

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos



Tese

**Caracterização físico-química, conteúdo em bioativos e perfil volátil de méis do
Rio Grande do Sul**

Francine Manhago Bueno Costa
Química de Alimentos
Mestre em Ciência e Tecnologia Agroindustrial

Pelotas, 2016

Francine Manhago Bueno Costa

**Caracterização físico-química, conteúdo em bioativos e perfil volátil de méis do
Rio Grande do Sul**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do Título de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Rui Carlos Zambiasi

Coorientador: Prof. Dr. Fábio Chaves

Pelotas, 2016

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

C837c Costa, Francine Manhago Bueno

Caracterização físico-química, conteúdo em bioativos e perfil volátil de méis do Rio Grande do Sul / Francine Manhago Bueno Costa ; Rui Carlos Zambiasi, orientador ; Fábio Clasen Chaves, coorientador. — Pelotas, 2016.

128 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2016.

1. Atividade antibacteriana. 2. Apicultura. 3. Compostos bioativos. 4. Mel. 5. Perfil volátil. I. Zambiasi, Rui Carlos, orient. II. Chaves, Fábio Clasen, coorient. III. Título.

CDD : 638.16

Francine Manhago Bueno Costa

Caracterização físico-química, conteúdo em bioativos e perfil volátil de méis do Rio Grande do Sul

Tese aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 15 de fevereiro de 2016

Banca examinadora:

Prof. Dr. Rui Carlos Zambiasi (Orientador). Doutorado em Food and Nutritional Science, pela University Manitoba, Canadá.

Prof. Dr. Fábio Clasen Chaves (Coorientador). Doutorado em biologia vegetal, pela Rutgers, Estados Unidos.

Prof^a. Dr^a Andressa Carolina Jacques. Doutorado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial, pela Universidade Federal de Pelotas, Brasil.

Prof^a. Dr^a. Caroline Dellinghausen Borges. Doutorado em Biotecnologia Agrícola, pela Universidade Federal de Pelotas, Brasil.

Prof. Dr. Jerri Teixeira Zanusso. Doutorado em Sciences Agronomiques, pelo Institut National Polytechnique de Toulouse, França.

Agradecimentos

Ao meu companheiro, Rafael de Moraes Costa, pela paciência, motivação, inspiração, compreensão, incentivo e apoio. Agradeço pela tua generosidade e por dar ouvidos as minhas reclamações, estresses que, por vezes, pareciam não ter fim, mas que sempre conseguimos superá-los juntos. Por tudo isso, meu amor, muito obrigada.

Aos meus pais, Glênio e Ângela Bueno, por todo o apoio, dedicação e por terem entendido todas as vezes que abdiquei de nossa vida social para poder me dedicar ao trabalho.

Aos meus dindos e primo, Atilio, Rosane e Diego Borges, pela estada de mais de 12 anos na casa de vocês. Sei que sempre fui considerada como filha, e assim me sinto. Muito obrigada dindo, por todo teu carinho, teu abraço no momento certo, tua compreensão e paciência comigo. Muito obrigada dinda pelo teu carinho e disponibilidade em corrigir os textos da qualificação e tese.

A minha irmã gêmea, Vivian Bueno Santos. Tenho sorte, pois já nasci junto da minha melhor amiga e tenho a certeza que jamais estarei só. Próxima ou não, nossa ligação será eterna. Obrigada irmã, contigo aprendi o quanto é valioso um “ok”. É dar um assunto por encerrado de maneira delicada, mas sem deixar explícito o que penso e ou o que realmente irei fazer... Lição valiosa, aprendida e colocada muito em prática durante esse período!

As tias, Sonia e Tania Bueno, avó Teresa Manhago e tia avó, Enilde Manhago pela dedicação e carinho que sempre dedicaram a mim, principalmente pela amorosa companhia em almoços, idas ao cinema, cafés da tarde que tanto contribuíram para que eu pudesse relaxar nos muitos finais de semana que teria passado sozinha. Pois assim, pude aproveitar e aprender com a sabedoria de vocês e retornar na segunda-feira revigorada para as minhas atividades de rotina.

Aos meus sogros, Nelson e Berenice de Moraes Costa pelo seu incentivo e compreensão. Nelson, foi através de tuas inúmeras perguntas pertinentes que pensei, repensei e estudei sobre fatos que até então me eram desconhecidos. E você, Berenice, com seu entusiasmo e positividade sempre torcendo por mim.

À minha amada sobrinha Cecília Correa, tão pequena e repleta de força. Em você, eu me espelho. Por causa de você, eu mudei. Você uniu uma família desunida. Você aproximou desconhecidos. Você reaproximou antigos amigos. Você colocou fé em corações, já sem esperanças. Por causa de você, hoje me considero melhor, mais simples e feliz, aprendi a descomplicar, ver sempre o lado bom das pedras que aparecem em meu caminho. Você foi meu maior presente de 2014 e tenho certeza que permanecerá assim pra toda a vida. Quando estiveres maior, terei imenso orgulho de ler isso para você. Tua tia te ama muito. Obrigada por existires e fazeres parte de nossas vidas. Para sempre: FÉ, FORÇA e FOCO!!!

Aos meus amigos Alessandra Haertel, André Martins, Marla Sganzerla, Rosimeri Brochado e Nara Antunes. A Alessandra pela sua amizade e companheirismo. Pelas muitas caronas, análises, almoços, todos regados com muito bom humor e leveza. Ao André, meu querido secretário, que falta você me faz. Meu companheiro de almoço, de ouvido, de risadas, obrigada por ter sempre uma palavra amiga e por sempre ter me ajudado com meus inúmeros atestados e pedidos de última hora. A minha grande amiga Marla que estava fisicamente ao meu lado no mestrado e por telefone e mídia social no doutorado. Muita obrigada por todas as vezes que me auxiliou no meu trabalho, principalmente pelas valiosas dicas nessa etapa final, com o tratamento de dados do perfil volátil. Nada como ter acesso a uma pessoa inteligentíssima, de caráter e que, além de tudo, é nossa amiga e madrinha! A queridíssima Meri, mais do que responsável pela limpeza e organização do laboratório, sempre foi uma pessoa generosa com todos. E tenho certeza que comigo ainda mais. Você sabe o quanto considero nossa amizade, seus conselhos, sua companhia, seu bom coração muito me salvaram em momentos difíceis. A minha amiga Nara pelo carinho e incentivo que, com seus ensinamentos de vida, contribuíram muito para a realização desse trabalho.

Aos estagiários, e mais do que isso “queridinhos da Fran”, como eu carinhosamente os chamava no nosso grupo, Bruna Bohmer Maas, Cinara Sousa, Josiane Hartwig, Susana Treptow, Tailise Zimmer e José Dilson da Silva. Juntos, mais do que trabalhamos, vivemos uma experiência linda e harmônica, de

companheirismo, amizade, trabalho e muita dedicação. Pelas muitas vezes que ficamos até tarde no campus, pelas férias dedicadas ao “nosso trabalho”, pelos congressos, pelos relatórios, enfim, por tudo.

Aos colegas do programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, André Bairros, Bianca Aranha, Cristina Jansen, Fernanda Krumrich, Fernanda Oliveira, Guilherme Dannenberg, Isadora de Oliveira, Jéssica Hoffmann, Julia Goldebeck, Lorena Silva, Mariângela Bruscatto, Rafael Schiavon, Roseane D’Ávila, Rosane Crizel, Scharlise da Silva, Sergio Fonseca, Simone Pacheco, Suzan Freda e Tassia Nievierowski. Em especial, a Roseane, Bianca e Jéssica. Rose saiba que sua serenidade me inspira, talvez não perceba, mas muito me ajudou com a sua atenção, disponibilidade, dedicação, sabedoria, tranquilidade e carinho. Bianca e Jéssica, que me auxiliaram nessa etapa final do meu trabalho, pelas várias vezes que deixaram de lado seus compromissos a fim de ajudar em algo que eu precisava. Tenho certeza que fizemos um ótimo trabalho o qual renderá muitos frutos!!!

Aos apicultores, especial Adi Pozzato e Lara Dutra. Com certeza, eu devo o meu trabalho aos senhores. A dificuldade que tive a princípio de coletar amostras, só foi superada após o prof. Jerri apresentar-me a Lara, que me apresentou o Sr. Adi, apicultor por mais de 40 anos e proprietário de uma indústria apícola da região de Santiago, chamada Apiário Padre Assis. Nunca irei me esquecer do tempo que estive aí e pude ter a prática do dia-a-dia em um apiário, de todo o saber que o Sr. Adi possui. Após o período com o senhor, eu retornei a Pelotas renovada, de tanta empolgação que eu tinha e tenho com essa área de atuação a qual eu admiro tanto. E isso, com certeza, eu devo aos senhores. Obrigada Lara, pela tua hospitalidade, generosidade, amizade. Foram dias felizes, em que o conhecimento estava atrelado a uma vida simples no campo, que me fez repensar minha vida, meus ideais, o que é realmente importante. Agradeço-lhe também pelas várias pessoas importantes que me apresentou no Congresso Apícola de Ijuí. Graças a essas pessoas que consegui adquirir amostras de todo o estado. Não tenho mais palavras para lhes dizer o quanto sou grata. Muito obrigada!

Aos professores, Andressa Jacques, Caroline Borges, Carla Mendonça, Claudio de Pereira, Fábio Chaves, Jerri Zanusso, Vanessa Pestana e Wladimir da Silva, por terem cedido do seu tempo e atenção, seja para o uso do laboratório, equipamentos, amostras ou do seu conhecimento sobre as inúmeras análises que eu fiz. Agradeço-lhe prof. Fábio Chaves por ter aceitado ser meu co-orientador,

sempre se mostrando disponível para ouvir meus questionamentos, reclamações e inúmeros pedidos. Como já lhe disse pessoalmente, tenho certeza que fizemos um ótimo trabalho juntos, acredito que uma boa equipe deve dispor de pessoas com perfis diferentes, mas que se complementam e nós fomos assim.

Ao prof. Rui Carlos Zambiasi, para sempre meu querido orientador. No dicionário da língua portuguesa, orientador, significa “especialista que orienta o aluno e o acompanha em sua vida acadêmica, que o aconselha nos rumos que deve seguir nos estudos imediatos, segundo suas aptidões, motivações, personalidade, predileções e de acordo com as possibilidades de colocação futura no mercado de trabalho”. Para mim, o senhor é isso e muito mais. O senhor mostra um exemplo de conduta profissional, tratando tudo e a todos com gentileza, delicadeza, sutileza, amizade e compreensão. Eu sempre falei para qualquer um que quisesse ouvir que o admirava muito. Minha admiração teve início na graduação no curso de Química de Alimentos e se perpetuou por esses quase doze anos de convivência. Sempre o vi, como aquela pessoa que não nos traz problemas, mas sim aquele que encontra a solução. E isso, a meu ver, é primordial para quem trabalha em pesquisa e tem uma relação de respeito com seus alunos. Pois, nós, alunos, já temos na nossa mente diversas dúvidas, receios, problemas. Na maioria das vezes, o que precisamos é que alguém com mais experiência nos guie para um caminho. Por tudo isso, sinto-me muito feliz, honrada e privilegiada por ter o prazer de ter tido uma convivência de tanto tempo com o senhor. Continue sendo assim sempre, uma pessoa admirável, querida, engraçada e respeitada por todos aqueles que prezam sua companhia. Obrigada por tudo!

À Universidade Federal de Pelotas, à Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”, ao Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). E principalmente à Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), pela aprovação e auxílio dado ao projeto “mel e própolis”, o qual foi muito importante para custear esse estudo.

*“Quando os ventos de mudança sopram,
umas pessoas levantam barreiras,
outras constroem moinhos de vento” .*

Érico Veríssimo

Resumo

BUENO-COSTA, Francine Manhago. **Caracterização físico-química, conteúdo em bioativos e perfil volátil de méis do Rio Grande do Sul**. 2016.128f. Tese de Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

A apicultura é uma atividade em crescente expansão econômica no país, pois está associada aos princípios que regem o atual mercado consumidor no qual se constata uma tendência que prevaleça o consumo de alimentos naturais. O mel é considerado o produto com maiores possibilidades de comercialização e de relevância econômica no mercado apícola do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Visando elucidar a qualidade do mel produzido no estado foram realizadas análises físico-químicas (umidade, sólidos solúveis, acidez, condutividade elétrica, coloração) de compostos bioativos (compostos fenólicos e carotenoides), da capacidade antioxidante *in vitro* (pelos métodos de DPPH e ABTS) e de atividade antibacteriana (CIM). Em conjunto a essas determinações foi proposto o estudo do perfil volátil (CG-MS) dos méis, com o objetivo de conferir especificidades que os caracterizassem quanto à origem botânica e geográfica. O conteúdo total de compostos fenólicos, flavonoides, ácidos fenólicos, carotenoides e as atividades antioxidantes (DPPH e ABTS) diferiram significativamente na maioria das amostras testadas, apresentando resultados entre 61,7 a 111,37mgEAG.100g⁻¹; 2,98 a 10,46mgEQ.100g⁻¹; 0 a 65,47mgEAC.100g⁻¹; 0,56 a 6,19mgβ-caroteno.Kg⁻¹; 2,48 a 17,21mgEAQ.100g⁻¹; e de 8,24 a 112,48mgtrolox.100g⁻¹, respectivamente. Todas as amostras de méis apresentaram atividade antibacteriana frente às quatro bactérias testadas (*Shigella dysenteria*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*), com resultados de Concentração Inibitória Mínima (CIM) variando de 10 a 350mg.mL⁻¹ de água. As amostras apresentaram valores adequados de pH (3,85), condutividade elétrica (685μS.cm⁻¹) e conteúdo de hidroximetilfurfural (5,18mg.Kg⁻¹) porém 42% dos méis apresentaram teores de umidade e ou conteúdo de acidez fora do limite preconizado pela legislação brasileira. Os flavonoides catequina, epicatequina e hesperitina foram os compostos fenólicos presentes em maior concentração nos méis. Por meio da determinação do perfil volátil foi possível identificar aromas característicos de cada região, metropolitana, nordeste, ocidental, sudeste e sudoeste. E ainda, sendo possível identificar a florada de eucalipto nas amostras M18 e M19, provenientes da região sudoeste do estado do Rio Grande do Sul.

Palavras chave: atividade antibacteriana; apicultura; compostos bioativos, mel e perfil volátil.

Abstract

BUENO-COSTA, Francine Manhago. **Physico-chemical characterization, bioactive content and volatile profile of honeys of Rio Grande do Sul.** 2016 128f. Tese de Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

Apiculture is an activity with substantial economic growth in Brazil as it is associated with the principles of a current market of notable consumption of natural foods. Honey is a product considered with higher trends possibility and with economy relevance in the apiculture market of the estate of Rio Grande do Sul in the south of Brazil. In order to highlight the quality of the honey produced in this state, it was performed some physical-chemical analysis (moisture, soluble solids, acidity, electrical conductivity, coloring) of bioactive compounds (phenolic compounds and carotenoids) of antioxidant capacity in vitro (by the methods of DPPH and ABTS) and antibacterial activity (MIC). Along with these results, it was proposed the volatile profile (CG-MS) in the honeys types with the purpose to check specific features related to its botanic and geographic source. The total content of phenolics, flavonoids, phenolic acids, carotenoids and antioxidant activity (DPPH and ABTS) differed significantly to the most of the samples tested presenting results between 61,7 and 111,37mgEAG.100g⁻¹; 2,98 and 10,46mgEQ.100g⁻¹; 0 and 65,47mgEAC.100g⁻¹; 0,56 and 6,19mgβ-carotene.kg⁻¹; 2,48 and 17,21mgEAQ.100g⁻¹; and from 8,24 to 112,48mgtrolox.100g⁻¹, respectively. All the honey samples have showed antibacterial activity if compared to the four bacteria tested (*Shiguella dysenteria*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Babillus cereus*) with results of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) ranging from 10 to 350mg. mL⁻¹ of water. The results of the samples were suitable with regards to pH (3,85), electrical conductivity (685μS.cm⁻¹) and hydroxymethylfurfural content (5,18mg.kg⁻¹), however 42% of the honeys tested have showed moisture content and or acidity content out of the limits defined by Brazilian laws. The flavonoids catechin, epicatechin and hesperetin were the phenolic compounds presented with highest concentration in the honeys tested. Through the determination of volatile profile, it was possible to identify the typical aromas of each region such as urban, northeast, western, southeast and southwest. Furthermore, it was possible to identify the *Eucalyptus* honey in the samples M18 and M19 that came from southwest of Rio Grande do Sul state.

Keywords: antibacterial activity; beekeeping; bioactive compounds; honey and volatile profile.

Figuras

Figura 1	Via biossintética de alguns compostos fenólicos.....	26
Figura 2	Estruturas químicas mais comuns das classes de flavonoides.....	28
Figura 3	Estruturas químicas dos principais ácidos fenólicos.....	29
Figura 4	Estruturas químicas dos principais carotenoides.....	31
Figura 5	Representação da extração dos compostos voláteis por SPME.....	37
Figura 6	Mapa do estado do Rio Grande do Sul, com regiões e municípios da amostragem.....	44
Figura 7	Conteúdo total de compostos fenólicos em amostras de mel comercializadas no estado do Rio Grande do Sul, Brasil.....	50
Figura 8	Conteúdo total de flavonoides em amostras de mel comercializadas no estado do Rio Grande do Sul, Brasil.....	52
Figura 9	Conteúdo total de ácidos fenólicos nos méis comercializados no estado do Rio Grande do Sul, Brasil.....	53
Figura 10	Conteúdo total de compostos fenólicos, flavonoides e ácidos fenólicos em amostras de mel comercializadas no estado do Rio Grande do Sul, Brasi.....	54
Figura 11	Conteúdo total de carotenoides nos méis comercializados no estado do Rio Grande do Sul, Brasil.....	55
Figura 12	Atividade antioxidante dos méis comercializados no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Atividade antioxidante frente ao radical DPPH.....	57
Figura 13	Atividade antioxidante dos méis comercializados no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Atividade antioxidante frente ao radical ABTS.....	58

Figura 14	Representação gráfica dos padrões de ácidos fenólicos e flavonoides a 280nm.....	75
Figura 15	Representação gráfica dos padrões de ácidos fenólicos e flavonoides a 320nm	75
Figura 16	Representação gráfica dos padrões de ácidos fenólicos e flavonoides a 360nm.....	76
Figura 17	Representação gráfica dos compostos fenólicos encontrados na amostra 9. Detecção a 320 nm.....	80
Figura 18	Representação gráfica do perfil volátil da amostra M1.....	93
Figura 19	Representação gráfica do perfil volátil da amostra M11.....	94
Figura 20	Análise de componentes principais (PCA) em compostos voláteis de méis provenientes do estado do Rio Grande do Sul, Brasil.....	95
Figura 21	Escala multidimensional da análise de componentes principais (PCA) em compostos voláteis de méis provenientes do estado do Rio Grande do Sul, Brasil.....	96
Figura 22	Estrutura hotrienol.....	97
Figura 23	Dados do perfil de fragmentação do composto hotrienol na amostra M18.....	97

Tabelas

Tabela 1	Amostras de méis com respectivos dados de coleta: município, origem botânica e coloração.....	43
Tabela 2	Classificação quanto à cor do mel segundo a escala <i>Pfund</i>	45
Tabela 3	Coloração dos méis através de escala <i>Pfund</i>	48
Tabela 4	Atividade antibacteriana em méis do estado do Rio Grande do Sul, Brasil.....	59
Tabela 5	Coeficiente de correlação de <i>Pearson's</i> para compostos fenólicos totais, flavonoide total, atividade antioxidante e cor em amostras de méis provenientes do estado do Rio Grande do Sul, Brasil.....	60
Tabela 6	Gradiente de concentração para a determinação de compostos fenólicos individuais.....	70
Tabela 7	Composição físico-química de méis provenientes do estado do Rio Grande do Sul, Brasil.....	71
Tabela 8	Ácidos fenólicos e flavonoides identificados por Cromatografia Líquida (CL) em méis do Rio Grande do Sul.....	78
Tabela 9	Coeficiente de correlação de <i>Pearson's</i> para composição físico-química e o somatório dos compostos fenólicos em amostras de méis oriundos do Rio Grande do Sul, Brasil.....	81
Tabela 10	Amostras de méis com respectivas dados de coleta: região, município, ano de colheita, origem botânica e coordenadas geográficas.....	86
Tabela 11	Compostos de aroma isolados em méis do estado do Rio Grande do Sul, Brasil.....	90
Tabela 12	Dados dos compostos encontrados com maior relevância na discriminação do perfil volátil quando aplicada à análise de componentes principais.....	98

Sumário

1	Introdução geral.....	15
1.1	Justificativa.....	16
1.2	Objetivo.....	18
1.3	Hipótese.....	18
2	Revisão de literatura.....	19
2.1	Histórico.....	19
2.2	Mercado apícola.....	20
2.3	Legislação.....	23
2.4	Compostos bioativos.....	25
2.5	Benefícios ao organismo humano.....	32
2.6	Origem floral e geográfica de méis.....	33
2.7	Compostos voláteis.....	35
3	Capítulo 1 – Relação entre compostos bioativos com as atividades antioxidante e antibacteriana em méis do estado do Rio Grande do Sul.....	39
3.1	Introdução.....	39
3.2	Material e método.....	43
3.2.1	Amostras.....	43
3.2.2	Padrões e reagentes.....	44
3.2.3	Determinação da coloração.....	44
3.2.4	Determinação dos compostos bioativos.....	45
3.2.5	Determinação das atividades antioxidantes <i>in vitro</i>.....	46
3.2.6	Determinação da atividade antibacteriana (CIM)	47
3.2.7	Análise estatística.....	48
3.3	Resultado e discussão.....	48
3.3.1	Coloração.....	48
3.3.2	Compostos bioativos.....	49

3.3.3	Atividades antioxidantes <i>in vitro</i>	56
3.3.4	Atividade antibacteriana (CIM)	58
3.3.5	Estudo da correlação.....	59
3.4	Conclusão.....	61
4	Capítulo 2 – Atributos de qualidade em méis provenientes do Rio Grande do Sul.....	62
4.1	Introdução.....	62
4.2	Material e método.....	65
4.2.1	Amostras.....	66
4.2.2	Padrões e reagentes.....	66
4.2.3	Determinação físico-química.....	66
4.2.4	Determinação de compostos fenólicos (cromatografia líquida).....	69
4.2.5	Análise estatística	70
4.3	Resultado e discussão.....	71
4.3.1	Composição físico-química.....	71
4.3.2	Compostos fenólicos.....	74
4.3.3	Estudo da correlação	81
4.4	Conclusão.....	82
5	Capítulo 3 – Investigação da origem botânica e geográfica através da determinação do perfil volátil de méis do Rio Grande do Sul.....	83
5.1	Introdução.....	83
5.2	Material e método.....	85
5.2.1	Amostras.....	85
5.2.2	Padrões e reagentes.....	87
5.2.3	Determinação do perfil volátil.....	87
5.3	Resultado e discussão.....	87
5.4	Conclusão.....	90
6	Considerações finais.....	100
	Referências.....	102
	Apêndice.....	127

1 Introdução geral

A apicultura é uma atividade em crescente expansão econômica no país, pois está associada aos princípios que regem o atual mercado consumidor, em que a tendência é que prevaleça o consumo de alimentos naturais, ricos em compostos bioativos, com ação antioxidante e que ainda contribuam para a sustentabilidade, atuando nos segmentos ambiental, econômico e social.

O segmento apícola se caracteriza por possuir um conjunto de produtos naturais produzidos pela abelha: como larvas de abelha e a própria abelha, apitoxina, cera, geléia real, pólen, própolis e mel (CRANE, 2009).

Além dos produtos, é possível explorar a criação racional de abelhas e rainhas com genéticas diferentes, além do aluguel de colmeias para a polinização. A polinização realizada pelas abelhas contribui para o equilíbrio do ecossistema, bem como pela a manutenção da biodiversidade.

O mel também pode ser utilizado como forma de monitoramento de contaminação ambiental (PISANI et al., 2008), através da análise dos metais pesados presentes no méis coletados de colmeias situadas em regiões com muita poluição, os quais apresentam toxicidade por não possuírem função biológica para o ser humano (YÜCEL & SULTANOGLU, 2012; ANDRADE et al., 2014).

Dentre os produtos apícolas, o mel é o que apresenta maiores possibilidades de exploração, comercialização e de relevância econômica no mercado apícola gaúcho. Essa facilidade de exploração e comercialização é devido a sua utilização em diversas indústrias, sejam elas, farmacêuticas, cosméticas e de alimentos (BUAINAIN & BATALHA, 2007).

Há milhares de anos, o mel tem sido empregado como medicamento, principalmente devido às atividades anti-inflamatória, antimicrobiana e antioxidante, no combate a resfriados, na cicatrização de feridas, no aumento da resposta imune, na recuperação do tecido epitelial, na promoção do desbridamento autolítico, no tratamento de úlceras e de dermatite atópica e na redução da dor (VANDAMME et

al., 2013; CHOI et al., 2014; SARHAN, HASSAN, AZZAZY, 2015; SOPO et al., 2015; ORYAN, ALEMZADEH & MOSHIRI, 2016).

O mel é conhecido como sendo a única forma concentrada de açúcar naturalmente disponível em todo o mundo (PYRZNSKA & BIESAGA, 2009) cuja composição é de aproximadamente 75% monossacarídeos e de 10-15% de dissacarídeos, os quais são responsáveis pelas propriedades de viscosidade, higroscopicidade e granulação (KAMAL & KLEIN, 2011; SILVA et al., 2016).

Essa mistura complexa de carboidratos, também é composta por uma minoria de outros constituintes, como: aminoácidos (alanina, arginina, cisteína, fenilalanina, glicina, histidina, glutamina, isoleucina, leucina, lisina, lipídios, metionina, prolina, tirosina, treonina, triptofano) (REBANE & HERODES, 2010), vitaminas (ácido ascórbico, niacina, piridoxina) (KARABAGIAS et al., 2014) compostos voláteis (álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, ácidos orgânicos, compostos nitrogenados e derivados de furanos) (ALIFERIS et al., 2010; ALISSANDRAKIS et al., 2011), compostos bioativos (ácidos fenólicos, flavonoides e carotenoides) (BARROS et al., 2007; Ferreira et al., 2009; HUANG et al., 2015) e minerais (cádmio, cálcio, cobre, cobalto, chumbo, ferro, fósforo, magnésio, manganês, potássio, sódio, selênio, e zinco) (ANJOS, ABATE & GRASSI, 2011; POHL, SERGIEL & PRUSISZ, 2011; ANDRADE et al., 2014).

Por isso, a sua utilização na nutrição humana não deveria se limitar à sua característica adoçante, já que se trata de um alimento com alta qualidade de fonte energética (BILANDZIC et al., 2011), além de possuir outras substâncias benéficas ao equilíbrio dos processos biológicos do nosso corpo.

Quantitativamente, os compostos bioativos estão em proporções minoritárias, mas muito deles são responsáveis pelas propriedades benéficas do mel, e dentre estes, destacam-se os compostos fenólicos (flavonoides e ácidos fenólicos) que são indicados por diversos estudos como sendo responsáveis pela atividade antioxidante, e a vitamina E (ALQARNI, OWAYSS & MAHNOUD, 2012).

O mel é um produto natural produzido principalmente a partir do néctar e pólen secretado por plantas com flores, coletado e transformado pelas abelhas (*Apis mellifera*) junto com substâncias específicas próprias (POHL & SERGIEL, 2010; ANDRADE et al., 2014). Naturalmente esses compostos recolhidos a partir de um amplo espectro de flores resultam em um mel com diferentes cores, aromas e sabores (VENTURINI et al. 2007).

Pesquisas científicas de diversos campos têm investigado as propriedades químicas e biológicas dos méis, porém só recentemente houve um aumento no interesse nas aplicações como antioxidante nos tratamentos médicos de diferentes doenças causadas por estresse oxidativo (SPILIOTI et al., 2014) ou no seu uso como antimicrobiano (SANCHEZ-MALDONADO, SCHIEBER & GANZLE, 2011) e ou anti-inflamatório nos tratamentos contra feridas, desbridamento, e impulso ao melhor funcionamento do sistema imunológico (ORYAN, ALEMZADEH, MOSHIRI, 2016). Como consequência desse interesse, o mercado mundial e doméstico do mel tornou-se mais exigente, onde os grandes consumidores têm padrões de qualidade elevados que se traduzem em requisitos técnicos, organizacionais e em processos de controle sofisticados.

A composição do mel é variável e depende de alguns fatores da natureza ou do homem, como: diferentes floradas, genética de abelhas, clima, solo, manejo, processamento, armazenamento e comercialização (ALVES et al., 2005; BLASA et al. 2006; BALTRUSAITYT; et al., 2007), tornando possível verificar a qualidade do mel produzido e até mesmo a sua origem geográfica e botânica através de sua composição físico-química.

Através do perfil volátil, ou seja, da análise dos compostos voláteis presentes no produto, é possível identificar compostos específicos de uma florada, também denominados de marcadores. Com auxílio de programas estatísticos que agrupam vários compostos os quais sejam característicos de alguma região geográfica e ou florada, possibilita a correta identificação de uma determinada amostra de mel.

1.1 Justificativa

Inexistência de dados sobre avaliação do conteúdo de bioativos e do perfil volátil, que podem ser utilizados como parâmetros para a identificação da origem botânica e geográfica de méis produzidos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

1.2 Objetivo

Realizar a caracterização físico-química e avaliar a composição em bioativos, o perfil volátil e a atividade antioxidante e antimicrobiana, dos méis produzidos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

1.3 Hipótese

Os méis apresentam correlações positivas entre conteúdo de bioativos, cor, atividade antioxidante e antimicrobiana.

Méis de diferentes origens apresentam perfis voláteis significativamente diferenciados, os quais podem ser utilizados para caracterizar determinada origem geográfica e/ou botânica.

2 Revisão de literatura

2.1 Histórico

As antigas civilizações já utilizavam há 2000 A.C. o mel para fins terapêuticos e conservativos em humanos e ou alimentos. Os filósofos gregos, Homer, Pitágoras, Demócrito, Hipócrates, Aristóteles, o consideravam como sendo um medicamento, que se ingerido regularmente, poderia preservar a saúde, prolongando a vida do indivíduo. A importância do mel na medicina também foi mencionada na bíblia no antigo testamento, em que os povos israelitas agradeciam a Deus pelos produtos de sua primeira colheita e ofertavam mel como presente; já os egípcios o utilizavam para conservar corpos mumificados, e os babilônicos e os gregos para conservar os corpos de reis e generais mortos em grandes batalhas (PARK et al., 2003; PEREIRA et al., 2003; BOGDANOV, 2009).

Na antiguidade, as abelhas utilizavam troncos de árvores para a produção de mel. O ser humano pensando em seu conforto buscou uma forma que facilitasse o manejo das abelhas para a coleta do mel, bem como colocá-las mais próximas de suas casas, então, os gregos resolveram dispor seus enxames em recipientes em formas de sino feitos de palha trançada chamada de colmo, o qual deu origem à palavra colmeia. Nessa época, a abelha já assumia grande importância para os homens, sendo, inclusive, considerada sagrada e utilizada como oferenda aos deuses, como presentes em celebrações e utilizada como moeda de troca. Com o passar dos anos, as abelhas passaram a ter grande importância econômica a serem consideradas como símbolo de poder para a realeza, sacerdotes, duques e condes, fazendo parte de brasões, cetros, coroas, moedas, vestimentas reais, etc. Por muito tempo, o mel foi o único alimento utilizado com o sabor doce, com o passar dos anos ele foi substituído gradativamente pelos açúcares refinados, extraídos da cana-de-açúcar e beterraba (O MEL, 2003).

No Brasil, os povos indígenas utilizavam abelhas nativas para a produção de mel de forma extrativista e predatória até que em 1839 o Imperador Dom Pedro II autorizou o Padre Antônio José Pinto Carneiro importar abelhas europeias,

denominadas melíponas e trígonas (abelhas sem ferrão) da Cidade do Porto, Portugal, para instalação do apiário imperial na Praia Formosa-RJ (GUIMARÃES, 1989; BRAGA et al., 1998).

No entanto, em 1956, o professor Warwick E. Kerr trouxe para o Brasil as abelhas africanas conhecidas por serem altamente produtivas com a finalidade de comparar a sua capacidade produtiva, rusticidade e agressividade com as abelhas européias. Essas abelhas foram introduzidas em Camaquã, estado de São Paulo com o objetivo implantar um programa de melhoramento genético que tornasse possível incentivar a produção e a melhor produtividade do segmento apícola no país. Após a enxameação de 26 colmeias que continham abelhas rainhas africanas em quarentena, teve início de forma acidentada o processo de cruzamento natural com as abelhas de origem europeia, já difundidas em todo o território brasileiro, levando à formação de um poli-híbrido (*Apis mellifera scutellata*) considerado produtivo, também denominado de abelhas africanizadas, mas que, no início, causou um grande impacto negativo decorrente da agressividade das abelhas e da deficiência que os apicultores tinham em trabalhar com uma abelha diferente. Com isso, os enxames foram dizimados e houve até mesmo o abandono da atividade apícola (GUIMARÃES, 1989).

Em 1970, a apicultura brasileira passou por um período de recuperação e expansão, o qual foi primordial para que ocorresse o desenvolvimento de técnicas adequadas de manejo a fim de que apicultura pudesse ser melhor explorada e praticada em todos os estados brasileiros (SEBRAE, 2013; SOUZA, 2004).

Na atualidade o conhecimento sobre os tratamentos terapêuticos com mel, pólen, geléia real e picadas de abelha (liberação de veneno, apitoxina) é denominado de apiterapia, a qual tem sido utilizada como forma de medicina preventiva no tratamento de algumas doenças (INOUE et al., 2005).

2.2 Mercado apícola

Os últimos três séculos foram marcados pela revolução industrial e econômica, por novas técnicas produtivas que aceleraram a produção, mas que trouxeram várias mudanças ao mundo, como a concentração de riquezas, desigualdade social e prejuízos ao meio ambiente, causando a impossibilidade de subsistência para as gerações futuras. Estudiosos e intelectuais observando esses

prejuízos iniciaram estudos que associassem as formas de desenvolvimento com a melhoria da interação humana com o meio ambiente e com outros seres humanos como estratégia nas organizações políticas e econômicas (OLIVEIRA et al., 2012A). Nascia assim, em 1987 o termo sustentabilidade, definido oficialmente pela Comissão Mundial sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento (CMMAD) da Organização das Nações Unidas (ONU), como sendo “a capacidade de satisfazer as necessidades do presente sem comprometer a capacidade das gerações futuras de satisfazerem suas próprias necessidades” (CMMAD, 1988).

Em 1994, foi proposto por Elkington, o conceito de sustentabilidade chamado “*Triple Bottom Line*”, também conhecido em português como modelo PPL (pessoas, planeta e lucro). A proposta era que as organizações estabelecessem um modelo econômico cujo empreendimento fosse viável e atraente aos investidores, que não causassem danos permanentes ao meio ambiente e que houvesse a preocupação em estabelecer ações justas para a sociedade (trabalhadores, parceiros, consumidores).

O mercado de produtos alimentares vem passando por grandes transformações, onde os consumidores estão mais informados sobre as características nutricionais e químicas dos alimentos, tornando-os mais exigentes pela busca de alimentos com qualidade, saudáveis e que apresentam informações como identificação de origem e associação com a natureza (BUAINAIN & BATALHA, 2007).

O segmento apícola vem ao encontro desse novo perfil de mercado consumidor que busca um alimento natural, funcional e saudável, que esteja inserido num cenário de alimentação sustentável. A apicultura é considerada uma atividade sustentável, pois atende aos requisitos da sustentabilidade: ambiental, econômica e social.

O ambiental refere-se à polinização de espécies nativas e cultivadas e a conservação da vegetação, uma vez que se precisa de pequenas áreas para a instalação de apiários, portanto, não havendo a necessidade do desmatamento para se criar abelhas; o econômico é o gerador de renda para os produtores; e o social, que intensifica a ocupação de mão-de-obra familiar no campo, com a diminuição do êxodo rural (SOMMER, 1998; ALCOFORADO FILHO, 1998, OLIVEIRA et al., 2012B).

Com isso, o consumo do mel tem crescido de forma considerável nos últimos anos, estimulado por essas características e pelas comprovadas propriedades funcionais e terapêuticas (BUAINAIN & BATALHA, 2007).

A Europa é o segundo maior produtor mundial e possui grande mercado consumidor de mel, porém devido à diminuição da produção de mel em decorrência de diversos prejuízos, como seca e morte de enxames ocorridas nos últimos anos, depende das importações para abastecer o mercado interno. Estima-se que 40% das necessidades de consumo sejam abastecidas pelas importações (EUROSTAST, 2015).

No entanto, o mercado mundial e doméstico de mel ainda carece de estruturação, que deve estar caracterizada por uma estrutura estável, com produtores firmemente posicionados, canais de comercialização bem definidos e linhas de produtos bem estabelecidas. A evolução do mercado apícola é marcada pela exploração de algumas particularidades, como a tendência que os consumidores prefiram e valorizem méis específicos, oriundos de determinada região, que apresentem método de produção adequado e que assegurem a sua qualidade, utilizando um sistema sustentável, além de possuir características sensoriais definidas (BUANAIN & BATALHA, 2009).

O país tem possibilidade de se tornar um dos líderes mundiais em produção de mel devido às condições favoráveis que possui, como: a biodiversidade da flora, características climáticas, ampla área territorial ainda inexplorada com presença de mata nativa, oferta de mel o ano inteiro, genética e produtividade das abelhas (abelhas africanizadas são mais resistentes a doenças, não havendo necessidade de utilização de antibióticos na sua criação) desde que haja o domínio das técnicas apícolas (FREITAS et al., 2004; ANDRADE et al., 2005; SEBRAE, 2009).

O Brasil ocupou uma posição importante no comércio internacional, passando a ser o oitavo maior exportador mundial, com 96,8 milhões de toneladas de mel exportadas em 2014 (ABEMEL). Esse resultado foi alcançado devido ao investimento em políticas que visam o enquadramento do mel brasileiro nos padrões de qualidade exigidos no mercado internacional bem como a promoção comercial e inserção de produtos apícolas no exterior, desenvolvido em conjunto com parceiros e entrepostos com parte do projeto “Brazil Let’s Bee” (ABEMEL, 2014).

Em 2015, houve uma queda no preço do mel no mercado internacional, fazendo com que o valor do produto fosse reduzido em 17,10% e o volume exportado baixasse 12,29% em relação a 2014. No mesmo ano, o Rio Grande do Sul foi o sétimo estado maior exportador do Brasil, com 596.6128kg, ficando atrás de estados como Santa Catarina, São Paulo, Paraná, Piauí, Minas Gerais e Ceará (ABEMEL, 2016).

O Rio Grande do Sul é o estado com maior consumo de mel, atingindo 400 gramas de mel por habitante/ano, enquanto que o restante do país consome somente 250 a 300 gramas de mel habitante/ano entre as classes alta e média; provavelmente devido ao tipo de colonização e, por consequência, da herança cultural européia, principalmente dos países Alemanha e Itália que são há muitos anos grandes apreciadores de mel (PAULA-NETO & ALMEIDA-NETO, 2006).

2.3 Legislação

O objetivo das normas de fiscalização é estabelecer parâmetros de qualidade que possam comprovar a identidade e qualidade do produto. Portanto, as normas técnicas precisam levar em consideração parâmetros físico-químicos e sensoriais que sirvam para comprovar a maturidade, seguridade e grau de pureza do mel (SILVA et al., 2016). Como Normas Internacionais, é utilizado o *Codex Alimentarius* e como Norma Brasileira se utiliza a instrução normativa do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento que estabelece o regulamento técnico de identidade e qualidade do mel (BRASIL, 2000).

O mel é definido como “o produto natural adoçado produzido pelas abelhas melíferas a partir do néctar das plantas ou de secreções de partes vivas de plantas ou de excreções de insetos sugadores de partes vivas das plantas, que as abelhas recolhem, transformam por combinação com substâncias específicas próprias, depositam, desidratam, armazenam e deixam amadurecer” (Codex Alimentarius, 2001).

O produto para ser exportado deve seguir às normas do MAPA (2000), onde os principais parâmetros dizem respeito ao produto final destinado ao mercado, como, diferentes colorações (claro ao âmbar escuro) e estágios físicos (líquido, pastoso ou cristalizado), não pode haver adição de produtos que possam alterar a sua composição, exceto a incorporação natural de cera e pólen. Devem também

obedecer aos seguintes parâmetros físico-químicos: açúcares redutores para mel floral no mínimo de $65\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ e para o melato ou mistura com mel floral de no mínimo de $60\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$; umidade de $20\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$; sacarose aparente para mel floral de no máximo de $6\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ e para o melato, ou mistura com mel floral de no máximo de $15\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$; sólidos insolúveis em água de no máximo de $0,1\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$; minerais no mel floral de no máximo de $0,6\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ e para o melato ou mistura com mel floral de no máximo $1,2\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$; acidez de 50 miliequivalentes. kg^{-1} , no mínimo de 8 *Göthe* na escala da atividade diastásica; e de hidroximetilfurfural de no máximo de $60\text{mg}\cdot \text{kg}^{-1}$. Deve conter grãos de pólen e não deve apresentar sinais de fermentação.

Em 2006, ocorreu um embargo europeu ao mel brasileiro que perdurou por dois anos. O Brasil não teve muitos prejuízos devido a essa imposição da Europa, pois acabou por exportar para os Estados Unidos. Por outro lado, esse problema impulsionou a implantação de um programa de rastreabilidade, de protocolos técnicos em sistemas de pós-colheita, BPF's (Boas Práticas de Fabricação) e APPCC's (Análises de Perigos e Pontos Críticos de Controle) (PAULA, 2008; SEBRAE, 2009). E ainda, aqueles estabelecimentos que realizam a manipulação, preparação, embalagem e armazenamento de mel e produtos apícolas destinados ao mercado europeu devem atender aos regulamentos de números 178/2002, 852/2004 e 853/2004 da União Européia e devem ser controlados pelo DIPOA (Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal) por meio do Serviço de Inspeção de Produtos Agropecuários (SIPAGs) das respectivas superintendências do MAPA nos estados. O regulamento 178/2002 cria uma autoridade europeia para a segurança de alimentos, através da proposta de padronização das regras aos estados membros da comunidade europeia. O regulamento 852/2004 tem enfoque no APPCC; e o regulamento 853/2004 visa estabelecer regras específicas de higiene aplicáveis aos gêneros alimentícios de origem animal (CE, 2002,2004).

A comunidade europeia já apoia iniciativas de seguridade de alimento, onde ela regulamenta produtos que possam ser comprovados como originais, utilizando para isso, algumas indicações no produto, tais como, denominação de origem protegida (DOP), indicação geográfica protegida (IGP), especialidade tradicional garantida (ETG) (CE. Diretiva, 2001/110, 2001; KARABAGIAS et al., 2014).

Na busca de um maior espaço no mercado europeu, o Brasil terá que num futuro próximo se adaptar a essa realidade para enfim alavancar e consolidar as exportações de mel e produtos apícolas. Para isso, é necessário que se faça

adequações à legislação brasileira, bem como a implantação de uma combinação de métodos que sejam capazes de identificar a origem botânica e ou geográfica.

2.4 Compostos Bioativos

As propriedades bioativas dos compostos fenólicos são muito bem conhecidas devido a inúmeras pesquisas (PYRZNSKA & BIESAGA, 2009; IGNAT, VOLF & POPA, 2011; QUIDEAU et al., 2011), envolvendo a descrição de suas características químicas, físicas e biológicas.

Nas plantas, uma quantidade significativa de carbono e de energia é direcionada para a produção de moléculas, cuja função não está completamente elucidada. O metabolismo central das células das plantas está baseado nas vias respiratórias, de glicólise e do ciclo de ácido cítrico, em que é produzida a grande maioria das moléculas e dos compostos envolvidos nos mecanismos de defesa e de sobrevivência das plantas (LOBO & LOURENÇO, 2007).

Os compostos fenólicos são geralmente produzidos como um mecanismo de defesa contra um ataque ao tecido da planta ou em um ambiente de estresse, como por exemplo, condições de temperatura desfavorável, excesso ou falta de luminosidade, estresse hídrico, pH e ataque de patógenos que possam causar infecções e ou ferimentos (NACZK & SHAHIDI, 2004; REA et al., 2011). Os compostos obtidos nessas condições são denominados de metabólitos secundários, uma vez que não estão diretamente relacionados com as funções de crescimento e desenvolvimento do tecido da planta e são normalmente encontrados em determinados tecidos e órgãos e em fases específicas do crescimento e desenvolvimento da planta (metabólitos primários) (BUCHANAN & JONES, 2000)

A estrutura básica de um composto fenólico é um anel de benzeno que apresenta um ou mais substituintes hidroxilas. Um resumo da complexa via de fenil propanóide, sendo representada e descrita através das etapas mais importantes para a formação de alguns compostos fenólicos está apresentado na figura 1. A via mais importante na biossíntese de compostos fenólicos é a via do ácido chiquímico, em que uma molécula de ácido fosfoenolpiruvico (PEP) derivado da glicólise, e uma molécula eritrose-4-fosfato derivado da via das pentoses fosfato, são combinados resultando na formação do DAHP (3-desoxi-arabinoheptulsonato-7-fosfato), o qual é ciclizado e reduzido para formar chiquimato.

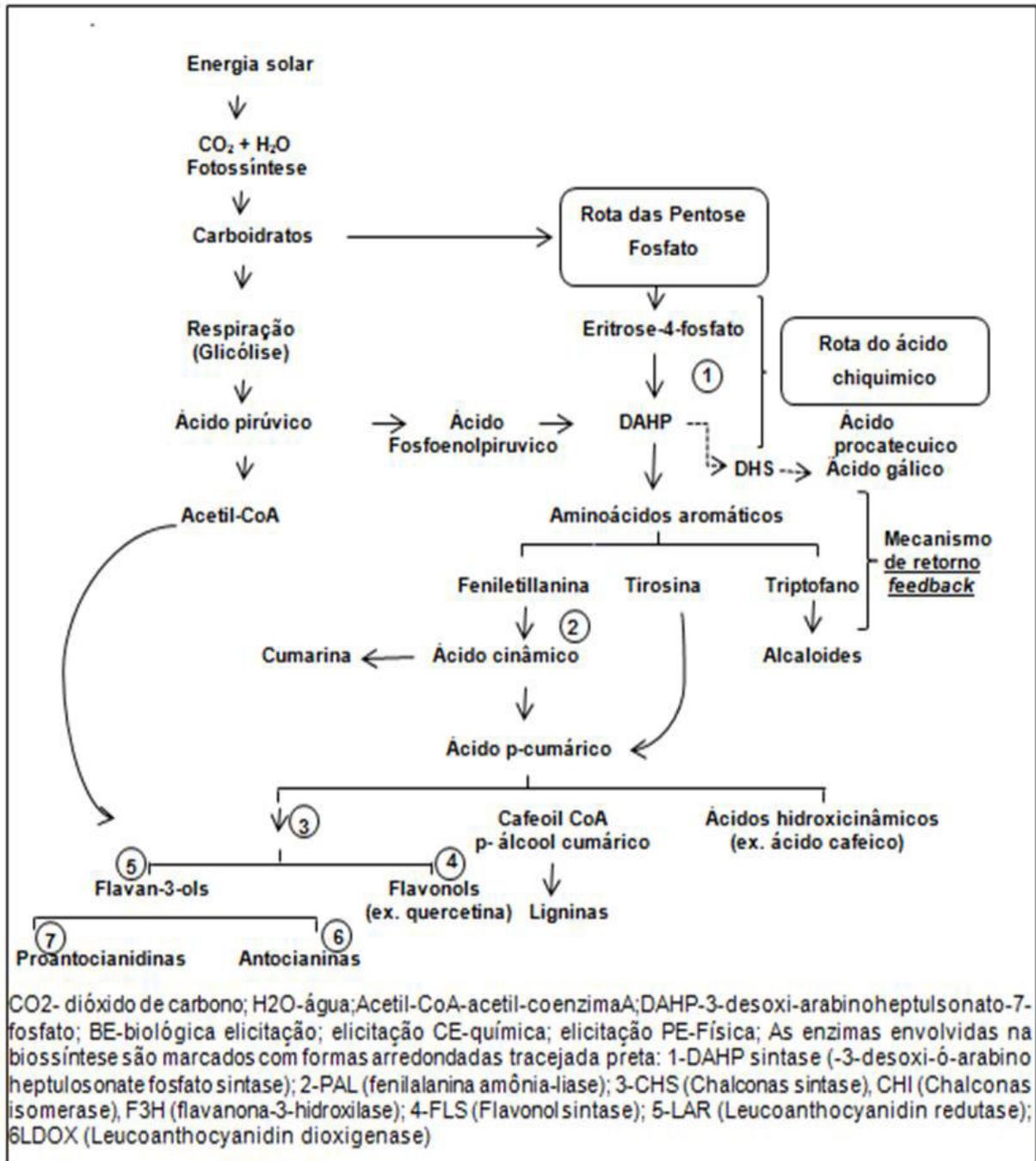


Figura 1 - Via biossintética de alguns compostos fenólicos (adaptado de Diaz et al., 2016)

De acordo com a figura 1, é possível notar que a via do ácido chiquímico também está envolvida no metabolismo primário, para a formação de proteínas, e que, portanto, também estão relacionadas com a formação dos compostos fenólicos e de ácidos fenólicos. A via para síntese de ácidos fenólicos começa a partir de açúcares, aminoácidos aromáticos (fenilalanina) e alguns casos tirosina. No mecanismo de *feedback* ocorre a produção maior de triptofano que irá induzir o fluxo

do carbono em direção à produção de fenilalanina e tirosina. Isso é muito interessante, pois a produção dos compostos fenólicos mais complexos inicia com a desaminação da fenilalanina com o ácido cinâmico para a produção de cumarinas e na conversão do ácido p-cumárico (derivado da tirosina). A produção do ácido p-cumárico dá origem à formação dos ácidos hidroxicinâmicos. Através da ação de enzimas o ácido p-cumárico é convertido em flavonóis e flavan-3-óis (KARAKAYA, 2004; AMAROWICZ et al., 2009; COHEN & KENNEDY, 2010; PATRA et al., 2013; SHAHIDI & AMBIGAIOALAN, 2015).

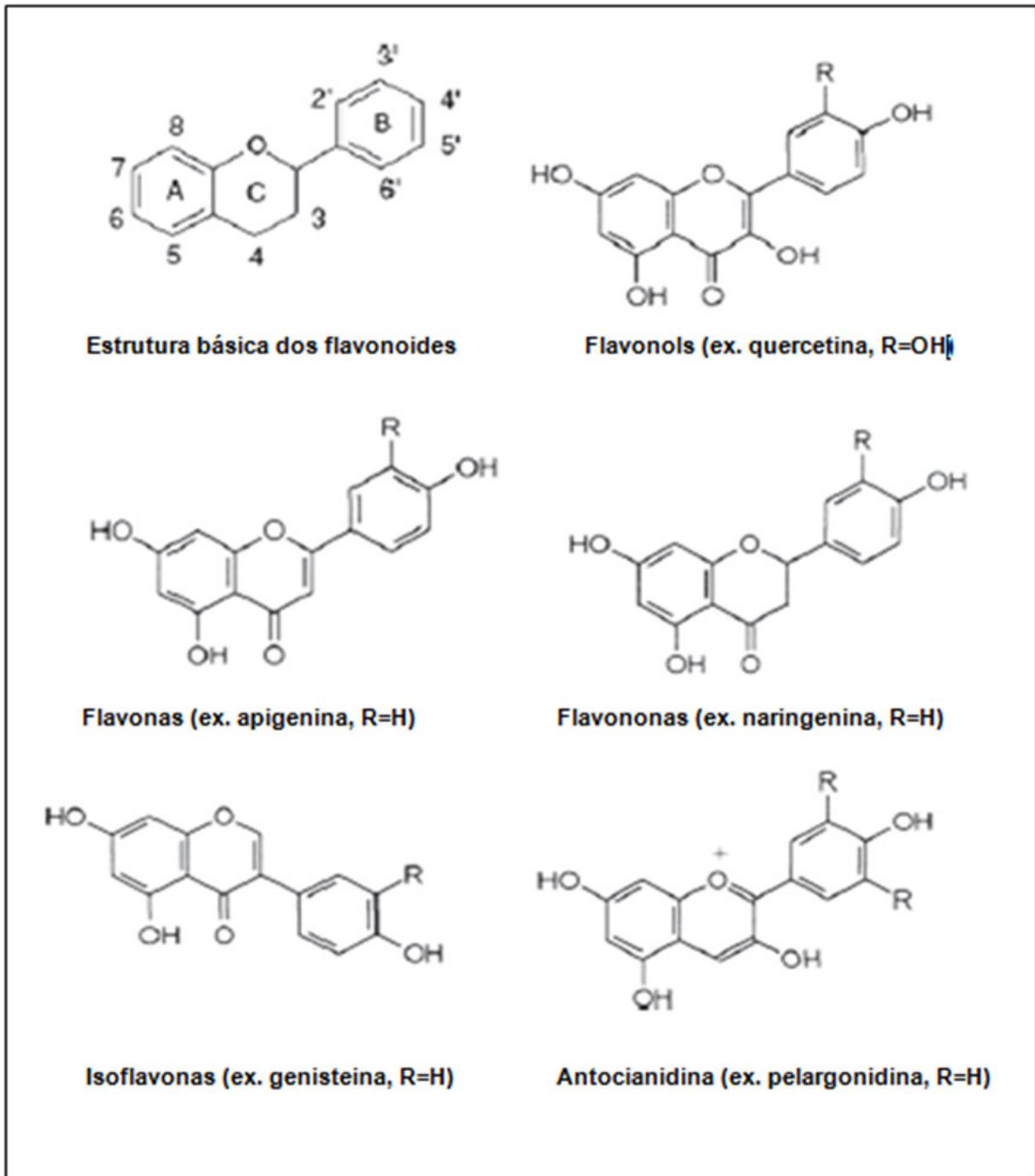


Figura 2 - Estruturas químicas mais comuns das classes de flavonoides, adaptado de Pyrznska & Biesaga, 2009

Portanto, a via metabólica do ácido chiquímico pode originar compostos flavonoides e não flavonoides. Os flavonoides constituem o maior grupo de compostos fenólicos presentes em plantas e são classificados de acordo com as substituições na estrutura do anel carbônico, dando origem a sete classes principais: flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis, flavanas, isoflavonas e antocianidinas (PETERSON e DWYER, 1998; MARTINS et al., 2011).

Já os não flavonoides, podem ser derivados de estruturas químicas C₆-C₁ (compostos hidroxibenzoicos, ex. ácido gálico, p-hidroxibenzoico, vanílico e seríngico), C₆-C₃ (compostos hidroxicinâmicos, ex. ácido cafeico e ferúlico), C₆-C₂-C₆ (compostos oriundos do trans e cis-resveratrol) (Figura 2). Maior será a atividade antioxidante dos não flavonoides quanto mais próximos estiverem os grupos hidroxilas e o -CO₂H em relação ao grupo fenil. Em geral, derivados de ácidos hidroxicinâmicos, devido à capacidade de estabilizar radicais livres grupo-CH=CH-COOH, possuem maior atividade antioxidante do que os derivados de ácidos hidroxibenzoicos (RICE-EVANS et al., 1996; BRAVO et al., 1998; MARTINS et al., 2011).

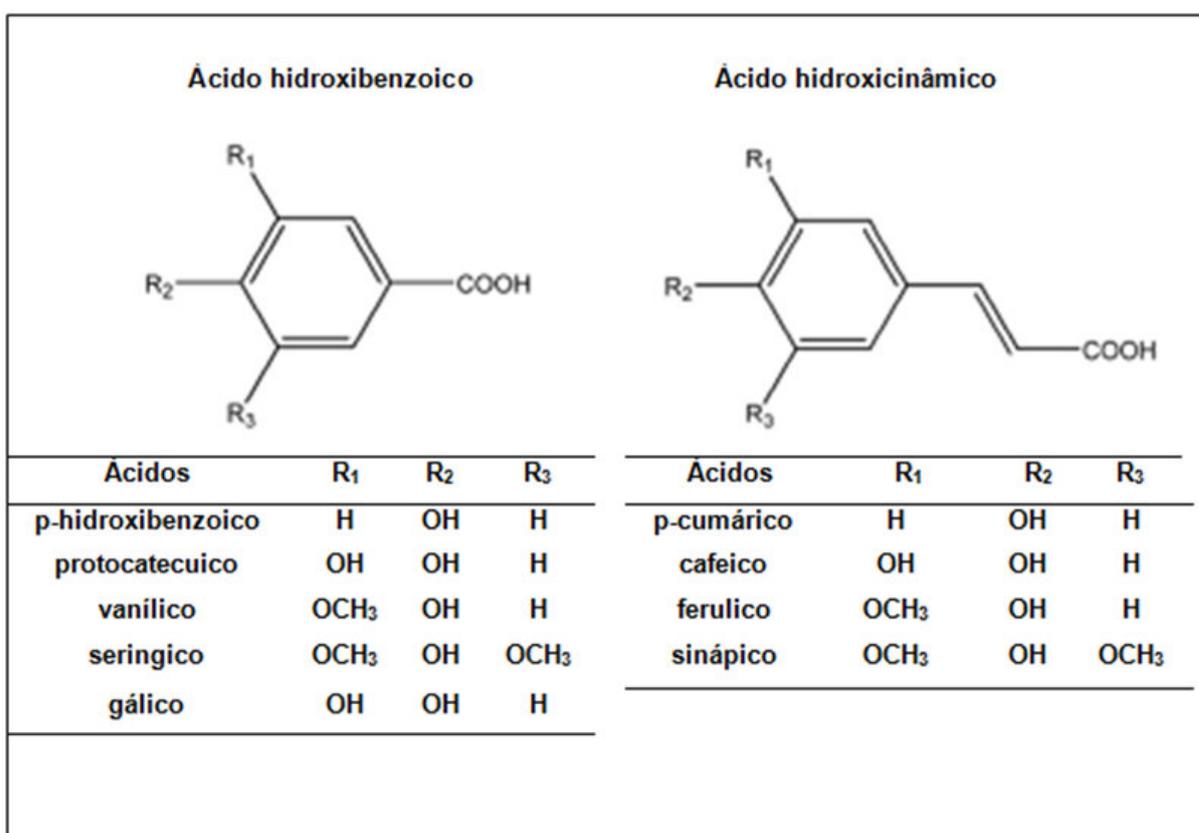


Figura 3 - Estruturas químicas dos principais ácidos fenólicos, adaptado de Shahidi & Ambigaipalan (2015).

Os ácidos fenólicos derivados dos ácidos hidroxicinâmicos são os mais comumente encontrados nas plantas, como, por exemplo, ácido cafeico, p-cumárico e ferulico que são encontrados com frequência nos alimentos sob a forma de ésteres simples. Por outro lado, derivados dos ácidos hidroxibenzoico normalmente estão presentes sob a forma de glicosídeos, como, por exemplo, ácidos vanílico (NACZK & SHAHIDI, 2004; SHAHIDI & CHANDRASEKARA, 2010).

Grande parte dos estudos sobre os efeitos benéficos do mel concentra-se na ação que os compostos bioativos, principalmente fenóis, apresentam no organismo humano (BERETTA et al., 2005).

Os compostos fenólicos identificados em amostras de méis sofrem variações em quantidade e variedade devido as suas origens botânicas e geográficas (OZKOK, D'ARCY & SORKUN, 2010). Essa variação é suficiente para permitir a discriminação das amostras devido ao predomínio de compostos específicos em determinadas regiões em função da flora predominante, tais como: luteolina (mel de lavanda), quercetina (mel de girassol) (YAO et al., 2003), hesperetina (mel de cítricos), campeferol (mel de alecrim) (THOMÁS-BARBERÁN, 2001), ácido elágico (mel de urze) (ANTONY et al., 2000), ácidos cafeico, cumarico e ferulico (MERKEN & BEECHER, 2000) campeferol, crisina, pinocembrina, ácido caféico e naringenina (mel de rosmaninho) e miricetina, quercetina, galangina e ácido p-cumárico (mel de melato) (ESCRICHE et al., 2014) e mel mánuka, *Leptospermum scoparium*, (pinocembrina, crisina, luteolina) (CHAN et al., 2013).

Os compostos fenólicos não estão apenas presentes nos méis, eles também são responsáveis por definir características específicas, através da avaliação cuidadosa da distribuição de alguns compostos considerados marcadores de florada (YAO et al., 2004; IURLINA et al., 2009; LACHMAN et al., 2010; OZKOK, D'ARCY & SORKUN, 2010; ESCRICHE et al., 2012). Pesquisas relacionadas à identificação e quantificação de compostos fenólicos em mel, tendo em vista a possível origem botânica e geográfica, aumentaram consideravelmente após a aplicação de metodologias usando cromatografia líquida. Porém não temos conhecimento de um estudo que compare duas metodologias de análise (por espectrofotometria e cromatografia) em méis de diferentes origens geográficas e botânicas.

O mel também já foi demonstrado possuir semelhança com a capacidade antioxidante (em base seca) encontrada em muitas frutas.

Os carotenoides pertencem a uma família de compostos naturais e constituem um dos mais importantes grupos de pigmentos na natureza devido às suas numerosas funções, larga distribuição e diversidade estrutural (SAINI, NILE & PARK, 2015).

Uma das suas principais funções é a atividade pró-vitamínica A (HASKELL, 2013). A vitamina A é essencial para a diferenciação celular, para a visão, para o crescimento ósseo, na reprodução e na integração do sistema imunológico, sendo

que sua deficiência pode resultar em anemia. Estudos demonstram que uma dieta rica em carotenóides está associada a menor incidência de câncer, problemas cardiovasculares, degeneração ocular e desenvolvimento de várias doenças como catarata, cegueira noturna e irreversível, ulceram na córnea, além de contribuir para um melhor funcionamento do sistema imunológico (SOMMER, 2008; SHARONI et al., 2012; STEPHENSEN et al., 2013).

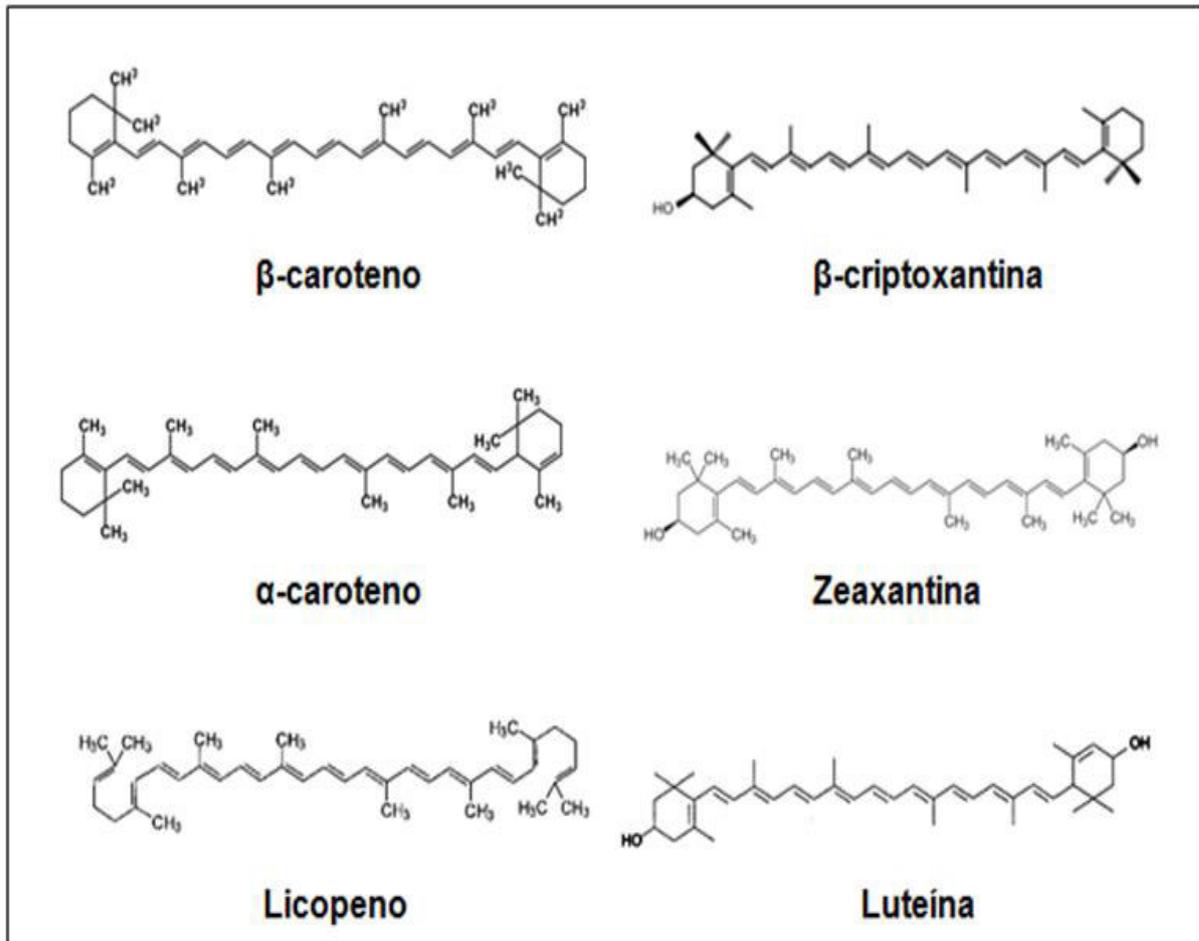


Figura 4 - Estruturas químicas dos principais carotenóides, adaptado de Krinsky & Johnson, 2005

É comumente distribuído em alimentos de origem vegetal e animal e são responsáveis pelas colorações amarela, alaranjada e vermelha. Existe mais de 700 tipos de carotenóides distribuídos na natureza, desde a astaxantina (3,3'-dihidroxi-β-βcaroteno-4,4'-diona), pigmento carotenóide oxigenado que confere característica de coloração rosa-avermelhada em alguns peixes (salmão), crustáceos (lagostas, siri e camarão), aves (flamingo) e micro-organismos, que atuam eliminando radicais livres e protegendo contra a peroxidação lipídica que causam oxidação nos tecidos e membranas celulares (FERREIRA, ZAMITH & ABRANTES, 2014; LERFALL, 2016)

até os presentes em grandes concentrações em vegetais folhosos (ex. brócolis), porém mascarados devido à presença da clorofila, que é o pigmento predominante característico da coloração verde.

Esse grupo apresenta diversidade estrutural característica pela presença de uma cadeia de carbonos com a presença e compartilhamento ou não de ligações duplas. Essas ligações duplas são capazes de receber elétrons de espécies reativas, neutralizando os radicais livres tornando os carotenoides compostos que apresentam potencialidade como antioxidante.

Com base nos grupos funcionais, os carotenoides podem ser classificados em dois grupos: os que contêm oxigênio (xantofilas, ex. luteína e zeaxantina) e os que possuem cadeia de hidrocarbonetos (carotenos, ex. α -caroteno, β -caroteno e licopeno) (BRITTON & KHACHIK, 2009).

Os carotenoides são constituídos de oito unidades de isoprenóides unidos de uma forma específica para que a organização das unidades de isoprenoide seja invertida no centro da molécula de modo que os grupos metil não terminais estejam em uma posição 1,5 e os outros grupos metis centrais estejam em uma posição 1,6, a deslocalização de elétrons ao longo dessa estrutura básica origina uma forma molecular, com propriedades específicas de reatividade química e absorção de luz (BRITTON & KHACHIK, 2009) (Figura 4), podendo ser encontrados na forma livre ou na forma esterificada com ácidos graxos (PÉREZ-GÁLVEZ & MÍNGUEZ-MOSQUERA, 2005; RIVERA & CANELA-GARAYOA, 2012).

2.5 Benefícios ao organismo humano

O uso indiscriminado de remédios provocou o surgimento de antibióticos resistentes, causando um receio que infecções possam voltar a ser difíceis de controlar sem o uso de novas formas de medicamentos (FAIR & TOR, 2014; TIRADO, HUDSON & MALDONADO, 2014; ORYAN, ALEMZADEH & MOSHIRI, 2016).

Devido às ações antimicrobiana (AL-WAILI et al., 2011), anti-inflamatória (MAJTAN, 2014), antioxidante (KUS et al., 2014), desbridamento (MADDOCKS & JENKINS, 2013), impulso no sistema imunológico (YAGHOUBI, KAZEROUNI & KAZEROUNI, 2013) e de estimulação do crescimento epitelial (BOEKEMA, POOL, ULRICH, 2013), o mel pode ser usado como, substituto de antibióticos no tratamento

de processos infecciosos, proteção contra distúrbios gastrointestinais e lesões gástricas crônicas, na cicatrização de feridas, queimaduras e regeneração de tecidos (GOMÉZ-CARAVACA et al., 2006).

Essas propriedades biológicas são devido à sua natureza multifatorial, caracterizadas por um conjunto de fatores, como, presença de peróxido de hidrogênio (BRUDZYNSKI et al., 2011), óxido nítrico (AL-WAILI et al., 2003) e compostos fenólicos (VANDAMME et al., 2013), condições ácidas (ORTIZ-VAZQUEZ et al., 2013) e de osmolaridade (GEORGE & CUTTING, 2007) e processos que envolvem a redução das prostoglandinas (AL-WAILI & BONI, 2003) tornando o mel um fitoterapico com capacidade para atuar de diferentes formas (ORYAN, ALEMZADEH & MOSHIRI, 2016).

2.6 Origem floral e geográfica

Na maioria das vezes, o mel é classificado de acordo com sua origem floral. Méis monoflorais e apresentam características como: cor, odor, sabor e aromas próprios de uma única espécie vegetal, como, por exemplo, o mel de laranjeira, mel de eucalipto, mel de urze, mel de castanha, entre outros.

Os méis multiflorais ou silvestres contém néctar e pólen de várias floradas e que por isso não são tão requisitados pelo mercado consumidor, não atingindo preços elevados por não apresentarem características específicas.

Há também méis de melato que são obtidos a partir da excreção de insetos sugadores de plantas e seiva de cana-de-açúcar. Por último, existem alguns méis com origem geográfica comprovada e que apesar de não apresentarem uma florada característica, possuem compostos específicos de alguma região, como o mel de mǎnuka, mel muito conhecido na Nova Zelândia pela sua ação antimicrobiana atribuída à presença de elevada quantidade de metilglioxal, o qual se origina da dihidroxiacetona do néctar da florada (CHAN et al., 2013).

A melissopalínologia é a ciência que estuda, identifica e quantifica as características dos grãos de pólen do mel (TERRAB et al., 2003). Trata-se de uma análise de microscopia, em que o analista coleta o pólen presente no mel e compara o seu tamanho e morfologia, bem como padrões de superfície de suco, poros e espinhos com o pólen da própria planta, com o intuito de comprovar a sua origem floral (IURLINA et al., 2009). Essa técnica depende da experiência do analista, já

que se baseia na análise morfológica do pólen, e para que o mel seja tipificado como mel de uma florada específica, é necessário que tenha no mínimo 45% da presença do pólen (ZANDER, 1935). Contudo, as abelhas podem coletar pólen de algumas floradas e o néctar de outras.

Por tudo isso, atualmente a pesquisa na área apícola tem se direcionado em buscar determinações que demonstrem os compostos que estão realmente presentes no mel, sejam devido à alimentação por pólen e ou néctar, deixando a análise polínica como um complemento de informações. Concomitantemente devem ser realizadas outras determinações, como, análises físico-químicas, espectroscopia e cromatografia, as quais são capazes de fornecer informações precisas da qualidade e dos compostos presentes no mel.

Sabe-se que o néctar coletado pela abelha passa por mudanças em sua composição física e química, causada pelas secreções produzidas pelas glândulas hipofaringeanas das abelhas que adicionam ao néctar enzimas como a invertase (α glicosidase), diástase (α e β amilases), glicose oxidase, catalase e fosfatase, enquanto a abelha transporta o néctar para a colmeia (CAMARGO et al., 2006; LENGLER et al., 2004). Os compostos formados pelas ações enzimáticas são os responsáveis pela conservação do mel (ácido glucônico e peróxido de hidrogênio) e pelas características próprias de sabor, cor e odor. Portanto, em decorrência dessas transformações, as propriedades apresentadas no néctar diferem daquelas observadas no mel.

Portanto, com a finalidade de determinar a origem floral dos méis são empregados diversos métodos: análises do pólen (melissopalínologia) (IURLINA et al., 2009), sensoriais (CASTRO-VÁZQUEZ et al., 2010), físico-químicas (KARABAGIAS et al., 2014), espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) (RIBEIRO et al., 2014), espectroscopia no infravermelho (ESCUREDO et al., 2015), espectroscopia de fluorescência (LENHARDT et al., 2015), espectroscopia de absorção atômica por chama (F-AAS/AES), espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) (MADJCZYK & BARALKIEWICZ et al., 2008), voltametria por língua eletrônica (ESCRICHE et al., 2012; TIWARI et al., 2013), cromatografia líquida (IURLINA et al., 2009), cromatografia gasosa e de espectrometria de massas (GC/MS) (ALIFERIS et al., 2010).

Desta forma, vários são os instrumentos analíticos utilizados pelos pesquisadores com o intuito de “tipificar” os méis. Buscando tornar a caracterização

mais fidedigna possível, tem sido adotada a combinação dessas técnicas analíticas auxiliadas por ferramentas estatísticas, como, análise de variância, análise de variância multivariada, análise de componentes principais (PCA), *clusters* e correlações.

2.7 Compostos voláteis

O aroma do mel é um importante fator de qualidade e depende da composição química presente na fração volátil, a qual é influenciada pela composição do néctar, da origem floral, genética da abelha, origem geográfica condições de transformação dentro da colméia, processamento e armazenamento (CASTRO-VÁZQUEZ et al., 2007; BARRA et al., 2010; MOREIRA et al., 2010; SILVA et al., 2016).

Devido ao elevado número e complexidade dos compostos voláteis presentes no mel, o perfil aromático representa uma "impressão digital" do produto, que pode ser utilizado para determinar sua origem floral (ANKLAM & RADOVIC, 2001). Quando se trata de um alimento rico em sabor como o mel, essa análise é particularmente confiável, proporcionando o desenvolvimento de inúmeras técnicas (RADOVIC et al., 2001).

Os compostos responsáveis pelo aroma de méis são uma mistura complexa de diversos compostos voláteis que apresentam algumas características, como: diferentes funcionalidades, baixo peso molecular, presentes em concentrações baixas, podendo ser, monoterpenos, norisoprenoides, sesquiterpenos, derivados de benzeno e, em concentrações um pouco maiores, ésteres de álcoois, ácidos graxos, cetonas, aldeídos e terpenos (CUEVAS-GLORY et al., 2007; PONTES et al., 2007).

O perfil volátil observado em um determinado mel pode variar em decorrência do processamento empregado, das condições e do período de armazenamento, pois os compostos químicos presentes no mel como açúcares, aminoácidos, vitaminas, ácidos orgânicos, compostos fenólicos e ainda, compostos voláteis podem sofrer processos enzimáticos ou químicos (reação de *Maillard*), que degradem o produto com formação de novos compostos, como derivados furanóides, álcoois fenólicos e novos compostos voláteis (SILVA et al., 2016).

A percepção do aroma é geralmente o resultado do balanço global entre o impacto de cada um dos compostos. Embora nenhum constituinte seja totalmente

responsável pelo aroma característico de uma matriz, em alguns produtos existem um ou mais componentes que, sozinhos, lembram a qualidade característica de seu aroma, e são denominados “caráter impacto”, os outros compostos necessários para se obter o sabor pleno são denominados “contribuintes” (FRANCO, 2003).

O desenvolvimento e aplicação de uma metodologia para determinação da composição química dos compostos voláteis é uma tarefa desafiadora (AUGUSTO et al., 2003), pois a técnica aplicada para isolamento deve ser capaz de isolar os compostos voláteis enquanto limita a formação de artefatos (FRANCO, 2003).

Por isso, a técnica mais utilizada para a determinação do perfil aromático é a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC/MS), pois combina uma elevada eficiência de separação e sensibilidade, além de fornecer dados qualitativos e quantitativos para uma adequada determinação do perfil aromático (CUEVAS-GLORY et al., 2007).

São utilizados como métodos de extração combinados à cromatografia gasosa, o *headspace* (SORIA, MARTINEZ-CASTRO, & SANZ, 2008), simultânea extração e destilação (LIPING et al., 2014), extração e destilação em micro escala simultânea (CASTRO-VAZQUEZ, DIAZ-MAROTO & PEREZ-COELHO, 2009) hidrodestilação e destilação por arraste a vapor (AUGUSTO et al., 2003) extração por ultrassom (ALISSANDRAKIS et al., 2011), extração em fase sólida (SPE) (MICHALKIEWIVZ, BIESAGA & PYRZNSKA, 2008) extração em fase sólida dinâmica (SPDE) (AMPUERO, BOGDANOV & BOSSET) e micro extração em fase sólida (SPME) (ALIFERIS et al., 2010).

Dentre as técnicas recentes para análise de voláteis podem se destacar a microextração em fase sólida, onde o princípio fundamental é a análise da fase gasosa em equilíbrio com a fase líquida ou sólida da amostra, visando minimizar a formação de artefatos e/ou a destruição da fração volátil, representando mais fielmente o aroma de uma determinada matriz (FRANCO, 2003).

A técnica de *headspace* por microextração em fase sólida (SPME, do inglês *solid phase microextraction*), introduzida em 1990 por Arthur Pawliszyn (1990), tem como principais vantagens sua simplicidade de manuseio, ser uma técnica livre de solventes, reprodutibilidade, sensibilidade, flexibilidade, simples, econômica, mantendo a integridade química das moléculas sem a complexidade dos métodos tradicionais (VALENTE & AUGUSTO, 2000; FRANCO, 2003; CUEVAS-GLORY et al., 2007).

A unidade de SPME consiste de uma fibra fina de sílica fundida recoberta com material polimérico usado como fase estacionária, que é utilizada para extrair compostos orgânicos a partir de sua matriz. A extração fundamenta-se no equilíbrio de partição (polidimetilsiloxano) ou adsorção (poliacrilato) entre a fibra e os componentes da amostra ou seu *headspace*. Na técnica de *headspace*, a amostra líquida é colocada em um frasco de vidro (*vial*) que é então lacrado.

A fibra de SPME é exposta no topo do frasco, obedecendo a uma distância pré-determinada entre a fibra e o líquido da amostra, bem como agitação, tempo de equilíbrio (somente amostra) e tempo de extração pré-definidos (fração volátil da amostra em contato com a fibra) (Figura 5).

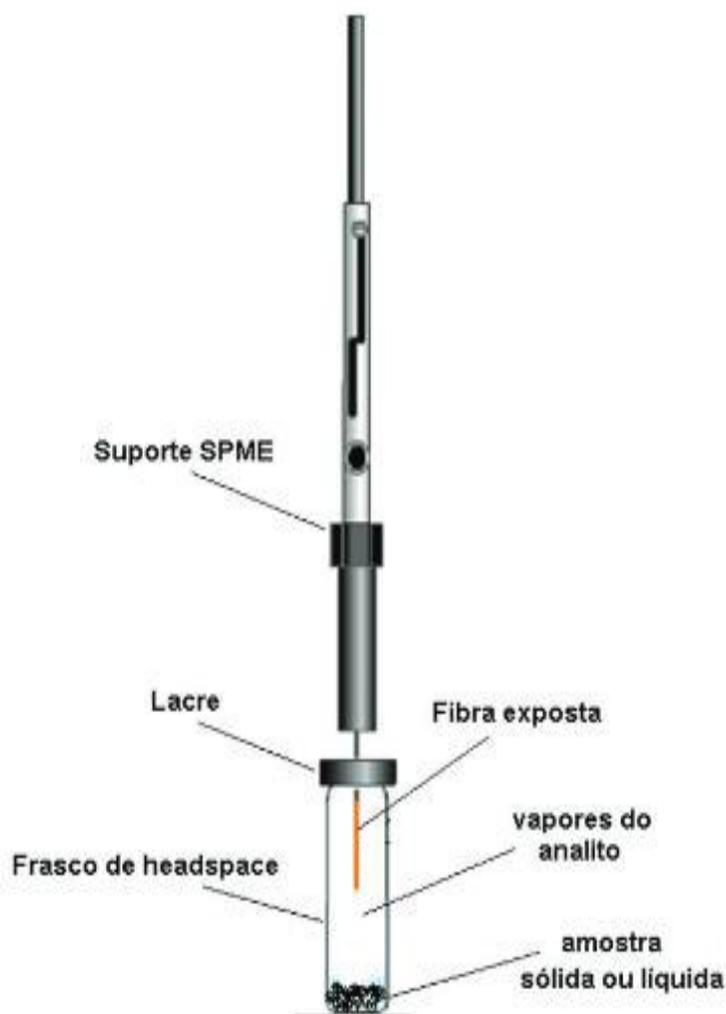


Figura 5 - Representação da extração dos compostos voláteis por SPME, adaptado de Menezes & Cardeal, 2013.

A microextração em fase sólida tem sido considerada um método potencialmente útil para caracterização de compostos voláteis em alimentos e principalmente, como método de rotina para verificar mudanças no aroma durante o seu processamento (FRANCO, 2003).

Através da análise dos compostos que compõem o aroma, torna-se possível a identificação de compostos que são marcadores de determinadas origens botânicas. Com isso, se propicia a identificação de um mel monofloral ou silvestre (ESCRICHE et al, 2011). A identificação da origem geográfica e botânica é essencial para a especificidade e originalidade do mel. Através dessas informações é possível caracterizar um mel de uma região e agregar valor a esse produto de acordo com suas propriedades sensoriais características.

Estudos como esse acabam sendo indispensáveis no mercado atual, pois cada vez mais o consumidor clama pela necessidade da rastreabilidade do alimento que está ingerindo, principalmente para a comprovação da sua qualidade.

São limitados os dados que caracterizam os méis de um mercado de grande importância econômica nacional, como é o estado do Rio Grande do Sul. Assim, torna-se fundamental a determinação das origens geográfica e botânica desses méis por meio de seus atributos de qualidade, compostos bioativos, perfil volátil e atividades antioxidante e antibacteriana.

3 Capítulo 1 – Relação entre compostos bioativos com as atividades antioxidante e antibacteriana em méis do estado do Rio Grande do Sul

3.1 Introdução

O mel é o produto apícola que possui maior potencial de mercado. Contém mais de 200 compostos, dos quais aproximadamente 79% carboidratos, 18% água e 3% de outros compostos. Porém, o que o caracteriza e o torna único é a vasta mistura de substâncias contidas nesses 3% da sua composição, como, aminoácidos, lipídios, minerais, vitaminas e compostos bioativos, destacando-se compostos fenólicos e carotenoides (ALVAREZ-SUAREZ et al., 2010; CIULU et al., 2011; ALQARNI, OWAYSS & MAHMOUD et al., 2012; ORYAN, ALEMZADEH & MOSHIRI, 2016). Esse somatório de características tornam o mel um dos alimentos mais completos quanto às propriedades benéficas ao organismo humano, possuindo ação terapêutica (BLASA et al., 2007; SILICI et al., 2008), antioxidante (MEDA et al., 2005; LACHMAN et al., 2010), antimicrobiana (ESCUREDO et al., 2012, VANDAMME et al., 2013), antitumoral (JAGANATHAN et al., 2011), anti-inflamatória (VAN DEN BERG et al., 2008), antiviral (WATANABE et al., 2014) e antiúlcera (VANDAMME et al., 2013).

São vários os benefícios para a saúde de uma dieta rica em alimentos que tenham em sua composição compostos fenólicos, porém, a atuação desses compostos é dependente da biodisponibilidade de cada componente individualmente, bem como da sua composição química. Há várias evidências que flavonoides e ácidos fenólicos podem ser absorvidos no corpo humano em quantidade que sejam suficientes para exercer muitas atividades biológicas (OLTHOF, HOLLMAN & KATAN, 2001, BERETTA et al., 2005; ALQARNI, OWAYSS & MAHMOUD, 2012).

Os compostos fenólicos constituem uma das principais classes de compostos que se originam do metabolismo secundário das plantas. Este metabolismo é responsável pelo mecanismo de defesa da planta, quando esta é acometida de

algum dano (estresse hídrico, excesso de luminosidade, ataque por pragas), naturalmente produz uma infinidade de compostos fenólicos com diferentes estruturas químicas e biológicas para atuarem como mecanismo de defesa (CAROCHO & FERREIRA, 2013; ROLEIRA et al., 2015; DIAS et al., 2016). Os compostos fenólicos são constituídos por no mínimo uma estrutura básica de um anel aromático ligado a um ou mais grupos hidroxilas, podendo variar de uma simples a uma complexa molécula de alto peso molecular (PYRZYNSKA & BIESAGA, 2009).

Um dos métodos mais utilizados para a pesquisa do conteúdo total de compostos fenólicos em alimentos é o *Folin-Ciocalteu* (mistura de ácido fosfotúngstico e fosfomolibdico). Esta técnica detecta todas as classes de compostos poli-hidroxifenólicos, e também, alguns compostos não fenólicos que apresentem atividade antioxidante, como por exemplo, o ácido ascórbico que é um agente redutor e acaba reagindo com a solução de *Folin-Ciocalteu*, levando ao aumento da absorbância e, por consequência, dos resultados (EVERETTE et al., 2010; FERREIRA et al., 2009).

Os compostos fenólicos e o néctar são recolhidos pelas abelhas e após, passarem por processos específicos são convertidos em mel (SILICI, SAGDIC & EKICI, 2010).

Segundo Alvarez-Suarez et al., (2012) os principais compostos fenólicos presentes em méis são flavonoides. Os quais podem ser categorizados em flavonóis, flavanonas, flavonas, isoflavonas e antocianinas (PYRZYNSKA & BIESAGA, 2009). Algumas propriedades na estrutura dos flavonoides caracterizam uma maior atividade antioxidante, como, a presença de hidroxilas nos anéis aromáticos, número e posição de grupos hidroxila e outros substituintes, por outro lado, a glicosilação caracteriza uma menor atividade antioxidante (SGHAIER et al., 2011; SILVA et al., 2016).

A maneira mais precisa e exata de se identificar e quantificar flavonoides em produtos naturais é por meio de análise cromatográfica (por cromatografia líquida) (MARCUCCI, 1995). Entretanto, quando se pensa em controle de qualidade, é conveniente a introdução de alternativas mais simples e baratas, pois nesses casos requerem-se procedimentos que permitem a análise rápida de várias amostras. Uma das técnicas que se enquadra bem nesse contexto é a determinação de flavonoides totais por espectrometria no UV. De acordo com Mabry (1970) no ano de 1954 um

pesquisador sugeriu a utilização de cloreto de alumínio como reagente para determinar através de espectrometria a presença de flavonoides. Desde a década de 60, o composto passou a ser largamente adicionado como um reagente de desvios (*shift reagent*) em espectrometria no UV-visível para a determinação de flavonoides totais (MABRY et al., 1970; MARKHAM, 1982). Em metanol, os grupamentos dos flavonoides formam um complexo estável com o alumínio, levando a um desvio de absorção para maiores comprimentos de onda e com maior intensidade, limitando assim, a possibilidade de interferência de outras substâncias fenólicas, que acompanham os flavonoides nos tecidos vegetais, pois mesmo que estes complexem com o $AlCl_3$, absorverão em comprimentos de onda muito inferiores (WOISKY, 1998)

Os ácidos fenólicos são compostos fenólicos largamente distribuídos na natureza e são divididos em derivados do ácido hidroxibenzóico (p-hidroxibenzóico, vanílico e siríngico) e hidroxicinâmico (caféico, ferúlico, p-cumárico e sinápico) (MARTINS et al., 2011). São compostos que apresentam atividade antioxidante e que possuem propriedade de diminuir os efeitos do estresse oxidativo, e por consequência atua contra diversas doenças, como câncer (SHAHIDI, 2004). Até o momento não existe na literatura a discriminação de teores totais de ácidos fenólicos em méis. O método utilizado no presente estudo foi adaptado de um método utilizado para a determinação desses compostos em vinhos (MAZZA et al., 1999). Assim como o mel, o vinho também possui um valor agregado de acordo com a sua composição bioativa e determinações que forneçam uma estimativa desses compostos são necessárias como análise de rotina em laboratórios de controle de qualidade.

Os carotenoides são pigmentos responsáveis pelas tonalidades que variam do amarelo ao vermelho de vários vegetais e frutas, podem também estar presentes em folhas acompanhados do pigmento predominante verde da clorofila. Assim como os compostos fenólicos também possuem estrutura química variada, onde a base consiste em oito unidades de isopreno conjugado, a deslocalização dos elétrons ao longo dessa estrutura origina uma única forma molecular (RIVERA & CANELA-GARAYOA, 2012; TURCSI, NAGY & ELI, 2016).

A cor do mel depende de vários fatores, alguns intrínsecos, como conteúdo mineral (ALVAREZ-SUAREZ et al., 2010), origem botânica e exposição ao calor antes da coleta (BOGDANOV, RUOFF & PERSANO, 2004), teor de pigmentos com

propriedades antioxidantes, como carotenoides e compostos fenólicos (BERETTA et al., 2005; BERTONCELJ et al., 2007), além de fatores extrínsecos, como tempo de armazenamento, exposição ao calor após a coleta (BOGDANOV, RUOFF & PERSANO, 2004) e presença de alterações como produtos de fermentação (DONER, 2003) e cristalização (BELAY et al., 2015). Em vários trabalhos há relações entre a coloração e os carotenoides presente em méis, onde os autores encontraram pequenas concentrações no escuro ($10\text{mg}\beta\text{-caroteno.kg}^{-1}$) e praticamente ausência nos de coloração extra branca (TOMASIK, 2004; ESTEVINHO et al., 2008; FERREIRA et al., 2009; ALVAREZ-SUAREZ et al., 2010).

As atividades benéficas do mel estão relacionadas essencialmente as suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas (MARTOS et al., 2000). A atividade antimicrobiana do mel foi comprovada em estudo recente utilizando 60 méis de diferentes origens botânicas, frente a 16 patógenos clínicos e suas respectivas cepas de referência (VOIDAROU et al., 2011).

Sabe-se também que essas propriedades benéficas, entre elas, a atividade antimicrobiana, irão depender de vários fatores, como, a fonte nutricional das abelhas que estará diretamente relacionado com a origem geográfica e botânica, a oferta de alimento e água, bem como coleta, processamento e armazenamento do mel (LIU et al., 2013; ORYAN, ALEMZADEH & MOSHIRI, 2016). Na determinação antibacteriana de oito méis (trigo, mirtilo e mañuka) observaram que a dose do mel é muito importante para o seu efeito bactericida, onde o máximo efeito é obtido com a degradação do DNA bacteriano, o qual foi observado efeitos antibacterianos em concentrações de mínimas de 6,25% de mel para os méis de trigo e mañuka (BRUDZYNSKI; ABUBAKER & WANG, 2012).

Vários autores também estudaram as correlações entre cor e atividades antioxidante e antibacteriana com o conteúdo dos compostos bioativos do mel (BERETTA et al., 2005; BERTONCELJ et al., 2007; CANADANOVIC-BRUNET et al., 2014). Porém, os dados sobre essas propriedades no mel brasileiro são limitados, portanto, é importante determinar parâmetros a fim de caracterizar os méis do estado do Rio Grande do Sul, Brasil, especialmente devido à relevância produtiva e econômica no mercado apícola brasileiro. Dessa forma, o objetivo do estudo foi avaliar as atividades antibacteriana e antioxidante e o teor de compostos bioativos de amostras de méis.

3.2 Material e método

3.2.1 Amostras

As amostras foram fornecidas por apicultores de várias regiões do estado do Rio Grande do Sul e coletadas a partir de um delineamento inteiramente casualizado (Tabela 1), nas seguintes regiões: oeste (H1, H2, H3, H4, H5, H10, H11, H14), metropolitana (H6, H16, H19, H20, H21, H22, H23), sudoeste (H7, H12, H13), sudeste (H8, H9, H17, H18), nordeste (H15) e noroeste (H24) (Figura 6). As amostras foram adquiridas entre janeiro e novembro de 2013 e mantidas em frascos de polietileno esterilizados com ausência de luminosidade e sob refrigeração (5°C).

Tabela 1 – Amostras de méis com respectivos dados de coleta: município, origem botânica e coloração.

Amostras	Município	Origem botânica	Mês de coleta
H1	Nova Esperança	silvestre	fevereiro
H2	Unistalda	silvestre	fevereiro
H3	Mata	silvestre	janeiro
H4	Bom Respiro	eucalipto	janeiro
H5	Cacequi	silvestre	maio
H6	Ivoti	silvestre	maio
H7	Bagé	eucalipto	maio
H8	Pelotas	eucalipto	outubro
H9	Pedras Altas	silvestre	março
H10	São Pedro do Sul	silvestre	março
H11	Santiago	silvestre	março
H12	Livramento	silvestre	março
H13	São Francisco de Assis	silvestre	março
H14	Jaguari	silvestre	março
H15	Farroupilha	silvestre	novembro
H16	Nova petrópolis	silvestre	novembro
H17	Rio Grande	silvestre	março
H18	Cerrito Alegre	silvestre	dezembro
H19	Camaquã	silvestre	novembro
H20	Santo Antônio da Patrulha	silvestre	dezembro
H21	Taquara	eucalipto	abril
H22	Gramado	silvestre	abril
H23	Três Coroas	silvestre	maio
H24	Teutônia	eucalipto	julho

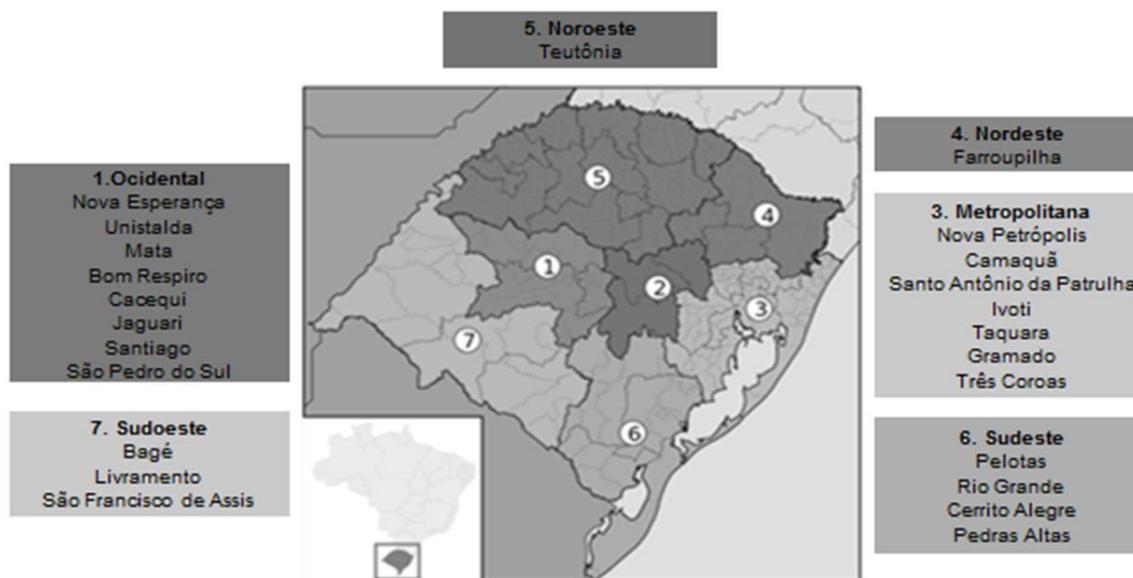


Figura 6 - Mapa do estado do Rio Grande do Sul com regiões e municípios da amostragem. (adaptado de Raphael Lorenzeto de Abreu, 2 de junho, 2006). Acesso: 10/10/2015. Disponível em: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:RioGrandedoSul_MesoMicroMunicip.svg.

3.2.2 Padrões e reagentes

Todos os produtos químicos eram do mais alto grau analítico. A quercetina, ácido cafeico, ácido gálico, DPPH e ABTS foram fornecidos por Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA), metanol, ciprofloxacina e Folin Ciocalteu solução 2N foram obtidos da Merck (Alemanha) e ágar de tripton de soja, caldo de soja tripton e peptona bacteriológica foram obtidos de Oxoid, Basingstone, Hampshire, Reino Unido. Água foi purificada por meio de um sistema de purificação Ultra (*Mega Purity*).

3.2.3 Determinação da coloração

Antes de todas as análises, as amostras foram previamente homogeneizadas e sonicadas (UltraSonic Clean Ultra Cleaner 1400A, Unique) durante 10min (45°C) até à dissolução completa dos cristais de açúcar.

Foram feitas soluções de 50% mel (50% água: 50% mel) em água destilada morna (45-50°C) e sonicadas durante 5min. Após as soluções de mel foram filtradas a fim de eliminar partículas grosseiras (resíduo de cera, abelha) e a absorbância foi medida a 635nm em espectrofotômetro de UV-visível (Spectrophotometer Jenway-

6705 UV/VIS). Os resultados foram calculados ($Pfund = 38,70 + 371,39 * ABS$) (FERREIRA et al., 2009) e expressos em milímetros em uma escala *Pfund* (FELL, 1978). Os resultados de coloração nos méis foram comparados com os dados da escala *Pfund*, conforme a tabela 2.

Tabela 2 - Classificação quanto à cor do mel segundo a escala *Pfund*.

Cor	Escala <i>Pfund</i> (mm)*	Faixa de cor*
Branco d'água	1 a 8	≤0,030
Extra branco	9 a 17	0,031 a 0,060
Branco	18 a 34	0,061 a 0,120
Extra âmbar claro	35 a 50	0,121 a 0,188
Âmbar claro	51 a 85	0,189 a 0,440
Âmbar	86 a 114	0,441 a 0,945
Âmbar escuro	de 115 a 150	>0,945

*milímetros, ** absorbância no espectrofotômetro

3.2.4 Determinação dos compostos bioativos

3.2.4.1 Conteúdo total em compostos fenólicos (CTCF)

A solução de mel (100mg.mL^{-1}) foi previamente homogeneizada e filtrada através de filtro quantitativo, $500\mu\text{L}$ de solução de mel foi adicionado a $2,5\text{mL}$ de reagente de Folin-Ciocalteu (0,2N). Após 5 minutos, 2mL de uma solução de carbonato de sódio ($\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-}75\text{g.L}^{-1}$) foi adicionada e incubada durante 2h no escuro. A absorbância foi medida à 760nm em um espectrofotômetro (SINGLETON et al., 1999). Curva padrão foi definida por concentrações conhecidas de ácido gálico, variando entre 0 a 200mg.L^{-1} (R^2 0,9923) e os resultados expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico ($\text{mgEAG.}100\text{g}^{-1}$).

3.2.4.2 Conteúdo total de flavonoides (CTF)

Soluções de mel (100mg.mL^{-1}) foram preparadas com metanol 50% e homogeneizadas e filtradas em filtro quantitativo, 5mL dessa solução de mel foi adicionada a 5mL de AlCl_3 (2%) em metanol. Essa mistura foi homogeneizada e deixada em repouso por 30 minutos. A absorbância foi medida a 415 nm (ARVOUET-GRAND et al., 1994). Curva padrão foi definida por concentrações conhecidas de quercetina, entre 0 e 40mg.L^{-1} (R^2 0,9989) e expressas em miligramas de equivalentes a quercetina ($\text{mgEQ.}100\text{g}^{-1}$).

3.2.4.3 Conteúdo total de ácidos fenólicos (CTAF)

Ácidos fenólicos foram determinados de acordo com o método de Mazza et al., (1999) com algumas modificações. Alíquotas de 250 μ L de soluções preparadas com mel (100mg.mL⁻¹ em 50% de solução de etanol), solução de 250 μ L etanol acidificado (0,1% de ácido clorídrico em etanol a 95%) e 4,55mL de uma solução de ácido clorídrico a 2% foram transferidos para um balão volumétrico de 10mL. A mistura de soluções foi homogeneizada e deixada em repouso durante 15minutos e, em seguida, a absorbância foi medida no comprimento de onda de 320nm. Curva padrão foi definida por ácido cafeico, entre 0 e 0.8 μ g.mL⁻¹ (R² 0,9992) e os resultados expressos em miligramas de equivalentes de ácido cafeico (mgEAC.100g⁻¹).

3.2.4.4 Conteúdo total de carotenoides (CTC)

A solução de mel foi preparada com 5g de mel dissolvido em 5mL de água destilada. Depois esta solução foi misturada com 45mL de uma solução de hexano-acetona (6:4), homogeneizou-se durante 1min e deixou-se no escuro durante 30 minutos. A absorbância foi determinada no comprimento de onda de 450nm (FERREIRA et al., 2009). Curva padrão foi definida pela concentração do composto, entre 0,015 e 0.6 μ g.mL⁻¹ (R² 0,9966) e expresso em miligramas de equivalentes β -caroteno (mg β -caroteno.kg⁻¹).

3.2.5 Determinação das atividades antioxidantes *in vitro*

3.2.5.1 Técnica de captura de radicais DPPH[•] (2,2 difenil-1-picril-hidrazil)

O outro ensaio *in vitro* da atividade antioxidante (DPPH) foi monitorado de acordo com um método descrito anteriormente por Velazquez et al., (2003). A reação com o DPPH foi feita usando 750 μ L de solução de mel misturada com 1,5mL de solução de DPPH em metanol (0,02mg.mL⁻¹). A mistura foi homogeneizada durante 30min à temperatura ambiente e, em seguida, a absorbância foi medida no comprimento de onda de 517nm. Quantidade de antioxidante foi determinada por curva padrão de quercetina (0 e 6,25mg.L⁻¹) (R² 0,9936) e os resultados foram expressos em equivalentes de quercetina antioxidante (mgEQA.100g⁻¹).

3.2.5.2 Técnica de captura de radicais ABTS [ácido 2,2'azino-bis(3-etil-benzotiazolina-6-sulfonado)]

Para a determinação da atividade antioxidante foi utilizado o método descrito por Re et al. (1999), em que o ensaio de ABTS foi feito utilizando a mesma solução de mel do método de ácidos fenólicos. Na reação foi usado 100µL de solução de mel e 3900µL de solução ABTS (0,700±0,05nm), homogeneizada e deixada em repouso durante 6 minutos. A absorbância foi medida no comprimento de onda de 734nm e os resultados foram expressos em equivalentes de Trolox (mgET.100g⁻¹) com a curva entre 0,05 e 0.25µg.mL⁻¹ (R² 0,9799).

3.2.6 Determinação da atividade antibacteriana (CIM)

As culturas bacterianas foram recuperadas da coleção de bactérias do Laboratório de Microbiologia de Alimentos (MICROBIAL) do Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão, Brasil. Foram analisadas cepas padrão de quatro espécies diferentes de bactérias, das quais duas eram Gram-negativas, *Shigella dysenteriae* (ATCC13313) e *Salmonella typhimurium* (ATCC14028), e duas eram bactérias Gram-positivas, *Staphylococcus aureus* (ATCC25923) e *Bacillus cereus* (ATCC1778). As cepas foram mantidas em ágar de soja triptona (TSA) a 4°C. Inócuos foram preparados com TSA durante 24h a 37 ° C. As suspensões celulares foram diluídas em água peptonada 0,1%, com auxílio da escala de McFarland, até à concentração de 10⁶ unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC.mL⁻¹). A concentração inibitória mínima (CIM) de extratos de mel foi determinada com o método adaptado por Taveira et al. (2010) empregando diluição em série com a utilização de placas de micro diluição de 96 poços esterilizados. As seguintes concentrações de mel foram testadas para a identificação CIM: 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 50, 25 e 10mg.mL⁻¹ de água ultra pura. Além disso, 90mL caldo de soja triptonado (TSB), 1 µL de suspensão com 10⁶ UFC.mL⁻¹ e 100µL de cada solução de mel foram adicionados em cada poço. O controle negativo consistiu substituindo a amostra pela água, ao passo que o antibiótico ciprofloxacina (mg.mL⁻¹) foi o controle positivo. Placas com microdiluição foram incubadas durante 24h a 37°C. A turbidez foi então avaliada por um leitor de placas (Elisa Analyser Placa,

Robonik). CIM para bactérias foi determinado como a menor concentração de extratos de mel capazes de inibir o crescimento das bactérias.

3.2.7 Análise estatística

Todas as determinações analíticas foram efetuadas em triplicata e os dados foram expressos como médias. A análise de variância seguida pelo teste de Tukey e diferenças entre as médias em nível de confiança de 95% foram consideradas estatisticamente significativas (SAS, 1999). Correlações foram obtidas pela correlação de *Pearson* entre cor, CTCF, CTF, CTAF, CTC, ABTS, DPPH.

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Coloração

A cor consiste em uma propriedade física percebida rapidamente pelos consumidores, sendo que sua determinação é de grande utilidade na classificação de diferentes méis (BOGDANOV, RUOFF & PERSANO, 2004).

Tabela 3 - Coloração dos méis através de escala *Pfund*.

Amostras	Escala <i>Pfund</i> *	Coloração	Amostras	Escala <i>Pfund</i> *	Coloração
H1	89	âmbar	H13	90	âmbar
H2	74	âmbar claro	H14	122	âmbar escuro
H3	150	âmbar escuro	H15	84	âmbar claro
H4	116	âmbar escuro	H16	149	âmbar escuro
H5	65	âmbar claro	H17	90	âmbar
H6	123	âmbar escuro	H18	122	âmbar escuro
H7	75	âmbar claro	H19	84	âmbar claro
H8	74	âmbar claro	H20	149	âmbar escuro
H9	150	âmbar escuro	H21	70	âmbar claro
H10	98	âmbar	H22	74	âmbar claro
H11	89	âmbar	H23	67	âmbar claro
H12	79	âmbar claro	H24	103	âmbar

*expressos em milímetros

A coloração do mel fica mais clara quando está sob a forma física granulada, portanto torna-se difícil ter uma eficiente e precisa determinação de cor através de métodos comuns, nos quais se realiza a leitura da amostra diretamente, sem que haja qualquer diluição. Por isso, optou-se neste estudo pela análise de coloração através da absorbância nas amostras diluídas, onde os resultados foram transformados para a escala *Pfund*.

Das sete classes de cores possíveis (escala *Pfund*) somente três foram encontradas nos méis estudados (Tabela 3), âmbar claro (41,7%), âmbar (25%) e âmbar escuro (33,3%). Moreti et al., (2006) classificaram como âmbar claro 44,5% dos 346 méis de seis estados brasileiros (Bahia, Tocantins, Piauí, Ceará, Minas Gerais e Santa Catarina). Provavelmente, a tonalidade escura encontrada em méis brasileiros seja devido à origem silvestre da maioria dos méis comercializado no país. No Brasil há uma grande diversidade de vegetação, o que favorece o predomínio de um mel silvestre, assim como a baixa profissionalização na apicultura que não colabora para o surgimento de um produto diferenciado, como, por exemplo, o mel de laranjeira, mel monofloral de tonalidade clara.

Méis mais claros possuem sabor leve, enquanto que aqueles escuros têm sabores mais fortes (BOGDANOV, RUOFF & PERSANO, 2004). Méis claros como o mel de Floresta de Harena (Etiópia), que apresentou entre 34 a 85 mm em escala *Pfund*, são agrupados entre extra claro e âmbar claro, e geralmente alcançam preços elevados (BELAY et al. , 2015). No entanto, na Alemanha, Áustria e Suíça, os méis com tonalidades mais escuras são os mais apreciados (BOGDANOV, RUOFF & PERSANO, 2004).

Dessa forma, percebe-se uma grande variabilidade quanto à aceitação do mel pelos consumidores em relação a sua cor (GAMBARO et al., 2007), pois o que define a sua aceitação e, por consequência, a comercialização, é o somatório de atributos de qualidade (HMF, cor, umidade, condutividade), o gosto específico de determinada origem botânica e os apelos terapêuticos de alguns méis específicos, como é o caso do Manuka (*Leptospermum scoparium*) (SNOW & MANLEY-HARRIS, 2004; VISAVADIA & DANFORDET, 2008; WATANABE et al., 2014).

3.3.2 Compostos bioativos

3.3.2.1 Conteúdo total de compostos fenólicos (CTCF)

O ensaio com o reagente *Folin-Ciocalteu* é um método espectrofotométrico que mede a redução do reagente pelos compostos fenólicos, com a formação de um complexo de coloração azulada que pode ser verificado no comprimento de onda de 760nm. É amplamente utilizado para a detecção e quantificação de compostos fenólicos em alimentos, pois é uma técnica simples e de baixo custo (IMEH & KHOKHAR, 2002; NACZK & SHAHIDI, 2006; IGNAT, VOLF & POPA, 2011).

Apesar da maioria dos méis analisados serem classificados como silvestres, os apiários estavam localizados em áreas próximas a algumas floradas específicas, como *Baccharis trimera*, *Bimucronata mimosa*, *Schinus terebinthifoliu* e *Eucalyptus*.

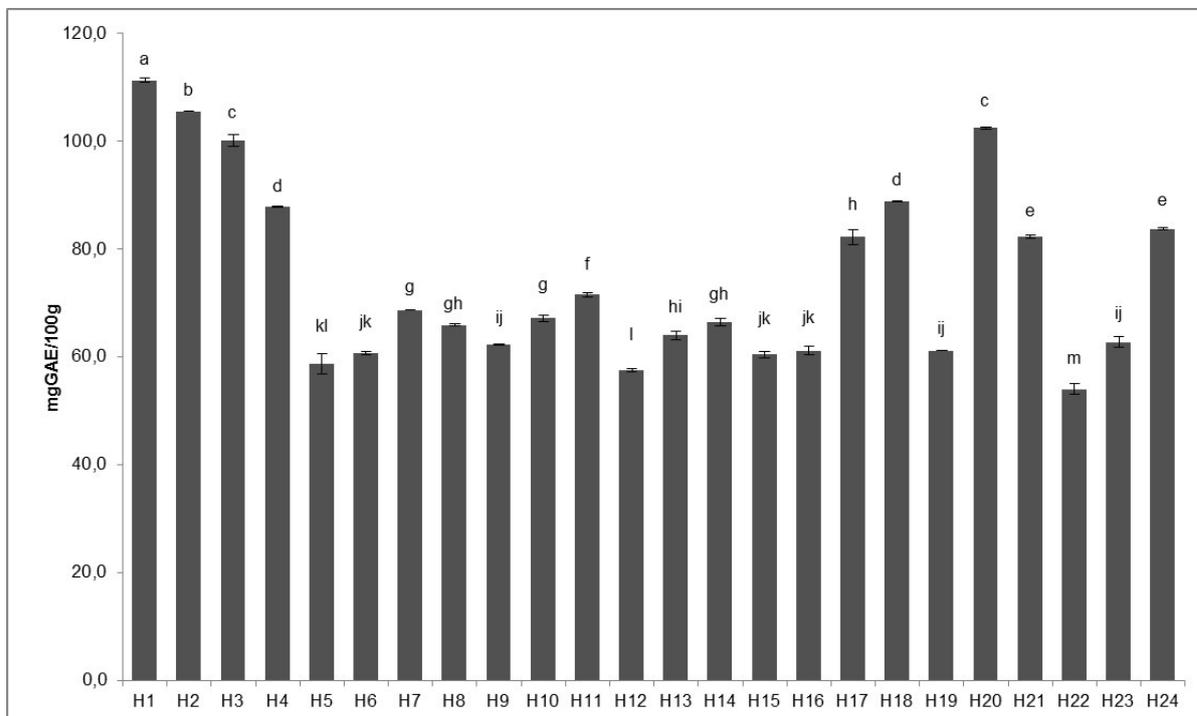


Figura 7 - Conteúdo total de compostos fenólicos em amostras de mel comercializadas no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Conteúdo fenólico expresso em mgEAG.100g⁻¹ de mel ± desvio padrão. *Letras diferentes no gráfico, diferem pelo teste de Tukey (p<0,05).

Através dos dados observados na figura 7, pode-se verificar que o CTCF do mel silvestre (H1) diferiu significativamente, e foi superior quando comparado às demais amostras. O teor da amostra de outro mel silvestre (H22) diferiu significativamente, porém foi inferior quando comparado ao conteúdo das outras amostras. Quando comparada as regiões (Figura 1), os méis da região ocidental continham os maiores níveis de compostos fenólicos (H1,H2,H3,H4,H5,H14), principalmente devido as amostras: H1 (111,37 mgEAG.100g⁻¹), H2 (105,62mgEAG.100g⁻¹) H3(100,15mgEAG.100g⁻¹) e H4(87,83mgEAG.100g⁻¹). Segundo Coelho (2011), na região ocidental a apicultura é bem desenvolvida, planejada e organizada, e isso está diretamente relacionado à qualidade do produto oferecido para comercialização.

De acordo com os resultados, o CTCF encontrados nas amostras de mel ficou entre 61,16 e 111,37 mgEAG.100g⁻¹. Esse resultado foi similar aos valores reportados por Escuredo et al. (2012) e Habib et al. (2014), estudando méis oriundos de Galícia (norte da Espanha) e regiões áridas como Emirados Árabes Unidos

(UAE), Oman e Yemen. Valores inferiores foram verificados por OZKOK, D'ARCY & SORKUN, (2010) e Meda et al. (2005), os quais relatam que em méis oriundos do norte da Turquia e Burkina Faso (país africano), o conteúdo de compostos fenólicos variou entre 3,66 a 36,59mg EAG.100g⁻¹ e de 32,59 a 114,75 mgEAG.100g⁻¹, respectivamente.

O mel manuka (*Leptospermum scoparium*) é um produto popularizado e com grande importância econômica, o qual é produzido a partir de uma florada nativa da Nova Zelândia. Esse mel tem sido exaustivamente analisado em função da sua propriedade antibacteriana, característica principalmente atribuída aos compostos fenólicos e a um composto chamado metilglioxal (STEPHENS et al., 2010; CHAN et al., 2013). Segundo Stephens et al. (2010), a bioatividade do mel mañuka é dependente da variedade e a da concentração dos compostos fenólicos presentes. Os autores avaliaram o conteúdo dos compostos fenólicos em méis mañuka com até um ano de armazenamento, e encontraram resultados semelhantes ao relatados na análise atual, variando entre 43,12 e 193.39mg.100g⁻¹. De acordo com os mesmos autores, a concentração de compostos fenólicos varia devido a cinco fatores: origem botânica, região geográfica, tratamento térmico intencional ou não, durante o processamento, tempo de armazenamento e método de extração dos compostos fenólicos.

A maioria dos méis âmbar claro (exceto H2), tinham menor teor de fenóis (H5;H7;H8;H12;H16;H19;H21;H22;H23). Este foi um resultado esperado, pois é de conhecimento que a cor reflete o teor de pigmentos presentes no mel, portanto, supõe-se que méis âmbar claro tenham menor teor de fenóis totais do que os âmbar e âmbar escuro.

3.3.2.2 Conteúdo total de flavonoides (CTF)

O CTF presente nas amostras de mel variou de 2,98 a 10,46 mgEQ.100g⁻¹ (Figura 8). Esses teores foram superiores aos encontrados por Martos et al. (2000) (2,0 a 2,5mgEQ.100g⁻¹) em amostras de méis oriundos do sul da Austrália, porém foram inferiores aos obtidos por Habib et al (2014), os quais estudando 16 amostras de méis provenientes de regiões áridas e não áridas de alguns países do oriente (Emirados árabe, Oman e Yemen), observaram que o mel heterofloral continha maiores teores de flavonoides, chegando a atingir 109,49mgEC.100g⁻¹.

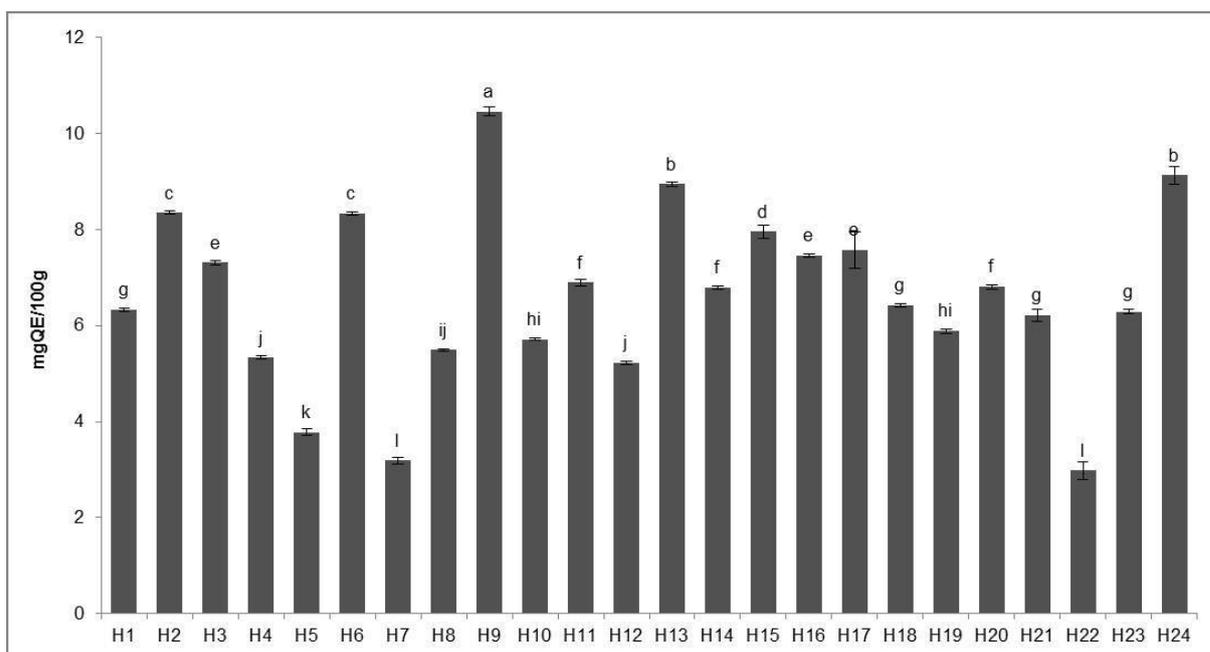


Figura 8 - Conteúdo total de flavonoides em amostras de mel comercializadas no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Conteúdo de flavonoides totais expresso em mgEQ(equivalente a quercitina).100g⁻¹ de mel ± desvio padrão. *Letras diferentes na coluna diferem pelo teste de Tukey.

Alguns autores caracterizam o mel de acordo com as suas origens botânica e geográfica, principalmente quando as relaciona ao conteúdo de flavonoides e até mesmo para flavonoides específicos (IURLINA et al., 2009). Iurlina et al. (2009), ao analisarem quinze méis argentinos, verificaram que três flavonoides (mirecitina, quercitina e luteolina) estavam presentes em todas as amostras estudadas e que, em geral, predominava a quercitina, representando inclusive 45% do conteúdo total de flavonoides.

Meda et al. (2005) utilizaram a mesma metodologia deste trabalho para avaliar comparativamente os flavonoides presentes nos méis de diferentes regiões de Burkina Faso (África) e verificaram como maior resultado 8,35mgEQ.100g⁻¹, que assemelha-se ao valor de 10,46mgEQ.100g⁻¹ observado na amostra de mel silvestre (H9). No presente estudo, os menores conteúdos de flavonoides, e com diferença significativa em relação aos demais, foram obtidos no mel silvestre oriundo de Três Coroas 2,99mgEQ.100g⁻¹ (H22) e no mel de eucalipto (H7) oriundo de Bagé, com 3,19mgEQ.100g⁻¹.

Aproximadamente 10% dos resultados médios do CTCF foram flavonoides (Figura 10), variando de 5% (H7) a 17% (H9). O CTF também variou de acordo com a cor, mel âmbar claro tinham, em média $5,49\text{mgEQ}\cdot 100\text{g}^{-1}$, âmbar $7,20\text{mgEQ}\cdot 100\text{g}^{-1}$ e âmbar escuro $7,66\text{mgEQ}\cdot 100\text{g}^{-1}$, como observado em CTCF, os resultados de flavonoides foram inferiores em amostras de coloração âmbar clara.

3.3.2.3 Conteúdo total de ácidos fenólicos (CTAF)

Os méis analisados continham teores totais de ácidos fenólicos variando de $0,49$ a $76,41\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ (Figura 9). As amostras H22 e H20 continham teores elevados, enquanto que H14 tinha o menor conteúdo.

Observou-se que todas as amostras continham mais ácidos fenólicos do que flavonoides. A coloração do mel variou de 65 a 150 mm (escala *Pfund*). Uma vez que a escala varia de 0 a 150mm, a maioria das amostras era de tonalidade escura. Os resultados estão de acordo com Bogdanov, Ruoff & Persano (2004), os quais relatam que méis de cor escura tem um alto índice de ácidos fenólicos e baixos teores de flavonoides.

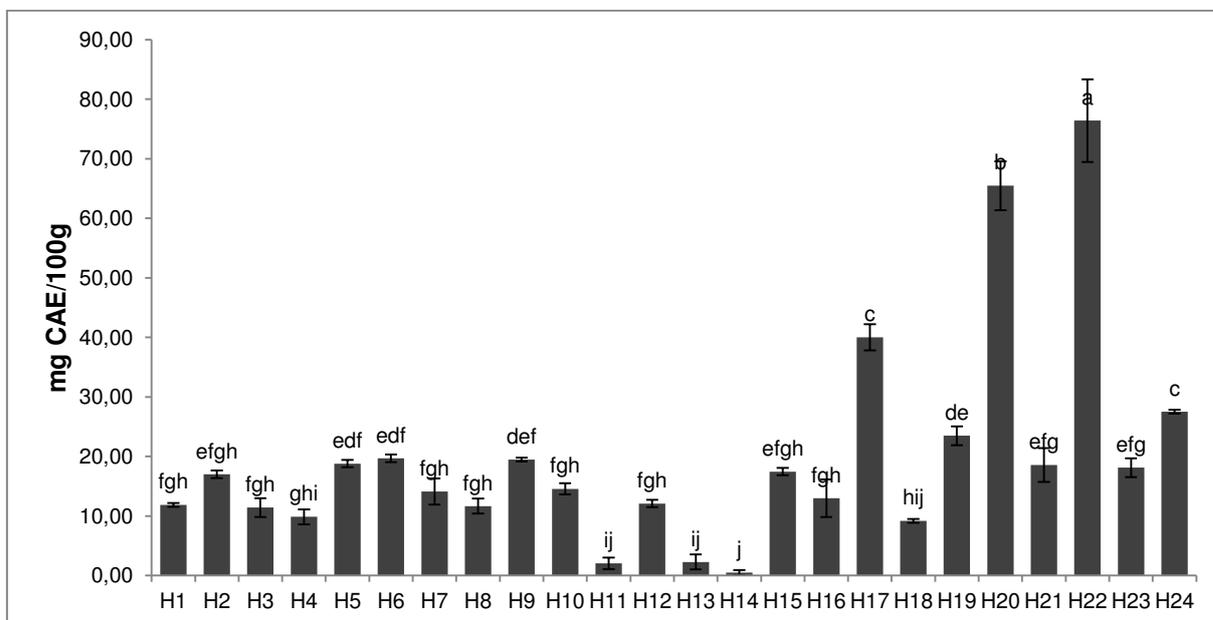


Figura 9 - Conteúdo total de ácidos fenólicos nos méis comercializados no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Expressos em mgEAC (equivalente a ácido cafeico). 100g^{-1} de mel \pm desvio padrão. *Letras diferentes na coluna diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Em média, ácidos fenólicos estavam presentes em 30% do CTCF, porém apresentando uma grande diferença entre os teores mínimos e máximos, onde a amostra H14 continha apenas 1% e H20 64%, respectivamente (Figura 10).

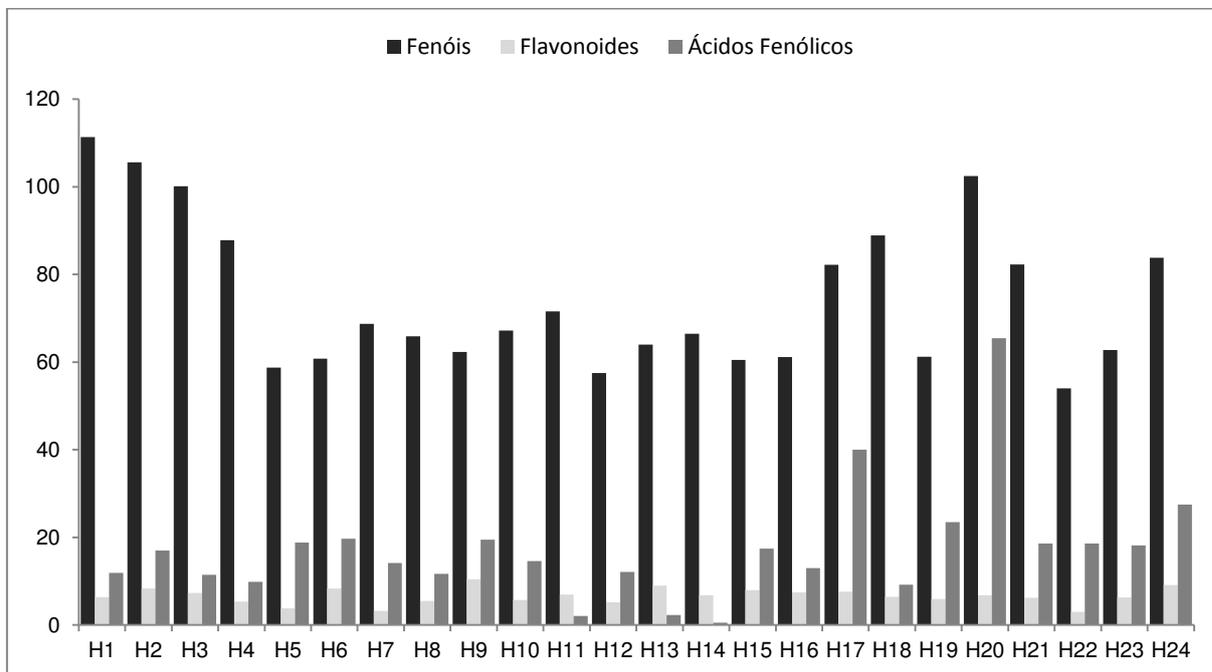


Figura 10 - Conteúdo total de compostos fenólicos (mgEAG.100g⁻¹), flavonoides(mgEQ. 100g⁻¹) e ácidos fenólicos (mgEAC. 100g⁻¹) em amostras de mel comercializadas no estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

A percentagem de CTAF em relação ao CTCF foi maior na região metropolitana, onde, em média, 50% dos compostos fenólicos encontrados no mel naquela região eram ácidos fenólicos. Estas variações dos resultados de ácidos fenólicos e flavonoides quando comparados com o teor total de compostos fenólicos pode ser explicada pelo método espectrofotométrico utilizado não ser um método específico, o qual detecta todos os grupos fenólicos presentes no extrato e também alguns não fenólicos mas que possuem poder antioxidante e que reagem com a solução utilizada (*Folin-Ciocalteu*), como, proteínas e ácido ascórbico (NACZK & SHAHIDI, 2004).

3.3.2.4 Conteúdo total de carotenoides (CTC)

Os méis continham teor total de carotenoides variando de 0,56 a 6,19mg β -caroteno.Kg⁻¹ (Figura 11), os quais são semelhantes aos verificados por Alvarez-Suarez et al.(2010). Esses autores utilizaram o mesmo método e obtiveram resultados de 1,17 a 5,57 6,19mg β -caroteno.Kg⁻¹ em amostras de méis oriundas de

Cuba. Boussaid et al.(2014) também estudaram o teor total de carotenoides de seis méis monoflorais da Tunisia (hortelã, marroio, eucalipto, tomilho, alecrim e laranjeira) e observaram maior conteúdo no mel de laranjeira ($4,72 \text{ mg}\beta\text{-caroteno.Kg}^{-1}$).

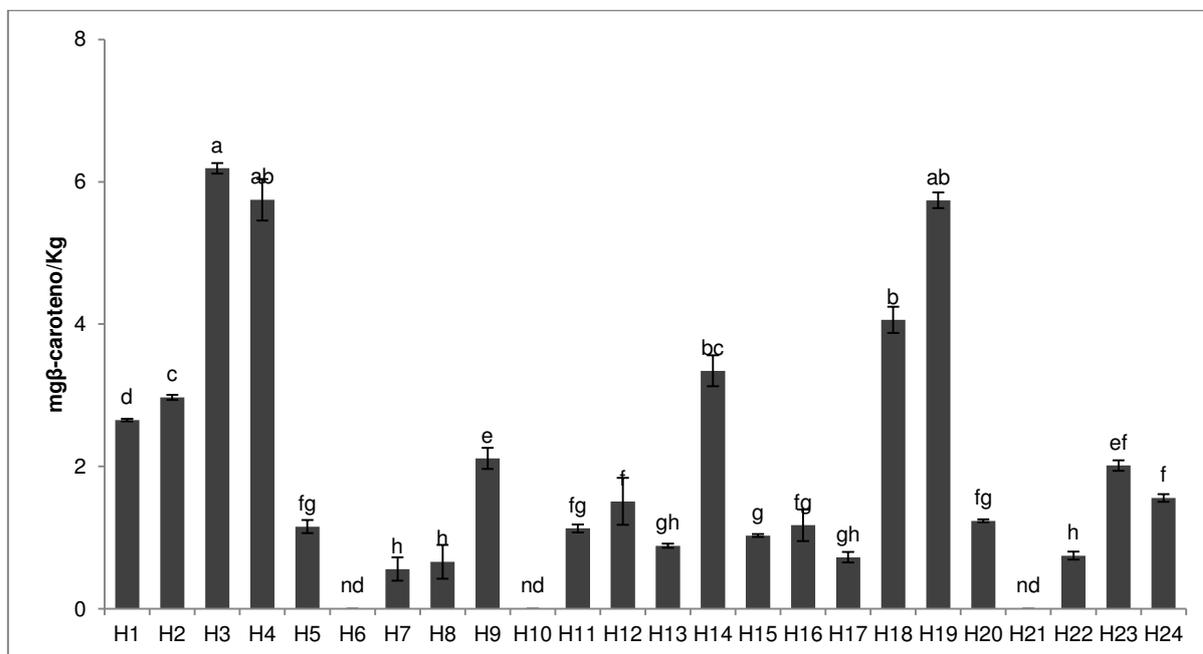


Figura 11 - Conteúdo total de carotenoides nos méis comercializados no estado do Rio Grande do Sul. Expresso em $\text{mg}\beta\text{-caroteno.Kg}^{-1} \pm$ desvio padrão. *Letras diferentes na coluna diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). nd (não detectável pelo método).

As amostras de méis silvestres (H6 e H10) e de eucalipto (H21) não apresentaram conteúdos dentro do limite de detecção do método. Os teores de carotenoides podem estar relacionados com a coloração do mel, normalmente, méis que apresentam coloração extra branco (9 a 17mm *Pfund*) contem baixos teores de carotenoides (FERREIRA et al., 2009; ALVAREZ-SUAREZ et al., 2010). Porém, no presente estudo, em que houve pouca variabilidade de cor (âmbar claro, âmbar e âmbar escuro) essa relação não foi observada.

Em contraste, o mel âmbar claro (H19) mostrou a maior CTC, demonstrando que, embora normalmente méis escuros tenham uma maior quantidade de carotenoides (H3, H4 e H18), estes compostos podem também ocorrer em quantidades significativa nos méis que apresentam coloração âmbar clara.

3.3.3 Atividades antioxidantes *in vitro*

3.3.3.1 Técnica de captura de radicais DPPH

É bem conhecido que o processo oxidativo é iniciado pelo ataque aos radicais livres, bem como que a eliminação desses radicais é um importante mecanismo para evitar a oxidação. Portanto, normalmente usa-se o artifício de analisar a capacidade que diferentes compostos possuem para inibir a oxidação, através da eliminação dos radicais presentes (CANADANOVIC-BRUNET et al., 2014). Os radicais mais usados com essa finalidade são o DPPH (2,2 difenil-1-picrilhidrazil) e o ABTS (2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline)-6-sulfônico) (LACHAMAN et al., 2010; SILVA et al., 2013; HABIB et al., 2014; WILCZYNSKA et al., 2014).

O método de determinação da atividade antioxidante por DPPH baseia-se na reação que o antioxidante (bioativos) presente na amostra possui frente ao radical. Na presença do antioxidante, a coloração púrpura escura do DPPH decai até um produto branco, incolor, sendo a mudança de absorbância monitorada através da espectrometria. A redução da absorção é relatada como a eficiência da amostra, extrato ou padrão, frente ao radical (CANADANOVIS-BRUNET et al., 2014).

A atividade frente ao radical (DPPH) variou significativamente entre a maioria das amostras de mel (Figura 12). A atividade antioxidante mais elevada ($17,21\text{mgEAQ}\cdot 100\text{g}^{-1}$) foi observada na amostra de mel de eucalipto (H24), enquanto que as atividades mais baixas ($2,48$ e $2,62\text{mgEAQ}\cdot 100\text{g}^{-1}$) foram observados em H13 e H21 (não detectável). H24 também continha alto CTF; H13 e H21 baixos CTCF e CTAF. Meda et al. (2005) determinaram as atividades antioxidantes em diversos tipos de mel de Burkina Faso (África) e os resultados médios registradas foram de $12,94\text{mgQEA}\cdot 100\text{g}^{-1}$, ou seja, inferiores aos encontrados neste estudo. Por outro lado, Noor et al. (2014) encontraram $2,85$ - $39,86\text{mgQEA}\cdot 100\text{g}^{-1}$ a partir de méis coletados em diferentes regiões do Paquistão.

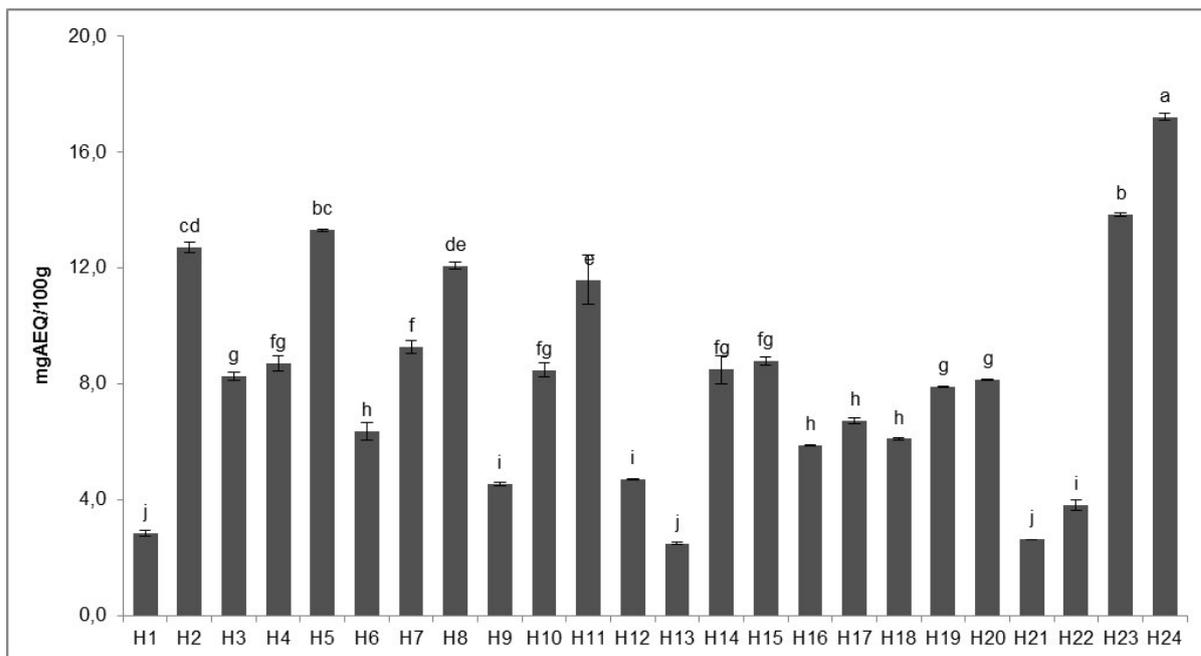


Figura 12 - Atividade antioxidante dos méis comercializados no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Atividade antioxidante frente ao radical DPPH, mgAEQ (antioxidante equivalente a quercitina).100g⁻¹ de mel \pm desvio padrão. *Letras diferentes na coluna diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A capacidade antioxidante não é a única responsável pelos efeitos benéficos à saúde do ser humano, por outro lado, muitas das ações biológicas que os compostos bioativos apresentam, têm sido atribuídas a essa propriedade. Portanto, a capacidade antioxidante do mel ou de seus componentes individuais, representa um parâmetro útil para correlacionar com as determinações dos compostos bioativos (ALVAREZ-SUAREZ et al., 2010).

3.3.3.2 Técnica de captura de radicais ABTS

Em média, méis de eucalipto (9,98mgEAQ.100g⁻¹) apresentaram maior atividade antioxidante do que os méis silvestres (7,63mgEAQ.100g⁻¹). Por outro lado, o inverso ocorreu com a análise de ABTS, onde o teor médio de mel de eucalipto (52,43mgEAT.100g⁻¹) foi mais baixo do que o obtido nos méis silvestres (60,17 mgEAT.100g⁻¹). Os méis apresentaram atividade antioxidante entre 8,24 a 111,48mgEAT.100g⁻¹ pelo método de ABTS (Figura 13), sendo cerca de 7 vezes superior a atividade encontrada pelo método de DPPH.

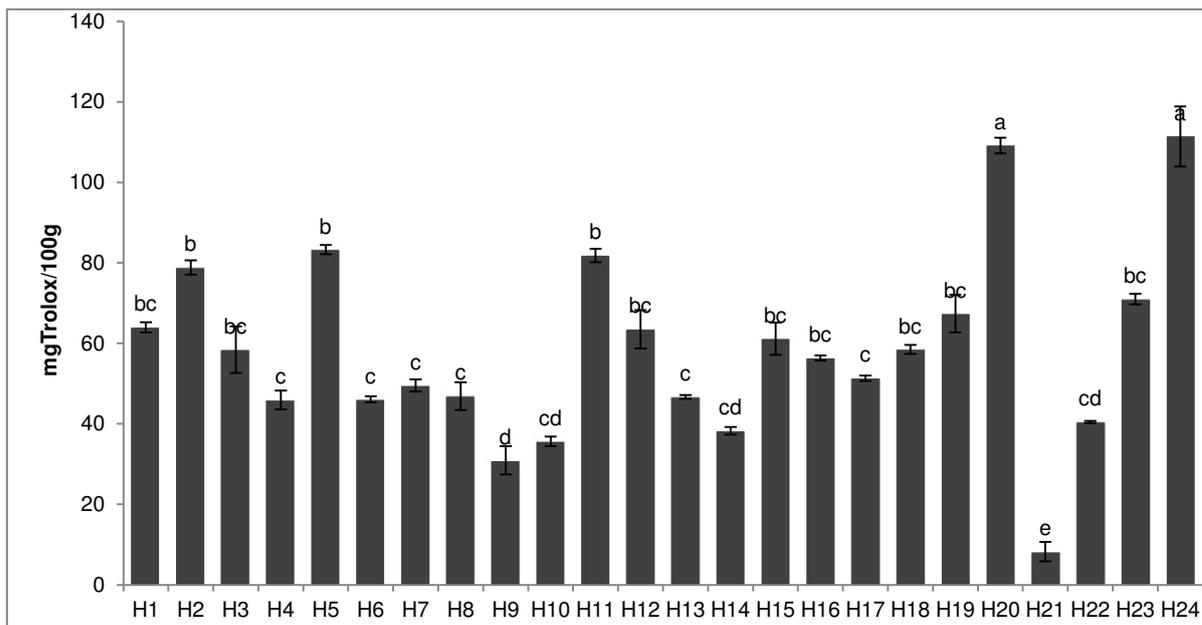


Figura 13 - Atividade antioxidante dos méis comercializados no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Atividade antioxidante frente ao radical ABTS, mgAET (antioxidante equivalente a trolox).100g⁻¹ de mel \pm desvio padrão. *Letras diferentes na coluna diferem pelo teste de Tukey.

Lachman et al.(2010) também compararam a atividade antioxidante determinada pelos dois métodos e observaram resultados sempre superiores pelo método de ABTS. O objetivo destas duas determinações foi detectar qual delas seria a mais adequada na avaliação da atividade antioxidante nos méis. Verificou-se que o ensaio de ABTS era mais adequado, por apresentar correlações mais fortes (Tabela 5) com o conteúdo de todas as análises fitoquímicas (fenóis, flavonoides, ácidos fenólicos, carotenoides).O método com ABTS apresenta vantagem em relação a outros, pois pode ser utilizado tanto para amostras hidrossolúveis quanto lipossolúveis. É conhecido por apresentar excelente solubilidade, estabilidade e reprodutibilidade, além de ser um teste rápido para medir a atividade antioxidante (KUSKOSKI et al., 2005).

3.3.4 Atividade antibacteriana (CIM)

A técnica da concentração inibitória mínima (CIM) é um método que avalia a quantidade de composto ou conjunto de compostos mínimos necessários para inibir o crescimento de um micro-organismo teste. Os resultados de atividade antibacteriana foram demonstrados na tabela 4.

Tabela 4 - Atividade antibacteriana em méis do estado do Rio Grande do Sul, Brasil

Amostras	Atividade antibacteriana (mg.mL ⁻¹)*			
	<i>Shigella dysenteriae</i>	<i>Salmonella Typhimurium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
H1	100	50	10	10
H2	100	50	10	10
H3	50	10	25	200
H4	100	300	300	25
H5	10	10	10	10
H6	25	25	50	25
H7	350	350	50	10
H8	10	25	10	10
H9	150	350	250	150
H10	300	300	250	100
H11	200	300	200	50
H12	150	150	10	10
H13	10	25	10	10
H14	50	100	10	10
H15	50	10	10	10
H16	25	25	10	10
H17	10	25	10	10
H18	25	100	10	50
H19	10	25	10	10
H20	50	300	10	10
H21	100	250	10	10
H22	50	350	50	10
H23	10	10	10	10
H24	300	400	150	200

atividade antimicrobiana através do uso da técnica CIM (concentração inibitória mínima) necessária para inibir o crescimento bacteriano, expresso em mg de mel/ml de água ultra pura necessário para inibir o crescimento da cepa correspondente.

As amostras de Cacequi (H5) e Três Coroas (H23) apresentaram os melhores resultados (CIM:10mg.mL⁻¹) contra as quatro bactérias patogênicas analisadas. As mesmas amostras também eram de coloração âmbar clara, as quais apresentaram os melhores resultados no que diz respeito às atividades antioxidantes e resultados intermediários de compostos bioativos.

3.3.5 Estudo da correlação

Diversos autores sugerem que as atividades antibacteriana e antioxidante de diferentes tipos de mel podem estar relacionadas com alguns parâmetros físico-químicos, como a cor e conteúdo de bioativos (BALTRSAITYTE et al., 2007; ESCRICHE et al., 2014; ESCUREDO et al., 2012).

As correlações entre os parâmetros avaliados nesse estudo foram verificadas através da análise de coeficiente de correlação de Pearson's. Observa-se que houve correlação positiva entre conteúdo total de compostos fenólicos (CTCF) e conteúdo

total de carotenoides (CTC); atividade antioxidante por ABTS e conteúdo total de carotenoides (CTC); conteúdo total de ácidos fenólicos (CTF) e cor (Tabela 5).

Tabela 5 - Coeficiente de correlação de *Pearson's* para compostos fenólicos totais, flavonoide total, atividade antioxidante e cor em amostras de méis provenientes do estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

	CTCF	CTF	CTAF	CTC	DPPH	ABTS	COR
CTCF	1	0.189	0.034	0.384*	0.032	0.305	0.307
CTF		1	-0.219	0.04	-0.002	0.109	0.559*
CTAF			1	-0.224	-0.082	0.214	-0.226
CTC				1	0.059	0.63**	-0.023
DPPH					1	0.073	0.306
ABTS						1	0.118
COR							1

Correlações de *Pearson's* entre conteúdo total de composto (CTCF), conteúdo total de flavonóide total (CTF), conteúdo total de ácidos fenólicos (CTAF), conteúdo total de carotenóides (CTC), atividades antioxidante DPPH e ABTS, coloração

^a95% de intervalo de confiança

* significativo $p \leq 0,05$

** significativo $p \leq 0,001$

Houve também correlação positiva (porém não significativa) entre CTCF com atividade antioxidante (ABTS) e coloração. Mesmo que esta correlação não seja significativa, ela não pode ser ignorada, pois é um resultado importante. Diferentemente do que se pensava anteriormente, CTCF melhor se correlacionou com a atividade antioxidante pelo ensaio ABTS do que com o DPPH.

Diferentes métodos são utilizados com o intuito de verificar a ação antioxidante *in vitro* que os alimentos possuem. Os métodos de ABTS e DPPH têm uma aplicação mais conveniente e popular, por consequência, são os que fornecem a maioria dos dados de atividade antioxidante em diferentes alimentos (FLOEGEL et al., 2011). A atividade antioxidante observada em méis depende de vários compostos e a ação sinérgica entre eles, sendo a maioria desses compostos fenólicos, carotenoides, aminoácidos, peptídeos, vitaminas e outros (GHELDOLF & ENGESETH, 2002). Quando aplicada uma técnica como a de ABTS, que é capaz de detectar diversos compostos (hidrofílicos e lipofílicos) há maior chance de haver correlações, como que ocorreu entre a técnica frente ao conteúdo total de carotenoides (CTC). Assim, como observado por Wilczynska et al. (2014), as diferenças na atividade antioxidante medidas pelos dois métodos (ABTS e DPPH) sugerem que a cinética de eliminação de radicais e a reação nos dois sistemas pode diferir significativamente.

. Alvarez- Suarez et al. (2010) também relataram correlações entre CTCF e cor, onde a maior CTCF foram detectados em méis de coloração âmbar. Sabe-se que a composição química do mel é altamente dependente da origem floral do néctar, do clima e das condições ambientais, o que pode explicar as diferenças dos resultados apresentados entre as amostras (GHELDOLF & ENGESETH, 2002; AZEREDO *et al.*, 2003).

No geral, as amostras de méis apresentaram pequenas diferenças nos resultados, porém, a exceção ocorreu na amostra H20. Essa amostra é proveniente de uma associação de apicultores de Santo Antônio da Patrulha. Portanto, trata-se de um produto comercializado que atende aos requisitos de segurança e qualidade exigidos em uma indústria processadora de alimentos. Um apiário bem planejado, manejo e processamento adequado fazem toda a diferença na qualidade do mel. Talvez por esses fatores, a amostra H20 de coloração âmbar escura apresentou os melhores resultados de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante (ABTS). Apesar disso, H20 não continha a melhor atividade antibacteriana, demonstrando que além dos compostos fenólicos e carotenoides, outras propriedades, como, acidez (ORTIZ-VÁZQUEZ et al., 2013) osmolaridade (GEORGE & CUTTING, 2007), óxido nítrico (KAMARATOS et al., 2014) e peróxido de hidrogénio (KNIGHT, 2013) podem estar relacionadas com a inibição bacteriana.

3.4 Conclusão

O estudo demonstrou que as vinte e quatro amostras de méis provenientes de diversas regiões do estado do Rio Grande do Sul apresentaram variabilidade nos teores dos compostos bioativos analisados por espectrofotometria. Os compostos fenólicos foram os bioativos encontrados em maior quantidade, sendo principalmente ácidos fenólicos. Os carotenoides foram encontrados em baixas concentrações, mas suficientes para contribuir para a sua atividade antioxidante (ABTS). A atividade antimicrobiana, principalmente frente aos micro-organismos Gram positivos, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* sugere que os méis avaliados podem desempenhar um papel importante como produtos naturais antibacterianos, a fim de minimizar os efeitos de intoxicações bacterianas e contribuir para uma alimentação saudável.

4 Capítulo 2 – Atributos de qualidade em méis provenientes do Rio Grande do Sul

4.1 Introdução

Fatores climáticos e o crescente aumento do consumo propiciaram uma baixa disponibilidade de mel no mercado mundial. Com isso, países como o Brasil, tendem a alavancar as suas exportações. Por outro lado, para que isso aconteça é necessária à adoção de métodos analíticos que confirmem a identidade e qualidade do produto.

As características físico-químicas do mel são dependentes de um conjunto de fatores, tais como, condições climáticas, tipo de solo, estágio de maturação, estágio fisiológico da colônia, alimentação da abelha (tipo, qualidade e proporção do néctar e pólen), genética da abelha que em conjunto possibilitam estabelecer a qualidade do mel produzido (SILVA, QUEIROZ & FIGUEIREDO, 2004).

Alguns parâmetros são considerados úteis para detectar possíveis adulterações, como por exemplo, a pureza pode ser determinada pela condutividade elétrica, a maturidade pela análise de umidade e a deterioração através de técnicas de acidez livre e hidroximetilfurfural (PUSCAS, HOSU, & CIMPOIU, 2013; SILVA et al., 2016). As formas mais comuns de adulteração de mel são pela adição de adoçantes comerciais, como, açúcar de cana, açúcar de beterraba, xarope de glicose de milho, xarope de maltose, melado, dextrina, amido e solução de açúcar invertido (MARCHINI, SODRÉ & MORETI, 2004; RICHTER et al., 2011; PUSCAS, HOSU & CIMPOIU, 2013; SILVA et al., 2016). Geralmente essas adulterações são praticadas durante o processamento do mel, nas etapas de filtração, centrifugação e decantação, mas também podem ser consequência de uma alimentação artificial fornecida às abelhas, a qual pode ser desde uma mistura de mel e água, até preparados contendo uma mistura de ingredientes. Por fim, alterações naturais como aquelas decorrentes de fatores climáticos, como o excesso de chuva ou calor (CHIRIFE et al., 2006; RICHTER et al., 2011;).

A fim de elucidar essas questões e manter o padrão de qualidade do produto, são realizadas algumas determinações analíticas, tais como, acidez, pH, sólidos solúveis, minerais, teor de hidróximetilfurfural (HMF) e coloração.

A determinação da acidez livre é importante para estimar o grau de deterioração do mel, em que valores mais elevados podem caracterizar a presença de ácidos orgânicos em decorrência da fermentação de açúcares. De acordo com diversos autores, todos os méis apresentam uma ligeira acidez, de aproximadamente 0,57% em ácidos orgânicos (KARABAGIAS et al., 2014)

A determinação do pH pode ser útil para verificar adulterações, como a adição de xarope de milho, que irá acarretar em um valor de pH superior ao verificado nos méis puros (RIBEIRO et al., 2014). É conhecido que valores de pH entre 3,2 e 4,5 e a acidez natural do mel, podem inibir o crescimento de micro-organismos (KARABAGIAS et al., 2014 e SUAREZ-LUQUE et al., 2002). Portanto, aqueles méis que apresentam valores de pH mais elevados correm maior risco de contaminação microbiológica. Dessa forma, uma adulteração como a adição de açúcar pode ser responsável por desencadear diversas reações deteriorantes.

O teor de cinzas é uma medida de qualidade que avalia o conteúdo total de minerais presentes no mel. O conhecimento sobre a quantidade de minerais presentes em méis é muito importante, pois pode informar sobre possível poluição ambiental, origem geográfica e nutricional (KARABAGIAS et al., 2014; ALVES et al., 2013).

Talvez a cor seja o atributo que mais influencia a comercialização e o preço alcançado por diferentes méis, o qual depende muito do interesse de cada região, onde alguns mercados apreciam méis escuros e outros méis claros. A coloração do mel pode também estar relacionada com a origem botânica, a quantidade de minerais presentes, bem como a temperatura estabelecida em todo o processo de obtenção do mel, desde a coleta no interior da colméia até o armazenamento pós-processamento (SILVA et al., 2016).

A cor é a imediata propriedade física percebida pelos consumidores e a sua determinação é de grande utilidade na classificação de diferentes méis (BOGDANOV, RUOFF & PERSANO, 2004). Atualmente, são três os métodos usados para determinar a coloração de méis, uso da escala *Pfund* (BELAY et al., 2015), por colorímetro *Minolta* (WILCZNSKA, 2014) ou por espectrofotometria (CIMPOIU et al., 2013). Apesar de o método *Pfund* ser limitado, em razão de

fornecer a medida de intensidade de cor apenas ao longo do tom âmbar característico do mel, ele é o mais comumente usado e aceito quanto à classificação de méis comercializados (BOGDANOV, RUOFF & PERSANO, 2004).

A umidade presente no mel pode variar em decorrência de diversos fatores, como origem botânica, maturidade, processamento, armazenamento, e assim, ter influência direta nas propriedades de qualidade do mel, tais como na viscosidade, cor, aroma, sabor, solubilidade e período de conservação (YÜCEL & SULTANOGLU, 2012; ESCUREDO et al., 2013.).

A quantidade de 5-hidroxiacetilfurfuraldeído (HMF) presente em mel fresco é inexistente ou muito pequena. A sua formação é ocasionada somente quando o produto é sujeito a longos períodos de armazenamento, quando submetido a temperaturas elevadas ou pela adulteração, como por exemplo, a adição de xarope de açúcar invertido (AJLOUNI & SUJIRAPINYOKUL, 2010; KOWALSKI, 2013)

A cristalização do mel durante o armazenamento é um problema tecnológico comum, e isso ocorre devido à elevada concentração de açúcares simples. O mel sólido não é bem aceito pelo mercado consumidor, de modo que muitas vezes torna-se necessário o aquecimento do produto a fim de liquefazê-lo novamente.

O Codex Alimentarius (2001) e Comissão Internacional de mel (2002) definiram como a concentração máxima de HMF permitida um valor equivalente a 40mg.kg^{-1} de mel a partir de regiões não tropicais e 80mg.kg^{-1} de mel a partir de regiões tropicais. Já a legislação brasileira preconiza valores de HMF de 60mg.kg^{-1} (BRASIL, 2000). Valores muito elevados ($>500\text{mg.kg}^{-1}$) de HMF são característicos de adulteração, portanto, o HMF é considerado pelos órgãos fiscalizadores um importante meio de verificar a qualidade de méis comercializados.

Através das determinações físico-químicas é possível determinar se o manejo e o processamento foram adequados, sendo inclusive viável a diferenciação e tipificação desses méis através de uma análise específica, como a de compostos fenólicos.

Os compostos fenólicos são um grupo de compostos heterogêneos, os quais são resultantes do metabolismo secundário de vegetais (STRUBE et al., 2005), e dentre eles, os flavonoides constituem o maior grupo, que possuem como característica principal um estrutura de difenil propano ($\text{C}_6\text{C}_3\text{C}_6$) (SKIBOLA & SMITH, 2000). Além desses, os ácidos fenólicos também se apresentam em proporções elevadas no mel (PYRZYNSKA & BIESAGA, 2009), tratam-se de compostos que

possuem estrutura simples C6-C1 e se diferenciam pelo número e posição das hidroxilas ligadas ao anel aromático (ROBBINS, 2003; OZKOK, D'ARCY & SORKUN, 2010).

Os compostos fenólicos presentes em méis produzidos no mundo inteiro geralmente variam devido as suas origens botânicas e geográficas (OZKOK, D'ARCY & SORKUN, 2010), as quais podem permitir sua discriminação devido ao predomínio de compostos específicos (ESCRICHE et al.,2014).

Alguns países da Europa, Estados Unidos e Canadá são grandes apreciadores de mel. O Brasil, buscando atender esse mercado externo que se encontra em expansão, tem se organizado a fim de tornar o mercado apícola cada vez mais lucrativo para o país, principalmente através da exploração e comercialização de mel. A Associação Brasileira de Exportadores de Mel (ABEMEL) ressalta o investimento em políticas que visam ao enquadramento do mel brasileiro nos padrões de qualidade exigidos no mercado internacional (APEX, BRASIL,2014).

Assim, a proposta desse estudo foi de avaliar através da composição físico-química a qualidade do mel produzido no Rio Grande do Sul, Brasil.

4.2 Material e método

4.2.1 Amostras

Méis de diferentes origens botânicas decorrentes de um delineamento inteiramente casualizado foram analisados (Tabela 1). As amostras foram fornecidas por apicultores e coletadas de várias regiões do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. As amostras foram obtidas das seguintes regiões: oeste (H1, H2, H3, H4, H5, H10, H11, H14), metropolitana (H6, H16, H19, H20, H21, H22, H23), sudoeste (H7, H12, H13), sudeste (H8, H9, H17, H18), nordeste (H15) e noroeste (H24) do estado do RS. As amostras foram adquiridas entre janeiro e novembro de 2013 e mantidas em frascos de polietileno esterilizados com ausência de luminosidade e sob refrigeração (5°C).

4.2.2 Padrões e reagentes

Todos os produtos químicos eram do mais alto grau analítico. Todos os padrões cromatográficos de ácidos fenólicos e flavonoides, resina amberlite XAD2, foram adquiridos da marca Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA), metanol e ácido fórmico da marca Vetec. A água foi purificada por meio de um sistema de purificação Ultra (*Mega Purity*).

4.2.3 Determinação físico-química

4.2.3.1 Acidez

O conteúdo de acidez foi determinado através do método da AOAC (1995), em que 10g de amostra foi dissolvida com 75mL de água, homogeneizada e realizada leitura do pH. A solução de mel foi titulada com solução de hidróxido de sódio 0,05N até pH 8,5 e anotado o volume (V). Imediatamente, foi adicionado nesta solução 10mL de solução de hidróxido de sódio 0,05N e titulada com solução de ácido clorídrico 0,05N até o pH 8,3 (V_a). O branco foi determinado com a titulação de 75mL de água com hidróxido de sódio 0,05N (V_b) até pH 8,5. Após, os resultados foram calculados segundo a Equação 1, 2 e 3.

$$Acidez_{livre} = \frac{(V - V_b) \cdot 50 \cdot f}{P} \quad (1)$$

Onde:

V = valores de mililitros da solução de hidróxido de sódio 0,05N gasto na titulação

V_b = valores de mililitros de solução de hidróxido de sódio 0,05N gasto na titulação para o branco

f = fator da solução de hidróxido de sódio 0,05N

P = massa da amostra em gramas

$$Acidez_{lactônica} = \frac{(10 - V_a) \cdot 50 \cdot f'}{P} \quad (2)$$

V_a = n° de mL de solução de ácido clorídrico 0,05N gasto na titulação

f' = fator da solução de ácido clorídrico 0,05 N

P = massa da amostra em gramas

$$Acidez_{total} = acidez_{livre} + acidez_{lactônica} \quad (3)$$

Os resultados foram expressos em miliequivalentes.Kg⁻¹ de mel.

4.2.3.2 Umidade e sólidos solúveis

Foram determinados por refratometria a 20°C, sendo utilizado refratômetro (Marca Quimis - modelo Q-109B). Para interpretação dos dados de umidade foi utilizada a tabela de *Chataway* (AOAC, 1995; IAL 1985). Os resultados foram expressos em percentual de umidade e os sólidos solúveis em °Brix.

4.2.3.3 Minerais

Foi preparada uma solução de mel a 20% sobre seus sólidos solúveis, empregando a tabela de *Chataway*. Em seguida, a solução de mel foi colocada na célula do condutivímetro (condutivímetro de bolso EC/TDS e temperatura, 0 a 3999 µS.cm¹, DIST@5, MODELO HI98311), mantida a 20 °C, durante 15min a fim de fazer a leitura (AOAC,1995). Os resultados foram expressos em µS.cm¹.

4.2.3.4 Hidroximetilfurfural (HMF)

A determinação da concentração do hidroximetilfurfural (HMF) foi realizada seguindo método recomendado pela Instrução Normativa do Ministério da Agricultura e do Abastecimento (BRASIL, 2000; BOGDANOV et al., 1997; AOAC, 1995).

A análise foi realizada através da clarificação das amostras com soluções de Carrez I ($K_4 [Fe (CN)_6].3H_2O$) e Carrez II ($Zn(CH_3COO)_2.2H_2O$) e pela adição de solução de bissulfito de sódio (0,2% m/v). Para isso, cerca de 5g de amostra e menos de 25mL de água foi transferido para um balão volumétrico de 50mL. Após, foi adicionado, 0,5mL de solução de Carrez I, homogeneizado e em seguida, adicionado 0,5mL de solução de Carrez II e novamente homogeneizado. Essa solução foi filtrada e transferida para quatro tubos. Onde, no primeiro tubo, contendo 5mL da solução filtrada, foi adicionado 5mL da solução de bissulfito de sódio, sendo esse tubo considerado como referência. Nos demais, também contendo 5mL da solução de amostra foram adicionados 5mL de água destilada, os quais foram denominados de soluções teste. As absorvâncias foram determinadas nos comprimentos de ondas 284 e 336nm em um espectrofotômetro UV-VIS (Spectrophotometer Jenway, 6705 UV/VIS). Os resultados foram expressos em $mg.kg^{-1}$. A quantificação foi realizada utilizando a Equação 4.

$$HMF = \frac{(A_{284} - A_{336}) \cdot \left[\left(\frac{126}{16830} \right) \left(\frac{1000}{10} \right) \cdot 1000 \right]}{P} \quad (4)$$

A_{284} = absorvância da solução com amostra no comprimento de onda de 284nm.

A_{336} = absorvância da solução com amostra no comprimento de onda de 336nm.

126 = peso molecular do hidroximetilfurfural

16830 = absorvidade molecular do hidroximetilfurfural à 284nm

1000 = conversão de g para mg

10 = diluição de 5g de mel em 50mL

1000 = conversão de g para Kg

P = peso em g

4.2.3.5 Potencial hidrogeniônico (pH)

O pH das amostras foi determinado segundo a metodologia das Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985). O pHmetro foi previamente calibrado com as soluções tampão 4,0 e 7,0. Após foi pesado 10g de mel e avolumado com 75mL de água destilada previamente fervida, homogeneizado e lido no equipamento.

4.2.3.6 Coloração

As amostras foram previamente homogeneizadas e aquecidas a 45°C, até a completa perda de cristalização. A cor foi medida com um colorímetro específico para amostras de mel (HANNA INSTRUMENTS– Honey color photometer - 96785). Antes das leituras o equipamento foi calibrado com padrão de glicerina. Os resultados foram expressos através da escala de *Pfund*, conforme a tabela 2.

4.2.4 Determinação de compostos fenólicos (cromatografia líquida)

O conteúdo de compostos fenólicos presentes nos méis foi determinado segundo método adaptado de Escriche et al., (2014).

Trinta gramas de resina Amberlite XAD-2(Supelco, Bellefonte, PA, EUA) foram embebidas em metanol durante 10min, após a maior parte do metanol foi decantada e substituída por água destilada. Esse conteúdo foi homogeneizado e deixado em repouso por 10min. Esse material foi usado para empacotar a coluna de vidro (30x3cm). Os méis foram dissolvidos (12,5g) em 125mL de solução pH 2,0 (acidificado com ácido clorídrico). A solução foi filtrada lentamente através da coluna empacotada e subseqüentemente, enxaguados com 150mL de água destilada a fim de remover todos os açúcares e outros compostos polares de mel. Os compostos fenólicos foram eluídos a partir do adsorvente com 125 ml de metanol. Os extratos de méis foram concentrados em rotaevaporador a 40°C, e o resíduo foi avolumado em 20mL de metanol de alta pureza.

A separação foi realizada usando um sistema cromatográfico UFLC SHIMADZU®, Modelo LC-20 da Shimadzu, acoplado a um detector de fotodiodo (DAD), trabalhando em dois comprimentos onda específicos, 280nm (ácidos gálico, hidroxibenzoico, seringico) e 320nm (ácidos cafeico, cumárico e ferulico). Foi utilizada coluna de fase reversa Eclipse XDB-C18 (150mm x4,6mm x 5µM) e sistema manual de injeção com volume fixo de 15 µL, temperatura da coluna de 40°C, e pressão máxima de 2500psi. As fases móveis usadas foram água e ácido fórmico (pH2,6) (Fase A) e metanol (Fase B). Os padrões cromatográficos foram avaliados individualmente e também em misturas. O tempo de eluição, o fluxo da fase móvel e o gradiente de eluição foram otimizados.

A melhor separação cromatográfica dos padrões foi obtida usando um fluxo de $1,0\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e um gradiente de eluição conforme está demonstrado na tabela 6.

Tabela 6 - Gradiente de concentração para a determinação de compostos fenólicos individuais.

Time (minutes)	[B%]
5	2
10	12
25	15
30	30
45	30
50	50
65	50
70	80
75	2
80	2

* [B] concentração do solvente metanol na corrida cromatográfica

Foram feitas curvas de calibração através das soluções seriadas dos seguintes padrões químicos: ácido gálico ($0,625\text{-}20\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 280nm); ácido hidroxibenzóico ($0,625\text{-}20\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 280nm); catequina ($12,5\text{-}200\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 280nm); ácido vanílico ($0,625\text{-}20\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 280nm); ácido cafeico ($0,625\text{-}20\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 320nm); ácido serínico ($0,625\text{-}20\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 280nm); epicatequina ($12,5\text{-}200\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 280nm); ácido cumárico ($0,625\text{-}20\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 320nm); ácido ferúlico ($0,625\text{-}20\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 320nm); rutina ($0,625\text{-}20\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 280nm); miricetina ($0,625\text{-}20\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 360nm); quercetina ($0,625\text{-}20\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 360nm); luteolina ($0,625\text{-}20\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 360nm); hesperetina ($1,25\text{-}20\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 280nm); campeferol ($0,625\text{-}20\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 360nm); apigenina ($0,625\text{-}20\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 360nm); pinocembrina ($0,625\text{-}20\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 280nm); crisina ($0,625\text{-}20\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 280nm); galangina ($0,625\text{-}20\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 360nm). Os resultados foram expressos em $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ de mel.

4.2.5 Análise estatística

Todas as determinações analíticas foram realizadas em triplicata e os resultados submetidos à análise de variância. Para comparação das médias foi utilizado o teste de Tukey, adotando-se o nível de significância de 5%, segundo os procedimentos do Statistical Analyses System (SAS, 1999).

4.3 Resultado e discussão

4.3.1 Composição físico-química

Os resultados da análise físico-química das amostras de mel são apresentados na tabela 7.

Os valores de umidade variaram de 15,2 a 25,0%, onde 20,83% das amostras apresentaram valores que ultrapassaram o limite permitido pela legislação brasileira (máximo 20%) (BRASIL, 2000). O conhecimento do percentual de umidade do mel é útil para melhorar a sua conservação e armazenamento, impedindo o crescimento de bolores e leveduras sobre a sua superfície (ESTEVINHO et al., 2012; SILVA et al., 2013). Níveis elevados de umidade são considerados prejudiciais tanto por influenciarem na contaminação quanto nas propriedades físicas, alterando a viscosidade e fluidez (SILVA, QUEIROZ & FIGUEIREDO, 2004; OLIVEIRA & SANTOS, 2011).

Tabela 7 - Composição físico-química de méis provenientes do estado do Rio Grande do Sul, Brasil

Amostras	Umidade (%)	Sólidos Solúveis (°Brix)	Acidez (mEquiv.g ⁻¹)	Minerais (μS.cm ⁻¹)	pH	Cor	HMF (mg.Kg ⁻¹)
H1	23,4 ab	75 e	54,44 cd	489,5 j	3,4 q	86 ghi	8,1 abcd
H2	22,4 b	76 e	32,95 fgh	401,5 k	4,0 ghi	117 bcd	10,0 a
H3	23,4 ab	75 e	27,25 fgh	394,5 k	3,9 ijk	150 a	4,2 efg
H4	25 a	72 f	24,45 gh	330,5 l	3,8 mno	117 bcd	1,5 g
H5	19 c	79 cd	42,27 def	870 d	4,0 efg	64 k	nd
H6	17,8 cde	80 cd	55,35 cd	741,5 fg	3,7 no	123 bc	9,0 ab
H7	18 cde	80 cd	40,96 defg	396,9 k	3,6 p	75 ijk	4,6 defg
H8	17,5 cde	81 bc	35,29 efgh	688,5 h	4,0 fgh	77 ijk	nd
H9	18,4 cd	80 cd	33,48 efgh	795 e	4,1 de	150 a	5,1 def
H10	19,2 c	79 d	42,34 def	599 i	3,9 hij	103 ef	1,9 g
H11	18,3 cd	80 cd	54,42 cd	847,5 d	4,2 bc	108 de	2,8 eg
H12	17,7	80 bc	31,64 fgh	744 fg	4,1 ef	69 jk	nd
H13	17,6 cde	81 bc	82,13 b	680 h	3,8 lm	146 a	0,9 g
H14	18,6 cd	79 cd	50,88 cde	635 i	3,8 mn	101 ef	8,9 abc
H15	18,2 cd	80 cd	65,29 bc	988,5 c	4,4 a	93 fg	nd
H16	18,6 cd	79 d	53,18 cd	702,5 gh	3,7 o	149 a	5,2 cdef
H17	18,6 cd	79 d	32,53 fgh	839,5 d	4,2 cd	92 fg	6,1 bcde
H18	17,8 cde	80 cd	23,86 gh	1066 b	3,9 hij	124 b	nd
H19	18,6 cd	79 d	23,50 gh	764 ef	4,4 a	112 cde	nd
H20	16,4 ef	82 ab	30,90 fgh	1112 a	3,9 jkl	149 a	9,2 ab
H21	19,1 c	79 cd	33,25 efgh	1007 c	4,4 a	127 b	nd
H22	15,2 f	83 a	21,01 h	258,5 m	3,8 klm	102 ef	3,0 efg
H23	23,3 ab	75 e	118,73 a	733,5 fg	3,4 q	150 a	3,7 efg
H24	17,1 de	81 bc	33,05 fgh	395,5 k	4,2 b	88 gh	3,8 efg

*nd (não detectável pelo método aplicado). Regiões: oeste (H1, H2, H3, H4, H5, H10, H11, H14), metropolitana (H6, H16, H19, H20, H21, H22, H23), sudoeste (H7, H12, H13), sudeste (H8, H9, H17, H18), nordeste (H15) e noroeste (H24) do estado do Rio Grande do Sul.

Ao analisar diferentes métodos de determinação de açúcares em mel, Silva et al. (2003) observaram que a determinação de sólidos solúveis reproduz com exatidão o conteúdo de açúcares totais, visto que a composição do mel em sólidos é basicamente seu conteúdo em carboidratos. Os autores encontraram valores de sólidos solúveis variando de 79,1 a 84,0°Brix nos méis comerciais de quinze regiões diferente do estado de Goiás. Os méis utilizados no presente estudo apresentaram sólidos variando de 72 a 83°Brix. É de conhecimento que resultados abaixo de 80°Brix indicam que o mel não foi coletado no tempo ideal de maturação ou coletados em ambiente de alta umidade, característico de períodos de chuva, etc.

A acidez total variou de 21,01meq.kg⁻¹ a 118,7321,01meq.kg⁻¹, onde 29% das amostras (H1;H6;H13;H14;H15;H16 e H23) apresentaram resultados acima do limite da legislação (50meq.kg⁻¹). A acidez do mel é decorrente da ação enzimática que ocorre após a abelha coletar o néctar e por diversos processos metabólicos produzir ácidos orgânicos, tais como, ácido glicônico, cítrico, láctico e butírico, que serão liberados no decorrer do processo de maturação do mel (RIBEIRO et al., 2009; OLIVEIRA & SANTOS, 2011; RICHTER et al., 2011).

A média da acidez total nas amostras analisadas foi de 43,46±1,09meq.kg⁻¹ e a acidez livre de 33,42±4,00 meq.kg⁻¹, teores inferiores ao observado por Silva et al. (2013), que encontraram resultados médios de acidez livre de 41,58±1,44meq.kg⁻¹ em nove méis de jandaíra (abelha sem ferrão) oriundos de duas regiões de Pernambuco, Brasil.

A média dos resultados encontrados na determinação de pH foi 3,95±0,011, semelhante ao observado por Bendini & Souza (2008), os quais encontraram valores médios de pH de 3,67 ao analisar méis de florada de cajueiro oriundos do estado do Ceará, Brasil. O pH baixo do mel inibe a presença e o crescimento de micro-organismos, fazendo com que esse produto possa ser utilizado como ingrediente na indústria alimentícia. Esse parâmetro é também de grande importância durante a extração e o armazenamento do mel, pois influencia diretamente na sua textura, estabilidade e no período de validade (GOMES et al., 2010; SILVA et al., 2013; RIBEIRO et al., 2014).

Segundo diversos autores, a cor é a propriedade física do mel que melhor se correlaciona com o conteúdo mineral (MORETTI et al., 2006; RIBEIRO et al., 2014). Foi observado em inúmeros trabalhos (BERETTA et al., 2005; BERTONCELJ et al.,

2007; BOGDANOV, 2009; KUS et al., 2014) que méis com coloração escura continham maior conteúdo de minerais do que os méis claros. Isso pode ser observado na tabela 7, onde as três amostras que continham maiores conteúdos de minerais foram as que apresentaram coloração âmbar escura.

O resultado médio de condutividade elétrica nas vinte e quatro amostras analisadas ficou em $685 \pm 7,6 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$, variando de 258,5 a $1112 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$. Não existe parâmetro para condutividade nas normas brasileiras, porém o *Codex Alimentarius* (2001) estipula valores acima $800 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ para méis de florada. Seguindo essa norma, 75% das amostras apresentaram valores abaixo de $800 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$, e portanto, abaixo do estipulado pela legislação internacional.

A determinação da condutividade elétrica, apesar de não ser exigida pela legislação brasileira, é considerada um bom critério para a determinação botânica do mel e atualmente substitui a análise de teor de cinzas (BOGDANOV et al., 1997; ALVES et al., 2005). Segundo Richter et al., (2011) a determinação de cinzas expressa o conteúdo de minerais presentes nos alimentos. Porém, a análise de condutividade elétrica apresenta algumas vantagens quando comparada à análise de cinza, pois, trata-se de uma técnica acessível, de baixo custo, fácil operação, precisão, necessidade de pouca amostra e sem uso de produto químico, sendo considerada assim, uma técnica altamente sustentável.

O conteúdo de hidroximetilfurfural (HMF) é um parâmetro amplamente reconhecido para avaliar a qualidade do mel. Traços desse composto podem ser encontrados em méis recém-coletados, porém níveis elevados são característicos de adulterações, sejam elas provocadas pelo aquecimento em temperatura elevada e por tempo prolongado, ou pela adição de açúcar invertido no mel (AJLOUNI & SUJIRAPINYOKUL, 2010; KOWASKI, 2013).

De acordo com o conteúdo de hidroximetilfurfural (HMF) (Tabela 7), nenhuma das amostras excederam o limite de $60 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ proposto pela legislação brasileira de identidade e qualidade do mel.

Esse resultado é ainda mais surpreendente se pensarmos que, no Rio Grande Sul, o clima é frio em boa parte do ano, portanto o mel cristaliza mais rápido, o que poderia conduzir o apicultor a utilizar temperaturas acima do permitido pela legislação (50°C) com o intuito de tornar o produto viscoso antes da comercialização.

No entanto, Fallico et al. (2004) relataram que mesmo submetendo o mel de eucalipto a temperaturas de 70°C não foi possível detectar quantidades de HMF nas primeiras 24h de aquecimento, o que pode estar relacionado com a maior estabilidade desses méis mesmo após longos períodos de armazenamento. Esses resultados são condizentes aos dados observados no presente estudo, em que muitas das amostras analisadas, de florada de eucalipto, apresentaram baixos teores de hidroximetilfurfural, mesmo após dois anos de armazenamento (as amostras foram coletadas em 2013 e analisadas em 2015).

A maioria das amostras de méis apresentou coloração âmbar escura (H2, H3, H4, H6, H9, H13, H16, H18, H20, H21, H23), seguido de méis âmbar (H1, H10, H11, H14, H17, H22, H24) e de méis âmbar claro (H5, H7, H8, H12, H15, H19).

4.3.2 Compostos fenólicos

Os métodos utilizados para a determinação de ácidos fenólicos e flavonoides por cromatografia líquida apresentam uma grande limitação em decorrência do longo tempo e da baixa eficiência de separação (HUANG et al., 2015). Em decorrência disso, métodos com resolução razoável e adequado tempo de separação, muitas vezes não possuem separação simultânea, e para que haja uma adequada separação de compostos muito similares, se faz necessário o uso de diferentes comprimentos de onda em uma mesma corrida cromatográfica.

Após inúmeros testes, foi proposta a utilização de três comprimentos de onda para a detecção dos diferentes compostos, 280, 320 e 360nm. Com isso foi possível separar com eficiência os compostos, além de apresentar adequada resolução cromatográfica. Os ácidos fenólicos, gálico, hidroxibenzoico, vanílico, seringico e os flavonoides catequina, rutina, pinocembrina, crisina, epicatequina foram identificados em 280nm. Os ácidos fenólicos, cafeico, cumarico, ferulico e o flavonoide hesperitina foram identificados em 320nm. E por fim, os flavonoides, mirecitina, quercetina, luteolina, campeferol, apigenina e galangina foram identificados em 360nm.

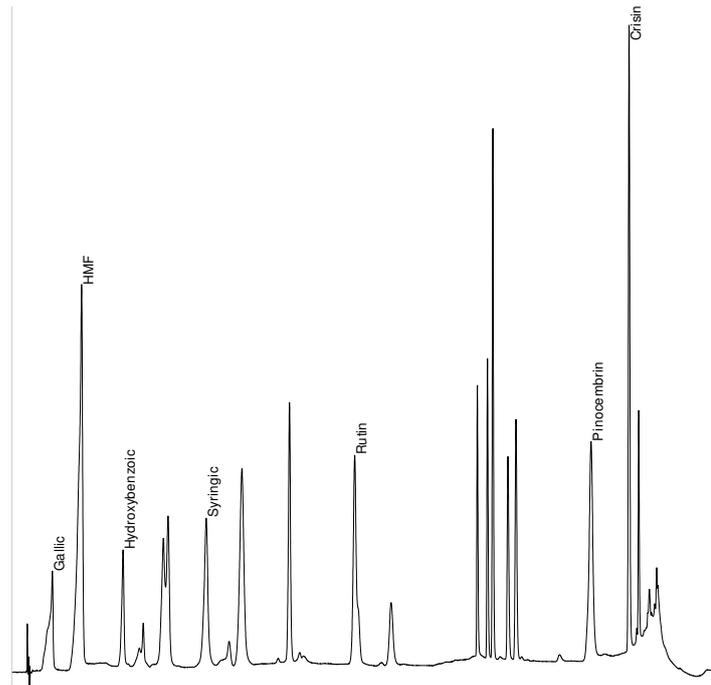


Figura 14 - Representação gráfica dos padrões de ácidos fenólicos e flavonoides a 280nm.

As figuras, 14,15 e 16 ilustram a separação de uma mistura de compostos padrões de 19 compostos fenólicos presentes nas amostras de méis.

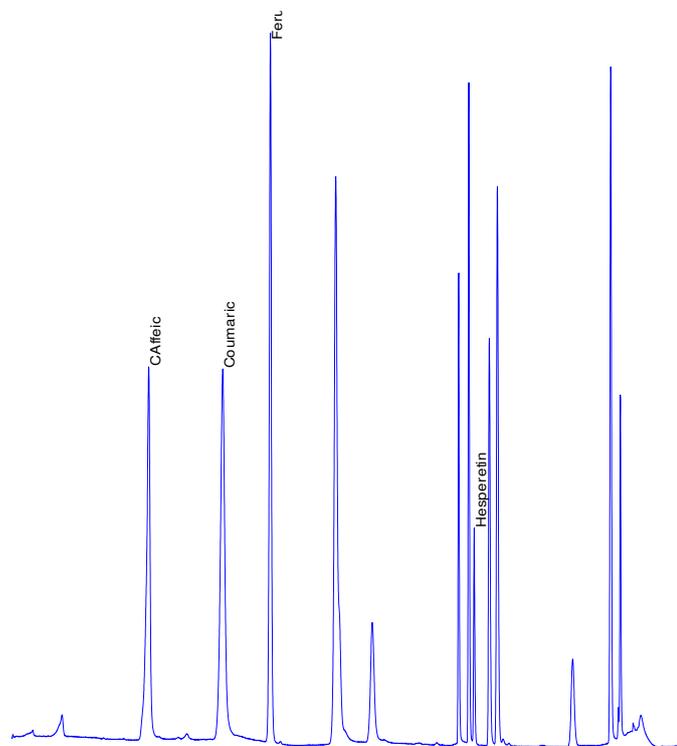


Figura 15 - Representação gráfica dos padrões de ácidos fenólicos e flavonoides a 320nm

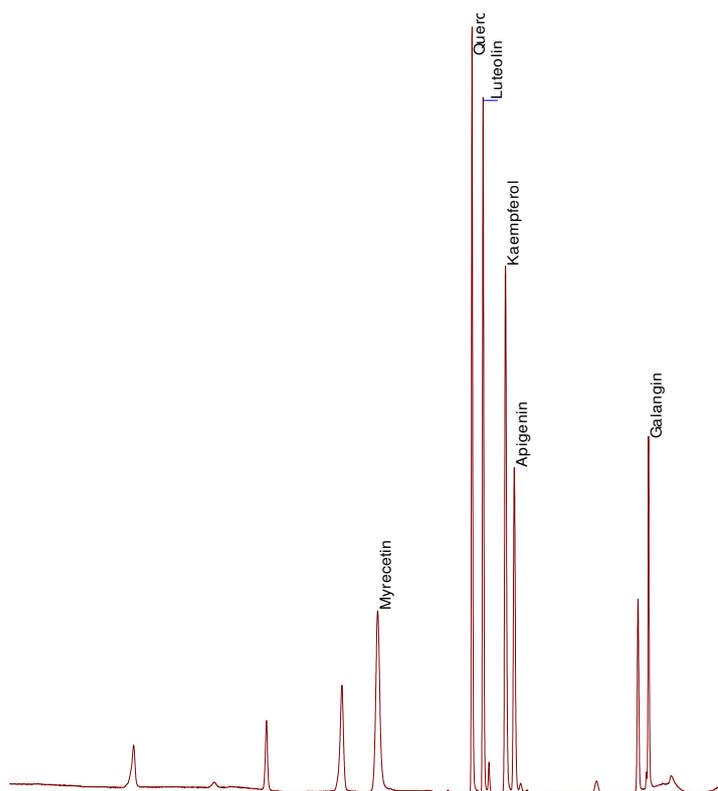


Figura 16 - Representação gráfica dos padrões de ácidos fenólicos e flavonoides a 360nm.

Considerando que os méis analisados no presente estudo foram obtidos apenas do estado do Rio Grande do Sul, uma possível "impressão digital por cromatografia líquida" pode ser de grande utilidade para a definição da qualidade.

Os flavonoides representaram cerca de 85% do total dos compostos fenólicos identificados nas amostras de mel.

A concentração média dos compostos variou de 1,42 a 247,83mg.100g⁻¹. Em ordem crescente de concentração média foram encontrados, ácido cafeico (1,42mg.100g⁻¹), ácido ferulico (1,90mg.100g⁻¹), galangina (3,25mg.100g⁻¹), ácido cumárico (4,25mg.100g⁻¹), campeferol (5,0mg.100g⁻¹), quercetina (5,34mg.100g⁻¹), apigenina (6,03mg.100g⁻¹), crisina (6,93mg.100g⁻¹), ácido vanílico (7,27mg.100g⁻¹), ácido gálico (10,74mg.100g⁻¹), mirecitrina (11,71mg.100g⁻¹), ácido serínico (14,59 mg.100g⁻¹), pinocembrina (15,87mg.100g⁻¹), luteolina (17,11mg.100g⁻¹), rutina (34,52mg.100g⁻¹), ácido hidroxibenzóico (85,63mg.100g⁻¹), epicatequina (205,74mg.100g⁻¹), hesperitina (206,83mg.100g⁻¹) e catequina (247,83mg.100g⁻¹). Portanto, de uma maneira geral, os flavonoides foram encontrados em maior proporção do que os ácidos fenólicos.

Salienta-se que os flavonóides constituem uma grande família de pigmentos fenólicos de plantas. Muitos sistemas de plantas contêm um grande número de flavonoides e cada planta tende a ter um perfil distinto desses compostos (ESCUREDO et al., 2012).

O ácido cafeico foi o composto fenólico encontrado em menor concentração, apresentando conteúdo de 0,60 a 4,11mg.100g⁻¹, similares ao observado por Escuredo et al. (2012), os quais encontraram valores entre 0,07 e 0,60mg.100g⁻¹.

Dos dezenove compostos fenólicos analisados nas vinte e quatro amostras de méis (Tabela 8), somente o flavonoide hesperitina estava presente em todos os méis, inclusive apresentando, na amostra 9, a maior concentração entre todos os compostos identificados nas diferentes amostras (Figura 17).

Além disso, quando realizada uma análise estatística de correlação entre os resultados médios de cada região gaúcha estudada (oeste, metropolitana, sudoeste, sudeste, nordeste e noroeste) observou-se que o único composto apresentou correlação positiva e significativa com o somatório dos compostos fenólicos analisados foi a hesperitina.

Isso demonstra que mesmo em concentrações diferentes, esse composto esteve presente de maneira similar em todas as amostras das regiões do estado. Amostras da região sudeste (H8, H9, H17, H18) apresentaram os maiores conteúdos de compostos fenólicos, com conteúdos médios de 1280,23mg.100g⁻¹, principalmente devido à amostra nove (região sudeste).

No geral, a representação gráfica das amostras oriundas das diferentes regiões foi similar, o que pode ser comprovado pelo somatório médio de cada região, onde a oeste apresentou valores de 868,49 mg.100g⁻¹, metropolitana 825,03 mg.100g⁻¹, sudoeste 787,05 mg.100g⁻¹, nordeste 785,58 mg.100g⁻¹ e noroeste 622,6 mg.100g⁻¹. O ácido gálico não foi identificado nas amostras da região sudeste, assim como o ácido cafeico não foi identificado em amostras das regiões oeste e sudeste. O flavonoide característico do mel, apigenina, não foi identificado em amostras da região oeste e sudeste, e por último, a crisina, outro composto característico de produtos apícolas principalmente da própolis, não foi identificado nas amostras da região sudoeste.

Tabela 8 - Ácidos fenólicos e flavonoides identificados por Cromatografia Líquida (CL) em méis do Rio Grande do Sul.

Amostras	Ácido Gálico	Ácido Hidroxibenzoico	Catequina	Ácido Seríngico	Epicatequina	Rutina	Pinocebrina	Ácido Cumárico	Ácido Ferúlico	Luteolina
H1	40,33 a	4,66 q	nd	nd	nd	13,04 f	42,47 a	nd	nd	nd
H2	3,28 e	11,88 op	nd	nd	nd	36,39 d	24,63 bc	nd	3,42 a	nd
H3	nd	154,21 d	nd	0,93 n	179,14 fgh	nd	nd	9,33 a	1,86 bc	nd
H4	29,01 b	54,46 k	257,53 bc	nd	210,52 c	183,83 a	nd	nd	3,61 a	nd
H5	nd	52,65 k	232,05 j	5,74 gh	174,14 hi	12,45 f	6,53 d	9,25 a	0,87 cd	10,29 cde
H6	nd	28,96 m	260,12 d	6,05 g	229,25 b	nd	nd	4,83 d	1,39 bc	1,45 cde
H7	nd	242,21 c	244,65 gh	3,87ijk	181,70 ef	nd	nd	0,66 fg	nd	0,98 de
H8	3,81 e	27,58 mn	257,11 b	2,77 kl	nd	nd	nd	nd	nd	0,34 e
H9	4,40 e	73,61 i	282,55 c	nd	187,73 de	4,36 g	nd	0,06 g	3,61 a	68,45 b
H10	nd	343,32 a	243,49 gh	12,09 d	181,29 efg	12,69	nd	0,80 fg	1,07 cd	4,59 cde
H11	nd	7,42 pq	251,02 ef	4,77 hi	685,68 a	138,64 b	nd	5,44 d	nd	nd
H12	nd	106,88 h	255,27 de	11,46 d	170,74 i	29,13 e	13,38 cd	nd	0,08 d	7,74 cde
H13	nd	65,96 j	366,24 a	2,84 jkl	191,28 d	nd	nd	8,83 a	1,07cd	nd
H14	nd	129,95 f	244,05 gh	7,35 f	nd	5,83 g	6,50 d	0,5 g	nd	3,54 cde
H15	nd	120,40 g	247,57 fg	4,42 i	179,96 fgh	6,89 g	8,29 d	6,51 bc	2,48 ab	13,48 c
H16	nd	136,60 e	289,29 b	4,02 ij	nd	5,98 g	6,66 d	5,57 cd	1,42 bc	12,82 cd
H17	nd	23,10 n	231,51 j	19,28 b	170,35 i	54,40 c	15,66 cd	1,85 e	0,83 cd	1,71 cde
H18	4,85 e	nd	236,91 ij	nd	nd	3,46 g	nd	nd	nd	nd
H19	nd	16,78 o	292,94 b	2,53 l	213,2 c	nd	34,53 ab	nd	nd	3,65 cde
H20	nd	45,55 l	258,92 d	1,75 lm	189,23 d	nd	nd	1,63 ef	3,66 a	3,6 cde
H21	3,28 e	14,62 o	nd	0,88 n	nd	5,50 g	nd	1,51 ef	nd	nd
H22	nd	5,52 q	239,30 hi	1,19 mn	227,44 b	5,43 g	nd	6,9 b	nd	nd
H23	6,97 d	6,64 pq	235,32 ij	14,72 c	179,81 fgh	nd	nd	nd	1,27 cd	nd
H24	11,44 c	296,62 b	1,34 k	188,05 a	5,10 j	nd	nd	nd	nd	106,81 a

*nd (não detectável pelas condições cromatográficas propostas)

continuação da Tabela 8.

Amostras	Hesperitina	Mirecetina	Campeferol	Galangina	Ácido Vanílico	Ácido Cafeico	Apigenina	Quercetina	Crisina	Somatório
H1	50,94 hij	7,58 e	5,47 defg	22,88 a	nd	nd	nd	nd	nd	187,36 l
H2	73,76 ghi	6,94 e	1,31 gh	8,72 b	nd	nd	nd	3,19 def	nd	175,86 l
H3	15,80 j	nd	2,17 fgh	1,18 cd	2,85 gh	nd	nd	0,62 gh	8,38 bc	376,48 k
H4	20,30 ij	nd	1,70 gh	8,57 b	28,54 a	nd	nd	4,35 d	nd	831,88 de
H5	235,11 cd	3,26 g	0,82 h	0,76 d	1,54 hi	nd	nd	6,32 c	nd	751,81 fg
H6	100,34 fgh	1,35 g	1,85 gh	Nd	0,76 i	nd	nd	1,64 fgh	nd	639,69 hi
H7	103,69 fg	nd	6,48 cdef	Nd	nd	0,62 d	nd	1,24 fgh	nd	786,77 def
H8	73,39 ghi	nd		0,70 d	nd	nd	nd	2,47 defg	nd	368,76 k
H9	2445,79 a	81,35 a	10,48 bc	Nd	6,66 e	nd	2,54 c	35,33 a	5,44 cd	3222,24 a
H10	194,79 de	3,37 g	8,50 cd	Nd	9,16 d	nd	nd	2,89 def	nd	1018,07 c
H11	40,87 ij	14,93 c	29,46 a	Nd	3,43 fg	nd	nd	2,68 def	nd	1184,36 b
H12	147,04 ef	3,03 g	2,6 efgh	Nd	4,60 f	nd	nd	3,94 d	nd	755,9 fg
H13	39,95 ij	nd	1,76 gh	0,49 d	22,06 c	0,61 d	nd	2,07 efg	nd	703,18 g
H14	102,13 fgh	2,37 g	6,68 cde	0,91 d	1,41 hi	nd	nd	3,06 def	12,25 ab	701,71 g
H15	174,89 e	1,22 g	2,17 fgh	1,65 cd	nd	1,18 c	nd	10,99 b	3,47 cd	785,59 ef
H16	30,54 ij	11,16 d	1,74 gh	1,77 cd	nd	0,6 d	nd	13,33 b	nd	695,79 gh
H17	55,18 hij	2,50 g	0,38 h	4,04 c	26,16 b	nd	nd	2,94 def	nd	609,64 i
H18	113,69 fg	8,73 de	3,65 efgh	2,43 cd	1,88 ghi	nd	4,47 b	0,64 gh	nd	380,72 k
H19	235,04 cd	3,77 fg	nd	1,31 cd	nd	nd	nd	4,20 d	16,86 a	823,66 de
H20	320,12 b	1,71 g	1,74 gh	1,32 cd	4,56 f	2,08 b	0,60 d	9,47 b	nd	845,95 d
H21	273,82 bc	6,34 ef	13,11 b	2,74 cd	2,09 ghi	nd	16,51 a	2,15 efg	nd	342,54 k
H22	109,75 fg	nd	1,94 gh	2,85 cd	2,47 gh	nd	nd	nd	7,46 bcd	610,28 i
H23	3,97 j	49,61 b	1,45 gh	1,12 cd	10,09 d	4,11 a	nd	0,09 h	1,55 d	516,74 j
H24	3,05 j	1,43 g	nd	Nd	1,88 ghi	nd	nd	6,86 c	nd	622,62 i

Os compostos que estiveram presentes em grandes concentrações nas amostras de méis das diferentes regiões, exceto para a região noroeste, foram os flavonoides catequina (valores médios próximos a $260\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$) e epicatequina (valores médios próximos a $220\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$).

A grande concentração do flavonoide hespertina nas amostras da região sudeste ($672,01\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$), em grande parte, foi influenciado pela amostra nove. A região noroeste apresentou resultados atípicos, quando comparada às demais regiões, apresentando maiores concentrações médias dos seguintes compostos: ácido hidroxibenzoico ($296,62\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$), ácido seringico ($188,05\text{ mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$) e luteolina ($106,82\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$).

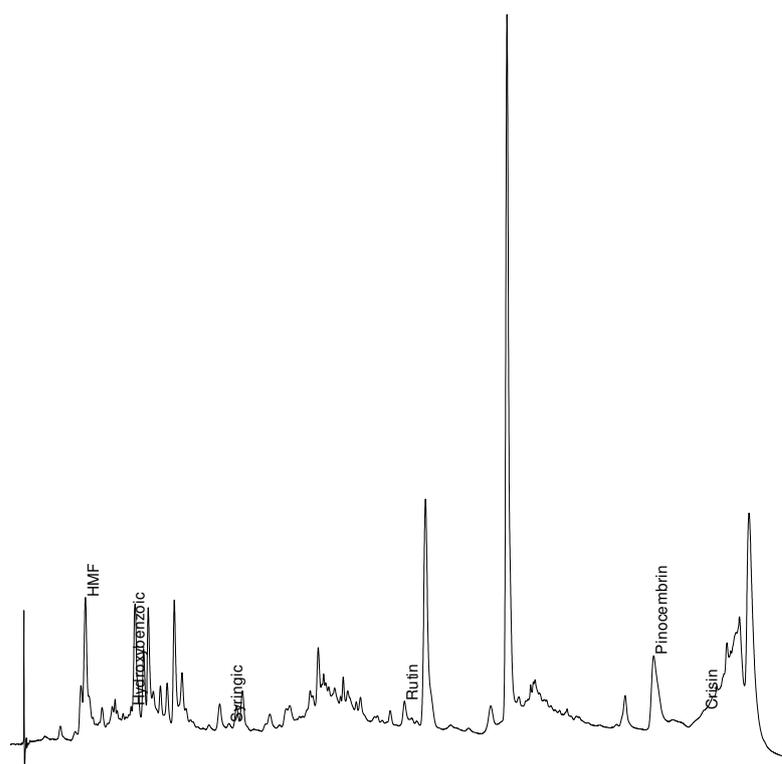


Figura 17 - Representação gráfica dos compostos fenólicos encontrados na amostra 9. Detecção à 320 nm

4.3.3 Estudo da correlação

Através dos dados apresentados na tabela 9, pode-se concluir que houve correlação negativa e significativa entre as variáveis pH e acidez. A correlação negativa é observada quando há aumento de uma variável e diminuição de outra. Nesse caso, pH e acidez, são propriedades que são inversamente relacionadas, ou seja, quando o pH é alto, a acidez é baixa, e vice versa. No entanto, segundo Ribeiro et al. (2014), o valor de pH no mel pode não estar diretamente relacionado com o conteúdo de acidez livre, devido à ação de tamponamento de vários ácidos e de minerais presentes neste produto.

Tabela 9 - Coeficiente de correlação de Pearson's para composição físico-química e o somatório dos compostos fenólicos em amostras de méis oriundos do Rio Grande do Sul, Brasil.

	Umidade	Acidez	S.solúveis	Cond.	HMF	pH	Cor	C. Fenólico
Umidade	1	0,202	-0,985**	-0,345	-0,115	-0,371*	0,223	-0,199
Acidez		1	-0,158	0,137	-0,134	-0,407*	0,201	-0,065
S.solúveis			1	0,359	0,036	0,362*	-0,198	0,192
Cond.				1	0,260	0,407*	0,163	0,158
HMF					1	-0,107	-0,046	-0,179
pH						1	-0,080	0,201
Cor							1	0,242
C.Fenólico*								1

Correlações de Pearson's entre umidade (%); acidez (miliequivalente.Kg⁻¹), sólidos solúveis (°Brix), Condutividade (μS.cm⁻¹), Hidroximetilfurfural (mg.Kg⁻¹), pH, cor e compostos fenólicos (mg.100g⁻¹).

S.Solúveis (sólidos solúveis), Cond. (condutividade); C.Fenólico (compostos fenólicos)

^a95% de intervalo de confiança * significativo p≤0,05; **significativo p<0,001

Foi encontrada correlação positiva e significativa, entre pH e sólidos solúveis; e correlações negativas e significativas, entre sólidos solúveis e umidade; e entre pH e umidade.

É conhecido que méis com umidade acima do permitido, ou seja, que possuam valores inferiores a 80°Brix, estão mais propensos à contaminação microbiológica, principalmente de bolores e leveduras, o que acarreta em uma diminuição do pH.

Segundo Finola et al. (2007), o pH do mel pode ser influenciado por diversos fatores, como: diferentes fontes de néctar ou a forma como será a composição dessas floradas, solo, ação da glicose-oxidase, ação das bactérias e por fim, pela quantidade de minerais presentes no mel. Esse último fator pode ser verificado no presente estudo, em que os méis apresentaram correlação positiva e significativa

entre pH e conteúdo de minerais, deixando claro o impacto que a composição do solo causa na composição físico-química dos méis.

Apesar de não ter sido possível observar na análise de correlação, deve-se destacar que os menores conteúdos de compostos fenólicos foram observados nas amostras de coloração mais escura (H3, H18 e H21).

A exceção ocorreu com o mel oriundo da região sudeste (H9), de coloração âmbar escuro e que apresentou o maior conteúdo no somatório de compostos fenólicos. Um fato importante é que o alto valor encontrado nessa amostra foi devido particularmente a um flavonoide, hesperitina, cuja concentração apresentou valor elevado quando comparados às outras amostras e demais compostos fenólicos.

4.4 Conclusão

No total de amostras analisadas, 42% apresentavam alguma não conformidade segundo a legislação, sendo que 29% estavam acima do limite para a acidez total e 21% para umidade. Dessas amostras, a H1 (mel silvestre do município de Nova Esperança) e a H23 (mel silvestre do município de Três Coroas) apresentaram resultados não conformes em ambas as análises físico-químicas (acidez e umidade).

As amostras H5, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H17, H18, H19, H20, H21, H22 e H24 obtiveram teores dentro dos parâmetros de qualidade nas determinações realizadas de umidade, acidez, condutividade, hidroximetilfurfural, sólidos solúveis, pH e coloração;

Os flavonoides estavam presentes em maior concentração do que os ácidos fenólicos, sendo a catequina, epicatequina e hesperitina, os compostos presentes em maior quantidade na maioria dos méis.

É possível concluir também que o perfil fenólico dos méis das diferentes regiões foi similar, sendo a única exceção observada em uma amostra da região sudeste (H9), a qual continha elevada concentração do flavonoide hesperitina.

5 Capítulo 3 – Investigação da origem botânica e geográfica através da determinação do perfil volátil de méis do Rio Grande do Sul

5.1 Introdução

A apicultura é uma das atividades mais antigas e importantes no mundo. São diversos os produtos apícolas existentes no mercado, porém, o mel é o produto que mais se destaca devido à facilidade de exploração, da possibilidade de inúmeras formas de comercialização, como alimento, medicamento, cosmético e das propriedades terapêuticas estudadas e comprovadas (PYRZYNSKA & BIESAGA, 2009; AL WAILI et al., 2011; BUAINAIN & BATALHA, 2012; CHAN et al., 2013; VANDAMME et al., 2013; KUS et al., 2014; MAJTAN et al., 2014; ORYAN, ALENZADEH & MOSHIRI, 2016; DIAS et al., 2016).

Os compostos de aroma estão presentes no mel em baixas concentrações, na forma de misturas complexas de compostos voláteis de baixo peso molecular (CUEVAS-GLORY et al., 2007). Há diversas formas de analisar o perfil volátil de um alimento, mas a grande maioria dos métodos utiliza a cromatografia. Porém, como o mel é um alimento basicamente constituído de açúcar, torna-se necessário um método prévio de retirada desses compostos ao procedimento cromatográfico.

A microextração em fase sólida (SPME) é um procedimento de preparo e extração de amostra que visa a isolar e concentrar compostos de interesse em níveis adequados e na forma de um analito puro.

Devido a essas características a SPME tem sido amplamente utilizada e empregada na identificação e quantificação de diversos compostos em uma gama de matrizes, incluindo o mel (AUGUSTO, et al., 2002; LI et al., 2006; NISHIDA et al., 2006; ALISSANDRAKIS et al., 2007, PLUTOWSKA et al., 2011; BIANCHIN et al., 2014).

A SPME tem sido utilizada na pesquisa do perfil volátil de méis, pois apresenta várias vantagens, como, relativamente rápido tempo de extração, pequenos volumes de amostra, livre de solventes, reutilização da fibra, facilidade operacional e automação, além de mínima contaminação (FRANCO, 2003; PARREIRA & CARDEAL, 2005; CUEVAS-GLORY et al., 2007; BIANCHIN et al., 2014).

A técnica consiste na utilização de uma fibra fina de sílica fundida de alta estabilidade, revestida com um polímero. A técnica é simples e envolve apenas duas etapas. Na primeira consiste em expor a fibra revestida ao material de interesse e que tem como finalidade a extração do analito, ou seja, a partição do analito alvo entre a matriz da amostra e o revestimento. Na segunda etapa, a fibra contendo os analitos é transferida para o instrumento analítico através da dessorção térmica, onde ocorre a separação e quantificação dos analitos extraídos (CUEVAS-GLORY et al., 2007; PARREIRA & CARDEAL., 2005; EISERT, et al., 1996).

Os diferentes tipos de fibras utilizados apresentam fases homogêneas de polidimetilsiloxano (PDMS) e de poliácrlato (PA), ou heterogêneas, de carboxeno/polidimetilsiloxano (CAR/PDMS), carbowax / divinilbenzeno (CAR/DVB), carbowax/resina TPR-100 e divinilbenzeno /carboxeno / polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) (PARREIRA & CARDEAL, 2005).

Segundo Pontes et al. (2007) e Plutowska et al., (2011) a fibra mais adequada para ser utilizada no isolamento de compostos aromáticos em mel é a fibra tripla de divinilbenzeno/carboxeno/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS), pois o restante das fibras são caracterizadas pela baixa eficiência de extração, apresentando menor repetibilidade.

A origem dos componentes voláteis em méis se deve a diversos fatores, como a transferência de constituintes da planta oriundas do pólen ou néctar (ex: terpenóides), produção e ou transformação de compostos feitos pela própria abelha (ex:enzimas redutase), produção de compostos durante o processamento (ex: compostos derivados da reação de *Maillard*), ação de micro-organismos (bolores e leveduras) e resíduos de cera (ácidos graxos).

Assim, o objetivo deste estudo foi investigar através do perfil volátil a origem botânica e geográfica.

5.2 Material e método

5.2.1 Amostras

Um total de vinte amostras de méis comerciais de diferentes origens botânicas e geográficas (Tabela 10), decorrentes de um delineamento inteiramente casualizado foram analisadas. As amostras foram provenientes de diversas regiões do Rio Grande do Sul, sendo seis amostras da região ocidental, cinco da sudoeste, quatro da sudeste, três da nordeste e duas amostras da região metropolitana. Todas as amostras foram mantidas sob temperatura de refrigeração (ao redor de 5°C), em frascos estéreis e na ausência de luminosidade.

5.2.2 Padrões e reagentes

Todos os produtos químicos utilizados foram de grau analítico. Todos os padrões utilizados eram da marca Sigma-Aldrich, para uso específico em cromatografia gasosa, furfural, benzaldeído, fenilacetaldéido, nonanal, 1-nonanol, ácido nonanoico e benzofenona. Fibra DVB/CAR/PDMS, 50/30µm for manual holder gray, 57328-U, Supelco, EUA. A água foi purificada em Sistema de Ultra Purificação (*Mega Purity*).

Tabela 10 - Amostras de méis com respectivas dados de coleta: região, município, ano de colheita, origem botânica e coordenadas geográficas

Regiões	Amostras	Município	Ano de coleta	Origem botânica	Coordenadas
Metropolitana	M1	Nova Petropolis	2013	silvestre	
	M2	Camaquã	2014	silvestre	31°084074,51°607879
Nordeste	M3	Vacaria	2013	silvestre	28°90254,50°411242
	M4	Farroupilha	2013	silvestre	
	M5	Vacaria	2014	<i>Brassica napus</i>	28°29901,58°55024
Ocidental	M6	Cacequi	2013	<i>Eucalyptus, Uncaria tomentosa, Mimosa bimucronata, Gaya macrantha</i>	30°022320,54°52144
	M7	Cacequi	2013	<i>Mimosa bimucronata; Schinus terebinthifolius, Eucalyptus, Gaya macrantha</i>	30°022320,54°52145
	M8	Cacequi	2013	silvestre	29°56384,54°12896
	M9	Cacequi	2013	silvestre	29563845,05
	M10	Santiago	2013	silvestre	29°222310,54°41019
	M11	Jaguari	2013	silvestre	29°211671,54°393726
Sudeste	M12	Pelotas	2013	<i>Schinus molle</i>	31°509033,52°552884
	M13	Pelotas	2013	<i>Eucalyptus, Butia capitata</i>	31°808646,52°507117
	M14	Rio Grande	2013	<i>Eucalyptus, Schinus terebinthifolius</i>	32°095664,52°16484
	M15	Rio Grande	2013	silvestre	32°095664,52°16485
Sudoeste	M16	Bagé	2013	<i>Eucalyptus</i>	31°35027,53°43713
	M17	Bagé	2013	<i>Eucalyptus</i>	31°26751,53°57725
	M18	Bagé	2013	<i>Eucalyptus</i>	31°29119, 54°23196
	M19	Santana do Livramento	2013	<i>Eucalyptus</i>	
	M20	Itaqui	2014	<i>Eucalyptus, citrus</i>	29°228383, 56°357941

5.2.3 Determinação do perfil volátil

Foi utilizado um método validado e otimizado por Alissandrakis et al. (2007), para a classificação e discriminação dos compostos voláteis através de CG-MS. Previamente, as amostras foram colocadas sob temperatura de no máximo 50°C para dissolução dos cristais. Um volume de 8mL de solução de mel (3g.mL⁻¹) e 20µL do padrão interno (solução de benzofenona-10µ.mL⁻¹) foram adicionados a um frasco de 20mL (específico para uso de SPME). A amostra juntamente com o padrão interno foi homogeneizada através de agitação magnética durante 30min (60°C). Em seguida, a fibra (DVD-CAR-PDMS) foi exposta no interior desse frasco por 60min.

A amostra foi desorvida no injetor de um sistema de cromatografia gasosa acoplada a espectrofotômetro de massa, com coluna capilar de 30m x 0,25mm de diâmetro interno, gás hélio com fluxo de 1mL.min⁻¹, injetor a 220°C, interface de 290°C e energia de ionização de 70ev. A rampa de temperatura iniciou com 40°C por 3min, aumentando 3°C por minuto até 160°C, e aumentando novamente 10°C por minuto até 200°C, totalizando 60min de análise.

A análise dos componentes voláteis foi baseada no esquema de fragmentação, onde os dados foram expressos pela razão de abundância dos fragmentos quando comparados ao padrão interno. A pesquisa de espectro de massa foi feita com o uso de NIST, bem como com alguns padrões como, furfural, benzaldeído, fenilacetaldeído, nonanal, 1-nonanol, ácido nonanoico e benzofenona.

5.3 Resultado e discussão

Foram analisados os perfis voláteis de vinte amostras de méis de diferentes regiões do Rio Grande do Sul (Tabela 11), onde os resultados foram expressos através da percentagem da área do pico obtido em comparação à área total de todos os picos do cromatograma.

Os perfis das frações voláteis dos méis obtidos foram muito complexos, apresentando 115 compostos isolados, bem como informações que facilitem a discussão, como, tempo de retenção (TR), forma de identificação (ID), quantidade média de cada composto (µg.Kg⁻¹) e percentagem média equivalente a um composto quando comparado ao somatório de todos os compostos (%). Apesar da complexidade dos perfis das frações voláteis, os perfis cromatográficos foram

bastante semelhantes em termos de sua composição qualitativa, porém distintos em relação à intensidade dos picos, e conseqüentemente em relação a sua quantidade.

A maioria dos constituintes de aroma observados nos méis do Rio Grande do Sul é derivada de álcool, éster, cetona, alceno e furano. Aproximadamente 70% dos compostos voláteis identificados foram compreendidos em um desses cinco grupos de compostos. Os outros compostos são pertencentes ou derivados das classes dos aldeídos, compostos inorgânicos, compostos nitrogenados, hidrocarbonetos, terpenóides e ácidos.

Os vinte compostos encontrados em maior proporção nos perfis voláteis foram nonanal (9,23%), acetofenona (6,55%), 2-hidroxi-4-metil pentanoato de metila (5,21%), butanoato de butila (4,94%), hotrienol (4,70%), 5-hidroxi-2,7-dimetil-4-octanona (3,66%), 2,3-heptanodiona (3,29%), alfa.-metil-.alfa.-[4-metil-3-pentenil]oxiranometanol (3,29%), furfural (2,97%) 1-nonanol (2,74%), benzaldeído (2,64%), 4,5-octanodiona (2,64%), 4-metil-2-oxi pentanoato de metila (2,38%), octanoato de metila (2,38%) 3,5-dimetoxibenzaldeído (2,13%), hexametilbenzeno (1,70%), linalol (1,42%) nonanoato de metila (1,38%), fenilacetaldeído (1,34%) e acetato de etil-fenil (1,13%) (Tabela 11).

Ao investigar os dados dos vinte compostos principais nas regiões estudadas, observou-se que o composto nonanal estava presente em maior concentração na região sudeste, apresentando valores médios de $1060,22\mu\text{g.kg}^{-1}$, e na região sudoeste com $1037\mu\text{g.kg}^{-1}$, principalmente devido às amostras M15 e M17, respectivamente.

A acetofenona está associada à via de conversão do ácido chiquímico, e é produzida por plantas a partir dos ácidos aromáticos hidroxi-substituído (GUYOT et al., 1998). Esse composto estava principalmente presente em méis da região ocidental ($731,30\mu\text{g.kg}^{-1}$), sendo que as amostras M19 e M110 continham as maiores concentrações.

O éster 2-hidroxi-4-metil pentanoato de metila foi observado em grande quantidade em todas as amostras da região sudoeste ($506,24\mu\text{g.kg}^{-1}$), e o butanoato de butila foi identificado em todas as amostras, com resultados variando de $168,43\mu\text{g.kg}^{-1}$ (região nordeste) a $326,57\mu\text{g.kg}^{-1}$ (região sudeste), e o 4-metil-2-oxi pentanoato de metila, intermediário do metabolismo da leucina, estava presente em quantidades superiores na região sudoeste ($189,29\mu\text{g.kg}^{-1}$).

O hotrienol e o linalol são relatados por inúmeros autores como sendo característicos de méis de citrus. O hotrienol também é conhecido por ser um produto gerado termicamente, pois surge após a degradação térmica do 2,6-dimetil-3,7-octadieno-2,6-diol, pela gliconjugação, ou pelo rearranjo do 3,7-dimetil-1,7-octadieno-3,6-diol ou do composto hidroxilinalol (VERZERA et al., 2001; ALISSANDRAKIS et al., 2007). No entanto, há relatos que o encontraram em méis com adequado grau de maturação, porém em quantidades mínimas nos méis “verdes”, dessa forma, o autor considerou que o hotrienol pode ser um composto formado durante a maturação do mel (ROUWLAND et al., 1995). No atual estudo, o hotrienol foi encontrado em maior concentração ($1839\mu\text{g.kg}^{-1}$) na amostra M1, proveniente da região metropolitana, estando presente em concentrações bem inferiores nas outras regiões, apresentando valores médios que variavam de $79,50\mu\text{g.kg}^{-1}$ (região nordeste) a $217,96\mu\text{g.kg}^{-1}$ (região sudoeste). O linalol esteve presente em maiores concentrações na região metropolitana ($496,48\mu\text{g.kg}^{-1}$), principalmente devido ao conteúdo da amostra M1. Há também estudos os quais demonstram que os derivados de linalol se originam a partir de flores visitadas por abelhas, e isso justificaria o porquê que esses compostos são encontrados apenas em méis específicos (MOREIRA et al., 2010).

O composto carbonilado 5-hidroxi-2,7-dimetil-4-octanona foi observado em maior concentração na região sudoeste com valores médios de ($458,78\mu\text{g.kg}^{-1}$), o 2,3-heptanodiona na região ocidental ($221,57\mu\text{g.kg}^{-1}$) e o 4,5-octanodiona apresentou valores muito similares entre as amostras, variando de $93,91\mu\text{g.kg}^{-1}$ na região nordeste a $167\mu\text{g.kg}^{-1}$ na região sudeste.

O α -metil- α -[4-metil-3-pentenil]oxiranometanol foi encontrado em todas as amostras e em maior quantidade nos méis das regiões metropolitana ($341,96\mu\text{g.kg}^{-1}$) e nordeste ($365,62\mu\text{g.kg}^{-1}$).

O furfural é um composto formado a partir da combinação de excessivo aquecimento, temperaturas altas e ou armazenamento prolongado, por isso, quando encontrado em concentrações altas é indicativo da degradação do mel (PASINI et al., 2013). Principalmente no estado do Rio Grande do Sul, em decorrência do clima ameno, o tratamento térmico é utilizado para retardar o processo de cristalização, servindo também para inibir o crescimento de micro-organismos (VAIKOUSI, KOUTSOUMANIS, & BILIADERIS, 2009).

Tabela 11 - Compostos de aroma isolados em méis do estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

No.	Compostos	TR	ID	$\mu\text{g.kg}^{-1}$	%
1	2,3-heptanodiona	3.73	MS	163,86	3,29
2	Furfural	3.91	MS,RT	147,80	2,97
3	Acetoina	4.15	MS	12,71	0,26
4	2,3-hexanodiol	4.35	MS	24,46	0,49
5	p-Xileno	4.55	MS	25,31	0,51
6	2-Furanometanol	4.71	MS	15,08	0,30
7	Estireno	5.03	MS	11,90	0,24
8	Nonano	5.16	MS	6,03	0,12
9	Oxime, metoxi-fenil	5.18	MS	12,22	0,25
10	Heptanal	5.23	MS	15,62	0,31
11	1-(2-furanil)-etanona	5.49	MS	9,83	0,20
12	Ácido hexanóico, metil ester	5.76	MS	5,39	0,11
13	Butanal-2-etil-3-metil	5.85	MS	26,45	0,53
14	4-Hepten-2-ona	5.93	MS	34,19	0,69
15	Alfa pineno	5.99	MS	13,50	0,27
16	4-metil-2-oxo-pentanoato de metila	6.14	MS	120,36	2,42
17	5-hidroxi-2,7-dimetil-4-octanona	6.25	MS	182,22	3,66
18	2-hidroxi-4-metil pentanoato de metila	6.38	MS	259,71	5,21
19	Benzaldeido	6.69	MS,RT	131,38	2,64
20	1-Heptanol	6.92	MS	26,16	0,53
21	3-Octanol	7.12	MS	19,85	0,40
22	Octanal	7.74	MS	15,10	0,30
23	1,3-benzenodiol	8.05	MS	15,14	0,30
24	2-etil-1-Hexanol	8.45	MS	18,24	0,37
25	Álcool benzílico	8.65	MS	25,39	0,51
26	fenilacetaldéido	8,66	MS,RT	66,89	1,34
27	2-metil-1-hexano	9,20	MS	15,09	0,30
28	2-Octanal	9.26	MS	11,86	0,24
29	2,3-Butanediona	9.35	MS	9,90	0,20
30	Acetofenona	9.52	MS	326,07	6,55
31	1-Octanol	9.62	MS	29,96	0,60
32	alfa-metil-alfa.-[4-metil-3-pentenil]oxiranometanol	9.68	MS	163,72	3,29
33	etil 2-(5-metil-5-viniltetrahidrofurano-2-il)propan-2-il carbonato	10.13	MS	52,32	1,05
34	Linalol	10.43	MS	70,83	1,42
35	Hotrienol	10.57	MS	234,31	4,70
36	Nonanal	10.62	MS,RT	459,85	9,23
37	Álcool feniletílico	10.88	MS	50,17	1,01
38	Isoforona	11.05	MS	51,72	1,04
39	Octanoato de metila	11.15	MS,RT	118,64	2,38
40	Ácido hexanóico, 2-etil	11.33	MS	8,57	0,17
41	2,6,6 trimetil-2-ciclohexeno-1,4-diona	11.68	MS	54,73	1,10
42	Lilás aldeido B	11.72	MS	53,12	1,07
43	Lilás aldeido D	11.74	MS	24,97	0,50

continuação da Tabela 11.

No.	Compostos	TR	ID	$\mu\text{g.kg}^{-1}$	%
44	1-Nonanol	11.83	MS,RT	133,50	2,68
45	Ácido octanóico	12.37	MS,RT	31,59	0,63
46	α -terpineol	13.07	MS	22,13	0,44
47	Salicilato de metila	13.19	MS	29,55	0,59
48	Decanal	13.43	MS	37,30	0,75
49	Nonanoato de metila	13.44	MS	68,73	1,38
50	Benzeno, [(metilsulfinil)metil]-	13.55	MS	19,99	0,40
51	3-Ciclohexeno-1-acetaldeido, .alfa.,4-dimetil-	13.75	MS	28,24	0,57
52	2,4-cicloheptadien-1-ona	13.87	MS	40,20	0,81
53	1-eicosanol	14.19	MS	19,11	0,38
54	Celesticetina	14.25	MS	19,77	0,40
55	Benzaldeido, 4-1-metiletil	14.45	MS	31,44	0,63
56	Acetato de etil-fenil	14.56	MS	56,10	1,13
57	1-Decanol	15.29	MS	26,27	0,53
58	Etanona, 2-(formiloxi)-1-fenil-	15.41	MS	14,42	0,29
59	Ácido nonanóico	15.65	MS,RT	49,19	0,99
60	2,3-Hexanediona	15.84	MS	18,41	0,37
61	Ácido nonanóico, etil ester	15.92	MS,RT	20,60	0,41
62	Undecanal	16.23	MS	6,86	0,14
63	Ácido decanóico, metil ester	16.68	MS,RT	42,28	0,85
64	4,5-Octanediona	17.47	MS	131,34	2,64
65	Eugenol	17.61	MS	8,92	0,18
66	Butanoato de butila	18.05	MS	245,89	4,94
67	1H-1,2,3-Triazole	18.34	MS	17,01	0,34
68	Ácido decanoico, etil ester	18.54	MS,RT	8,96	0,18
69	Tetradecano	18.60	MS,RT	8,72	0,18
70	Dodecanal	18.88	MS	21,86	0,44
71	Cariofileno	19.26	MS	8,76	0,18
72	3,5-Dimetoxibenzaldeido	19.7	MS	106,09	2,13
73	1{2[3-metil-3-(5-metil-furan-2il)...	20.41	MS	42,92	0,86
74	1-Dodecanol	20.50	MS	8,02	0,16
75	2H-Piran-2-one, 5,6-dihidro-6-pentil-	20.71	MS	12,07	0,24
76	Ácido arsenous	20.84	MS	15,57	0,31
77	Alfa.-Camfolenal	21.01	MS	13,63	0,27
78	Fenol, 2,4-bis(1,1-dimetil)etil-	21.51	MS	15,95	0,32
79	Ácido dodecanoico, metil ester	21.70	MS	10,53	0,21
80	Naftaleno,6-butil-1,2,3-tetrahidro	22.35	MS	20,81	0,42
81	Propanoic acid, 2-metil-	23.48	MS	9,85	0,20
82	Benzeno, 1,3,5-tris(1-metiletil)	23.65	MS	10,04	0,20
83	benzeno, hexametil	24.76	MS	84,61	1,70
84	2-(2-hidroxi-2-metil-2-feniletil)-3-metil	24.93	MS	22,36	0,45
85	Ácido isoftálico	25.36	MS	5,58	0,11
86	Hexadecano	25.7	MS,RT	4,52	0,09

continuação da Tabela 11.

No.	Compostos	TR	ID	$\mu\text{g.kg}^{-1}$	%
87	Metil tetradecanoato	26.27	MS,RT	10,31	0,21
88	Ácido decadecioico	27.67	MS	0,68	0,01
89	Ácido tetradecanoico, etil ester	27.74	MS	1,87	0,04
90	Heptadecano	27.80	MS	3,35	0,07
91	Ácido 1,2-Benzenodicarboxílico, bis(2-metilpropil) ester	29.35	MS	8,60	0,17
92	Octadecano	29.86	MS,RT	8,50	0,17
93	Ácido 9-Hexadecenoico, metil ester	29.99	MS,RT	2,59	0,05
94	Ácido Hexadecanoico, metil ester	30.41	MS	36,90	0,74
95	Ácido n-Hexadecanoico	31.13	MS	8,74	0,18
96	Ácido Hexadecanoic, etil ester	31.69	MS,RT	5,34	0,11
97	Nonadecano	32.04	MS,RT	28,39	0,57
98	Ácido Heptadecanoic, metil ester	32.22	MS	17,55	0,35
99	Ácido 9-Octadecenoico, metil ester	33.32	MS	24,57	0,49
100	Ácido metil estearato	33.68	MS,RT	5,09	0,10
101	Ácido oleico	33.86	MS	15,61	0,31
102	1,2,4,5-Tetrazine	34.09	MS	11,53	0,23
103	Ácido linolenico	34.2	MS	4,06	0,08
104	Fenol, 4,4'-(1-metilletilidene)bis-	34.47	MS	13,62	0,27
105	Ácido nonadecanoico, metil ester	34.88	MS	2,25	0,05
106	Eicosano	35.64	MS,RT	4,58	0,09
107	Ácido hexanedioico, bis(2-etilhexil) ester	36.66	MS	6,45	0,13
108	Metoxiflurano	36.93	MS	1,96	0,04
109	Ácido benzoico, 4-cloro-2-[(2-furanilmetil)amino]-	37.52	MS	2,18	0,04
110	Bis(2-etilhexil) ftalato	38.15	MS	3,35	0,07
111	2-Butanona, 3-metoxi-3-metil-	39.76	MS	4,11	0,08
112	Heneicosano	39.83	MS,RT	2,75	0,06
113	Esqualeno	41.97	MS	38,03	0,76
114	Colesta-4,6-dien-3-ol, (3.beta.)-	43.16	MS	6,27	0,13
115	Colesterol	49.45	MS	10,71	0,22

*Número (No), tempo de retenção em minutos (TR), forma de identificação (ID), quantidade média de cada composto quando comparado ao padrão interno ($\mu\text{g.Kg}^{-1}$) e porcentagem média equivalente a um composto quando comparado ao somatório de todos os compostos (%). **verificado através do espectro de massa do NIST98 e bibliotecas *on line* de espectro de massa (MS); verificado através do composto autentico (TR).

O conteúdo elevado de furfural observado nas amostras da região sudoeste ($270,6\mu\text{g.kg}^{-1}$) indicam que houve algum problema com o processamento e ou armazenamento desses méis. A reação de *Maillard* promove uma redução no valor nutricional do produto, pois ocorre a destruição dos aminoácidos essenciais, que reagem com açúcares e outros aminoácidos (DAMODARAN et al., 2010).

O álcool, 1-nonanol foi observado em maiores concentrações nas amostras da região sudoeste ($236,48 \mu\text{g.kg}^{-1}$) e o éster nonanoato de metila esteve presente em concentrações semelhantes nas amostras das diferentes regiões, já o octanoato de metila esteve presente em maior concentração nas amostras da região ocidental ($354,11 \mu\text{g.kg}^{-1}$), principalmente devido às amostras M18 e M19.

Os aldeídos, benzaldeído, 3,5-dimetoxibenzaldeído e o fenilacetaldéido foram encontrados em concentrações elevadas principalmente nas amostras da região sudeste $176\mu\text{g.kg}^{-1}$; $222,78\mu\text{g.kg}^{-1}$ e $59,37\mu\text{g.kg}^{-1}$. Allisandrakis et al. (2007) também encontraram aldeídos aromáticos, tais como o fenilacetaldéido (5,74%) e o benzaldeído (1,62%), em grande concentração nos méis cítricos. O composto hexametilbenzeno foi encontrado em poucas amostras, mas em quantidades elevadas nas amostras da região sudoeste ($167,06\mu\text{g.kg}^{-1}$), principalmente devido à amostra M18. O acetato de etil-fenil foi encontrado em baixas concentrações nas amostras de todas as regiões, com exceção da região ocidental que apresentou resultados médios em torno de $124,82\mu\text{g.kg}^{-1}$.

As figuras 18 e 19 representam os dois tipos de perfis cromatográficos encontrados nas 20 amostras de méis.

A maioria dos compostos de aroma dos méis (Figura 18) foi identificada até os vinte minutos da análise cromatográfica, ou seja, apresentaram temperaturas de volatilização inferiores a 90°C .

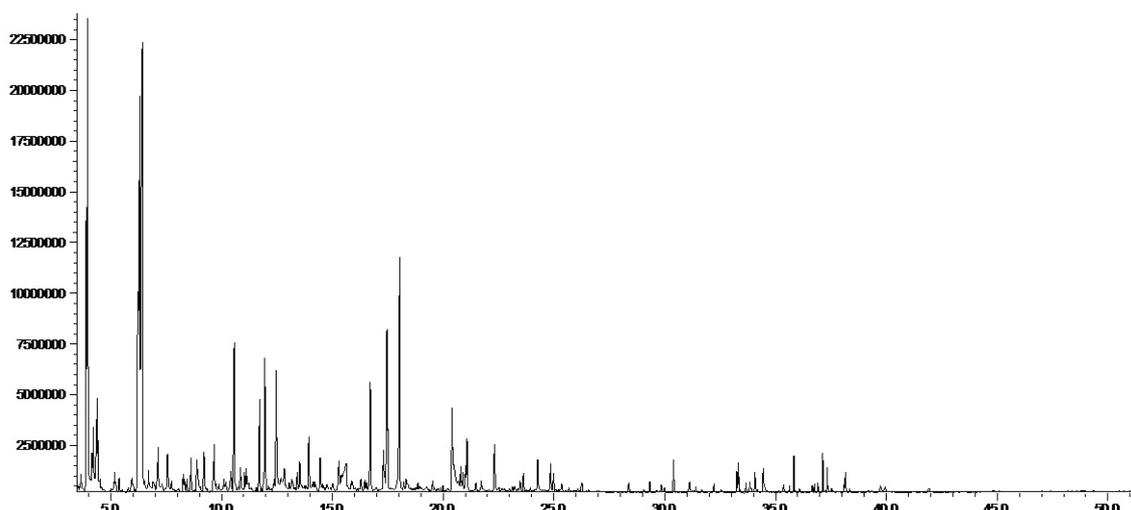


Figura 18 - Representação gráfica do perfil volátil da amostra M1

Nas outras amostras, nas quais havia compostos como derivados de ácidos graxos, o comportamento foi como o observado na figura 19.

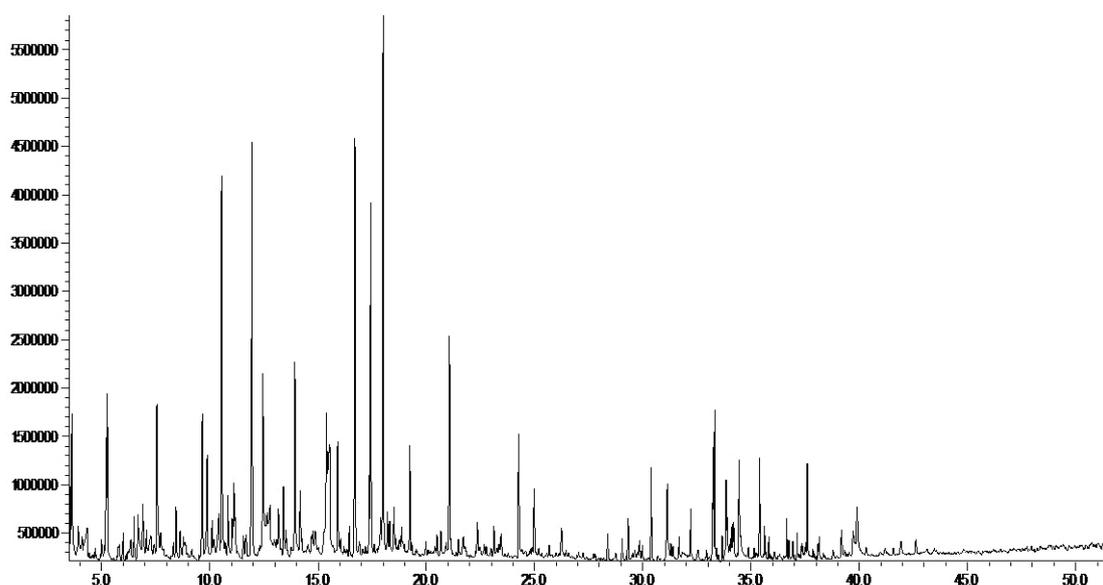


Figura 19 - Representação gráfica do perfil volátil da amostra M11.

Segundo diversos autores (ALISSANDRAKIS et al., 2003; ALISSANDRAKIS et al., 2007; PONTES et al., 2007; SPANIK et al., 2014), compostos como linalol (3,7-dimetil-octa-1,6-dien-3-ol), hotrienol (3,7-dimetil-1,5,7-octatrien-3-ol), benzenoacetaldéido, lilás aldeídos, furfural, ácido nonanóico e α -terpineol têm sido reportados como os constituintes orgânicos majoritários encontrados nos méis, independentemente da origem botânica.

Os compostos voláteis naturalmente presentes nos méis podem ser oriundos da transferência de constituintes voláteis da planta, da conversão dos constituintes da planta pela abelha, dos compostos produzidos pela abelha, da produção de compostos durante o processamento pós-coleta e pela ação de microrganismos (SILVA et al., 2016; BARRA et al., 2010).

Apesar de em pequenas concentrações, pode-se observar a presença de inúmeros ésteres metílicos de ácidos graxos no perfil volátil determinado nos méis de todas as regiões estudadas. Kaskoniene et al. (2008) sugerem que vários aldeídos e cetonas podem ser formados pela oxidação de ácidos graxos nos méis, particularmente ácidos linoléico e linolênico, os quais podem desenvolver sabor a ranço. O ácido hexadecanóico pode ser formado devido à oxidação do aldeído durante o armazenamento de hexadecanal (MOREIRA et al., 2010).

Alguns compostos estão presentes em grandes quantidades em todas as amostras, são eles: nonanal, furfural, benzaldeído, 1-nonanol, 4,5-octanodiona, ácido propionico, ácido nonanoico, hotrienol e linalol. Diversas são as pesquisas (ALIFERIS et al., 2010; ALISSANDRAKIS et al., 2007; CUVEVAS-GLORIA et al., 2007) que abordam a caracterização volátil do mel com o objetivo de caracterizar a sua origem botânica. Esses estudos focam na identificação de possíveis marcadores da origem botânica. O Benzaldeído, lilás isômeros, hotrienol e o linalol têm sido considerados como marcadores para mel cítrico (ESCRICHE et al., 2011; ALISSANDRAKIS et al., 2007; BERTELLI et al., 2008); e o nonanal, nonanol e ácido nonanoico foram propostos como marcadores de mel de eucalipto (ALISSANDRAKIS et al., 2011).

As únicas amostras que apresentaram resultados onde os perfis voláteis e os compostos majoritários apresentavam semelhança foram as de florada de eucalipto (M16, M17, M18 e M19). Essas amostras continham oito compostos principais, que juntos somavam aproximadamente 70% da concentração total (somatório de todos os compostos identificados). Em ordem crescente, os compostos identificados foram o 2-hidroxi-4-metil pentanoato de butila (12,39%), 5-hidroxi-2,7-dimetil-4-octanona (12,39%), nonanal (10,67%), 2,3-heptanodiona (8,17%), furfural (6,33%), nonanol (5,94%), 4-metil-oxi pentanoato de metila (4,40%) e o butanoato de butila (4%). Alguns desses compostos, como o nonanal e o nonanol já foram exhaustivamente discutidos como marcadores de florada de eucalipto, porém outros não.

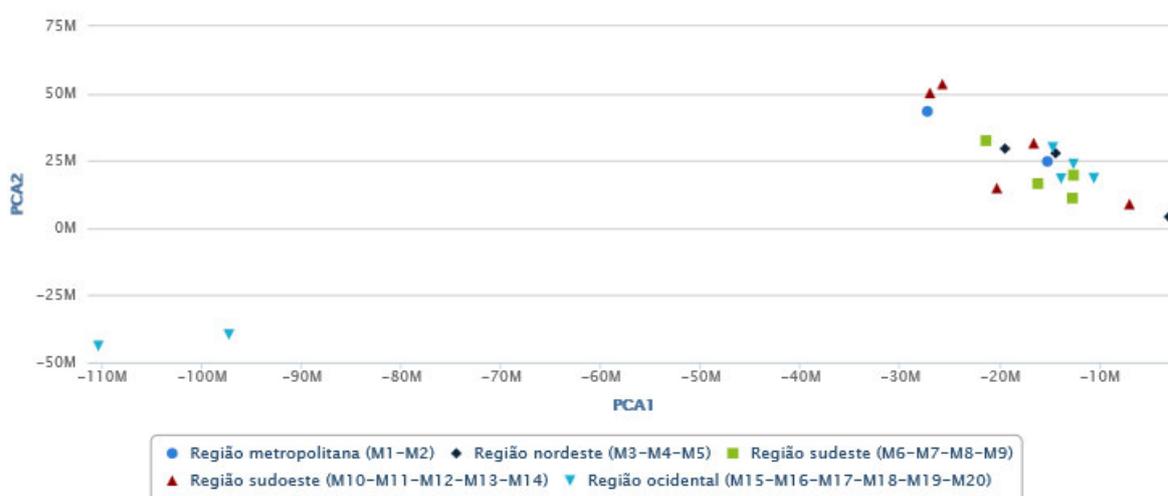


Figura 20 - - Análise de componentes principais (PCA) em compostos voláteis de méis provenientes do estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

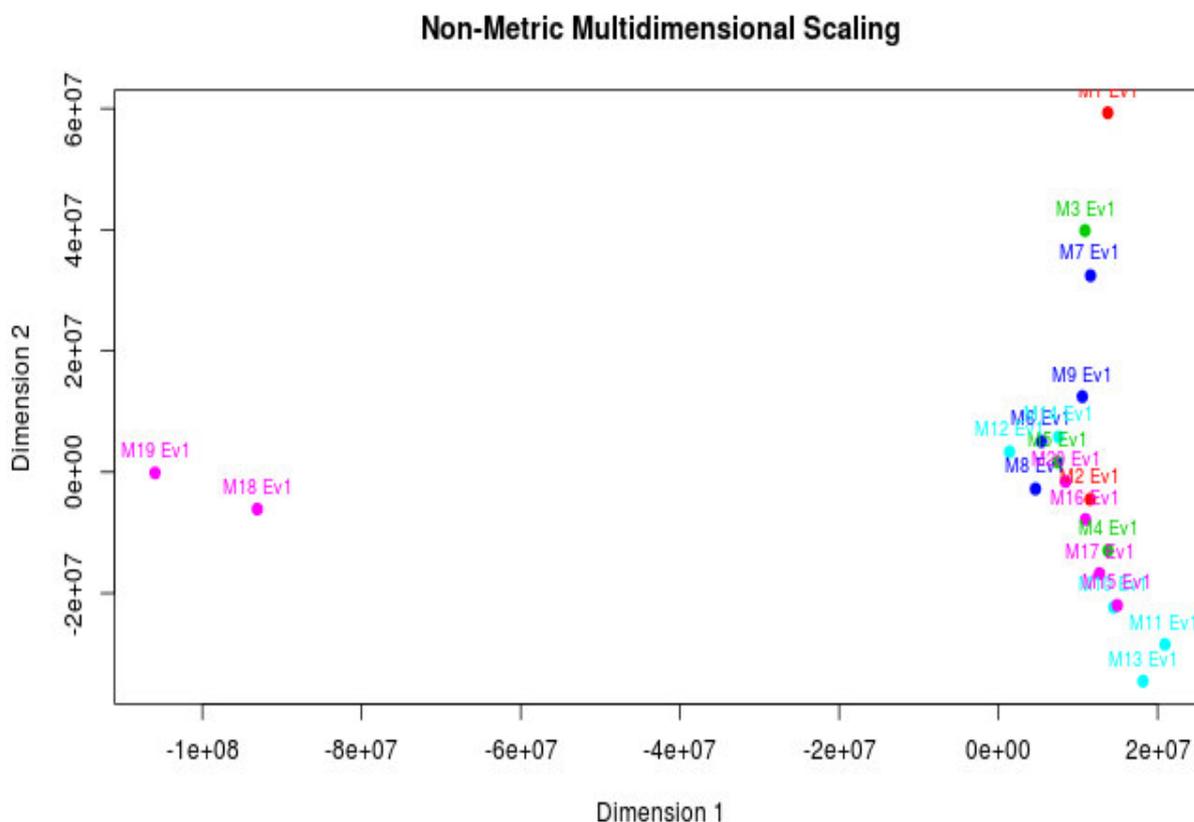


Figura 21 - Escala multidimensional da análise de componentes principais (PCA) em compostos voláteis de méis provenientes do estado do Rio Grande do Sul, Brasil

Com o objetivo de investigar as origens geográfica e botânica foi empregada à análise de componentes principais (Figuras 20 e 21) nas amostras de méis. Através dessa ferramenta estatística foi possível discriminar os perfis de aroma nas regiões estudadas. Os dois primeiros componentes principais juntos representam 31% da variabilidade total dos dados, com 12% do PC1 e 19% do PC2.

Por meio dessa análise exploratória foi observado que a maioria das amostras apresentou certa similaridade, as diferenças observadas são com relação às amostras M18 e M19 (ambas da florada de eucalipto). O composto determinante para separação dessas duas amostras foi o hotrienol (contribuição de 8,5%), O hotrienol (Figura 22) foi identificado com uma similaridade de 94% (Figura 23) através do padrão de fragmentação da biblioteca de dados do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST) 2011. Seus principais íons de referência foram: 43(59%); 67(38%); 71(100%); 82(84%); M^+ 152.

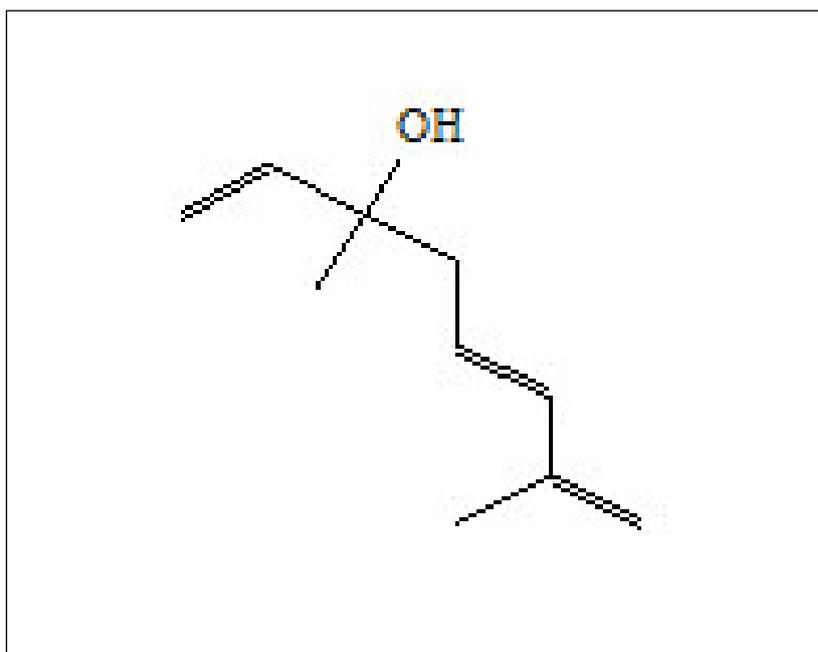


Figura 22 - Estrutura hotrienol

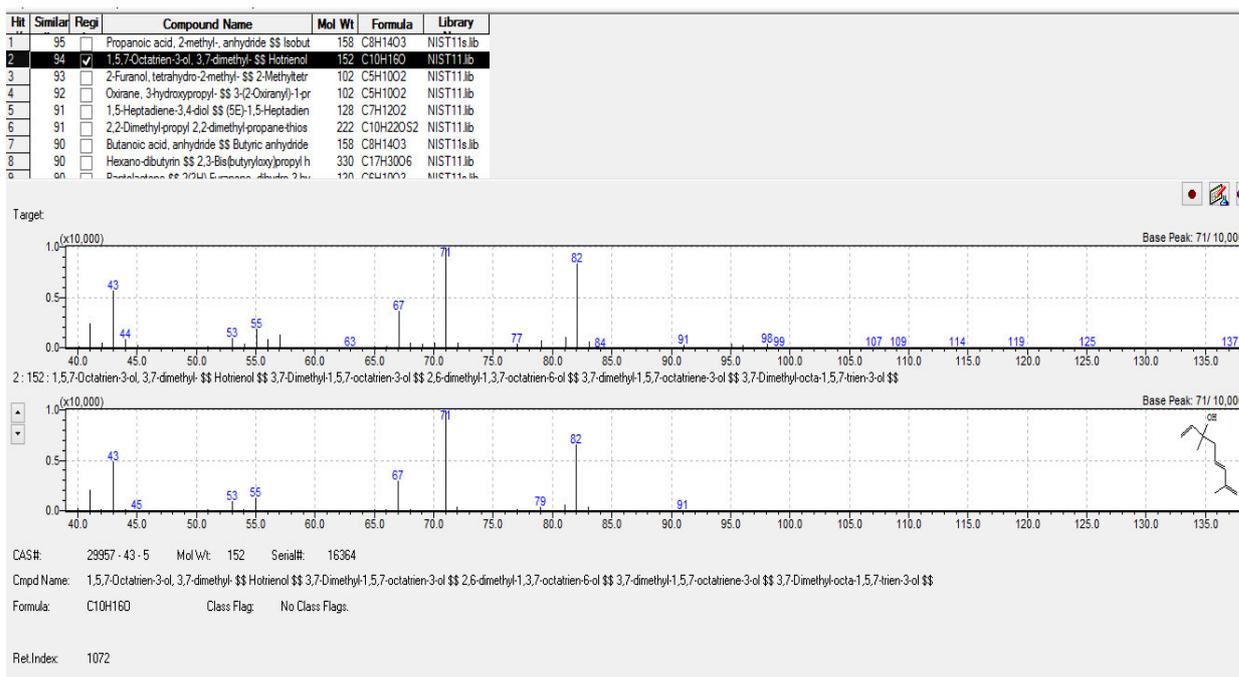


Figura 23 - Dados do perfil de fragmentação do composto hotrienol na amostra M18. (a) similaridade de 94% do composto. (b) perfil de fragmentação do composto na amostra M18. (c) perfil de fragmentação do composto na biblioteca NIST. (d) informações sobre o composto.

Além do hotrienol, houve outros seis compostos que contribuíram para as diferenças observadas nas amostras M18 e M19, os quais estão listados na tabela 12.

Tabela 12 - Dados dos compostos encontrados com maior relevância na discriminação do perfil volátil quando aplicada à análise de componentes principais.

Compostos	PCA (%)	CG/MS (%)	Ion referência
2-hidroxi-4-metil pentanoato de metila	7,5	90	43(100);45(49);69(70); 87(32);M ⁺ 146
octanoato de metila	6,8	95	41(22);43(33)74(100);87(45);M ⁺ 158(<1)
nonanal	6,6		43(88);57(68);71(100);82(96); M ⁺ 142
fenilacetaldéido	3,2	97	65(17);91(100);92(26);120(22); M ⁺ 120(21,7)
1-nonanol	1,6		43(70);56(86);71(100);89(83)
butanoato de butila	1,3	94	43(70);56(86);71(100);89(83); M ⁺ 144(<1)

* PCA (%): percentual de contribuição do composto para o PCA; CG-MS(%) similaridade do fragmento do composto com a biblioteca NIST 2011.

5.4 Conclusão

O perfil volátil de méis oriundos de diversas regiões do Rio Grande do Sul foi investigado por meio de microextração em fase sólida (DVB-PDMS-CAR) seguida de cromatografia gasosa acoplada a espectro de massas (CG-MS), onde a presença de nonanal foi observada em todas as amostras, independente da região, e em concentrações elevadas, o que não o torna característico de alguma florada ou região específica, mas sim característico do perfil volátil de méis.

Os compostos acetofenona, octanoato de metila, acetato de etil-fenil foram característicos nas amostras da região ocidental. Os compostos 2-hidroxi-4-metil pentanoato de metila, 5-hidroxi-2,7-dimetil-4-octanona, 4-metil-2-oxi pentanoato de metila e 1-nonanol foram identificados em maior concentração nas amostras da região sudoeste. As amostras da região sudeste se diferenciaram pela presença dos compostos benzaldeído, 3,5-dimetoxibenzaldeído e fenilacetaldeído.

Foi possível caracterizar a florada de eucalipto nas amostras M18 e M19, devido à predominância dos compostos hotrienol, 2-hidroxi-4-metil pentanoato de metila, octanoato de metila e nonanal, observado pela análise de PCA.

6 Considerações finais

A determinação de compostos bioativos por espectrofotometria não foi capaz de detectar variabilidade dos compostos nos méis de diferentes regiões. Os bioativos encontrados em maior concentração foram os compostos fenólicos. Já os carotenoides, apesar de presentes em baixas concentrações foram suficientes para contribuir para a sua atividade antioxidante (ABTS).

A atividade antimicrobiana demonstrou eficiência principalmente frente aos micro-organismos Gram positivos, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*.

Através da determinação de compostos fenólicos individuais, por cromatografia líquida, foi possível identificar que os flavonoides estiveram presentes em maior concentração do que os ácidos fenólicos, sendo a catequina, epicatequina e hesperitina, os compostos identificados em maior proporção na maioria dos méis.

Como complemento para a discussão dos dados observados nos Capítulos 1 e 2 (os quais contém o mesmo grupo de amostras) foi realizada a análise de correlação de *Pearson's*. Nessa foi observado que: os flavonoides mirecetina e hesperitina, e o ácido fenólico cafeico podem ter contribuído para a coloração dos méis, pois apresentaram correlações fortemente positivas e significativas, com valores de 0,85 (<0,0001), 0,55 (0,005) e 0,8897 (0,007), respectivamente. O somatório dos compostos fenólicos individuais, determinado por cromatografia líquida apresentou correlação positiva (0,54) e significativa (0,03) com os resultados apresentados na análise de condutividade (dados que se relacionam com o conteúdo de minerais). A galangina foi o composto que se correlacionou positivamente (0,63) pela técnica de compostos fenólicos por espectrofotometria. E ainda, que o ácido cafeico apresentou correlação fortemente positiva (0,84) e significativa (0,01) com o conteúdo de acidez e de compostos fenólicos. O conteúdo de luteína e ácido serínico foram os que se correlacionaram positivamente (0,62 e 0,47) e significativamente (0,02 e 0,03) com os resultados da análise de atividade antioxidante por ABTS.

Por intermédio do perfil volátil foi possível detectar os compostos acetofenona, octanoato de metila, acetato de etil-fenil como característicos da região ocidental; 2-hidroxi-4-metil pentanoato de metila, 5-hidroxi-2.7-dimetil-4-octanona, 4-metil-2-oxi pentanoato de metila e 1-nonanol identificados em maior concentração na região sudoeste e presentes em maior proporção; e o benzaldeído, 3,5-dimetoxibenzaldeído e fenilacetaldéído na região sudeste do estado do Rio Grande do Sul.

Foi presumível a caracterização da florada de eucalipto em duas amostras de méis (M18 e M19), sendo possível a sua identificação quanto à originalidade devido à presença de quatro compostos principais, hotrienol, 2-hidroxi-4-metil pentanoato de metila, octanoato de metila e nonanal.

Referências

ABREU, R.L. **Mapa das regiões do Rio Grande do Sul**. Wikipedia, 2 jun. 2006. Disponível em:<
http://commons.wikimedia.org/wiki/File:RioGrandedoSul_MesoMicroMunicip.svg>
Acesso em: 10 out. 2015

ABEMEL, **Associação Brasileira dos Exportadores de Mel** (2014). Disponível em:<www.abemel.com.br > Acesso em: 18 de mai 2014.

ABEMEL, **Inteligência Comercial. Setor apícola brasileiro em números**, por Gustavo Cuba. (2016). Disponível em: icom@abemel.com.br Acesso em 10 de fevereiro de 2016.

AJLOUNI , S., SUJIRAPINYOKUL, P.(2010) Hydroxymethylfurfuraldehyde and amylase contents in Australian honey. **Food Chemistry** ,119 1000–1005.

AL-WAILI NS, SALOM K, BUTLER G, AL GHAMDI AA. Honey and microbial infections: a review supporting the use of honey for microbial control. **J Med Food** . 14(10):1079 e 96.2011.

ALCOFORADO FILHO, F. G. **Cadeia produtiva do mel de abelhas do Piauí**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 12., Salvador, BA. Nordeste: a grande opção da apicultura brasileira - anais. Salvador: CBA/FAABA, 1998. p. 229.1998.

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

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

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

ALISSANDRAKIS, E.; TARANTILIS, P. A.; PAPPAS, C.; HARIZANIS, P. C.; POLISSIOU, M. Investigation of organic extractives from unifloral chestnut (*Castanea sativa* L.) and eucalyptus (*Eucalyptus globulus* Labill.) honeys and flowers to identification of botanical marker compounds. **LWT - Food Science and Technology**, 44, 1042–1051, 2011.

AMPUERO, S., BOGDANOV, S., & BOSSET, J. O. Classification of unifloral honeys with an MS-based electronic nose using different sampling modes: SHS, SPME and INDEX. **European Food Research and Technology**, 218, 198–207. 2004.

ALQARNI, A.S.; OWAYSS, A.A.; MAHMOUD, A.A. Physicochemical characteristics, total phenols and pigments of national and international honeys in Saudi Arabia. **Arabian Journal of Chemistry**, 2012.

ALVAREZ-SUAREZ, J. M., TULIPANI, S., DIAZ, D., ESTEVEZ, Y., ROMANDINI, S., GIAMPERI, Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. **Food Chemistry Toxicology**, 48, 2490–2499. 2010.

ALVAREZ-SUAREZ, J.M; GIAMPIERI, F.; GONZALEZ-PARAMAS, A.M.; DAMIANI, E.; ASTOLFI, P.; MARTINEZ-SANCHEZ, G.; BOMPADRE, S.; QUILES, J.L.; SANTOS-BUELGA, C.; BATTINO, M. Phenolics from monofloral honeys protect human erythrocyte membranes against oxidative damage. **Food and Chemical Toxicology**, 50, 1508–1516, 2012

ALVES, O.M.R.; CARVALHO, L.A.C.; SOUZA, A.B.; SODRÉ, S.G.; MARCHINI, C.L. (2005). Características Físic. o-Químicas de Amostras de Mel de Melipona mandacaia SMITH (Hymenoptera: Apidae). **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, versão online; Campinas. p. 644 – 650. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cta/v25n4/27630.pdf>> Acesso em: 20 de maio 2015

AL-WAILI, N.S. Identification of nitric oxide metabolites in various honeys: effects of intravenous honey on plasma and urinary nitric oxide metabolites concentrations. **Journal of Medicinal Food**;6(4):359 e 64, 2003.

AL-WAILI, N.S; BONI, N.S. Natural honey lowers plasma prostaglandin concentrations in normal individuals. **Journal of Medicinal Food**. 6(2):129 e 33. 2003.

AL-WAILI, N.S; SALOM, K; BUTLER, G, A.L; GHAMDI, A.A. Honey and microbial infections: a review supporting the use of honey for microbial control. **Journal of Medicinal Food**. 14(10): 79 - 96, 2011.

ANDRADE, R. C. P. **O MEL**, 2003. Apicultura Mundo, Brasil, Paraná. Curitiba: Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento, 2005. Disponível em: http://www.apicultura.com/index_sp.htm,2016, Acesso em 15 de janeiro de 2016.

ANDRADE, C.K.; ANJOS, V.E. FELSNER, M.L.; TORRES, Y.R. QUINAIA, S.P. Direct determination of Cd, Pb and Cr in honey by slurry sampling electrothermal atomic absorption spectrometry. **Food Chemistry**, 146, 166–173. 2014.

ANKLAM, E., & RADOVIC, B. S. **Suitable analytical methods for determining the origin of European honey**. American Laboratory, 60–64, 2001.

ANTONY,S.M; HAN, I.Y.; RIECK, J.R.; DAWSON, P.L. Journal of Agricultural Food Chemistry, 48, 3985, 2000.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**, 16th ed. Arlington: A.O.A.C., (method 962.19) . chapter 44. p. 31, 1995.

APEX BRASIL,2014. Disponível em:<www.apexbrasil.com.br> Acesso em 1 jan.2016

ARVOUET-GRAND A, VENNAT B, POURRAT A, LEGRET P.(1994). Standardisation d'un extrait de propolis et identification des principaux constituants. **Journal Pharmcie Belgique**. 49(6), 462-468.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**, 16th ed. Arlington: A.O.A.C., (method 980.23), 1995. chapter 44. p. 26.

AUGUSTO, F., VALENTE, A.L.P., Applications of solid-phase microextraction to chemical analysis of live biological samples, **Trends in Analytical Chemistry**, 21, 428, 2002.

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

BALTRUSAITYT, V.; VENSKEYOINS, P.R.; EKSTERYT, V.(2007) Radical Scavenging Activity of Different Floral Origin Honey and Beebread Phenolic Extracts. **Food Chemistry**, 101. p.502-514.

BARRA, M. P. G., PONCE-DÍAZ, M. C., & VENEGAS-GALLEGOS, C. (2010). Volatile compounds in honey produced in the central valley of Ñuble Province, Chile.

BARROS, L., CALHELHA, R. C., VAZ, J. A., FERREIRA, I. C. F. R., BAPTISTA, P., & ESTEVINHO, L. M. Antimicrobial activity and bioactive compounds of Portuguese wild edible mushrooms. **European Food Research and Technology**, 225, 151–156, 2007..

BELAY, A., SOLOMON, W.K., BULTOSSA, G., ADGABA, N., MELAKU, S. (2015). Botanical origin, colour, granulation, and sensory properties of the Harenn forest honey, Bale, Ethiopia. **Food Chemistry**, 167, 213–219.

BENDINI, J.N.; SOUZA, D.C. Caracterização físico-química do mel de abelhas proveniente da florada do cajueiro. *Ciência Rural*, v.38, n 2, Santa Maria, 2008

BERETTA, G., GRANATA, M., FERRERO, M., ORIOLI, R.M. FACINO., (2005). Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. **Anal. Chim. Acta**, 533, 185-191.2005.

BERTELLI, D., PAPOTTI, G., LOLLI, M., SABATINI, A. G., & PLESSI, M. Development of an HS-SPME–GC method to determine the methyl anthranilate in citrus honeys. **Food Chemistry**, 108, 297–303, 2008.

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

BIANCHIN, J.N; NARDINI, G.; MERIB,J.; DIAS,A.N.; MARTENDAL,E.; CARASEK, E. Screening of volatile compounds in honey using a new sampling strategy combining multiple extraction temperatures in a single assay by HS-SPME–GC–MS **Food Chemistry**, 145, 1061–1065, 2014.

BILANDZIC,N.; GACIC, M.; DOKIC,M.; SEDAK, M.; SIPUSIC, D.I.; KONCURAT,A.; GAJGER, I.T. Major and trace elements levels in multifloral and unifloral honeys in Croatia. **Journal of Food Composition and Analysis** ,33 132–138, 2014.

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, pp. 217–222. 2006.

BLASA, M., CANDIRACCI, M., ACCORSI, A., PIACENTINI, M. P., & PIATTI, E. Honey flavonoids as protection agents against oxidative damage to human red blood cells. **Food Chemistry**, 104, 1635–1640. 2007.

BOEKEMA BK, POOL L, ULRICH MM. The effect of a honey based gel and silver sulphadiazine on bacterial infections of in vitro burn wounds. **Burns**, 39(4): 754 e 9, 2013.

BOGDANOV, S.; MARTIN, P.; LULLMAN, C. HARMONISED. **METHODS OF THE EUROPEAN HONEY COMMISSION** Apidologie, Paris: Issue Spec.p. 25-27. 1997

BOGDANOV, S., RUOFF, K., PERSANO ODDO, L. Physico-chemical methods for the characterisation of inifloral honeys: a review. **Apidologie**, 35, 4-17.2004.

BOGDANOV. Honey Composition. **Bood of Honey**. [s.l.] : Bee Product Science, August 2009. Disponível em:<<http://www.bee-hexagon.net>>. Acesso em: 23 fev. 2010.

BOUSSAID, A., CHOUAIBI, M., RESIG, L., HELLAL, R., DONSI, F., FERRARI, G., HAMDI, S. (2014). Physicochemical and bioactive properties of six honey samples from various floral origins from Tunisia. **Arabian Journal of Chemistry**. On line, doi:10.1016/j.arabjc.2014.08.011

BRAGA, A. de S. **Apicultura: o caminho para a cidadania**. Salvador, 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura, pecuária e Abastecimento. Defesa Animal. Legislações. Legislação por Assunto. Legislação de Produtos Apícolas e Derivados. Instrução Normativa n. 11, de 20 de outubro de 2000. **Regulamento técnico de identidade e qualidade do mel**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/sda/dipoa/in_11_2000.htm>. Acesso em: 10 de outubro de 2014.

BRAVO L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance, **Nutrition Reviews**, 56 (11) 317-333. 1998.

BRITTON G.; KHACHIK F. **Carotenoids in food**. In: Britton G, Liaaen-Jensen S, Pfander H, Carotenoids, Volume 5: Nutrition and Health. Springer, New York, 2009.

BRUDZYNSKI, K, ABUBAKER, K, ST-MARTIN L, CASTLE A. Reexamining the role of hydrogen peroxide in bacteriostatic and bactericidal activities of honey. **Front Microbiol**, 2:213, 2011.

BRUDZYNSKI K, ABUBAKER K, WANG T. Powerful bacterial killing by buckwheat honeys is concentration-dependent, involves complete DNA degradation and requires hydrogen peroxide. **Front Microbiol**. 4(3):242, 2012.

BUANAIN, A..M.; BATALHA, M.O. **Cadeia produtiva de flores e mel**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Política Agrícola, Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura. Sério negócios, v.9, 2007. Disponível em: <http://www.ibraf.org.br/x_files/Documentos/Cadeia_Produtiva_de_Frutas_S%C3%A9rie_Agroneg%C3%B3cios_MAPA.pdf>, Acesso em 10 março 2016.

BUCHANAN, B.B., JONES, R.L., 2000. Biochemistry & Molecular Biology of Plants, vol.40. **American Society of Plant Physiologists**, Rockville, MD.

CAMARGO, R. C. R. de; PEREIRA, F. de M.; LOPES, M. T. do R.; WOLFF, L. F. **Mel: características e propriedades**. Documentos Embrapa , 2006

CANADANOVIC-BRUNET, J., CETKOVIC, G., SAPONJAC, V.T., STAJCIC, S., VULIC, J., DJILAS, S., STAJNER, D., POPOVIC, B. Evaluation of phenolic content, antioxidant activity and sensory characteristics of Serbian honey-based product. **Industrial Crops and Products**, 62, 1–7, 2014.

CAROCHO, M., FERREIRA, I.C.F.R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food Chem. Toxicol.** 51, 15–25, 2013.

CASTRO-VAZQUEZ, L., DIAZ-MAROTO, M. C., & PEREZ-COELLO, M. S. Aroma composition and new chemical markers of Spanish citrus honeys. **Food Chemistry**, 103, 601–606, 2007.

CASTRO-VAZQUEZ, L., DIAZ-MAROTO, M. C., & PEREZ-COELLO, M. S. Differentiation of monofloral citrus, rosemary, eucalyptus, lavender, thyme, and heather honeys based on volatile composition and sensory descriptive analysis. **Food Chemistry**, 112, 1022–1030. 2009.

CASTRO-VÁZQUEZ, L.; DÍAZ-MAROTO, M.C.; DE TORRES, C.; PÉREZ-COELLO, P.S. Effect of geographical origin on the chemical and sensory characteristics of chestnut honeys. **Food Research International**, 43, 2335–2340, 2010.

CE. Council Directive 2001/110, Relating to honey. **Official Journal of the European Communities** L 10/47-L 10/52.

CE, REGULAMENTO N.º 178/2002 DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO de 28 de Janeiro de 2002 que determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios Disponível em: <http://www.apicarnes.pt/pdf/legislacao/Reg_178_2002.PDF>. Acesso em: fev. 2016

CE, REGULAMENTO N.º 852/2004 DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO, de 29 de Abril de 2004, relativo à higiene dos géneros alimentícios Disponível em: <http://www.apicarnes.pt/pdf/legislacao/Reg_852_2004.pdf> Acesso em: fev. 2016.

CHAN, C., DEADMAN, B.J., MANLEY-HARRIS, M., WILKINS, A.L., ALBER, D.G., HARRY, E.. Analysis of the flavonoid component of bioactive New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey and the isolation, characterisation and synthesis of an unusual pyrrole. **Food Chemistry**, 141, 1772–1781. 2013.

CHIRIFE, J.; ZAMORA, M.C.; MOTTO, A. The correlation between water activity and % moisture in honey: Fundamental aspects and application to Argentine honeys. **Journal of Food Engineering**, v.72, p.287–292, 2006

CHOI, C.; KIM, W.S.; PARK, Y.H.; PARK, S.C. JANG, M.K.; NAH, J.W. Water-soluble chitosan and herbal honey compound alleviates atopic dermatitis-like lesions in NC/Nga mice. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, 20, 499–504, 2014.

CIMPOIU, C., HOSU, A., MICLAUS, V., PUSCAS, A. Determination of the floral origin of some Romanian honeys on the basis of physical and biochemical properties. **Spectrochim. Acta Mol. Biomol. Spectros.** 100, 149–154, 2013.

CIULU, M.; SOLINAS, S.; FLORIS, I.; PANZANELLA, A.; PILO, M.; PIU, P.; SPANO, N.; SANNA, G. RP-HPLC determination of water-soluble vitamins in honey. **Talanta**, 83, 924-929, 2011.

CMMAD- COMISSÃO MUNDIAL SOBRE MEIO AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO. *Nosso futuro comum*. Rio de Janeiro: Fundação Getúlio Vargas, 1988.

CODEX ALIMENTARIUS. **Revised codex standard for honey**. Rev. 2 [2001]. 24th session of the Codex Alimentarius in 2001. Disponível em: <http://www.codexalimentarius> Acesso: janeiro de 2016

COHEN, S.D., KENNEDY, J.A. Plant metabolism and the environment: implications for managing phenolics. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** 50, 620–643, 2010.

CRANE, E. Chapter 20- Bee Products. **Encyclopedia of Insects** (Second Edition), 71-75, 2009.

CUEVAS-GLORY, L. F., PINO, J. A., SANTIAGO, L. S., & SAURI-DUCH, E. A review of volatile analytical methods for determining the botanical origin of honey. **Food Chemistry**, 103, 1032–1043, 2007.

DAMODARAN, S., PARKIN, K. L., & FENNEMA, O. R. (2010). **Química de alimentos** de Fennema (4th ed.). Artmed.

DIAS, M.I, SOUSA, M.J, ALVES, R.C, FERREIRA, I.C.F. A review: Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: **Industrial Crops and Products**, 82 9–22, 2016.

DONER, L. W. (2003). **Honey**. Elsevier Science Ltd, Wyndmoor, PA, USA. 3125–3130.

EISERT, R., LEVSEN, K., Solid-phase microextraction coupled to gas chromatography: a new method for the analysis of organics in water, **Journal of Chromatography A**, 733, 143, 1996.

ESCRICHE, I.; 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.

ESCRICHE, I.; KADAR, M.; DOMENECH, E., DIL-SANCHEZ, L. A potentiometric electronic tongue for the discrimination of honey according to the botanical origin. Comparison with traditional methodologies: Physicochemical parameters and volatile profile. **Journal of Food Engineering**, 109, 449–456, 2012.

ESCRICHE, I., KADAR, M., JUAN-BORRAS, M., DOMENECH, E. Suitability of antioxidant capacity, flavonoids and phenolic acids for floral authentication of honey. Impact of industrial thermal treatment. **Food Chemistry** 142, 135–143. 2014.

ESCUREDO, O., SILVA, L.R., VALENTÃO, P., SEIJO, M.C., ANDRADE, P.B. Assessing Rubus honey value: Pollen and phenolic compounds content and antibacterial capacity. **Food Chemistry**, 130, 671-678, 2012.

ESCUREDO, O.; SONZÁLEZ-MARTIN, I.M.; RODRIGUEZ-FLORES, S.M. SEIJO, C.M. Near infrared spectroscopy applied to the rapid prediction of the floral origin and mineral content of honeys. **Food Chemistry** ,170, 47–54, 2015

ESTEVINHO, L., PEREIRA, A.P., 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. M.; FEÁS, X.; SEIJAS, J. A.; VÁZQUEZ-TATO, M. P. Organic honey from region (Portugal): Chemical, palynological, microbiological and bioactive compounds characterization. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 258–264, 2012.

EUROSTAST, **Trade Statistics, Honey in Europe**, CBI, Market Intelligence, The Netherlands, 2015. Disponível em: <<https://www.cbi.eu/sites/default/files/trade-statistics-europe-honey-2015.pdf>> Acesso em: fev. 2016.

EVERETTE, J. D.; BRYANT, Q. M.; GREEN, A. M.; ABBEY, Y. A.; WANGILA, G. W.; WALKER, R. B. Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteou reagent. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 58, p. 8.139-8.144, 2010.

FAIR, RJ, Tor Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. **Perspect Med Chem**, 28(6):25 e 64, 2014.

FALLICO, B. et al. Effects of conditioning on HMF content in unifloral honeys. **Food Chemistry**, 85, 305-313, 2004

Fell, R.D (1978). The color grading of honey. *Am. Bee J.* 18, 782-789.

FERREIRA, I. C.F.R., AIRES, E., BARREIRA, J.C.M, ESTEVINHO, L.M. (2009). Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract. **Food Chemistry**, 114, 1438–1443.

FERREIRA M M, ZAMITH HPS, ABRANTES S. Astaxantina: seu uso como corante natural alimentício. **Rev Inst Adolfo Lutz**. São Paulo, 73(1):1-8, 2014

FINOLA, M. S., LASAGNO, M. C., & MARIOLI, J. M. Microbiological and chemical characterization of honeys from central Argentina. **Food Chemistry**, 100, 1649 a 1653, 2007.

FLOEGEL, A., KIM, D., CHUNG, S., KOO, S.I., CHUN, O.K..Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 1043–1048, 2011.

FRANCO, M. R. B. **Aroma e sabor de alimentos: temas atuais**. São Paulo: Livraria Varela, 246, 2003.

FREITAS, D. G. F.; KHAN, A. S.; SILVA, L. M. R. Nível tecnológico e rentabilidade de produção de mel de abelha (*Apis mellífera*) no Ceará. **Revista de Economia Rural**, v. 42, n. 1, p. 171- 188, 2004.

GÁMBARO, A., ARES, G., GIMÉNEZ, A., & PAHOR, S. (2007). Preference mapping of color of Uruguayan honeys. **Journal of Sensory Studies**, 22, 507–519.(2007)

GEORGE NM, CUTTING KF. Antibacterial honey (Medihoney): in vitro activity against clinical isolates of MRSA, VRE, and other multi resistant gram-negative organisms including *Pseudomonas aeruginosa*. **Wounds**. 19(9):231 e 6, 2007.

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

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

GOMES, S.; DIAS, L. G.; MOREIRA, L. L.; RODRIGUES, P.; ESTEVINHO, L. Physicochemical, microbiological and antimicrobial properties of commercial honeys from Portugal. **Food and Chemical Toxicology**, v.48, p544-548, 2010.

GUIMARÃES, N. P. **Apicultura, a ciência da longa vida**. Belo Horizonte: Ed. Itatiaia Ltda., 1989

GUYOT, C., BOUSETA, A., SCHEIRMAN, V., & COLLIN, S. Floral origin markers of chestnut and linden tree honeys. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 46, 625–633, 1998.

HABIB, H.M., AL MEQBALI, F.T.,KAMAL,H., SOUKA, IBRAHIM, W.H. Bioactive components, antioxidant and DNA damage inhibitory activities of honeys from arid regions. **Food Chemistry**, 153 , 28–34, 2014.

HASKELL, M. J. Provitamin A carotenoids as a dietary source of vitamin A. In S. A. Tanumihardjo (Ed.), **Carotenoids and human health**, 249–260, 2013.

HUANG, R.T.; LU, J.F.; INBARAJ, S., CHEN, B.H. Determination of phenolic acids and flavonoids in *Rhinacanthus nasutus* (L.) kurz by highperformance-liquid-chromatography with photodiode-array detection and tandem mass spectrometry. **Journal of functional foods**, 12, 98–508, 2015.

IAL - INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**, 3. ed. Sao Paulo: IMESP, 1985. p. 160.

IBGE, Produção da Pecuária Municipal, v.41, 2013
ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2013/ppm2013.pdf

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Produção da Pecuária Municipal 2009. Rio de Janeiro, v. 37, p. 1-55, 2009. Disponível em:
<<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2009/ppm2009.pdf>>.
Acesso em 03 de maio de 2014.

IGNAT, I.; VOLF, I., POPA, V. Review: A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, 126, 821–1835, 2011.

IMEH. U. ; KHOKHAR. S. Distribution of Conjugated and Free Phenols in Fruits: Antioxidant Activity and Cultivar Variations. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, 50, 301-306, 2002.

INOUE, K.; MURAYAMA, S.; SESHIMI, F.; TAKEBA, K.; YOSHIMURA, Y.; NAKAZAWA, H. , **Journal Science Food Agricultural**, 85, 872, 2005.

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

JAGANATHAN, S K; MAZUMDAR, A; MONDHE, D; MANDAL, M (2011). Apoptotic effect of eugenol in human colon cancer cell lines. **Cell Biology International**. 6, 607-615.

KAMAL, M. A., & KLEIN, P. Determination of sugars in honey by liquid chromatography. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 18, 17–21, 2011.

KAMARATOS AV, TZIROGIANNIS KN, IRAKLIANOU SA, PANOUTSOPOULOS GI, KANELLOS IE, MELIDONIS AI. Manuka honey-impregnated dressings in the treatment of neuropathic diabetic foot ulcers. **Int Wound J**.11(3): 259 e 63.2014.

KARABAGIAS, I. K., BADEKA, A., KONTAKOS, S., KARABOURNIOTI, S., & KONTOMINAS, M. G. Characterization and classification of *Thymus capitatus* (L.) honey according to geographical origin based on volatile compounds,

physicochemical parameters and chemometrics. **Food Research International**, 55, 363–372. 2014.

KARAKAYA, S. Bioavailability of phenolic compounds. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**44, 453–464, 2004.

KASKONIENE, V., VENSKUTONIS, P. R., & CEKSTERYTE, V. Composition of volatile compounds of honey of various floral origin and beebread collected in Lithuania. **Food Chemistry**, 111, 988–997, 2008.

KNIGHT ,A. The therapeutic effects of honey. Plymouth. **Student Sci** .6(1):376 e 85, 2013.

KOWALSKI , S. Changes of antioxidant activity and formation of 5-hydroxymethylfurfural in honey during thermal and microwave processing Stanisław. **Food Chemistry**, 141, 1378–1382. 2013.

KUS P.M; CONGIU, F; TEPER, D; SROKA, Z; JERKOVI, C.I; TUBEROSO C.I.G. Antioxidant activity, color characteristics, total phenol content and general HPLC fingerprints of six Polish unifloral honey types. **LWT Food Sci Technol**; 55(1):124e30, 2014.

KUSKOSKI, E.M., ASUERO, A.G., TRONCOSO, A.M., MANCINI, J., FETT, R.. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante em pulpa de frutos. **Cien Tecnol Aliment**, 25, 726-732, 2005.

LACHMAN, J., ORSAK, M., HEJTMANKOVA, A., KOVAROVA, E. Evaluation of antioxidant activity and total phenolics of selected Czech honeys. **LWT – Food Science and Technology**, 43, 52–58, 2010.

LENGLER, S. 2004. Disponível em:<www.com.br/apicultura/pesquisas/inspeção_mel,01.doc> Acesso em: 3 de outubro de 2015.

LENHARDT, L.; BRO, R.; ZEKOVIC, I.; DRAMICANIN, T.; DRACANIN, M.D. Fluorescence spectroscopy coupled with PARAFAC and PLS DA for characterization and classification of honey. **Food Chemistry**, 175, 284–291, 2015.

LERFALL, J. Carotenoids: Occurrence, Properties and Determination. Reference Module in Food Science. **Encyclopedia of Food and Health**, 663-669, 2016.

LI, N., DENG, C., LI, Y., YE, H., ZHANG, X.; Gas chromatography-mass spectrometry following microwave distillation and headspace solid-phase microextraction for fast analysis of essential oil in dry traditional Chinese medicine; **Journal of Chromatography A**, 1133, 29, 2006.

LIPING DU, JIANXUN LI, WEI LI, YUNFEI LI, TAO LI, DONGGUANG XIAO. Characterization of volatile compounds of pu-erh tea using solid-phase microextraction and simultaneous distillation-extraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry, **Food Research International**, 57, 61-70, 2014.

LIU, J., YE, Y., LIN, T., WANG, Y., PENG, C. Effect of floral sources on the antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory activities of honeys in Taiwan. **Food Chemistry**, 139 938-943, 2013.

LOBO, A.M., LOURENÇO, O. A.M., **Biossíntese de Produtos Naturais**. IST—Instituto Superior Técnico, Lisboa, 2007.

MABRY, T J, MARKHAM, K R; THOMAS, M B. Systematic identification of flavonoids. **Springer-Verlag**; New York, USA; 354 pp. 1970.

MADDOCKS, S.E, JENKINS, R.E. Honey: a sweet solution to the growing problem of antimicrobial resistance? **Future Microbiol.** 8(11):1419 e 29, 2013

MADEJCZYK, M., & BARALKIEWICZ, D. Characterization of Polish rape and honeydew honey according to their mineral contents using ICP-MS and F-AAS/AES. *Analytica Chimica Acta*, 617, 11-17, 2008.

MAIA, A.G.; DILVA, A.R.; SOUSA, M.H.O.; COSTA, C.M.J.; composição e Propriedades Terapêuticas do Mel de Abelha. **Alim. Nutri.** Versão Online, vol. 17, n.1,o. 113-120. São Paulo, 2006. Disponível em :<<http://servbib.fcfar.unesp.br/ser/index.php/alimentos/article/view/120/133>> Acesso fev. 2016.

MAJTAN J. Honey: an immunomodulator in wound healing. **Wound Repair Regen** ;22(2):187 e 92. 2014.

MARCHINI, L. C.; SODRÉ, G.S.; MORETI, A. C.C. **Mel brasileiro: composição e normas**. Ribeirão Preto: AS Pinto, 2004

MARCUCCI, M C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, 26, 83-99, 1995.

MARKHAM, K. R. **Techniques of flavonoid identification**. Academic Press; London, UK; 113, 1982.

MARTINS, S.; MUSSATO, S.I.; MARTÍNEZ-AVILA, G., MONTAÑEZ-SAENZ, J.; AGUILAR, C. N.; TEIXEIRA, J. A. A review: Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. **Biotechnology Advances**, 29 365–373, 2011.

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

MAZZA, G., FUKUMOTO, L., DELAQUIS, P., GIRARD, B., EWERT, B., (1999). Anthocyanins, Phenolics, and Color of Cabernet Franc, Merlot, and Pinot Noir Wines from British Columbia. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 47, 4009-4017

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.

MENEZES, H.C.; CARDEAL, Z.M. Desenvolvimento de um novo sistema de microextração em fase sólida com fibra resfriada. **Scientia Chromatographica**, 5, 301-309, 2013.

Merken, H.M.; Beecher, G.R. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 48, 577, 2000.

MICHALKIEWIVZ, A.; BIESAGA, M.; PYRZNSKA, K. Solid-phase extraction procedure for determination of phenolic acids and some flavonols in honey. **Journal of Chromatography A**, 1187, 18–24, 2008.

MOREIRA, R. F. A., MARIA, C. A. B., PIETROLUONGO, M., & TRUGO, L. C. Chemical changes in the volatile fractions of Brazilian honeys during storage under tropical conditions. **Food Chemistry**, 121, 697–704, 2010.

MORETI, A. C. C. C., SODRÉ, G. S., & MARCHINI, L. C. Cor de amostras de mel de *Apis mellifera* L. de diferentes estados brasileiros. **Boletim de Indústria Animal**, 63, 159-164, 2006.

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

NACZK, M., SHAHIDI, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 41, 1523–1542, 2006.

PAULA-NETO, F. L.; ALMEIDA-NETO, R. M. Principais mercados apícolas mundiais e a apicultura brasileira. In: **CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA E SOCIOLOGIA RURAL**, 48, 2005. Anais RIBEIRÃO PRETO, SP: SOBER, 2005.

NISHIDA, M., YASHIKI, M., NAMERA, A., KIMURA, K.; Single hair analysis of methamphetamine and amphetamine by solid phase microextraction coupled with in matrix derivatization, **Journal of Chromatography B**, 842, 106, 2006

NOOR, N., SARFRAZ, R.A., ALI, S., SHAHID.M. Antitumour and antioxidant potential of some selected Pakistani honeys. **Food Chemistry**, 143, 362–366, 2014.

O MEL e as Abelhas. *Revista Brasileira de Agropecuária*. São Paulo, n. 15, p. 9-11, 2003

OLIVEIRA, E.N.A.; SANTOS, D.C. Análise físico-química de méis de abelhas africanizada e nativa. Physical-chemical analysis of honeys from africanized and native bees. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)_versão impressa** ISSN 0073-9855. Rev. Inst. Adolfo Lutz (Impr.) vol.70 nº.2 São Paulo, 2011.

OLIVEIRA, L.R.; MEDEIROS, R.M.; TERRA, P.B.; QUELHAS, O.L.G. **Sustentabilidade: da evolução dos conceitos à implementação como estratégia nas organizações**. Produção, v. 22, n. 1, p. 70-82, jan./fev. 2012A doi: 10.1590/S0103-65132011005000062.

OLIVEIRA, P.S., MULLER, R.C.S., DANTAS, K.G.F., ALVES, C.N.; VASCONCELOS, M.A.M., VENTURIEI, G.C. Ácidos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante em méis de *Melipona fasciculata*, *M. flavolineata* (Apidae, Meliponini) e *Apis mellifera* (Apidae, Apini) da Amazônia. **Química Nova**, 35, 9, 2012B

OLTHOF, M.R.; HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. **Human Nutrition and Metabolism**, 131, 66–71, 2001.

ORTIZ-VAZQUEZ E, CUEVAS-GLORY L, ZAPATA-BAAS G, MARTÍNEZ-GUEVARA J, RAMOÑ-SIERRA J. Which bee honey components contribute to its antimicrobial activity? A review. **Afr J Microbiol Res**, 7(51):5758e65.2013.

ORYAN, A.; ALEMZADEH, E.; MOSHIRI, A. Biological properties and therapeutic activities of honey in wound healing: A narrative review and meta-analysis. **Journal of Tissue**, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jtv.2015.12.002>>.

OZKOK, A., D'ARCY, B., SORKUN, K. (2010). Total phenolic acid and total flavonoid content of Turkish pine honeydew honey. **Journal of ApiProduct and ApiMedical Science**, 2, 65 – 71, 2010.

PAULA, J. **Mel do Brasil: as exportações brasileiras de mel no período 2000/2006 e o papel do Sebrae**. Brasília. Sebrae, 98p, 2008.

PASINI, F; GARDINI, S; MARCAZZAN, G.L.; CARBONI, M. F. Buckwheat honeys: Screening of composition and properties. **Food Chemistry**, 141 (2013) 2802–2811

PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.; AGUIAR, C.L. Estudo da composição fenólica de méis e própolis oriundos de mesma colméia. **Revista Mensagem Doce**, São Paulo - SP, p. 1–11. 2003.

PATRA, B., SCHLUTTERNHOFER, C., WU, Y., PATTANAIK, S., YUAN, L. Transcriptional regulation of secondary metabolite biosynthesis in plants. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms**, 1829, 1236–1247, 2013.

PEREIRA, C. M. E; DUTRA, C.F.; LONIEN, H.C.S.; **O paciente queimado e a cicatrização: uma revisão literária**. Instituto de Ensino Superior de Londrina. Inesul, 201º. 2003. Disponível em : < http://www.inesul.edu.br/revista/arquivos/arqidvol_14_1310159432.pdf>. Acesso em 03 de Maio de 2014.

PÉREZ-GÁLVEZ, A.; MÍNGUEZ-MOSQUERA, M.I. Esterification of xanthophylls and its effect on chemical behavior and bioavailability of carotenoids in the human. **Nutrition Research**, 25(7), 631–640, 2005.

PETERSON J; DWYER J. Flavanoids: dietary occurrence and biochemical activity, **Nutrition Research**. 18 (12) p.1995-2018. 1998.

PISANI, A., PROTANO, G., RICCOBONO, F. Minor and trace elements in different honey types produced in Siena County (Italy). **Food Chemistry**, 107, 1553–1560.2008.

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.

POHL, P.; SERGIEL, I. Direct determination of the total concentrations of copper, iron and manganese and their fractionation forms in freshly ripened honeys by means of flame atomic absorption spectrometry. **Microchimica Acta**, 168, 9–15, 2010.

POHL, P.; SERGIEL, I.; PRUSISZ, B. Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract, **Food Chemistry**, 125, 1504–1509, 2011.

PONTES, M.; MARQUES, J. C.; CÂMARA, J. S. (2007). Screening of volatile composition from Portuguese multifloral honeys using headspace solid-phase microextraction-gas chromatography–quadrupole mass spectrometry. **Talanta**, 74, 91–103, 2007.

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

PYRZYNSKA, K.; BIESAGA, M. Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. **Trends in Analytical Chemistry**, Vol. 28, No. 7, 2009.

QUIDEAU, S., DEFFIEUX, D., DOUAT-CASASSUS, C., POUYSÉGU, L. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. **Angew. Chem.** 50, 586–621, 2011.

RADOVIC, B. S., CARERI, M., MANGIA, A., MUSCI, M., GERBOLES, M., & ANKLAM, E. (2001). Contribution of dynamic headspace GC–MS analysis of aroma compounds to authenticity testing of honey. **Food Chemistry**, 72, 511–520.

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

REA, G., ANTONACCI, A., LAMBREVA, M., PASTORELLI, S., TIBUZZI, A., FERRARI, S., FISCHER, D., JOHANNINGMEIER, U., OLESZEK, W., DOROSZEWSKA, T., RIZZO, A.M., BERSELLI, P.V.R., BERRA, B., BERTOLI, A., PISTELLI, L., RUFFONI, B., CALAS-BLANCHARD, C., MARTY, J.L., LITESCU, S.C., DIACONU, M., TOULOUPAKIS, E., GHANOTAKIS, D., GIARDI, M.T. Integrated plant biotechnologies applied to safer and healthier food production: the Nutra-Snack manufacturing chain. **Trends Food Sci. Technol.** 22, 353–366, 2011.

REBANE, R.; HERODES, K. A sensitive method for free amino acids analysis by liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection using pre column derivatization with diethyl ethoxymethylenemalonate: Application to the honey analysis. **Analytica Chimica Acta**, 672, 79–84. 2010.

RIBEIRO, R. O. R. et al. Avaliação comparativa da qualidade físico-química de méis inspecionados e clandestinos, comercializados no estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Rev. Bras. Ciênc. Vet.**, v. 16, n. 1, p. 3-7, 2009

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

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

RICE-EVANS, C. A., MILLER, N. J., & PAGANGA, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, 20, 933–956, 1996.

RICHTER, W.; JANSEN, C.; VENZKE, T.S.L.; MENDONÇA, C.R.B. BORGES, C.D, AVALIAÇÃO DA QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA DO MEL PRODUZIDO NA CIDADE DE PELOTAS/RS. **Alim. Nutr.** Araraquara, v. 22, n. 4, p. 547-553, 2011.

RIVERA, S.M., CANELA-GARAYOA, R., 2012. Analytical tools for the analysis of carotenoids in diverse materials. **Journal of Chromatograph A**, 1224, 1–10, 2012.

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

ROLEIRA, F. M. B.; TAVARES, E. S.; VARELA, C.; COSTA, S. C.; SILVA, T.; GARRIDO, J.; BORGES, F. Review - Plant derived and dietary phenolic antioxidants: Anticancer properties, **Food Chemistry**, 183, 235–258, 2015.

ROWLAND, C. Y., BLACKMAN, A. J., D'ARCY, B. R., & RINTOUL, G. B. A comparison of organic extractives found in Leatherwood (*Eucryphia lucida*) honey and the Leatherwood tree. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 43, 753–763, 1995..

SAINI, R. K.; NILE, S.H.; PARK, S.W. Carotenoids from fruits and vegetables: chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities. **Food Research International**, 76, 735-750, 2015.

SANCHEZ-MALDONADO, A. F., SCHIEBER, A., & GANZLE, M. G. Structure-function relationships of the antibacterial activity of phenolic acids and their metabolism by lactic acid bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, 111, 1176–1184.2011.

SARHAN, W.A.; AZZAZY, H. High concentration honey chitosan electrospun nanofibers: biocompatibility and antibacterial effects, *Carbohydr Polym*, 122, 135-143, 2015.

SAS Institute Inc. (1999). **SAS/STAT User's Guide, Version 8**, vol 2. SAS Institute, Inc., Cary, NC.

SEBRAE, Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas, 2009 Nacional. PAS Indústria. Manual de Segurança e Qualidade para Apicultura. Brasília: Sebrae/NA, 86p. 2009. Disponível em: <[http://201.2.114.147/bds/BDS.nsf/4B9F0764B18CA32983257646006E9520/\\$File/NT000429CE.pdf](http://201.2.114.147/bds/BDS.nsf/4B9F0764B18CA32983257646006E9520/$File/NT000429CE.pdf)> Acesso em: 10 de janeiro de 2016.

SEBRAE, Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas, 2013. Acesso em 18 de maio de 2014. Disponível em <http://www.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/artigos/Conhe%C3%A7a-o-hist%C3%B3rico-da-apicultura-no-Brasil>

SEBRAE, Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas, 2014. **Mel gaúcho vira cosmético e abastece redes de hotéis**. Acesso em 10 março de 2016. Disponível em <http://www.sebrae-rs.com.br/index.php/noticia/2042-mel-gaucha-vira-cosmetico-e-abastece-redes-de-hotéis>

SEBRAE, Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas, 2016. Acesso em 18 de fevereiro de 2016. Disponível em <http://sustentabilidade.sebrae.com.br/portal/site/Sustentabilidade>

SGHAIER, M. B., SKANDRANI, I., NASR, N., FRANCA, M. D., CHEKIR-GHEDIRA, L., & GHEDIRA, K. Flavonoids and sesquiterpenes from *Teucrium ramosissimum* promote antiproliferation of human cancer cells and enhance antioxidant activity: A structure–activity relationship study. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 32, 336–348, 2012.

SHAHIDI, F. Functional foods: their role in health promotion and disease prevention. **Journal of Food Science**, v.69, n.5, p.146-149, 2004.

SHAHIDI, F., CHANDRASEKARA, A. Hydroxycinnamates and their in vitro and in vivo antioxidant activities. **Phytochemistry Review**, 9, 147–170, 2010.

SHAHIDI, F., AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects –A review. **Journal of functional foods**, 18, 820–897, 2015.

SHARONI, Y., LINNEWIEL-HERMONI, K., KHANIN, M., SALMAN, H., VEPRIK, A., DANILENKO, M. Carotenoids and apocarotenoids in cellular signaling related to cancer: A review. **Molecular Nutrition & Food Research**, 56(2), 259–269, 2012.

SILICI, S.; ULUOZLU, O. D.; TUZEN, M.; SOYLAK, M. Assessment of trace element levels in *Rhododendron* honeys of Black Sea Region, Turkey. **Journal of Hazardous Materials**, 1–3, 612–618, 2008.

SILICI, S.; SAGDIC, O.; EKICI, L. Total phenolic content, antiradical, antioxidant and antimicrobial activities of *Rhododendron* honeys. **Food Chemistry**, 121, 238–243, 2010..

SILVA, R.N., MONTEIRO, V.N., ALCANFOR, J.X., ASSIS, E.M., ASQUIERI, E. R. Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. **Ciência Tecnologia de Alimentos** vol.23, no.3, Campinas, Sept./Dec. 2003

SILVA, C.L.; QUEIROZ, A.J.M.; FIGUEIRÊDO, R.M.F. Caracterização físico-química de méis produzidos no Estado do Piauí para diferentes floradas. **Rev Bras Eng Agrícola Ambiental** 2004; 8(2/3):260-5.

SILVA, T.M.S., SANTOS, F.P., EVANGELISTA-RODRIGUES, A., SILVA, E.M.S., SILVA, G.S., NOVAIS, J.S., SANTOS, F.A.R., CAMARA, C.A Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaí'ra (*Melipona subnitida*) honey. **Journal of Food Composition and Analysis**, 29, 10-18, 2013..

SILVA, P.M.; GAUCHE, C.; GONZAGA, L.V.; COSTA, A.C.O.; FETT, R. Honey: Chemical composition, stability and authenticity, **Food Chemistry**, 196,309–323M 2016.

SINGLETON, V. L., ORTHOFER, R., & LAMUELA-RAVENTOS, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, 299, 152–178.

SKIBOLA C F; SMITH M T.Potential health impacts of excessive flavanoid intake, **Free Radical Biology & Medicine**. 29, (3/4) p.375-383. 2000.

SNOW, M.J., MANLEY-HARRIS, M. On the nature of non-peroxide antibacterial activity in New Zealand manuka honey. **Food Chemistry**, 84 ,145–147, 2004.

SOMMER, P.G.O. **Desenvolvimento da apicultura brasileira**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 12. Salvador (BA). Anais de Congresso, p. 173, 1998.

SOMMER, A. (2008). Vitamin A deficiency and clinical disease: A historical overview. **The Journal of Nutrition**, 138(10), 1835–1839, 2008.

SOPO, M.S.; GRECO, M.; MONACO, S.; VARRASI, G.; DI LORENZO, G.; SIMEONE, G. Effect of multiple honey doses on non-specific acute cough in children. An open randomised study and literature review. **Allergologia et Immunopathologia**, 43, 449-455, 2015.

SORIA, A. C., MARTINEZ-CASTRO, I., & SANZ, J. Some aspects of dynamic headspace analysis of volatile components in honey. **Food Research International**, 41, 838–848, 2008.

SOUZA, D. C. (org.). **Apicultura: manual do agente de desenvolvimento rural**. Brasília: SEBRAE, 100 p., 2004.

SPANIK, I.; PAZITNA, A.P.; SISKA, P.; SZOLCSANYI, P. The determination of botanical origin of honeys based on enantiomer distribution of chiral volatile organic compounds. **Food Chemistry**, 158, 497–503, 2014

SPILIOTI, E., JAAKKOLA, M., TOLONEN, T., LIPPONEN, M., VIRTANEN, V., CHINO, I., KASSI, E., KARABOURNIOTI, S., & MOUSATSOS, P. Phenolic acid composition, antiatherogenic and anticancer potential of honeys derived from various regions in Greece. **PLoS ONE**, 9, 1–10, 2014.

STEPHENS, J.M., SCHLOTHAUER, R.C., MORRIS, B.D., YANG, D., FEARNLEY, L., GREENWOOD, D.R., LOOMES, K.M., (2010). Phenolic compounds and methylglyoxal in some New Zealand manuka and kanuka honeys. **Food Chemistry**, 120, 78–86. 2010.

STEPHENSEN, C. B. (2013). Provitamin A carotenoids and immune function. In S. A. Tanumihardjo (Ed.), *Carotenoids and Human Health* (pp. 261–270). Humana Press (Retrieved from http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-62703-203-2_16).

STRUBE, M.; DRAGTETD, L.O.; LARSEN, P.; LARSTEN, J.C. Naturally Occurring Antitumorigens. In: RABAH, T.M.; KHALIL, I.E.; HOWARD, L. Effect of ascorbic acid and dehydration on concentrations of total phenolics, antioxidant capacity, anthocyanins, and color in fruits. **J. of agricult. and Food Chem.**, v.53, p. 444-447, 2005.

SUÁREZ-LUQUE, S.; MATO, I.; HUIDOBRO, J. F.; SIMAL-LOZANO, J.; SANCHO, M. T. Rapid determination of minority organic acids in honey by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, 955, 207–214, 2002

TAVEIRA, M., SILVA, L. R., SILVA-VALE, L. A., PINTO, E., VALENTÃO, P., FERRERES F. (2010) *Lycopersicon esculentum* seeds: An industrial byproduct as an antimicrobial agent. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 58, 9529–9536.

TERRAB, A.; DIEZ, M.J.; HEREDIA, F.J. Palynological, physico-chemical and colour characterisation of Moroccan honeys: I. River red gum (*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh) honey. **International Journal of Food Science and Technology**, 38, 379-386, 2003.

THOMAS-BARBERAN, F.A.; MARTOS, I.; FERRERES, F.; RADOVIC, B.S.; ANKLAM, E.; **Science Food Agricultural**, 81, 485, 2001.

TIRADO, D.J; HUDSON NR; MALDONADO CJ. Efficacy of medical grade honey against multidrug-resistant organisms of operational significance: part I. **J Trauma Acute Care Surg**; 77, 2014

TIWARI, K.; TUDU, B.; BANDYOPADHYAY,; CHATTERJEE, A.; Identification of monofloral honey using voltammetric electronic tongue. **Journal of Food Engineering**, 117, 205–210, 2013.

TOMASIK, P.(2004) **Chemical and Functional Properties of Food**. Cap 6. Helena Rybak-Chmielewska, p. 77.

TURCSIA, E.; NAGYA, V.; DELIA, J. A review: Study on the elution order of carotenoids on endcapped C18 and C30 reverse silica stationary phases. **Journal of Food Composition and Analysis**, 47, 101–112, 2016.

VAIKOUSI, H.; KOUTSOUMANIS, K.; BILIADERIS, C.G. Kinetic modelling of nonenzymatic browning in honey and diluted honey systems subjected to isothermal and dynamic heating protocols. **Journal of Food Engineering**, 95, 541–550, 2009.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. **MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA**. Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas - CP 6154 - 13083-970-Campinas, SP, 2000.

VAN DEN BERG, A J., VAND DEN WORM, E., VAN UFFORD, H C., HALKES, S B., HOEKSTRA, M J., BEUKELMAN, C J .An in vitro examination of the antioxidant and anti-inflammatory properties of buckwheat honey. **Journal of Wound Care**, 17, 172-4, 176-8, 2008.

VANDAMME,L., HEYNEMAN, A., HOEKSEMA,H.,VERBELEN,J., MONSTREY,S. Honey in modern wound care: A systematic review. **Burns**, 39, 1514-1525, 2013.

VELAZQUEZ et al., (2003) VELAZQUEZ, E., TOURNIER, H. A., MORDUJOVICH de BUSCHIAZZO, P., SAAVEDRA, G., SCHINELLA, G.R., Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. **Fitoterapia**, v.74, p.91-97, 2003.

VENTURINI, K. S.; SARCINELLI, M. F.; SILVA, L. C. **Características do mel**. Vitória: UFES, p 1-8 (Boletim Técnico –PIE-UFES: 01107), 2007.

VERZERA, A., CAMPISI, S., ZAPPALÀ, M., & BONACCORSI, I. (2001). SPME-GC-MS analysis of honey volatile components for the characterization of different floral origin. **American Laboratory**, 33, 18-21, 2001.

VISAVADIA, B.G., HONEYSETT, J., DANFORD, M.H. Short communication Manuka honey dressing: An effective treatment for chronic wound infections. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, 46, 55–56, 2008.

VOIDAROU, C., ALEXOPOULOS, A., PLESSAS, S., KARAPANOU A., MANTZOURANI I., STAVROPOULOU, E., FOTOU K., TZORA A., SKOUFOS, I., BEZIRTZOGLU, E. Antibacterial activity of different honeys against pathogenic bacteria. **Anaerobe**, 17, 375 – 379, 2011.

WATANABE, K., RAHMASARI, R., MATSUNAGA, A., KOBAYASHI, N. (2014). Anti-influenza viral effects of honey in vitro: Potent High Activity of Manuka Honey. **Archives of Medical Research**, 45. 359-365, 2014.

WILCZYNSKA, A.. Effect of filtration on colour, antioxidant activity and total phenolics of honey. **LWT - Food Science and Technology**, 57 , 767-774, 2014.

WOISKY, R., SALATINO, A.. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **J. Apiculture Research** 37, 99–105, 1988.

YAGHOUBI, R, KAZEROUNI, A, KAZEROUNI, O. Evidence for clinical use of honey in wound healing as an anti-bacterial, anti-inflammatory anti-oxidant and anti-viral agent: a review. **Jundishapur J Nat Pharm Prod** 8(3):100 e 4. 2013.

YAO, L., DATTA, N., TOMAS-BARBERAN, F.A., Flavonoids, phenolic acids and abscisic acid in Australian and New Zealand *Leptospermum honeys*. **Food Chemistry**, 81(2): 159-168. 2003.

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

YUCEL, Y.; SULTANOG˘LU, P. Determination of industrial pollution effects on citrus honeys with chemometric approach. **Food Chemistry**, 135, 170–178, 2012.

ZANDER, E. Beitrage zur Herkunftsbestimmung bei Honig. Verlag der Reichs fach gruppe Imker E.V., Berlim, 1935.

Apêndice

Apêndice 1 - Relação entre o índice de refração e a porcentagem de água dos méis

Índice de refração a 20°C	Umidade %	Índice de refração a 20°C	Umidade %	Índice de refração a 20°C	Umidade %	Índice de refração a 20°C	Umidade %
1,5044	13,0	1,4961	16,2	1,4880	19,4	1,4800	22,6
1,5038	13,2	1,4956	16,4	1,4875	19,6	1,4795	22,8
1,5033	13,4	1,4951	16,6	1,4870	19,8	1,4790	23,0
1,5028	13,6	1,4946	16,8	1,4865	20,0	1,4785	23,2
1,5023	13,8	1,4940	17,0	1,4860	20,2	1,4780	23,4
1,5018	14,0	1,4935	17,2	1,4855	20,4	1,4775	23,6
1,5012	14,2	1,4930	17,4	1,4850	20,6	1,4770	23,8
1,5007	14,4	1,4925	17,6	1,4845	20,8	1,4765	24,0
1,5002	14,6	1,4920	17,8	1,4840	21,0	1,4760	24,2
1,4997	14,8	1,4915	18,0	1,4835	21,2	1,4755	24,4
1,4992	15,0	1,4910	18,2	1,4830	21,4	1,4750	24,6
1,4987	15,2	1,4905	18,4	1,4825	21,6	1,4745	24,8
1,4982	15,4	1,4900	18,6	1,4820	21,8	1,4740	25,0
1,4976	15,6	1,4895	18,8	1,4815	22,0	-	-
1,4971	15,8	1,4890	19,0	1,4810	22,2	-	-
1,4966	16,0	1,4885	19,2	1,4805	22,4	-	-

Nota: na correção do índice de refração para temperatura diferente de 20°C.

- Adicione 0,00023 ao índice de refração para cada grau acima de 20°C.
- Subtraia 0,00023 do índice de refração para cada grau abaixo de 20°C.