

FABÍOLA CARINA BILUCA

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E BIOATIVA DE MÉIS DE  
ABELHAS SEM FERRÃO (*Meliponinae*) PRODUZIDOS NO  
ESTADO DE SANTA CATARINA

Tese submetida ao Programa de  
Pós-Graduação em Ciência dos  
Alimentos da Universidade  
Federal de Santa Catarina para  
a obtenção do título de Doutora  
em Ciência dos Alimentos sob a  
orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>.  
Roseane Fett.

Florianópolis, 2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Biluca, Fabíola Carina  
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E BIOATIVA DE MÉIS DE  
ABELHAS SEM FERRÃO (Meliponinae) PRODUZIDOS NO  
ESTADO DE SANTA CATARINA : CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E  
BIOATIVA DE MÉIS DE ABELHAS SEM FERRÃO (Meliponinae)  
PRODUZIDOS NO ESTADO DE SANTA CATARINA / Fabíola  
Carina Biluca ; orientador, Roseane Fett, 2018.  
180 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de  
Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Florianópolis,  
2018.

Inclui referências.

1. Ciência dos Alimentos. 2. Mel. 3. abelhas sem  
ferrão. 4. Composição química. 5. Ciência dos  
Alimentos . I. Fett, Roseane . II. Universidade  
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação  
em Ciência dos Alimentos. III. Título.

## **DEDICATÓRIA**

*Aos meus amados pais,  
Agostinho e Classi Biluca,  
por todo amor, carinho,  
compreensão, incentivo e fé  
que me fez ir em busca dos meus ideais  
e chegar tão longe.  
Meus grandes exemplos de vida!*



## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, ao senhor meu Deus!! Agradeço por me proteger, guiar, abençoar e por me presentear com pessoas iluminadas e ótimas oportunidades. Em especial, para a conclusão desta importante etapa, gostaria de agradecer:

Aos meus pais, Agostinho Biluca e Classi Biluca, pelo grande amor recebido e ensinado, pela dedicação, carinho, cuidados e educação, e principalmente, por sempre acreditarem em mim e me dar todo o apoio necessário para nunca desistir. Apesar de longe estou sempre pensando em vocês, me esforçando e me dedicando cada dia mais para dar alegrias a vocês. Amo vocês!

Ao meu irmão Francis e minha querida cunhada Raquel, por serem base e apoio, por serem firmes e abrigo, por estarem sempre lá (casa, Anchieta-SC) todas as vezes que retornei para ganhar um abraço. Agradeço ainda mais por serem família e por me proporcionar a grande FELICIDADE de ser titia do nosso príncipe Martín. Amo muito vocês!

A minha melhor amiga e fiel companheira, minha irmã Leonela, agradeço por sempre estar ao meu lado, por todos os momentos lindos vividos e compartilhados. Sou muito mais feliz quando estou com você, porque tudo fica mais bonito! Te amo!

A toda minha gigante e maravilhosa família por rezarem, torcerem e se orgulharem sempre de mim. Obrigada!

A professora Dra. Roseane Fett, minha orientadora, obrigada por me acolher com tanto carinho e alegria. Agradeço pela confiança, apoio e oportunidade em participar do seu grupo de pesquisa.

Os profissionais do grupo de pesquisa do Laboratório de Química de Alimentos (LabQA), a professora Dra. Ana Carolina de Oliveira Costa e ao Luciano V. Gonzaga. Agradeço pelas vezes em que me ouviram, pelas sugestões dadas, pelas palavras certas, apoio, amizade, e por todos ensinamentos passados. Luciano, meu muito obrigada por toda sua dedicação e paciência, pelo seu enorme conhecimento transmitido, pelas suas idéias, contribuições e a participação fundamental para o desenvolvimento deste trabalho de pesquisa. Obrigada por acreditar e confiar em mim.

Aos demais membros do LabQA, que se tornaram mais que colegas, meus amigos, obrigada pela amizade, aprendizado e a feliz convivência diária! Agradeço cada docinho compartilhado, a caminhada foi mais leve tendo todos vocês comigo: Priscila. M., Roberta, Mayara, Greici, Bruno, Francieli, Siluana Patrícia, Bibiana, Mônia, Priscila. N., Fabiana e Ana Luiza. Em especial, a minha colega de estudo de méis e abelhas sem ferrão Francieli Braghini, você faz parte deste trabalho, não tenho palavras

para agradecer cada minuto dedicado de nossa convivência e troca de experiências e principalmente, por tornar leve cada dia de trabalho intenso.

A minha família construída em Florianópolis, Saionara e Greici. Obrigada por dividirem os cafés da manhã, por tomar chima, por trocar a lâmpada de luz que eu não alcançava, por lavar a louça depois do almoço, pelas risadas, mas principalmente, por serem amor, pelas muitas palavras de carinho e apóio, pelo incondicional incentivo. Obrigada por me fazerem tão feliz nessa jornada que caminhamos juntas. Amo vocês!

O amor e a amizade de Priscila. M, Roberta e Laura, vocês iluminaram meu caminho. Deus é bom pra mim e me deu vocês de presente para a vida toda. Eternamente amo vocês!

A todos os amigos que fizeram minha vivência em Florianópolis mais fácil: Trilícia, Leidiane. A., Alan, Neto, Rafael, Bernardo, Japa, Lucas, Cristian, Raphael. L., Roque e Victor. G. Aos amigos que mesmo longe mandam sempre energias boas para que eu continuasse: Jéssica, Ale, Julia, Nathi, Duh, Edinéia, Ellen e Igor. Obrigada pela cumplicidade, amizade, companheirismo, alegrias, risadas, estadias, por toda ajuda em qualquer situação, enfim, por todos os momentos vividos intensamente.

Ao professor Dr. José Luis Bernal del Nozal, por me receber no Laboratório de Técnicas de Separación y Análisis Aplicado (TESEA), junto ao grupo de Química Analítica Aplicada da Universidade de Valladolid, Valladolid, Espanha, pela confiança depositada para a realização de parte deste trabalho e por todos os valiosos ensinamentos ao longo do estágio de doutoramento. Essa etapa foi essencial para o meu crescimento pessoal e profissional. A todos do TESEA. Muchísimas gracias!!

À professora Dra. Tania Ueda Nakamura e a aluna doutoranda Larissa Valone, por ter me recebido no Laboratório de Microbiologia Aplicada a Produtos Naturais e Sintéticos, da Universidade Estadual de Maringá. Obrigada pelo apoio técnico e pelo conhecimento sobre estudos com células.

Ao Professor Dr. Luciano Vitali, por me receber no LabEC/UFSC. Obrigada pelo apoio técnico e pelos conhecimentos passados. Agradeço também ao professor Dr. Daniel Borges e ao Dr. Jefferson pelas muitas tardes de análises no laboratório LARES/UFSC, pelo apoio técnico e pelos ensinamentos.

Aos meliponicultores pela contribuição das amostras, ensinamentos e, principalmente, por acreditarem na pesquisa: Carlos A. Paganini, Cleumar Liebert, Pedro Faria Gonçalves e a Associação de Meliponicultores da Encosta da Serra, AMESG.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos pela estrutura física e profissional.

À coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.

Biluca, F. C. **Caracterização química e bioativa de méis de abelhas sem ferrão (*Meliponinae*) produzidos no estado de Santa Catarina.** 2018. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 188p.

## RESUMO

As abelhas *Meliponinae*, conhecidas como abelhas sem ferrão, ou do inglês *stingless bee*, produzem méis, que são, há muitos anos utilizados pela população devido às suas características peculiares, relacionadas a propriedades nutricionais, sensoriais e medicinais. Apesar os conhecimentos culturais envolvendo os méis de abelhas sem ferrão, os estudos realizados para avaliar seu verdadeiro potencial ainda são escassos. Com o propósito de buscar novos dados e auxiliar nas pesquisas científicas em relação aos méis de abelhas sem ferrão, o objetivo deste estudo foi: avaliar as características físico-químicas e a capacidade antioxidante, investigar a bioacessibilidade *in vitro* dos macro e micro elementos minerais, determinar a composição de compostos fenólicos, glucosinolatos, sulforafano e aminoácidos livres em amostras de méis de abelhas sem ferrão (*Meliponinae*) produzidos no estado de Santa Catarina, Brasil. Os resultados obtidos apontaram méis de abelhas sem ferrão com níveis de umidade que variam de 23,74 a 43,53% (m/m); sólidos solúveis de 55,16 a 75,00 °Brix; acidez livre de 21,36 a 106,01 mEq kg<sup>-1</sup>; pH de 3,33 a 4,56; atividade diastásica de < 3 a 13,40 um Göthe; condutividade elétrica de 0,16 a 0,84 mS cm<sup>-1</sup>; açúcares: frutose de 30,44 a 46,02% (m/m) e glicose de 20,41 a 31,31% (m/m); já para sacarose e 5-HMF, os teores foram abaixo dos limites de quantificação (LOQ = 0,074 e 0,310 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente) para todas as amostras estudadas. Foram observados valores consideráveis no conteúdo de compostos fenólicos totais (10,39 a 45,56 mg EAG 100 g<sup>-1</sup>) e atividade antioxidante (DPPH 1,41 a 13,95 mg EAA 100 g<sup>-1</sup> e FRAP 67,49 a 474,61 µmol Fe II 100 g<sup>-1</sup>). Tais resultados evidenciam que os méis de abelhas sem ferrão são distintos dos méis de abelhas *Apis Mellifera*, portanto, não recebe respaldo da legislação vigente, indicando assim, a necessidade de fixação de parâmetros específicos de identidade e qualidade os quais poderiam permitir adequação dos méis de abelhas sem ferrão à comercialização. Os resultados evidenciaram a presença predominante de potássio (261,53- 4984,01 µg g<sup>-1</sup>), seguido de cálcio (137,90 - 188,67 µg g<sup>-1</sup>), magnésio (25,94- 231,02 µg g<sup>-1</sup>), sódio (12,73-

260,78  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) e níveis traços de Fe, Cu, Co, Zn, Mn, Se, Al, Cd, Ni, Pb e Li) com valores inferiores a 12  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Na avaliação de bioacessibilidade *in vitro* dos minerais, foram encontradas altas percentagens (74 a 107,32%) de minerais bioacessíveis. Foram detectados 28 compostos fenólicos nas amostras, dentre eles, os principais foram ácido salicílico (6,0 - 94,8  $\mu\text{g 100 g}^{-1}$ ), ácido *p*-cumárico (4,0 - 110,1  $\mu\text{g 100 g}^{-1}$ ), aromadentrina (7,9 - 337,3  $\mu\text{g 100 g}^{-1}$ ) e taxifolina (12,0 - 1910  $\mu\text{g 100 g}^{-1}$ ). Além disso, a presença de ácido mandélico, ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido rosmarínico, aromadendrina, isoquercetrina, eriodictilol, vanilina, umbeliferona, siringaldeído, sinapaldeído e carnosol foram relatados pela primeira vez em méis de abelhas sem ferrão. Na investigação de glucosinolatos e sulforafano, os compostos não foram encontrados em nenhuma das amostras estudadas. Os aminoácidos quantificados na maioria das amostras de méis de abelhas sem ferrão foram prolina, fenilalanina, tirosina, alanina e valina, contudo, os aminoácidos com maior concentração foram prolina (12,1 - 762  $\text{mg kg}^{-1}$ ), fenilalanina (0,421 - 592  $\text{mg kg}^{-1}$ ) e glutamina (< LOD - 605  $\text{mg kg}^{-1}$ ). Além disto, a determinação de aminoácidos pode representar uma estratégia analítica para autenticação com relação à discriminação geográfica.

**Palavras-chave:** Mel, Abelhas sem ferrão, Fenólicos, Glucosinolatos; Bioacessibilidade de minerais, Aminoácidos.

## ABSTRACT

*Meliponinae* bees, known as stingless bees, produce honeys, which for many years have been used by the population due to their peculiar characteristics related to nutritional, sensorial and medicinal properties. Despite this culture involving honeybees without sting, studies carried out to assess their true potential are still scarce. With the purpose of searching for new data and assisting in scientific research regarding stingless bee honeys, the objective of this study was: to evaluate the physicochemical characteristics and antioxidant capacity, to investigate the in vitro bioaccessibility of macro and micro mineral elements, to determine the composition of phenolic compounds, glucosinolates, sulforaphane and free amino acids from samples of honeybees without sting (*Meliponinae*) produced in the state of Santa Catarina, Brazil. Stingless bee honeys had moisture content varying from 23.74 to 43.53% (m/m); soluble solids of 55.16 to 75.00 °Brix; free acidity from 21.36 to 106.01 mEq kg<sup>-1</sup>; pH of 3.33 to 4.56; diastase activity <3 to 13.4 un Göthe; electrical conductivity of 0.16 to 0.84 mS cm<sup>-1</sup>; sugars: fructose from 30.44 to 46.02% (m/m) and glucose from 20.41 to 31.31% (m/m); for sucrose and 5-HMF, the contents were below the limits of quantification (LOQ = 0.074 and 0.310 mg L<sup>-1</sup>, respectively) for all samples studied. The values of total phenolic compounds (10.39 to 45.56 mg EAG 100 g<sup>-1</sup>) and antioxidant activity (DPPH 1.41 to 13.95 mg EAA 100 g<sup>-1</sup> and FRAP 67.49 to 474.61 µmol Fe II 100 g<sup>-1</sup>). These results show that bee honeys without sting are distinct from *Apis Mellifera* honeys, therefore, it does not receive support from current legislation, thus pointing to the need to set specific parameters of identity and quality which could enable the bee honeys to be adapted without sting to the commercialization. The results showed a predominance of potassium (4984.01- 261.53 µg g<sup>-1</sup>), followed by calcium (137.90 – 88.67 µg g<sup>-1</sup>), magnesium (231.02 - 25.94 µg g<sup>-1</sup>, Fe, Cu, Co, Zn, Mn, Se, Al, Cd, Ni, Pb and Li) with values lower than 12 µg g<sup>-1</sup>. In the evaluation of in vitro bioaccessibility of minerals, high percentages (74 to 107.32%) were found, indicating a high mineral bioaccessibility. The study revealed the presence of 28 phenolic compounds in samples of stingless bees, among them the salicylic acid (6.0 - 94.8 µg 100 g<sup>-1</sup>), *p*-coumaric acid (4.0 - 110.1 µg 100 g<sup>-1</sup>), aromadentrine (7.9 - 337.3 µg 100 g<sup>-1</sup>) and taxifoline (12.0 - 1910 µg 100 g<sup>-1</sup>). In addition, the presence of mandelic acid, caffeic acid, chlorogenic acid, rosmarinic acid, aromadendrin, isoquercetrine, eriodictilol, vanillin, umbelliferone, syringaldehyde, sinapaldehyde and

carosol were first reported in honeys without sting. In the investigation of glucosinolates and sulforaphane, the compounds were not found in any of the studied samples. The amino acids quantified in most samples of stingless bees were proline, phenylalanine, tyrosine, alanine and valine; however, the amino acids at highest concentration were proline (12.1 - 762 mg kg<sup>-1</sup>), phenylalanine (0.421-592 mg kg<sup>-1</sup>) and glutamine (<LOD - 605 mg kg<sup>-1</sup>). In addition, amino acid determination may represent an analytical strategy for authentication with respect to geographical discrimination.

**Keywords:** Honey, Stingless bees, Phenolic, Glucosinolates; Bioaccessibility of minerals, Amino acids.

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

- Figura 1.1 Mapa ilustrativo da distribuição geográfica mundial das abelhas sem ferrão (*Meliponinae*). 26
- Figura 1.2 Representação das principais características morfológicas das abelhas sem ferrão, destacando cada gênero: *Meliponini* e *Trigonini*. 27
- Figura 1.3 Representação da estrutura física da colmeia de abelhas sem ferrão (*Meliponinae*) com favos de cria e potes contendo mel e pólen, bem como imagens de batumes de algumas espécies (nomes populares) encontradas no Brasil. 30

### Capítulo 3

- Figura 3.1 Representação esquemática do método *in vitro* empregado para determinação de bioacessibilidade dos minerais em amostras de méis de abelhas sem ferrão (*Meliponinae*). 104
- Figura 3.2 Comparação da fração bioacessível em relação à concentração total de a- K, b - Ca e c -Mg dos méis de abelhas sem ferrão (*Meliponinae*). 111
- Figura 3.3 Comparação da fração bioacessível em relação à concentração total de a- Fe, b- Mn, c- Cu, d- Zn e- Co dos méis de abelhas sem ferrão (*Meliponinae*). 113
- Figura 3.4 Comparação da fração bioacessível em relação à concentração total de a- Al, b- Ba, c- Ni e d- Li dos méis de abelhas sem ferrão (*Meliponinae*). 114

### Capítulo 4

- Figura 4.1 Cromatograma representativo da identificação de compostos fenólicos por LC-ESI-MS/MS a partir de uma amostra de mel de abelha sem ferrão (amostra A1). 139
- Figura 4.2 Cromatograma representativo da investigação de glicosinolatos por UHPLC-qTOF-MS obtido a 142

partir de uma amostra de mel de abelha sem ferrão (amostra H).

Figura 4.3 Cromatograma representativo da investigação de sulforafano por HPLC-ESI-MS, a) Cromatograma obtido a partir de uma amostra de mel de abelha sem ferrão (amostra D). 142

## Capítulo 5

Figura 5.1 Análise de componentes principais para aminoácidos livres em méis de abelhas sem ferrão (*Meliponinae*) de diferentes cidades do Estado de Santa Catarina, Brasil. 160

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

Tabela 1.1	Estudos já relatados dos parâmetros de identidade e qualidade do mel de abelhas sem ferrão ( <i>Meliponinae</i> ) comparado ao mel de abelha <i>Apis Mellifera</i> (legislação).	33
Tabela 1.2	Compostos fenólicos presentes em méis de abelhas sem ferrão ( <i>Meliponinae</i> ).	44

### Capítulo 2

Tabela 2.1	Identificação das espécies de abelhas sem ferrão ( <i>Meliponinae</i> ), origem botânica e municípios de origem das amostras.	74
Tabela 2.2	Características de identidade e qualidade determinadas nas amostras de méis de abelhas sem ferrão ( <i>Meliponinae</i> ).	79
Tabela 2.3	Conteúdo de 5-HMF e atividade diastásica determinados nas amostras de méis de abelhas sem ferrão ( <i>Meliponinae</i> ).	84
Tabela 2.4	Conteúdos em % (m/m) de frutose, glicose e sacarose encontradas nas amostras de méis de abelhas sem ferrão ( <i>Meliponinae</i> ).	86
Tabela 2.5	Resultados obtidos para compostos fenólicos totais, capacidades antioxidantes por captura de radical (DPPH) e redução férrica (FRAP) em amostras de mel de abelhas sem ferrão ( <i>Meliponinae</i> ).	89

### Capítulo 3

Tabela 3.1	Identificação das espécies de abelhas sem ferrão ( <i>Meliponinae</i> ) e descrição geográfica dos municípios de origem das amostras.	102
Tabela 3.2	Concentração total ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) de K, Ca, Na e Mg para mel de abelhas sem ferrão ( <i>Meliponinae</i> ).	106
Tabela 3.3	Concentração total ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) de Fe, Co, Cu, Zn e Mn para méis de abelhas sem ferrão ( <i>Meliponinae</i> ).	107

Tabela 3.4	Concentração total ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) de Al, Ba, Ni e Li para mel de abelhas sem ferrão ( <i>Meliponinae</i> ).	109
------------	---	-----

#### Capítulo 4

Tabela 4.1	Identificação das espécies de abelhas sem ferrão ( <i>Meliponinae</i> ), origem botânica e municípios de origem das amostras estudadas.	129
Tabela 4.2	Quantificação de compostos fenólicos (ácidos fenólicos $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ) em méis produzidos por abelhas sem ferrão ( <i>Meliponinae</i> ).	133
Tabela 4.3	Quantificação de compostos fenólicos (flavonóides $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ) em méis produzidos por abelhas sem ferrão ( <i>Meliponinae</i> ).	135
Tabela 4.4	Quantificação de compostos fenólicos (outros grupos $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ) em méis produzidos por abelhas sem ferrão ( <i>Meliponinae</i> ).	137

#### Capítulo 5

Tabela 5.1	Identificação das espécies de abelhas sem ferrão ( <i>Meliponinae</i> ), municípios de origem e origem botânica dos méis estudados.	154
Tabela 5.2	Condições de gradiente cromatográfico.	155
Tabela 5.3	Concentração média ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) de aminoácidos livres encontrados em amostras de méis de abelhas sem ferrão ( <i>Meliponinae</i> ).	158

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5 - HMF	5- hidroximetilfurfural
AI	Ingestão adequada (do <i>inglês</i> , <i>Adequate Intake</i> )
AAS	Espectrometria de absorção atômica (do <i>inglês</i> , <i>Atomic Absorption Spectrometry</i> )
ANOVA	Análise de variância
CZE	Eletroforese capilar de zona (do <i>inglês</i> , <i>capillary zone electrophoresis</i> )
CE	Eletroforese capilar (do <i>inglês</i> , <i>capillary electrophoresis</i> )
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
DAD	Detector de arranjo de diodos (do <i>inglês</i> , <i>diode array detector</i> )
DPR	Desvio padrão relativo
DRI	Ingestão dietética de referência (do <i>inglês</i> , <i>dietary reference intakes</i> )
EAA	Equivalentes a ácido ascórbico
EAG	Equivalentes a ácido gálico
EAR	Estimativa de requerimento médio (do <i>inglês</i> , <i>stimated average requirement</i> )
EPAGRI	Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina
ESI	Ionização por eletrospray (do <i>inglês</i> , <i>electrospray ionization</i> )
FMOC-Cl	Cloroformiato de 9-fluorenilmetila
F/G	Razão frutose/glicose
FRAP	Poder de redução do ferro (do <i>inglês</i> , <i>ferric reducing antioxidant potential</i> )
GC/MS	Cromatografia a gás acoplada ao espectrômetro de massas (do <i>inglês</i> , <i>gas chromatography mass spectrometry</i> )
G/U	Glicose/umidade
HR-CS AAS	Espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (do <i>inglês</i> , <i>high resolution continuum source atomic absorption spectrometry</i> )
ICP-MS	Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (do <i>inglês</i> , <i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i> )
ICP-OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (do <i>inglês</i> , <i>inductively</i>

	<i>coupled plasma optical emission spectrometry</i> )
IR	Índice de refração
HPLC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (do <i>inglês</i> , <i>liquid chromatography - tandem mass spectrometry</i> )
LOQ	Limite de quantificação (do <i>inglês</i> , <i>limit of quantification</i> )
LOD	Limite de detecção (do <i>inglês</i> , <i>limit of detection</i> )
m/m	Razão massa/massa
m/v	Razão massa/volume
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mbar	Milibar
MEKC	Cromatografia eletrocinética micelar capilar (do <i>inglês</i> , <i>micellar electrokinetic chromatography</i> )
mEq	Miliequivalente
mS	MiliSiemens
HPTLC	Cromatografia em camada fina de alto desempenho ( <i>high performance thin layer chromatography</i> )
OMS	Organização Mundial da Saúde
PTWI	Dose semanal tolerável provisória (do <i>inglês</i> , <i>provisional tolerable Weekly Intake</i> )
PC	Componente principal, do inglês principal component
ACP	Análise de componentes principais (do inglês, <i>principal component analysis</i> )
RDA	Ingestão dietética recomendada (do <i>inglês</i> , <i>recommended dietary allowance</i> )
R <sup>2</sup>	Coefficiente de determinação
SDS	Dodecil-sulfato de sódio
TBS	Tetraborato de sódio
TPTZ	2,4,6-tripiridil-triazina
TESEA	Técnicas de Separación y Análisis Aplicado
UL	Limite superior tolerável de ingestão (do <i>inglês</i> <i>tolerable upper intake level</i> )
Un.	Unidade (s)
UHPLC– qTOF-MS	Cromatografia líquida de ultra alta eficiência, com analisador por tempo-de-voo e um espectrometro de massas (do <i>inglês</i> , <i>ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry</i> )

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b>	21
<b>CAPÍTULO 1- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	25
<b>1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	26
<b>1.1 Abelhas sem ferrão (Meliponinae)</b>	26
<b>1.2 Méis de abelhas sem ferrão</b>	31
<b>1.3 Mel: definição, classificação e parâmetros de identidade e qualidade</b>	33
1.3.1 Definição e classificação	33
1.3.2 Parâmetros de identidade e qualidade dos méis	34
<b>1.4 Compostos de relevância nutricional e bioativa de mel</b>	40
1.4. 1 Compostos fenólicos e capacidade antioxidante.	40
1.4. 2 Glicosinolatos e sulforafano	45
1.4. 3 Minerais	46
1.4.4 Aminoácidos	50
<b>REFERÊNCIAS</b>	52
<b>CAPÍTULO 2- MEL DE ABELHAS SEM FERRÃO (Meliponinae): IDENTIDADE E QUALIDADE, COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE</b>	69
<b>RESUMO</b>	70
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	71
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b>	72
<b>2.1 Material</b>	72
<b>2.2 Amostras</b>	73
<b>2.3 Parâmetros de identidade e qualidade</b>	75
2.3.1 Umidade	75
2.3.2 Sólidos solúveis totais	75
2.3.3 Condutividade elétrica	75
2.3.4 Acidez livre e pH	75
2.3.5 Açúcares	75
2.3.6 5- Hidroximetilfulfural	76
2.3.7 Atividade diastásica	76
<b>2.4 Compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante em mel</b>	77

<b>2.5 Análise estatística</b>	78
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	78
<b>3.1 Parâmetros de identidade e qualidade</b>	80
3.1.1 Umidade	81
3.1.2 Sólidos solúveis totais	81
3.1.3 Condutividade elétrica	81
3.1.4 Acidez livre e pH	82
3.1.5 5- Hidroximetilfulfural e atividade diastásica	83
3.1.6 Açúcares	85
<b>3.2 Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante</b>	88
<b>4 CONCLUSÃO</b>	91
<b>REFERÊNCIAS</b>	92
<b>CAPÍTULO 3- DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MINERAL TOTAL E BIOACESSÍVEL DE MEL DE ABELHAS SEM FERRÃO (<i>Meliponinae</i>)</b>	97
<b>RESUMO</b>	98
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	99
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b>	100
<b>2.1 Reagentes e soluções</b>	100
<b>2.2 Instrumentação</b>	101
<b>2.3 Amostras de méis de abelhas sem ferrão</b>	101
<b>2.4 Preparo da amostra para análise de minerais</b>	103
<b>2.5 Bioacessibilidade de minerais</b>	103
<b>2.6 Cálculo da bioacessibilidade (%)</b>	104
<b>2.7 Análises estatísticas</b>	105
<b>3- RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	105
<b>3.1 Composição elementar total das amostras de méis de abelhas sem ferrão</b>	105
3.1.1 Macrominerais	105
3.1.2 Microminerais	107
3.1.3 Metais	109
<b>3.2 Bioacessibilidade em méis de abelhas sem ferrão</b>	110
3.2.1 Bioacessibilidade de macrominerais	111
3.2.2 Bioacessibilidade de microminerais	112
3.2.3 Bioacessibilidade de metais	114
<b>4 CONCLUSÃO</b>	116
<b>REFERENCIAS</b>	117

<b>CAPÍTULO 4 COMPOSTOS BIOATIVOS EM MÉIS DE ABELHAS SEM FERRÃO (<i>Meliponinae</i>): COMPOSTOS FENÓLICOS, GLUCOSINOLATOS E SULFORAFANO</b>	123
<b>RESUMO</b>	124
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	125
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b>	126
<b>2.1 Reagentes e soluções</b>	126
<b>2.2 Amostras</b>	127
<b>2.3 Preparo das amostras</b>	131
<b>2.4 Instrumentação para análises dos compostos fenólicos</b>	131
<b>2.5 Instrumentação para análises de glucosinolatos e sulforafano</b>	132
<b>2.6 Análise estatística</b>	132
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	132
<b>3.1 Compostos fenólicos</b>	132
<b>3.2 Glucosinolatos e sulforafano</b>	141
<b>4 CONCLUSÃO</b>	143
<b>REFERÊNCIAS</b>	144
<b>CAPÍTULO 5 - DETERMINAÇÃO DE AMINOÁCIDOS LIVRES EM MÉIS DE ABELHAS SEM FERRÃO (<i>Meliponinae</i>)</b>	149
<b>RESUMO</b>	150
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	151
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b>	152
<b>2.1 Reagentes e soluções</b>	152
<b>2.2 Amostras</b>	153
<b>2.3 Preparo de amostra</b>	154
<b>2.4 Instrumentação</b>	155
<b>2.5 Limites de detecção, quantificação e exatidão</b>	156
<b>2.6 Análises estatísticas</b>	156
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	157
<b>4 CONCLUSÃO</b>	161
<b>REFERÊNCIAS</b>	162
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	165
<b>APÊNDICE</b>	167
<b>ANEXO</b>	171



## INTRODUÇÃO

*Meliponinae*, popularmente conhecidas como abelhas sem ferrão, é o grupo mais diversificado de abelhas encontrado em países tropicais e subtropicais, sendo o subtipo mais abundante de abelhas na Terra (MICHENER, 2000). São reconhecidas por oferecerem benefícios ecológicos graças à eficiência na polinização e pela produção de mel, pólen, própolis e geopropolis, que possuem características específicas reconhecidas na medicina popular tradicional e na alimentação humana (mel e pólen) (RANNEH et al., 2018; YAACOB et al., 2018).

As abelhas sem ferrão são divididas em três tribos, *Meliponini*, *Trigonini* e as *Lestrimelittini*, possuem diferenças das abelhas *Apis mellifera*, quanto a hábitos e morfologia, dentre as quais, destacam-se a coleta de néctar de plantas rasteiras, revoadas curtas para buscar alimento, colmeias em sentido horizontal e não formam favos para a reserva de alimento (formam potes). Devido à ausência do ferrão ou por possuírem ferrão atrofiado, não são agressivas ao homem e, por isso, sua criação pode ser localizada próximo à residência, podendo ser manejadas por pessoas de várias idades, não exigindo roupas e equipamentos especiais e, assim, resultando em baixos custos de produção (NOGUEIRA-NETO, 1997; GUERRINI et al., 2009; VILLAS-BÔAS, 2012).

Em razão das diferenças na morfologia, estrutura de colmeia e de manejo, os produtos elaborados pelas abelhas sem ferrão apresentam diferenças na composição (VIT; PEDRO; ROUBIK, 2013) quando comparados aos produtos produzidos por abelhas *Apis mellifera*. A composição dos méis de abelhas sem ferrão é distinta principalmente por suas características sensoriais, como cor e sabor, propriedades físicas, tais como viscosidade, e composição química, uma vez que, em sua maioria apresenta elevado teor de umidade e acidez e um baixo teor de açúcares (CHUTTONG, 2016 a, b; De SOUSA et al., 2016).

Os méis de abelhas sem ferrão também apresentam em sua composição, compostos em menores concentrações tais como compostos fenólicos (Da SILVA et al., 2013; PÉREZ-PÉREZ et al., 2013; SILVA et al. 2013; SOUSA et al., 2016; RANNEH et al., 2018), proteínas (RAMÓN-SIERA et al., 2016), minerais (De OLIVEIRA et al., 2017) e demais elementos traços com importantes funções biológicas (RAO et al., 2016). Estes compostos podem atribuir ao mel características potenciais de propriedades funcionais, fornecendo benefícios adicionais à saúde, além de suas funções nutricionais básicas (RAO et al., 2016; YAACOB et al., 2018). Alguns desses compostos

também são comumente utilizados para discriminação botânica e geográfica entre tipos de méis (RAMÓN-SIERRA et al., 2016; Da SILVA et al., 2017; Da COSTA et al., 2018).

No entanto, os estudos que caracterizam esses méis são relativamente recentes e insuficientes para estabelecer sua identidade e padrões de qualidade. A falta de dados prejudica a competitividade desses méis no mercado nacional e internacional, tornando-o um produto com alto valor de comercialização, mercado informal e propício às fraudes.

O objetivo do estudo foi avaliar as características físico-químicas, capacidade antioxidante, bioacessibilidade *in vitro* dos macro e micros elementos minerais, perfil majoritário de compostos fenólicos, glucosinolatos, sulforafano e aminoácidos livres de amostras de méis de abelhas sem ferrão (*Meliponinae*) produzidos no estado de Santa Catarina, Brasil.

A fim de contemplar todos os aspectos supracitados, este trabalho está estruturado da seguinte forma:

Capítulo 1- Revisão Bibliográfica. Apresenta uma breve revisão sobre as espécies de abelhas sem ferrão (*Meliponinae*), estudos sobre a composição e as recentes publicações sobre o mel produzido por esta classe de abelhas.

Capítulo 2- Méis de abelhas sem ferrão (*Meliponinae*): caracterização físico-química, compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante. Nesse capítulo foram caracterizados os méis de abelhas sem ferrão quanto aos seus parâmetros físicos- químico (umidade, acidez livre, pH, teor de 5-HMF, atividade diastásica, frutose, glicose, sacarose, condutividade elétrica), bem como a presença de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante (DPPH e FRAP) de 20 amostras de méis de abelhas sem ferrão (*Meliponinae*) provenientes do estado de Santa Catarina.

Capítulo 3- Bioacessibilidade *in vitro* de minerais em méis de abelhas sem ferrão (*Meliponinae*). O capítulo apresenta a composição de elementos minerais e a fração bioacessível dos mesmos (K, Ca, Na, Fe, Cu, Co, Zn, Mn, Se, Al, Cd, Ni, Pb e Li) em treze amostras méis de abelhas sem ferrão de nove espécies distintas, provenientes de três municípios do estado de Santa Catarina.

Capítulo 4- Compostos bioativos em méis de abelhas sem ferrão (*Meliponinae*): compostos fenólicos, glucosinolatos e sulforafano. Esse capítulo reporta resultados sobre os compostos fenólicos, glucosinolatos e sulforafano investigados em amostras de méis de abelhas sem ferrão do estado de Santa Catarina.

Capítulo 5- Determinação de aminoácidos livres em méis de abelhas sem ferrão (*Meliponinae*). Esse último capítulo contempla a identificação e quantificação de 17 aminoácidos livres investigados em dez amostras de méis de abelhas sem ferrão produzidos e três cidades do estado de Santa Catarina.

Por fim, apresentam-se as considerações finais a respeito do projeto de pesquisa desenvolvido, como também as perspectivas de estudos futuros para o tema abordado.



## **CAPÍTULO 1**

### **REVISÃO BIBLIOGRAFICA**

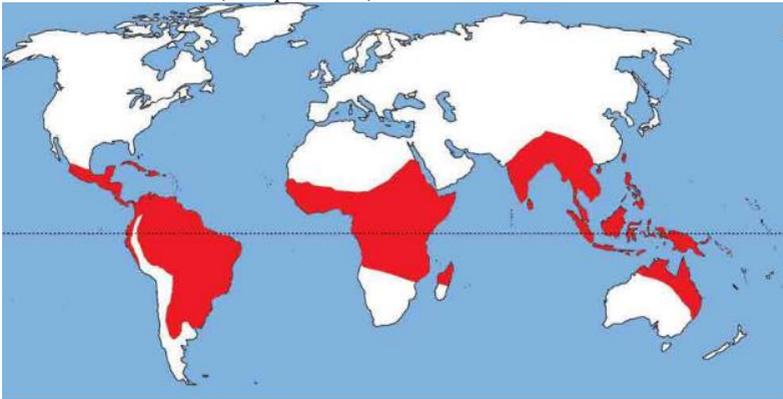
## 1 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

### 1.1 Abelhas sem ferrão (*Meliponinae*)

Mais de 20 mil espécies de abelhas habitam os mais diversos tipos de ecossistemas terrestre (OLIVEIRA et al., 2013). Dentre essa diversidade de espécie está a subfamília de abelhas *Meliponinae*, que se diferenciam das demais espécies principalmente por possuírem ferrão atrofiado os quais não podem ser utilizados como meio de defesa. Devido a essas características, as abelhas pertencentes à espécie *Meliponinae* são denominadas popularmente como abelhas sem ferrão ou do inglês *stingless bees* (OLIVEIRA et al., 2013; RAMÓN-SIERRA et al., 2015).

Essa espécie é encontrada tipicamente nas regiões de clima tropical e em algumas regiões de clima temperado subtropical (Figura 1.1), distribuindo-se, na maior parte do território Latino-Americano, além da Austrália, Indonésia, Malásia, Índia, África e Tailândia (VIT; PEDRO; ROUBIK, 2013; CHUTTONG et al., 2016a; ALVAREZ-SUAREZ et al., 2018).

Figura 1.1 Mapa ilustrativo da distribuição geográfica mundial das abelhas sem ferrão (*Meliponinae*).



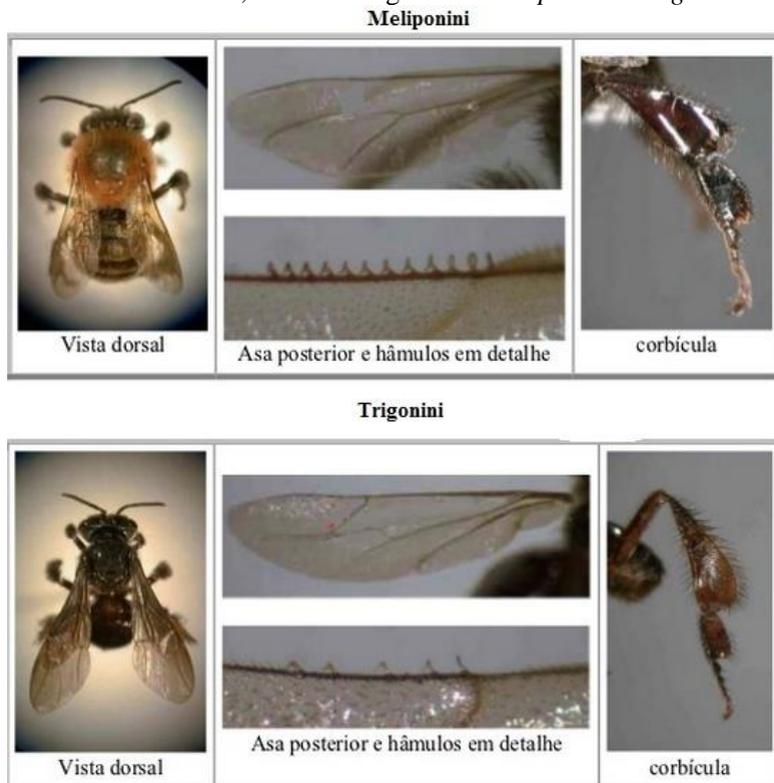
Fonte: Oliveira et al. (2013).

Pesquisadores relatam a existência de mais de 500 espécies de abelhas sem ferrão no mundo, sendo que no Brasil há pelo menos 192 espécies catalogadas (NOGUEIRA-NETO, 1997). Essas espécies podem ser classificadas em: família *Apidae*, subfamília *Meliponinae* e

divididas em três tribos, *Meliponini*, *Trigonini* e *Lestrimelittini* (NOGUEIRA-NETO, 1997; VIT; PEDRO; ROUBIK, 2013)

As *Meliponini* possuem um único gênero, descrito como *Meliponas*, que se caracterizam por não construírem células reais de cria, por apresentarem aparência robusta, tamanho variando entre 7 a 13 mm, tórax com pilosidade abundante e longa, tíbias posteriores triangulares e com corbícula, asas curtas, as quais dificilmente ultrapassam o comprimento do abdômen, geralmente mais de nove hâmulos por asa e pterostigma pouco desenvolvido e estreito (Figura 1.2). As rainhas geralmente são semelhantes às operárias e aos machos, em especial na largura do tórax (OLIVEIRA et al., 2013).

Figura 1.2 - Representação das principais características morfológicas das abelhas sem ferrão, destacando gêneros: *Meliponini* e *Trigonini*.



Fonte: Laboratório de abelhas da USP (2015).

As *Trigonini*, por sua vez, possuem mais de dez gêneros e constroem células de cria de dois tamanhos: as células das operárias e as células reais. Na célula real, as larvas recebem mais alimento, determinando a formação de uma nova rainha virgem (VILLAS-BÔAS, 2012). As *Trigoninis* (Figura 1.2) são abelhas menores, variando de 2 a 11 mm, abdômen mais alongado, tórax com pouca pilosidade e mais curtas, as tíbias posteriores com formato variável, com corbícula, fascículo e pente cerdosos apicais, asas que sobrepassam o comprimento do abdômen, pterostigma bem desenvolvido e menor número de hêmulos por asa. As rainhas virgens possuem um tórax mais largo e tamanho corpóreo maior do que as operárias e os machos (OLIVEIRA et al., 2013; VIT; PEDRO; ROUBIK, 2013).

Existe, ainda, a tribo *Lestrimelittini*, que compreende aos meliponíneos que vivem, exclusivamente, de furto de alimento de outras espécies de abelhas, constituindo um grupo pequeno (NOGUEIRA-NETO, 1997). Assim, como não existe uma produção efetiva de produtos nas colônias da tribo *Lestrimelittin*, essas abelhas não são utilizadas por produtores na meliponicultura. Portanto nossos estudos estão voltados para as tribos *Meliponini* e *Trigonini*. Além disso, até o momento não foram encontrados relatos detalhados da morfologia das *Lestrimelittini*.

As abelhas sem ferrão são eussociais, assim sendo, são extremamente organizadas, formam colônias permanentes, habitadas pelas rainhas, zangões e majoritariamente pelas operárias (VILLAS-BÔAS, 2012; RAMÓN-SIERRA et al., 2015). Além da presença de insetos e fungos que vivem em simbioses com as abelhas (MENEZES et al., 2015).

As abelhas sem ferrão possuem variação nas cores, que podem ser claras (amarelo) ou escuras (marrom, preto). Não são ofensivas, porém, podem expelir líquidos ácidos ou básicos para a sua defesa, que irritam a pele de seus predadores. Ainda podem enrolar-se nos cabelos ou pelos, ou até mesmo tentar entrar nas vias respiratórias (NOGUEIRA-NETO, 1997; VILLAS-BÔAS, 2012).

Além das diferenças morfológicas das abelhas sem ferrão, a arquitetura dos ninhos também recebe destaque por ser distinta das demais espécies de abelhas. A estrutura do ninho pode ser variável de acordo com os materiais disponíveis para sua construção, assim como o local de instalação das colônias, que pode variar entre cavidades no solo, cupinzeiros, formigueiros abandonados, troncos de árvores, postes, muros, caixas, ou seja, nos mais diversos locais onde possam estar

seguras para o desenvolvimento da colônia (NOGUEIRA-NETO, 1997; VIT; PEDRO; ROUBIK, 2013).

As colônias das abelhas são formadas por discos de favos de cria e potes para a reserva de alimentos, dispostos na horizontal, envolvidos por uma grande quantidade de lamelas de cera que servem principalmente como isolamento térmico (VIT, PEDRO, ROUBIK, 2013).

Além disso, cada espécie de abelha constrói uma estrutura característica de entrada para sua colônia, essa estrutura é chamada de batume. O batume das *Trigoninis*, por exemplo, costuma ser constituído de cerume (mistura de cera e resina coletada nas plantas), enquanto as *Meliponinis* contraem com geoprópolis (mistura de cera, terra e resina) (NOGUEIRA-NETO, 1997; FRANCHIN et al., 2012; VIT, PEDRO, ROUBIK, 2013). Tais características podem ser observadas na Figura 1.3.

Figura 1.3 - Representação da estrutura física da colmeia de abelhas sem ferrão (*Meliponinae*) com favos de cria e potes contendo mel e pólen, bem como imagens de batumes de algumas espécies (nomes populares) encontradas no Brasil



Fonte: Venturieri (2007); Abreu (2012); Villas-bôas (2012); Oliveira et al. (2013).

Ainda sobre as abelhas sem ferrão, vale mencionar que a exploração de suas colônias para a utilização e consumo dos seus produtos (cera, própolis, geoprópolis, pólen, cerume e mel), sempre fizeram parte dos costumes socioculturais, alimentares, medicinais, ritualísticos e comerciais de muitos povos, incluindo, os maias do México e da Guatemala, os pigmeus Abayandas de Uganda, várias tribos aborígenes australianas e os Kayapós da bacia amazônica brasileira (NOGUEIRA-NETO, 1997; RAMÓN-SIERRA et al., 2015).

Com o decorrer dos anos, a criação e o manejo racional das abelhas sem ferrão tornou-se uma atividade rentável, conhecida como meliponicultura. A meliponicultura tem possibilitado ao homem explorar economicamente as abelhas e comercializar seus produtos, servindo como uma importante fonte de renda para agricultura familiar brasileira (JAFFÉ et al., 2015).

Além disso, a criação dessas abelhas e a sua exploração racional também podem contribuir para a preservação das espécies, bem como, auxiliar na manutenção e conservação dos ecossistemas (RAMÓN-SIERRA et al., 2015).

A fim de estabelecer uma atividade regular, o governo brasileiro estabeleceu normas para a criação racional das abelhas sem ferrão. Dessa forma, a utilização das colônias para qualquer fim está sujeita às exigências do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA, através da Resolução n.º. 346, de 16 de agosto de 2004, na qual estão dispostos, adequadamente, os critérios para o manejo dessas abelhas nativas do território brasileiro (BRASIL, 2004).

A meliponicultura tem alcançado um importante desenvolvimento, tanto em espaço, quanto em tecnologia e investimentos para uma criação racional mais produtiva. No entanto, apesar do crescimento dessa atividade, no Brasil, e em todos os países que desenvolvem a meliponicultura, a atividade permanece informal, o conhecimento técnico é escasso, as práticas de gestão necessitam de padronização. E para a comercialização de produtos se faz necessárias legislações e fiscalizações efetivas para a segurança dos méis produzidos e, conseqüentemente, dos consumidores (JAFFÉ et al., 2015).

## **1.2 Méis de abelhas sem ferrão**

Assim como na apicultura, a meliponicultura tem o mel como principal produto apreciativo de exploração e o interesse por esse produto têm apresentado uma demanda crescente nos últimos anos,

decorrente de suas características sensoriais peculiares bem aceitas na gastronomia, aliadas à elevada procura por produtos naturais e orgânicos com potencial benéfico à saúde e a possível aplicação em produtos da indústria alimentícia e farmacêutica (Da SILVA et al., 2013; SILVA et al., 2013; VIT, PEDRO, ROUBIK, 2013).

Os méis de abelhas sem ferrão são vistos não somente como alimento, mas também como um produto popularmente empregado no combate a diversos processos patológicos, doenças respiratórias, infecções, inflamações, controle digestivo e para o uso tópico (MEDINA; ENRIQUEZ, 2004; RAMÓN-SIERRA et al., 2015; VIT; RAO et al., 2016).

Assim como os méis produzidos por abelhas *Apis mellifera*, os méis de abelhas sem ferrão também são reconhecidos como um produto natural, produzido a partir da coleta do néctar de flores ou de exsudatos sacarínicos de partes vivas de plantas ou de excreções de insetos sugadores de seiva que se encontram sobre as plantas (mel de melato) (RAMÓN-SIERRA et al., 2015; Da SILVA et al., 2016; AZEVEDO, 2017). No entanto, méis de abelhas sem ferrão apresentam características químicas e sensoriais peculiares como, elevado teor de umidade e acidez, menores teores de açúcares redutores, atividade diastásica e 5-HMF (BILUCA et al., 2014; CHUTTONG et al., 2016a). Apresentam sabor ácido e doce, textura fluida, com aroma e cor variável de acordo com as características de sua origem (CHUTTONG et al., 2016a; De SOUSA et al., 2016).

Fatores como estes, tornam os méis de abelhas sem ferrão um produto economicamente mais valorizado frente aos méis de abelha *Apis mellifera*. No Brasil, méis de abelhas sem ferrão podem alcançar valores de 20,00 a 240,00 reais o kg, variando de acordo com as espécies e região de origem.

A produção de méis de abelhas sem ferrão é distribuída em cerca de 20 estados brasileiros, destacando as regiões Nordeste e Sudeste, com um crescente desenvolvimento na região Sul (JAFFÉ et al., 2015). Segundo informações de produtores, a extração de mel é realizada apenas duas vezes ao ano, cuja quantidade obtida pode variar de 0,4 a 15 kg de mel por colônia ao ano, dependendo da espécie produtora (VILLAS-BÔAS, 2012).

No Brasil, existe uma estimativa de produção de quatro mil toneladas de mel de abelhas sem ferrão por ano (VIT; PEDRO; ROUBIK, 2013). No entanto, os órgãos fiscalizadores não têm registros sobre a totalidade dos meliponários brasileiros e, conseqüentemente, não existem valores regulamentados de produção do mel até o momento.

Associado a isso, sua comercialização é realizada majoritariamente em feiras livres ou propriedades rurais, muitas vezes de difícil acesso (VIT; PEDRO; ROUBIK, 2013). A indisponibilidade do mel no mercado também influencia no alto valor de comercialização.

Apesar de ser o principal produto da meliponicultura, ainda não é possível encontrar na literatura relatos do consumo, produção e venda deste mel. Ademais, os relatos dos benefícios proporcionados à saúde são culturalmente conhecidos, porém os estudos para comprovação científica ainda são escassos ou inexistentes (RAO et al., 2016).

### **1.3 Mel: definição, classificação e parâmetros de identidade e qualidade**

#### **1.3.1 Definição e classificação**

De acordo com o estabelecido pela legislação brasileira, através da Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000, entende-se por mel o produto alimentício produzido pelas abelhas melíferas, a partir do néctar das flores ou das secreções procedentes de partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas que as abelhas recolhem, transformam, combinam com substâncias específicas próprias, armazenam e deixam madurar nos favos da colmeia (BRASIL, 2000).

Os méis podem ser classificados quanto a sua origem, em méis florais ou méis de melato (BRASIL, 2000; Da SILVA et al., 2016). Os méis florais obtidos dos néctares das flores, também podem ser classificados em unifloral ou monofloral, quando o néctar coletado origina-se de flores de uma mesma família, gênero ou espécie, ou multifloral, polifloral ou silvestres quando o néctar coletado é decorrente de diferentes origens florais (BONTÉ; DESMOULIÈRE, 2013; BRASIL, 2000).

Méis de melato são obtidos principalmente a partir de secreções das partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas que se encontram sobre elas (BRASIL, 2000). Estes insetos perfuram partes da planta, alimentam-se da seiva e excretam o excesso em gotículas que são recolhidos pelas abelhas (AZEVEDO, 2017). No Brasil, há ainda outro produto denominado mel de cana, extrafloral, elaborado pelas abelhas a partir da seiva de cana-de-açúcar após a colheita ou de cortes feitos na planta (AZEVEDO, 2017).

### 1.3.2 Parâmetros de identidade e qualidade

De acordo com a literatura, a composição do mel, de uma forma geral, é majoritariamente formada por açúcares, principalmente frutose e glicose, e cerca de 20% de água (Da SILVA et al., 2016). Possui também outras substâncias como proteínas, enzimas, minerais, aminoácidos, ácidos orgânicos, lipídeos, vitaminas, ácidos fenólicos, flavonóides, carotenoides, produtos da reação de Maillard e numerosos compostos voláteis, além de conter cera e grãos de pólen (ESCUREDO et al., 2014; Da SILVA et al., 2016; SERAGLIO et al., 2017).

No entanto, a composição do mel depende de alguns fatores, como origem floral e geográfica, condições climáticas, processamento, armazenamento e espécie produtora (BONTÉ; DESMOULIÈRE, 2013; CAN et al., 2015).

Sendo influenciado por vários fatores e com alta variabilidade na sua composição, o mel deve ser fiscalizado para maior garantia de segurança ao consumidor. No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é o órgão responsável pelo regulamento técnico de identidade e qualidade de méis, fiscalizando os parâmetros físicos e químicos relacionados à maturidade, pureza e deterioração, através da Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000 (BRASIL, 2000). Tal regulamentação não especifica as diferentes espécies de abelhas das quais provém os méis, no entanto, sabe-se que a instrução foi baseada em normatizações internacionais (*Codex Alimentarius* e Mercosul) específicas para o mel de *Apis mellifera*.

Deste modo, é possível que os parâmetros definidos na normativa não atendam, na sua totalidade, as características específicas dos méis de abelhas sem ferrão e que esse produto não é regularizado e fiscalizado por autoridades de controle alimentar, o que limita a sua produção e sua comercialização (VIT, PEDRO, ROUBIK, 2013; CHUTTONG et al., 2016b).

Os parâmetros de identidade e qualidade definidos pela IN número 11 de 2000 estão ilustradas na Tabela 1.1, bem como, estudos recentes publicados sobre a composição dos méis de abelhas sem ferrão, que apontam as expressivas diferenças entre a composição dos méis.

Tabela 1.1- Estudos já relatados dos parâmetros de identidade e qualidade do mel de abelhas sem ferrão (Meliponinae) comparado ao mel de abelha *Apis Mellifera* (legislação).

REF	País	Umidade (% m/m)	AR (% m/m)	AS (% m/m)	5-HMF (mg kg <sup>-1</sup> )	AD (un.Göthe)	CE (mS cm <sup>1</sup> )	AL (meq kg <sup>-1</sup> )	pH
Legislação (BRASIL, 2000)	Brasil <i>Apis M.</i>	Máximo 20,0	Mínimo de 65,0	Máximo 6,00	Máximo 60,0	Mínimo de 8,00	-	Máximo 50,00	-
Sousa et al. (2013)	Brasil	17,3- 35,4	42,2 – 64,00	1,5 – 10,2	-	-	-	27,4 – 86,2	3,5- 5,1
Vit, Pedro e Roubik, (2013)	Venezuela	22,1 - 32,0	69,9 - 78,6	0,5 – 5,1	5,04 - 24,6	2,6 – 3,5	-	12,7 – 97,1	-
Ramón-Sierra et al. (2015)	México	22,0 – 25,0	53,1 - 63,7	8,3 - 6,9	-	-	-	-	-
Chuttong et al. (2016a)	Tailândia	25,7- 47,0	22,0 - 55,0	ND – 0,05	nd - 46	ND – 1,7	0,3 - 3,1	-	3,1-3,9
De Sousa et al. 2016	Brasil	23,9-28,9	62,7 – 71,2	0,7-3,0	nd	-	3,4 - 6,7	17,8- 86,8	3,2 - 5,3
Alvarez-Suarez et al., 2018	Cuba	28,62	-	-	9,3	1,3	0,3 - 0,5	41,5	3,2

REF= referências, ASF=abelhas sem ferrão, AR= açúcares redutores, AS= sacarose, AD= atividade diastásica, CE= condutividade elétrica, AL= acidez livre, nd= não detectado.

Para uma melhor compreensão entre as diferenças de cada um dos parâmetros de identidade e qualidade estipulado pela IN número 11 de 2000, é possível descrever um a um apontando as alterações existentes entre os méis e os parâmetros.

### *Açúcares*

Considerados os principais constituintes dos méis, os açúcares são avaliados em relação aos parâmetros de maturidade e qualidade, conferindo aos méis viscosidade, sabor e aroma (BONTÉ; DESMOULIÈRE, 2013).

Os monossacarídeos, por sua vez, são os principais açúcares presentes no mel, produzidos basicamente pelas abelhas a partir da sacarose presente no néctar, transformada pela ação de enzimas ( $\alpha$  e  $\beta$ -glicosidase,  $\alpha$  e  $\beta$ -amilase e a  $\beta$ -fructosidase) (Da SILVA et al., 2016). A frutose (cerca de 40%) e a glicose (cerca de 30%) são os açúcares presentes em maior concentração (ESCUREDO et al., 2014).

Entretanto, os méis de abelhas sem ferrão podem apresentar uma grande variação no conteúdo de glicose e frutose, com predominância da frutose (Tabela 1.1), ou até mesmo apresentar altos teores de outros açúcares, como verifica-se nos estudos de Chuttong et al. (2016a) a presença de maltose em méis da Tailândia, e nos estudos de De Sousa et al., (2016) a presença de arabinose em méis do Brasil.

Dissacarídeos, como sacarose, também são açúcares presente nos méis, e segundo descrito na normativa brasileira, o máximo permitido de 6% (m/m) em méis florais e 15% (m/m) em mel de melato (BRASIL, 2000). O conteúdo de sacarose em méis é analisado com o intuito de identificar possível manipulação inadequada do mel, sendo que valores elevados podem indicar: a) colheita precoce indicando que a sacarose não foi totalmente transformada em glicose e frutose; b) adição fraudulenta de açúcar comercial com objetivo de elevar o rendimento; c) alimentação artificial das abelhas com xaropes de sacarose também com a finalidade de aumentar o rendimento, resultado em produtos fraudulentos (ESCUREDO et al., 2013; TORNUK et al., 2013).

Levando em conta os estudos já relatados sobre açúcares presentes em méis de abelhas sem ferrão (Tabela 1.1), os resultados evidenciam que os valores encontrados não estão em conformidade com à IN nº 11, de 20 de outubro de 2000 (BRASIL, 2000).

## Umidade

A água é o segundo maior constituinte encontrado nos méis e pode estar relacionada com a florada, origem geográfica, condições climáticas, estação do ano em que é realizada a sua colheita e a espécie de abelha produtora (BONTÉ; DESMOULIÈRE, 2013).

O teor de umidade é também um dos parâmetros mais importantes a ser avaliado em méis, e capaz de influenciar diretamente nas características do produto, como na maturidade, viscosidade, peso específico, cristalização, vida útil, características sensoriais e valor comercial (GUERRINI et al., 2009; ALVAREZ-SUAREZ et al., 2018).

Segundo a IN n° 11 de 2000, o conteúdo de umidade não deve exceder 20% (m/m) (BRASIL, 2000). Entretanto, os méis de abelhas sem ferrão, considerados maduros, aptos para a colheita e com adequada manipulação, apresentam em sua maioria, valores de umidade superiores aos estabelecidos, como relatado no estudo por De Sousa et al. (2013 e 2016) apontando valores de 17,3 a 35,4% (m/m) para méis brasileiros (Tabela 1.1), ou até mesmo méis provenientes de outros países, como Tailândia (25,00 a 47,00% m/m) e México (22,00 a 25,00% m/m) (CHUTTONG et al., 2015; RAMÓN-SIERRA et al., 2015).

Este perfil nos valores do parâmetro de umidade evidencia a diferença entre os méis de *Apis mellifera* e méis de abelhas sem ferrão. Esse fato impacta na comercialização do produto (BRASIL, 2000; VIT, PEDRO, ROUBIK, 2013). Na tentativa de comercialização, produtores aplicam processos tecnológicos como a desidratação, os quais podem descaracterizar as amostras já popularmente conhecidas e apreciadas com seu elevado teor de umidade (VILLAS-BÔAS, 2012; VIT, PEDRO, ROUBIK, 2013).

### 5-Hidroximetilfurfural (5-HMF)

O 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) é um composto oriundo de altas temperaturas e prolongado tempo de armazenagem, geralmente utilizado como parâmetro de qualidade na fiscalização de adulteração do mel (Da SILVA et al., 2016; PASIAS et al., 2017).

Em países tropicais como o Brasil, com temperaturas elevadas em determinadas épocas do ano, o processamento e o armazenamento inadequado do mel durante longos períodos podem influenciar nos teores de 5-HMF, através da desidratação de hexoses em meio ácido, via

reação de Maillard ou por adição fraudulenta de açúcar invertido (KOWALSKI, 2013).

Para controlar as fraudes e garantir a qualidade do mel, a legislação estabelece um limite máximo de 60 mg kg<sup>-1</sup> de 5-HMF para o mel de *Apis mellifera* (BRASIL, 2000). Para méis de abelhas sem ferrão, coletados no sul do Brasil, foi relatada uma resistência na formação de 5- HMF e valores inferiores aos encontrados para abelha *Apis mellifera*, no entanto, não existem limites regulamentados (BILUCA et al., 2014; De SOUSA et al., 2016).

#### *Atividade diastásica*

Sabe-se que o mel contém enzimas provenientes das plantas e das glândulas hipofaríngeas dos insetos (Da SILVA et al., 2016). Sendo as principais enzimas presentes invertase, glicose-oxidase e as diástases ( $\alpha$ - e  $\beta$ - amilases) (VIT; PEDRO; ROUBIK, 2013). A diástase apresenta alto grau de instabilidade frente às temperaturas elevadas e sua presença se faz importante na tentativa de detectar possíveis aquecimentos do mel comercial. No entanto, podem perder sua atividade (desnaturação) em temperatura ambiente com armazenamento prolongado e ainda sofrem influência do pH e acidez dos méis (SAKAC; SAK-BOSNAR, 2012).

Sendo assim, a atual legislação preconiza que os méis devam apresentar atividade diastásica acima de 8 unidades na escala Göthe. Porém, méis com baixo conteúdo enzimático natural podem apresentar no mínimo 3 unidades Göthe, desde que o conteúdo de 5-HMF não exceda a 15 mg kg<sup>-1</sup> (BRASIL, 2000).

Estudos relatando a atividade diastásica dos méis de abelhas sem ferrão são limitados. Na Tabela 1.1, é possível observar que os estudos existentes apontam baixa atividade diastásica.

#### *Condutividade elétrica*

A condutividade elétrica é basicamente utilizada na autenticidade dos méis, sendo possível distinguir méis florais de melato (LACHMAN et al., 2007). O valor de condutividade elétrica depende do teor de minerais e da acidez do mel: quanto maior forem os seus conteúdos, maior será a condutividade resultante (BOGDANOV; MARTIN; LULLMANN, 2002). A medida da condutividade elétrica não é uma exigência da legislação brasileira, porém o *Codex*

*Alimentarius* preconiza que o mel floral apresente condutividade elétrica menor do que  $0,8 \text{ mS cm}^{-1}$  (CODEX, 2001).

Para méis de abelhas sem ferrão, os relatos de estudos analisando a condutividade elétrica são escassos e os estudos encontrados relatam grande variação nos valores como: 0,3 a  $6,7 \text{ mS cm}^{-1}$  descrito Chuttong et al. (2016a), De Sousa et al. (2016) e Alvarez-Suarez et al. (2018).

### *Acidez livre*

A acidez livre é considerada um indicativo de deterioração do mel e pode ser influenciada pelas enzimas das glândulas mandibulares das abelhas e pelas diferentes fontes de coleta de néctar (VIT; PEDRO; ROUBIK, 2013). Valores elevados de acidez livre são indicadores da ocorrência de fermentação dos açúcares pela ação de micro-organismos, sendo  $50 \text{ mEq kg}^{-1}$  o nível máximo de acidez permitido pela IN n° 11 de 2000, que regulamenta méis de abelha *Apis mellifera* (BRASIL, 2000). Entretanto, méis de abelhas sem ferrão apresentam acidez extremamente variável com valores de 8,0 a  $168 \text{ mEq kg}^{-1}$  (FONSECA et al., 2006; VIT; PEDRO; ROUBIK, 2013; SOUSA et al., 2016).

### *pH*

O mel geralmente apresenta baixo pH, em torno de 4,0, o que é importante durante a extração e estocagem, por influenciar na estabilidade e vida útil do produto (BERTONCEL et al., 2011a). Vit e colaboradores (2013) descrevem a ocorrência de diferentes pH entre os méis de abelhas sem ferrão, mesmo quando produzidos na mesma localidade, fato que pode ser explicado pelas diferenças de pH do néctar coletado das flores, a presença ou não de pólen, a concentração de diferentes íons como cálcio, potássio, sódio, entre outros e as diferentes substâncias mandibulares dos insetos acrescentadas ao néctar no decorrer da produção do mel (VIT; PEDRO; ROUBIK, 2013).

Considerando o exposto, os estudos existentes já evidenciam as diferenças entre méis de abelhas sem ferrão, méis de abelhas *Apis Mellifera* e os parâmetros exigidos na IN n° 11 de 2000 e declaram que a diferença na composição dos méis de abelhas sem ferrão pode ser associada à morfologia da abelha, estrutura de colônia, preferência de habitat e das floradas utilizadas pelas abelhas na produção do mel (VIT; PEDRO; ROUBIK, 2013), ou ainda devido a outros organismos que vivem em suas colmeias. Estudos recentes explicam que as abelhas sem

ferrão vivem em simbiose com outros organismos, que podem ser inquilinos de suas colmeias, tais como fungos, bactérias e ácaros (MENEZES et al., 2015; ITAGIBA et al., 2017). Estudos futuros ainda são necessários para investigar a influência destes organismos nas características específicas dos méis.

A visibilidade das diferenças entre os méis, fez com que alguns pesquisadores propusessem novos regulamentos e normativas para a comercialização dos méis de abelhas sem ferrão (SOUZA et al., 2016; CAMARGO et al., 2017) e em alguns estados brasileiros já se estabeleceram instruções normativas para a produção, comercialização e os registros dos méis (ADAB, 2014; ADAPAR, 2017; CIPOA, 2017). No entanto, no estado de Santa Catarina a comercialização continua informal e estudos para o conhecimento das características específicas dos méis produzidos no estado ainda são insuficientes.

#### **1.4 Compostos de relevância nutricional e bioativa em méis**

Tão importante quanto os parâmetros de identidade e qualidade, a investigação dos compostos minoritários (vitaminas, ácidos orgânicos, ácidos fenólicos, flavonóides, aminoácidos, enzimas, minerais e produtos químicos voláteis) presentes no mel também deve ser destacado e estudado (Da SILVA et al., 2016). Os múltiplos compostos que estabelecem a composição do mel funcionam em sinergia, sendo responsáveis pelas possíveis propriedades nutricionais, sensoriais e medicinais associadas a esses produtos, assim, tais compostos podem elucidar com mais detalhes a origem botânica e geográfica dos méis, bem como auxiliar na identificação de fraudes ou contaminações e apontar os compostos com propriedades capazes de fornecer benefícios ao organismo vivo (OSÉS et al., 2016; KHAN et al., 2017; BADOLATO et al., 2017; SOBRINO-GREGORIO et al., 2017).

##### **1.4.1 Compostos fenólicos e capacidade antioxidante**

As plantas são organismos autotróficos que dependem principalmente da luz, água, ar e solo para viver, logo, um conjunto de reações bioquímicas ocorre em sua estrutura, compondo o seu metabolismo (ELMER; DATNOFF, 2014). O metabolismo das plantas costuma ser dividido em dois: metabolismo primário e metabolismo secundário. Entende-se por metabolismo primário o conjunto de reações que desempenha funções essenciais para o vegetal, tais como a respiração, a fotossíntese, o transporte de solutos e compostos

envolvidos (aminoácidos, nucleotídeos, lipídeos, carboidratos, clorofila e outros) que possuem uma distribuição universal nas plantas (GRY et al., 2007).

Em contrapartida, o metabolismo secundário origina compostos que não são necessários para a sobrevivência das plantas, mas que são de extrema importância para a interação das plantas com o meio ambiente, agindo como protetores de estresse ambiental, na mudança de temperatura, nível de luz, conteúdo de água, exposição ao UV e deficiência de nutrientes minerais (GRY et al., 2007).

Entre os metabólitos secundários produzidos pelas plantas, estão presentes compostos bioativos, definidos como compostos que não são essenciais, mas podem promover efeitos benéficos ou tóxicos em um organismo vivo (GRY et al., 2007; SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015).

Muitos desses compostos apresentam capacidade antioxidante e atuam como inibidores de radicais livres (KÜÇÜK et al., 2007; BERTONCELJ et al., 2011b). Os radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (EROs) são moléculas orgânicas, inorgânicas e átomos que contêm um ou mais elétrons não pareados ou livres. Essa configuração faz dos radicais livres moléculas altamente instáveis, capazes de reagir com qualquer composto situado próximo à sua órbita externa, passando a ter uma função oxidante ou redutora de elétrons (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015).

A presença de radicais livres em excesso no organismo pode originar lesões em componentes celulares, podendo levar à oxidação dos lipídeos, proteínas, açúcares e ácidos desoxirribonucleico (ADN) e ribonucleico (ARN), assim contribuindo para o desenvolvimento de inúmeras doenças, como Parkinson, Alzheimer, câncer, entre outras (GRY et al., 2007; HALLIWELL, 2011; ALBUQUERQUE et al., 2016).

A produção inevitável de radicais livres pelo organismo pode ser inibida ou minimizada com o consumo dos compostos ativos que possuem a capacidade de neutralizar os efeitos dos radicais livres, comumente conhecidos como compostos antioxidantes. Os antioxidantes podem estar presentes no organismo humano por mecanismos endógenos e por uma dieta equilibrada (MAGALHÃES et al., 2008; BAGHIANI et al., 2011; SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015).

Dentre as diversas classes de substâncias bioativas de ocorrência natural nos alimentos, os compostos fenólicos são os que se destacam entre os atuais estudos, isso é decorrente da sua forte

associação com a influência na saúde e bem estar humano (MARSANASCO et al., 2015; Da SILVA; ROCHA-SANTOS; DUARTE, 2016). São responsáveis também pelas características sensoriais dos alimentos tais como adstringência, amargor e aroma, e outras sensações táteis que definem cada alimento (IGNAT; VOLF; POPA, 2011; HAMINIUK et al., 2012; SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015).

Essa classe de compostos forma um grupo quimicamente heterogêneo, com cerca de 10.000 compostos e são quimicamente definidos como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais que podem variar desde uma molécula fenólica simples até um polímero complexo de alta massa molecular (LEE et al., 2005, Da SILVA et al., 2016).

De acordo com sua estrutura química básica, os compostos fenólicos podem ser divididos em grandes grupos, classificados como ácidos fenólicos, não-flavonóides, flavonóides, estilbenos, lignanas e taninos (HAMINIUK et al., 2012).

Os ácidos fenólicos apresentam-se de forma livre, ligados entre si e com outros compostos. Os ácidos fenólicos apresentam dois subgrupos, os ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos. O ácido hidroxibenzóico apresenta sete átomos de carbono ( $C_6-C_1$ ) derivados do ácido benzóico, com variação nas hidroxilações e metilações do anel aromático, originando os ácidos: *p*-hidroxibenzóico, vanílico, siríngico, salicílico, gálico e elágico (ROSA, 2012; Da SILVA et al., 2016).

Os ácidos hidroxicinâmicos, por sua vez, são compostos aromáticos com cadeia lateral de três carbonos, apresentando nove átomos de carbono ( $C_6-C_3$ ), sendo que os representantes mais comuns são os ácidos cafeico, ferúlico, *p*-cumárico e ácido sinápico (Tabela 1.2). Esses compostos ocorrem normalmente na sua forma conjugada como ésteres de hidroxiácidos, como o chiquímico e tártarico e também na forma pura (ANGELO; JORGE, 2007; MCCARTHY et al., 2013; RICE-EVANS; PACKER, 2003).

Os flavonóides são compostos de baixa massa molecular e caracterizados quanto à estrutura química que contém 15 átomos de carbono organizados na configuração  $C_6-C_3-C_6$ , (FERREIRA; ABREU, 2007; PYRZYNSKA; BIESAGA, 2009). A estrutura base dos flavonóides consiste em dois anéis aromáticos e um heterocíclico, conectados por ligações de três átomos de carbono, resultando rotas biossintéticas distintas: a do ácido chiquímico e a do acetato via ácido malônico. As variações nas configurações de substituição do anel

heterocíclico resultam na maioria das subclasses dos flavonóides: flavonas, flavonóis, flavanonas, flavanonóis, flavonóis, antocianidinas, isoflavonas e chalconas (ANDERSEN; MARKHAM, 2006; FRAGA, 2010).

### *Compostos fenólicos em mel de abelhas sem ferrão*

As plantas polinizadas pelas abelhas produzem néctar, utilizado na produção de mel, assim, os compostos bioativos sintetizados pelas plantas, são transferidos aos méis, tornando-o um alimento potencial fornecedor de compostos biativos para a dieta humana (IURLINA et al., 2009; ALVAREZ-SUAREZ et al., 2012; Da SILVA et al., 2016).

O perfil e a quantidade dos compostos fenólicos presentes nos méis são dependentes de fatores como espécie da planta fornecedora do néctar, espécie de abelha, condições climáticas e geográficas. Tornando o mel um produto muito peculiar com compostos específicos de acordo com as variações dos fatores (IURLINA et al., 2009; ALVAREZ-SUAREZ et al., 2012; Da SILVA et al., 2016).

Inúmeros são os estudos que expõem o perfil de compostos fenólicos dos méis oriundos das abelhas *Apis Mellifera* (DAS et al., 2015; CAN et al., 2015; SERAGLIO et al., 2016; ZHAO et al., 2016; BADOLATO et al., 2017; OROIAN; ROPCIUC; SORINA, 2017; OROIAN; ROPCIUC, 2017). Porém, até o momento, ainda são limitados os estudos de perfil de compostos fenólicos dos méis de abelhas sem ferrão (Tabela 1.2).

Investigações focadas nos compostos fenólicos são importantes, pois além dos benefícios à saúde, esses compostos podem ser utilizados como possíveis marcadores e auxiliar na identificação dos méis quanto à origem floral ou geográfica e na fiscalização de fraudes e denominação de origem (Da SILVA et al., 2016; ZHAO et al., 2016).

Tabela 1.2 - Compostos fenólicos presentes em méis de abelhas sem ferrão (*Meliponine*).

Autor/ano	Origem do mel	Espécie de abelha	Metodologia Empregada	Compostos encontrados
Guerrini et al. (2009)	Equador	Sem distinção	HPTLC	Luteolina-7-glucósido, luteolina, quercitrina, naringenina, isoramnetina
Oliveira et al. (2012)	Brasil	<i>M. fasciculata</i> , <i>M. flavolineata</i>	HPLC/UV	Ácido gálico, ácido cafeico, ácido vanílico, ácido p-cumárico, mircetina, ácido ferulico, ácido m-cumárico, ácido o-cumárico, Quercetina, ácido trans-cinâmico e ácido o-metoxinâmico.
Da Silva et al. (2013)	Brasil	<i>M. s. merrillae</i>	HPLC/UV	Ácido gálico, ácido 3,4-di-hidroxibenzóico, ácido vanílico, ácido salicílico, ácido siringico, cumárico, ácido cinâmico, catecol, trans,trans- ácido abscísico, cis,trans- ácido abscísico, taxifolina, naringenina, luteolina.
Silva et al. (2013)	Brasil	<i>M. subnitida</i>	HPLC/UV	Ácido gálico, ácido 3,4-di-hidroxibenzóico, ácidovanílico, cinâmico, isoramnetina, naringenina, quercitrina, trans,trans- ácido abscísico, cis,trans- ácido abscísico.
Ranneh et al. (2018)	Malásia	<i>Trigona</i>	LC- MS/MS	Ácido gálico, ácidos cafeico, ácido siringico, catequina, apigenina, crisina, ácido cinamico, 2-hidroxicinamoco, kaempferol, ácido cumárico, quercetina, rutina e ácido 4-hidroxibenzóico.

#### 1.4.2 Glucosinolatos e sulforafano

Os glucosinolatos são compostos do metabolismo secundário encontrados em plantas do gênero *Brassica* (família *Brassicaceae* ou *Cruciferae*) que inclui um grande número de plantas cultivadas de interesse agrícola, entre elas a mais relevante é a espécie *Brassica oleracea* (ARES et al., 2016; FERNÁNDEZ-LEÓN et al., 2107). Couve-flor, brócolis, repolho, colza e mostarda são os vegetais mais conhecidos desta família (FERNÁNDEZ-LEÓN et al., 2107).

Estudos epidemiológicos associam o consumo de vegetais crucíferos a redução de riscos de vários tipos de câncer, incluindo mama, gástrico (BOSETTI et al., 2012), pulmão (WU et al., 2015), colorretal (AZEEM et al., 2015), bexiga (AL-ZALABANI et al., 2016) e câncer de próstata (CHAN et al., 2009). As evidências acumuladas nas últimas décadas sugerem que os efeitos preventivos de certos tipos de câncer podem ser atribuídos aos glucosinolatos e seus produtos de degradação (CLARKE, 2010; WU et al., 2017).

Quimicamente, os glucosinolatos são  $\beta$ -tioglicosídeos-N-hidroxissulfatos (também conhecidos como (Z) -N-hidroxissulfatos ou tio-hidróxidos de S-glucopiranosil), contêm um grupamento ciano e grupamento sulfato, com uma cadeia lateral derivada de aminoácidos, que determina a classe de cada glucosinato, sendo, alifático, aromático, heterocíclicos ou indólicos (ARES et a., 2016; WU et al., 2017).

Para desempenhar funções biologicamente ativas sobre o organismo vivo, o tecido vegetal deve ser rompido para que a enzima mirosinase entre em contato com os glucosinolatos realizando a reação de hidrólise (TRIPATHI; MISHRA, 2007). Assim, os produtos da hidrólise, em sua maioria, isotiocianatos, tiocianatos, nitrilos ou indóis são ativos e amplamente estudados e conhecidos por suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antifúngicas, anticarcinogênicas e características sensoriais específicas (ARES et al., 2016; FERNÁNDEZ-LEÓN et al., 2107).

Dentre os compostos de degradação dos glucosinolatos, é dado destaque para os isotiocianatos, pois, segundo estudos, são os principais constituintes quimiopreventivos das *Brassica* (WICZK et al., 2012). Um dos isotiocianatos mais estudados é o sulforafano (1-isotiocianato-4-(metil-sulfinil)-butano), formado pela hidrólise da glicorafanina, encontrado em abundância nos brócolis (KOKOTOU et al., 2017).

Estudos com a determinação de glucosinolatos e sulforafano têm sido amplamente realizados em matrizes vegetais, apontando

inúmeros benefícios para a saúde humana (AMBRECHT et al., 2015; OGUZ et al., 2015). Mas, recentemente novos estudos têm focado em outros produtos que possam conter tais compostos, indicando a presença natural de glucosinolatos e sulforafano em produtos apícolas como pólen, geleia real e mel (TRUCHADO et al., 2010; ARES et al., 2015; ARES et al., 2016). No entanto, para méis de abelhas sem ferrão, não foram encontrados relatos de investigação até o momento.

### 1.4.3 Minerais

Os minerais são elementos inorgânicos com papel fundamental em diversas funções biológicas no organismo humano e não podem ser sintetizados pelo mesmo, dessa forma devem ser obtidos de fontes exógenas (FRANCO, 2005).

A estrutura do corpo humano em condições saudáveis é constituída principalmente por proteínas, glicídios, lipídeos, água e elementos minerais. Os minerais constituem apenas 4% do corpo humano, mas são de fundamental importância para uma variedade de funções, tais como cofatores em diversos processos enzimáticos, na regulamentação do balanço ácido-básico, no impulso nervoso, atividade muscular e como elementos estruturais do corpo (CAMPBELL, 2014; MIR-MÁRQUÉS et al., 2015). A deficiência dos mesmos pode acarretar em distúrbios no organismo.

Os minerais tornam-se elementos essenciais no equilíbrio do corpo humano, são requeridos pelo organismo em quantidades específicas, em uma faixa que pode variar de microgramas a gramas por dia. Os minerais necessários em quantidades de 100 mg ou mais por dia são denominados macrominerais ou macroelementos, são eles o potássio, o cálcio, o fósforo, o sódio, o cloro, o magnésio e o enxofre. Os microminerais ou microelementos são aqueles necessários apenas em pequenas quantidades, poucos miligramas ou microgramas por dia, são manganês, cobre, cobalto, ferro, zinco, iodo, molibdênio, selênio, flúor e cromo (CAMPBELL, 2014; KOYYALAMUDIA et al., 2013).

Além dos minerais essenciais, outros elementos, denominados metais, também podem estar presentes nos alimentos. Mesmo sem função essencial, os metais podem afetar o metabolismo de elementos essenciais, ou ainda serem tóxicos ainda que em concentrações extremamente baixas. Esses elementos não são encontrados de modo uniforme nos alimentos, por isso devem ser investigados para garantir a qualidade do produto (MIR-MÁRQUÉS et al., 2015).

### *Minerais em méis de abelhas sem ferrão*

O crescimento e o desenvolvimento das plantas dependem de fatores como luminosidade, água, gás carbônico e fluxo contínuo de sais minerais. Estes minerais, embora requeridos em pequenas quantidades, são fundamentais no desempenho das principais funções metabólicas das células das plantas (ELMER; DATNEFF, 2014).

Considerando a habilidade das plantas em absorver do solo ou de soluções nutritivas os elementos químicos disponíveis sem grandes restrições, podem ser nutrientes benéficos ou compostos tóxicos (ELMER; DATNOFF, 2014). Naturalmente, esses elementos minerais são absorvidos pelas plantas e, conseqüentemente, presentes nos néctares ou no exsudados colhidos pelas abelhas e carreados para os méis (ESCUREDO et al., 2015).

Estudos vêm relatando a influência da composição de minerais em méis, por fatores bióticos e abióticos criados em torno da colônia de abelhas, ou seja, origem botânica e geográfica do néctar ou exsudado utilizado, espécie de abelha, assim como o manejo beneficiamento, colheita e o armazenamento dos méis (CZIPA; ANDRÁSI, KOVÁCS, 2015; DI BELLA et al., 2015; RIZELIO et al., 2012).

Os teores de minerais encontrados em méis são relativamente baixos, com concentrações entre 0,1 a 0,2% em méis florais e de cerca de 1,0% em méis de melato (ALQARNI et al., 2014; DI BELLA et al., 2015).

Inúmeros elementos químicos já foram identificados em méis de abelha *Apis mellifera*, como o bário (Ba), berílio (Be), bismuto (Bi), cálcio (Ca), chumbo (Pb), cobalto (Co), cobre (Cu), estanho (Sn), estrôncio (Sr), ferro (Fe), gálio (Ga), germânio (Ge), lítio (Li), magnésio (Mg), manganês (Mn), molibdênio (Mo), níquel (Ni), ósmio (Os), ouro (Au), potássio (K), prata (Ag), sódio (Na), tálio (Tl), vanádio (V) e zinco (Zn), alumínio (Al), cádmio (Cd), tálio (Tl), rubídio (Rb), urânio (U), platina (Pt), paládio (Pd), telúrio (Te), háfnio (Hf), molibdênio (Mo), antimônio (Sb), fósforo (P), lantânio (La), iodo (I), samário (Sm), térbio (Tb), disprósio (Dy), tório (Th), praseodímio (Pr), neodímio (Nd), túlio (Tm), itérbio (Yb), lutécio (Lu), gadolínio (Gd), hólmio (Ho), érbio (Er), cério (Ce) e cromo (Cr) (BATISTA et al., 2012; POHL et al., 2012; RIZELIO et al., 2012; ALQARNI et al., 2014; DI BELLA et al., 2015).

No entanto, o mineral mais abundante nos méis de abelha *Apis mellifera* é o potássio (K) (372 a 3000 mg kg<sup>-1</sup>), que corresponde a 45 a 85% da concentração mineral total. Outros elementos de relevância são

sódio (Na) (6,76 a 531,77 mg kg<sup>-1</sup>), cálcio (Ca) (30 a 450 mg kg<sup>-1</sup>), magnésio (Mg) (80 a 237 mg kg<sup>-1</sup>) e fósforo (P) (20 a 245 mg kg<sup>-1</sup>) (POHL et al., 2012; RIZELIO et al., 2012; ALQARNI et al., 2014; HABIB et al., 2014; DI BELLA et al., 2015).

A presença de elementos essenciais, em méis pode ser considerado um importante complemento de minerais (POHL et al., 2012) para indivíduos sem restrições com relação à ingestão de carboidratos (DUARTE, 2006). Entretanto, estudos revelam que a quantidade de nutrientes ingeridos na dieta, difere da quantidade utilizada pelo organismo, fato que ocorre devido à complexidade dos alimentos, das etapas de ingestão e metabolismo (COZZOLINO, 2009; POHL et al., 2012).

Assim sendo, os estudos de biodisponibilidade e bioacessibilidade podem ser utilizados para indicar a porção de um componente verdadeiramente disponível para a absorção em relação ao total consumido (RODRÍGUEZ- ROQUE et al., 2013).

O termo biodisponibilidade refere-se à fração de nutrientes ou contaminantes ingeridos através de matrizes alimentares, modificadas no trato gastrointestinal, liberando compostos e tornando-os bioacessíveis, para a utilização em funções fisiológicas normais, ou podendo ser armazenado pelo organismo. Neste processo incluem a digestão gastrointestinal, absorção, metabolismo distribuição de tecidos e bioatividade (CARDOSO et al., 2015; LEMMENS et al., 2014). No entanto, a bioacessibilidade representa a fração de um nutriente que é liberado da matriz alimentar no trato gastrointestinal durante o processo digestivo que pode estar disponível para a absorção intestinal (RODRÍGUEZ-ROQUE et al., 2013; LEMMENS et al., 2014).

Os estudos de bioacessibilidade e biodisponibilidade podem ser analisados de duas diferentes formas analíticas: teste *in vivo* ou *in vitro*. Considerados mais simples, rápidos e de custos moderados, os estudos *in vitro* são apresentados como alternativa a estudos em humanos ou animais. Porém, para obtenção de resultados semelhantes aos da digestão *in vivo*, as condições, tais como a composição química dos fluidos digestivos, o pH e tempo de residência típico de cada compartimento, devem ser iguais ou semelhantes às do sistema digestivo vivo (HORNERO-MÉNDEZ; MÍNGUEZ-MOSQUERA, 2007).

Assim, um elevado número de investigações quanto aos valores bioacessíveis de minerais e oligoelementos em matrizes, como vegetais (HU et al., 2013), moluscos marinhos (LEUFROY et al., 2012; HE; KE; WANG, 2010), vegetais, algas comestíveis, ovo de galinha e leite de

vaca (MOREDA-PIÑEIROA et al., 2011), suplementos medicinais (TOKALIOĞLU et al., 2014), queijo, pão, frutas e vegetais (KHOUZAM et al., 2011), cogumelos (BHATIA et al., 2013), grão e cereais (WANG; HE; CHEN, 2014), plantas comestíveis (ZHENG et al., 2013; BERTIN et al., 2016), e frutos juçara (açaf) (SCHULZ et al., 2017) foram publicados nos últimos anos.

Essa tendência de investigação de minerais bioacessíveis também levou Pohl et al. (2012) e Seriaglio et al. (2017) a estudar e descrever as frações bioacessíveis de elementos minerais em méis de abelha *Apis mellifera* provenientes da Polônia e do Brasil. No entanto, estudos como esses ainda são escassos ou inexistentes para alguns elementos minerais e para méis produzidos por abelhas sem ferrão.

O monitoramento dos minerais em méis mostrou-se importante, tanto para fins de orientações nutricionais e segurança alimentar quanto como indicador biológico da contaminação ambiental na área forrageada das abelhas (Da SILVA et al., 2016).

Com o avanço da apicultura e da meliponicultura, muitos produtores passaram a instalar os apiários e os meliponários em áreas urbanas, periurbanas ou industriais. Essas regiões vêm apresentando contaminação e consequente degradação do meio natural causado por agentes químicos, detritos domésticos, industriais, escapamentos de automóveis, depósitos de lixo, entre outros fatores. Os méis produzidos nesses locais estão sujeitos a contaminações por metais provenientes de emissões de gases e particulados (CZIPA; ANDRÁSI; KOVÁCS, 2015; DI BELLA et al., 2015), justificando assim, a importância do monitoramento,

Com o monitoramento de minerais em méis é possível prever também uma possível fraude por alimentação indevida com xaropes, uma vez que os xaropes fornecidos para a alimentação das abelhas podem apresentar quantidades elevadas de Cd, Cu, Fe, K, Mn, Mg, Pb e Na (RASHED; SOLTAN, 2004).

Realizando uma pesquisa nos bancos de dados (<http://pcs.webofknowledge.com>; <http://www.sciencedirect.com>; <http://www.journals.elsevier.com>) e uma revisão na literatura, foi possível observar que, até o momento da publicação deste trabalho (BILUCA et al., 2016; BILUCA et al., 2017), nenhum estudo havia sido relatado para quantificar os elementos minerais de méis de abelhas sem ferrão. Na sequência das publicações, De Oliveira et al. (2017) também relataram a presença de minerais em méis de abelhas sem ferrão nativas do território brasileiro.

#### 1.4.4 Aminoácidos

Os aminoácidos são os constituintes básicos dos organismos vivos e têm um papel dinâmico estrutural e ativo na fisiologia dos tecidos e das células (RUSCIANO et al., 2016). São moléculas orgânicas formadas por um grupo carboxila (COOH), um grupo amino (NH<sub>2</sub>) e um átomo de hidrogênio ligado ao mesmo átomo de carbono, chamado de carbono alfa ( $\alpha$ ), ainda ligado a esse carbono existe um radical R diferenciado, o qual determina as suas propriedades químicas podendo variar a estrutura, função, tamanho, carga elétrica, influenciando a solubilidade do aminoácido em água (CABALLERO; FINGLAS; TOLDRA, 2016)

Nutricionalmente, os aminoácidos podem ser classificados em não-essenciais e essenciais. Assim, enquanto a maioria das bactérias e plantas podem sintetizar todos os 21 aminoácidos, mamíferos só podem sintetizar 10. Aqueles que podem ser sintetizados são chamados aminoácidos não essenciais, enquanto aqueles para os quais uma via de síntese não existe e devem ser obtidos a partir de alimentos, são chamados aminoácidos essenciais (CABALLERO; FINGLAS; TOLDRA, 2016). Para o ser humano, é indispensável a aquisição por meio dos alimentos dos seguintes aminoácidos, denominados essenciais: isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano, histidina e valina (CABALLERO; FINGLAS; TOLDRA, 2016).

Além de ser a base estrutural das proteínas e de grande importância para o corpo humano, estudos consideram que os aminoácidos podem exercer outras funções no organismo, como fonte de produtos fisiológicos secundários relevantes, por exemplo, em casos de inflamação, a arginina é degradada em citrulina e óxido nítrico, que é então utilizado para sustentar o processo de inflamação (RUSCIANO et al., 2016). Kantorow et al. (2004) e Njie-Mbye et al. (2013) também relacionaram os aminoácidos com propriedades antioxidantes: a metionina e a cisteína funcionam como antioxidantes através da oxidação reversível das proteínas. Existem também dados pré-clínicos e clínicos sugerindo que um suprimento adicional de aminoácidos, seja sistêmico ou tóxico, pode ser útil para ajudar a melhorar o sistema ocular (RUSCIANO et al., 2016).

Devido à importância, são inúmeros os estudos relatando a presença de aminoácidos em diversas matrizes alimentares como: frutos, bebidas, tubérculos, carnes, ovos, leite, produtos lácteos e mel (KELLY; BLAISE; LARROQUE, 2010; PIMENTEL et al., 2014; ALI et al. 2016;

BORDIGA et al., 2016; MOTA et al., 2016; PÉREZ-MÍGUEZ; MARINA; CASTRO-PUYANA, 2016).

### *Aminoácidos em méis de abelhas sem ferrão*

A presença de aminoácidos em méis é atribuída tanto às abelhas quanto aos vegetais visitados, incluindo néctar, pólen, secreções das glândulas salivares e da faringe (ESCUREDO et al., 2013; SAK-BOSNAR; SAKAC, 2012), podendo representar cerca de 1% da massa dos méis (CAMPO et al., 2016).

Estudos relatam a presença dos aminoácidos em diferentes tipos de méis produzidos por abelhas *Apis Mellifera*, sendo a prolina, o principal aminoácido relatado, tanto em mel quanto em pólen (IGLESIAS et al., 2006; PARAMÁS et al., 2006). No mel, ela representa de 50 a 85% do total de aminoácidos (IGLESIAS et al., 2006; JANISZEWSKA; ANIOŁOWSKA; NOWAKOWSKI, 2012; PARAMÁS et al., 2006; TRUZZI et al., 2014). Considerando a origem nos méis, a prolina tem sido utilizada como critério de avaliação da maturação do mel e, em alguns casos, de adulterações com açúcares. Um valor mínimo de 180 mg kg<sup>-1</sup> é aceito como valor limite para o mel puro (MANZANARES et al., 2014; HERMOSÍN; CHICÓN; CABEZUDO, 2003).

Além de prolina, outros aminoácidos são encontrados em méis, sendo os mais comuns, ácido glutâmico, alanina, fenilalanina, tirosina, leucina e isoleucina (GIROLAMO; D'AMATO; RIGHETTI, 2012), variando sempre de acordo com a origem floral, geográfica e abelha produtora do mel (AZEVEDO et al., 2017).

Nos últimos anos, as investigações e sucessivas publicações dos perfis de aminoácidos em méis têm sido realizadas focando a discriminação de origens botânica e geográfica, para a possível discriminação entre tipos de mel, como por exemplo, méis florais e méis de melato. O crescente interesse pela discriminação de méis se deve ao valor comercial e as preferências dos consumidores (CAMPO et al., 2016; AZEVEDO et al., 2017; SUN et al., 2017).

Para méis de abelhas sem ferrão, até a data da presente revisão bibliográfica não foram encontrados relatos analíticos de identificação e quantificação de aminoácidos. A identificação dos aminoácidos faz parte de uma caracterização efetiva dos méis de abelhas sem ferrão a qual também poderia auxiliar na discriminação dos méis frente a méis de abelhas *Apis mellifera* ou indicar as possíveis origens botânicas e geográficas.

## REFERÊNCIAS

ABREU, T. S. Meliponário da serra. Disponível em: <<http://meliponariodaserra.blogspot.com.br/>>. Acesso em: 05 set. 2012.

ADAB. Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia. Portaria nº 207 de 21 de novembro de 2014. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel de Abelha social sem ferrão, gênero Melipona. **Decreto nº 9.023 de março de 2004** e Art. 174, Parágrafo Único, 26 de nov. 2014.

ADAPAR. Agência de Defesa Agropecuária do Paraná. Portaria nº 63 de 10 de março de 2017. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel de Abelhas sem ferrão para o estado do Paraná. **Decreto nº 94.377 de abril de 2012** e Art. 3º, Parágrafo Único, 16 de março. 2017.

ALBUQUERQUE, T.G. et al. Nutritional and phytochemical composition of *Annona cherimola* Mill. fruits and by-products: potential health benefits. **Food Chemistry**, v. 193, p. 187–195, 2016.

ALI, H.M. et al. The role of various amino acids in enzymatic browning process in potato tubers, and identifying the browning products. **Food Chemistry**, v. 192, p. 879–885, 2016.

ALQARNI, A. S. et al. Mineral content and physical properties of local and imported honeys in Saudi Arabia. **Journal of Saudi Chemical Society**, v.18, n.5, p. 618–625, 2014.

ALVAREZ-SUAREZ, J. M. et al. Phenolics from monofloral honeys protect human erythrocyte membranes against oxidative damage. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 1508–1516, 2012.

ALVAREZ-SUAREZ, J. M. et al. *Apis mellifera* vs *Melipona beecheii* Cuban polyfloral honeys: A comparison based on their physicochemical parameters, chemical composition and biological properties. **LWT-Food Science and Technology**, v. 87, p. 272-279, 2018.

AL-ZALABANI, A. H. et al. Modifiable risk factors for the prevention of bladder cancer: a systematic review of meta-analyses. **European Journal of Epidemiology**, v. 31, n.9, p. 811-851, 2016.

AMBRECHT, L. A. et al. Protection of retinal function by sulforaphane following retinal ischemic injury. **Experimental Eye Research**, v. 138, p. 66-69, 2015.

ANDERSEN, Ø. M.; MARKHAM, K. R. Flavonoids Chemistry, Biochemistry and Applications. In: \_\_\_\_ Separation and Quantification of Flavonoids. New York: **Taylor e Francis**, 2006. p. 1-37.

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

ARES, A. M. et al. Development and validation of a specific method to quantify intact glucosinolates in honey by LC-MS/MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 46, p. 114-122, 2016.

ARES, A. M. et al. Development and validation of a LC-MS/MS method to determine sulforaphane in honey. **Food Chemistry**, v. 181, p. 263-269, 2015.

AZEVEDO, M. S. Mel de melato de bracinga (*Mimosa scabrella Benth*) do planalto serrano de Santa Catarina: discriminação e potencialidade funcional. 2017, 201p. **Tese (Doutorado)** -Programa de Pós Graduação em Ciências dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2017.

AZEVEDO, M. S. et al. Free amino acid determination by GC-MS combined with a chemometric approach for geographical classification of bracinga honeydew honey (*Mimosa scabrella Benth*). **Food Control**, v. 78, p. 383-392, 2017.

AZEEM, S. et al. Diet and colorectal cancer risk in Asia: a systematic review. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 16, n.13, p. 5389-5396, 2015.

AZIZ, M. S. A et al. Pancreatoprotective effects of *Geniotrigona thoracica* stingless bee honey in streptozotocin-nicotinamide-induced

male diabetic rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 89, p. 135-145, 2017.

BADOLATO, M. et al. From the hive: honey, a novel weapon against cancer. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2017.

BAGHIANI, A. et al. Antioxidants, free radicals scavenging and xanthine oxidase inhibitory potentials of Ajugaiva L. extracts. **Free Radicals and Antioxidants**, v.1, n.4, p. 21–30, 2011.

BATISTA, B. L. et al. Multi-element determination in Brazilian honey samples by inductively coupled plasma mass spectrometry and estimation of geographic origin with data mining techniques. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 209–215, 2012.

BERTIN, R. L. et al. Mineral composition and bioaccessibility in *Sarcocornia ambigua* using ICP-MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 47, p. 45–51, 2016.

BERTONCEL, J. et al. Characterization of Slovenian honeys on the basis of sensory and physicochemical analysis with a chemometric approach. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 46, p. 1661-1671, 2011a.

BERTONCELJ, J. et al. LC-DAD-ESI/MS analysis of flavonoids and abscisic acid with chemometric approach for the classification of Slovenian honey. **Food Chemistry**, v. 127, p. 296-302, 2011b.

BHATIA, P. et al. Selenium bioaccessibility and speciation in biofortified *Pleurotus* mushrooms grown on selenium-rich agricultural residues. **Food Chemistry**, v.140, p. 225–230, 2013.

BILUCA, F.C. Caracterização química e influência do tratamento térmico em méis de abelhas sem ferrão (*Meliponinae* spp.) produzidos no estado de Santa Catarina. 2014. 112p. **Dissertação (Mestrado)** - Programa de Pós Graduação em Ciências dos alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2014.

BILUCA, F. C. et al. Phenolic compounds, antioxidant capacity and bioaccessibility of minerals of stingless bee honey (*Meliponinae*). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 63, p. 89-97, 2017.

BILUCA, F. C. et al. Physicochemical profiles, minerals and bioactive compounds of stingless bee honey (*Meliponinae*). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 50, p. 61-69, 2016.

BOGDANOV, S.; MARTIN, P.; LULLMANN, C. **Harmonised methods of the international honey commission**, Swiss Bee Research Centre, FAM, Liebefeld, 2002.

BONTÉA, F.; DESMOULIÈREB, A. Le miel: origine et composition. Honey: origin and composition. **Actualités Pharmaceutiques**, v.52, p. 18–21, 2013.

BORDIGA, M. et al. Factors influencing the formation of histaminol, hydroxytyrosol, tyrosol, and tryptophol in wine: temperature, alcoholic degree, and amino acids concentration. **Food Chemistry**, v.197, p. 1038–1045, 2016.

BORGES, G. C. da S. et al. Protective effect of *Euterpeedulis* M. on Vero cell culture and antioxidant evaluation based on phenolic composition using HPLC – ESI-MS/MS. **Food Research International**, v.51, p. 363-369, 2013.

BOSETTI, C. et al. Cruciferous vegetables and cancer risk in a network of case–control studies. **Annals of Oncology**, v. 23, n.8, p. 2198-2203, 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **LEI Nº 7.802, de 11 de julho de 1989**. Lei dos agrotóxicos. Brasília, 11 de julho de 1989.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000**. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel. MAPA, Brasília, 2000.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução nº 346, de 16 de agosto de 2004**. Disciplina a utilização das abelhas silvestres nativas, bem como a implantação de meliponários. CONAMA, Brasília, DF, 2004.

CABALLERO, B.; FINGLAS, P. M.; TOLDRA, F. **Encyclopedia of Food and Health**. Academic Press is an imprint of Elsevier, 2016.

CAMPBELL, I. Macronutrients, minerals, vitamins and energy. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, v.15, p.344–349, 2014.

CAMPO, D. G. et al. Quantitative determination of carboxylic acids, amino acids, carbohydrates, ethanol and hydroxymethylfurfural in honey by <sup>1</sup>H NMR. **Food Chemistry**, v. 196, p. 1031–1039, 2016.

CAN, Z. et al. An investigation of Turkish honeys: Their physico chemical properties, antioxidant capacities and phenolic profiles - **Food Chemistry**, v. 180, p. 133–141, 2015.

CARDOSO, C. et al. Bioaccessibility assessment methodologies and their consequences for the risk–benefit evaluation of food. **Trends in Food Science & Technology**, v. 41, n.1, p. 5–23, 2015.

CIPOA. Centro de Inspeção de Produtos de Origem Animal. **Resolução SAA - 52, de 03 outubro de 2017**. Regulamento técnico de identidade, o padrão de qualidade e os requisitos do processo de beneficiamento do mel, destinado ao consumo humano elaborado pelas abelhas da subfamília Meliponinae (Hymenoptera, Apidae), conhecidas como abelhas sem ferrão. Diário Oficial da União, São Paulo, 06 de out. 2017, Seção 1, p. 28.

CHAN, R.; LOK, K.; WOO, J. Prostate cancer and vegetable consumption. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 53, n.2, p. 201–216, 2009.

CHUTTONG, B. et al. Physicochemical profiles of stingless see (Apidae: Meliponini) honey from south sastia (Thailand). **Food Chemistry**, v. 192, p. 149–155, 2015.

CHUTTONG, B. et al. Physicochemical profiles of stingless bee (Apidae: Meliponini) honey from South East Asia (Thailand). **Food Chemistry**, v. 192, p. 149–155, 2016a.

CHUTTONG, B. et al. Effects of long term storage on stingless bee (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) honey. **Journal of Apicultural Research**, v. 54, n. 5, p. 441–451, 2016b.

CLARKE, D. B. Glucosinolates, structures and analysis in food. **Analytical Methods**, v. 2, n. 4, p. 310-325, 2010.

CODEX STAN 12. Codex AlimentariusComission. **Codex Standard for Honey**, v. 11, n. 12, p. 1-8, 2001. Disponível em:<[http://www.codexalimentarius.net/web/more\\_info.jsp?id\\_sta=310](http://www.codexalimentarius.net/web/more_info.jsp?id_sta=310)>. Acessoem: 18 ago. 2015.

COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de Nutrientes**. 3ª ed. Barueri, SP: Manole, 2009.

CZIPA, N.; ANDRÁSI, D.; KOVÁCS, B. Determination of essential and toxic elements in Hungarian honeys. **Food Chemistry**, v. 175, p. 536–542, 2015.

Da SILVA, I. A. A. et al. Phenolic profile, antioxidant activity and palynological analysis of stingless bee honey from Amazonas, Northern Brazil. **Food Chemistry**, v. 141, n.4, p. 3552–3558, 2013.

Da SILVA, R. P.F.F.; ROCHA-SANTOSA, T. A.P.; DUARTEA, A. C. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. **Trends in Analytical Chemistry**, v.76, p. 40–51, 2016.

DA SILVA, P. de L. M. et al. Comparative analysis of the volatile composition of honeys from Brazilian stingless bees by static headspace GC–MS. *Food Research International*, v. 102, p. 536-543, 2017.

DAS, A. et al. Evaluation of antioxidative, antibacterial and probiotic growth stimulatory activities of *Sesamum indicum* honey containing phenolic compounds and lignans. **LWT - Food Science and Technology**, v.61, p. 244–250, 2015.

De OLIVEIRA, F. A. et al. Evaluation of matrix effect on the determination of rare earth elements and As, Bi, Cd, Pb, Se and In in honey and pollen of native Brazilian bees (*Tetragonisca angustula*–Jataí) by Q-ICP-MS. **Talanta**, v. 162, p. 488-494, 2017.

De SOUSA, J. M. B. et al. Sugar profile, physicochemical and sensory aspects of monofloral honeys produced by different stingless bee species in Brazilian semi-arid region. **LWT-Food Science and Technology**, v. 65, p. 645-651, 2016.

DI BELLA, G. et al. Geographical discrimination of Italian honey by multi-element analysis with a chemometric approach. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.44, p. 25-35, 2015.

ELMER, W.H.; DATNOFF, L.E. Mineral nutrition and suppression of Plant Disease. **Encyclopedia of Agriculture and Food Systems**, p. 231-244, 2014.

ESCUREDO, O. et al. Nutritional value and antioxidant activity of honeys produced in a European Atlantic area. **Food Chemistry**, v. 138, n. 2-3, p. 851-856, 2013.

ESCUREDO, O. et al. Contribution of botanical origin and sugar composition of honeys on the crystallization phenomenon. **Food Chemistry**, v.149, p. 84-90, 2014.

ESCUREDO, O. et al. Near infrared spectroscopy applied to the rapid prediction of the floral origin and mineral content of honeys. **Food Chemistry**, v. 170, p. 47-54, 2015.

FERNÁNDEZ-LEÓN, A. M. et al. Quantification and bioaccessibility of intact glucosinolates in broccoli 'Parthenon' and Savoy cabbage 'Dama'. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 61, p. 40-46, 2017.

FERREIRA, I. C. F.R.; ABREU, R. M. V. Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. **Bioanálise**, n. 2, p. 32-39, 2007.

FONSECA, A. O. et al. Qualidade do mel de abelhas sem ferrão: uma proposta para boas práticas de fabricação. Cruz das Almas: Universidade Federal do Recôncavo, 2006.

FRAGA, C. G. et al. (Ed.). **Plant Phenolics and Human Health: Biochemistry, Nutrition and Pharmacology**. John Wiley & Sons, 2009.

FRANCHIN, M. et al. Geopropolis from *Meliponascutellaris* decreases the mechanical inflammatory hypernociception by inhibiting the production of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n.2, p. 709-715, 2012.

GIROLAMO, F. D.; D'AMATO, A.; RIGHETTI, P. G. Assessment of the floral origin of honey via proteomic tools. **Journal of Proteomics**, v. 75, p. 3688–3693, 2012.

GONÇALVES, E. C. B. A. **Análise de Alimentos: Uma Visão Química da Nutrição**. São Paulo: Varela, 2012.

GRY, J. et al. Euro FIR-BASIS e a combined composition and biological activity database for bioactive compounds in plant-based foods. **Trends in Food Science & Technology**, v.18, p. 434-444, 2007.

GUERRINI, A. et al. Ecuadorian stingless bee (Meliponinae) honey: A chemical and functional profile of an ancient health product. **Food Chemistry**. v.114, p.1413-1420, 2009.

HABIB, H.M. et al. Physicochemical and biochemical properties of honeys from arid regions. **Food Chemistry**, v. 153, p.35-43, 2014.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants – quo vadis?. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.32, n. 3, p.125-130, 2011.

HAMINIUK, C. W. I. et al. Phenolic compounds in fruits – an overview. **International Journal of Food Science and Technology**, v.47, p. 2023–2044, 2012.

HE, M.; KE, C.H.; WANG, W.X. Effects of cooking and subcellular distribution on the bioaccessibility of trace elements in two marine fish species. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v.58, p. 3517-3523, 2010.

HU, J. et al. Bioaccessibility, dietary exposure and human risk assessment of heavy metals from market vegetables in Hong Kong revealed with an in vitro gastrointestinal model. **Chemosphere**, v. 91, n. 4, p. 455-461, 2013.

HERMOSÍN, I.; CHICÓN, R. M.; CABEZUDO, M. D. Free amino acid composition and botanical origin of honey. **Food Chemistry**. v. 83, p. 263–268, 2003.

HORNERO-MÉNDEZ, D.; MÍNGUEZ-MOSQUERA, M. I. Bioaccessibility of carotenes from carrots: Effect of cooking and addition of oil. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.8, p. 407-412, 2007.

IGLESIAS, M. T. et al. Changes in the free amino acid contents of honeys during storage at ambient temperature. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 9099–9104, 2006.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V.I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v.126, n. 4, p.1821–1835, 2011.

ITAGIBA, M. et al, 2017. Ocorrência de larvas de mosca (Diptera - *Hermetia illucens*) em colônias de abelhas nativas *Tertragonisca angustula*. Disponível em: <<http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/91/artigo5.htm>> Acesso em: 16/10/2017.

IURLINA, M. O. et al. 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**, v. 115, n. 3, p. 1141-1149, 2009.

JAFFÉ, R. et al. Bees for development: Brazilian survey reveals how to optimize stingless bee keeping. **Plos One**, v.10, p.121-157, 2015.

JANISZEWSKA, K.; ANIOŁOWSKA, M.; NOWAKOWSKI, P. Free amino acids content of honeys from Poland. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 62, p. 85-89, 2012.

JIMENEZ, M. et al. Physicochemical and antioxidant properties of honey from *Scaptotrigona mexicana* bee. **Journal of Apicultural Research**, v. 55, n. 2, p. 151-160, 2016.

KANTOROW, M. et al. Methionine sulfoxide reductase A is important for lens cell viability and resistance to oxidative stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 26, p. 9654-9659, 2004.

KELLY, M.T.; BLAISE, A.; LARROQUE, M. Rapid automated high performance liquid chromatography method for simultaneous determination of amino acids and biogenic amines in wine, fruit and honey. **Journal of Chromatography A**, v.1217, n.47, p.7385–7392, 2010.

KHAN, S. U. et al. Honey: Single food stuff comprises many drugs. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2017.

KHOUZAM, R. B.; POHL, P.; LOBINSKI, R. Bioaccessibility of essential elements from white cheese, bread, fruit and vegetables. **Talanta**, v.86, p. 425– 428, 2011.

KOKOTOU, M. G. et al. High Resolution Mass Spectrometry Studies of Sulforaphane and Indole-3-carbinol in Broccoli. **Food Chemistry**, 2017.

KOWALSKI, S. Changes of antioxidant activity and formation of 5-hydroxymethylfurfural in honey during thermal and microwave processing. **Food Chemistry**, v.141, ed. 2, p.1378–138, 2013.

KOYYALAMUDIA, S. R. R. et al. Micronutrient mineral content of the fruiting bodies of Australian cultivated *Agaricus bisporus* white button mushrooms. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.31, p. 109–114, 2013.

KÜÇÜK, M. et al. Biological activities and chemical composition of three honeys of different typed from Anatolia. **Food Chemistry**, v.100, n. 2, p. 526-534, 2007.

LACHMAN, J. et al. Analysis of minority honey components: possible use for the evaluation of honey quality. **Food Chemistry**, v. 101, p. 973-979, 2007.

LEE, S.J. et al. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v.91, n.1, p.131-7, 2005.

LEMMENS, L. et al. Carotenoid bioaccessibility in fruit- and vegetable-based food products as affected by product (micro) structural

characteristics and the presence of lipids: A review Trends. **Food Science & Technology**, v.38, n.2 p. 125–135, 2014.

LEUFROY, A. et al. Use of a continuous leaching method to assess the oral bioaccessibility of trace elements in sea food. **Food Chemistry**, v.135, p. 623-633, 2012.

LIU, R.H.; FINLEY, J. Potential cell culture models for antioxidant research. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 53, p. 4311-4314, 2005.

MAGALHÃES, L. M. et al. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, v. 613, n. 1, p.1-19, 2008.

MANZANARES, A. Bentabol et al. Physicochemical characteristics of minor monofloral honeys from Tenerife, Spain. **LWT-Food Science and technology**, v. 55, n. 2, p. 572-578, 2014.

MARSANASCO, M. et al. Bioactive compounds as functional food ingredients: characterization in model system and sensory evaluation in chocolate milk. **Journal of Food Engineering**, v.166, p. 55–63, 2015.

MCCARTHY, A. L. et al. The hydroxycinnamic acid content of barley and brewers' spent grain (BSG) and the potential to incorporate phenolic extracts of BSG as antioxidants into fruit beverages. **Food Chemistry**, v. 141, p. 2567-2574, 2013.

MENEZES, C. et al. A Brazilian social see must cultivate fungus to survive. **Current Biology**, v. 25, p. 2851–2855, 2015.

MIR-MARQUÉS, A. et al. Mineral profile of kakifruits (*Diospyros kaki*L.). **Food Chemistry**, v. 172, p. 291-297, 2015.

MICHENER, C. **The Meliponini. Pot-honey: A legacy of stingless bees**, Springer, New York. pp. 1-18, 2013,

MOREDA-PIÑEIROA, J. et al. In-vivo and in-vitro testing to assess the bioaccessibility and the bioavailability of arsenic, selenium and mercury species in food samples. **Trends in Analytical Chemistry**, v.30, p. 324–345, 2011.

MOTA, C. et al. Protein content and amino acids profile of pseudocereals. **Food Chemistry**, v.193, p. 55-61, 2016.

NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e Criação de Abelhas Sem Ferrão**. São Paulo: Nogueirapis, 1997.

NJIE-MBYE, Y. F. et al. Lipid peroxidation: pathophysiological and pharmacological implications in the eye. **Frontiers in Physiology**, v. 4, 2013.

OGUZ, A. et al. The effects of sulforaphane on the liver and remote organ damage in hepatic ischemia-reperfusion model formed with pringle maneuver in rats. **International Journal of Surgery**, v. 18, p. 163-168, 2015.

OLIVEIRA, P. S. et al. Ácidos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante em méis de *Melipona fasciculata*, *M. flavolineata* (Apidae, Meliponini) e *Apis mellifera* (Apidae, Apini) da Amazônia. **Química Nova**, v. 35, n.9, p. 1728-1732, 2012.

OLIVEIRA, F. F. et al. **Guia Ilustrado das Abelhas “Sem-Ferrão” das Reservas Amanã e Mamirauá, Brasil (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)**. Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, Amazônia, Tefé: IDSM, 2013.

OROIAN, M; ROPCIUC, S. Honey authentication based on physicochemical parameters and phenolic compounds. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 138, p. 148-156, 2017.

OSÉS, S. M. et al. Bioactive properties of honey with propolis. **Food Chemistry**, v. 196, p. 1215-1223, 2016.

PARAMÁS, A. M. G. et al. HPLC-fluorimetric method for analysis of amino acids in products of the hive (honey and bee-pollen). **Food Chemistry**, v. 95, p. 148–156, 2006.

PÉREZ-PÉREZ, E.; VIT, P.; HUQ, F. Flavonoids and polyphenols in studies of honey antioxidant activity. **Int J Med Plant Altern Med**, v. 1, p. 63-72, 2013.

PÉREZ-MÍGUEZ, R.; MARINA, M.L.; CASTRO-PUYANA, M. Capillary electrophoresis determination of non-protein amino acids as quality markers in foods. **Journal of Chromatography A**, v.1428, p.97-114, 2016.

PASIAS, I. N.; KIRIAKOU, I. K.; PROESTOS, C. HMF and diastase activity in honeys: a fully validated approach and a chemometric analysis for identification of honey freshness and adulteration. **Food Chemistry**, v. 229, p. 425-431, 2017.

PIMENTEL, F. B. et al. Phenylketonuria: Protein content and amino acids profile of dishes for phenylketonuric patients. The relevance of phenylalanine. **Food Chemistry**, v.149, p.144-150, 2014.

POHL, P. et al. Bioaccessibility of Ca, Cu, Fe, Mg, Mn and Zn from commercial bee honeys. **Food Chemistry**, v.134, p. 392- 396, 2012.

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

RAMÓN-SIERRA, J. M. et al. Electrophoresis characterisation of protein as a method to establish the entomological origin of stingless bee honeys. **Food Chemistry**, v.183, p. 43-48, 2015.

RANNEH, Y. et al. Malaysian stingless bee and Tualang honeys: a comparative characterization of total antioxidant capacity and phenolic profile using liquid chromatography-mass spectrometry. **LWT-Food Science and Technology**, 2018.

RAO, P. V. et al. Biological and therapeutic effects of honey produced by honey bees and stingless bees: a comparative review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 5, p. 657-664, 2016.

RASHED, M. N.; SOLTAN, M. E. Major and trace elements in different types of Egyptian mono-floral and non-floral bee honeys. **Journal of Food Composition and Analysis, Maryland Heights**, v.17, p. 725-735, 2004.

RICE-EVANS, C. A.; PACKER, L. Flavonoids in Health and Disease. In: \_\_\_\_\_. Annie Fleuriet. A., Macheix. J-J. **Phenolic Acids in Fruits and Vegetables**. New York: Marcel Dekker. p.1- 43,2003.

RIZELIO, V. M. et al. Fast determination of cations in honey by capillary electrophoresis: a possible method for geographic origin discrimination original research article. **Talanta**, v.99, p. 450-456, 2012.

RODRÍGUEZ-ROQUE, M. J. et al. Soymilk phenolic compounds, isoflavones and antioxidant activity as affected by in vitro gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v.136 p. 206–212, 2013.

ROSA, C. G. Microencapsulação de extratos metanólicos de amora-preta (*rubus fruticosus*) e ácido gálico. 2012. 112 f. **Dissertação** (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 2012.

RUSCIANO, D. et al. Free amino acids: an innovative treatment for ocular surface disease. **European Journal of Pharmacology**, v. 787, p. 9-19, 2016.

SAK-BOSNAR, M.; SAKAČ, N. Direct potentiometric determination of diastase activity in honey. **Food Chemistry**, v. 135, n. 2, p. 827-831, 2012.

SAKAČ, N; SAK-BOSNAR, M. A rapid method for the determination of honey diastase activity. **Talanta**, v.93, p. 135–138, 2012.

SCHULZ, M. et al. Bioaccessibility of bioactive compounds and antioxidant potential of juçara fruits (*Euterpe edulis Martius*) subjected to in vitro gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 228, p. 447-454, 2017.

SERAGLIO, S. K. T. et al. Development and validation of a LC-ESI-MS/MS method for the determination of phenolic compounds in honeydew honeys with the diluted-and-shoot approach. **Food Research International**, v. 87, p. 60-67, 2016.

SERAGLIO, S. K. T. et al. Effect of in vitro gastrointestinal digestion on the bioaccessibility of phenolic compounds, minerals, and

antioxidant capacity of *Mimosa scabrella* Bentham honeydew honeys. **Food Research International**, 2017.

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

SILVA, J. A. F. et al. Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. **Química Nova**, v. 30, p. 740-744, 2007.

SILVA, T. M. S. et al. Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaira (*Melipona subnitida*) honey. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 29, p.10–18, 2013.

SOBRINO-GREGORIO, L. et al. Thermal properties of honey as affected by the addition of sugar syrup. **Journal of Food Engineering**, 2017.

SOUSA, J. M. B. et al. Aspectos físico-químicos e perfil sensorial de méis de abelhas sem ferrão da região do Seridó, Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Ciências Agrárias**, v. 34, n. 4, p. 1765-1774, 2013.

SOUZA, B. A. et al. Composition of stingless bee honey: setting quality standards. **Interciencia**, v. 31, n. 12, 2006.

SUN, Z. et al. Identification of botanical origin of Chinese unifloral honeys by free amino acid profiles and chemometric methods. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, 2017.

TOKALIOĞLU, S. et al. Bioaccessibility of Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo: Se and Zn from nutritional supplements by the unified BARGE method. **Food Chemistry**, v.150, p. 321-327, 2014.

TORNUKA, F. et al. Quality characterization of artisanal and retail Turkish blossom honeys: determination of physicochemical, microbiological, bioactive properties and aroma profile. **Industrial Crops and Products**, v. 46, p.124–131, 2013.

TRIPATHI, M. K.; MISHRA, A. S. Glucosinolates in animal nutrition: A review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 132, n. 1, p. 1-27, 2007.

TRUCHADO, P. et al. Identification of botanical biomarkers in Argentinean Diplotaxis honeys: flavonoids and glucosinolates. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, n. 24, p. 12678-12685, 2010.

TRUZZI, C. et al. Determination of proline in honey: Comparison between official methods, optimization and validation of the analytical methodology. **Food Chemistry**, v. 150, p. 477-481, 2014.

USP- Laboratório de abelha da Universidade de São Paulo - LA/ USP- Disponível em: < <http://ecologia.ib.usp.br/beelab>> Acesso em: 23 de set 2015.

VENTURIERI, G. A. et al. **Caracterização, colheita, conservação e embalagem de méis de abelhas indígenas sem ferrão**. Belém: EMBRAPA Amazônia Oriental, 2007.

VILLAS-BÔAS, J. **Manual Tecnológico: Mel de Abelhas sem Ferrão**. Brasília: Instituto Sociedade, População e Natureza (ISPAN), 2012.

VIT, P.; MEDINA, M.; ENRIQUEZ, M. E. Quality standards for medicinal uses of Meliponinae honey in Guatemala, Mexico and Venezuela. **Bee World**, v.85, n. 1, p. 2 - 5, 2004.

VIT, P.; PEDRO, S. R. M.; ROUBIK, D. W. **Pot-honey a legacy of stingless bees**. New York: Springer, 2013.

WANGA, T.; HE, F.; CHEN, G. Improving bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds in cereal grains through processing technologies: a concise review. **Journal of Functional Foods**, v.7, p. 101-111, 2014.

WICZK, A. et al. Sulforaphane, a cruciferous vegetable-derived isothiocyanate, inhibits protein synthesis in human prostate cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Molecular Cell Research**, v. 1823, n. 8, p. 1295-1305, 2012.

WU, Q. J. et al. Pre-diagnostic cruciferous vegetables intake and lung cancer survival among Chinese women. **Scientific Reports**, v. 5, 2015.

WU, X. et al. Challenges of developing a valid dietary glucosinolate database. **Journal of Food Composition and Analysis**, 2017.

YAACOB, M et al. Stingless bee honey and its potential value: a systematic review. **Food Research**, v.2 n.2. p.124-133. 2018.

ZHAO, J. et al. Identification of monofloral honeys using HPLC–ECD and chemometrics. **Food Chemistry**, v. 194, p.167–174, 2016.

ZHENG, F.Y. et al. Effect of edible plants combination on mineral bioaccessibility and bioavailability, using in vitro digestion and liposome-affinity extraction. **Food Research International**, v.53, p. 174–179, 2013.

## CAPÍTULO 2

### **MÉIS DE ABELHAS SEM FERRÃO (*Meliponinae*): CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE**

Os resultados do presente capítulo junto a outros resultados não apresentados neste trabalho de tese, foram publicados em: BILUCA, F. C.; Braghin, F.; Gonzaga, L.V.; Costa, A. C. O.; Fett, R. Physicochemical profiles, minerals and bioactive compounds of stingless bee honey (*Meliponinae*). *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 50, p. 61-69, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.05.007>

## RESUMO

Neste estudo foram avaliados os padrões de identidade e qualidade (umidade, acidez livre, pH, teor de 5-HMF, atividade diastásica, frutose, glicose, sacarose, condutividade elétrica), bem como a presença de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante (DPPH e FRAP) de 20 amostras de méis de abelhas sem ferrão (*Meliponinae*) provenientes do estado de Santa Catarina, Brasil. Com relação aos parâmetros de identidade e qualidade, os méis demonstraram valores que variaram entre: umidade de 23,74 a 43,53% (m/m); sólidos solúveis de 55,16 a 75,00 em °Brix; acidez livre de 21,36 a 106,01 mEq kg<sup>-1</sup>; pH de 3,33 a 4,56; atividade diastásica < 3 a 13,40 un. Göthe; condutividade elétrica de 0,16 a 0,84 mS cm<sup>-1</sup>; açúcares: frutose de 30,44 a 46,02% (m/m) e glicose de 20,41 a 31,31% (m/m); sacarose e 5-HMF, apresentaram concentrações abaixo dos limites de quantificação (LOQ = 0,074 e 0,310 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente) para todas as amostras. As amostras analisadas apresentaram relevante conteúdo de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante, quando comparado aos méis de abelhas *Apis mellifera* descritos na literatura. O estudo revelou variações significativas nas características das amostras, uma vez que essas podem ser influenciadas pela origem botânica, geográfica e espécie de abelha. Os resultados obtidos também confirmam que as exigências da legislação brasileira (*Apis mellifera*), não atendem à totalidade das características dos méis de abelhas sem ferrão, especialmente para os parâmetros de umidade, açúcares, atividade diastásica e acidez, ressaltando a necessidade de uma normativa específica.

**Palavras-chave:** Mel. Propriedades físico-químicas. Umidade. Acidez livre. Capacidade antioxidante,

## 1 INTRODUÇÃO

Existem mais de 500 espécies de abelhas sem ferrão identificadas em todo o mundo, pertencentes à espécie *Meliponinae* (MICHENER, 2013). As abelhas sem ferrão possuem características distintas do gênero *Apis* e *Bombus*, especialmente em relação à morfologia (ausência de ferrão), coleta de néctar de plantas rasteiras, voos curtos em busca de alimento, construção de colmeias em posição horizontal sem elaboração de favos para o armazenamento de néctar e pólen (VIT; PEDRO; ROUBIK et al., 2013).

Além de serem excelentes polinizadores, essenciais em ecossistemas tropicais e subtropicais (ROUBIK et al., 1997), as abelhas sem ferrão armazenam e modificam quimicamente néctares florais que resultam na produção de mel popularmente conhecido por seu sabor e aroma distinto, com uma textura mais fluida e cristalização lenta. Este mel é apreciado pelos consumidores em todo o mundo, o que o torna comercialmente mais valioso (Da SILVA et al., 2013).

Devido ao conhecimento insuficiente da composição dos méis de abelhas sem ferrão, existe uma escassez de padrões de identidade e qualidade, uma vez que esses méis diferem das normas estabelecidas pelos padrões nacionais (BRASIL, 2000) e internacionais (Codex Alimentarius, 2001), específicos para o mel de *Apis mellifera* (SILVA et al., 2013, RAMÓN-SIERRA et al., 2015; CHUTTONG et al., 2016a).

No Brasil, onde se concentra a maior diversidade dessas abelhas (JAFFÉ et al., 2015), a caracterização do mel já está sendo realizada em algumas regiões (De SOUSA et al., 2016), mas estudos que usam diferentes espécies, grandes quantidades de amostras, com diferentes regiões e floradas, ainda são escassos, limitando assim, a efetiva elaboração de uma padronização, regulamentação e conhecimento da composição do mel, o que dificulta a sua comercialização.

Apesar da composição majoritária de açúcares (frutose e glicose) e água, o mel proveniente de abelhas sem ferrão também contém pequenas quantidades de outros compostos, tais como ácidos orgânicos, compostos fenólicos (ácidos fenólicos e flavonóides), proteínas, aminoácidos, enzimas, vitaminas e minerais (CHUTTONG et al., 2016a).

Estudos têm relatado que o mel de abelhas sem ferrão tem capacidade antioxidante significativa, destacando a presença de compostos fenólicos (RAO et al., 2016; RANNEH et al., 2018). No entanto, estudos da estimativa da capacidade antioxidante de méis de abelhas sem ferrão foram relatados apenas por Da Silva et al. (2013) em

mel de Jandaíra (*Melipona subnitida*) coletadas no Brasil, Guerrini et al. (2009) em mel de três espécies de abelhas sem ferrão coletadas no Equador e recentemente por Ranneh et al. (2018) em méis da Malásia.

O aumento da produção dos méis dessas abelhas e a perspectiva de um mercado mais amplo para os produtos naturais sugerem a necessidade de investigação da composição do mel variabilidade de espécies e outros fatores que podem influenciar as suas características tais como a florada predominante e origem geográfica. É necessário ainda o estabelecimento de parâmetros para proteger o consumidor contra a fraude, garantindo a qualidade do produto. Sendo assim, este estudo tem como objetivo investigar as propriedades físico-químicas, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante de 20 amostras de mel provenientes de oito espécies diferentes de abelhas sem ferrão produzidas no estado de Santa Catarina, Brasil.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Material**

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Os reagentes hidróxido de sódio, cloreto de sódio, acetato de sódio, amido solúvel, iodo, ácido ascórbico, cloreto férrico, sulfato ferroso, ácido gálico, carbonato de sódio, frutose, glicose, sacarose e metanol foram obtidos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil).

O dodecil-sulfato de sódio (SDS), tetraborato de sódio (TBS), brometo de cetil-trimetil-amônio (CTBA), ácido sórbico, cafeína, reagente de Folin-Ciocalteu, 2,4,6-tris-(2-piridil)-1,3,5-triazina (TPTZ), 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e 5-hidroximetilfulfural (5-HMF) foram obtidos da Sigma Aldrich (Santa Ana, EUA). A água utilizada foi filtrada por sistema de desionização (desionizador Milli-Q, Millipore, Bedford, EUA).

Os instrumentos empregados foram: eletroforese capilar modelo 7100 (Agilent Technologies, Palo Alto, EUA), espectrofotômetro SB 1810-S (Spectro Vision, Beijing, China), condutivímetro Tec-4MP (Tecnal, São Paulo, Brasil), pHmetro DM-20 (Digimed, Mato Grosso do Sul, Brasil), ultrassom (Cristófoli, Paraná, Brasil), centrífuga MiniSpin plus® (Eppendorff™, Hamburg, Alemanha), balança analítica AB204-S (Mettler Toledo, São Paulo, Brasil), purificador de água Simplicity UV (sistema Milli - Q, Millipore, Bedford, Massachusetts, EUA), banho de água Depron/DBM (Benfer do Brasil, São Paulo, Brasil) e vórtex 772 (Fisatom, São Paulo, Brasil).

## 2.2 Amostras

Foram analisadas 20 amostras de méis, as quais foram obtidas através de parcerias com meliponicultores do estado de Santa Catarina. Amostras provenientes dos municípios de São Miguel do Oeste e Santa Rosa de Lima (2 localidades: Rio do Meio e Nova Fatima) foram coletadas nas safras de 2013/2014 e 2014/2015. A descrição das espécies, a origem botânica predominante e os municípios estão descritas na Tabela 2.1. As informações referentes às amostras foram descritas pelo médico veterinário Luiz M. R. dos Santos, o meliponicultor Cleumar Liebert e o extensionista da EPAGRI-SC, Carlos A. Paganini. Todas as amostras foram coletadas e armazenadas em frascos de polipropileno (tipo Falcon) e transportadas em caixas isotérmicas ao Laboratório de Química de Alimentos do CCA - UFSC, onde foram mantidas a  $-18 \pm 2$  °C até o momento das análises.

Tabela 2.1 – Identificação das espécies de abelhas sem ferrão (*Meliponinae*), origem botânica e municípios de origem das amostras.

Amostras	Nome Popular	Nome científico	Origem botânica - Nome científico	Origem *
A	Guaraipo	<i>Melipona Bicolor</i>	<i>Eucalyptus spp. e Mimosa bimucronata</i>	N F
B	Guaraipo	<i>Melipona Bicolor</i>	<i>Eucalyptus spp.</i>	N F
C	Tubuna	<i>Scaptotrigona Bipunctata</i>	Silvestre	N F
D	Tubuna	<i>Scaptotrigona Bipunctata</i>	<i>Eucalyptus spp.</i>	N F
E	Mandaçaia	<i>Melipona quadrfaciata anthidioides</i>	<i>Citrussinensis</i>	N F
F	Mandaçaia	<i>Melipona quadrfaciata anthidioides</i>	<i>Hoveni aduclis</i>	N F
G	Mandaçaia	<i>Melipona quadrfaciata anthidioides</i>	<i>Eucalyptus spp.</i>	N F
H	Mandaçaia	<i>Melipona quadrfaciata anthidioides</i>	<i>Mimosa bimucronata</i>	N F
I	Mandaçaia	<i>Melipona quadrfaciata anthidioides</i>	<i>Citrussinensis</i>	N F
J	Mandaçaia	<i>Melipona quadrfaciata anthidioides</i>	<i>Hoveniaduclis e Vernonanthuradis color</i>	R M
K	Mandaçaia	<i>Melipona quadrfaciata anthidioides</i>	Silvestre	R M
L	Mandaçaia	<i>Melipona quadrfaciataanthidioides</i>	Silvestre	N F
M	Manduri	<i>Melipona Marginata</i>	<i>Heliconiavellozianae watsoniameriana</i>	R M
N	Manduri	<i>Melipona Marginata</i>	<i>Eucalyptus spp.</i>	N F
O	Manduri	<i>Melipona Marginata</i>	<i>Hoveniaduclis e Vernonanthuradis color</i>	R M
P	Manduri	<i>Melipona Marginata</i>	<i>Mimosa bimucronata</i>	N F
Q	Jataí	<i>Tetragonisca angustula angustula</i>	Silvestre	N F
R	Mumbuca	<i>Trigona fuscipennis</i>	Silvestre	SMO
S	Mandaçaia	<i>Melipona quadrfaciata anthidioides</i>	<i>Hoveniaduclis e Vernonanthuradis color</i>	N F
T	Bugia	<i>Melipona mondury</i>	<i>Eucalyptus spp.</i>	N F

\*Município: SMO = São Miguel do Oeste, NF = Nova Fátima, RM = Rio do Meio. Fonte: próprio auto

## 2.3 Parâmetros de identidade e qualidade

### 2.3.1 Umidade

A umidade do mel foi determinada por um refratômetro Abbé, método 969.38 AOAC, 2005, utilizando a refratometria Abbé. Todas as medidas foram realizadas a 20 °C ou aplicado o método de correção de + ou - 0,00023 para cada grau de temperatura diferente.

### 2.3.2 Sólidos solúveis totais

Os sólidos solúveis totais (°Brix) foram determinados na mesma condição analítica descrita em 2.3.1, através de leitura no refratômetro de Abbé, em temperatura ambiente, segundo o método 932.12 AOAC, 2005.

### 2.3.3 Condutividade elétrica

A condutividade elétrica foi determinada em solução de mel a 20% (m/v) em água desionizada a 25 °C, com auxílio de condutivímetro. Os resultados foram obtidos diretamente no equipamento previamente calibrado e expressos em mS cm<sup>-1</sup> (AOAC, 2005).

### 2.3.4 Acidez livre e pH

A acidez livre e o pH foram medidos de acordo com o método 962.19 AOAC, 2005. O pH das amostras foi determinado em solução 10% (mel/água), com auxílio de pHmetro, previamente calibrado com solução padrão/tampão.

A análise de acidez livre foi realizada por neutralização de uma massa conhecida de mel com solução padronizada de NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> em volume suficiente para atingir o pH 8,5. O valor da acidez livre foi calculado e os resultados expressos em mEq kg<sup>-1</sup>.

### 2.3.5 Açúcares

Os açúcares frutose, glicose e sacarose foram determinados através do método indireto de eletroforese capilar (EC) descrito por Rizelio et al. (2012a), com eletrólito de corrida composto por 20 mmol L<sup>-1</sup> de ácido sórbico, 0,2 mmol L<sup>-1</sup> de CTAB e 40 mmol L<sup>-1</sup> de NaOH, com pH final de 12,2. O capilar utilizado continha 60 cm de

comprimento total, 8,5 cm de comprimento efetivo e 50  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno. A injeção foi realizada pelo modo hidrodinâmico (-50 mbar, 3 s), e a voltagem aplicada foi de 25 kV. A temperatura foi mantida a 25 °C, com detecção indireta a 254 nm. Os resultados foram expressos em percentagem (% m/m) (RIZELIO et al., 2012a).

### 2.3.6 5- Hidroximetilfulfural

O teor de 5-HMF foi determinado segundo metodologia descrita por Rizelio et al. (2012b), utilizando método de MEKC (*do inglês Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography*). As condições do método foram: eletrólito de corrida, composto de TBS 5 mmol L<sup>-1</sup> e SDS 120 mmol L<sup>-1</sup>, em pH 9,3; capilar de 32 cm de comprimento total, 8,5 cm de comprimento efetivo e 50  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno; injeção por modo hidrodinâmico a -50 mbar durante 3 segundos; voltagem de -15 kV; temperatura de 25°C; e detecção direta a 284 nm. Os resultados foram expressos em mg kg<sup>-1</sup>.

### 2.3.7 Atividade diastásica

A medida da atividade diastásica seguiu o protocolo 920.180 da AOAC (2005), onde uma solução tamponada de amido e mel foi mantida em banho de água (40 °C) por tempo necessário para obtenção de absorbância igual ou inferior a 0,235. Com os valores obtidos, foi construído um gráfico da absorbância *versus* o tempo, para o cálculo de  $t_x$ . A atividade diastásica foi então obtida com o quociente  $300/t_x$ , e o número resultante expresso em atividade diastásica como sendo o volume em mL de solução de amido a 1% hidrolisada pelas enzimas presentes em 1 g de mel, em 60 minutos e expresso em unidades Göthe.

## 2.4 Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante

As soluções das amostras utilizadas nas determinações de fenólicos totais, DPPH e FRAP foram preparadas com 2,5 g de mel diluídos com água desionizada e avolumados para 5 mL.

O conteúdo de fenólicos totais da solução de mel foi determinado pelo método espectrofotométrico com reativo de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965), com leituras realizadas a 765 nm e os resultados expressos em miligrama equivalente ao ácido gálico (mg EAG 100 g<sup>-1</sup> de mel).

A capacidade antioxidante foi avaliada através de diferentes métodos, envolvendo princípios e condições experimentais distintas: o método de DPPH, descrito por o Brand-Williams, Cuverlier e Berset (1995) e o método do poder redutor do ferro (FRAP), descrito por Benzie e Strain (1996), modificado por Bertoncej et al. (2007).

O radical DPPH foi preparado, na concentração de  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ , em metanol. Essa solução foi diluída até atingir absorvância inicial de  $0,800 \pm 2$  em 515 nm. Em uma série de três (células de 1 cm de caminho ótico), foram lidas as absorvâncias de 2,9 mL da solução de DPPH ( $t_{0\text{min}}$ ) e, em seguida, adicionados 100  $\mu\text{L}$  da solução de mel a cada célula. A mistura foi homogeneizada e mantida ao abrigo da luz a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  por 30 minutos, e logo após, as absorvâncias foram novamente medidas ( $t_{30\text{min}}$ ). As percentagens de inibição dos radicais foram calculadas através da Equação 1:

$$\text{Inibição \%} = (1 - A_{30}/A_0) \times 100 \quad (1)$$

Uma curva padrão foi preparada utilizando ácido ascórbico ( $80 - 720 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ), e os resultados expressos em miligramas equivalentes a ácido ascórbico (mg EAA) por 100 g de mel (BRAND-WILLIAMS; CUVERLIER; BERSSET, 1995).

Para avaliação do poder redutor de ferro, foi aplicado o reagente de FRAP, o qual consiste em uma solução contendo uma parte de TPTZ ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ) em HCl ( $40 \text{ mmol L}^{-1}$ ), uma parte de  $\text{FeCl}_3$  ( $20 \text{ mmol L}^{-1}$ ), e dez partes de tampão acetato de sódio  $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 3,6, preparado diariamente. Alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  da solução de mel foram adicionadas em 1,8 mL do reagente de FRAP, mantidas ao abrigo da luz por 10 minutos em banho de água a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . A seguir as absorvâncias foram medidas a 594 nm e os resultados calculados frente ao padrão de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $25 - 600 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ) aplicado na preparação da curva de calibração. Os resultados obtidos foram expressos em  $\mu\text{mols}$  equivalentes a Fe (II) por 100 g de mel (BENZIE; STRAIN, 1996; BERTONCELJ et al., 2007).

## 2.5 Análise estatística

Todas as análises foram conduzidas em triplicata e os dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), ao nível de 5% de significância seguida pelo teste de Tukey para comparação das médias. A correlação entre a capacidade antioxidante e o conteúdo de compostos fenólicos totais foi

avaliada através da análise de regressão linear simples. O *software* Statistic 13.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK) foi utilizado para aquisição e tratamento de dados.

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1 Parâmetros de identidade e qualidade**

Os resultados dos parâmetros de identidade e qualidade (umidade, sólidos solúveis totais em °Brix, condutividade elétrica, acidez livre e pH), das 20 amostras de méis de abelhas sem ferrão analisadas, estão ilustrados na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 – Características de identidade e qualidade determinadas nas amostras de méis de abelhas sem ferrão (*Meliponinae*).

Amostra	Umidade % (m/m)	°Brix (%)	Condutividade Elétrica (mS cm <sup>-1</sup> )	Acidez livre (mEq kg <sup>-1</sup> )	pH
A	35,45 ± 0,75 <sup>e</sup>	63,60 ± 0,52 <sup>j</sup>	0,59 ± 0,01 <sup>h</sup>	72,02 ± 2,39 <sup>b</sup>	3,77 ± 0,01 <sup>f</sup>
B	37,32 ± 0,25 <sup>e,d</sup>	61,40 ± 0,17 <sup>k</sup>	0,61 ± 0,01 <sup>f</sup>	63,28 ± 2,39 <sup>d</sup>	3,67 ± 0,02 <sup>g</sup>
C	24,87 ± 0,25 <sup>n</sup>	74,00 ± 0,17 <sup>b</sup>	0,60 ± 0,01 <sup>g</sup>	56,70 ± 0,01 <sup>f</sup>	4,20 ± 0,01 <sup>b,c</sup>
D	38,30 ± 0,25 <sup>d</sup>	60,70 ± 0,23 <sup>k</sup>	0,69 ± 0,00 <sup>c</sup>	44,17 ± 2,75	4,50 ± 0,02 <sup>b</sup>
E	25,91 ± 0,24 <sup>m</sup>	72,90 ± 0,17 <sup>c</sup>	0,22 ± 0,01 <sup>m</sup>	24,17 ± 0,61 <sup>l,m</sup>	3,64 ± 0,03 <sup>g</sup>
F	35,58 ± 0,43 <sup>e</sup>	63,43 ± 0,50 <sup>j</sup>	0,21 ± 0,01 <sup>n</sup>	38,83 ± 0,66 <sup>i</sup>	3,33 ± 0,01 <sup>m</sup>
G	41,99 ± 0,26 <sup>b</sup>	56,90 ± 0,01 <sup>l</sup>	0,83 ± 0,02 <sup>a</sup>	106,01 ± 1,37 <sup>a</sup>	3,73 ± 0,01 <sup>f,e</sup>
H	43,53 ± 0,26 <sup>a</sup>	55,16 ± 0,23 <sup>l</sup>	0,70 ± 0,01 <sup>b</sup>	60,15 ± 0,67 <sup>e</sup>	3,77 ± 0,01 <sup>f</sup>
I	32,52 ± 0,01 <sup>h</sup>	66,50 ± 0,01 <sup>h</sup>	0,16 ± 0,01 <sup>p</sup>	21,36 ± 0,20 <sup>n</sup>	3,45 ± 0,01 <sup>j,k</sup>
J	29,23 ± 0,24 <sup>j</sup>	69,70 ± 0,17 <sup>f</sup>	0,16 ± 0,01 <sup>p</sup>	22,29 ± 0,02 <sup>m,n</sup>	3,53 ± 0,02 <sup>i</sup>
K	28,25 ± 0,42 <sup>k</sup>	70,53 ± 0,42 <sup>e</sup>	0,23 ± 0,01 <sup>l</sup>	29,67 ± 0,12 <sup>j</sup>	3,56 ± 0,02 <sup>h,i</sup>
L	33,65 ± 0,25 <sup>g</sup>	65,17 ± 0,58 <sup>i</sup>	0,17 ± 0,01 <sup>o</sup>	26,09 ± 0,31 <sup>k</sup>	3,37 ± 0,01 <sup>l,m</sup>
M	28,25 ± 0,42 <sup>k</sup>	70,60 ± 0,45 <sup>e</sup>	0,30 ± 0,01 <sup>ij</sup>	73,32 ± 1,53 <sup>b</sup>	3,50 ± 0,01 <sup>ij</sup>
N	38,20 ± 0,25 <sup>d</sup>	60,50 ± 0,17 <sup>k</sup>	0,27 ± 0,01 <sup>k</sup>	42,44 ± 0,62 <sup>h</sup>	3,90 ± 0,03 <sup>d</sup>
O	32,03 ± 0,00 <sup>h</sup>	66,90 ± 0,01 <sup>h</sup>	0,63 ± 0,01 <sup>d</sup>	70,80 ± 0,72 <sup>c</sup>	3,42 ± 0,06 <sup>k,l</sup>
P	30,35 ± 0,42 <sup>i</sup>	68,53 ± 0,45 <sup>g</sup>	0,30 ± 0,01 <sup>ji</sup>	56,39 ± 0,01 <sup>f</sup>	3,37 ± 0,03 <sup>l,m</sup>
Q	23,74 ± 0,01 <sup>o</sup>	75,00 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,57 ± 0,01 <sup>i</sup>	31,43 ± 0,85 <sup>j</sup>	4,24 ± 0,01 <sup>c</sup>
R	34,44 ± 0,25 <sup>f</sup>	64,47 ± 0,12 <sup>i</sup>	0,31 ± 0,01 <sup>j</sup>	46,71 ± 0,27 <sup>g</sup>	3,44 ± 0,04 <sup>i,k</sup>
S	27,15 ± 0,23 <sup>l</sup>	71,76 ± 0,23 <sup>d</sup>	0,16 ± 0,01 <sup>p</sup>	22,33 ± 1,00 <sup>m,n</sup>	3,60 ± 0,01 <sup>g,h</sup>
T	29,92 ± 0,01 <sup>ji</sup>	69,10 ± 0,23 <sup>f</sup>	0,84 ± 0,01 <sup>a</sup>	16,20 ± 3,30 <sup>o</sup>	6,56 ± 0,03 <sup>a</sup>

Valores expressos como média ± desvio padrão. <sup>a-l</sup> Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as médias de acordo com teste de Tukey (p < 0,05). Letras de A-T: amostras de mel de abelhas sem ferrão descritas na Tabela 2.1. Fonte: próprio autor.

### 3.1.1 Umidade

O teor de umidade encontrado nas amostras analisadas variou de 23,74 a 43,53% (m/m). Os resultados apresentados na Tabela 2.2, indicam diferença estatística significativa para os teores de umidade, onde os maiores valores foram encontrados nas amostras H e G produzidas pela mesma espécie de abelha (*Melipona quadrifaciata anthidioides*) e ambas de mesma origem geográfica, porém, provenientes de origem botânica distinta (predominância de *Mimosa bimucronata* e *Eucalyptus* spp., respectivamente). Os menores valores foram encontrados nas amostras Q e C, procedentes de abelhas e origem botânica distinta, mas ambas da mesma localidade.

Todas as amostras apresentaram valores superiores aos preconizados pela legislação brasileira, que dispõe valor máximo de 20% (m/m) de umidade para méis de abelha *Apis mellifera* (BRASIL, 2000). A diferença no teor de umidade pode estar relacionada à baixa taxa de desidratação do néctar durante o processamento de transformação do mel, entre outros fatores, como coletas de néctar das flores mais rasteiras e de frutos maduros, ricos em água, ou pode ter relação com as características específicas das espécies de abelhas (VIT; PEDRO; ROUBIK, 2013).

Os teores de umidade relatados por Silva et al. (2013) e Sousa et al. (2013), para méis de abelhas sem ferrão apontam valores elevados de umidade (22,30 e 35,4% m/m respectivamente). Estudos provenientes de outros países, como México e Tailândia, também apresentam valores elevados de umidade para mel de abelhas sem ferrão (CHUTTONG et al., 2016a; RAMÓN-SIERRA et al., 2015).

Além de ser uma das principais propriedades que o diferencia de outros méis, o elevado teor de umidade torna os méis de abelhas sem ferrão suscetível a fraudes por adição de água. Assim sendo, os méis devem ser avaliados com atenção, pois este, afeta outras características como: viscosidade, fluidez, cristalização e principalmente a conservação, exigindo assim maiores cuidados no momento da colheita e armazenamento (Da SILVA et al., 2013).

Por fim, as informações encontradas levam a confirmação de que os níveis elevados de água são uma característica particular dos méis provenientes de abelhas sem ferrão, demonstrando a importância de uma legislação voltada para méis de abelhas sem ferrão, com suas próprias características físico-químicas.

### 3.1.2 Sólidos solúveis totais (°Brix)

Os valores de sólidos solúveis totais encontrados foram de 55,16 a 75,00 expressos em °Brix, variando significativamente entre a maioria das amostras estudadas (Tabela 2.2).

O estudo de Souza et al. (2006) aponta valores de °Brix semelhantes para amostras de méis de abelhas sem ferrão de países da América do Sul (57,5 - 75,0 °Brix). Já os estudos de De Sousa et al. (2016), Oliveira e Santos (2011) apontam valores superiores aos encontrados no presente estudo (71,10 - 74,70 °Brix e 77,39 - 79,05 °Brix, respectivamente).

Porém, quando comparado aos méis produzidos por abelhas *Apis mellífera*, o valor de Brix é ligeiramente superior aos encontrados para méis de abelhas sem ferrão (65 a 80 °Brix) (Da SILVA et al., 2016). Essa variação já era esperada, uma vez que o teor de umidade dos méis também é distinto, parâmetro que está diretamente relacionada com os sólidos solúveis. Valor distinto na determinação do Brix pode estar associado às diferentes plantas visitadas pelas abelhas, fator verificado por Silva (2000), que relata a ausência de abelhas *Apis mellifera* nas plantas polinizadas por abelhas sem ferrão.

### 3.1.3 Condutividade elétrica

Os valores para condutividade elétrica encontrados nas amostras de méis de abelhas sem ferrão variaram entre 0,16 e 0,84 mS cm<sup>-1</sup>, apresentando grande variação entre as espécies. As amostras I, J e S (todas da espécie *Melipona quadrifaciata anthidioides*) apresentaram os menores valores, enquanto que a amostra T (*Melipona mondury*) foi a que mostrou maior valor. Tais amostras são provenientes de origem botânica distinta, porém da mesma localidade geográfica.

Estudos têm mostrado valores de condutividade elétrica variável entre amostras de mel de abelhas sem ferrão: 0,15 - 1,34 mS cm<sup>-1</sup> foram valores encontrados em diferentes municípios de Santa Catarina (BILUCA, 2014), 0,53 a 0,80 mS cm<sup>-1</sup> para méis de abelha *Melipona scutellaris* de diferentes municípios do Estado de Pernambuco (CAMPOS; GOIS; CARNEIRO, 2010), 1,06 - 2,70 mS cm<sup>-1</sup> para méis de *Tetragonisca angustula latreille* do município de Piracicaba Estado de São Paulo (ANACLETO et al., 2009), 0,33 a 0,90 mS cm<sup>-1</sup> para méis de abelha *Meliponas cutellaris* do estado da Bahia (SOUZA et al., 2009).

Segundo Yücel e Sultanoglu (2013) a condutividade elétrica do mel está relacionada com o teor de cinzas (teor mineral), acidez, ácidos orgânicos e proteína. Assim, quanto maior for o conteúdo destes compostos no mel, maior a condutividade elétrica resultante.

Devido à forte relação entre teor de cinzas e condutividade elétrica, recentemente foi incluída nas normas do *Codex Alimentarius* a análise de condutividade elétrica em substituição à determinação de cinzas em mel. As normas recomendam um valor máximo de 0,80 mS  $\text{cm}^{-1}$  (*Codex Alimentarius* 2001; Da SILVA et al., 2016). No presente estudo, duas amostras (G e T) não estavam em conformidade com o presente regulamento, no entanto, como pode ser observado, valores elevados de condutividade elétrica também foram encontrados por outros autores já citados anteriormente, apontando a diferença dos méis de abelhas sem ferrão em relação ao mel proveniente de abelha *Apis mellifera*.

### 3.1.4 Acidez livre e pH

Na Tabela 2.2 também é possível observar o valor de acidez livre determinada nas amostras de méis de abelhas sem ferrão, nas quais, foram encontrados valores entre 16,20 a 106,01 mEq  $\text{kg}^{-1}$ . Os valores apontaram uma grande variação nos níveis de acidez livre em uma mesma espécie, visto que as amostras das espécies *Melipona quadrifaciata anthidioides* (E, F, G, H, I, J, K, L e S) apresentaram os menores e os maiores valores.

Essa diferença de acidez livre entre as amostras deve-se, provavelmente, à variação dos tipos de ácidos orgânicos presentes nas diferentes fontes de néctar coletados de diferentes fontes florais, uma vez que as amostras têm origens botânicas distintas (OLIVEIRA; SANTOS, 2011). Os estudos já publicados e que descrevem valores de acidez em méis de abelhas sem ferrão apontam a acidez livre como um parâmetro peculiar desses méis, relacionando ainda os valores elevados com ácidos provenientes das mandíbulas das abelhas, que podem influenciar de forma particular para cada espécie (VIT; PEDRO; ROUBIK, 2013; Da SILVA et al., 2016).

Variações de valores no parâmetro acidez livre pode ser observada no estudo descrito por Biluca (2014), o qual relata valores de 28,66 a 138,46 mEq  $\text{kg}^{-1}$  para méis de diferentes espécies de abelhas sem ferrão do estado de Santa Catarina. Silva et al. (2013) encontraram valores de 24,5 a 93,5 mEq  $\text{kg}^{-1}$  para méis de abelha *Melipona subnitida*, produzido no estado da Paraíba. Sousa e colaboradores (2013)

encontraram valores de 27,46 a 86,23 mEq kg<sup>-1</sup> para méis de diferentes espécies de abelhas sem ferrão produzidos no estado de Rio Grande do Norte e Ramón-Sierra et al. (2015) relatam valores de 33,6 e 38,6 mEq kg<sup>-1</sup> (*Melipona beecheii* e *Trigona*, respectivamente) para méis oriundos do México.

Com influência nas características sensoriais e conservação, a acidez é um dos principais parâmetros na avaliação do mel, uma vez que é fortemente alterada pela fermentação (DA SILVA et al., 2016). Segundo os parâmetros de qualidade de mel vigentes na legislação brasileira (BRASIL, 2000), o valor máximo para acidez livre é 50 mEq kg<sup>-1</sup>, o que coloca, 35% das amostras analisadas em desacordo com a legislação. Entretanto, é necessário ressaltar que a legislação preconiza méis de abelha *Apis mellifera* e que os méis de abelhas sem ferrão se apresentam como um produto diferenciado com necessidade de fixação de parâmetros específicos e mais abrangentes, permitindo, assim, sua adequação à comercialização com garantia de identidade e qualidade.

As amostras analisadas apresentaram caráter ácido, típico do mel, com valores de pH entre 3,33 a 4,24 (Tabela 2.2). Valores semelhantes também foram encontrados nos méis de abelhas sem ferrão produzidos no estado da Paraíba (2,9 a 3,83) (SILVA et al., 2013), Rio Grande do Norte (3,5 a 5,1) (SOUSA et al., 2013) e Maranhão (3,3 a 4,6) (COSTA, 2012).

O pH e a acidez dos méis, também são considerados importantes fatores antimicrobianos e são importantes para definir a forma de manejo e armazenamento do mel, considerando sua influência na estabilidade e vida útil (GUERRINI et al., 2009; ALVES et al., 2012).

### 3.1.5 5- Hidroximetilfulfural e atividade diastásica

O 5-HMF apresentou-se abaixo do LOQ (0,31 mg L<sup>-1</sup>) do método para todas as amostras de méis analisadas (Tabela 2.3). Já os resultados de atividade diastásica apresentaram valores consideráveis (maiores que 3 un. Göthe) em apenas três amostras, com valores de 6,40, 5,15 e 13,41 un. Göthe, na amostra D, H e T respectivamente (Tabela 2.3).

Tabela 2.3 – Conteúdo de 5-HMF e atividade diastásica determinados nas amostras de méis de abelhas sem ferrão (*Meliponinae*).

Amostra	HMF (mg kg <sup>-1</sup> )	Atividade Diastásica (un.Göthe)
A	< LOQ	< 3
B	< LOQ	< 3
C	< LOQ	< 3
D	< LOQ	6,40 ± 0,60
E	< LOQ	< 3
F	< LOQ	< 3
G	< LOQ	< 3
H	< LOQ	5,15 ± 0,71
I	< LOQ	< 3
J	< LOQ	< 3
K	< LOQ	< 3
L	< LOQ	< 3
M	< LOQ	< 3
N	< LOQ	< 3
O	< LOQ	< 3
P	< LOQ	< 3
Q	< LOQ	< 3
R	< LOQ	< 3
S	< LOQ	< 3
T	< LOQ	13,41 ± 0,53

Valores expressos como média ± desvio padrão. LOQ – Limite de quantificação (0,31 mg kg<sup>-1</sup>). Letras de A-T: amostras de méis de abelhas sem ferrão descritas na Tabela 2.1. Fonte: próprio autor

Os resultados de 5-HMF e a atividade diastásica são considerados como indicadores de frescor, indicando possível aquecimento não controlado, armazenamento prolongado ou inadequado. É possível destacar as amostras analisadas como de excelente procedência, por atenderem às exigências da legislação nacional para mel de *Apis mellifera*, a qual determina níveis de 5-HMF inferiores a 15 mg kg<sup>-1</sup> (BRASIL, 2000; BARONI et al., 2009).

No entanto, a maioria das amostras apresentou valores baixos de atividade diastásica, o que leva a crer que méis de abelhas sem ferrão possuam atividade diastásica menores quando comparados aos méis de abelha *Apis mellifera*, considerando o total controle das amostras analisadas quanto à condição de coleta e armazenamento, que garantem o não aquecimento e o armazenamento a frio. Levando em conta a elevada acidez dos méis de abelhas sem ferrão e a grande variação do

pH, é possível que estes dois fatores influenciem na baixa atividade diastásica dos méis, estudos futuros devem ser realizados para evidenciar estas influências.

De Sousa e colaboradores (2016) também analisam 5-HMF em méis de abelhas sem ferrão e relatam que não foi detectada a presença do mesmo. O estudo de Biluca et al. (2014) relata que méis de abelhas sem ferrão possuem uma potencial resistência quanto à formação do 5-HMF, isso pode ser justificado pelos tipos de açúcares que os compõem, onde o conteúdo de frutose predomina, bem como outros fatores: atividade de água, umidade, pH e acidez (BARRA et al., 2010; YUCEL, SULTANOGLU, 2013; BILUCA et al., 2014; Da SILVA et al., 2016).

### 3.1.6 Açúcares

Glicose e frutose são os principais açúcares encontrados no mel, sendo importantes para o estabelecimento de uma série de características: cristalização, viscosidade e outras. Já a sacarose, é vista como um açúcar proveniente de adulterações, principalmente por adição de xaropes para aumento de volume e lucros nas vendas (Da SILVA et al., 2016). Os resultados de concentração dos açúcares (frutose, glicose e sacarose), analisados nas amostras de méis de abelhas sem ferrão, estão expostos na Tabela 2.4.

Tabela 2.4 – Conteúdos em % (m/m) de frutose, glicose e sacarose encontradas nas amostras de méis de abelhas sem ferrão (*Meliponinae*).

Amostra	Frutose	Glicose	F+G	F/G	G/U	Sacarose
A	34,65 ± 0,74 <sup>e,f,g</sup>	26,55 ± 0,59 <sup>d,e,f,g</sup>	61,20 ± 1,27 <sup>f,g</sup>	1,30 ± 0,09 <sup>i</sup>	0,74 ± 0,01 <sup>f</sup>	< LOQ
B	33,17 ± 0,35 <sup>f,g,h</sup>	27,82 ± 0,77 <sup>d,e,f</sup>	60,99 ± 1,01 <sup>f,g</sup>	1,19 ± 0,07 <sup>c</sup>	0,74 ± 0,02 <sup>f</sup>	< LOQ
C	40,17 ± 0,98 <sup>b</sup>	27,30 ± 0,10 <sup>d,e,f</sup>	67,77 ± 0,91 <sup>c</sup>	1,47 ± 0,13 <sup>f,g</sup>	1,09 ± 0,01 <sup>a</sup>	< LOQ
D	35,76 ± 0,84 <sup>f,g</sup>	23,03 ± 1,14 <sup>j</sup>	58,79 ± 0,32 <sup>h</sup>	1,56 ± 0,12 <sup>d</sup>	0,60 ± 0,04 <sup>g</sup>	< LOQ
E	32,72 ± 1,11 <sup>g,h,i</sup>	27,85 ± 0,92 <sup>c,d,e</sup>	60,57 ± 1,46 <sup>f,g</sup>	1,17 ± 0,08 <sup>l</sup>	1,07 ± 0,07 <sup>a,b</sup>	< LOQ
F	35,10 ± 0,47 <sup>f,g</sup>	31,31 ± 0,63 <sup>a</sup>	62,16 ± 0,60 <sup>f</sup>	1,12 ± 0,05 <sup>k</sup>	0,88 ± 0,01 <sup>f</sup>	< LOQ
G	30,44 ± 0,20 <sup>k</sup>	25,59 ± 0,53 <sup>f,g,h,i</sup>	56,03 ± 0,68 <sup>i</sup>	1,19 ± 0,02 <sup>l</sup>	0,60 ± 0,01 <sup>g</sup>	< LOQ
H	30,72 ± 0,17 <sup>j,k</sup>	24,14 ± 0,41 <sup>i</sup>	54,86 ± 0,51 <sup>j</sup>	1,27 ± 0,06 <sup>j</sup>	0,55 ± 0,01 <sup>h</sup>	< LOQ
I	37,29 ± 0,27 <sup>d</sup>	29,18 ± 0,16 <sup>c</sup>	66,46 ± 0,43 <sup>d</sup>	1,27 ± 0,02 <sup>j</sup>	0,89 ± 0,01 <sup>d</sup>	< LOQ
J	39,30 ± 0,56 <sup>c</sup>	30,20 ± 0,24 <sup>b</sup>	69,51 ± 0,81 <sup>b</sup>	1,30 ± 0,02 <sup>i</sup>	1,03 ± 0,02 <sup>a,b</sup>	< LOQ
K	35,20 ± 0,68 <sup>f,g</sup>	24,56 ± 0,29 <sup>h,i</sup>	59,76 ± 0,96 <sup>g</sup>	1,43 ± 0,09 <sup>g</sup>	0,86 ± 0,02 <sup>e</sup>	< LOQ
L	37,14 ± 0,62 <sup>d</sup>	25,43 ± 0,24 <sup>g,h,i</sup>	62,56 ± 0,86 <sup>f</sup>	1,46 ± 0,05 <sup>f</sup>	0,75 ± 0,01 <sup>f</sup>	< LOQ
M	40,50 ± 0,03 <sup>b</sup>	29,90 ± 0,33 <sup>b,c</sup>	70,30 ± 0,64 <sup>a</sup>	1,35 ± 0,08 <sup>h</sup>	1,05 ± 0,04 <sup>a</sup>	< LOQ
N	33,54 ± 0,33 <sup>f,g,h</sup>	27,11 ± 0,22 <sup>d,e,f</sup>	60,64 ± 0,29 <sup>f,g</sup>	1,23 ± 0,04 <sup>k</sup>	0,70 ± 0,01 <sup>f</sup>	< LOQ
O	34,97 ± 0,70 <sup>e,f,g</sup>	26,99 ± 0,82 <sup>d,e,f,g</sup>	61,96 ± 0,00 <sup>f,g</sup>	1,29 ± 0,04 <sup>i</sup>	0,84 ± 0,10 <sup>e</sup>	< LOQ
P	37,47 ± 0,10 <sup>d</sup>	27,56 ± 0,36 <sup>d,e,f</sup>	65,03 ± 0,30 <sup>d,e</sup>	1,36 ± 0,03 <sup>h</sup>	0,90 ± 0,01 <sup>d</sup>	< LOQ
Q	46,02 ± 0,14 <sup>a</sup>	24,14 ± 0,37 <sup>i</sup>	70,16 ± 0,73 <sup>a</sup>	1,90 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,01 ± 0,02 <sup>a,b</sup>	< LOQ
R	36,22 ± 0,71 <sup>d,e</sup>	20,41 ± 0,97 <sup>k</sup>	56,63 ± 1,61 <sup>i</sup>	1,77 ± 0,27 <sup>b</sup>	0,59 ± 0,03 <sup>h</sup>	< LOQ
S	33,15 ± 0,59 <sup>f,g,h</sup>	25,82 ± 0,89 <sup>f,g,h,i</sup>	58,97 ± 0,52 <sup>h</sup>	1,28 ± 0,12 <sup>j</sup>	0,95 ± 0,03 <sup>c</sup>	< LOQ
T	38,96 ± 0,30 <sup>c</sup>	30,03 ± 0,40 <sup>b</sup>	68,99 ± 0,10 <sup>b,c</sup>	1,29 ± 0,14 <sup>i</sup>	1,00 ± 0,03 <sup>b</sup>	< LOQ

Valores expressos como média ± desvio padrão. <sup>a-l</sup>Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as médias de acordo com teste de Tukey (p < 0,05). F+G – soma dos conteúdos de frutose e glicose; F/G – razão entre os conteúdos de frutose e glicose; G/U- razão entre glicose e umidade. LOQ – limite de quantificação (0,074 mg kg<sup>-1</sup> sacarose) na curva de calibração. Letras de A – T = amostras de méis de abelhas sem ferrão descritas na Tabela 2.1. Fonte: próprio autor.

O conteúdo dos açúcares frutose e glicose nas amostras analisadas variaram de 30,44 e 46,02 e de 20,41 a 31,31% (m/m), respectivamente. Com tais resultados é possível observar que os teores de frutose são predominantes. Uma das principais características dos méis de abelhas sem ferrão são teores elevados de frutose, que podem ser responsáveis pela intensidade do sabor doce e da alta higroscopicidade, mantendo o mel líquido por um longo período sem cristalizar (CRANE, 1985).

Outros autores que também estudaram méis de abelhas sem ferrão como De Sousa e colaboradores (2016), relatam valores de 59,20% m/m para frutose e 45,70% m/m para glicose. Chuttong et al. (2016b) relatam valores expressivamente inferiores para méis de abelhas sem ferrão da Tailândia com 20,00% m/m para frutose e 17,00% m/m para glicose, mencionando a presença de outros açúcares.

Os resultados apontam ainda, que as amostras E, F, G, H, I, J, K, L e S provenientes da mesma espécie de abelhas sem ferrão (*Melipona quadrifaciata anthidioides*) apresentaram variação no teor de açúcares. É importante ressaltar que a origem botânica utilizada para a coleta de néctar na produção destes méis é distinta. Entretanto, amostras com a mesma origem botânica (A, B, J, O e S) e com espécies distintas, também apontam variações nos teores de açúcares. Assim, é possível observar que tanto origem botânica quanto espécie e origem geográfica podem influenciar na variação das concentrações de açúcares.

Os resultados mostraram também, que os valores da soma dos conteúdos variaram de 54,86 a 70,46% (m/m). Analisando os resultados, 60% das amostras apresentam teores inferiores a 65% (m/m), que é o limite mínimo estabelecido para o conteúdo de açúcares redutores em méis de abelha *Apis mellifera* (BRASIL, 2000). Essa diferença pode ser atribuída às características diferenciadas dos méis, como elevados teores de umidade, ou pela presença de outros açúcares ainda não estudados. Investigações como a de Sousa et al. (2013) e Ramón-Sierra et al. (2015) também descrevem o baixo teor de açúcares redutores em méis de abelhas sem ferrão.

Comercialmente, é de fundamental importância considerar a cristalização do mel. Segundo estudos, a cristalização depende principalmente da razão entre frutose e glicose (F/G), ou seja, méis com alta razão frutose/glicose podem permanecer fluidos por mais tempo. Esse fato deve levar em consideração a quantidade de água presente no mel, considerando ser a solubilidade da frutose maior do que da glicose (AL et al., 2009; ESCUREDO et al., 2014). Estudos ainda apontam que

amostras que permanecem fluidas por muito tempo ou não cristalizam, apresentam razão maior que 1,33 (ESCUREDO et al., 2014).

A taxa de frutose/glicose para as amostras de méis de abelhas sem ferrão analisadas apresentou valores  $> 1$ , indicando a fluidez das amostras (AL et al., 2009). A amostra Q (*Tetragonisca angustula angustula*) apresentou o maior valor entre todas as amostras analisadas, com razão frutose/glicose de 1,90. Levando em consideração o conteúdo de umidade das amostras e os aspectos visuais, as amostras G (F/G = 1,19) e H (F/G = 1,27) são mais fluidas, ou seja, possivelmente se faz necessário considerar a umidade da amostra para um resultado mais fiável.

A relação glicose/umidade (G/U) também serve como indicador na previsão de cristalização do mel, a qual pode ser lenta ou nula quando a relação G/U é inferior a 1,7, e é completa e rápida quando a relação é superior a 2. De acordo com os resultados obtidos, 100% das amostras apresentaram índices inferiores a 1,7, comportando-se como amostras fluidas, o que pôde ser observado visualmente. Além de F/G e G/U, outros fatores como poeira, grãos de pólen, agitação e bolhas de ar podem também influenciar no processo de cristalização (DOBRE et al., 2012).

Quanto ao teor de sacarose (Tabela 2.4), todos os resultados obtidos ficaram abaixo do limite de quantificação do método ( $0,074 \text{ mg L}^{-1}$ ), abaixo também do definido pela legislação vigente para mel de *Apis mellifera* (menor que  $6 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ ) (BRASIL, 2000). Estes resultados sugerem ausência de adulteração e colheita do mel no momento ótimo de maturação, pois elevados teores de sacarose podem resultar da adição de açúcar comercial ou ser atribuídos à colheita precoce do produto (De SOUSA et al., 2016).

### **3.2 Compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante**

Os valores encontrados para o conteúdo de compostos fenólicos totais e para a capacidade antioxidante (DPPH e FRAP), das amostras de méis de abelhas sem ferrão, podem ser observados na Tabela 2.5.

Tabela 2.5 - Resultados obtidos para compostos fenólicos totais, capacidades antioxidantes por captura de radical (DPPH) e redução férrica (FRAP) em amostras de mel de abelhas sem ferrão (*Meliponinae*).

Amostra	Fenólicos totais (mg EAG 100 g <sup>-1</sup> )	DPPH (mg EAA 100 g <sup>-1</sup> )	FRAP ( $\mu\text{mol Fe}^{2+}$ 100 g <sup>-1</sup> )
A	23,13 $\pm$ 0,15 <sup>f</sup>	4,68 $\pm$ 0,23 <sup>e,f</sup>	223,20 $\pm$ 0,75 <sup>g</sup>
B	25,69 $\pm$ 0,23 <sup>e</sup>	4,06 $\pm$ 0,13 <sup>e,f</sup>	250,80 $\pm$ 2,71 <sup>e</sup>
C	45,56 $\pm$ 3,22 <sup>a</sup>	5,63 $\pm$ 0,56 <sup>e,d</sup>	275,90 $\pm$ 0,39 <sup>d</sup>
D	29,90 $\pm$ 0,34 <sup>d</sup>	5,44 $\pm$ 0,17 <sup>e,d</sup>	339,50 $\pm$ 0,33 <sup>b</sup>
E	16,98 $\pm$ 0,55 <sup>j</sup>	3,58 $\pm$ 0,14 <sup>f,g</sup>	196,40 $\pm$ 0,38 <sup>b</sup>
F	17,65 $\pm$ 0,94 <sup>i</sup>	4,38 $\pm$ 0,28 <sup>e,f</sup>	114,10 $\pm$ 0,17 <sup>n</sup>
G	31,70 $\pm$ 0,14 <sup>c</sup>	11,48 $\pm$ 0,83 <sup>b</sup>	116,70 $\pm$ 0,01 <sup>m</sup>
H	17,90 $\pm$ 0,38 <sup>i</sup>	4,27 $\pm$ 0,28 <sup>e,f</sup>	177,80 $\pm$ 0,17 <sup>i</sup>
I	10,70 $\pm$ 0,22 <sup>m</sup>	2,46 $\pm$ 0,25 <sup>g,h,i</sup>	69,90 $\pm$ 0,01 <sup>r</sup>
J	15,52 $\pm$ 0,36 <sup>k</sup>	3,17 $\pm$ 0,06 <sup>f,g,h</sup>	109,90 $\pm$ 0,01 <sup>o</sup>
K	17,93 $\pm$ 0,48 <sup>i</sup>	3,62 $\pm$ 0,14 <sup>f,g,h</sup>	136,70 $\pm$ 0,29 <sup>k</sup>
L	10,39 $\pm$ 0,29 <sup>m</sup>	2,61 $\pm$ 0,20 <sup>g,h,i</sup>	67,49 $\pm$ 0,11 <sup>r</sup>
M	22,61 $\pm$ 1,66 <sup>g</sup>	1,78 $\pm$ 0,13 <sup>i</sup>	87,77 $\pm$ 0,11 <sup>q</sup>
N	35,06 $\pm$ 0,90 <sup>c</sup>	7,76 $\pm$ 0,08 <sup>c</sup>	293,7 $\pm$ 0,46 <sup>c</sup>
O	19,76 $\pm$ 1,29 <sup>h</sup>	1,41 $\pm$ 0,08 <sup>j</sup>	96,33 $\pm$ 0,01 <sup>p</sup>
P	19,33 $\pm$ 1,82 <sup>h</sup>	2,57 $\pm$ 0,17 <sup>g,h,i</sup>	93,63 $\pm$ 0,95 <sup>p</sup>
Q	30,39 $\pm$ 0,91 <sup>c</sup>	6,65 $\pm$ 0,09 <sup>c</sup>	239,40 $\pm$ 3,36 <sup>f</sup>
R	15,32 $\pm$ 0,36 <sup>k</sup>	4,23 $\pm$ 0,12 <sup>e,f</sup>	122,20 $\pm$ 0,42 <sup>l</sup>
S	14,79 $\pm$ 0,49 <sup>k</sup>	2,11 $\pm$ 0,15 <sup>h,i</sup>	163,10 $\pm$ 0,17 <sup>j</sup>
T	38,92 $\pm$ 1,28 <sup>b</sup>	13,95 $\pm$ 0,30 <sup>a</sup>	474,61 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>

Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão. <sup>a-o</sup> Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as médias de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). EAG – equivalentes a ácido gálico; EAA – equivalentes de ácido ascórbico. Letras de A-T: amostras de mel de abelhas sem ferrão descritas na Tabela 2.1. Fonte: próprio autor

A capacidade antioxidante *in vitro* dos méis de abelhas sem ferrão foi avaliada a partir dos mecanismos de captura de radicais livres e de redução férrica, objetivando estimar o potencial da amostra de mel. Em função da possível superestimação dos resultados na determinação de compostos fenólicos totais, devido à contribuição de agentes redutores não fenólicos presentes no sistema do método de Folin-Ciocalteu (SHAHIDI; ZHONG, 2015), esta determinação tem sido

considerada um marcador de capacidade redutora antioxidante em méis, utilizada como complemento na avaliação da capacidade antioxidante total (CAN et al., 2015; EVERETTE et al., 2010).

Os testes de compostos fenólicos totais realizados nas amostras apontaram valores variáveis entre 10,39 e 45,56 mg EAG 100 g<sup>-1</sup> de mel. As amostras L e I (ambas da espécie *Melipona quadrifaciata anthidioides*) apresentaram os menores valores, enquanto a amostra C (*Scaptotrigona bipunctata*) e T (*Melipona mondury*) apresentaram os maiores valores. Além de espécies de abelhas distintas, as amostras também pertencem à origem geográfica e botânica distintas, o que pode justificar a variação de valores (CAN et al., 2015).

Os valores obtidos neste estudo são semelhantes aos encontrados por Da Silva et al. (2013) em méis de abelhas sem ferrão do nordeste brasileiro (17 a 66 mg EAG 100 g<sup>-1</sup>), e com os estudos de Ranneh et al. (2018) que estuda méis da Malásia (13,94 a 23,50 mg EAG 100 g<sup>-1</sup>).

Para as avaliações aplicando o método de captura de radicais por DPPH, o valor mínimo apresentado foi de 1,41 mg EAA 100 g<sup>-1</sup> para a amostra O (*Melipona marginata*) e o máximo de 13,95 mg EAA 100g<sup>-1</sup> para a amostra T (*Melipona mondury*). Ambas as amostras pertencem a espécies de abelha e origem botânica distinta o que pode justificar a variação, porém, são da mesma origem geográfica. Foi observado também que de forma geral, amostras que apresentaram os maiores valores pertencem à florada predominante de *Eucalyptus spp.*

Da Silva et al. (2013a) também analisaram a capacidade antioxidante de méis de abelhas sem ferrão do Brasil aplicando o método de DPPH, e encontraram valores aproximados ao presente estudo (3,23 a 25,90 mg EAA 100 g<sup>-1</sup>).

Nas análises de FRAP para os méis de abelhas sem ferrão, os valores médios indicam diferenças estatísticas significativas para todas as amostras, com valores que variam de 67,49 µmol Fe II 100 g<sup>-1</sup> para mel de abelha *Melipona quadrifaciata anthidioides* (amostra L) a 474,61 µmol Fe II 100 g<sup>-1</sup> para mel *Melipona mondury* (amostra T). Até o momento nem um relato foi descrito para análises de FRAP em méis de abelhas sem ferrão.

Assim como nos resultados obtidos do teste de DPPH, nos resultados de FRAP amostras com maiores valores pertencem à florada predominante de *Eucalyptus spp.*, concordando com estudos anteriores que descrevem a origem botânica como a principal influente na composição de compostos com capacidade antioxidante (DAS et al., 2015; Da SILVA et al., 2016).

Os valores encontrados nos estudos de méis de abelhas sem ferrão são consistentes com os valores encontrados em méis de abelha mel *Apis mellifera*, que mostra grandes variações (DPPH-1.91-150 mg EAA 100 g<sup>-1</sup>. FRAP- 4,01 e 498  $\mu\text{mol Fe II}$  100 g<sup>-1</sup>), sempre dependendo da origem botânica do néctar coletado para a produção de mel, a origem geográfica e as espécies de abelhas (GORJANOVIĆ et al., 2013; BOUSSAID et al., 2014; HABIB et al., 2014; SHAFIEE et al., 2014; CAN et al., 2015).

#### 4 CONCLUSÃO

Os parâmetros de identidade e qualidade avaliados nas 20 amostras de méis de abelhas sem ferrão de diferentes espécies, florada predominante e origem geográfica apontam diferenças significativas se comparadas aos valores estabelecidos pelas legislações nacionais e internacionais vigentes para méis de abelhas *Apis mellifera*, principalmente para açúcares, acidez livre e os teores de água, demonstrando nitidamente a necessidade da elaboração de uma regulamentação específica para o produto estudado.

À presença de compostos fenólicos totais e a capacidade antioxidante das amostras, apresentam variação, além de uma moderada correlação entre o conteúdo de compostos fenólicos totais e a capacidade antioxidante determinada pelos métodos DPPH e FRAP, podendo ser uma fonte facilmente acessível de antioxidantes naturais.

O presente estudo pode servir como base de dados para auxiliar no possível desenvolvimento de uma nova normativa específica para os méis de abelhas sem ferrão, e contribuir para divulgar o mel de abelhas sem ferrão produzido no estado de Santa Catarina e Brasil, como um produto com potencial antioxidante, valorizando esse produto natural frente à comunidade científica e a população em geral.

## REFERÊNCIAS

AL, M. L. et al. Physico-chemical and bioactive properties of different floral origin honeys from Romania. **Food Chemistry**, v. 112, n. 4, p. 863-867, 2009.

ALVES, E. M. et al. Estabilidade físico-química e sensorial de méis desumidificado de *Tetragonisca angustula*. **Semana Entomológica da Bahia (SINSECTA)**, v. 24, p. 185-193, 2012.

ANACLETO, D. A. et al. Composição de amostras de mel de abelha Jataí (*Tetragonisca angustula* latreille, 1811). *Revista Ciência e Tecnologia em Alimentos*, Campinas, v. 29, n. 3, p. 535-541, 2009.

AOAC. **Official Methods of Analysis**. In: W. HORWITZ (Ed) (18.ed.). Gaithersburg, MD, USA: Association of Official Analytical Chemists, Inc., 2005.

BILUCA, F. C. et al. 5-HMF and carbohydrates content in stingless bee honey by CE before and after thermal treatment. **Food Chemistry**, v. 159, p. 244-249, 2014.

BARONI, M. V. et al. Composition of honey from Córdoba (Argentina): assessment of North/South provenance by chemometrics. **Food Chemistry**, v. 114, n. 2, p. 727-733, 2009.

BARRA, M. P. G. et al. Volatile compounds in honey produced in the central valley of Ñuble Province, Chile. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 70, p. 75–84, 2010.

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

BERTONCELJ . J. et al. Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. **Food Chemistry**, v. 105, n. 2, p. 822-828, 2007.

BILUCA, F.C. **Caracterização química e influência do tratamento térmico em méis de abelhas sem ferrão (*Meliponinae spp.*) produzidos no estado de Santa Catarina**. 2014. 112p. Dissertação

(Mestrado em Ciências dos alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

BOUSSAID, A. et al., Physicochemical and bioactive properties of six honey samples from various floral origins from Tunisia. **Arabian Journal of Chemistry** In Press, 2014.

BRAND-WILLIAMNS, W.; CUVERLIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT – Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel**. MAPA, Brasília, 2000.

CAMPOS, F. S.; GOIS, G.C.; CARNEIRO, G.G. Parâmetros físico-químicos do mel de abelhas *Meliponascutellaris* produzido no estado da Paraíba. **FAZU em Revista**, v. 7, p.186 - 190, 2010.

CAN, Z. et al. An investigation of Turkish honeys: their physico-chemical properties, antioxidant capacities and phenolic profiles. **Food Chemistry**, v. p. 133–141, 2015.

CHUTTONG, B. et al. Physicochemical profiles of stingless bee (Apidae: Meliponini) Honey from south east asia (Thailand), **Food Chemistry**, v. 192, p. 149-155, 2016a.

CHUTTONG, B. et al. Effects of long term storage on stingless bee (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) honey. **Journal of Apicultural Research**, v. 54, n. 5, p. 441-451, 2016b.

CODEX ALIMENTARIUS COMMITTEE. Codex standard 12, revised Codex Standard for Honey. Standards and Standard Methods, 11, 1–7, 2001.

COSTA T.V.; FARIAS C.A.G.; BRANDÃO C.S. Meliponicultura em comunidades tradicionais do Amazonas. **Revista Brasileira de Agroecologia**, 7:106-115, 2012.

CRANE, E. **O livro do Mel**. 2.ed.São Paulo: Nobel, 1985.

Da SILVA, I. A. A., et al. Phenolic profile, antioxidant activity and palynological analysis of stingless bee honey from Amazonas, Northern Brazil. **Food Chemistry**, v.141 ed. 4, p. 3552–8, 2013.

Da SILVA, P. M. et al. Honey: chemical composition, stability and authenticity. **Food Chemistry**, v 196, p, 309–323, 2016.

DAS, A. et al. Evaluation of antioxidative, antibacterial and probiotic growth stimulatory activities of *Sesamum indicum* honey containing phenolic compounds and lignans. **LWT-Food Science and Technology**, v. 61, n. 1, p. 244-250, 2015.

De SOUSA, J. M. et al. Sugar profile, physicochemical and sensory aspects of monofloral honeys produced by different stingless bee species in Brazilian semi-arid region. **LWT-Food Science and Technology**, 65, 645-651, 2016.

DOBRE, I. et al. Rheological behavior of different honey types from Romania. **Food Research International**. v.49, ed. 1, p. 126-132, 2012.

EVERETTE, J. D. et al. Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 8139-8144, 2010.

ESCUREDO, O. et al. Contribution of botanical origin and sugar composition of honeys on the crystallization phenomenon. **Food Chemistry**, v. 149, p. 84–90. 2014.

GORJANOVIĆ, S. Ž. et al., Comparative analysis of antioxidant activity of honey of different floral sources using recently developed polarographic and various spectrophotometric assays. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 30, n1, p.13–18, 2013.

GUERRINI, A. et al. Ecuadorian stingless bee (*Meliponinae*) honey: A chemical and functional profile of an ancient health product. **Food Chemistry**. p.1413-1420, 2009.

HABIB, H. M. et al. Bioactive components, antioxidant and DNA damage inhibitory activities of honeys from arid regions. **Food Chemistry**, v. 153, p. 28-34, 2014.

JAFFÉ, R. et al. Bees for development: Brazilian survey reveals how to optimize stingless beekeeping. **PloS one**, v. 10, n. 3, p. e0121157, 2015.

MICHENER C. D. The Meliponini. In: Vit, P., Pedro, S.R.M. & Roubik, D.W. (Eds.), **Pot-Honey: A legacy of stingless bees**. Springer, New York, p. 3–17, 2013.

OLIVEIRA, E. N. A.; SANTOS, D. da C. Análise físico-química de méis de abelhas africanizada e nativa. **Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 70, n. 2, p.132-8, 2011.

RANNEH, Y. et al. Malaysian stingless bee and Tualang honeys: A comparative characterization of total antioxidant capacity and phenolic profile using liquid chromatography-mass spectrometry. **LWT-Food Science and Technology**, v. 89, p. 1-9, 2018.

RAO, P. V. et al. Biological and therapeutic effects of honey produced by honey bees and stingless bees: a comparative review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 5, p. 657-664, 2016.

RAMÓN-SIERRA, J. M. Electrophoresis characterisation of protein as a method to establish the entomological origin of stingless bee honeys. **Food Chemistry**, v. 183, p. 43-48, 2015.

RIZELIO, V. M. et al. Development of a fast capillary electrophoresis method for determination of carbohydrates in honey samples. **Talanta**, v. 93, p. 62-66, 2012 a.

RIZELIO, V. M. et al. Development of a fast MECK method for determination of 5-HMF in honey samples. **Food Chemistry**, v. 133, p. 1640-1645, 2012b.

ROUBIK, D. et al. New stingless bee genus endemic to Central American cloudforests: phylogenetic and biogeographic implications (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). **Systematic Entomology**, v. 22, n. 1, p. 67-80, 1997.

SHAFIEE, S. et al. Honey characterization using computer vision system and artificial neural networks. **Food Chemistry**, v. 159, p. 143–150, 2014.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Measurement of antioxidant activity. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 757-781, 2015.

SILVA, T. M. S. et al. Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaira (*Meliponasubnitida*) honey. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 29, p.10-18, 2013.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p.144-158, 1965.

SOUSA, J. M. B. et al. Aspectos físico-químicos e perfil sensorial de méis de abelhas sem ferrão da região do Seridó, Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. *Ciências Agrárias*, Londrina, v. 34, n. 4, p. 1765-1774, 2013.

SOUZA, B. de A.; CARVALHO, C.A.L. de; ALVES, R.M. de O. Flight activity of *Melipona asilvai* Moure (Hymenoptera: Apidae). **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v.66, n.2B, p.731-737, 2006.

SOUZA, B. A. et al. Caracterização do mel produzido por espécies de *Melipona* illiger, 1806 (Apidae: Meliponini) da região nordeste do Brasil: 1. Características físico-químicas. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 303-308, 2009.

VIT, P.; PEDRO, S. R. M.; ROUBIK, D. W. **Pot-honey a legacy of stingless bees**. New York: Springer, 2013.

YÜCEL, Y.; SULTANOGLU, P. Characterization of honeys from Hatay region by their physicochemical properties combined with chemometrics. **Food Bioscience**, v.1, p.16-25, 2013

### CAPÍTULO 3

#### **BIOACESSIBILIDADE *IN VITRO* DE MINERAIS EM MÉIS DE ABELHAS SEM FERRÃO (*Meliponinae*)**

Os resultados do presente capítulo foram publicados em: Biluca, F. C.; de Gois, J. S.; Schulz, M.; Braghini, F.; Gonzaga, L. V.; Maltez, H. F.; Rodriguese, E.; Vitali, L.; Micke, G. A.; Borges, D. L.G; Costa, A. C. O.; Fett, R. Phenolic compounds, antioxidant capacity and bioaccessibility of minerals of stingless bee honey (*Meliponinae*). *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 63, p. 89-97, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.07.039>

**RESUMO**

Este estudo foi realizado para investigar a composição de elementos minerais e a fração bioacessível em méis de abelhas sem ferrão por meio da simples diluição da amostra em ácido nítrico. Para o estudo foram coletadas treze amostras de mel de nove espécies distintas de abelhas sem ferrão, provenientes de três municípios do estado de Santa Catarina: São Miguel do Oeste, Florianópolis e Santo Amaro da Imperatriz. Os elementos Na, Fe, Cu, Co, Zn, Mn, Se, Al, Cd, Ni, Pb e Li foram determinados por espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) e K e Ca por espectrometria de absorção atômica com fonte contínua de alta resolução (AAS HR-CS). Para a determinação da bioacessibilidade foi utilizado método de simulação de digestão gastrointestinal *in vitro*. Os minerais mais abundantes nas amostras analisadas foram K (4984,01- 261,53  $\mu\text{g g}^{-1}$ ), Ca (137,90 - 88,67  $\mu\text{g g}^{-1}$ ), Mg (231,02 - 25,94  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) e Na (260,78 - 12,73  $\mu\text{g g}^{-1}$ ). Os demais elementos (Fe, Cu, Co, Zn, Mn, Se, Al, Cd, Ni, Pb e Li) apresentaram níveis traços, inferiores a 12  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Após a simulação da digestão gastrointestinal, os níveis de bioacessibilidade variaram entre 74 a 107,32%, apontando uma elevada bioacessibilidade mineral nos méis estudados.

**Palavras-chave:** Mel. *Meliponinae*. Minerais. Potássio. Digestão gastrointestinal *in vitro*.

## 1 INTRODUÇÃO

No Brasil, além das abelhas *Apis mellifera*, existem outras espécies de abelhas produtoras de mel, como as sem ferrão (*Meliponinae*) (SILVA et al., 2013; SOUSA et al., 2016), presentes também em outros países tropicais e subtropicais (RAMÓN-SIERRA et al., 2015) e que recentemente vêm passando por um aumento do nível de interesse no consumo dos seus produtos (GUERRINI et al., 2009; SILVA et al., 2013; BILUCA et al., 2014).

O crescente interesse pelo mel produzido por abelhas sem ferrão é devido às suas características sensoriais próprias, como sabor e aroma, textura mais fluida e cristalização lenta quando comparado ao mel de *Apis mellifera* (OLIVEIRA et al., 2012; RAMÓN-SIERRA et al., 2015; CHUTTONG et al., 2016b). Além disso, recebe atenção especial porque mostra resistência na formação de 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) quando submetido a temperaturas elevadas (BILUCA et al., 2014). Essa característica aumenta o interesse das empresas farmacêuticas e alimentares, uma vez que o mel pode ser adicionado como complemento a outros produtos sem riscos para a saúde devido ao excesso de 5-HMF.

Os méis de abelhas sem ferrão são compostos majoritariamente por açúcares e água (GUERRINI et al., 2009; SILVA et al., 2013). No entanto, estudos recentes relatam a presença de polifenóis (GUERRINI et al., 2009; Da SILVA et al., 2013, SILVA et al., 2013) e se comparado aos estudos realizados com méis de uma forma geral, é possível que também contenha ácidos orgânicos, proteínas, aminoácidos, vitaminas, enzimas e minerais.

Dentre os compostos possivelmente presentes nos méis de abelhas sem ferrão, os minerais recebem destaque, uma vez que podem fornecer informações de identidade e qualidade dos méis, bem como indicar poluição do local de origem, apontar a possível localização geográfica da produção e principalmente por sua importância nutricional (LACHMAN et al., 2007).

Os efeitos benéficos da ingestão de alimentos que apresentam elementos de importância nutricional, como minerais, são essenciais para a saúde humana. Entretanto, há uma complexidade de fatores envolvidos com os alimentos e com os vários estágios de digestão e absorção para o organismo. Sabe-se que a quantidade de nutrientes ingeridos na dieta, difere da quantidade dos mesmos que são utilizados pelo organismo (COZZOLINO, 2009; POHL et al., 2012).

Desse modo, os estudos de bioacessibilidade podem ser realizados, *in vivo* e/ou *in vitro*, principalmente no campo da nutrição e da ciência dos alimentos, para indicar a porção de um nutriente verdadeiramente disponível para a absorção do organismo, em relação ao total consumido (RODRÍGUEZ-ROQUE et al., 2013).

Atualmente, para a determinação dos minerais em alimentos são utilizados vários métodos, como a espectrometria de reflexão total de raios-X (KROPF et al., 2010), cromatografia iônica, voltametria pulsada (BULDINI et al., 2001), espectrometria de absorção atômica em chama (AAS) (BARONI et al., 2009), eletroforese capilar (EC) (RIZELIO et al., 2012), espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) (TERRAB et al., 2005) e espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) (LECH, 2014; OLIEIRA et al., 2014; TOALDO et al., 2014).

As técnicas espectrométricas atômicas, como a AAS, ICP-OES e ICP-MS, têm grandes vantagens para a determinação dos elementos minerais, como a alta frequência analítica, capacidade de atingir limites de detecção em níveis traços, alta sensibilidade e a possível determinação elementar em amostras líquidas após diluição simples (LECH, 2014; OLIEIRA et al., 2014; TOALDO et al., 2014).

Considerando esses aspectos, o objetivo deste trabalho foi quantificar os elementos minerais presentes em amostras de méis de abelhas sem ferrão coletadas em diferentes municípios do estado de Santa Catarina, Brasil, e paralelamente monitorar a fração bioacessível desses elementos após simulação de digestão gastrointestinal *in vitro*, utilizando ICP-MS e AAS como ferramentas de quantificação.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Reagentes e soluções**

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. O ácido clorídrico (HCl-37%) e o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-30% m/m), foram obtidos da Sigma-Aldrich Chemical SA (Madrid, Espanha). O ácido nítrico (65% m/m) foi adquirido da Merck (Darmstadt, Alemanha) e purificado por destilação abaixo do ponto de ebulição em um destilador de quartzo (Kürnern Analys enttechnik, Rosenheim, Alemanha). Uma solução padrão multielementar ICP III foi obtida da Perkin Elmer (Shelton CT, EUA), e uma solução estoque de Rh fornecido pela Sigma-Aldrich (Buchs, Suíça), utilizados após diluição adequada. O gás argônio com uma pureza de 99,99% foi adquirido da

White Martins (São Paulo, Brasil). Água deionizada com uma resistividade de 18,2 MΩ/cm foi obtida a partir de um Milli-Q Plus sistema (Millipore, Bedford, EUA).

Para o procedimento de digestão gastrointestinal foram utilizados os seguintes reagentes: ácido clorídrico (37% m/m), bicarbonato de sódio, pepsina, glicodeoxicolato de sódio, taurodeoxicolato de sódio, taurocolato de sódio e pancreatina, obtidos da Sigma-Aldrich (St.Louis, EUA).

## 2.2 Instrumentação

As análises elementares foram realizadas utilizando um espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), modelo ELAN 6000 (Perkin-Elmer SCIEX, Thornhill, Canadá). A digestão foi realizada em micro-ondas MLS-1200 Mega (Milestone, Sorisole, Itália). Foi aplicado um nebulizador microconcentrado MCN-100 (Tecnologias CETAC), acoplado com uma câmara de pulverização ciclônica (Perkin-Elmer SCIEX) e conectado a uma bomba peristáltica, modelo 7331-15 (Ismatec, Suíça). As condições instrumentais foram 15 L min<sup>-1</sup> de fluxo de gás principal de argônio, 1,2 L min<sup>-1</sup> de fluxo de gás auxiliar, 1,0 L min<sup>-1</sup> de fluxo de gás nebulizador e 800 W de frequência de rádio. Os isótopos monitorados foram, <sup>27</sup>Al, <sup>138</sup>Ba, <sup>112</sup>Cd, <sup>59</sup>Co, <sup>63</sup>Cu, <sup>56</sup>Fe, <sup>7</sup>Li, <sup>24</sup>Mg, <sup>55</sup>Mn, <sup>23</sup>Na, <sup>61</sup>Ni, <sup>208</sup>Pb, <sup>82</sup>Se, <sup>103</sup>Rh e <sup>66</sup>Zn.

Devido às interferências espectrais em relação massa/carga (m/z) de Ca e K, a determinação desses elementos foi efetuada utilizando espectrômetro de absorção atômica com fonte contínua de alta-resolução (AASHR-CS) ContrAA 700 (Analytik Jena AG, Jena, Alemanha). As condições operacionais e analíticas usadas na quantificação dos minerais por AAS HR-CR.

Para Ca utilizou-se uma chama de acetileno/óxido nitroso e as medições foram realizadas na linha de ressonância principal a 422,67 nm, enquanto que para K utilizou-se uma chama de ar-acetileno e as medições foram realizadas a 766,49 nm.

## 2.3 Amostras de méis de abelhas sem ferrão

As treze amostras de méis de abelhas sem ferrão foram obtidas diretamente de produtores de três municípios do estado de Santa Catarina, Brasil: Florianópolis, Santo Amaro da Imperatriz e São Miguel do Oeste (Tabela 3.1). As amostras foram colhidas entre março e maio de 2012/2013 e armazenadas a  $-18 \pm 2$  °C, até a realização do experimento.

Tabela 3.1 - Identificação das espécies de abelhas sem ferrão (*Meliponinae*) e descrição geográfica dos municípios de origem das amostras.

Amostra	Nome popular	Nome científico	Origem
A	Mandaçaia	<i>Melipona quadrifasciata</i>	FLN
B	Tujuba	<i>Melipona mondury</i>	FLN
C	Guaraipo	<i>Melipona bicolor</i>	FLN
D	Manduri	<i>Melipona marginata</i>	FLN
E	Mandaçaia	<i>Melipona quadrifasciata</i>	SAI
F	Manduri	<i>Melipona marginata</i>	SMO
G	Vorá ou Borá	<i>Tetragonisca clavipes</i>	SMO
H	Jataí	<i>Tetragonisca angustula angustula</i>	SMO
I	Guaraipo	<i>Melipona bicolor</i>	SMO
J	Uruçu Nordestina	<i>Meliponascutellaris</i>	SMO
K	Tubuna	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	SMO
L	Uruçu Amarela	<i>Melipona rufivestris mondoy</i>	SMO
M	Mandaçaia	<i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i>	SMO

\***Município:** FLN= Florianópolis, SAI= Santo Amaro da Imperatriz, SMO = São Miguel do Oeste.

Fonte: próprio autor.

## 2.4 Preparo da amostra para análise de minerais

Amostras foram preparadas em frascos cônicos de polipropileno (tipo Falcon), onde massas de 1500 mg de amostras foram diluídas em 10 mL ( $0,7 \text{ mol L}^{-1}$ ) de  $\text{HNO}_3$  e analisadas utilizando sistemas de micro nebulização (MCN-100).

Devido à ausência de um material certificado para estudos sobre amostras de mel, buscando a precisão e a confiabilidade do método proposto (usando diluição simples) as amostras simplesmente diluídas foram comparadas com a digestão com microondas, um método padrão para análises de mel (etapa de microondas, Milestone, 1995). Para corrigir os desvios instrumentais todas as medições foram realizadas utilizando  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de Rh como padrão interno. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g g}^{-1}$ .

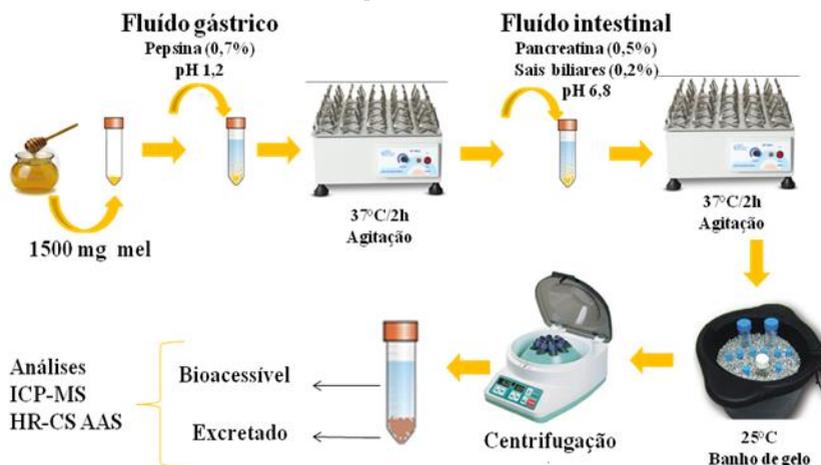
## 2.5 Bioacessibilidade de minerais

A simulação gastrointestinal *in vitro* foi realizada com base no método descrito por Nascimento (2011), Pohl et al. (2012) e Bertin et al. (2016), com modificações. O método consistiu em duas etapas: digestão gástrica e digestão intestinal. Massas individuais de 1,5 g das amostras foram incubadas sob agitação, adicionadas de 3 mL da solução de fluido gástrico (320 mg de pepsina, 0,7 mL de  $\text{HCl}$   $12 \text{ mol L}^{-1}$  e pH 1,2) durante 2 h a  $37^\circ\text{C}$ . Em seguida, as soluções de amostra resultantes foram adicionadas de 4 mL de solução de fluido intestinal (500 mg de pancreatina e 210 mg de sais biliares) e neutralizadas (pH= 6,8), através da adição de solução de  $\text{NaHCO}_3$  (3% m/v). A mistura resultante foi incubada sob agitação durante 2 h a  $37^\circ\text{C}$ .

No final do período de incubação, as misturas foram centrifugadas durante 20 min (1710 g) utilizando centrífuga modelo 280R (Fanem, São Paulo, Brasil), a mistura foi dividida em duas frações (sobrenadantes e resíduos). Os resíduos foram diluídos em 10 mL ( $0,7 \text{ mol L}^{-1}$ ) de  $\text{HNO}_3$  e analisados utilizando ICP-MS e AAS.

Esses procedimentos foram efetuados em duplicata para cada amostra. Simultaneamente ao procedimento, brancos foram executados utilizando 1500 mg de água deionizada em substituição às amostras, e os resultados considerados nos cálculos finais. O procedimento pode ser observado na Figura 3.1.

Figura 3.1- Representação esquemática do método *in vitro* empregado para determinação de bioaccessibilidade dos minerais em amostras de méis de abelhas sem ferrão (*Meliponinae*).



Fonte: adaptado Nascimento (2011); Bertin et al. (2016).

## 2.6 Cálculo da bioaccessibilidade (%)

A fração (%) bioacessível foi definida como a concentração dos elementos liberados no processo de digestão gastrointestinal aplicado, em comparação com as concentrações totais para o mesmo elemento, analisadas conforme já descrito (2.4.3) e calculadas de acordo com a Equação (1) (LEUFROY et al., 2012):

$$\% \text{ Bioaccessibilidade} = \frac{(Y-Z)}{Y} * 100 \quad (1)$$

Onde,

Y = Concentração total do elemento determinado na amostra *in natura*;  
Z = Fração individual do elemento encontrado no resíduo após a digestão gastrointestinal *in vitro*.

As concentrações de minerais foram expressas em percentagem (% m/m).

## 2.7 Análise estatística

Todos os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP). Para identificar diferenças significativas entre as médias foram utilizados análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey. Para comparar os métodos de preparação de amostras, foi realizado teste t, considerando a média (por  $n = 3$ ) de cada um dos treze minerais estudados: Na, Mg, Mn, Al, Fe, Co, Cu, Zn, Cd, Pb, Ba, Ni e Li, com um nível de confiança de 95%. Todas as análises foram testadas utilizando o software STATISTICA 13.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, EUA), admitindo nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

## 3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Composição elementar total das amostras de méis de abelhas sem ferrão

#### 3.1.1 Macrominerais

Até o momento da publicação dos trabalhos realizados por nosso grupo de investigação não havia dados na literatura sobre minerais em mel de abelhas sem ferrão, assim sendo, as concentrações de minerais dos méis analisados foram comparadas com estudos já publicados com méis de abelhas *Apis mellifera*, juntamente com regulamentos existentes (Agência de Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças, Comissão das Comunidades Europeias, Codex Alimentarius e do Instituto de Medicina dos EUA (OIM) específicos para cada elemento.

Os resultados da concentração total de cada um dos macrominerais estudados (média e desvio padrão) estão ilustrados na Tabela 3.2. Os resultados apresentam diferenças estatisticamente significativas para os macrominerais analisados.

Tabela 3.2- Concentração total ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) de K, Ca, Na e Mg para mel de abelhas sem ferrão (*Meliponinae*).

Amostra	K	Ca	Na	Mg
A	1730,01 $\pm$ 4,67 <sup>f</sup>	122,80 $\pm$ 0,17 <sup>e</sup>	23,98 $\pm$ 0,01 <sup>i</sup>	54,99 $\pm$ 0,43 <sup>f</sup>
B	2501,00 $\pm$ 5,83 <sup>d</sup>	102,30 $\pm$ 0,16 <sup>j</sup>	54,12 $\pm$ 2,48 <sup>f</sup>	32,50 $\pm$ 2,15 <sup>h</sup>
C	1627,00 $\pm$ 3,43 <sup>g</sup>	137,90 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	69,63 $\pm$ 1,03 <sup>d</sup>	43,07 $\pm$ 1,17 <sup>g</sup>
D	2600,01 $\pm$ 22,2 <sup>c</sup>	133,92 $\pm$ 0,75 <sup>d</sup>	64,88 $\pm$ 0,48 <sup>e</sup>	57,73 $\pm$ 0,71 <sup>e</sup>
E	1087,00 $\pm$ 3,42 <sup>h</sup>	112,24 $\pm$ 0,01 <sup>g</sup>	18,09 $\pm$ 0,23 <sup>f</sup>	62,44 $\pm$ 1,50 <sup>d</sup>
F	1089,01 $\pm$ 0,22 <sup>h</sup>	116,08 $\pm$ 0,14 <sup>g</sup>	12,73 $\pm$ 2,17 <sup>k</sup>	29,56 $\pm$ 1,53 <sup>i</sup>
G	2987,00 $\pm$ 6,61 <sup>b</sup>	136,37 $\pm$ 0,62 <sup>b</sup>	85,53 $\pm$ 0,24 <sup>c</sup>	88,06 $\pm$ 0,17 <sup>c</sup>
H	4984,02 $\pm$ 6,61 <sup>a</sup>	123,29 $\pm$ 0,19 <sup>e</sup>	260,78 $\pm$ 10,00 <sup>a</sup>	95,82 $\pm$ 3,52 <sup>b</sup>
I	802,90 $\pm$ 17,9 <sup>j</sup>	107,82 $\pm$ 0,49 <sup>j</sup>	11,90 $\pm$ 0,11 <sup>k</sup>	29,47 $\pm$ 0,41 <sup>i</sup>
J	261,59 $\pm$ 0,26 <sup>l</sup>	89,85 $\pm$ 0,25 <sup>l</sup>	32,16 $\pm$ 1,53 <sup>g</sup>	231,02 $\pm$ 4,38 <sup>a</sup>
K	2412,98 $\pm$ 7,40 <sup>e</sup>	134,91 $\pm$ 0,34 <sup>c</sup>	106,87 $\pm$ 0,90 <sup>b</sup>	63,94 $\pm$ 1,08 <sup>d</sup>
L	603,99 $\pm$ 0,18 <sup>j</sup>	88,67 $\pm$ 0,05 <sup>l</sup>	25,33 $\pm$ 0,67 <sup>h</sup>	33,24 $\pm$ 0,42 <sup>h</sup>
M	538,76 $\pm$ 2,06 <sup>k</sup>	110,90 $\pm$ 0,48 <sup>h</sup>	13,14 $\pm$ 3,38 <sup>k</sup>	25,94 $\pm$ 2,38 <sup>j</sup>

Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão. <sup>a-h</sup>Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as médias de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Fonte: próprio autor

Alguns dos principais constituintes da matriz, como Ca, K, C, Cl, P, S e seus íons poliatômicos são fontes de interferências espectrais em análise ICP-MS. Carbono, oxigênio e nitrogênio podem induzir a produção de íons poliatômicos e isso faz com que a determinação com base em alguns isótopos dificulte as análises (BATISTA et al., 2012). Assim, as concentrações totais e as frações bioacessíveis de Ca e K foram analisadas por AAS.

Verificou-se então, que K é o elemento mais abundante em todas as amostras analisadas, com valores variando de 262 a 4980  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Isso é compatível com os achados relatados por outros autores para o mel produzido por *Apis mellifera* (390,00- 6000,0  $\mu\text{g 100 g}^{-1}$ ), que consideram esse mineral quantitativamente mais importante nos méis, representando cerca de 50% do teor mineral total (POHL, 2009; RIZELIO, et al., 2012; CHUA, et al., 2012; ALVES, et al., 2013; ALQARNI, et al., 2014; CZIPA; ANDRÁSI; KOVÁCS, 2015).

O segundo mineral mais abundante em todas as amostras foi Ca, variando de 88,67 a 137,9  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Valores mais baixos são descritos por Czipa, Andrasi e Kovács (2015) para mel de *Apis mellifera*

provenientes da Hungria ( $47,90 \mu\text{g g}^{-1}$ ). No entanto, Escuredo et al. (2015) apresentaram valores semelhantes ( $112,01 \mu\text{g g}^{-1}$ ) aos relatados para méis de *Apis mellifera* provenientes da Espanha.

As concentrações de Mg e Na foram variáveis entre as amostras, de acordo com cada espécie de abelhas sem ferrão. Os valores encontrados nas amostras foram de  $25,94$  e  $231,02 \mu\text{g g}^{-1}$  para Mg e entre  $12,73$  e  $260,78 \mu\text{g g}^{-1}$  para Na. Na maioria dos méis analisados (amostras A, E, F, G, I, J, L e M) o conteúdo de Mg foi o terceiro maior, enquanto nas amostras B, C, D, H e K o terceiro elemento mais abundante foi o Na.

Os valores de Mg encontrados foram superiores aos encontrados por Czipa, Andrasi e Kovács (2015) e Jevtić et al. (2012) ( $1,91$  a  $35 \mu\text{g g}^{-1}$ ), porém valores semelhantes ( $2,28$  a  $360 \mu\text{g g}^{-1}$ ) foram descritos por Batista et al. (2012), Habib et al. (2014) e Pohl et al. (2012), em estudos realizados com méis de *Apis mellifera*. Para Na os valores encontrados neste estudo foram superiores aos de Rizelio et al. (2012) para mel de *Apis mellifera* ( $5,91$  e  $64,17 \mu\text{g g}^{-1}$ ).

### 3.1.2 Microminerais

Cinco importantes microminerais foram estudados e os resultados das concentrações totais estão dispostos na Tabela 3.3.

Tabela 3.3-Concentração total ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) de Fe, Co, Cu, Zn e Mn para méis de abelhas sem ferrão (*Meliponinae*).

Amostras	Fe	Co	Cu	Zn	Mn
A	$0,60 \pm 0,01^{\text{kj}}$	< LOQ	$0,07 \pm 0,01^{\text{g}}$	$0,09 \pm 0,09^{\text{e}}$	$0,52 \pm 0,04^{\text{m}}$
B	$0,33 \pm 0,03^{\text{k}}$	< LOQ	$0,40 \pm 0,01^{\text{b}}$	$0,55 \pm 0,01^{\text{b}}$	$3,05 \pm 0,19^{\text{d}}$
C	$0,79 \pm 0,01^{\text{h}}$	< LOQ	$0,15 \pm 0,01^{\text{f}}$	$0,66 \pm 0,09^{\text{ab}}$	$1,47 \pm 0,03^{\text{i}}$
D	$0,82 \pm 0,01^{\text{h}}$	< LOQ	$0,24 \pm 0,01^{\text{d}}$	$0,65 \pm 0,06^{\text{ab}}$	$3,28 \pm 0,06^{\text{c}}$
E	$0,41 \pm 0,02^{\text{j}}$	< LOQ	$0,08 \pm 0,01^{\text{g}}$	$0,14 \pm 0,01^{\text{de}}$	$0,86 \pm 0,02^{\text{l}}$
F	$5,78 \pm 0,48^{\text{b}}$	$0,05 \pm 0,01^{\text{a}}$	$0,08 \pm 0,01^{\text{g}}$	$0,17 \pm 0,01^{\text{de}}$	$2,06 \pm 0,10^{\text{f}}$
G	$2,56 \pm 0,04^{\text{d}}$	$0,06 \pm 0,01^{\text{a}}$	$0,45 \pm 0,01^{\text{b}}$	$0,79 \pm 0,03^{\text{a}}$	$1,54 \pm 0,02^{\text{h}}$
H	$4,14 \pm 0,23^{\text{c}}$	< LOQ	$0,67 \pm 0,03^{\text{a}}$	$0,61 \pm 0,04^{\text{ab}}$	$2,98 \pm 0,11^{\text{e}}$
I	$1,24 \pm 0,02^{\text{g}}$	< LOQ	$0,08 \pm 0,02^{\text{g}}$	$0,33 \pm 0,01^{\text{cd}}$	$1,75 \pm 0,03^{\text{g}}$
J	$6,22 \pm 0,82^{\text{a}}$	< LOQ	$0,41 \pm 0,01^{\text{c}}$	< LOQ	$5,69 \pm 0,19^{\text{a}}$
K	$2,04 \pm 0,05^{\text{e}}$	< LOQ	$0,24 \pm 0,04^{\text{d}}$	$0,48 \pm 0,01^{\text{bc}}$	$4,13 \pm 0,08^{\text{b}}$
L	$1,79 \pm 0,02^{\text{f}}$	< LOQ	$0,07 \pm 0,07^{\text{g}}$	$0,57 \pm 0,18^{\text{b}}$	$1,24 \pm 0,02^{\text{k}}$
M	$0,66 \pm 0,09^{\text{i}}$	< LOQ	< LOQ	$0,08 \pm 0,06^{\text{c}}$	$1,38 \pm 0,10^{\text{j}}$

<LOQ = Menor que o limites de quantificação. Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão. <sup>a-m</sup> Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as médias de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Fonte: próprio autor.

Os microminerais estudados mostraram grande variação entre as amostras de mel de abelhas sem ferrão. Os teores de Fe variaram de 0,33 a 6,22  $\mu\text{g g}^{-1}$ , apresentando resultados semelhantes às amostras de mel de *Apis mellifera* estudadas nos Emirados Árabes Unidos (HABIB et al., 2014), Turquia (YÜCEL; SULTANOĞLU, 2013) e no Brasil (BATISTA et al., 2012). Estudos como os de Jevtić et al. (2012) e Czipa, Andrasi e Kovács (2015), realizados também com méis de abelha *Apis mellifera*, apontam concentrações menores (0,108 - 2,36  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) quando comparadas aos méis de abelhas sem ferrão analisados neste estudo.

O Zn não foi detectado em apenas uma das amostras, as demais apresentaram valores de 0,08 a 0,79  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Czipa e colaboradores (2015) apresentam valores superiores para méis Húngaros produzidos por *Apis mellifera*.

Os teores de Mn variaram de 0,52 a 5,69  $\mu\text{g g}^{-1}$ , apresentando concentrações semelhantes aos valores descritos na literatura para méis de abelha *Apis Mellifera* (POHL et al., 2012; BATISTA et al., 2012; CZIPA; ANDRASI; KOVÁCS, 2015; HABIB et al., 2014).

Os valores encontrados para Cu foram de 0,07 a 0,67  $\mu\text{g g}^{-1}$ . O Cu não foi detectado na amostra M (LOD = 0,001  $\mu\text{g g}^{-1}$ ). O Co foi quantificável apenas em duas amostras (F e G) com valores de 0,05 e 0,06  $\mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente. Esses resultados foram semelhantes aos méis de abelha *Apis mellifera* brasileiros, neozelandeses e turcos analisadas por Vanhanen et al. (2011), Batista et al. (2012) e Yücel e Sultanoğlu (2013).

## 3.1.3 Metais

As concentrações dos metais estudados nas amostras de mel de abelhas sem ferrão estão ilustradas na Tabela 3.4. A ordem de concentração na maioria das amostras foi Al>Ba> Ni>Li.

Tabela 3.4 - Concentração total ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) de Al, Ba, Ni e Li para mel de abelhas sem ferrão (*Meliponinae*).

Amostra	Al	Ba	Ni	Li
A	$0,60 \pm 0,03^l$	$0,14 \pm 0,09^j$	< LOQ	< LOQ
B	$2,75 \pm 0,15^e$	< LOQ	< LOQ	< LOQ
C	$2,66 \pm 0,20^f$	$0,11 \pm 0,01^k$	< LOQ	< LOQ
D	$2,92 \pm 0,20^d$	$0,19 \pm 0,01^i$	< LOQ	< LOQ
E	$1,83 \pm 0,12^i$	$0,18 \pm 0,01^i$	< LOQ	$5,07 \pm 0,03$
F	$5,96 \pm 0,30^b$	$0,41 \pm 0,01^e$	< LOQ	< LOQ
G	$1,79 \pm 0,23^i$	$2,56 \pm 0,06^a$	$0,03 \pm 0,01^b$	< LOQ
H	$3,52 \pm 0,27^c$	$0,70 \pm 0,03^c$	$0,20 \pm 0,01^a$	< LOQ
I	$1,43 \pm 0,04^j$	$0,34 \pm 0,01^f$	< LOQ	< LOQ
J	$11,32 \pm 0,27^a$	$1,35 \pm 0,05^b$	< LOQ	< LOQ
K	$2,01 \pm 0,02^g$	$0,57 \pm 0,01^d$	$0,02 \pm 0,01^b$	< LOQ
L	$1,93 \pm 0,03^h$	$0,28 \pm 0,01^g$	< LOQ	< LOQ
M	$1,08 \pm 0,02^k$	$0,23 \pm 0,02^h$	< LOQ	< LOQ

<LOQ = Menor que o limites de quantificação. Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão. <sup>a-k</sup> Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as médias de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Fonte: Próprio autor

O Al apresentou valores de 0,60 a 11,32  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Para o Ba os valores encontrados foram da ordem de 0,11 a 2,53  $\mu\text{g g}^{-1}$ , porém para a amostra B não foi possível quantificar (LOQ = 0,03 $\mu\text{g g}^{-1}$ ) (Apêndice A). O Ni foi quantificável apenas nas amostras G, H e K com valores de 0,003, 0,20 e 0,02  $\mu\text{g g}^{-1}$  respectivamente, e o Li foi quantificável apenas na amostra E (5,07  $\mu\text{g g}^{-1}$ ). Os resultados encontrados são inferiores aos relatados por Di Bella et al. (2015) para mel de abelha *Apis mellifera*.

Os teores de metal pesado (Pb e Cd) foram determinados para todas as amostras e apresentaram valores abaixo do limite de quantificação (LOQ = 0,03 $\mu\text{g g}^{-1}$ ) (Apêndice A). Nenhuma das amostras excede os valores considerados tóxicos, conforme tabulado pela

Agência para Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças (ATSDR, 2015).

Estudos realizados com o mel de abelha *Apis mellifera*, relatam que a concentração de minerais no mel está relacionada com origem geográfica, floral, composição geoquímica e poluição ambiental local (POHL, 2009; BATISTA et al, 2012; RIZELIO et al., 2012). A presença de elementos, Ca, K, Mg, Li e Na, estão associadas com origem floral e as características do solo. Por outro lado, Fe, Zn, Cu, Ni, Al, Cd e Pb são basicamente associados à contaminação no processo de pós colheita ou poluição ambiental (POHL, 2009). Ao procurar por exsudado, néctar, pólen e plantas dentro de um território, as abelhas entram em contato com as plantas, ar, água e solo, onde pode haver contaminação ambiental, possibilitando o transporte dos poluentes provenientes dos arredores para as matérias primas coletadas (POHL, 2009).

Esse estudo mostrou que méis de diferentes espécies de abelhas sem ferrão (A, B, C e D) produzidos na mesma localidade apresentaram diferentes concentrações de minerais. Isso pode ser atribuído às características específicas de cada espécie de abelha, por exemplo, a construção do ninho e a preferência da floração. O material escolhido por cada espécie na construção da colmeia, também é um fator relevante, uma vez que a colmeia é construída com geopropolis, uma substância composta de resina, cera e terra, que pode variar de acordo com a espécie de abelha e região geográfica (FRANCHIN et al., 2012). Assim, elementos minerais e outras substâncias podem ser transferidos para o mel através da colmeia, devido ao contato durante o armazenamento. As características específicas do mel como pH e acidez, que ajudam na transferência de compostos, devem ser levadas em consideração.

Por outro lado, é possível observar que abelhas da mesma espécie (A, E e M), criadas em diferentes localidades geográficas também apresentam diferenças na composição dos minerais, possivelmente devido à variação na floração predominante, o que está de acordo com os estudos já realizados com méis de abelha *Apis mellifera* (Da SILVA et al., 2016).

### **3.3 Bioacessibilidade em méis de abelhas sem ferrão**

Os resultados encontrados neste estudo (itens 3.1.1, 3.1.2 e 3.1.3) demonstraram que méis de abelhas sem ferrão apresentam quantidades consideráveis de minerais. A determinação da concentração total de elementos minerais nos méis é importante para garantir a

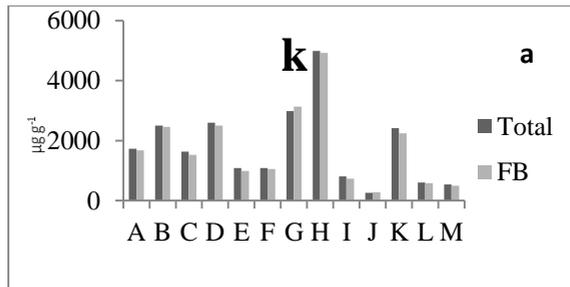
qualidade do produto, mas a avaliação da bioacessibilidade também pode prever os possíveis efeitos nutricionais relacionados à ingestão desse produto alimentar (FERNÁNDEZ-GARCÍA et al., 2009; POHL et al., 2012). Infelizmente, o número de relatórios sobre a análise de especiação dos elementos minerais no mel e a avaliação da sua bioacessibilidade *in vitro* tem sido limitado para *Apis mellifera* ou inexistente para abelhas sem ferrão até a presente data.

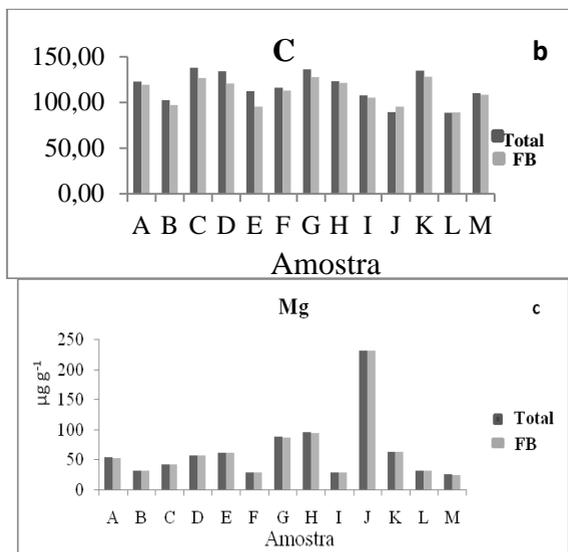
Considerando a função fisiológica normal de um organismo humano, foram estudadas as frações bioacessíveis dos macrominerais (K, Ca, Mg) dos microminerais (Fe, Zn, Mn, Co, Cu) e dos metais (Al, Ni, Pd, Cd, Li, Ba) em amostras de méis de abelhas sem ferrão.

### 3.2.1 Bioacessibilidade de macrominerais

Com a bioacessibilidade dos macrominerais Ca, K e Mg avaliada nas amostras de méis de abelhas sem ferrão foi possível verificar que K (90,92 a 105,03%), Ca (84,97 a 106%) e Mg (95,82 a 99,92%) apresentam níveis elevados de bioacessibilidade. Na Figura 3.2, é perceptível a pequena diferença entre valores da fração bioacessível em relação à concentração total dos macrominerais estudados. O estudo com méis de abelhas *Apis mellifera* realizados por de Pohl et al. (2012), relata elevada percentagem bioacessível para Ca e Mg. Entretanto, para o K não foram encontrados estudos de bioacessibilidade em amostras de mel.

Figura 3.2- Comparação da fração bioacessível em relação à concentração total de a- K, b - Ca e c -Mg dos méis de abelhas sem ferrão (*Meliponinae*).





Legenda: As siglas superiores são os compostos; Leras de A- M são as amostras estudadas expostas na Tabela 3.3 ; FB- Fração bioacessível.

Não foi possível quantificar o sódio nas frações bioacessíveis, considerando a elevada concentração de sais biliares adicionada ao processo de bioacessibilidade *in vitro*, os quais apresentam elevadas concentrações de sódio, podendo assim, interferir no resultado real das análises. Além disso, soluções com uma elevada concentração de sódio podem depositar-se na superfície do cone (discos de metal com um pequeno orifício (~1mm) central, com finalidade de conduzir a amostra para a posição central do feixe de íons proveniente do plasma) e promover interferências espectrais e não-espectrais resultando em valores não confiáveis (De GOIS, 2012).

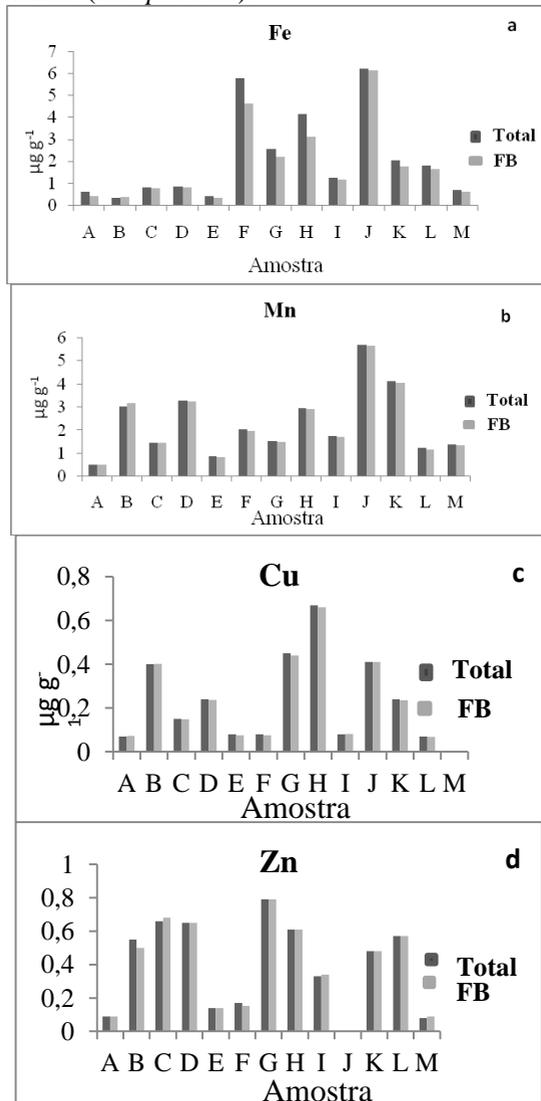
### 3.2.2 Bioacessibilidade de microminerais

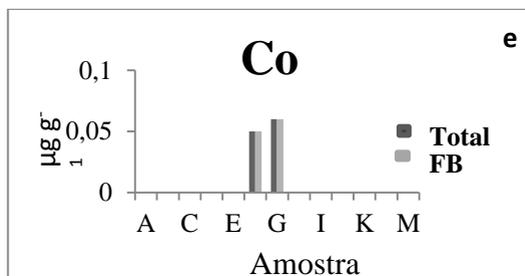
Todos os elementos pesquisados e detectados em níveis inferiores ao LOQ no estudo das concentrações totais (itens 3.2.1, 3.2.2 e 3.2.3) foram desconsiderados na quantificação das frações bioacessíveis e não foram apresentados nas figuras.

Os microminerais com valores mais elevados de bioacessibilidade foram: Co, Cu, Zn, Mn e Fe. A bioacessibilidade dos cinco microminerais estudados variou de 73,62 a 107,69% (Figura 3.3). No estudo de Pohl et al. (2012), realizado com amostras de méis de

abelha *Apis mellifera* oriundos da Polônia, apresenta valores semelhantes para os microminerais, com valores médios de 96% (Cu), 83% (Fe), 92% (Mn) e 90% (Zn).

Figura 3.3- Comparação da fração bioacessível em relação à concentração total de a- Fe, b- Mn, c- Cu, d- Zn e e - Co dos méis de abelhas sem ferrão (*Meliponinae*).





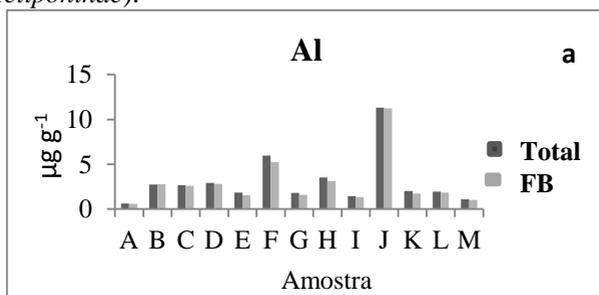
Legenda: As siglas superiores são os compostos; Leras de A- M são as amostras estudadas expostas na Tabela 3.3 ; FB- Fração bioacessível.

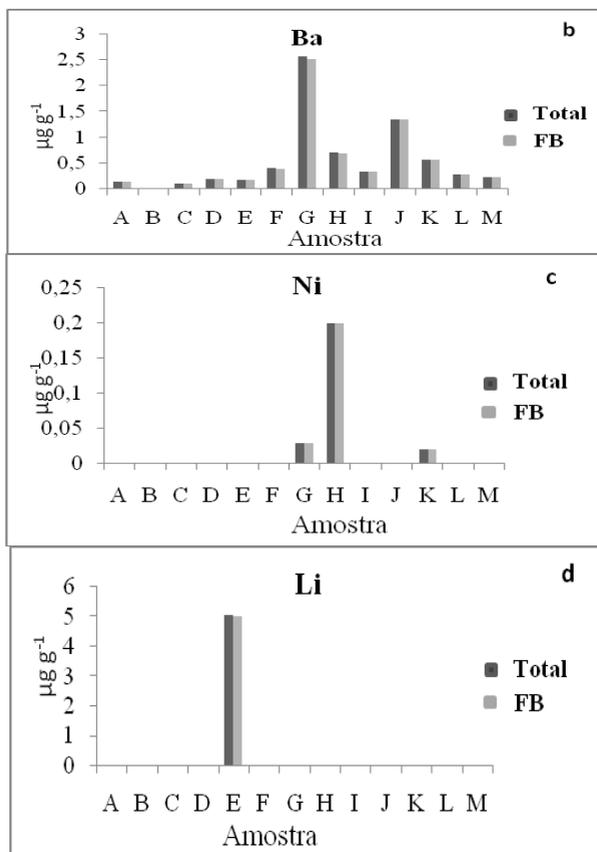
Fonte: próprio autor

### 3.2.3 Bioacessibilidade de metais

Em relação aos metais, as percentagens das frações bioacessíveis para Al, Ba, Ni e Li variaram de 84,56 a 100%. Não há dados na literatura sobre bioacessibilidade de metais em méis, entretanto outras matrizes alimentares já foram estudadas e relataram níveis de bioacessibilidade inferiores aos encontrados neste estudo (ARPADJAN et al., 2013; HU et al., 2013; SCHULZ, 2015), essa variação pode ser decorrente da complexidade química de cada alimento. Essa elevada bioacessibilidade encontrada nas amostras de méis estudadas também pode ser vista na Figura 3.4.

Figura 3.4- Comparação da fração bioacessível em relação à concentração total de a- Al, b- Ba, c- Ni e d- Li dos méis de abelhas sem ferrão (*Meliponinae*).





Legenda: As siglas superiores são os compostos; Leras de A- M são as amostras estudadas espostas na Tabela 3.3; FB- Fração bioacessível.  
 Fonte: próprio autor

O presente estudo mostrou que as percentagens das frações bioacessíveis dos elementos minerais são elevadas, apontando um valor médio de 90%, muito semelhantes ao estudo realizado com mel de abelha *Apis mellifera* executado por Pohl et al., (2012), o qual relata valores entre 83 a 92% para mel de cores escuras produzidos na Polônia. Bioacessibilidade de minerais elevada também foi relatada por Seraglio et al. (2017) em méis de *Apis mellifera* do Brasil.

Os altos valores de bioacessibilidade de minerais nos méis podem ser atribuídos ao fato de que os elementos estudados provavelmente permanecem livres, sendo facilmente solubilizados e

disponíveis para absorção pelo organismo (sistema simulado *in vitro*) (POHL et al., 2012; POHL, 2009; SERAGLIO et al., 2017). Além disso, outros autores relataram que a presença de compostos fenólicos e ácido ascórbico em alimentos aumentam a bioacessibilidade de minerais (VITALI et al., 2008; RAMOSA et al., 2012; LIMA et al., 2014). Esse achado pode ser relevante para estudos sobre mel, uma vez que este produto contém compostos fenólicos e ácido ascórbico (GUERRINI et al., 2009; SILVA et al., 2013; Da SILVA et al., 2013).

Considerando que uma ingestão adequada de minerais e oligoelementos é um aspecto importante para uma dieta saudável, também é possível ressaltar que os elementos micro e macro-minerais são apresentados pelo Subsídio Dietético Recomendado (RDA) devido à sua essencialidade (ANEXO A) (IOM, 2001). Considerando a elevada bioacessibilidade de elementos, as contribuições da ingestão de mel para RDAs também foram avaliadas, levando em consideração o consumo diário de 100 g de mel (a média diária máxima de mel para consumo adulto) (MOLAN, 2001). De acordo com os resultados, o mel pode contribuir para a RDA, principalmente com os elementos Mn, K, Fe e Mg em 31,61%, 10,44%, 7,84% e 5,50%, respectivamente. Os outros elementos estudados contribuem com menos de 2% da RDA.

#### **4. CONCLUSÃO**

Nesse estudo foi possível identificar e quantificar elementos minerais em méis de abelhas sem ferrão. As amostras analisadas contêm, minerais como potássio, predominante em todos os méis analisados, seguido por cálcio, sódio, magnésio, manganês e níveis traços de lítio, ferro, alumínio, cobalto, níquel, cobre, zinco e bário. Valores de chumbo e cádmio não foram detectados e as concentrações dos demais metais foram suficientemente baixas, não representando risco à saúde humana. A avaliação da bioacessibilidade sob condições simuladas de digestão gastrointestinais *in vitro* mostrou que os compostos minerais podem ser considerados bioacessíveis e potencialmente biodisponíveis.

**REFERÊNCIAS**

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR). Minimal Risk Levels (MRLs) for Hazardous Substances. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/mrls/mrllist.asp#64tag>>. Acesso em: 15 out. 2015.

ALQARNI, A. S. et al. Mineral content and physical properties of local and imported honeys in Saudi Arabia. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 18, ed.5, p. 618–625, 2014.

ALVES, A. et al. Antioxidant activity, quality parameters and mineral content of Portuguese monofloral honeys. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.30, ed. 2, p. 130–138, 2013.

ARPADJAN, S. et al. Bioaccessibility of Cd, Cu, Fe, Mn, Pb, and Zn in hazelnut and walnut kernels investigated by an enzymolysis Approach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.61, p. 6086-6091, 2013.

BARONI, M. V. et al. Composition of honey from Córdoba (Argentina): Assessment of North/South provenance by chemometrics. **Food Chemistry**, v. 114, n. 2, p. 727-733, 2009.

BATISTA, B. L. et al. Multi-element determination in Brazilian honey samples by inductively coupled plasma mass spectrometry and estimation of geographic origin with data mining techniques. **Food Research International**, v. 49, n.1, p. 209–215, 2012.

BERTIN, R. L. et al. Mineral composition and bioaccessibility in *Sarcocornia ambigua* using ICP-MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.47, p.45–51, 2016.

BILUCA, F. C. et al. 5-HMF and carbohydrates content in stingless bee honey by CE before and after thermal treatment. **Food Chemistry**, v.159, p. 244-249, 2014.

BULDINI, P. L. et al. Ion chromatographic and voltammetric determination of heavy and transition metals in honey. **Food Chemistry**, v. 73, p. 487-495, 2001.

CHUTTONG, B.; CHANBANGA, Y.; SRINGARM, K.; BURGETTE M. Physicochemical Profiles of Stingless Bee (Apidae: Meliponini) Honey from South East Asia (Thailand). **Food Chemistry**, v. 192, p. 149-155, 2016.

CHUA, L. S. et al. Multi-elemental composition and physical properties of honey samples from Malaysia. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 880–887, 2012.

COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de Nutrientes**. 3ª ed. Barueri: Manole, 2009.

CZIPA, N.; ANDRÁSI, D.; KOVÁCS B. Determination of essential and toxic elements in Hungarian honeys. **Food Chemistry**, v. 175, p. 536–542, 2015.

DA SILVA, I. A. A., et al. Phenolic profile, antioxidant activity and palynological analysis of stingless bee honey from Amazonas, Northern Brazil. **Food chemistry**, v.141, n.4, p. 3552–3558, 2013.

De GOIS, J. S. **Avaliação analítica de sistemas de introdução de amostra para a determinação de elementos traço em extratos lixiviados contendo ácido acético por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado**. 2012. 82 f. Dissertação (Dissertação em Química). Departamento de química Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

DA SILVA, P. M. et al. Honey: Chemical composition, stability and authenticity. **Food Chemistry**, v. 196, p. 309-323, 2016.

De SOUSA, J. M. et al. Sugar profile, physicochemical and sensory aspects of monofloral honeys produced by different stingless bee species in Brazilian semi-arid region. **LWT-Food Science and Technology**, v. 65, p. 645-651, 2016.

DI BELLA, G. et al. Geographical discrimination of Italian honey by multi-element analysis with a chemometric approach. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 44, p. 25-35, 2015.

ESCUREDO, O. et al. Near infrared spectroscopy applied to the rapid prediction of the floral origin and mineral content of honeys. **Food Chemistry**, v. 170, p.47-54, 2015.

FERNÁNDEZ-GARCÍA, E. et al. *In vitro* bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. **Nutrition Research**, v. 29, p. 751-760, 2009.

FRANCHIN, M. et al. Geopropolis from *Melipona scutellaris* decreases the mechanical inflammatory hypernociception by inhibiting the production of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n.2, p. 709-715, 2012.

GUERRINI, A. et al. Ecuadorian stingless bee (*Meliponinae*) honey: a chemical and functional profile of an ancient health product. **Food Chemistry**, v. 114, n.4, p.1413–1420, 2009.

HABIB, H.M. et al. Physicochemical and biochemical properties of honeys from arid regions. **Food Chemistry**, v. 153, p.35-43, 2014.

HU, J. et al. Bioaccessibility, dietary exposure and human risk assessment of heavy metals from market vegetables in Hong Kong revealed with an *in vitro* gastrointestinal model. **Chemosphere**, v. 91, p. 455-461, 2013.

INSTITUTE OF MEDICINE - IOM. (2001). Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. Washington, DC: National Academy Press.

JEVTIĆ, G. et al. Quality of false acacia honey from Rasina district in Serbia. **Journal of Hygienic Engineering and Design**, v. 1, p. 278–283, 2012.

KROPF, U. et al. Determination of the geographical origin of Slovenian black locust, lime and chestnut honey. **Food Chemistry**, v. 121, n. 3, p. 839-846, 2010.

LACHMAN, J. et al. Analysis of minority honey components: Possible use for the evaluation of honey quality. **Food Chemistry**, v. 101, p.973-979, 2007.

- LECH, T. ICP OES and CV AAS in determination of mercury in an unusual fatal case of long-term exposure to elemental mercury in a teenager. **Forensic Science International**, v. 237, p. 1-5, 2014.
- LEUFROY, A. et al. Use of a continuous leaching method to assess the oral bioaccessibility of trace elements in seafood. **Food Chemistry**, v. 135, p. 623-633, 2012.
- LIMA, A. C. S. et al. *In vitro* bioaccessibility of copper, iron, zinc and antioxidant compounds of whole cashew apple juice and cashew apple fibre (*Anacardium occidentale* L.) following simulated gastro-intestinal digestion. **Food Chemistry**, v.161, p. 142-147,2014.
- MILESTONE. Microwave Laboratory system. Milestone application note for microwave digestion. Milestone Application. Italian, 1995.
- Molan. P. C. **Why honey is effective as a medicine**. 2. The scientific explanation of its effects Bee World, 82 (2001), pp. 22–40.
- NASCIMENTO, A. N. **Especiação e biodisponibilidade de metaloproteínas de Ca, Cu, Fe, Mg e Zn em castanha de caju (*Anacardium occidentale*)**. 2011. 151 f. Tese (Tese em Química). Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- OLIVEIRA, H. R et al. Development of methods for the determination of cadmium and thallium in oil shale by-products with graphite furnace atomic absorption spectrometry using direct analysis. **Microchemical Journal**, v, 116, p. 5-61, 2014.
- OLIVEIRA, P. S. et al. Ácidos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante em méis de *Melipona fasciculata*, *M. flavolineata* (Apidae, Meliponini) E *Apis mellifera* (Apidae, Apini) da Amazônia. **Química Nova**, v. 35, n.9, p. 1728-1732, 2012.
- POHL, P. Determination of metal content in honey by atomic absorption and emission spectrometries. **Trends Analysis Chemistry**, v. 28, p.117-128, 2009.
- POHL, P. et al. Bioaccessibility of Ca, Cu, Fe, Mg, Mn and Zn from commercial bee honeys. **Food Chemistry**, v. 134, p. 392-396, 2012.

RAMÓN-SIERRA, J. M. et al. Electrophoresis characterisation of protein as a method to establish the entomological origin of stingless bee honeys. **Food Chemistry**, v. 183, p. 43-48, 2015.

RAMOSA, A. et al. Bioaccessibility of Se, Cu, Zn, Mn and Fe, and heme iron content in unaged and aged meat of Hereford and Braford steers fed pasture. **Meat Science**, v. 91, p.116–124, 2012.

RIZELIO, V. M. et al. Fast determination of cations in honey by capillary electrophoresis: A possible method for geographic origin discrimination. **Talanta**, v.99, p. 450-456, 2012.

RODRÍGUEZ-ROQUE, María Janeth et al. Soymilk phenolic compounds, isoflavones and antioxidant activity as affected by in vitro gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 136, n. 1, p. 206-212, 2013.

SCHULZ, M. **Influência da maturação sobre o conteúdo e bioacessibilidade de minerais e perfil de compostos fenólicos dos frutos da palmeira juçara (*euterpe edulismartius*)**. 2015. 171f. Dissertação. (Dissertação de Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC, Florianópolis, 2015.

SILVA, T. M. S. et al. Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaíra (*Melipona subnitida*) honey. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.29, p. 10-18, 2013.

SOUSA, J. M. et al. Polyphenolic profile and antioxidant and antibacterial activities of monofloral honeys produced by Meliponini in the Brazilian semiarid region. **Food Research International**, v. 84, p. 61-68, 2016.

TERRAB, A. et al. Contribution to the study of avocado honeys by their mineral contents using inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Food Chemistry**, v. 92, p. 305-309, 2005.

TOALDO, I. M. et al. Phytochemical polyphenol extraction and elemental composition of *Vitislabrusca* L. grape juices through

optimization of pectinolytic activity. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, p. 2581-2594, 2014.

VANHANEN, L.P. et al. Mineral analysis of mono-floral New Zealand honey. **Food Chemistry**, v. 128, p. 236–240, 2011.

VITALI, D. et al. Bioaccessibility of Ca, Mg, Mn and Cu from whole grain tea-biscuits: Impact of proteins, phytic acid and polyphenols. **Food Chemistry**, v. 110, n.1, p. 62-68, 2008.

YÜCEL, Y.; SULTANOĞLU, P. Characterization of hatay honeys according to their multi-element analysis using ICP-OES combined with chemometrics. **Food Chemistry**, v. 140, p. 231-237, 2013.

## **CAPÍTULO 4**

### **COMPOSTOS BIOATIVOS EM MÉIS DE ABELHAS SEM FERRÃO (*Meliponinae*): COMPOSTOS FENÓLICOS, GLUCOSINOLATOS E SULFORAFANO**

## RESUMO

Nos últimos anos, os méis de abelhas sem ferrão (*Meliponinae*) têm apresentado crescente valorização, por suas propriedades sensoriais e físico-químicas peculiares e, principalmente, por sua alegação de benefícios à saúde humana, apresentando assim, relevância econômica e potencial produtivo no mercado nacional de méis da região do sul do Brasil, especialmente do estado de Santa Catarina. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi investigar compostos bioativos possivelmente presentes em amostras de méis de abelhas sem ferrão (*Meliponinae*) como: compostos fenólicos, glucosinolatos e sulforafano. Vinte e oito compostos fenólicos foram encontrados, dentre eles, os principais compostos fenólicos foram ácido salicílico (6,0 - 94,8  $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ), ácido *p*-cumárico (4,0 - 110,1  $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ), aromadentrina (7,9 - 337,3  $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ) e taxifolina (12,0 - 1910  $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ). A identificação e quantificação de ácido mandélico, ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido rosmarínico, aromadentrina, isoquercetrina, eriodictilol, vanilina, umbeliferona, siringaldeído, sinapaldeído e carnosol em méis de abelhas sem ferrão se trata de um relato inédito. Os compostos glucosinolatos e sulforafano não foram detectados nas amostras de méis estudadas.

**Palavras-chave:** Mel, Compostos fenólicos, Glucosinolatos, Sulforafano.

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma das maiores diversidades de espécies de abelhas sem ferrão (*Meliponinae*) do mundo. Atualmente cerca de 190 espécies já foram relatadas nos diferentes estados brasileiros (VIT; PEDRO; ROUBIK, 2013).

As abelhas sem ferrão além de oferecerem benefícios ecológicos, incluindo a conservação de plantas nativas através da polinização, também produzem méis com excelentes qualidades sensoriais, apreciados pelo seu sabor peculiar (Da COSTA et al., 2018) e popularmente valorizados e reconhecidos como um produto natural, contido de compostos químicos com atividade biológica que podem atuar na diminuição dos riscos de desenvolvimento de algumas doenças (VIT; PEDRO; ROUBIK, 2013; JAFFÉ et al., 2015).

Os efeitos benéficos à saúde associados ao consumo de mel, são atribuídos a diferentes classes de compostos bioativos, tais como vitaminas, minerais, aminoácidos, ácidos orgânicos, compostos fenólicos, entre outros (RAO et al., 2016; MIGUEL; ANTUNES; FALEIRO, 2017).

Os fenólicos estão entre os principais grupos de compostos bioativos estudados, possuem estrutura química derivada do benzeno ligada a grupos hidroxila, incluindo principalmente os ácidos fenólicos e os flavonóides, os quais são reconhecidos pelas suas contribuições na prevenção de doenças associadas ao estresse oxidativo, tais como câncer, inflamações e doenças cardiovasculares (GRUZ et al., 2011; SILVA et al., 2016; CONG-CONG et al., 2017; MARTÍN; RAMOS, 2017).

Dispor do conhecimento da composição fenólica dos méis produzidos por abelhas sem ferrão, pode auxiliar nas descobertas sobre o seu real potencial benéfico para a saúde humana e quais os compostos fenólicos envolvidos neste processo, elucidando também, o histórico de coletas de néctares selecionados pelas abelhas, podendo, assim, apontar sua origem floral e possivelmente origem geográfica.

No entanto, na literatura, são poucos os estudos que determinaram compostos fenólicos em méis de abelhas sem ferrão (ácido gálico, ácido cafeico, ácido vanílico, ácido *p*-cumárico, mericetina, ácido ferúlico, ácido *m*-cumárico, ácido *o*-cumárico, quercetina, ácido trans-cinâmico e ácido *o*-metoxinâmico, ácido 3,4-dihidroxibenzóico, cinâmico, isoramnetina, naringenina, trans- ácido abscísico, cis, trans- ácido abscísico, luteolina-7-glucósido, luteolina, aringenina, isoramnetina) (GUERRINI et al., 2009; OLIVEIRA et al.,

2012; DA SILVA et al., 2013; SILVA et al., 2013). Este fato aponta para uma necessidade de investigação, para um maior conhecimento da composição desses méis e subsequente, maior exploração de seus possíveis benefícios para a saúde.

Neste mesmo contexto, recentemente, outros dois compostos bioativos foram citados em méis, o glucosinolato e o sulforafano (ARES et al., 2015a, ARES et al., 2016).

Glucosinolatos são metabólitos secundários das plantas que estão presentes nas *brassicas*, como repolho, couve-flor ou brócolis. Por sua vez, o sulforafano é um isotiocianato derivado da degradação enzimática de um glucosinolato (ARES et al., 2014). Os glucosinolatos e seus correspondentes produtos de degradação são bem conhecidos por suas propriedades fungicidas, bactericidas, alelopáticas, atividade anticancerígena e seu potencial na diminuição de risco de doenças crônicas e degenerativas (ARES et al., 2014; KOKOTOU et al., 2017).

A quantificação de glucosinolatos e sulforafano é uma pesquisa interessante, até agora não relatada para méis de abelhas sem ferrão, o que poderia servir como marcador botânico e apontar uma possível busca das abelhas por alimentos nas flores rasteiras como as *brassicaceae*.

Considerando o crescente interesse nos méis de abelhas sem ferrão no Brasil, a associação entre o consumo de mel com a redução da incidência de doenças, a busca de potenciais marcadores de origem floral e geográfica e a carência de estudos sobre o tema em questão, assim, o propósito do trabalho foi identificar e quantificar os compostos fenólicos, glucosinolatos e o sulforafano em amostras de méis de abelhas sem ferrão, produzidos e coletados em diferentes municípios do estado de Santa Catarina.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Reagentes e soluções**

Todos os reagentes utilizados possuíam pureza analítica e todas as soluções foram preparadas utilizando água desionizada de alta pureza (18.2 M $\Omega$  cm) obtida pelo sistema de ultra purificação de água Milli Q (Millipore, Bedford, EUA). Cloreto de sódio foi obtido da Biotec (São Paulo, Brasil). Sulfato de sódio anidro, hexano, acetato de etila, éter etílico e hidróxido de sódio foram adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). O metanol, ácido clorídrico e ácido fórmico, foram obtidos da Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Os padrões de

compostos fenólicos (ácido 4-aminobenzóico, ácido salicílico, ácido cinâmico, ácido p-anísico, ácido mandélico, vanilina, ácido 4-hidroximetilbenzóico, ácido 3,4-dihidroxibenzóico, umbeliferona, ácido 4-hidroxicinâmico, ácido metoxifenilacético, ácido vanílico, ácido 4-metilumbeliferona, coniferaldeído, ácido cafeico, siringaldeído, escopoletina, ácido gálico, protocatecuico, vanílico, p-cumárico, resveratrol, kaempferol, aromadendrina, hispidulina, quercetina, taxifolina, miricetina, rutina, ácido ferúlico, ácido siríngico, sinapaldeído, ácido sinápico, crisina, pinocembrina, apigenina, galangina, naringenina, eriodictiol, fustina, catequina, epicatequina, ácido elágico, carnosol, ácido clorogênico, ácido rosmarínico, isoquercetina, naringina) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA) e Fluka Chemie AG (Buchs, Suíça). Os padrões de glucosinolatos, a glucoiberin, a glucorapanina, a glucoerucina, a gluconapina, a glucotropaeolina, a glucobrassicina, a gluconasturtiina e a sinigrina foram adquiridas da Phytoplan Diehm & und Neuberger GmbH (Heidelberg, Alemanha). Padrão de sulforafano (massa molecular: 177,3 g), formiato de amônio, hidróxido de sódio, ácidos fórmico e clorídrico foram obtidos da Sigma Aldrich Chemie Gbmh (Steinheim, Alemanha). O etanol, metanol, DCM e a acetônitrila utilizada para glucosinolatos e sulforafano foram fornecidos pela Lab-Scan Ltd. (Dublin, Irlanda).

## 2.2 Amostras

Para o estudo dos compostos fenólicos foram analisadas 34 amostras de méis de abelhas sem ferrão, obtidas através de parcerias com meliponicultores do estado de Santa Catarina. Amostras provenientes dos municípios de São Miguel do Oeste, Florianópolis, Santo Amaro da Imperatriz e Santa Rosa de Lima, foram coletadas em três diferentes safras, safras 2012/2013, 2013/2014 e 2014/2015. A descrição das espécies, a origem botânica predominante e os municípios estão descritas na Tabela 4.1. As informações referentes às amostras foram descritas pelos meliponicultores Cleumar Liebert e Agrônomo Pedro Faria Gonçalves/Sítio Flor de Ouro, o médico veterinário Luiz Miguel Rech dos Santos, e o extensionista de EPAGRI-SC, Carlos A. Paganini. Todas as amostras foram coletadas e armazenadas em frascos de polipropileno (tipo falcon) e transportadas em caixas isotérmicas ao Laboratório de Química de Alimentos do CCA – UFSC, onde foram mantidas a  $-18 \pm 2$  °C até o momento das análises.

Destas amostras, cinco foram selecionadas para as análises de glucosinolatos e sulforafano (destacadas na Tabela 4.1), levando em conta o maior volume de amostras disponíveis para o transporte até o Laboratório de Técnicas de Separación y Análisis Aplicado (TESEA), junto ao grupo de Química Analítica Aplicada da Universidade de Valladolid, Valladolid, Espanha, onde foram executadas as análises.

Tabela 4.1- Identificação das espécies de abelhas sem ferrão (*Meliponinae*), origem botânica e municípios de origem das amostras estudadas.

Nome científico/ popular	Amostra	Origem botânica – Nome científico	Origem
<i>Melipona bicolor</i> /Guaraipo	A1	Silvestre	Florianópolis
	A2	Silvestre	São Miguel do Oeste
	A3	<i>Eucalyptus spp</i> e <i>Mimosa bimucronata</i>	Santa Rosa de Lima
	A4	<i>Eucalyptus spp</i>	Santa Rosa de Lima
	<b>A5*</b>	<b>Silvestre</b>	<b>Santa Rosa de Lima</b>
<i>Scaptotrigona bicunctata</i> /Tubuna	B1	Silvestre	São Miguel do Oeste
	B2	Silvestre	Santa Rosa de Lima
<i>Melipona quadriasciata</i> / <i>Mandaçaia</i>	C1	Silvestre	Florianópolis
	C2	Silvestre	Santo Amaro da Imperatriz
	C3	Silvestre	São Miguel do Oeste
	C4	<i>Citrussinensis</i>	Santa Rosa de Lima
	C5	<i>Hovenadulcis</i>	Santa Rosa de Lima
	C6	<i>Eucalyptus spp.</i>	Santa Rosa de Lima
	C7	<i>Mimosa bimucronata</i>	Santa Rosa de Lima
	<b>C8*</b>	<b><i>Citrussinensis</i></b>	<b>Santa Rosa de Lima</b>
	C9	<i>Hovenadulcis</i> e <i>Vernonanthura discolor</i>	Santa Rosa de Lima
	C10	Silvestre	Santa Rosa de Lima
	C11	Silvestre	Santa Rosa de Lima
C12	<i>Hovenadulcis</i> and <i>Vernonanthura discolor</i>	Santa Rosa de Lima	

*Continuação*

	D1	Silvestre	Florianópolis
	D2	Silvestre	São Miguel do Oeste
<i>Melipona marginata</i>	D3	<i>Heliconiavelloziana</i> e <i>Watsoniameriana</i>	Santa Rosa de Lima
Manduri	D4	<i>Eucalyptus</i> spp.	Santa Rosa de Lima
	D5	<i>Hovenadulcis</i> e <i>Vernonanthura discolor</i>	Santa Rosa de Lima
	D6	<i>Mimosa bimucronata</i>	Santa Rosa de Lima
<i>Tetragonisca angustula</i>	E1	Silvestre	São Miguel do Oeste
Jataí	E2	Silvestre	Santa Rosa de Lima
<i>Melipona mondury</i>	F1	Silvestre	Florianópolis
Bugia	F2	<i>Eucalyptus</i> spp.	Santa Rosa de Lima
<i>Melipona rufivestris mondory</i>			
Uruçu Amarela	G	Silvestre	São Miguel do Oeste
<i>Tetragona clavipes</i>	<b>H*</b>	<b>Silvestre</b>	<b>São Miguel do Oeste</b>
Vorá ou Borá			
<i>Melipona scutellaris</i>	<b>I*</b>	<b>Silvestre</b>	<b>São Miguel do Oeste</b>
Uruçu Nordestina			
<i>Nanotrigona testaceicornis/ Irai</i>	<b>J*</b>	<b>Silvestre</b>	<b>São Miguel do Oeste</b>
<i>Trigona fuscipennis</i>			
Munbuca	K	Silvestre	São Miguel do Oeste

Fonte: próprio autor.

\*amostras utilizadas nas análises de glucosinolatos e sulforafano.

## 2.3 Preparo das amostras

### Compostos fenólicos

Os extratos foram preparados de acordo com método descrito por Trautvetter et al. (2009), que utiliza extração líquido-líquido (LLE). As pequenas modificações realizadas no método podem ser relatadas: massa de amostras de mel (1 g) foram medidas em tubos cônicos de polipropileno graduados (tipo Falcon), adicionados de 1 mL de solução de cloreto de sódio 2% m/v. Após, 1 minuto sob agitação constante (agitador de tubo Vortex, Fisatom 774), a solução de mel diluída, foi particionada cinco vezes com 2 mL de acetato de etila (grau HPLC), totalizando 10 mL de fase orgânica, as quais foram combinadas, desidratadas com sulfato de sódio anidro por 15 minutos, filtradas em papel Watman número 1, concentradas em evaporador rotativo (40 °C) até secagem total.

O resíduo suspenso em 1 mL de metanol, diluído 10 vezes com metanol:água (70:30) e analisado por HPLC-ESI-MS/MS após microfiltração em membrana 0,45 µm (Millipore, Bedford, MA, EUA), e o resultado expresso em µg 100 g<sup>-1</sup>

### Glucosinolatos e sulforafano

Para a identificação e quantificação de glucosinolatos e sulforafano, o preparo das amostras de méis de abelhas sem ferrão foi realizado segundo os métodos descritos por Ares et al. (2015a) e Ares et al. (2016).

## 2.4 Instrumentação para análises dos compostos fenólicos

A identificação e a quantificação dos compostos fenólicos foram realizadas de acordo com Schulz et al. (2015), utilizado um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência modelo 1200 Series (Agilent Technologies, Alemanha), acoplado a espectrômetro de massas com analisador triploquadropolo/*ion trap* linear, modelo Q Trap 3200 (Applied Biosystems/MDS Sciex, Canadá). Os experimentos foram realizados utilizando fonte de ionização por eletrospray TurboIon Spray™ (Applied Biosystems/MDS Sciex, Canadá) em modo negativo. Outros parâmetros para o cone e energia de colisão, para os 47 compostos fenólicos testados, estão listados em ANEXO B. Os resultados foram expressos em µg 100 g<sup>-1</sup>.

## **2.5 Instrumentação para análises de glucosinolatos e sulforafano**

O método utilizado para identificar e quantificar glucosinolatos foi descrito por Ares et al. (2015b). O método proposto utiliza um sistema de cromatografia líquida de ultra alta eficiência (UHPLC-ACQUITY, Waters, Milford, M A, EUA) e um espectrômetro de massas com analisador por tempo-de-voe (qTOF- impacto da MaXis, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemanha), acoplados a uma fonte de ionização por eletrospray (ESI).

A determinação de sulforafano foi realizada através do método desenvolvido e validado por Ares et al. (2015a). O sistema cromatográfico consistindo em um instrumento Trap XCT LC-MS da série 1100 da Agilent Technologies (Palo Alto, CA, EUA), com fonte de ionização por eletrospray (ESI), no modo positivo. Os dados foram analisados pela Quant Analysis para LC/MSD Trap 1.6 e Data Analysis para LC /MSD Trap 2.2, ambos da Agilent Technologies.

## **2.6 Análise estatística**

As análises estatísticas foram realizadas com o software Statistica 13.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK). Os resultados experimentais foram obtidos como média  $\pm$  desvio padrão (SD) de três medidas paralelas. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguidos pelo teste de Tukey, que foi utilizado para comparar os dados obtidos para diferentes amostras de mel. Os valores médios com  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

# **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## **3.1 Compostos fenólicos**

As concentrações de compostos fenólicos individuais dos méis de abelhas sem ferrão são apresentadas nas Tabelas 4.2, 4.3, 4.4.



											<i>Continuação</i>	
<b>D6</b>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>E1</b>	94,8 ± 0,8 <sup>a</sup>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>E2</b>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	194,9 ± 23 <sup>a</sup>	n.d
<b>F1</b>	47,4 ± 2,3 <sup>c</sup>	n.d	19,9 ± 3,4 <sup>h</sup>	n.d	n.d	13,2 ± 3,2 <sup>b</sup>	n.d	12,7 ± 1,5 <sup>e</sup>	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>F2</b>	n.d	n.d	100,0 ± 0,9 <sup>a</sup>	n.d	n.d	24,5 ± 6,8 <sup>f</sup>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>G</b>	8,2 ± 0,8 <sup>h</sup>	n.d	11,8 ± 5,8 <sup>i</sup>	n.d	n.d	13,9 ± 2,3 <sup>b</sup>	182,6 ± 23 <sup>f</sup>	n.d	n.d	166,3 ± 4,5 <sup>e</sup>	n.d	n.d
<b>H</b>	70,2 ± 18 <sup>b</sup>	n.d	9,4 ± 2,2 <sup>j</sup>	n.d	n.d	6,4 ± 2,1 <sup>j</sup>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>I</b>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>J</b>	5,0 ± 1,2 <sup>j</sup>	n.d	66,1 ± 8,0 <sup>b</sup>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	434, 3 ± 34 <sup>a</sup>	n.d	n.d
<b>K</b>	10,2 ± 1,2 <sup>e</sup>	n.d	6,0 ± 0,72 <sup>k</sup>	335,5 ± 80 <sup>d</sup>	n.d	n.d	648,2 ± 11 <sup>a</sup>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d

---

n.d= não detectado



<b>D6</b>	n.d	n.d	10,2 ± 2,5 <sup>j</sup>	n.d	149,2 ± 7,2 <sup>c</sup>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
									<i>Continuação</i>	
<b>E1</b>	n.d	5,0 ± 1,0 <sup>f</sup>	n.d	3,0 ± 0,7 <sup>g</sup>	79,1 ± 2,3 <sup>i</sup>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>E2</b>	n.d	n.d	8,7 ± 2,2	6,4 ± 1,2 <sup>f</sup>	67,2 ± 9 <sup>1</sup>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>F1</b>	n.d	4,0 ± 0,5 <sup>g</sup>	9,44 ± 1,75 <sup>j</sup>		23,3 ± 8,6 <sup>p</sup>	58,33 ± 19 <sup>f</sup>	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>F2</b>	n.d	6,5 ± 1,5 <sup>e</sup>	n.d	17,7 ± 4,8 <sup>c</sup>	69,4 ± 12 <sup>k</sup>	31,3 ± 2,5 <sup>j</sup>	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>G</b>	n.d	10,9 ± 1,7 <sup>c</sup>	140,1 ± 9,5 <sup>b</sup>	6,3 ± 3,2 <sup>f</sup>	142, 5 ± 16,6 <sup>c</sup>	n.d	n.d	n.d	6,0 ± 2,0 <sup>c</sup>	66.0 ± 10,5 <sup>a</sup>
<b>H</b>	n.d	10,7 ± 0,4 <sup>c</sup>	13,5 ± 3,3 <sup>b</sup>	7,20 ± 3,3 <sup>c</sup>	1910,0 ± 33 <sup>a</sup>	n.d	n.d	n.d	18,0 ± 3,3 <sup>a</sup>	n.d
<b>I</b>	n.d	n.d	n.d	n.d	12,0 ± 1,6 <sup>f</sup>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>J</b>	20,9 ± 2,6 <sup>a</sup>	n.d	14,6 ± 1,6 <sup>g</sup>	n.d	107,5 ± 22,3 <sup>f</sup>	40,6 ± 9,0 <sup>h</sup>	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>K</b>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	39,9 ± 3,5 <sup>i</sup>	n.d	n.d	n.d	n.d

---

n.d= não detectado

Tabela 4.4- Quantificação de compostos fenólicos (outros grupos  $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ) em méis produzidos por abelhas sem ferrão (*Meliponinae*).

Amostra	Vanilina	Umbeliferona	Siringaldeído	Escopoleína	Carnosol	Sinapaldeído
A1	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
A2	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
A3	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
A4	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
A5	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
B1	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
B2	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
C1	n.d	3,0 $\pm$ 0,23 <sup>b</sup>	n.d	n.d	9,0 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>	n.d
C2	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
C3	n.d	n.d	229,1 $\pm$ 30 <sup>e</sup>	n.d	n.d	n.d
C4	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
C5	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
C6	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
C7	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
C8	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
C9	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
C10	n.d	n.d	n.d	7,5 $\pm$ 2,6 <sup>a</sup>	n.d	n.d
C11	n.d	4,85 $\pm$ 2,2 <sup>a</sup>	n.d	n.d	22,9 $\pm$ 9,0 <sup>a</sup>	n.d
C12	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
D1	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
D2	287,1 $\pm$ 60 <sup>a</sup>	n.d	245,6 $\pm$ 11 <sup>f</sup>	n.d	n.d	72,0 $\pm$ 20,0
D3	n.d	n.d	270,5 $\pm$ 50 <sup>e</sup>	n.d	3,6 $\pm$ 1,4 <sup>c</sup>	n.d
D4	n.d	n.d	4284,0 $\pm$ 95 <sup>a</sup>	n.d	n.d	n.d
D5	n.d	n.d	526 $\pm$ 99 <sup>c</sup>	4,0 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup>	n.d	n.d
D6	115,0 $\pm$ 9,0 <sup>b</sup>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
E1	n.d	n.d	498,3 $\pm$ 9,0 <sup>d</sup>	n.d	n.d	n.d

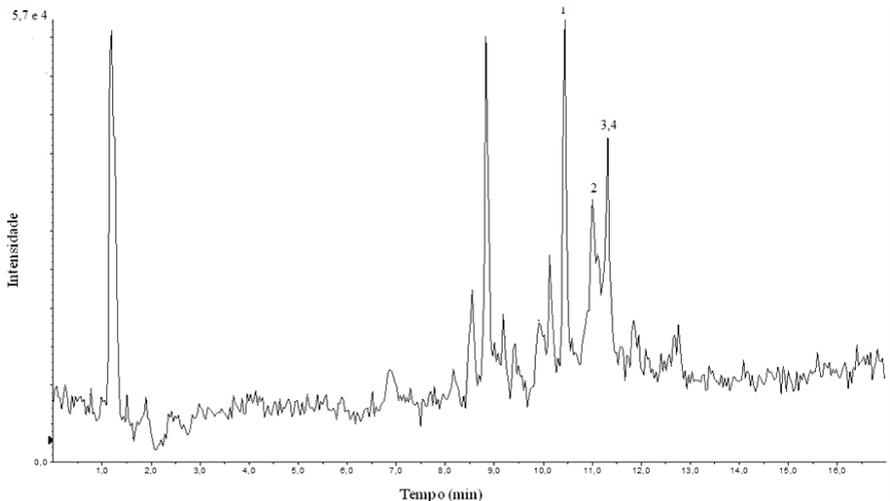
<b>E2</b>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>F1</b>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	<i>Continuação</i>
<b>F2</b>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>G</b>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>H</b>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>I</b>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>J</b>	n.d	n.d	648,2 ± 99 <sup>b</sup>	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>K</b>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d

---

n.d= não detectado

Considerando as informações obtidas a partir dos espectros de massa, dos tempos de retenção e dos limites de detecção e quantificação (ANEXO C), foi possível quantificar 28 compostos fenólicos: 12 ácidos fenólicos, 10 flavonóides, 3 aldeídos fenólicos, 2 cumarinas e 1 diterpeno. Os compostos que estavam presentes na maioria das amostras estudadas foram ácido salicílico, ácido *p*-cumárico, aromadendrina e taxifolina (cromatograma representativo Figura 4.1). Em contraste, os compostos ácido 4-aminobenzóico, ácido sinápico, hispidulina e sinapaldeído foram encontrados em apenas uma amostra (amostra diferente para cada composto).

Figura 4.1 – Cromatograma representativo da identificação de compostos fenólicos por LC-ESI-MS/MS a partir de uma amostra de mel de abelha sem ferrão (amostra A1).



Amostras A1: 1- *p*-cumárico, 2- ácido salicílico, 3- taxifolina e 4- aromadendrina.

Entre os compostos fenólicos investigados, ácido mandélico ( $2459,7 \mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ) ácido vanílico ( $1220,0 \mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ), taxifolina ( $1910,0 \mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ) e siringaldeído ( $4284,0 \mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ) foram os compostos com concentrações mais elevadas, enquanto que a apigenina ( $3,0 \mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ), umbeliferona ( $3,0 \mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ) e naringenina ( $4,00 \mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ) apresentaram as concentrações mais baixas na maioria das amostras.

Estudos reportando compostos fenólicos em méis de abelhas sem ferrão também foram descritos por Guerrini et al. (2009)

(escopoletina, bergamotina, luteolina, quercitrina, naringenina e isorhamnetina), Silva et al. (2013) (3,4-dihidroxibenzil, gálico, vanílico, cinâmico e cis e trans -abscísico), Da Silva et al. (2013) (ácido 4-hidroxibenzóico, ácido salicílico, ácido siríngico, ácido cumárico, catecol e taxifolina), De Sousa et al. (2016) (2,4-dihidroxibenzoico, ferúlico, elagenico, miricetina, catequina, rutina, kaempferol, hesperetina e crisina) e Ranneh et al. (2018) (ácido gálico, ácido cafeico, ácido siríngico, catequina, apigenina, crisina, ácido cinâmico, 2-hidroxicinâmico, kaempferol, ácido cumárico, quercetina, rutina e ácido 4-hidroxibenzóico).

Em estudo realizado por Biluca et al. (2017) foram relatados pela primeira vez a presença de ácido mandélico, ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido rosmarínico, aromadendrina, isoquercitrina, eriodictilol, vanilina, umbeliferona, siringaldeído, sinapaldeído e carnosol em méis de abelhas sem ferrão.

Com os resultados do presente estudo juntamente, com os dados disponíveis na literatura, é possível observar que a investigação da composição fenólica em méis de abelhas sem ferrão ainda é recente e vem aumentando nos últimos anos, apontando para uma grande variação na composição, fato que pode ser facilmente explicado, considerando a imensa gama de plantas dos distintos biomas brasileiros que são polinizadas por abelhas e que fornecem compostos transferidos aos méis através do néctar. Uma vez que estes compostos atuam na planta como protetores do estresse ambiental, na mudança de temperatura, luz, teor de água, exposição à UV e deficiência de nutrientes minerais. Esses compostos, portanto, podem variar devido à exposição da planta ao meio ambiente (KAŠKONIENĖ; VENSKUTONIS, 2010; Da SILVA et al., 2016). Dessa forma, a localização dos apiários, origem floral e geográfica onde as abelhas coletam o néctar, pode influenciar na composição dos polifenóis presentes em méis (Da SILVA et al., 2016).

Fatos constatados na presente investigação, onde foi possível observar grande variação na composição fenólica das amostras estudadas. Variabilidade nos compostos foi observada em méis produzidos pela mesma espécie de abelha (amostras C1 a C12), alocadas em regiões geográficas distintas. Estas observações também foram constatadas em méis provenientes de um mesmo apiário e na mesma colheita, mas, produzido por diferentes espécies de abelhas (A1, C1, D1 e F1), fato que provavelmente pode ser justificado considerando a preferência floral de cada espécie de abelha. O comportamento da composição e perfil dos compostos fenólicos não permitiu que o modelo estatístico aplicado apontasse um fator de relevância considerando as

espécies, suas preferências florais ou origem geográfica das plantas, como um fator distinto de influência.

De uma forma geral, os compostos fenólicos encontrados neste estudo já foram relatados em estudos anteriores para outros alimentos como, por exemplo, méis oriundos de abelha *Apis mellifera* (SERAGLIO et al., 2017; HOSSEN et al., 2017), frutas (SCHULZ et al., 2015) legumes (MARTÍN; RAMOS, 2016). Os estudos são comumente associados a atividades benéficas para a saúde humana, como por exemplo, correlação positiva entre a atividade anticancerígena e a quantidade dos flavonóides (crisina, apigenina, quercetina, acacetina e pinocembrina) e ácidos fenólicos (*p*-cumárico, vanílico, protocatequico, cafeico e *p*-hidroxibenzóico) presentes em méis (MIGUEL; ANTUNES; FALEIRO, 2017). No entanto, a evidência direta de que esses compostos ou suas combinações são responsáveis pela atividade anticarcinogênica, ainda necessita de comprovação científica (CORNARA et al., 2017).

Assim, o presente estudo buscou elucidar a presença do perfil majoritário e destacar as concentrações consideráveis de alguns compostos fenólicos em méis de abelhas sem ferrão, na intenção de auxiliar em estudos futuros quanto aos benefícios do consumo de mel associados aos compostos fenólicos presentes nas amostras estudadas.

### **3.2 Glucosinolatos e sulforafano**

Na investigação de glucosinolatos e sulforafano, não foi possível identificar a presença dos mesmos nas cinco amostras de méis de abelhas sem ferrão estudadas (Figura 4.2 e 4.3). Assim, os resultados sugerem a hipótese de que as abelhas não visitaram as plantações de *brassicaceae* para a utilização do seu néctar e subsequente produção de mel.

As colônias de abelhas sem ferrão, onde foram coletados os méis para o presente estudo, são mantidas em locais de matas nativas silvestres, o que supostamente seria evidente a ausência dos compostos investigados, no entanto, os produtores confirmam a existência de plantações de *brassicaceae* nas proximidades dos meliponários, assim como outras flores, laranjeiras, eucalipto, existindo a possibilidade de revoadas até as plantações para a coleta de alimentos.

Figura 4.2- Cromatograma representativo da investigação de glucosinolatos por UHPLC-qTOF-MS obtido a partir de uma amostra de mel de abelha sem ferrão (amostra H).

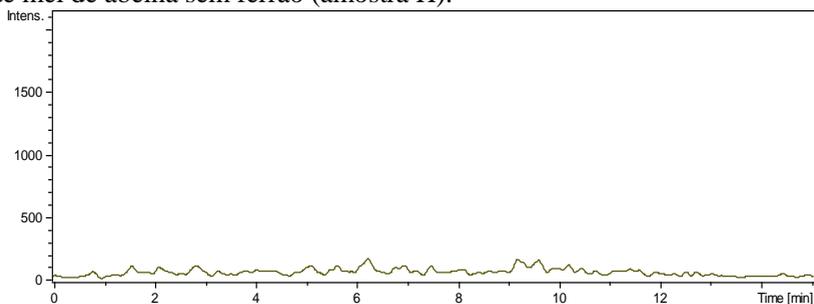
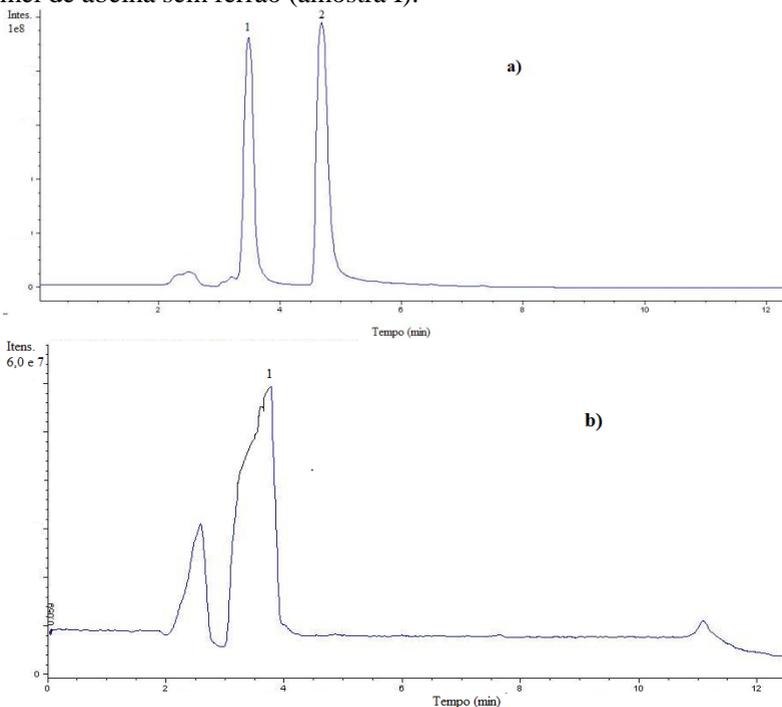


Figura 4.3- Cromatograma representativo da investigação de sulforafano por HPLC-ESI-MS, a) Cromatograma obtido a partir de uma amostra de mel de abelha sem ferrão (amostra I).



a) Cromatograma obtido de um padrão de sulforafano, b) Cromatograma obtido de uma amostra de mel. Número: 1- pico desconhecido, 2- pico de padrão de sulforafano.

## 4 CONCLUSÃO

Com o presente estudo, foi possível identificar e quantificar 28 compostos fenólicos em 34 amostras de méis de abelhas sem ferrão, descrevendo pela primeira vez quantidades relevantes de alguns ácidos fenólicos e flavonóides. Esta pesquisa mostra uma variação nas composições fenólicas, bem como a ausência de compostos glucosinolatos e sulforafano nos méis de abelhas sem ferrão estudados. O estudo não identificou um fator de relevância considerando as espécies, suas preferências florais ou origem geográfica, que pudesse diferenciá-las, ou separá-las em grupos. Assim, estudos adicionais devem ser realizados para investigar e enfatizar as diferenças particulares de cada mel e de cada espécie de abelha.

**REFERÊNCIAS**

- ARES, A. M. et al. Optimized extraction, separation and quantification of twelve intact glucosinolatos in broccoli leaves. **Food Chemistry**, v. 152, p. 66-74, 2014.
- ARES, A. M. et al. Development and validation of a LC–MS/MS method to determine sulforaphane in honey. **Food Chemistry**, v. 181, p. 263-269, 2015a.
- ARES, A. M. et al. Fast determination of intact glucosinolates in broccoli leaf by pressurized liquid extraction and ultra high performance liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Food Research International**, v. 76, p. 498-505, 2015b.
- ARES, A. M. et al. Development and validation of a specific method to quantify intact glucosinolates in honey by LC–MS/MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 46, p. 114-122, 2016.
- BILUCA, F. C. et al. Phenolic compounds, antioxidant capacity and bioaccessibility of minerals of stingless bee honey (Meliponinae). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 63, p. 89-97, 2017.
- CONG-CONG, X. U. et al. Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant materials. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 15, n. 10, p. 721-731, 2017.
- CORNARA, L. et al. Therapeutic properties of bioactive compounds from different honeybee products. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, p. 412, 2017.
- Da COSTA, A. C. V. et al. Sensory and volatile profiles of monofloral honeys produced by native stingless bees of the

brazilian semiarid region. **Food Research International**, v. 105, p. 110-120, 2018.

Da SILVA, I. A. A. et al. Phenolic profile, antioxidant activity and palynological analysis of stingless bee honey from Amazonas, Northern Brazil. **Food Chemistry**, v.141, n. 4, p. 3552–3558, 2013.

Da SILVA, P. M. et al. Honey: chemical composition, stability and authenticity. **Food Chemistry**, v. 196, p. 309–323, 2016.

De SOUSA, J. M. et al. Sugar profile, physicochemical and sensory aspects of monofloral honeys produced by different stingless bee species in Brazilian semi-arid region. **LWT-Food Science and Technology**, v. 65, 645-651, 2016.

GRUZ, J. et al. Phenolic acid content and radical scavenging activity of extracts from medlar (*Mespilus germanica L.*) fruit at different stages of ripening. **Food Chemistry**, v. 124, n. 1, p. 271-277, 2011.

GUERRINI, A. et al. Ecuadorian stingless bee (*Meliponinae*) honey: A chemical and functional profile of an ancient health product. **Food Chemistry**, p.1413-1420, 2009.

HOSSEN, M. S. et al. Beneficial roles of honey polyphenols against some human degenerative diseases: a review. **Pharmacological Reports**, 2017.

JAFFÉ, R. et al. Bees for development: Brazilian survey reveals how to optimize stingless beekeeping. **Plos One**, v.10, p.121-157, 2015.

KAŠKONIENĖ, V., VENSKUTONIS, P. R. (2010). Floral markers in honey of various botanical and geographic origins:

a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 9(6), 620-634.

KOKOTOU, M. G. et al. High Resolution Mass Spectrometry Studies of Sulforaphane and Indole-3-carbinol in Broccoli. **Food Chemistry**, 2017.

MARTÍN, M. Á.; RAMOS, S. Health beneficial effects of cocoa phenolic compounds: a mini-review. **Current Opinion in Food Science**, 2017.

MIGUEL, M. G.; ANTUNES, M. D.; FALEIRO, M. L. Honey as a Complementary Medicine. **Integrative medicine insights**, v. 12, 2017.

OLIVEIRA, P. S. et al. Ácidos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante em méis de *Melipona fasciculata*, *M. flavolineata* (Apidae, Meliponini) E *Apis mellifera* (Apidae, Apini) DA AMAZÔNIA. **Química Nova**, v. 35, n. 9, 1728-1732, 2012.

RANNEH, Y. et al. Malaysian stingless bee and Tualang honeys: A comparative characterization of total antioxidant capacity and phenolic profile using liquid chromatography-mass spectrometry. **LWT-Food Science and Technology**, v. 89, p. 1-9, 2018.

RAO, P. V. et al. Biological and therapeutic effects of honey produced by honey bees and stingless bees: a comparative review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 5, p. 657-664, 2016.

SCHULZ, M. et al. Chemical composition, bioactive compounds and antioxidant capacity of juçara fruit (*Euterpe edulis* Martius) during ripening. **Food Research International**, v. 77, p. 125-131, 2015.

SERAGLIO, S. K. T. et al. Effect of in vitro gastrointestinal digestion on the bioaccessibility of phenolic compounds, minerals, and antioxidant capacity of *Mimosa scabrella* Bentham honeydew honeys. **Food Research International**, 2017.

SILVA, T. M. S. et al. Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaira (*Melipona subnitida*) honey. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 29, p.10-18, 2013.

TRAUTVETTER, S. et al. Confirmation of phenolic acids and flavonoids in honeys by UPLC-MS. **Apidologie**, v. 40, n. 2, p. 140-150, 2009.

VIT, P.; PEDRO, S. R. M.; ROUBIK, D. W. **Pot-honey a legacy of Stingless Bees**. New York: Springer, 2013.



## **CAPÍTULO 5**

### **DETERMINAÇÃO DE AMINOÁCIDOS LIVRES EM MÉIS DE ABELHAS SEM FERRÃO (*Meliponinae*)**

**RESUMO**

Considerando a inexistência de relatos referentes à identificação e quantificação de aminoácidos livres em méis de abelhas sem ferrão, o estudo teve como objetivo investigar tais compostos em dez amostras de mel de abelhas sem ferrão, de nove espécies distintas, provenientes de três municípios do Estado de Santa Catarina: São Miguel do Oeste, Florianópolis e Santa Rosa de Lima. Os aminoácidos: aspártico, glutâmico, asparagina, glutamina, histidina, serina, arginina, glicina, treonina, alanina, prolina, tirosina e valina foram analisados empregando HPLC-FLD e leucina, isoleucina, fenilalanina e triptofano empregando sistema de LC-MS. As concitações encontradas apresentaram ampla faixa de variação, com resultado de 0,421 mg kg<sup>-1</sup> a 762 mg kg<sup>-1</sup>. Os aminoácidos livres com maior concentração foram prolina (12,1 -762 mg kg<sup>-1</sup>), fenilalanina (0,421 - 592 mg kg<sup>-1</sup>) e glutamina (< LOD - 605 mg kg<sup>-1</sup>). O estudo revelou possível distinção entre o perfil de aminoácido livre para as amostras da mesma região, possibilitando uma indicação de discriminação geográfica entre as amostras, contudo, com os resultados obtidos, não foi possível discriminação das amostras considerando as espécies, sendo necessários mais estudos tendo em conta maior amostragem, controle dos meliponários e espécies de abelhas produtoras de mel.

**Palavras-chave:** Abelhas sem ferrão, Mel, Aminoácido livre, Prolina.

## 1 INTRODUÇÃO

Nas regiões tropicais e subtropicais, como América Central e do Sul, África, Austrália e Sudeste Asiático, existem mais de 500 espécies de abelhas sociais nativas que produzem mel (VIT; PEDRO; ROUBIK, 2013). Essas abelhas são conhecidas como abelhas indígenas, nativas, meliponas ou abelhas sem ferrão, por possuírem ferrão atrofiado incapaz de ferocar (ordem Hymenoptera, família Apidae, subfamília *Meliponinae*). Estas abelhas têm menor produtividade de mel quando comparado com as abelhas *Apis melliferas*, porém, produzem méis distintos, apreciado por suas propriedades sensoriais marcantes, com sabor ligeiramente ácido e aromas mais pronunciados (SE et al., 2018a).

Além das propriedades sensoriais distintas e bem aceitas, os méis de abelhas sem ferrão também são popularmente conhecidos por possuírem compostos bioativos benéficos para a saúde humana, com alegação de poder de cura, sendo, utilizados em tratamentos terapêuticos de várias doenças ou complicações, incluindo doenças respiratórias, gastrite, catarata, entre outras (RAO et al., 2016; RANNEH et al., 2018). A valorização dos méis de abelhas sem ferrão tem aumentado ano a ano, de tal modo, que seu valor comercial pode alcançar 200 reais o kg, valor considerado elevado se comparado ao mel de *Apis mellifera* (15- 40 reais o kg).

Por ser um produto ainda recente no mercado e sem regulamentação específica, com variação nas características de identidade, com a cultura de coleta e armazenamento dependentes da região e locais de produção e consumo, cada mel produzido pelas abelhas sem ferrão é um produto único. Fato que têm despertando o interesse de pesquisadores que buscam estudar extensivamente as propriedades e características físicas, químicas, atividade biológica em busca de informações sobre as reais características e benefícios do seu consumo para a saúde humana, bem como outras preocupações inerentes aos alimentos em geral como, autenticação, contaminantes, armazenamento e conservação e identidade e qualidade de forma geral.

Recentes investigações revelam que as características físico-químicas destes méis são distintas, quando comparado ao mel de *Apis mellifera*, com maior conteúdo de umidade, maior acidez e menores teores de açúcares (RAMÓN-SIERRA et al., 2015; CHUTTONG, 2016; De SOUSA et al., 2016; SE et al., 2018b). Revelam também um potencial antioxidante e consideráveis concentrações de compostos fenólicos e minerais (SILVA et al., 2013; SOUSA et a., 2016; BILUCA et al., 2017; RANNEH et al., 2018; De OLIVEIRA et al., 2017). Da

Silva et al. (2017) relataram pela primeira vez os compostos voláteis presentes nos méis de abelhas sem ferrão e concluíram que estes podem ser usados para atestar a autenticidade relacionada à origem. Da Costa et al. (2018) também investigaram os compostos voláteis, mas levaram em conta o perfil sensorial dos méis. Chuttong et al. (2016), Jimenez et al. (2016) e Ribeiro et al. (2017) são os primeiros a publicar sobre a manutenção da qualidade do mel, quanto ao armazenamento, conservação e os processos de pasteurização e refrigeração.

Embora estudos sobre o tema mel de abelhas sem ferrão estejam constantemente sendo publicados, ainda existem muitos aspectos a serem explorados, principalmente relacionados a composição ou até mesmo a inexistência de relatos acerca da presença e do conteúdo de compostos como vitaminas, ácidos orgânicos, lipídeos e aminoácidos.

Dentre este grupo de compostos minoritários presente nos méis, os aminoácidos, são importantes nutricionalmente, mas também, podem fornecer informações relevantes, como origem geográfica, botânica e adulterações. Com base no exposto, realizou-se um estudo inédito a fim de identificar e quantificar aminoácidos livres em méis de diferentes espécies abelhas sem ferrão (*Meliponinae*), produzidos em locais distintos, visando aprimorar as pesquisas existentes sobre a composição química e considerando a sugestão de uma possível discriminação geográfica entre os méis estudados.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Reagentes e soluções

Os ácidos acético e clorídrico, acetato de sódio, acetato de amônio e borato de sódio foram fornecidos pela Merck (Darmstadt, Alemanha). Hidróxido de sódio obtido de Panreac (Barcelona, Espanha). O metanol e acetoneitrila adquiridos de VWR chemicals (Fontenay-sous-Bois, França).

Os padrões de aminoácidos, cloroformiato de 9-fluorenilmetila (FMOC-Cl) e hidroxilamina foram obtidos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

As soluções de padrões de aminoácidos foram preparadas em HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> a um nível de concentração de 100 mg L<sup>-1</sup>. As soluções de trabalho foram obtidas por diluição com água deionizada. Todas as soluções foram armazenadas ao abrigo da luz a 4 °C. A solução de FMOC-Cl foi preparada em acetoneitrila a uma concentração de 0,16 mmol L<sup>-1</sup>.

## 2.2 Amostras

No presente estudo foram analisadas 10 amostras de mel de abelhas sem ferrão (*Meliponinae*), obtidas através de parcerias com meliponicultores do estado de Santa Catarina, contemplando amostras provenientes dos municípios de São Miguel do Oeste, Florianópolis e Santa Rosa de Lima, coletadas nas safras de 2013/2014 e 2016/2017. A descrição das espécies, origem botânica predominante e os municípios referentes às amostras estão descritas na Tabela 5.1. As informações referentes às amostras foram descritas pelos meliponicultores Cleumar Liebert, e o Engenheiro Agrônomo Pedro Faria Gonçalves, pelo Médico veterinário Luiz Miguel Rech dos Santos e o extensionista da EPAGRI-SC, Carlos A. Paganini. Todas as amostras foram coletadas e armazenadas em frascos de polipropileno (tipo Falcon de 50 mL) e transportadas em caixas isotérmicas ao Laboratório de Química de Alimentos do CCA – UFSC, onde foram mantidas a  $-18 \pm 2$  °C até o momento do transporte para o Laboratório de Técnicas de Separación y Análisis Aplicado (TESEA), junto ao grupo de Química Analítica Aplicada da Universidade de Valladolid, Valladolid, Espanha, onde foram executadas as análises. As amostras foram transportadas em temperatura ambiente e após transporte mantidas a  $\pm 4$  °C até execução das análises.

Tabela 5.1- Identificação das espécies de abelhas sem ferrão (*Meliponinae*), municípios de origem, ano de coleta e origem botânica dos méis estudados.

Amostras	Nome popular/científico	Local	Ano	Florada
A	Borá/ <i>Tetragona clavipes</i>	SMO	2013/2014	Silvestre
B	Irai/ <i>Nanotrigona testaceicornis</i>	SMO	2013/2014	Silvestre
C	Uruçu/ <i>Melipona scutellaris</i>	SMO	2013/2014	Silvestre
D	Tujuba/ <i>Melipona mondori</i>	SMO	2013/2014	Silvestre
E	Tubuna/ <i>Scaptotrigona bicunctata</i>	SMO	2013/2014	Silvestre
F	Guaraípo/ <i>Melipona bicolor</i>	SRL	2016/2017	Silvestre
G	Mandaçaia/ <i>Melipona quadriasciata</i>	SRL	2013/2014	Silvestre
H	Mandaçaia/ <i>Melipona quadriasciata</i>	SRL	2013/2014	Silvestre
I	Jataí/ <i>Tetragonisca angustula</i>	FLN	2016/2017	Silvestre
J	Comerciais Tujuba/ <i>Melipona Mondori</i>	FLN	2016/2017	Silvestre

\*Município: SMO = São Miguel do Oeste, NF = Nova Fátima, SRL Santa Rosa de Lima. Fonte: próprio autor

### 2.3 Preparo de amostra

O preparo das amostras foi realizado segundo Bernal et al., (2005), com modificações, considerando diluição em água, derivatização e injeção conforme segue: massas de 0,1 g de mel foram diluídas em 20 mL de solução de borato de sódio ( $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  a pH 8,5), acondicionados em frascos de 2 mL e dispostos no equipamento, seguidos de amostragem automática onde o procedimento de derivatização foi realizado diretamente em sistema de auto-amostrador acoplado a HPLC-FLD. Foram coletados 3  $\mu\text{L}$  de amostra e 5  $\mu\text{L}$  de

reagente de derivação (FMOC-Cl) seguido de agitação em 10 ciclos, com intervalos de 1,5 minutos de repouso. Ao sistema foram adicionados 3  $\mu\text{L}$  de solução de hidroxilamina + NaOH 0,85 mol  $\text{L}^{-1}$  (3:7 v/v) e novamente aplicados 10 ciclos de agitação e repouso de 3,5 minutos. Ao final 5  $\mu\text{L}$  de solução de ACN-H<sub>2</sub>O-HAcO (20:3:2 v/v) foram adicionados o sistema, submetido à agitação e 16  $\mu\text{L}$  das amostras derivatizada foi injetada para identificação e quantificação.

Em um segundo sistema de preparo, objetivando avaliar os aminoácidos leucina, isoleucina, fenilalanina e triptofano, massas de 0,1 g de mel foram diluídas com 20 mL de água desionizada e injetadas diretamente no LC-MS.

## 2.4 Instrumentação

Os experimentos foram realizados usando um sistema de HPLC 1200, equipado um detector de fluorescência (G1321) (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Para a separação foi utilizada coluna analítica Gemini C<sub>18</sub> (5  $\mu\text{m}$  de tamanho de partícula, 150  $\times$  4,6 mm i.d) (Milford, EUA) e coluna de guarda de 5  $\mu\text{m}$ .

Os aminoácidos livres foram quantificados utilizando eluição com gradiente de acetonitrila (eluente A), água (eluente B) e acetato de amônio (eluente C), com fluxo de 1 mL  $\text{min}^{-1}$ . O gradiente detalhado pode ser observado na Tabela 5.2. O forno de coluna foi ajustado para 43°C. A detecção foi realizada com excitação de 263 nm e emissão de 313 nm.

Tabela 5.2 Condições de gradiente cromatográfico.

Tempo (min.)	% A	% B	% C
0	15	1	84
10	18	2	80
20	18	2	80
27	22,5	2,5	75
36	31,5	3,5	65
40	66,2	3,8	30
45	100	0	0
53	65	5	30
54	77,5	2,5	75
55	15	1	84

Legenda - Acetonitrila: eluente A, água: eluente B e acetato de amônio: eluente C.

Os aminoácidos leucina, isoleucina, triptofano e fenilalanina foram identificados e quantificados em sistema de LC-MS, consistindo em instrumento Trap XCT LC-MS, composto por LC série 1100 da Agilent Technologies (Palo Alto, CA, EUA), que foi utilizado em conjunto com uma fonte de ionização por eletrospray (ESI), no modo positivo. As condições cromatográficas utilizadas foram: voltagem do fragmento: 50v; Gás de secagem (N<sub>2</sub>): 350 °C, fluxo: 8 L/min; pressão do gás nebulizador (N<sub>2</sub>) 50 psi; voltagem do capilar 3000 V; e as massas monitoradas foram m/z: 166 (fenilalanina), m/z: 132 (Leucina), m/z: 132 (isoleucina), m/z: 205 (triptofano).

As separações cromatográficas foram realizadas em uma coluna analítica Ultisil XB- C<sub>18</sub> 5 µm (4.6 x 150 mm) (Pudong Shanghai, China), com temperatura de 25 °C e volume de injeção de 1 µl. Aplicando na separação gradiente de metanol (eluente A) e água (eluente B) como se segue: 6% A em 0 -10 min; 20% A em 10-16 min; 50% A em 16-19 min; 20% em 19- 20min. Posteriormente, restaurando para o inicial (6% A) mantendo constante durante 5 min.

Os dados foram analisados pela Quant Analysis para LC/MSD Trap 1.6 e Data Analysis para LC/MSD Trap 2.2, ambos da Agilent Technologies.

## 2.5 Limites de detecção, quantificação e exatidão

O limite de quantificação (LOQ) foi definido como a concentração mais baixa o qual o método pode operar com precisão aceitável (sinal/ruído  $\geq 10$ ). O limite de detecção (LOD) foi considerado como a concentração mais baixa o qual o método pode detectar em todas as réplicas (sinal/ruído  $\geq 3$ ). Estes limites foram estabelecidos baseados nos resultados de média e desvio padrão obtidos de triplicatas independentes destas concentrações (EURACHEM, 2014).

A exatidão foi determinada por meio da recuperação aparente de amostras fortificadas, em triplicatas independentes, nos dois níveis de concentração citados anteriormente. Os resultados foram expressos como desvio padrão relativo (DPR, %) (EURACHEM, 2014).

## 2.6 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com o software Statistica 13.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK). Os resultados experimentais foram obtidos como média  $\pm$  desvio padrão (SD) de três medidas paralelas. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA)

seguida pelo teste de Tukey, que foi utilizado para comparar os dados obtidos para as diferentes amostras. Os valores médios com  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Utilizando o HPLC-FLD foi possível identificar e quantificar 13 aminoácidos livres nas 10 diferentes amostras de mel de abelhas sem ferrão estudadas (Apêndice B.). No LC-MS foi possível quantificar quatro aminoácidos (Apêndice C) totalizando 17 aminoácidos identificados e quantificados. Para a realização do estudo, foram determinados os LOQ e o LOD (Apêndice D) e a exatidão do método, que apresentou valores de 89 a 108%, considerados satisfatórios de acordo com o critério de aceitabilidade de 80 a 110% (EUROPEAN COMMISSION, 2002).

Os conteúdos de aminoácidos livres detectados nas amostras analisadas estão ilustrados na Tabela 5.3.

Tabela 5.3. Concentração média (mg kg<sup>-1</sup>) de aminoácidos livres encontrados em amostras de méis de abelhas sem ferrão (*Meliponinae*).

AA	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
<b>Aspártico</b>	98,3 ± 0,48 <sup>a</sup>	99,8 ± 1,6 <sup>a</sup>	0,500 ± 0,01 <sup>e</sup>	59,5 ± 0,89 <sup>b</sup>	17,8 ± 1,8 <sup>c</sup>	1,13 ± 0,56 <sup>d</sup>	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
<b>Glutâmico</b>	129 ± 1,0 <sup>a</sup>	125 ± 0,49 <sup>b</sup>	<LOQ	82,1 ± 1,0 <sup>c</sup>	28,2 ± 1,6 <sup>d</sup>	1,06 ± 0,38 <sup>c</sup>	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
<b>Asparagina</b>	76,6 ± 0,82 <sup>a</sup>	22,40 ± 0,48 <sup>d</sup>	<LOQ	58,2 ± 0,64 <sup>b</sup>	34,7 ± 0,25 <sup>c</sup>	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOD	<LOD
<b>Glutamina</b>	605 ± 4,81 <sup>a</sup>	144 ± 0,14 <sup>c</sup>	<LOQ	533 ± 4,8 <sup>b</sup>	73,8 ± 0,97 <sup>d</sup>	1,00 ± 1,20 <sup>f</sup>	1,42 ± 0,92 <sup>e</sup>	<LOD	<LOQ	<LOQ
<b>Histidina</b>	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
<b>Serina</b>	233 ± 0,46 <sup>a</sup>	85,5 ± 0,86 <sup>c</sup>	10,0 ± 0,40 <sup>e</sup>	170 ± 0,86 <sup>b</sup>	39,3 ± 0,43 <sup>d</sup>	9,15 ± 0,26 <sup>f</sup>	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
<b>Arginina</b>	94,1 ± 0,45 <sup>a</sup>	28,2 ± 0,42 <sup>c</sup>	18,4 ± 0,58 <sup>d</sup>	66,6 ± 0,18 <sup>b</sup>	15,2 ± 0,40 <sup>c</sup>	7,93 ± 0,16 <sup>f</sup>	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
<b>Glicina</b>	37,0 ± 0,12 <sup>a</sup>	15,4 ± 0,60 <sup>c</sup>	9,17 ± 0,50 <sup>d</sup>	23,8 ± 0,11 <sup>b</sup>	14,6 ± 0,60 <sup>c</sup>	1,91 ± 0,80 <sup>e</sup>	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
<b>Treonina</b>	27,0 ± 0,21 <sup>a</sup>	4,47 ± 0,11 <sup>g</sup>	<LOD	20,1 ± 0,32 <sup>b</sup>	18,5 ± 0,21 <sup>c</sup>	16,7 ± 0,14 <sup>e</sup>	17,1 ± 0,80 <sup>d</sup>	11,1 ± 0,18 <sup>f</sup>	<LOD	18,0 ± 0,24 <sup>c</sup>
<b>Alanina</b>	80,3 ± 0,16 <sup>b</sup>	56,2 ± 0,49 <sup>c</sup>	<LOD	83,0 ± 0,50 <sup>a</sup>	9,38 ± 0,33 <sup>d</sup>	5,91 ± 0,33 <sup>e</sup>	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
<b>Prolina</b>	762 ± 3,5 <sup>a</sup>	276 ± 0,7 <sup>c</sup>	48,5 ± 0,13 <sup>g</sup>	578 ± 4,24 <sup>b</sup>	594 ± 3,5 <sup>b</sup>	75,1 ± 0,10 <sup>d</sup>	12,1 ± 0,20 <sup>i</sup>	15,8 ± 0,40 <sup>h</sup>	62,2 ± 0,26 <sup>f</sup>	66,2 ± 0,22 <sup>e</sup>
<b>Tirosina</b>	156,2 ± 0,26 <sup>b</sup>	71,2 ± 0,79	<LOD	167,4 ± 1,59 <sup>a</sup>	24,7 ± 0,79 <sup>e</sup>	<LOD	9,72 ± 0,25 <sup>g</sup>	8,48 ± 0,25 <sup>h</sup>	12,6 ± 0,25 <sup>f</sup>	31,6 ± 1,0 <sup>d</sup>
<b>Valina</b>	38,2 ± 0,12 <sup>f</sup>	85,9 ± 0,23 <sup>a</sup>	46,5 ± 0,14 <sup>e</sup>	65,0 ± 0,35 <sup>b</sup>	46,7 ± 0,23 <sup>c</sup>	<LOD	48,1 ± 0,67 <sup>d</sup>	16,1 ± 0,55 <sup>g</sup>	53,5 ± 0,85 <sup>c</sup>	48,9 ± 0,22 <sup>d</sup>
<b>Leucina</b>	32,5 ± 0,41 <sup>a</sup>	7,77 ± 0,21 <sup>c</sup>	<LOQ	18,1 ± 0,47 <sup>b</sup>	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
<b>Isoleucina</b>	32,6 ± 0,70 <sup>a</sup>	10,7 ± 0,20 <sup>c</sup>	<LOQ	19,5 ± 0,46 <sup>b</sup>	1,16 ± 0,14 <sup>f</sup>	<LOQ	<LOQ	<LOQ	1,21 ± 0,1 <sup>e</sup>	2,07 ± 0,2 <sup>d</sup>
<b>Fenilalanina</b>	168 ± 3,7 <sup>c</sup>	6,88 ± 2,1 <sup>h</sup>	5,20 ± 0,88 <sup>i</sup>	122 ± 3,28 <sup>d</sup>	88,6 ± 4,2 <sup>f</sup>	592 ± 4,7 <sup>a</sup>	100 ± 2,77 <sup>e</sup>	0,421 ± 0,90 <sup>j</sup>	27,9 ± 0,90 <sup>g</sup>	517 ± 4,3 <sup>a</sup>
<b>Triptofano</b>	8,24 ± 1,6 <sup>b</sup>	<LOQ	<LOD	9,77 ± 0,21 <sup>a</sup>	<LOQ	<LOD	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ

Valores expressos como média ± desvio padrão. <sup>a-j</sup> Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as médias de acordo com teste de Tukey (p < 0,05). Letras de A-J: amostras de mel de abelhas sem ferrão descritas na Tabela 5.1.

Avaliando os dados da Tabela 5.2, é possível observar uma grande variação entre os resultados obtidos para os aminoácidos livres das amostras de méis de abelhas sem ferrão analisadas, com diferenças significativas entre as mesmas. A prolina e a fenilalanina foram encontradas em todas as amostras analisadas, seguidas pela valina, tirosina e treonina. As concentrações mais elevadas, foram de prolina (12,1 - 762 mg kg<sup>-1</sup>), glutamina (1,00 - 605 mg kg<sup>-1</sup>) e fenilalanina (0,421 - 592 mg kg<sup>-1</sup>) respectivamente. A menor concentração obtida foi para o triptofano (<LOQ -9,77 mg kg<sup>-1</sup>). Histidina não foi detectada em 100% as amostras analisadas.

Considerando a inexistência na literatura científica de relatos relacionados à composição de aminoácidos livres em méis de abelhas sem ferrão, buscamos descrições já existentes sobre méis de abelha *Apis mellifera* para uma possibilidade de comparação. Os aminoácidos livres encontrados nos méis de abelhas sem ferrão analisados estão em concordância com aqueles comumente já relatados para méis de abelhas *Apis mellifera*, tendo prolina e fenilalanina como os principais aminoácidos livres presentes nos méis já estudados. Alguns autores têm relatado que variações nas concentrações, assim como, a presença dos aminoácidos nas amostras de méis, podem ser atribuídas às diferentes origens, botânicas (HERMOSÍN; CHICÓN; CABEZUDO, 2003; BOONCHIANGMA et al., 2015).

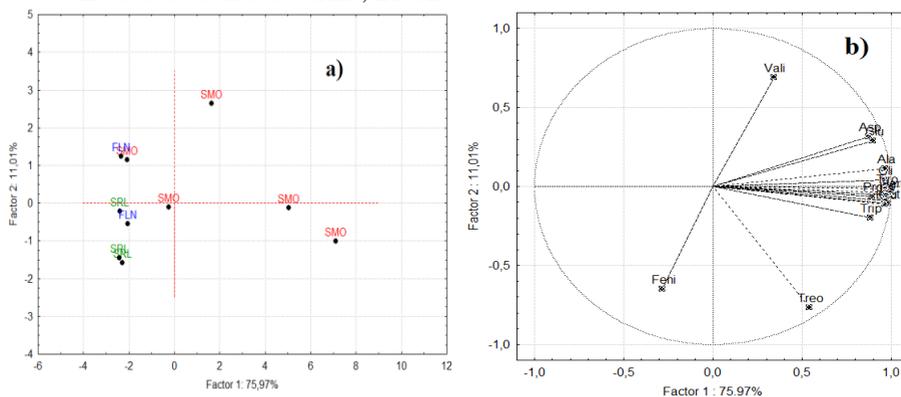
Apesar da não obrigatoriedade da avaliação de proteínas e aminoácidos como parâmetro de identidade e qualidade nos méis, estudos sugerem a especificação de aminoácidos presentes, especialmente prolina, como sendo útil na identificação de adulterações com açúcares (HERMOSÍN; CHICÓN; CABEZUDO, 2003). Assim, para méis de *Apis mellifera* recomenda-se um valor mínimo de 180 mg kg<sup>-1</sup> de prolina ao considerar méis puros, uma vez que a prolina procede principalmente das secreções salivares de abelhas (DA SILVA et al., 2016).

Em méis de abelhas sem ferrão, poucos são os estudos que avaliaram, até o momento, o conteúdo de prolina. Sousa et al. (2016) avaliando méis brasileiros de abelhas sem ferrão obtiveram valores relativamente baixos, que variaram entre 46,0 a 205,0 mg kg<sup>-1</sup>, já Duarte et al. (2012) relatam valores entre 201,6 e 924,6 mg kg<sup>-1</sup>, também para méis de abelhas sem ferrão do Brasil. As oscilações nos valores podem ser explicadas levando em conta as diferentes espécies de abelhas as quais podem produzir méis distintos, além da influência de origens geográficas e floradas distintas. Sendo possível considerar ainda a

microbiota naturalmente presente em algumas colmeias e as condições de manejo e estocagem dos méis (PALUDO et al., 2018).

Na Tabela 5.2, também é possível observar que, nas amostras codificadas como A e D, foram identificados e quantificados todos os aminoácidos estudados (exceto a histidina), revelando perfil semelhante entre si e aos dados das amostras B e E (mesma região de coleta), São Miguel do Oeste. De uma forma geral a amostra G e H também apresentam semelhanças entre si, diferenciando-se da amostra F, que pertence ao mesmo local de coleta (G, H e F), no entanto, coleta realizada em safra distinta (2016/2017). A mesma semelhança entre amostras ocorre para os méis I e J quando comparadas as outras amostras. A análise estatística aplicada aos dados pode ser observada na Figura 5.1.

Figura 5.1. Análise de componentes principais para aminoácidos livres em méis de abelhas sem ferrão (*Meliponinae*) de diferentes cidades do Estado de Santa Catarina, Brasil.



Fonte: próprio autor

A Análise de Componentes Principais (ACP) foi realizada com os dados de aminoácidos livres das diferentes amostras estudadas a fim de obter mais informações sobre as variáveis que influenciaram na similaridade ou diferença entre os méis estudados.

A Figura 5.1 (a) representa o gráfico de distribuição das amostras de méis de abelhas sem ferrão e aponta a formação de agrupamentos de acordo com a origem geográfica, com a maioria das amostras provenientes de São Miguel do Oeste distribuídas na parte positiva da PC1 e as amostras de Santa Rosa de Lima distribuídas na parte negativa da PC2.

A Figura 5.1(b) ilustra o gráfico de pesos das principais PCs para as variáveis dos aminoácidos dos méis de abelhas sem ferrão analisados e pode ser observado que PC1 explica a maior parte da variabilidade dos dados com 75,9%. As variáveis significantes foram os aminoácidos aspártico, glutâmico (0,87), asparagina (0,97), serina (0,98), arginina (0,98), glicina (0,96), treonina (0,55), alanina (0,96), valina (0,32), leucina (0,96), isoleucina (0,97), fenilalanina (-0,27) e triptofano (0,89), os quais foram responsáveis pelo agrupamento das amostras da cidade de São Miguel do Oeste. A PC2 explica 11,0% da variância total, e são explicadas pelas variáveis, valina (0,67), fenilalanina (-0,69) e treonina (-0,76), sendo as duas últimas responsáveis pelo agrupamento das amostras da cidade de Santa Rosa de Lima. Os dados obtidos nesta APC são considerados adequados, uma vez que se obteve uma variância total explicada  $\geq 70\%$  (CHUDZINSKA; BARALKIEWICZ, 2010; KAISER et al., 1960; RIZELIO et al., 2012).

A confiabilidade esta justificada pela soma das duas primeiras PCs explicarem 86,9% da variância total dos dados obtidos, bem como a garantia de origem geográfica das amostras analisadas que, segundo Fechner et al. (2016), pode validar o modelo de classificação quimiométrico proposto.

#### 4 CONCLUSÃO

Pela primeira vez, 17 aminoácidos foram quantificados em méis de abelhas sem ferrão. Destaque é dado a prolina, fenilalanina, tirosina, alanina e treonina como os aminoácidos encontrados na maioria das amostras, as maiores concentrações encontradas foram de prolina, fenilalanina e glutamina. Somadas a estas informações, a análise quimiométrica dos dados indica uma discriminação geográfica entre os méis. No entanto, estudos considerando maior abrangência amostral, espécies de abelhas e amplitude entre as safras, as quais carecem de monitoramento por maior período, serão necessários para uma conclusão a respeito da influência de espécie, florada e região dos meliponários para a identidade dos méis de abelhas sem ferrão. Estudos como este contribuem nas descobertas sobre a composição química dos méis de abelhas sem ferrão e podem orientar novas pesquisas.

**REFERÊNCIAS**

BERNAL, J. L. et al. A comparative study of several HPLC methods for determining free amino acid profiles in honey. **Journal of Separation Science**, v. 28, n. 9-10, p. 1039-1047, 2005.

BILUCA, F. C. et al. Phenolic compounds, antioxidant capacity and bioaccessibility of minerals of stingless bee honey (Meliponinae). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 63, p. 89-97, 2017.

BOONCHIANGMA, S. et al. Reversed phase chromatographic analysis of 13 amino acids in honey samples. **Chromatographia**, v. 78, n. 13-14, p. 923-927, 2015.

CHUTTONG, B.; CHANBANGA, Y.; SRINGARM, K.; BURGETTE M. Physicochemical Profiles of Stingless Bee (Apidae: Meliponini) Honey from South East Asia (Thailand), **Food Chemistry**, v. 192, p. 149-155, 2016a.

CHUTTONG, B. et al. Effects of long term storage on stingless bee (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) honey. **Journal of Apicultural Research**, v. 54, n. 5, p. 441-451, 2016b.

JIMENEZ, M. et al. Physicochemical and antioxidant properties of honey from *Scaptotrigona mexicana* bee. **Journal of Apicultural Research**, v. 55, n. 2, p. 151-160, 2016.

SOUSA, J. M. et al. Polyphenolic profile and antioxidant and antibacterial activities of monofloral honeys produced by Meliponini in the Brazilian semiarid region. **Food Research International**, v. 84, p. 61-68, 2016.

De OLIVEIRA, F. A. et al. Evaluation of matrix effect on the determination of rare earth elements and As, Bi, Cd, Pb, Se and In in honey and pollen of native Brazilian bees (*Tetragonisca angustula*-Jataí) by Q-ICP-MS. **Talanta**, v. 162, p. 488-494, 2017.

De SOUSA, J. M. et al. Sugar profile, physicochemical and sensory aspects of monofloral honeys produced by different stingless bee species

in Brazilian semi-arid region. **LWT-Food Science and Technology**, 65, 645-651, 2016.

DA COSTA, A. C. V et al. Sensory and volatile profiles of monofloral honeys produced by native stingless bees of the Brazilian semiarid region. **Food Research International**, v. 105, p. 110-120, 2018.

DA SILVA, P. de L. M. et al. Comparative analysis of the volatile composition of honeys from Brazilian stingless bees by static headspace GC-MS. **Food Research International**, v. 102, p. 536-543, 2017.

EURACHEM. The fitness for purpose of analytical methods, a laboratory guide to method validation and related topics. 2<sup>a</sup> ed., 2014. Disponível em: < <https://www.eurachem.org/>> Acesso em: 15 dez. 2017.

EREJUWA, O. O.; SULAIMAN, S. A.; WAHAB, M. S. A. Honey: A novel antioxidant. **Molecules**, v. 17, p. 4400-4423, 2012.

SILVA, T. M. S. et al. Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaira (*Melipona subnitida*) honey. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 29, p.10-18, 2013.

HERMOSÍN, I.; CHICÓN, R. M.; CABEZUDO, M. D. Free amino acid composition and botanical origin of honey. **Food Chemistry**, v. 83, n. 2, p. 263-268, 2003.

PALUDO, C. R. et al. Stingless bee larvae require fungal steroid to pupate. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1122, 2018.

SE, K. W. et al. A simple approach for rapid detection and quantification of adulterants in stingless bees (*Heterotrigona itama*) honey. **Food Research International**, v. 105, p. 453-460, 2018a.

SE, K. W et al. Accurate evaluation of sugar contents in stingless bee (*Heterotrigona itama*) honey using a swift scheme. **Journal of Food Composition and Analysis**, 2018b.

VIT, P.; PEDRO, S. R. M.; ROUBIK, D. W. **Pot-honey a legacy of stingless bees**. New York: Springer, 2013.

RAMÓN-SIERRA, J. M et al. Electrophoresis characterisation of protein as a method to establish the entomological origin of stingless bee honeys. **Food Chemistry**, v. 183, p. 43 - 48, 2015.

RANNEH, Y et al. Malaysian stingless bee and Tualang honeys: A comparative characterization of total antioxidant capacity and phenolic profile using liquid chromatography-mass spectrometry. **LWT-Food Science and Technology**, v. 89, p. 1-9, 2018.

RAO, P. V et al. Biological and therapeutic effects of honey produced by honey bees and stingless bees: a comparative review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 5, p. 657-664, 2016.

RIBEIRO, G. P et al. Influence of freezing, pasteurization and maturation on Tiúba honey quality. **In press. LWT**, 2017.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os méis de abelhas sem ferrão são distintos dos méis produzidos por abelhas *Apis mellifera*, e a legislação vigente não abrange as características encontradas nesses méis, o que demanda uma legislação específica com parâmetros de identidade e qualidade para que, futuramente, possam ser comercializados nacionalmente e internacionalmente de forma legal, considerando as características individuais e regionais de produção e extração destes méis especiais. No entanto, em razão da grande quantidade de espécies de abelhas sem ferrão encontradas no país e das decorrentes variações nos valores dos parâmetros exigidos, mais estudos devem ser realizados para uma legislação adequada.

O presente estudo apresentou uma avaliação inédita sobre méis de abelhas sem ferrão com relação à composição de compostos fenólicos, glucosinolatos, sulforafano, minerais totais e sua bioacessibilidade e aminoácidos livres.

A investigação referente aos compostos fenólicos permitiu a identificação e quantificação de 28 compostos (12 ácidos fenólicos, 10 flavonóides, 3 aldeídos, 2 cumarinas e 1 diterpeno), descrevendo pela primeira vez quantidades relevantes de ácido mandélico, ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido rosmarínico, aromadendrina, isoquercitrina, eriodictilol, vanilina, umbeliferona, siringaldeído, sinapaldeído, carnosol. O estudo apontou também uma grande variação nas composições fenólicas, dificultando a identificação de um fator de relevância para diferenciar cada amostra, ou separá-las em grupos.

Os glucosinolatos e o sulforafano investigados não foram identificados nas amostras de méis estudadas. A ausência desses compostos nas amostras indica que as abelhas não visitaram plantações de *brassicaceae*.

O presente estudo comprovou a existência de minerais em méis de abelhas sem ferrão, destacando o potássio como o mineral mais abundante em todas as amostras. Além disso, os resultados encontrados para a bioacessibilidade destes minerais nos méis sob condições simuladas de digestão gastrointestinais *in vitro* apresentaram-se elevados, com potencial biodisponível de minerais para o organismo humano.

Por fim, o estudo elucidou, pela primeira vez, a presença de 17 aminoácidos livres em méis de abelhas sem ferrão, mostrando a prolina e fenilalanina como os aminoácidos mais abundantes e presentes em todas as amostras estudadas.

Visando destacar os benefícios específicos dos méis de abelhas sem ferrão e continuar a promover o conhecimento a respeito deste importante produto melíponícola de Santa Catarina, em ascensão ao mercado brasileiro e internacional, as perspectivas para continuidade deste estudo sugerem a identificação de classes de compostos que fazem parte da composição dos méis e que ainda não foram investigados, tais como ácidos orgânicos, proteínas, oligossacarídeos e outros, objetivando também uma discriminação deste tipo de mel. Deve-se avaliar as funções biológicas específicas, evidenciando cientificamente os benefícios relacionados à saúde, principalmente, a partir de testes *in vivo*. Estudos mais específicos para avaliação da bioacessibilidade devem ser realizados, investigando também compostos como aminoácidos e compostos fenólicos.

Vale destacar que, no decorrer do período de quatro anos utilizados para a elaboração deste documento, foram realizados outros estudos não relatados aqui, mas que serão publicados. Podendo assim, declarar que já foram investigados resíduos de pesticidas presentes em méis de abelhas sem ferrão do estado de Santa Catarina. Foram realizados estudos do efeito citoprotetor dos méis em danos oxidativos celulares. O grupo de pesquisa iniciou também investigações de compostos bioativos e resíduo de pesticidas presentes no pólen produzidos por abelhas sem ferrão do estado de Santa Catarina.

## APÊNDICE

Apêndice A- Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) utilizados para cada um dos elementos minerais estudados.

Analitos	LOD ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )		LOQ ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	
	Total	Bioacessível	Total	Bioacessível
<b>Ca*</b>	0,10	0,01	0,33	0,09
<b>K*</b>	0,05	0,02	0,16	0,03
<b>Na</b>	0,2	-	0,6	-
<b>Mg</b>	0,02	5	0,1	15
<b>Mn</b>	0,01	0,3	0,05	1
<b>Al</b>	0,01	0,3	0,05	1
<b>Fe</b>	0,05	1,6	0,2	5
<b>Co</b>	0,01	0,3	0,05	1
<b>Cu</b>	0,01	0,3	0,05	1
<b>Zn</b>	0,01	0,3	0,05	1
<b>Cd</b>	0,01	0,3	0,05	1
<b>Pb</b>	0,01	0,3	0,05	1
<b>Ba</b>	0,01	0,3	0,05	1
<b>Ni</b>	0,005	0,17	0,2	0,5
<b>Li</b>	0,01	0,3	0,05	1

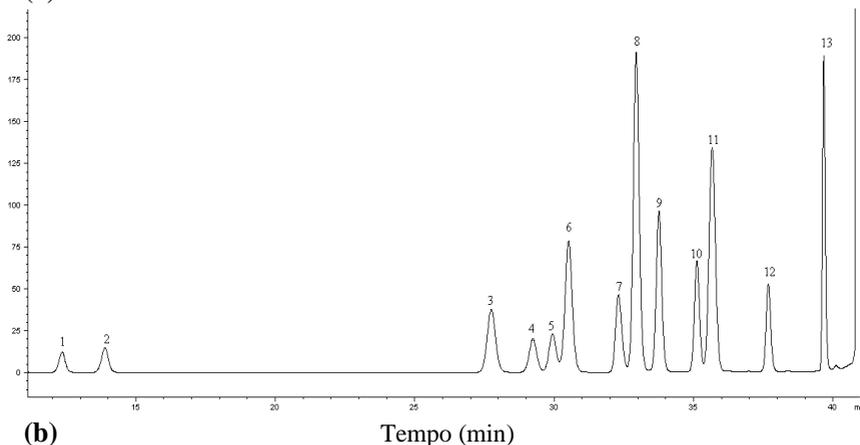
\* = Valores expresso em  $\text{mg g}^{-1}$ ,

- Não analisando

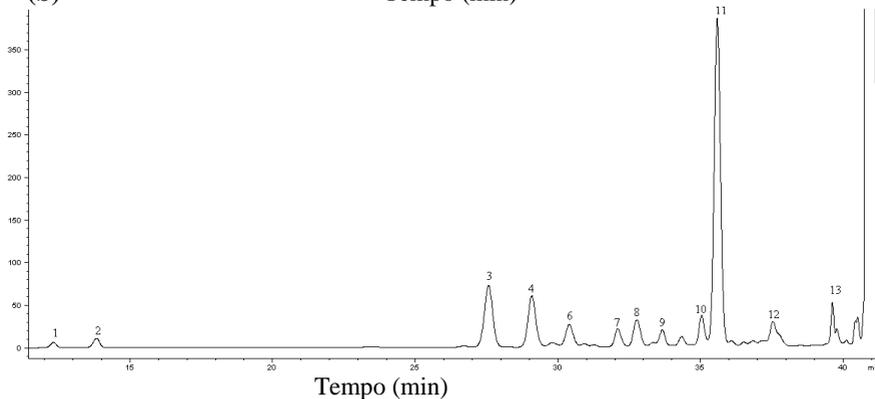
Fonte: próprio autor.

Apêndice B- Cromatograma representativo obtidos do HPLC-FLD para a identificação de aminoácidos em méis de abelhas sem ferrão (*Meliponinae*).

(a)

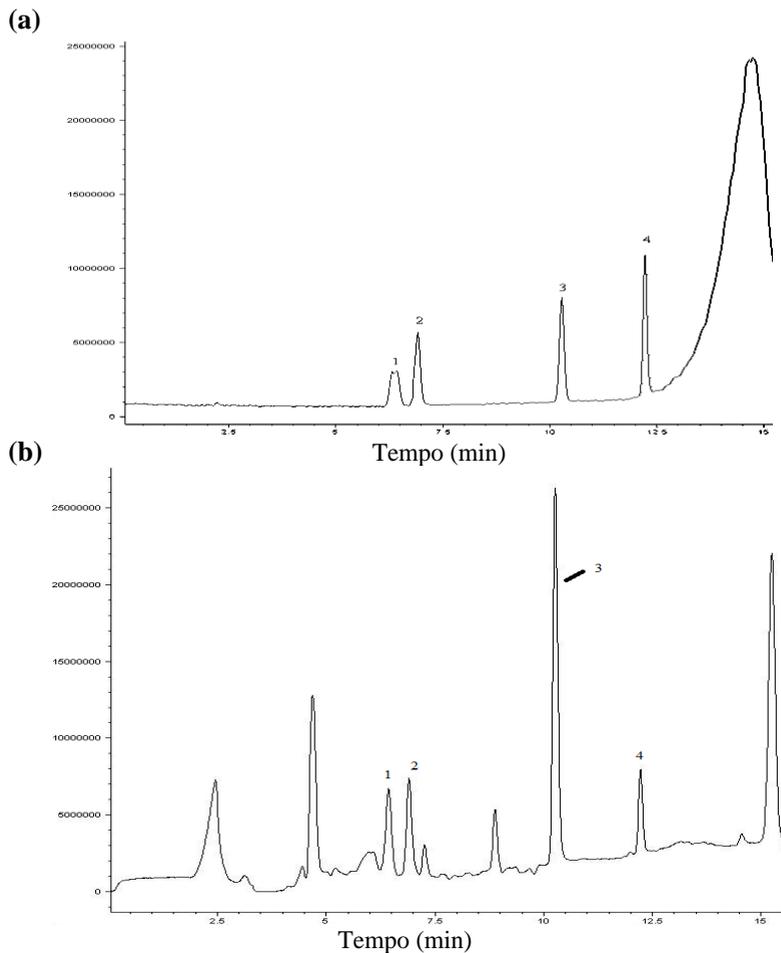


(b)



Legenda: (a) - cromatograma identificação dos padrões: 1- aspártico, 2- glutâmico, 3- Aspargina, 4- glutamina, 5- histidina, 6- serina, 7- argenina, 8- glicina, 9-treonina, 10- Alanina, 11- prolina, 12- tirosina, 13- valina. (b) - cromatograma de uma amostra de mel de abelhas sem ferrão (*Meliponinae*) identificando cada aminoácido presente.

Apêndice C- Cromatograma representativo obtidos do LC-MS para a identificação de aminoácidos em méis de abelhas sem ferrão (*Meliponinae*).



Legenda: (a) - cromatograma representativo para a identificação dos padrões: 1- leucina, 2- isoleucina, 3- fenilalanina, 4- triptofano (b) – cromatograma representativo de uma amostra de mel de abelhas sem ferrão (*Meliponinae*) identificando: 1- leucina, 2- isoleucina, 3- fenilalanina, 4- triptofano.

Apêndice D- Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) utilizados para cada um dos aminoácidos estudados.

<b>Aminoácidos</b>	<b>LOD (mg/Kg)</b>	<b>LOQ (mg/Kg)</b>
<b>Aspártico</b>	0,45	1,52
<b>Glutámico</b>	1,31	4,35
<b>Asparagina</b>	0,34	1,12
<b>Glunamina</b>	0,36	1,19
<b>Histidina</b>	0,71	2,37
<b>Serina</b>	0,63	2,10
<b>Arginina</b>	1,09	3,63
<b>Glicina</b>	0,25	0,84
<b>Treonina</b>	0,51	1,69
<b>Alanina</b>	0,73	2,45
<b>Prolina</b>	0,33	1,11
<b>Tirosina</b>	1,46	4,87
<b>Valina</b>	0,42	1,39
<b>Leucina</b>	0,38	1,25
<b>Isoleucina</b>	1,83	6,11
<b>Fenilalanina</b>	0,18	0,60
<b>Triptofano</b>	0,92	3,08

## ANEXO

Anexo A - Tabela simplificada das necessidades de ingestão diária para K, Ca, Mg, Fe, Zn, Mn, Na, Ni e Cu. Valores demonstrados em mg dia<sup>-1</sup>.

<b>Crianças</b>						
	<b>1 a 3 anos</b>		<b>4 a 8 anos</b>			
	<b>RDA</b>	<b>UL</b>	<b>RDA</b>	<b>UL</b>		
K	3000*	ND	3800	ND		
Ca	500 *	2500	800 *	2500		
Fe	7	40	10	40		
Mg	80	65	130	110		
Mn	1,2 *	2	1,5 *	3		
Zn	3	7	5	12		
Cu	260	340	340	440		
Na	1000*	1500	1200*	1900		
Ni	ND	0.2	ND	0,3		

<b>Homens</b>						
	<b>9 a 18 anos</b>		<b>19 a 50 anos</b>		<b>&gt; 51 anos</b>	
	<b>RDA</b>	<b>UL</b>	<b>RDA</b>	<b>UL</b>	<b>RDA</b>	<b>UL</b>
K	4700 *	ND	4700 *	ND	4700 *	ND
Ca	1300 *	2500	1000 *	2500	1200 *	2500
Fe	11	40	8	45	8	45
Mg	340	410	350	400	350	420
Mn	1,6 *	6	1,8 *	11	1,8 *	11
Zn	11	23	11	40	11	40
Cu	0,89	5	0,9	10	0,9	10
Na	1500	2300	1500	2300	1300	2300
Ni	ND	1,0	ND	1,0	ND	1,0

<b>Mulheres</b>						
	<b>9 a 18 anos</b>		<b>19 a 50 anos</b>		<b>&gt; 51 anos</b>	
	<b>RDA</b>	<b>UL</b>	<b>RDA</b>	<b>UL</b>	<b>RDA</b>	<b>UL</b>
K	4700 *	ND	4700 *	ND	4700 *	ND
Ca	1300 *	2500	1000 *	2500	1200 *	2500
Fe	15	45	18	45	8	45
Mg	360	350	320	350	320	350
Mn	1,6 *	6	1,8 *	11	1,8 *	11
Zn	9	23	8	40	8	40
Cu	0,89	5	0,9	10	0,9	10
Na	1500	2300	1500	2300	1300	2300
Ni	ND	1,0	ND	1,0	ND	1,0

\* Apenas a ingestão adequada (AI) foi estabelecida.

Fonte: adaptada de IOM, 2001.

Anexo B - Parâmetros otimizados no espectrômetro de massas obtidos pela infusão dos padrões de compostos fenólicos.

<b>Compostos</b>	<b>DP</b>	<b>EP</b>	<b>CEP</b>	<b>CE</b>	<b>CXP</b>
4-aminobenzoico	-20,00	-9,50	-10,00	-16,00	-2,00
Ácido salicílico	-25,00	-2,50	-10,00	-24,00	-2,00
Ácido cinâmico	-25,00	-9,00	-10,00	-16,00	-2,00
Ácido p-anísico	-25,00	-5,00	-10,00	-18,00	-2,00
Ácido mandélico	-20,00	-7,50	-10,00	-12,00	-2,00
Vanilina	-25,00	-3,00	-14,00	-14,00	-2,00
Ácido 4-hidroximetilbenzoico	-30,00	-6,50	-10,00	-18,00	-2,00
Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	-30,00	-7,00	-10,00	-20,00	-2,00
Umbeliferona	-55,00	-4,50	-10,00	-22,00	-4,00
Ácido p-cumárico	-21,00	-4,00	-17,69	-13,00	-6,00
Ácido metoxifenilacético	-10,00	-10,00	-10,00	-6,00	-2,00
Ácido vanílico	-30,00	-7,00	-10,00	-18,00	-2,00
Ácido gálico	-25,00	-11,00	-12,00	-20,00	-4,00
4-metilumbeliferona	-45,00	-10,50	-10,00	-28,00	-2,00
Coniferaldeído	-25,00	-10,00	-12,00	-20,00	-2,00
Ácidocafeico	-30,00	-11,00	-10,00	-22,00	-2,00
Siringaldeído	-25,00	-4,50	-10,00	-20,00	-4,00
Escopoletina	-35,00	-4,00	-12,00	-14,00	-2,00
Ácidoferúlico	-40,00	-7,00	-10,00	-24,00	-2,00
Ácidosiríngico	-30,00	-10,50	-12,00	-28,00	-2,00
Sinapaldeído	-30,00	-3,00	-12,00	-22,00	-2,00
Ácidosinápico	-30,00	-12,00	-16,00	-22,00	0,00
Resveratrol	-50,00	-8,50	-18,00	-24,00	-4,00
Crisina	-65,00	-10,00	-20,00	-52,00	-2,00
Pinocembrina	-60,00	-12,00	-22,00	-54,00	-2,00
Apigenina	-75,00	-9,00	-14,00	-46,00	-2,00
Galangina	-75,00	-8,50	-16,00	-64,00	-10,00
Naringenina	-60,00	-4,50	-12,00	-28,00	-2,00
Campferol	-75,00	-4,50	-16,00	-62,00	-2,00
Eriodictiol	-75,00	-9,50	-16,00	-36,00	-4,00
Aromadendrina	-45,00	-4,00	-16,00	-32,00	-2,00
Fustina	-45,00	-4,00	-14,00	-38,00	-2,00
Catequina	-55,00	-4,50	-14,00	-34,00	-4,00
Epicatequina	-290,00	-4,00	-16,00	-40,00	-2,00
Hispidulina	-50,00	-7,00	-22,00	-14,00	-4,00

Ácidoelágico	-50,00	-10,50	-16,00	-58,00	0,00
Quercetina	-80,00	-6,00	-14,00	-32,00	0,00
Taxifolina	-95,00	-10,50	-16,00	-30,00	-2,00
Miricetina	-65,00	-4,50	-18,00	-34,00	-2,00
Carnosol	-75,00	-5,00	-16,00	-16,00	-4,00
Ácido clorogênico	-25,00	-5,00	-24,00	-28,00	-2,00
Ácido rosmarínico	-50,00	-3,00	-18,00	-28,00	-4,00
Isoquercetina	-	-3,00	-48,00	-44,00	-2,00
	245,00				
Naringina	-	-4,00	-36,00	-52,00	-2,00
	250,00				
Rutina	-31,00	-5,00	-34,19	-27,00	-6,00

DP - Potencial de desagregação; EP – Potencial de entrada; CEP – Potencial de entrada da célula de colisão; CE – Energia de colisão; CXP - Potencial de saída da célula de colisão.

Fonte: próprio autor.

Anexo C - Íon precursor, íon quantitativo, tempo de retenção e limites de detecção (LOD) dos compostos fenólicos identificados nas amostras de mel de abelhas sem ferrão

<b>Composto</b>	<b>Íon precursor (m/z) Q1</b>	<b>Íon quantitativo (m/z) Q3</b>	<b>Tempo de retenção (min)</b>	<b>LOD (mg L<sup>-1</sup>)</b>
4-aminobenzoico	135,85	90,5	10,47	0,060
Ácido salicílico	136,9	91,1	10,99	0,003
Ácido mandélico	150,875	106,80	7,86	0,051
Vanilina	150,892	132,8	10,42	0,005
Ácido 3,4 dihidroxibenzoico	152,83	106,0	6,92	0,009
Umbeliferona	160,802	129,5	10,78	0,003
Ácido p-cumárico	163,040	119,0	10,46	0,001
Ácidovanílico	166,831	148,50	9,65	0,022
Ácido gálico	168,836	124,1	3,98	0,011
Coniferaldeído	176, 865	160,30	11,31	0,002
Ácidocafeico	178,834	131,30	9,45	0,006
Siringaldeído	180,873	163,10	10,76	0,013
Escopoletina	190,7	172,8	10,9	0,005
Ácido trans ferúlico	192,8	129,7	10,7	0,006
Ácidosiríntrico	196,8	119,6	10,0	0,009
Sinapaldeído	206,9	174,4	11,3	0,006
Ácidosinápico	222,8	161,6	10,8	0,019
Chrysin	252,8	62,2	13,8	0,004
Pinocebrina	254,9	60,7	13,5	0,002
Apigenina	268,7	114,8	12,6	0,009

*Continuação*

Naringenina	270,8	150,2	12,3	0,002
Eriodictiol	286,8	132,1	11,8	0,003
Aromadendrina	286,8	123,9	11,2	0,003
Catequina	288,8	120,3	8,8	0,013
Hispidulina	298,8	282,7	12,72	0,004
Quercetina	301,0	149,3	10,8	0,014
Taxifolina	302,8	120,7	10,7	0,007
Miricetina	316,8	150,6	11,2	0,014
Carnosol	329,0	284,0	14,3	0,002
Ácido clorogênico	352,8	187,8	9,1	0,005
Ácido rosmarínico	358,9	159,8	10,8	0,004
Isoquercetina	462,9	297,3	10,8	0,003

---

Fonte: próprio autor.

