ADRIANNE BASTOS FERREIRA

UESB, JEQUIÉ - BA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

LINHA DE PESQUISA: QUÍMICA DOS PRODUTOS NATURAIS

ADRIANNE BASTOS FERREIRA

Perfil físico-químico, teor de compostos fenólicos e atividade antitumoral do mel de *Tetragonisca angustula* (Jataí)

JEQUIÉ – BA

MARÇO / 2020

ADRIANNE BASTOS FERREIRA

Perfil físico-químico, teor de compostos fenólicos e atividade antitumoral do mel de *Tetragonisca angustula* (Jataí)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre(a) em Química.

Área de concentração: Química Analítica

Orientadora: Profa. Dra. Rosane Moura Aguiar

Coorientadora: Profa. Dra. Julita Maria Pereira Borges

JEQUIÉ – BA

MARÇO / 2020

Ficha Catalográfica – Biblioteca Jorge Amado

F383p Ferreira, Adrianne Bastos.

Perfil físico-químico, teor de compostos fenólicos e atividade antitumoral do mel de Tetragonisca angustula (Jataí) / Adrianne Bastos Ferreira.- Jequié, 2020.

92f.

(Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, sob orientação da Prof.ª Dr.ª Rosane Moura Aguiar e coorientação da Prof.ª Dr.ª Julita Maria Pereira Borges)

1.Jataí 2.DLLME 3.CLAE-UV 4.PCA 5.Atividade antitumoral I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia II.

CDD – 541.3

Rafaella Câncio Portela de Sousa - CRB 5/1710. Bibliotecária – UESB - Jequié

TERMO DE APROVAÇÃO

ADRIANNE BASTOS FERREIRA

Perfil físico-químico, teor de compostos fenólicos e atividade antitumoral do mel de *Tetragonisca angustula* (Jataí)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre(a) em Química.

COMISSÃO EXAMINADORA

_____

Profa. Dra. Rosane Moura Aguiar – Orientadora (UESB)

_____

Prof. Dr. Clayton Queiroz Alves (UEFS)

_____

Profa. Dra. Solange Aparecida de Paula (UESB)

Dissertação aprovada pelo Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Química em

____ / ____ / _____.

A Deus por me fortalecer durante essa prazerosa e árdua trajetória;

Á minha mainha (avó Matildes) por todo amor, cuidado e apoio incondicional.

Dedico!

AGRADECIMENTOS

Muitos foram aqueles que colaboraram para a realização deste sonho. A estes, meus sinceros agradecimentos:

A Deus pelo dom da vida, pelo seu amor, misericórdia e por me presentear com pessoas iluminadas durante a vida;

A mainha, avó Matildes, minha fiel companheira, conselheira, a quem admiro e sou infinitamente grata pelo amor dedicado a mim em gestos e palavras, essenciais em todos os momentos de alegrias ou tristezas;

Aos meus pais, Adriana e Rogério, pelos ensinamentos e construção do meu caráter;

A meu padrasto, Carlos, pelos conselhos e motivação;

Aos meus irmãos, Ian, Luiza e Thayses, por estarem presente, mesmo na minha constante ausência, pelos momentos leves e descontraídos que compartilharmos;

Aos meus amigos, Beatriz, Anderson, Layla, Leila e Maida pelas palavras de incentivo, pelos risos, choros, conselhos e momentos de descontração. Agradeço a Pâmela, pelo cuidado diário e companheirismo. A Ivan, pela parceria desde a graduação e por tudo que vivemos, boas lembranças guardadas na memória. A Heiddy, por sempre corroborar com meu crescimento pessoal, acadêmico e profissional sendo um exemplo para mim;

A minha orientadora Profa. Dra. Rosane Moura Aguiar, pelos valiosos conhecimentos que transcenderam saberes científico, pelo incentivo, atenção, paciência e amizade. Poder desfrutar de sua energia irradiante, fez total diferença durante esse período. O modelo de princesa que quero ser;

A toda equipe do pré-cidadão, a coordenadora Aline Magalhães, aos amigos, colegas de trabalho e alunos, pela solicitude nos momentos de necessidade e por contribuírem com o meu contínuo desejo de aperfeiçoamento;

A UESB, ao PGQUI e docentes do programa, pela infraestrutura, suporte e conhecimentos compartilhados durante a minha formação;

A minha coorientadora, Profa. Dra. Julita Borges, pelas amostras para a realização deste trabalho e pela colaboração com as análises;

Aos colaboradores: Laboratório de Produtos Naturais, a Profa. Dra. Vanderlucia de Paula e Hion de Jesus; ao Laboratório de Analítica e ao Prof. Dr. Marcos Bezerra; Prof. Dr. Valfredo, Prof. Dr. Cléber Galvão, Prof. Dr. Djalma Menezes; Prof. Dr. Clayton Queiroz; a FIOCRUZ – MG e a Dra. Bethânia; ao Laboratório de Físico-Química (UEFS), ao Prof. Severo da Silva e Luiz da Silva; pela colaboração providencial ao desenvolvimento deste trabalho;

Aos colegas da turma de 2018, especialmente a Dhéssica, pela amizade, conversas e acolhimentos nos momentos de maior necessidade;

A Capes e ao CNPq pelo financiamento e oportunidade em contribuir com a ciência;

A Camurujipe pelo transporte semanal em segurança, na maioria das vezes;

Por fim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste sonho, meus sinceros agradecimentos.

"Se as abelhas desaparecerem da face da terra, a humanidade terá apenas mais quatro anos de existência. Sem abelhas não há polinização, não há reprodução da flora, sem flora não há animais, sem animais não haverá raça humana".

Albert Einstein

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

FIGURA 1. Abelha *Tetragonisca angustula* (Jataí). _____20

CAPÍTULO I

FIGURA 1 - Área de coleta das amostras de mel pela representação do mapa baiano. _____35

FIGURA 2 - Mel coletado no período seco e mel coletado no período úmido, respectivamente. _____36

FIGURA 3. Esquema de determinação do pH no mel. _____37

FIGURA 4. Sistema de determinação do teor de acidez total. _____37

FIGURA 5. Esquema demonstrativo para determinação da umidade. _____38

Figura 6. Esquema representativo da padronização das soluções de Fehling A e B por titilação. _____39

Figura 7. Representação esquemática para determinar o teor de cinzas presente no mel. _____41

CAPÍTULO II

FIGURA 1. Curva analítica de ácido gálico. _____55

FIGURA 2. Curva analítica de quercetina. _____56

FIGURA 3. (a) Placa revelada com solução de DPPH após trinta minutos de aplicação. (b) Placa revelada com DPPH após 72h de aplicação. (c) placa revelada com solução de β-caroteno após 30 minutos de aplicação. _____59

CAPÍTULO III

FIGURA 1. Esquema do processo de Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME). _____66

FIGURA 2. Perfil cromatográfico da análise da solução mix de padrões. _____73

FIGURA 3. Compilação dos cromatogramas dos padrões de ácidos fenólicos e flavonoides. Ácido gálico (5), ácido clorogênico (3), rutina (6), ácido cafeico (1), ácido *p*-cumárico (2), ácido *trans*-ferúlico (4), quercetina (7). _____74

FIGURA 4. Cromatograma referente a amostra de MPS. _____75

FIGURA 5. Cromatogramas referentes a coinjeção dos respectivos padrões na amostra de MPS e sua identificação. _____75

FIGURA 6. Representação gráfica da curva de calibração dos padrões de referência ácido cafeico (a) e rutina (b). _____78

FIGURA 7. Viabilidade celular em linhagem de glioma murino (C6), expostas à fração clorofórmica do mel, nas doses de 1000-15000 $ng.mL^{-1}$. Os dados apresentam distribuição não normal, representados por mediana e variação, analisados por Kruskal-Wall. _____80

CAPÍTULO IV

FIGURA 1. Gráfico *Screen-plot* para os dados provenientes das análises de mel. _____89

Figura 2. Gráfico de escores e *loadings* para PC1 e PC2 das amostras de méis. _____90

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

TABELA 1. Proposta dos parâmetros relacionados às características físico-químicas do mel de ASF, respectivos limites e referências metodológicas (conforme Camargo, 2017). _____32

TABELA 2. Classificação da cor a partir da escala mm Pfund e a faixa de absorbância. _____41

TABELA 3. Parâmetros físico-químico do mel, calculados para as amostras do mel de *T. angustula* no período seco (MPS) e mel no período úmido (MPU). __42

CAPÍTULO III

TABELA 1. Valores do Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LD) calculados para os padrões de ácido cafeico e rutina em µg._____79

CAPÍTULO IV

Tabela 1. Valores para as correlações entre componentes principais e variáveis do mel. _____88

LISTA DE QUADROS

INTRODUÇÃO GERAL

QUADRO 1. Polifenóis encontrados no mel e suas respectivas ações terapêuticas. _____25

CAPÍTULO III

QUADRO 1. Condições cromatográficas estabelecidas para análise por CLAE – UV. _____70

QUADRO 2. Padrões de referência, seus respectivos códigos de identificação e estruturas molecular. _____71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µgAcCaf.100 mg^{-1} de mel – Micrograma de ácido cafeico em 100 miligramas de mel

µgRut.100 mg^{-1} de mel – Micrograma de Rutina em 100 miligramas de mel

Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASF – Abelha Sem Ferrão

BDMEP–INMET - Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa do Instituto Nacional de Meteorologia

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLAE – DAD – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Fotodiodos

CLAE – EM – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Espectrometria de Massas

CLAE – UV – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Ultravioleta

CMC – Concentração Mínima Citotóxica

DLLME – Dispersive Liquid-Liquid Microextraction

DMEM – Meio Eagle Modificado por Dubellco

DMSO – Dimetilsulfóxido

FAO/ONU – Food and Agriculture Organization of the United Nations

m – Coeficiente angular da curva

mm – Milímetros

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MASF – Mel de Abelha Sem Ferrão

mEAG.Kg^{-1} – Miliequivalente de Ácido Gálico por Quilograma de mel

mEq.Kg^{-1} - Miliequivalente por quilogramas de mel

mEQ.Kg^{-1} – Miliequivalente de Quercetina por Quilograma de mel

mm – Milímetro

MPS – Mel do Período Seco

MPU – Mel do Período Úmido

MTT – Kit de Proliferação Celular

ng.mL^{-1} – Nanograma por mililitro de mel

PCA – Principal Component Analysis

RIISPOA – Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitário dos Produtos de Origem Animal

S – Desvio padrão do branco

TLC – Thin-Layer Chromatography

Perfil físico-químico, teor de compostos fenólicos e atividade antitumoral do mel de *Tetragonisca angustula* (Jataí)

Autora: Adrianne Bastos Ferreira

Orientadora: Profa. Dra. Rosane Moura Aguiar

Coorientadora: Profa. Dra. Julita Maria Pereira Borges

RESUMO:

A abelha *Tetragonisca angustula* (Jataí) é uma espécie social que desempenha papel importante na manutenção da biodiversidade do ecossistema. O mel de abelha sem ferrão possui grande valor nutricional e terapêutico fortemente relacionado a composição dos metabólitos secundários obtidos das plantas. No entanto, fatores externos como condições climáticas e geográficas podem modificar sua composição. Dessa forma, o presente estudo buscou avaliar as características físico-química do mel de abelha Jataí coletados nos períodos seco (MPS) e úmido (MPU), bem como, o teor de fenólicos totais, flavonoides e a atividade antitumoral. Dos parâmetros físico-químicos analisados houve diferença significativa entre as amostras. O MPS apresentou coloração mais escura, maior acidez, teor de açucares redutores e cinzas, e menor umidade quando comparado ao MPU. No entanto, teor de fenólicos e flavonoides não se distinguiram estatisticamente entre as amostras. A análise de Componente Principais (PCA) explicou 98,13% de variância total dos dados através de duas componentes principais, separando os grupos de mel. A atividade antitumoral em linhagem de células glioma foi certificada para o MPS em baixas concentrações ($ng.mL^{-1}$) e o estudo da composição fenólica por CLAE-UV permitiu identificar o ácido clorogênico, ácido *p*-cumárico e/ou ácido *trans*-ferulico e quantificar ácido cafeico e rutina (1,7723 e 0,9384 $\mu g.100\ mg^{-1}$ de mel), respectivamente.

Palavras-chave: Jataí, DLLME, CLAE-UV, PCA, atividade antitumoral.

Physico-chemical profile, content of phenolic compounds and antitumor activity of *Tetragonisca angustula* (Jataí) honey

Author: Adrianne Bastos Ferreira

Advisor: Profa. Dra. Rosane Moura Aguiar

Co-Advisor: Profa. Dra. Julita Maria Pereira Borges

ABSTRACT:

The *Tetragonisca angustula* bee (Jataí) is a social species that presents an importante role in maintaining the ecosystem biodiversity. Stingless bee has great nutricional and therapeutic value strongly related to the secondary metabolites obtained from plants. However, external factors such as climatic and geographical conditions can modify its compositions. Thus, the presente study aims to avaluete the physicochemical characteristics of Jataí honey, collected in differents periods, dry (MPS) and wet (MPU) of the year, as well as, quantify of the total phenolic and flavonoid contentes and antitumor activity. Among the analyzed physicochemical parameters, significant diferences were observed between the MPS and MPU. The MPS demostrate dark color, higher acidity, reducing sugar and ash contente, and lower humidity compared to MPU. However, total phenolic and flavoid contentes was not statistically difference between samples. The Principal Component Analysis (PCA) explained 98.13% of the total variance of the date through two principals componentes, separating the groups. The antitimor activity in the glioma cell line was certified for MPS in low concentrations ($ng.mL^{-1}$). The study of the phenolic contente by HPLC-UV allowed the identification of chlorogenic acid, *p*-cumaric acid and/or *trans*-ferulic acid and quantification of the caffeic acid and rutin (1.7723 and 0.9384 mg.100 mg^{-1} de mel, respectively.

Key words: Jataí, DLLME, HLPC-UV, PCA, antitumor activity.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL

ABELHA *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811) 20

MEL 22

CARACTERÍSTICAS DO SEMIÁRIDO E INFLUÊNCIA NO POTENCIAL BIOATIVO DO MEL 23

REFERÊNCIAS 26

CAPÍTULO I

CARACTERÍSITCAS FÍSICO-QUÍMICAS DE MEL DA ABELHA *Tetragonisca angustula* (Jataí) EM PERÍODO SECO E ÚMIDO DA REGIÃO SUDOESTE DA BAHIA 30

1.1 – INTRODUÇÃO 31

1.2 – OBJETIVO 34

1.3 – MATERIAIS E MÉTODOS 35

1.3.1 – Coleta das amostras 35

1.3.2 – Parâmetros físico-químicos 36

1.4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO 42

1.5 – CONCLUSÃO 47

1.6 – REFERÊNCIAS 48

CAPÍTULO II

TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS E FLAVONOIDES EM AMOSTRA DE MEL DE *Tetragonisca angustula* (Jataí) 51

2.1 – INTRODUÇÃO 52

2.2 – OBJETIVOS 54

2.3 – MATERIAL E METODOS 55

2.3.1 – Determinação dos fenólicos totais 55

2.3.2 – Determinação dos flavonoides totais 56

2.3.3 –Triagem do Potencial Antioxidante: radicais de DPPH e β-caroteno 57

2.4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO 58

2.5 – CONCLUSÃO 60

2.6 - REFERÊNCIAS 61

CAPÍTULO III

COMPOSTOS FENÓLICOS, FLAVONOIDES E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL EM AMOSTRA DE MEL DE *Tetragonisca angustula* (Jataí) POR DLLME E CLAE-UV 64

3.1 – INTRODUÇÃO 65

3.2 – OBJETIVO 68

3.3 – MATERIAL E MÉTODOS 69

3.3.1 – Preparo da amostra de MPS por DLLME 69

3.3.2 – Identificação e quantificação dos compostos fenólicos por CLAE-UV 70

3.3.3 – Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) 71

3.3.4 – Teste biológico: Atividade antitumoral em linhagem de glioma murino (C6) 72

3.4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO 73

3.4.1 – Identificação dos compostos fenólicos 73

3.4.2 – Quantificação de ácido cafeico e rutina na amostra de MPS 78

3.4.3 – Atividade antitumoral 79

3.5 – CONCLUSÃO 81

3.7 – REFERÊNCIAS 82

CAPÍTULO IV

QUIMIOMETRIA: TRATAMENTO ESTATÍSTICO UTILIZANDO ANÁLISES DOS COMPONENTES PRINCIPAIS 84

4.1 – INTRODUÇÃO 85

4.2 – OBJETIVOS 85

4.3 – MATERIAIS E MÉTODOS 86

4.4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO 87

4.5 – CONCLUSÃO 91

4.6 – REFERÊNCIAS 92

INTRODUÇÃO GERAL

ABELHA NATIVA JATAÍ (*Tetragonisca angustula*), MEL E INFLUÊNCIA DO SEMIÁRIDO NO POTENCIAL BIOATIVO DO MEL

INTRODUÇÃO

ABELHA *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1811)

As abelhas sem ferrão são consideradas um dos insetos mais importantes para o equilíbrio do meio ambiente, pois são polinizadores naturais de várias plantas e responsáveis pela manutenção da biodiversidade de diversos ecossistemas terrestres. O termo “sem ferrão” é atribuído devido ao ferrão atrofiado, não funcional, incapaz de ferroar. Além da polinização, outra função muito difundida é a apicultura e meliponicultura (termo conferido ao cultivo de abelha sem ferrão) que concentra a principal fonte econômica promovida pelas abelhas através da produção e comercialização do mel, pólen, própolis, geoprópolis, ceras e geleia real, produtos de grande valia para a sociedade. As abelhas sociais são classificadas em duas tribos: Meliponini (consiste apenas do gênero *Melipona)* e Trigoni que é representada por diversos gêneros, incluindo a espécie *Tetragonisca angustula*, conhecida por abelha jataí [1]–[5].

Jataí ou também chamada de “maria-seca”, “abelhas-ouro”, “jataí-verdadeira”, “virginitas” e “abelha indígena” é uma abelha de pequeno porte (4 a 5 mm) com características sociais (**FIGURA 1**). Sua distribuição geográfica é ampla ocorrendo desde o México até o sul do Brasil, onde é possível encontrá-las naturalmente nos estados do Amazonas, Amapá, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Mato Grosso, Pará, Paraíba, Rio de Janeiro, Rondônia, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo [2], [6].

FIGURA 1. Abelha *Tetragonisca angustula* (Jataí)

Fonte: Chaves, L. R., 2019

A facilidade em hábitos de nidificação, permite a criação de meliponíneos em cavidades como tronco mortos ou vivos, paredes de alvenaria, caixas específicas e até mesmo tubulações. Umas de suas características peculiar é a entrada da colmeia que consiste em um tubo de cerume marrom-amarelado com extremidades estreitas e mais claras [2], [7].

As colônias de jataí podem conter até 10.000 indivíduos e em épocas de grandes floradas, a rainha pode pôr até 50 ovos por dia. A produção anual de mel oscila entre 0,6 a 1,2 L e o custo muda conforme o estado, na Bahia, por exemplo, o valor por litro de mel fica em torno de 80,00 a 100,00 reais. Embora a produção de mel de *T. angustula* seja em menor quantidade, quando comparadas a outras espécies de abelhas sem ferrão, a originalidade e qualidade deste produto se destaca e é apreciada pelo consumidor. O mel de jataí apresenta especificidades únicas como sabor, cor e aroma característicos. Estudos revelam influência das plantas visitadas pelas abelhas, região geográfica, clima e a espécie de abelha para obter o resultado relevante deste produto [8]–[11].

A facilidade em adaptar-se em diversificadas regiões, confere às abelhas sociais o valioso papel polinizador. Pode ser inserida em vegetação natural, plantios florestais, fruticultura, sendo peça chave na diversificação vegetal, colaborando com o aumento da produção agrícola, originando frutos maiores e de maior qualidade. Toda funcionalidade e importância das abelhas intervém indiretamente em dimensões sociais, política, econômica, ambientais, biológica, agronômica e geográfica. Contudo, a vida e diversidade das abelhas tem sido ameaçada principalmente nos últimos dois anos em virtude da utilização de determinados defensivos agrícolas [8], [12]–[14].

A crescente utilização e liberação de agroquímicos no Brasil, autorizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), põe em risco o ecossistema, o meio ambiente e a saúde humana. Segundo o MAPA e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), em 2019 foram concedidas a comercialização e utilização de 475 agrotóxicos no país, maior número registrados desde 2005, sendo alguns destes proibidos ou com alta restrição de uso em diversos países europeus. Os efeitos da utilização demasiada de agroquímicos mostram impactos especialmente para as abelhas, aumentando

seu nível de mortandade. Segundo a Repórter Brasil e Agência Pública, quase meio bilhão de abelhas foram mortas entre os estados do RS, MS, SP e RN em consequência de pesticidas derivados de nicotina da classe dos neonicotinoides (clotianidina, imidacloprid e tiametoxam) [12], [15]–[20].

No Brasil, das 141 espécies de plantas cultivadas para alimentação humana e animal, aproximadamente 60% necessitam da ação polinizadora das abelhas e segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO/ONU do inglês Food and Agriculture Organization of the United Nations), 75% do cultivo mundial são dependentes delas. Infelizmente, diante do atual cenário com elevado percentual de mortandade das abelhas, a meliponicultura, a apicultura e o ecossistema como um todo estão sendo afetados de forma preocupante e, futuramente, efeitos socioeconômicos serão fortemente notórios [10], [15], [18], [21].

MEL

O potencial alimentício e terapêutico do mel nos tempos mais remotos atribui a este produto, grande importância na vida humana. Atualmente, essa estima se expande em diversos ramos das indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia, bem como no setor agrícola. O mel de abelha pode ser caracterizado como um fluido viscoso com grande concentração de açucares principalmente glicose e frutose, em menor concentração os oligossacarídeos e polissacarídeos, ácidos orgânicos, minerais, aminoácidos, vitaminas, grão de pólen, ceras, compostos fenólicos e outros fitoquímicos, compõe uma mistura complexa de nutrientes [22].

O mel é produzido a partir de abelhas operarias que coletam o néctar das flores, das secreções advindas de partes vivas das plantas melíferas ou de excreções de insetos sugadores de plantas que vivem sobre elas e armazenam esses constituintes em seu abdômen. No abdômen, secreções salivares e enzimas das glândulas cefálicas modificam quimicamente as substâncias coletadas que posteriormente são depositadas na colmeia. Na colmeia, o mel é armazenado nos favos até amadurecer. Assim, o resultado da composição química, aroma e sabor do mel estão intrinsicamente associados à fonte vegetal

do ambiente nativo disponíveis no processo de polinização, bem como as condições climáticas, geográfica e a espécie de abelha, por isso a importância das condições externas no produto final [1], [23]–[25].

CARACTERÍSTICAS DO SEMIÁRIDO E INFLUÊNCIA NO POTENCIAL BIOATIVO DO MEL

A composição do mel desidratado equivale de 95 a 98% de carboidratos e 2 a 5% são referentes a mistura complexa de metabólitos secundários e minerais, sendo estes responsáveis pelo potencial bioativo e real qualidade do mel. Os bioativos que compõe o mel são em grande maioria decorrentes da origem botânica e da espécie de abelhas que os produzem, por isso, a importância quanto a estrutura geográfica e floral da região em que é produzida. Estudos comprovam que os compostos pertencentes às classes de ácidos fenólicos, flavonoides, antocianinas e procianidinas são os principais responsáveis pelo poder bioativo do mel [26]–[30].

O semiárido é caracterizado pelo clima seco, temperaturas elevadas, solos com baixa capacidade de retenção de umidade, evapotranspiração média de 2.700 $mm.ano^{-1}$ e índice pluviométrico médio de 600 a 800 $mm.ano^{-1}$. Geralmente, metade da chuva se concentra no trimestre mais chuvoso (período úmido) - característico nos meses do verão – e o período seco se estende em média por 6-8 meses. Aproximadamente 50% do solo dessa região é de origem sedimentar e elevado potencial de águas subterrâneas, sua rede fluvial é predominantemente intermitente e volumes de água limitados [30], [31].

Tratando-se de cobertura vegetal, o bioma que prevalece na região semiárida é a Caatinga, com cerca de 80% da área e os outros 20% distribuídos entre Cerrado e brejos de altitude. A vegetação xerófila composta por arbustos e arbóreos de pequeno e médio porte apresentam fisionomia e florística diversificada, permitindo uma biota rica em endemismo característico desse ecossistema [29]–[31].

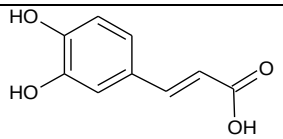
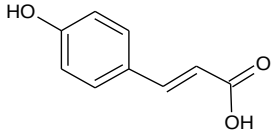
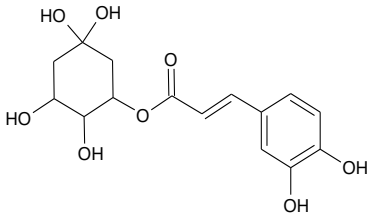
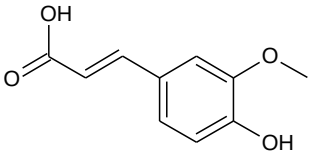
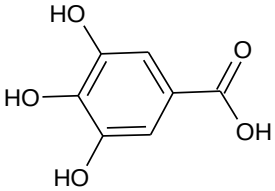
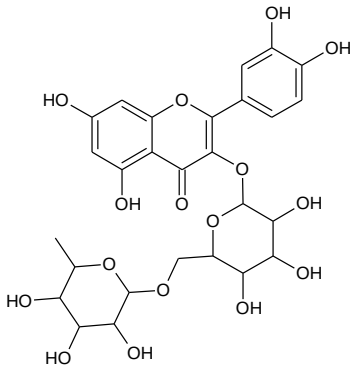
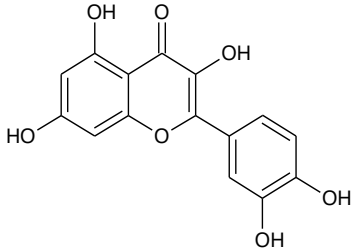
A caatinga é o único bioma exclusivamente brasileiro, portanto, todo patrimônio biológico dessa região só pode ser encontrado no Brasil. Esse bioma

apresenta riqueza incomum por causa da grande variabilidade na composição florística, resultado da influência dos fatores abióticos que o compõe. As condições climáticas e geográficas adversas resultam na resistência e admirável poder de regeneração de plantas melíferas [29]–[31].

As plantas melíferas são apreciadas por abelhas (Apis e Meliponinae) em razão do seu aroma e por ser fonte de alimento (néctar, pólen, resinas e óleos). Um fator determinante da região semiárida do Nordeste é que em período de seca extrema, as abelhas dependem desse tipo de plantas adaptadas às condições de seca para a manutenção de suas colônias. As características referentes as condições climáticas, geográficas e biodiversidade vegetal inerentes da região do semiárido concede variedade de néctar e pólen floral que estimulam na composição das propriedades específicas dos méis e demais produtos das abelhas [30]–[32].

A apiterapia – termo utilizado para fins medicinais baseado em produtos derivados de abelha – tem sido amplamente utilizada por humanos há muito tempo no tratamento de úlceras, queimaduras, doenças gastrointestinais entre outras, em função da sua composição altamente diversificada, rica em fitoquímicos e quantidades relevantes de substâncias com potencial antioxidante. Diversos estudos apontam a relação da atividade antioxidante do mel com a presença de ácidos fenólicos (cafeico, cumárico, ferúlico, clorogênico, gálico, vanílico, cinâmico, elágico); flavonoides (quercetina, crisina, rutina, pinocembrina, pinobanksina, kaempferol, luteolina, galangina, apigenina, hesperetina, mircetina); ácido ascórbico; catalase; peroxidase e carotenoides [33], [34].

Dessa forma, cada mel possui composição específica inerente à presença e variação das concentrações dos constituintes químicos. A combinação sinergética dos constituintes bioativos proporcionam ao mel o poder nutricional e terapêutico, os quais são dependentes das condições climáticas, biológicas e vegetais disponíveis no ambiente em que estão inseridos [33], [35], [36]. Em estudos anteriores, Amin *et al*., 2018 e Rossen *et al*., 2017, ressaltaram o potencial terapêutico de fenólicos comumente encontrados em mel de abelha sem ferrão, alguns desses demonstrados no **QUADRO 1** [37],[38].

Composto polifenólico	Estrutura molecular	Potencial terapêutico
Ácido cafeico		Auxilia no tratamento cardiovascular; anti-inflamatório; antioxidante; previne a diabete e ação anticancerígena.
Ácido *p*-cumárico		Ação anti-inflamatória, hematoprotetor, ação antitumoral e melhora déficit cognitivo reduzindo os danos cerebrais.
Ácido clorogênico		Ação hepatoprotetora; anti-inflamatória antitumoral; reduz a hipertensão.
Ácido *trans*-ferúlico		Ação hepatoprotetora, cardioprotetora, previne o estresse oxidativo e diabetes
Ácido gálico		Potencial antioxidante, anti-inflamatório, cardioprotetor e anticancerígeno.
Rutina		Efeito protetor da diabetes; ação antitumoral; cardioprotetora; redução do estresse oxidativo e minimiza sintomas de depressão.
Quercetina		Efeito hepatoprotetor; anti-inflamatório, combate o estresse oxidativo.

QUADRO 1. Polifenóis encontrados no mel e suas respectivas ações terapêuticas

Fonte: Amin, 2018 e Rossen, 2017, adaptado

REFERÊNCIAS

[1] ÁVILA, S.; BEUX, M. R.; RIBANI, R. H.; ZAMBIAZI, R. C. Stingless bee honey: Quality parameters, bioactive compounds, health-promotion properties and modification detection strategies. **Trends in Food Science and Technology**, v. 81, n. September, p. 37–50, 2018.

[2] SANTIAGO, L. R. **Variabilidade genética de *Tetragonisca angustula* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) de meliponários**, 2013.Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

[3] VIT, P.; BOGDANOV, S.; KILCHENMANN, V. Composition of Venezuelan honeys from stingless bees (Apidae: Meliponinae) and Apis mellifera L. **Apidologie**, v. 25, n. 3, p. 278–288, 1994.

[4] BUENO-COSTA, F. M. *et al.* Antibacterial and antioxidant activity of honeys from the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 333–340, 2016.

[5] DE CAMARGO, R. C. R.; DE OLIVEIRA, K. L.; BERTO, M. I. Mel de abelhas sem ferrão: proposta de regulamentação. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 20, 2017.

[6] ALMEIDA-ANACLETO, D. De. **Recursos alimentares, desenvolvimento das colônias e características físico químicas, microbiológicas e polínicas de mel e cargas de pólen de meliponíneos, do município de Piracicaba, Estado de São Paulo**, 2007.Dissertação (Mestrado em Ciencias) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

[7] ANACLETO, D. de A.; SOUZA, B. de A.; MARCHINI, L. C.; MORETI, A. C. de C. C. Composição de amostras de mel de abelha Jataí (Tetragonisca angustula latreille, 1811). **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 3, p. 535–541, 2009.

[8] OLIVEIRA, A. F. De; STORTO, L. J.; LOPES, A. E. P.; DIAS, L. F.: Caracterização físico-química do mel da abelha Jataí (Tetragonisca angustula). **Tópicos em Ciências e Tecnologia de Alimentos: Resultados de Pesquisas Acadêmicas.** v. 55, n. 43, p. 2715–2729, 2017. a.

[9] CARVALHO, C. A. *et al.* Mel de abelhas sem ferrão: contribuição para a caracterização físico-química. January, 2005.

[10] NASCIMENTO, A. *et al.* Physical-Chemical Parameters of Honey of

Stingless Bee (Hymenoptera: Apidae). **American Chemical Science Journal**, v. 7, n. 3, p. 139–149, 2015.

[11] VENTURIERI, G. C.; PA, E. **Criação de abelhas Indígenas sem Ferrão**. Disponível em: <www.embrapa.br/fale-conosco/sac>. Acesso em: 12 mar. 2020.

[12] ROCHA, A. S. **Agriculturas e meio ambiente: uma questão permanente**. p. 215–234, 2019.

[13] SOUZA CUNHA, A. E. *et al*. A.: A novel non-invasive radar to monitor honey bee colony health. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 170, n. January, p. 105241, 2020.

[14] STEWART, S.; IVY, M. A.; ANSLYN, E. V.: The use of principal component analysis and discriminant analysis in differential sensing routines. **Chemical Society Reviews**, v. 43, n. 1, p. 70–84, 2014.

[15] GRIGORI, P. **Agrotóxico mais encontrado em frutas e verduras no Brasil é fatal para abelhas | Brasil | EL PAÍS Brasil**. 2019a. Disponível em: <https://brasil.elpais.com/brasil/2019-12-17/agrotoxico-mais-encontrado-em-frutas-e-verduras-no-brasil-e-fatal-para-abelhas.html>. Acesso em: 23 fev. 2020.

[16] GRIGORI, P. P. **Apicultores brasileiros encontram meio bilhão de abelhas mortas em três meses**. 2019b. Disponível em: <https://reporterbrasil.org.br/2019/03/apicultores-brasileiros-encontram-meio-bilhao-de-abelhas-mortas-em-tres-meses/>. Acesso em: 23 fev. 2020.

[17] GUSSONI, W.; RIBEIRO, G. **Abelhas x Agrotóxicos**. p. 1–16.

[18] FERREIRA, I. C. F. R.; AIRES, E.; BARREIRA, J. C. M.; ESTEVINHO, L. M. Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract. **Food Chemistry**, v. 114, n. 4, p. 1438–1443, 2009.

[19] JOLLIFE, I. T.; CADIMA, J. Principal component analysis: A review and recent developments. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 374, n. 2065, 2016.

[20] GALVANI, G. **Brasil tem um novo registro de agrotóxico por dia em 2019** - CartaCapital. 2019. Disponível em:

<https://www.cartacapital.com.br/politica/brasil-tem-um-novo-registro-de-agrotoxico-por-dia-em-2019/>. Acesso em: 24 fev. 2020.

[21] GOMES, V. V. *et al.* Avaliação da Qualidade do Mel Comercializado no Oeste do Pará, Brasil. **Revista Virtual de Quimica**, v. 9, n. 2, p. 815–826, 2017.

[22] ROÓS, P. B. *et al.* Avaliação de parâmetros físico-químicos e da atividade antimicrobiana in vitro de méis de jataí (*Tetragonisca angustula*) provenientes do Rio Grande do Sul. **PERSPECTIVA**, v. 42, n. 159, p. 97–107, 2018.

[23] MENDES, C. D. G.; MESQUITA, L. X. De. As Análises De Mel : Revisão the Analysis of Meis : Review. **Revista Caatinga**, v. 22, n. 2, p. 7–14, 2009.

[24] FUENMAYOR, C. A.; ZULUAGA-DOMÍNGUEZ, C. M.; DÍAZ-MORENO, A. C.; QUICAZÁN, M. C. Miel de angelita': Nutritional composition and physicochemical properties of Tetragonisca angustula honey. **Interciencia**, v. 37, n. 2, p. 142–147, 2012.

[25] 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.

[26] SAHIN, H. *et al.* Honey, polen, and propolis extracts show potent inhibitory activity against the zinc metalloenzyme carbonic anhydrase. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 3, p. 440–444, 2011.

[27] TEZCAN, F.; KOLAYLI, S.; ULUSOY, H. S. E.; ERIM, F. B. Evaluation of organic acid, saccharide composition and antioxidant properties of some authentic Turkish honeys. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 50, n. 1, p. 33–40, 2011.

[28] COSTA, A. C. V. Da. *et al.* Sensory and volatile profiles of monofloral honeys produced by native stingless bees of the brazilian semiarid region. **Food Research International**, v. 105, n. August 2017, p. 110–120, 2018.

[29] C. G. da Silva, Pedro Carlos Gama & Filho, **"Eixo Tecnológico da Ecorregião Nordeste**," *embrapa*, 2015.

[30] BLAMONT, E.; FILHO, J. R. C. V.; FILHO, P. T.; MENDONÇA, J. O. O semiárido da Bahia: Problemas, desafios e possibilidades. **socioeconomia**, v. 5, n. 2, 2002.

[31] CASTRO, M. L. *et al.* Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: Influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Quimica Nova**, v. 30, n. 7, p. 1512–1516, 2007.

[32] PONTIS, J. A.; DA COSTA, L. A. M. A.; DA SILVA, S. J. R.; FLACH, A. Color, phenolic and flavonoid content, and antioxidant activity of honey from Roraima, Brazil. **Food Science and Technology**, v. 34, n. 1, p. 69–73, 2014.

[33] VIT, P.; ROUBIK, D. W.; PEDRO, S. R. M. Pot-Honey: A legacy of stingless bees. **Pot-Honey: A Legacy of Stingless Bees**, p. 1–654, 2012.

[34] ÁVILA, S. **DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS DE QUALIDADE DE MEL DE ABELHAS SEM FERRÃO UTILIZANDO FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS**, 2019. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2019.

[35] ÜRÜNLERININ, A.; ÖNEMI, T.; HEGAZI, A. G. Medical Importance of Bee Products. **Kasım U Bee J. November**, v. 12, n. 4, p. 136–146, 2012.

[36] ZULKHAIRI AMIN, F. A. *et al*. **Therapeutic properties of stingless bee honey in comparison with european bee honey**, 2018.

[37] HOSSEN, M. S. *et al.* Beneficial roles of honey polyphenols against some human degenerative diseases: A review. **Pharmacological Reports**, v. 69, n. 6, p. 1194–1205, 2017.

CAPÍTULO I

CARACTERÍSITCAS FÍSICO-QUÍMICAS DE MEL DA ABELHA *Tetragonisca angustula* (Jataí) EM PERÍODO SECO E ÚMIDO DA REGIÃO SUDOESTE DA BAHIA

1.1 – INTRODUÇÃO

O mel de abelhas sem ferrão (ASF) tem sido admirado em virtude do seu sabor peculiar e qualidade nutricional, o que justifica o sucesso de sua inserção comercial. A composição química, apresentada por esses produtos, podem variar a depender de fatores edafoclimáticos, principalmente da região de cultivo, espécie de abelha e período de coleta [1].

A inclusão da meliponicultura (termo utilizado para o cultivo de abelha sem ferrão) como atividade agrícola no Brasil foi sugerida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e a inclusão dos produtos das abelhas nativas no Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitário dos Produtos de Origem Animal (RIISPOA) foi publicado no decreto Nº 9.013, de 29 de março de 2017, aceitando o mel, pólen e própolis de ASF como produtos alimentícios. Tal reconhecimento corrobora com a necessidade dos padrões de parâmetros físico-químicos específicos para méis de ASF, no âmbito nacional [2], [3].

A proposta de regulamentação de méis de abelha sem ferrão foi sugerida por Camargo *et al*., 2017, com o objetivo de estabelecer a identidade e os requisitos mínimos do controle de qualidade e as condições físico-química destes produtos, considerando: a origem, métodos de extração, composição e requisitos, aditivos, acondicionamento, armazenamento, contaminantes, higiene, pesos, medidas e rotulagem ideais para amostras de méis de abelhas sem ferrão. Os valores estabelecidos previamente como padrões são apresentados na **TABELA 1**.

TABELA 1. Proposta dos parâmetros relacionados às características físico-químicas do mel de ASF, respectivos limites e referências metodológicas (conforme Camargo, 2017)

Parâmetros	**Limites**	**Referências**
Açúcares redutores (calculado como açúcar invertido)	Mínimo 60g/100g	IHC (2002)
Sacarose aparente	Máximo 6g/100g	
Umidade a) Mel desumidificado b) Mel *in natur*a, pasteurizado ou maturado	 Máximo 20g/100g Máximo 40g/100g	AOAC (2010a)
Sólidos insolúveis em água	Máximo 0,1g/100g	FSA (1992a)
Minerais (cinzas)	Máximo 0,6g/100g	IHC (2002)
Pólen	Presença de grãos de pólen	Louveaux *et al*. (1978)
pH	2,9 a 4,5	IHC (2002)
Acidez livre	Máximo 50 mEq/kg	FSA (1992b)
Atividade de água	0,52 a 0,80	AOAC (2010b)
Hidroximetilfurfural – HMF	Máximo de 20 mg/kg	AOAC (2010c)
O mel não deve apresentar indícios de fermentação, com exceção do mel maturado		

Fonte: Camargo, 2017

Apesar de existir uma proposta de regulamentação dos parâmetros para méis de ASF, esses valores não contemplam méis de todas as espécies. Estudo realizado por Ávila *et al*., 2018, compila valores de diferentes espécies de origens mundial e constata variação nos valores proposto na regulamentação. A acidez, por exemplo, oscila bastante em diferentes espécies, nos gêneros *Mellipona* (20,55 a 145,28), *Frieseomelita* (73,00), *Homotrigona* (528,00), *Scaptotrigona* (28,78 a 98,43), *Tetragona* (91,20 a 128,90), *Tegragonula* (76,00 a 96,50), *Tetrigona* (495,00 a 592,00) e *Trigona* (46,70 a 78,14). A quantidade de HMF também varia, sendo encontrados valores acima de 50 mg/Kg para a espécie *S. xanthotricha.* Os açucares redutores apresentados em amostras de mel, na maioria das espécies, encontram-se fora da faixa padrão com taxa inferior a 60g/100g, limite mínimo estabelecido. Tais variações demonstram a necessidade de estudos de caracterização de produtos nativos de diferentes regiões do Brasil [4].

A acidez do mel é caracterizada pela presença de ácidos orgânicos, especialmente o ácido glucônico, formado durante a ação da enzima glucose-oxidase; por lactonas ou ésteres internos e pela concentração de íons inorgânicos (principalmente fosfato, sulfeto e cloretos), que são derivados de distintas fontes de néctar. A ação das bactérias durante a maturação do mel também pode contribuir com o teor de acidez total do produto. Apesar de não ser um parâmetro de qualidade obrigatório, a avaliação da acidez total pode ser auxiliada pela determinação do potencial hidrogeniônico (pH). A avaliação do pH permite inferir a presença de íons de hidrogênios contidos no meio. Esse parâmetro é importante na classificação e avaliação de amostras de mel, pois encontra-se diretamente ligado à formação de hidroximetilfurfural (composto que pode indicar desidratação de frutose em meio acidificado). Além disso, o pH tem a função de complementar a avaliação da acidez total dessas amostras. Em alguns casos, valores de pH fora da faixa permitida pode indicar processos de fermentação ou adulteração. Contudo, a composição ácida dos méis torna-se benéfico pois, em pH abaixo de 4,5 dificilmente ocorrerá propagação de microrganismos patogênicos indesejáveis, tornando o mel de ASF um alimento de baixo risco para consumidores dentro da faixa etária permitida. O pH pode sofrer variação a depender da origem das plantas pólen-nectarífero, assim como da umidade presente na amostra [5]–[8].

A umidade é uma das características mais importantes do mel, garante sua segurança e confere padrão de qualidade. Em méis de *A. mellifera* o teor de água varia de 15% a 20%, contudo, essa faixa não contempla o mel de ASF que podem apresentam umidade de 20% a 45%, a depender de fatores edafoclimático. Além disso, o teor de água presente na amostra, influencia diretamente em características secundárias como: sabor, cristalização, viscosidade, conservação e vida útil do produto. O período de coleta, origem floral, grau de maturação da colmeia e fatores climáticos influenciam diretamente no teor aquoso em amostras de mel [6], [9].

O mel é uma mistura majoritariamente composta por açúcares, principalmente os monossacarídeos redutores (frutose e glicose), equivalente a aproximadamente 85% de sua matéria seca. A frutose, caracterizada pela elevada higroscopicidade é responsável pelo sabor adocicado, enquanto a

glicose, determina a tendência de cristalização. O teor de açucares presentes no mel influencia diretamente na sua densidade, viscosidade, atividade antimicrobiana e valor energético [5], [10].

O teor de cinzas está relacionado a concentrações de minerais presentes no mel e pode variar de acordo com fatores como, a origem botânica da flor visitada, meio ambiente, além das condições de obtenção, produção e processamento final do mel. Através do teor de cinzas é possível conjecturar irregularidades no mel, como falta de higiene, a não decantação e/ou filtração no final do processo de retirada do mel pelo produtor [11].

Fatores externos como o clima, manipulação, região e período de coleta também interferem no teor de cinzas, que por sua vez, está fortemente correlato a coloração do mel. Quanto mais escuro for, maior a quantidade de cinzas e de minerais, quando comparados a méis de coloração mais clara [5], [10].

A cor é o primeiro parâmetro de seleção do mel para o consumidor, tornando-se, em alguns casos, pré-requisito para aquisição do produto. A coloração do mel está sujeita, assim como outras características, a diversas variáveis desde fatores externos como clima da região, manejo do produtor, origem floral até níveis de monossacarídeos e teor de cinzas. As classificações atribuídas a coloração do mel podem ser: branco água, extra branco, branco, âmbar extra claro, Âmbar claro, âmbar e âmbar escuro [5], [6], [12].

1.2 – OBJETIVO

O presente capítulo visa apresentar a avaliação dos parâmetros físico-químicos para amostras de mel de *Tetragonisca angustula* (Jataí), obtidos na fazenda Faz Faustino, zona rural do município de Rio Antônio – BA, Brasil, sudoeste baiano, em período seco e úmido.

1.3 - MATERIAL E MÉTODOS

1.3.1- Coleta das amostras

Os méis de abelha *T. angustula* foram obtidos de meliponicultores na fazenda Faz Faustino, zona rural do município de Rio Antônio, Bahia, Brasil (14º21’28.36”S 42º00’01.48”O) (**FIGURA1**). As amostras foram coletadas nas diferentes ocasiões climáticas: período seco de longa estiagem, 8 meses com escassez de água (de março a início de outubro/2018) e período úmido, após 3 meses de chuva (de novembro a início de fevereiro/2019), distinguindo assim, quanto ao período de produção (**FIGURA 2**). Após coleta, as amostras foram armazenadas sob refrigeração a 4 ºC, até posterior análises.

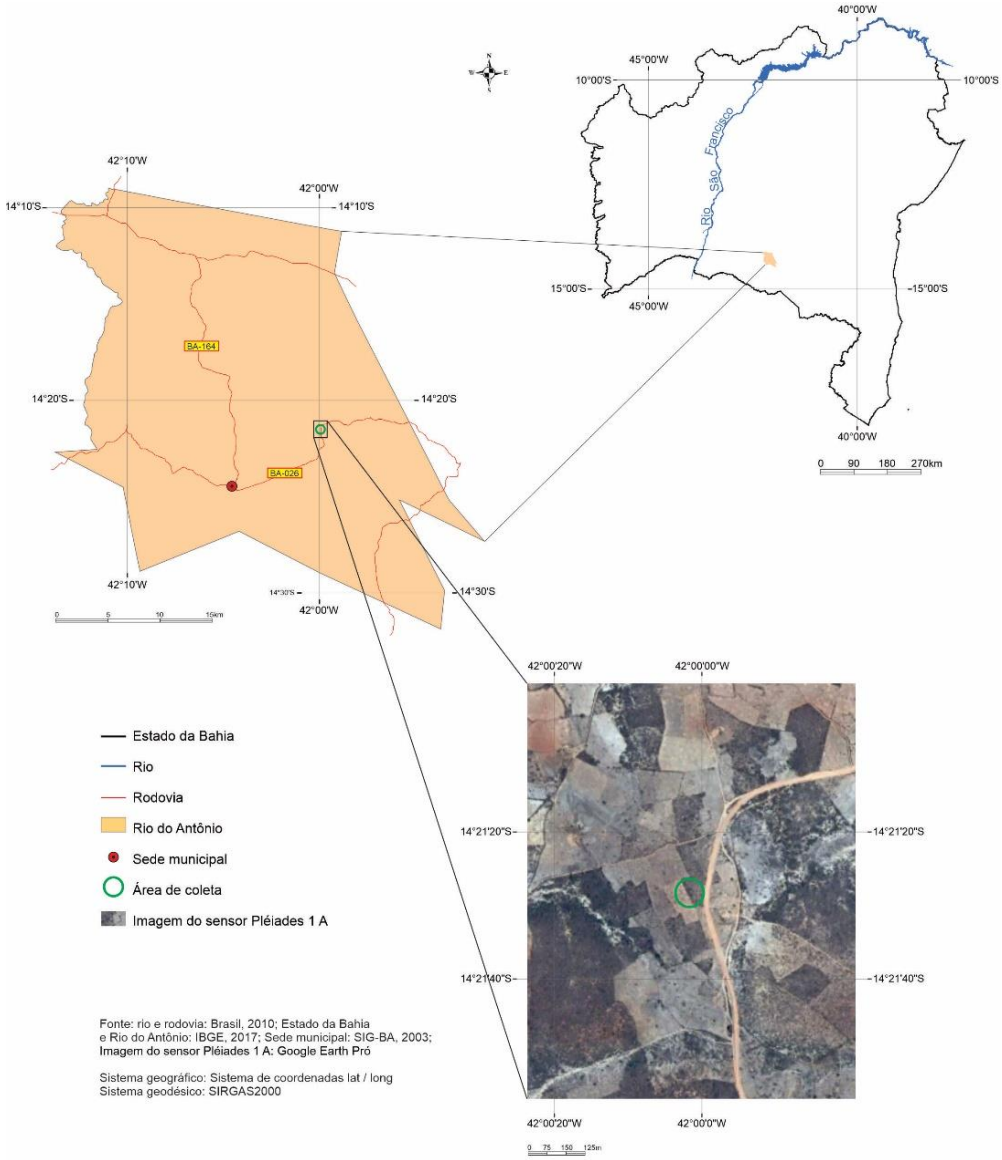


FIGURA 1. Área de coleta das amostras de mel na representação do mapa baiano

FONTE: Autor, 2020

FIGURA 2. Mel coletado no período seco e mel coletado no período úmido, respectivamente

FONTE: AUTOR, 2019

1.3.2 - Parâmetros físico-químicos

Os parâmetros físico-químicos foram avaliados em parceria com o Laboratório de Físico-Química, na Universidade Estadual de Feira de Santana – UEFS, seguindo os parâmetros determinados pelo Instituto Adolfo Lutz e o Laboratório Nacional de Referência Animal (INSTITUITO ADOLFO LUTZ, 2008; LANARA), em triplicata e com modificações. As amostras utilizadas para as realizações das análises foram dos méis coletado em período seco e úmido, porém, em virtude da baixa disponibilidade de material em ambos períodos, adaptações proporcionais foram realizadas nas metodologias permitindo a realização das análises.

- **pH**

Os valores de pH foram medidos através do pHmetros digital Digimed (modelo DM-22) que foi previamente calibrado. A análise da solução de mel foi realizada conforme condições metodológicas estabelecidas pelo INSTITUTO ADOLFO LUTZ com modificações, para tanto, uma solução de mel, com concentração de 0,13 $g.mL^{-1}$ (m/v) foi preparada a partir de 2 g de mel em 15 mL de água destilada (**FIGURA 3**).

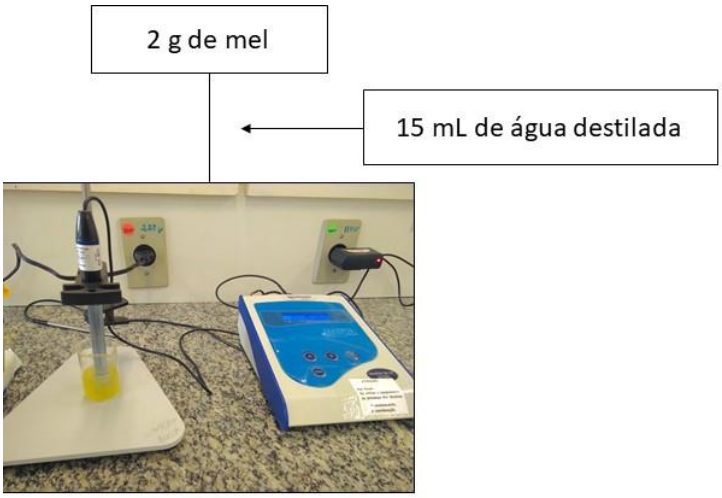


Figura 3. Esquema de determinação do pH no mel

Fonte: Autor, 2019

- **Acidez Total**

A solução de mel foi titulada com uma solução padronizada de hidróxido de sódio a 0,1 mol.L^{-1}, até que alcançasse o pH 8,3, sendo registrado o volume (V_b) de NaOH, gasto na titulação. A **FIGURA 4** apresenta o sistema de determinação da acidez total [13].

FIGURA 4. Sistema de determinação do teor de acidez total
Fonte: Autor, 2019

A acidez em mEq.Kg^{-1} do mel foi calculado pela EQUAÇÃO (1):

$$acidez = \frac{\mathrm{Vb} * M * 1000}{p} \qquad \text{Equação (1)}$$

Onde:

V_b – Volume de hidróxido de sódio gasto ao final da titulação

M – Concentração molar da base

P – Peso do mel utilizado na solução

- **Umidade**

A medição da umidade foi realizada diretamente para uma amostra de mel, sem diluição, através do refratômetro de Abbe (luz natural e temperatura ambiente). As medidas são condicionadas a temperaturas de 20º C, caso as análises sejam feitas em temperaturas diferentes, é necessário corrigir utilizando o fator de correção 0,00023 por ºC, somando, para temperaturas superiores ou subtraindo para temperaturas inferiores. O percentual em umidade foi calculado pela conversão do valor do índice de refração corrigido, utilizando a tabela de Chataway. Em refratômetros que expressem o valor de º Brix, é necessário converter o valor expresso para índice de refração. O esquema demonstrativo para determinação da umidade encontra-se na **FIGURA 5** [14].

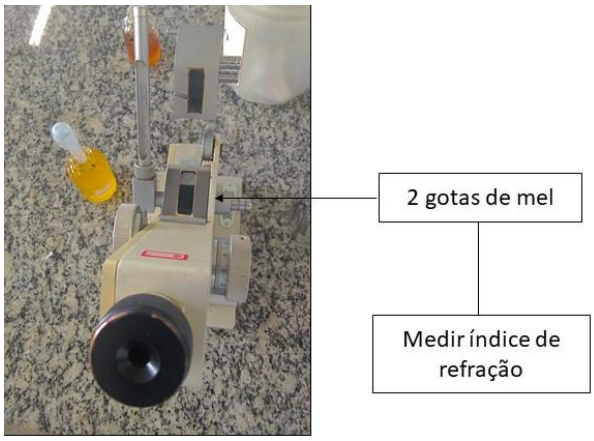


FIGURA 5. Esquema demonstrativo para determinação da umidade

Fonte: Autor, 2019

- **Açúcares Redutores**

O teor de açucares redutores foi determinado a partir de duas etapas:

1ª etapa: Preparo e padronização das soluções de Fehling A e Fehling B – A solução de Fehling A (0,070 $g.mL^{-1}$) consistiu em 250 mL de uma solução aquosa

de sulfato de cobre penta hidratado. Enquanto a de Fehling B (0,35 g.mL^{-1}) de 250 mL uma solução aquosa de tartarato de sódio e potássio.

Na padronização das soluções de Fehling, alíquotas de 10 mL das soluções de Fehling A e Fehling B, 50 mL de água destilada e duas gotas do indicador azul de metileno (1%), foram misturados em Erlenmeyer, sob aquecimento, e titulada com uma solução aquosa de glicose (0,5 g de glicose/ 100 mL de água). O tempo total da titulação não deveria ultrapassar 3 minutos. Com esses dados foi possível determinar o título da solução (**EQUAÇÃO 2**) e o esquema representativo da padronização das soluções A e B é expresso na **FIGURA 6**.

$$T = \frac{Vglicose * mglicose}{100} \qquad \text{Equação (2)}$$

Onde:

$V_{glicose}$ – Volume da solução (mL) de glicose utilizado na titulação;

$m_{glicose}$ – massa de glicose (g) utilizada no preparo da solução

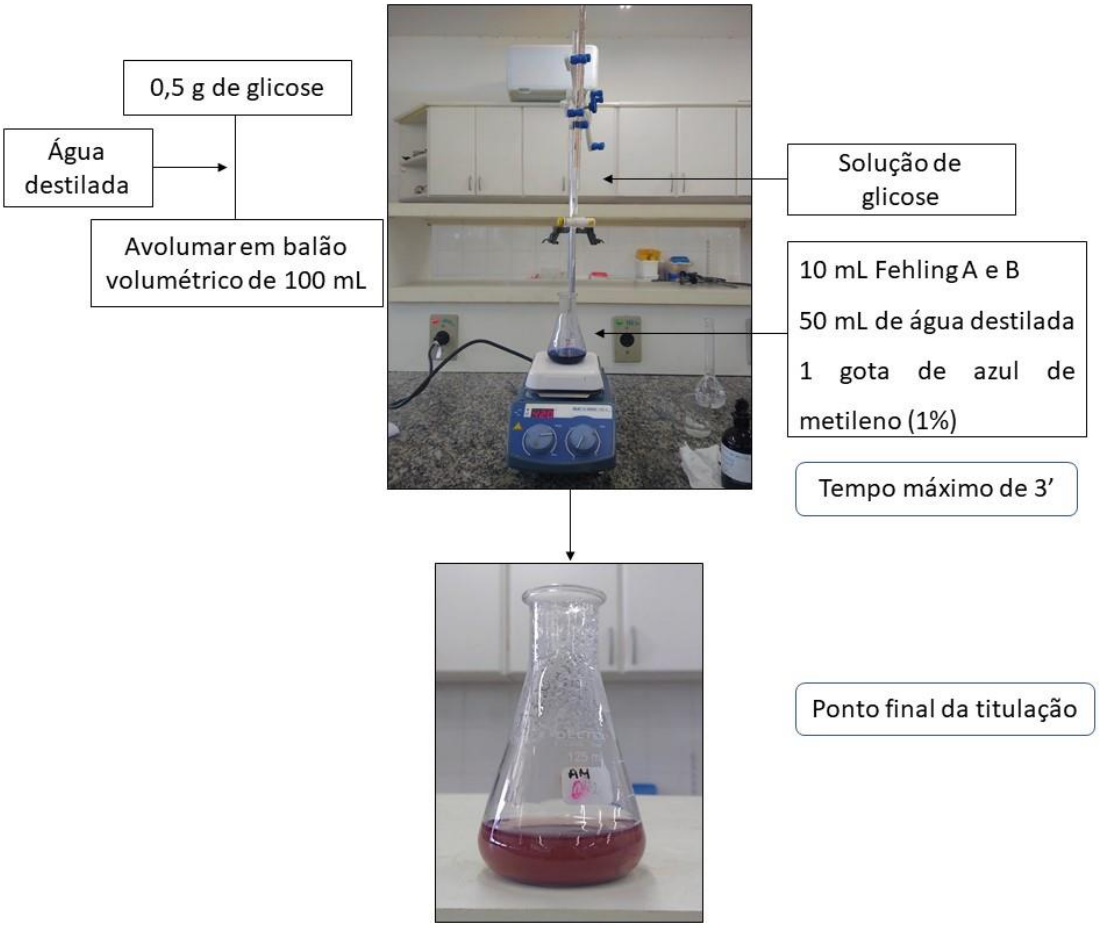


Figura 6. Esquema representativo da padronização das soluções de Fehling A e B por titilação

2ª etapa: Determinação do teor de açucares redutores – A determinação dos açucares redutores presentes no mel consistiu em titulação volumétrica com a solução de mel. Para tanto, as etapas esquematizadas na **FIGURA 6** foram adotadas, substituindo a solução de glicose pela solução de mel. Tal solução foi preparada a partir de 1 g de mel diluído em 50 mL de água destilada [14].

O percentual de açucares redutores pode ser determinado através da Equação 3:

$$Açucares\ reduores\ \% = \frac{100 * A * T}{P * V} \qquad \text{Equação (3)}$$

Onde:

A – Volume da bureta
T – Título da solução
P – Massa de mel
V – Volume gasto do titulante

- **Teor de cinzas**

Em cadinho de porcelana com massa previamente determinada, foi pesado 1 g de mel. Em seguida, o cadinho foi aquecido, até completa remoção da água. Logo após, foi realizada a calcinação na mufla a 550ºC por 4 horas. Por fim, as cinzas remanescentes no cadinho foram pesadas e o teor expresso em g/100 g de mel foi encontrado a partir da Equação (4). O esquema representando a determinação de cinzas no mel está expresso na **FIGURA 7**.

$$Cinzas\ \% = \frac{100 * N}{P} \qquad \text{Equação (4)}$$

Onde:

N – massa de cinzas em gramas
P – massa da amostra

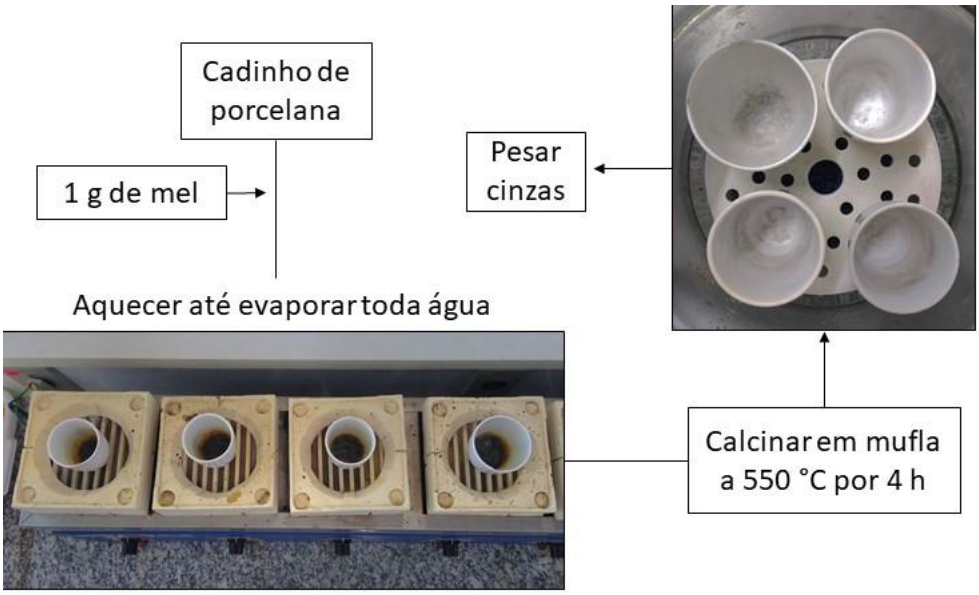


Figura 7. Representação esquemática para determinar o teor de cinzas presente no mel

Fonte: Autor, 2019

- **Cor**

O método para determinar a coloração do mel foi baseado nos diferentes graus de absorção da luz, em diversos comprimento de onda, através do espectrofotômetro UV-Vis à 635 nm. O mel foi diluído em 50% (v/v) de água destilada, homogeneizado, centrifugado à 4000 rpm (5 min) e filtrado com algodão. A absorbância (Abs) foi determinada e o valor obtido foi convertido usando a EQUAÇÃO 5 e classificado conforme a escala de Pfund, para determinar a intensidade da cor (**TABELA 2**) [15]–[17].

$$mmPfund = -38{,}70 + 371{,}39 * ABS \qquad \text{Equação (5)}$$

TABELA 2. Classificação da cor a partir da escala mm Pfund e a faixa de absorbância

Mel	mm Pfund	Absorbância (nm)
Branco água	0 – 8	0,104 – 0,125
Extra branco	8 – 16,5	0,125 – 0,148
Branco	16,5 – 34	0,148 – 0,195
Âmbar extra claro	34 – 50	0,195 – 0,238
Âmbar claro	50 – 85	0,238 – 0,333
Âmbar	85 – 114	0,333 – 0,411
Escuro	Mais de 114	0,411 ou mais

1.4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os parâmetros físico-químicos de méis de abelha *T. angustula,* coletados em outubro de 2018 (período seco) e fevereiro de 2019 (período úmido) foram avaliados, visando observar possíveis diferenças entre estes, nos diferentes períodos do ano. Os resultados obtidos foram comparados a outros disponíveis na literatura para méis da mesma espécie de ASF, a fim de compreender as variáveis existentes, dependentes dos distintos fatores regionais. Os parâmetros físico-químico como: pH, acidez ($mEq.Kg^{-1}$), açúcares redutores (%), umidade (%), cinzas (%) e coloração foram avaliados e os resultados estão expressos na **TABELA 3**.

TABELA 3. Parâmetros físico-químico do mel, calculados para as amostras do mel de *T. angustula* no período seco (MPS) e mel no período úmido (MPU)

Parâmetros	MPS	MPU
pH	3,62	4,14
Acidez ($mEq.Kg^{-1}$)	97,13	69,79
Açúcares redutores (%)	35,45	30,69
Umidade (%)	24,40	27,89
Cinzas (%)	0,4050	0,2247
Cor (Pfund)	145 - escuro	103 – âmbar

Fonte: Autor, 2020

Nos resultados apresentados é observado que, o MPS possui pH menor (pH = 3,62) que o MPU (pH = 4,14). As diferenças entre os valores de pH são estatisticamente significativas, ressaltando ainda que se trata de valores expressos em escala logarítmica. Segundo CRANE (1985), a composição florística da região de colheita, bem como as condições do solo e a disposição dos pólens florais são fatores que estão diretamente conectados ao pH do mel. Considerando esses fatores, é possível justificar a diferença no pH dos méis do período seco e úmido, visto que, no semiárido baiano, as plantas apresentam grande resistência a estresse hídrico decorrente do período de estiagem, o que possibilita o aumento na concentração de compostos ácidos e redução na diversidade química em sua composição. É possível observar que, no período úmido a diversidade e oferta de flores seja muito superior ao do período seco,

consequentemente, mais classes de constituintes compõem o mel favorecendo o aumento do pH [6], [18].

Nas bases bibliográficas, consultadas para a construção deste trabalho, não foram encontrados estudos dos parâmetros físico-químicos para o mel de *T. angustula,* baseados nos períodos climáticos da mesma região nordeste do Brasil. Contudo, os resultados obtidos para os dois períodos em análise encontram-se dentro da faixa de variação de pH (3,72 a 4,77 ± 0,44), conforme compilação realizada por Ávila *et al*., 2018. Embora a legislação brasileira não possua nenhuma recomendação de padronização de pH para mel de ASF, os valores encontrados para esse parâmetro encontram-se de acordo com os padrões nacional para mel de *Apis* [18]–[20].

A acidez também apresentou diferença significativa entre os MPU (69,79 $mEq.Kg^{-1}$) e MPS (97,13 $mEq.Kg^{-1}$), sendo o MPS mais ácido. Corroborando com a informação do pH encontado, onde MPS apresenta menor pH, consequentemente maior acidez. Segundo ÁVILA et al., 2018, o mel da espécie *T. angustula* apresenta teores de acidez entre 27,00 a 79,00 (± 18,04) $mEq.Kg^{-1}$. OLIVEIRA, *et al*, 2013 determina a acidez em 69,06 $mEq.Kg^{-1}$ para mel de *T. angustula*. VILLAS-BÔAS & MALASPINA, 2005 estabelece máximo de 85 $mEq.Kg^{-1}$ de acidez para o mel de ASF e MONTENEGRO, 2018 para méis de *T. angustula* do Paraná e Rondônia determina 55,79 $mEq.Kg^{-1}$ e 66,67 $mEq.Kg^{-1}$, respectivamente. Outras espécies de ASF podem produzir méis com acidez que ultrapassam os valores encontrados para *T. angustula* chegando até a 528 $mEq.Kg^{-1}$ para *Homotrigona fimbriata* [21]. Tais observações apontam que os resultados encontrados para o pH e acidez do mel de *T. angustula*, na região sudoeste da Bahia, encontram-se nas mesmas faixas observadas em outras regiões do Brasil.

O teor de açúcares redutores encontrados para MPS (35,45%) e MPU (30,69%) apresentaram diferença significativa entre eles. Ambos resultados, encontram-se em uma faixa de valor abaixo daqueles observados em estudos anteriores para méis de *T. angustula*. ÁVILA *et al*., 2018 relata variação nos teores de açúcares redutores de 43,00 a 66,75% para méis de jataí. MONTENEGRO, 2018, determinou percentual de 58,89 a 64,70% para méis da

mesma espécie. Outros estudos apresentam a mesma faixa de percentual de açúcares redutores da *T. angustula* [4], [22], [23].

Um fator diferencial entre méis de abelha africanizadas e nativas é o teor de açucares redutores pois, comumente, as espécies de ASF exibem menor teor de açúcares, estando abaixo do mínimo estabelecido pela legislação brasileira (65,00%), muito embora apresente sabor mais adocicado. Isto porque a frutose é responsável por essa característica e seu teor pode predominar na composição do mel. VILLAS-BÔAS E MALASPINA, 2005, em inúmeros estudos com meliponíneas, preconizam valor máximo de 50% para essas espécies [24], [25].

Os valores médios de umidade diferiram significativamente entre MPS (24,40%) e MPU (27,89%). Segundo os dados climatológicos fornecidos pelo BDMEP – INMET (Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa do Instituto Nacional de Meteorologia) o valor médio de precipitação total referente ao período seco (março a outubro de 2018) foi 23,78 mm e o período úmido (novembro a fevereiro de 2019) foi de 91,10 mm, constatando ampla variação de umidade entre os dois períodos. O curto período chuvoso, porém, com elevada incidência pluviométrica, resultou no aumento considerável no percentual de água no mel do período úmido.

Apesar da legislação brasileira entender como aceitável o teor máximo de 20% para umidade de méis de *Apis*, nenhum estudo com meliponíneas, relatado até então, obtiveram resultados dentro desse parâmetro. Na compilação de ÁVILA *et al*., 2018, o valor mínimo encontrado foi de 23,20% (méis argentinos) e máximo de 26,60% (méis brasileiros). ANACLETO *et al*., 2009, estudando também abelhas jataí, encontrou valor máximo de 32,50% de umidade.

O percentual de água é uma característica extremamente importante no mel, pois influencia no processo de conservação do produto, visto que microrganismos estão propícios a se propagarem e sobreviverem por longos períodos em ambientes úmidos. O sabor e a cristalização também podem ser afetados pela quantidade de água presente no mel. RAMÓN-SIERRA *et al*., 2015, propõe que ambiente tropicais, frutos maduros e a espécie de abelha afeta no teor de umidade do produto pois, mesmo cultivados no mesmo ambiente, o

teor de umidade do mel de *A. mellifera* é inferior ao de meliponíneas [4], [22], [24].

O teor de cinzas variou de MPS (0,40%) para MPU (0,22%), sendo considerado uma variação estatisticamente significativa. SOUZA *et al*., 2019 estudando abelhas jataí encontrou valor médio de 0,20% em cinzas de mel cultivado no paraná. OLIVEIRA *et al*., 2013, apresentou resultado com teor de cinzas de 0,36%, também para mel de abelhas *T. angustula*. Anacleto, *et al*., 2009, determinou valores entre 0,21 e 0,60% em méis de abelha da mesma espécie e em compilação, ÁVILA *et al*., 2018, registra amplitude de 0,21% a 0,39% para cinzas do mel da mesma espécie. É possível verificar ampla faixa de variação do teor de cinzas, no entanto, as referências consultadas não especificam o período de coleta do mel, fator que poderia auxiliar na interpretação dos resultados, já que o teor de cinzas está relacionado com a colocação e fatores externos que contribuem com a variação desse parâmetro nas amostras de mel [4], [6], [23],[26].

Segundo a legislação brasileira, o teor máximo de cinzas aceitável em mel de *Apis* é 0,60%, logo, os resultados encontrados neste estudo estão dentro dos parâmetros de qualidade estabelecidos, assim como os demais estudos referenciados. O percentual de cinzas é um dos parâmetros de qualidade que o valor de referência determinado pela norma vigente atende tanto a abelhas com ferrão quanto as ASF. Sugere-se que o teor de cinzas no mel seja influenciado por fatores como as práticas de coleta dos meliponicultores, processos de separação (decantação e/ou filtração) nas etapas finais; a origem botânica; a procedência geográfica do mel e a coloração, pois, na maioria das vezes, quanto mais escuro o mel, maior percentual de cinzas ele terá [22]–[24], [26].

A coloração foi distinta entre a amostra de MPS que apresentou média de ABS de 0,4946 nm (±0,0036), sendo classificado dentro da faixa superior a 114 na escala mm Pfund, considerado de coloração escura. O MPU apresentou média de ABS 0,3823 nm (±0,0028), 103 na escala mm Pfund, classificado como âmbar. Dessa forma, torna-se evidente perfil colorífico diferente para méis produzidos e coletados no período seco e período úmido.

MONTENEGRO, 2018, em estudos com mel de *T. angustula* encontrou valores de absorbância superiores (0,58 a 0,65 nm) aos determinados neste trabalho. NASCIMENTO, 2014, em estudos com jataí de diferentes regiões destacou variação na coloração do mel, onde amostras oriundas do estado do Paraná, na cidade de Cornélio Procópio, apresentou média de 0,520 nm, Guaraqueçaba 0,302 nm e Bandeirantes 1,020 nm, em Icém no estado de São Paulo 0,536 nm e Mafra / Santa Catarina 0,820 nm.

Nota-se com estudos anteriores e os resultados encontrados nesta pesquisa que a cor do mel é decorrente da sua composição e local de origem, não apresentando padrão específico para a espécie de abelha em questão. Outros estudos mostram que os méis escuros podem ter quatro vezes mais sais minerais que os claros e geralmente são eles os de maior teor de açucares redutores. Além disso, a origem floral, a presença de grão de pólen e o teor de fenólicos e flavonoides também podem influenciar diretamente a coloração do mel [11], [17], [26].

1.5- CONCLUSÃO

As relações que podem ser evidenciadas no presente trabalho apontam que, o MPS apresenta a coloração mais escura, maior teor de cinzas, de açúcares redutores e acidez, com menor teor de umidade em comparação MPU. Variações que são justificáveis pelas características muito distintas de clima, umidade, disponibilidade e variabilidade de flores nos períodos seco e úmido da região sudoeste do Bahia. Porém, ambas amostras apresentam os parâmetros físico-químicos incluídos nas faixas apresentadas para méis de ASF registradas no Brasil e em outros país.

A legislação brasileira define os padrões para o mel de abelha *Apis*, estabelecendo os requisitos mínimos de qualidade que o mel destinado ao consumo deve possuir, porém estes não são aplicáveis para o controle de qualidade e identidade dos méis de abelhas sem ferrão. Os resultados deste trabalho reforçam a necessidade de que a legislação brasileira deve estipular valores para parâmetros que atendam as características específicas das abelhas sem ferrão, visto que, os parâmetros aceitos atualmente foram estabelecidos a partir dos produtos de *Apis mellifera* e muitos deles não se enquadram nos limites estipulados.

1.6- REFERÊNCIAS

[1] EDELKY, W. *et al.* Parâmetros físico-químicos do mel de abelha sem ferrão (melipona subnitida) após tratamento térmico. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 4, n.3, p. 153–157, 2010.

[2] MAPA. Serviço Público Federal Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Secretaria de Defesa Agropecuária. 2004. Disponível em: <www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 10 mar. 2020.

[3] CONSTITUIÇÃO FEDERAL. DECRETO Nº 9.013, DE 29 DE MARÇO DE 2017 Regulamenta. **ABA Journal**, v. 102, n. 4, p. 24–25, 2017.

[4] ÁVILA, S.; BEUX, M. R.; RIBANI, R. H.; ZAMBIAZI, R. C. Stingless bee honey: Quality parameters, bioactive compounds, health-promotion properties and modification detection strategies. **Trends in Food Science and Technology**, v. 81, n. September, p. 37–50, 2018.

[5] MONTENEGRO, H. R. **Comparação das características físico-químicas e antioxidantes do mel de *tetragonisca angustula* (*latreille, 1811*) coletado nos estados do paraná e rondônia**. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2018.

[6] CARVALHO, C. A. L. *et al*. **Mel de abelhas sem ferrão: contribuição para a caracterização físico-química**.January, 2005.

[7] SANCHO, M. T. *et al.*, Critical assessment of antioxidant-related parameters of honey, ***Int. J. Food Science Technol***., vol. 51, no. 1, pp. 30–36, 2016.

[8] PÉRICO, E.; SHIOJI TIUMAN, T.; LAWICH, M. C.; KRUGER, R. L. Avaliação Microbiológica e Físico-química de Méis Comercializados no Município de Toledo, Pr. **Journal of Pediatrics**, v. 13, n. 3, p. 365–382, 2011.

[9] PERSANO O. L.; PIRO, R. Main European unifloral honeys: descriptive sheets. **Apidologie**, v. 35, n. Suppl. 1, p. S38–S81, 2004.

[10] VÉRAS, S. O. **Parâmetros de diferenciação dos méis dos principais**

grupos de abelhas criadas para a produção de mel na Bahia. Dissertação (mestrado em Defesa Agropecuária) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2012.

[11] EVANGELISTA-RODRIGUES, A.; SILVA, E. M. S. Da; BESERRA, E. M. F.; RODRIGUES, M. L. Análise físico-química dos méis das abelhas Apis mellifera e Melipona scutellaris produzidos em regiões distintas no Estado da Paraíba. **Ciência Rural**, v. 35, n. 5, p. 1166–1171, 2005.

[12] VILLAS-BÔAS, J. **Manual Tecnológico Mel de Abelhas sem Ferrão**. 2012.

[13] YÜCEL, Y.; SULTANOĞLU, P. Characterization of honeys from Hatay Region by their physicochemical properties combined with chemometrics. **Food Bioscience**, v. 1, p. 16–25, 2013.

[14] ZENEBON, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos - Secretaria da Saúde - Governo do Estado de São Paulo**. Disponível em: <http://www.ial.sp.gov.br/ial/publicacoes/livros/metodos-fisico-quimicos-para-analise-de-alimentos>. Acesso em: 14 mar. 2020.

[15] 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, n. 1, p. 10–18, 2013.

[16] COSTA, A. S. *et al*. Levantamento dos estudos realizados com a própolis produzida no estado da Bahia. **SITIENTIBUS série Ciências Biológicas**, v. 13, n. Bittencourt 2008, p. 1–7, 2013.

[17] BALTRUŠAITYTE, V.; VENSKUTONIS, P. R.; ČEKSTERYTE, V. Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts. **Food Chemistry**, v. 101, n. 2, p. 502–514, 2007.

[18] NASCIMENTO, A. *et al*. Physical-Chemical Parameters of Honey of Stingless Bee (Hymenoptera: Apidae). **American Chemical Science Journal**, v. 7, n. 3, p. 139–149, 2015.

[19] 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.

[20] SUNTIPARAPOP, K.; PRAPAIPONG, P.; CHANTAWANNAKUL, P. Chemical and biological properties of honey from Thai stingless bee (Tetragonula leaviceps). **Journal of Apicultural Research**, v. 51, n. 1, p. 45–52, 2012.

[21] ÁVILA, S. *et al.* Bioactive compounds and biological properties of Brazilian stingless bee honey have a strong relationship with the pollen floral origin. **Food Research International**, v. 123, p. 1–10, 2019.

[22] ANACLETO, D. de A.; SOUZA, B. de A.; MARCHINI, L. C.; MORETI, A. C. de C. C. Composição de amostras de mel de abelha Jataí (Tetragonisca angustula latreille, 1811). **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 3, p. 535–541, 2009.

[23] OLIVEIRA, K. A. M.; RIBEIRO, L. S.; OLIVEIRA, G. V. Caracterização microbiológica, físico-química e microscópica de mel de abelhas canudo (*scaptotrigona depilis*) e jataí (*Tetragonisca angustula*). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 15, n. 3, p. 239–248, 2013.

[24] MONTENEGRO, S.; AVALLONE, C.; CRAZOV, A.; AZTARBE, M. Variación del color en miel de abejas (Apis mellifera).p. 1–3, 2005.

[25] OLIVEIRA, A. F. De; STORTO, L. J.; LOPES, A. E. P.; DIAS, L. F. Caracterização físico-química do mel da abelha Jataí (*Tetragonisca angustula*). **Tópicos em Ciências e Tecnologia de Alimentos: Resultados de Pesquisas Acadêmicas - Vol. 3**, p. 2715–2729, 2017.

[26] SOUZA, T. H. De; LOPES, A. E. P.; PEDRÃO, M. R.; DIAS, L. F. Caracterização físico-química do mel da abelha jataí (*Tetragonisca angustula*). **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 13, n. 1, 2019.

CAPÍTULO II

TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS E FLAVONOIDES EM AMOSTRA DE MEL DE *Tetragonisca angustula* (Jataí)

2.1 – INTRODUÇÃO

O mel é um dos mais renomados alimentos naturais e o principal produto oriundo de abelhas. Em princípio, o mel poderia ser definido como uma solução aquosa supersaturada em açúcar (principalmente frutose e glucose), mas sua composição química é muito mais complexa e variada, o que depende de fatores externos, tanto geográficos, quanto botânicos. A crescente evidência do mel como produto potencialmente utilizado para fins medicinais, tais como anti-inflamatório, antioxidante e antimicrobiano vem aumentando o interesse de indústrias farmacêuticas, cosmética e alimentícia. Em consequência disso, pesquisadores de diversos ramos da ciência, em todo o mundo, intensificam e aprimoram estudos acerca da constituição química e os fatores que estão ligados a modificação da composição desse produto [1].

Os antioxidantes atuam no controle dos efeitos nocivos dos processos oxidativos, impedindo ou diminuindo a formação dos radicais livres e os compostos fenólicos possuem grande potencial de ação antioxidante. Atualmente o interesse no estudo dos compostos fenólicos tem aumentado, devido principalmente à habilidade antioxidante destas substâncias, em agir como sequestrador de radicais livres. Estima-se que a propriedade antioxidante do mel está relacionada a composição química deste produto, tal quais, ácidos fenólicos, flavonoides, flavonas, vitaminas, substâncias do tipo carotenoides, aminoácidos, proteínas, ácidos orgânicos e enzimas (glicose oxidase e catalase). Contudo, o resultado dessa composição depende integralmente de fatores externos que cumprem uma função fundamental em sua constituição. A localização geográfica, plantas poliníferas disponível para a polinização e espécie de abelha podem ser destacados como principais fatores [2]–[4].

Os principais compostos fenólicos e flavonoides presente no mel relatados em trabalhos científicos incluem o ácido elágico, ácido gálico, ácido benzóico, ácido ferúlico, miricetina, ácido clorogênico, hesperetina, crisina, quercetina, luteolina, kaempferol e os classificados como ácidos hidroxicinâmicos (ácido cafeico, ácido cinâmico, 2-hidroxicinâmico e *p*-cumárico) [2], [3], [5]–[7].

Trabalhos comparativos entre amostras de méis de abelhas africanizadas e abelhas nativas (ASF) apontam que, nesta última, encontra-se um maior teor de polifenóis. Possivelmente, o pequeno porte das ASF viabiliza a polinização em flores de diversos tamanhos, aumentando a diversidade de pólen floral e, consequentemente, mais constituintes secundários distintos serão incrementados ao mel [3], [4], [8].

Os métodos espectrofotométricos são aplicados com sucesso, na determinação de compostos fenólicos e potencial antioxidante em amostras naturais, devido a facilidade operacional e rapidez no fornecimento de dados quantitativos e qualitativos. Técnicas cromatográficas também se destacam no estudo de amostras de mel, podendo ser aplicadas na quantificação e identificação da composição química, permitindo assegurar a qualidade e possíveis adulterações no produto. Para tanto, são aplicadas as técnicas de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em fase reversa (CLAE) com distintos detectores, Ultravioleta (CLAE-UV), conjunto de fotodiodo (CLAE-DAD) e Espectrometria de Massas (CLAE-EM) [9], [10].

Ainda são raros os trabalhos acadêmicos que relatam o teor de compostos fenólicos em mel de abelha *T. angustula*. Roós *et al*., 2018, determinou o teor de fenólicos e flavonoides do mel de abelhas jataí da região do Rio Grande do Sul e constatou concentrações de fenólicos variando entre 259,0 a 289,9 $mEAG.Kg^{-1}$, e para flavonoides 48,5 a 57,5 $mEQ.Kg^{-1}$ [11].

ÁVILA *et al*., 2018, em revisão bibliográfica reuniu informações de trinta e duas amostras de abelha sem ferrão brasileiras, incluindo abelha jataí, onde o conteúdo dos fenólicos totais variou de 220,4 a 708,1 $mgEAG.Kg^{-1}$. Os resultados evidenciam a elevada quantidade de compostos fenólicos, entretanto, com significativa variância de 103 a 980 $mgEAG.Kg^{-1}$. A variação no teor de compostos polifenóis é dependente da ampla gama de fatores, desde a espécie de abelha sem ferrão em análise até as condições climáticas do ambiente [4], [12], [13].

Apesar de poucos trabalhos científicos com méis da ASF, os valores expressos na literatura até então, indicam valores semelhante entre o teor de fenólico para AFS comparados aos resultados de *A. melífera,* o que classifica o

mel destas abelhas como um produto promissor especialmente no ramo da saúde [2], [12], [14].

2.2 – OBJETIVOS

O presente capítulo visa apresentar a avaliação dos teores de compostos fenólicos e flavonoides totais em amostras de méis de *Tetragonisca angustula*, obtidos na Fazenda Faz Faustino, município de Rio Antônio, sudoeste baiano, em períodos seco e úmido.

2.3 - MATERIAL E METODOS

Uma solução estoque de mel de *T. angustula,* de cada período (seco e úmido) foi preparada a uma concentração de 0,1 $g.mL^{-1}$, as quais foram utilizadas para determinar o teor de fenólicos totais e flavonoides.

2.3.1 - Determinação dos fenólicos totais

O método colorimétrico com reagente de Folin-Ciocalteu foi utilizado para determinação dos fenólicos. No tubo de ensaio, foi misturada uma alíquota de 0,5 mL da solução estoque de mel, 0,3 mL de reagente de Folin-Ciocalteu, 2 mL da solução de carbonato de sódio (15%) e 2,2 mL de água destilada. Em seguida, o sistema foi incubado por 2 h e realizado a leitura da absorbância em espectrofotômetro à 798 nm. O branco foi preparado a partir da substituição da solução estoque de mel por água destilada. O ácido gálico, marca Sigma, foi utilizado como padrão, nas concentrações de 0,02; 0,025; 0,05;0,1; 0,15 e 0,2 $mg.L^{-1}$ para construir a curva analítica. A partir da equação da reta obtida na curva do gráfico do padrão ácido gálico (**FIGURA 1 E EQUAÇÃO 1**), foi calculado o teor de fenólicos totais, expresso em mg equivalentes de ácido gálico por kg de mel ($mgEAG.Kg^{-1}$) [15], [16].

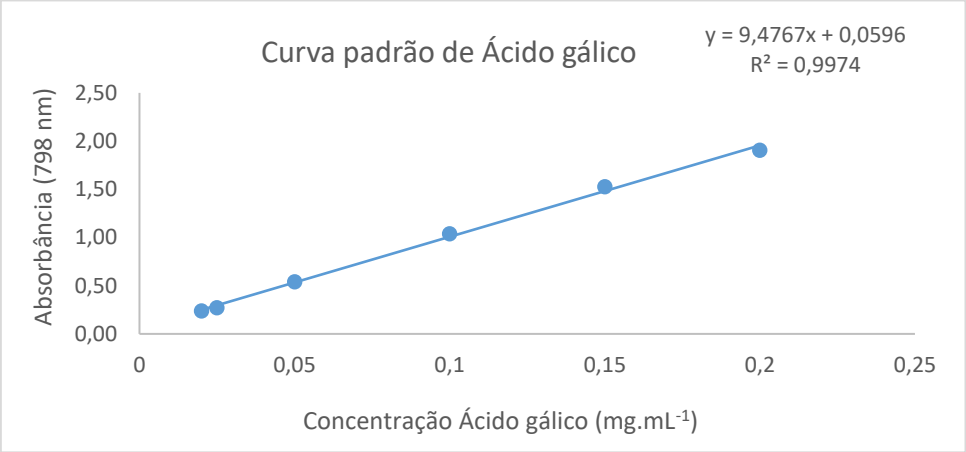


FIGURA 1**.** Curva analítica de ácido gálico

$$Y = 9,4767x + 0,0596 \qquad \text{Equação} \quad (1)$$

Onde:

y = absorbância a 798 nm;

x = teor de fenólicos totais (mgEAG.Kg^{-1})

2.3.2 - Determinação dos flavonoides totais

A determinação da concentração de flavonoides presentes na amostra de mel foi realizada por método espectrofotométrico, utilizando o reagente de cloreto de alumínio (5%), e os resultados foram expressos em mg de quercetina por kg de mel (mgEQ.Kg^{-1}). Em um tubo de ensaio foram adicionados 2 mL da solução estoque de mel e 3 mL de cloreto de alumínio (5%), seguindo de incubação por 30 minutos. Após esse período, foi realizada a leitura da absorbância a 437 nm. O branco foi preparado substituindo a solução de mel por metanol. A quercetina, marca Sigma, foi utilizada como padrão nas concentrações de 0,008; 0,01; 0,02; 0,025 e 0,05 mg.mL^{-1}, para a construção da curva analítica e a partir da equação da reta obtida na curva do gráfico do padrão quercetina (**FIGURA 2 e EQUAÇÃO 2)**, foram determinados os flavonoides totais da amostra [16].

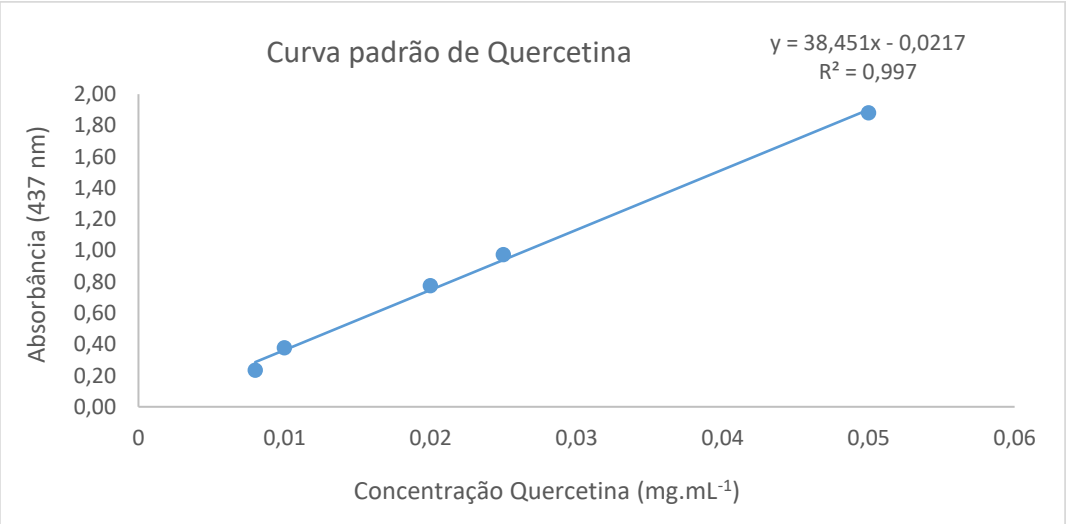


FIGURA 2. Curva analítica de quercetina

$$y = 38{,}451x - 0{,}0217 \qquad \text{Equação (2)}$$

Onde:

y = absorbância a 437 nm

x = teor de flavonoides totais (mgEQ.Kg^{-1})

2.3.3 – Triagem do Potencial Antioxidante: radicais de DPPH e β-caroteno

O teste qualitativo do potencial antioxidante foi realizado por CCD (também conhecido como TLC do inglês Thin-Layer Chromatography), pulverizado com soluções de DPPH e de β-caroteno. Para tanto, foram aplicadas amostras de quercetina, rutina e mel (MPS) a placas de CCD e eluídas com sistema de solvente metanol : clorofórmio (7:3). Após eluição, as placas foram pulverizadas separadamente com solução metanólica 0,2% de DPPH e solução 0,02% de β-caroteno em diclorometano. Após 30 min, as placas foram reveladas em luz UV (254 nm) [17].

2.4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os teores de compostos fenólicos não diferiram estatisticamente ($p>0,05$) entre as amostras de MPS e MPU, as quais apresentaram valor de concentração de 0,5155 (±0,0112) e 0,5228 (±0,0308) $mgEAG.Kg^{-1}$ de mel, respectivamente. Assim como os constituintes fenólicos, os flavonoides também não apresentaram diferença significativa entre as amostras de MPS (0,1978 ± 0,0027 $mgEQ.Kg^{-1}$ de mel) e MPU (0,1950 ± 0,0012 $mgEQ.Kg^{-1}$ de mel).

Fatores climáticos, origens botânicas e espécies de abelha podem influenciar na composição de teores dos compostos bioativos, bem como interferir em sua concentração. Devido à inexistência de artigos publicados determinando a quantidade de fenóis e flavonoides de méis de jataí no estado da Bahia, não é possível comparar os valores encontrados com os valores expostos na literatura. Estudos realizados anteriormente com mel de *T. angustula* em outras regiões do Brasil demonstraram teores de fenólicos e flavonoides superiores aos encontrados neste estudo. Em Geral, o mel de abelhas sem ferrão apresenta teor de fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante superior aos méis de *A. melífera,* mesmo possuindo ampla faixa de variação (0,56 a 1810 $mgEAG.Kg^{-1}$) [2], [12], [18], [19].

Para o conhecimento do potencial antioxidante da amostra de mel foi realizada uma triagem em CCD. É possível observar na **FIGURA 3**, que as cromatoplacas reveladas com uma solução de DPPH apresentaram o melhor resultado, em comparação as borrifadas com solução de β-caroteno. A atividade antioxidante foi considerada positiva, pela descoloração da solução de DPPH borrifado (inicialmente de cor púrpura), obtendo-se a coloração amarelada, enquanto na ausência de atividade antioxidante, a coloração permanece púrpura. Já a cromatoplaca pulverizada com β-caroteno testaria positivo se houvesse aparecimento de banda de coloração amarela-alaranjado e fundo esbranquiçado, no entanto, esse resultado não foi observado [17]. Assim, a ação antioxidante do mel de *T. angustula* é evidenciada, principalmente ao reagente DPPH. Em estudos anteriores, Roós *et al*., 2018 e Montenegro, 2018, também relatam a ação antioxidante de méis da mesma espécie de abelhas.

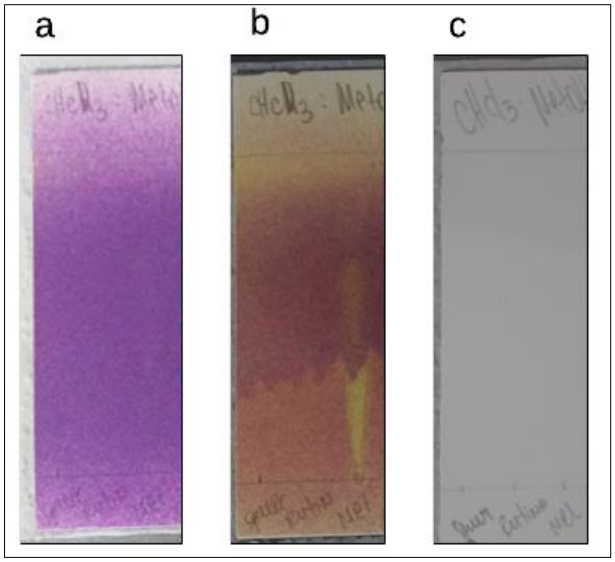


FIGURA 3. (a) Placa revelada com solução de DPPH após trinta minutos de aplicação. (b) Placa com revelada com DPPH após 72h de aplicação. (c) placa revelada com solução de β-caroteno após 30 minutos de aplicação

Estudos comprovam a importante influência dos compostos fenólicos na capacidade antioxidante do mel, isso porque esses compostos estão presentes no néctar derivados das plantas (pólen, ceras e resinas), que podem sofrer variações na sua composição, a depender do período de produção e colheita, da planta e do mel, condições climáticas, além das espécies de abelhas e as condições de processamento. Variações nesses fatores ocasionam mudanças na composição química do mel e diversidade em sua ação bioativa, uma vez que cada composto fenólico tem um potencial de ação diferente. Além disso, ácidos orgânicos, aminoácidos, proteínas e ácido ascórbico são compostos que também possuem propriedade antioxidante e podem contribuir com a ação antioxidante através de interações sinergéticas entre os compostos fenólico [12], [22]–[25].

2.5 – CONCLUSÃO

Os méis de abelha *Tetragonisca angustula* da região do semiárido baiano coletados nos períodos seco e úmido não diferem estatisticamente quanto ao teor de fenólicos e flavonoides. Em comparação a estudos realizados com méis de *T. angustula* em outras regiões do país observa-se que, os valores encontrados no presente estudo encontram-se um pouco abaixo das faixas de valores. Essa variação reafirma que o conjunto de diversos fatores ambientais permitem a variabilidade na composição do mel. O teste qualitativo da ação antioxidante aponta uma potencial ação antioxidante para mel de abelha *T. angustula*, frente ao radical livre DPPH.

2.6 - REFERÊNCIAS

[1] STEWART, S.; IVY, M. A.; ANSLYN, E. V. The use of principal component analysis and discriminant analysis in differential sensing routines. **Chemical Society Reviews**, v. 43, n. 1, p. 70–84, 2014.

[2] EREJUWA, O. O.; SULAIMAN, S. A.; AB WAHAB, M. S. Honey: A novel antioxidant. **Molecules**, v. 17, n. 4, p. 4400–4423, 2012.

[3] 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.

[4] 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.

[5] PETRUS, K.; SCHWARTZ, H.; SONTAG, G. Analysis of flavonoids in honey by HPLC coupled with coulometric electrode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 400, n. 8, p. 2555–2563, 2011.

[6] KISHORE, R. K.; HALIM, A. S.; SYAZANA, M. S. N.; SIRAJUDEEN, K. N. S. Tualang honey has higher phenolic content and greater radical scavenging activity compared with other honey sources. **Nutrition Research**, v. 31, n. 4, p. 322–325, 2011.

[7] KASSIM, M. *et al.* M. Ellagic acid, phenolic acids, and flavonoids in Malaysian honey extracts demonstrate in vitro anti-inflammatory activity. **Nutrition Research**, v. 30, n. 9, p. 650–659, 2010.

[8] KEK, S. P. *et al.* Total Phenolic Contents and Colour Intensity of Malaysian Honeys from the Apis spp. and Trigona spp. Bees. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, v. 2, p. 150–155, 2014.

[9] JACOB, M. A. M. **Compostos fenólicos, atividade antioxidante e características físico-química de mel e pólen coletados por apis mellifera linnaeus, 1758 (Hymenoptera: apidae)**, 2014. Tese (Doutorado em Etmologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

[10] CARPES, S. T. *et al.* Avaliação do potencial antioxidante do pólen apícola produzido na região sul do Brasil. **Quimica Nova**, v. 31, n. 7, p. 1660–1664, 2008.

[11] ROÓS, P. B. *et al.* Avaliação de parâmetros físico-químicos e da atividade antimicrobiana in vitro de méis de jataí (*Tetragonisca angustula*) provenientes do Rio Grande do Sul. **PERSPECTIVA**, v. 42, n. 159, p. 97–107, 2018.

[12] ÁVILA, S.; BEUX, M. R.; RIBANI, R. H.; ZAMBIAZI, R. C. Stingless bee honey: Quality parameters, bioactive compounds, health-promotion properties and modification detection strategies. **Trends in Food Science and Technology**, v. 81, n. September, p. 37–50, 2018.

[13] NASCIMENTO, K. S. Do, *et al*. Phenolic compounds, antioxidant capacity and physicochemical properties of Brazilian Apis mellifera honeys. **LWT - Food Science and Technology**, v. 91, n. August 2017, p. 85–94, 2018.

[14] ZULKHAIRI A., F. A. *et al.* Therapeutic properties of stingless bee honey in comparison with european bee honey. **Advances in Pharmacological Sciences,** v. 2018, p. 1-10, 2018.

[15] FERREIRA, I. C. F. R.; AIRES, E.; BARREIRA, J. C. M.; ESTEVINHO, L. M. Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract. **Food Chemistry**, v. 114, n. 4, p. 1438–1443, 2009.

[16] PONTIS, J. A. *et al.* Color, phenolic and flavonoid content, and antioxidant activity of honey from Roraima, Brazil. **Food Science and Technology**, v. 34, n. 1, p. 69–73, 2014.

[17] CIMPOIU, C. Analysis of some natural antioxidants by thin-layer chromatography and high performance thin-layer chromatography. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 29, n. 7–8, p. 1125–1142, 2006.

[18] 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, n. 1, p. 10–18, 2013.

[19] NWEZE, J. A.; OKAFOR, J. I.; NWEZE, E. I.; NWEZE, J. E. Evaluation of physicochemical and antioxidant properties of two stingless bee honeys: A comparison with Apis mellifera honey from Nsukka, Nigeria. **BMC Research Notes**, v. 10, n. 1, p. 4–9, 2017.

[20] 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.

[21] FUENMAYOR, C. A. *et al.* Miel de angelita': Nutritional composition and physicochemical properties of Tetragonisca angustula honey. **Interciencia**, v. 37, n. 2, p. 142–147, 2012.

[21] SHAMSUDIN, S. *et al.*, "Influence of origins and bee species on physicochemical, antioxidant properties and botanical discrimination of stingless bee honey," ***Int. J. Food Prop***., vol. 22, no. 1, pp. 238–263, 2019.

[22] BAEK, Y. *et al.* Total phenolic contents and antioxidant activities of Korean domestic honey from different floral sources. **Food Science and Biotechnology**, v. 24, n. 4, p. 1453–1457, 2015.

[23] IDRIS, Y. M. A.; MARIOD, A. A.; HAMAD, S. I. Physicochemical properties, phenolic contents and antioxidant activity of Sudanese honey. **International Journal of Food Properties**, v. 14, n. 2, p. 450–458, 2011.

[24] MONTENEGRO, H. R. **Comparação das características físico-**

químicas e antioxidantes do mel de *tetragonisca angustula* (*latreille, 1811*) coletado nos estados do paraná e rondônia. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2018.

[25] TRUCHADO, P. *et al.* Nectar flavonol rhamnosides are floral markers of acacia (Robinia pseudacacia) honey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 19, p. 8815–8824, 2008.

CAPÍTULO III

COMPOSTOS FENÓLICOS, FLAVONOIDES E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL EM AMOSTRA DE MEL DE *Tetragonisca angustula* (Jataí) POR DLLME E CLAE-UV

3.1- INTRODUÇÃO

Os compostos fenólicos encontrados em mel podem ser classificados em diversos grupos (flavonoides, ácidos fenólicos e derivados de ácidos fenólicos). Cada constituinte desempenha um papel específico no tratamento ou prevenção de diversas doenças, conferindo ao mel propriedades potencialmente bioativas. Estudos revelam que o consumo de mel de abelha sem ferrão está relacionado a prevenção de doenças cardiovasculares, diabetes, câncer e até mesmo distúrbios neurodegenerativos como Alzheimer, Parkinson, esclerose múltipla e Huntington [1].

A composição química do mel depende intrinsicamente do bioma em que este se encontra inserido, uma vez que, abelhas polinizadoras coletam das espécies vegetais, néctar e pólen, onde estão presentes metabólitos secundários responsáveis pela sua composição química. Dessa maneira, a grande variedade de ecossistemas brasileiros proporciona uma ampla variabilidade na sua composição química, dificultando a definição da composição de todos méis de origem brasileira e a completa similaridade na composição deles.

Uma das técnicas de pré-concentração de amostras e extração de compostos fenólicos em mel é a Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME do inglês “Dispersive Liquid-Liquid Microextraction”). Essa técnica foi desenvolvida por Rezaee *et al*, 2006, e se baseia em duas etapas. Na primeira etapa, busca-se a dispersão completa do solvente extrator no extrato aquoso, com auxílio do solvente dispersor que, por sua vez, é miscível em ambas as fases, formando uma emulsão. O objetivo principal dessa etapa é aumentar a superfície de contato do solvente extrator com os analitos de interesses presentes na fase aquosa. Na segunda etapa, a solução deve ser centrifugada - para completa separação das fases – e o solvente extrator, recolhido e transferido para um frasco (vial) para posterior análises (esquema representativo na **FIGURA 1**) [2],[3].

A escolha dos solventes (extrator e dispersor), pH, tempo de centrifugação e volume utilizado influenciam diretamente na eficiência da

extração. Campone *et al*., 2014, em análises variando todas as condições anteriormente citados, propôs uma metodologia otimizada para extração de compostos fenólicos em amostra de mel. Usando como solvente extrator clorofórmio, solvente dispersor acetona, pH 2 e tempo de centrifugação de 5 minutos com rotação de 600 rpm [4], [5].

Essa técnica de microextração também pode ser considerada como preparo de amostra, no processo de pré-concentração, elevando o fator de enriquecimento do analito. Embora seja recomendado utilizar em análises de amostras de matrizes simples, sua aplicação em amostras de matrizes complexas tem sido cada vez mais utilizada nos últimos anos devido ao seu desempenho satisfatório na extração dos analitos desejados [2].

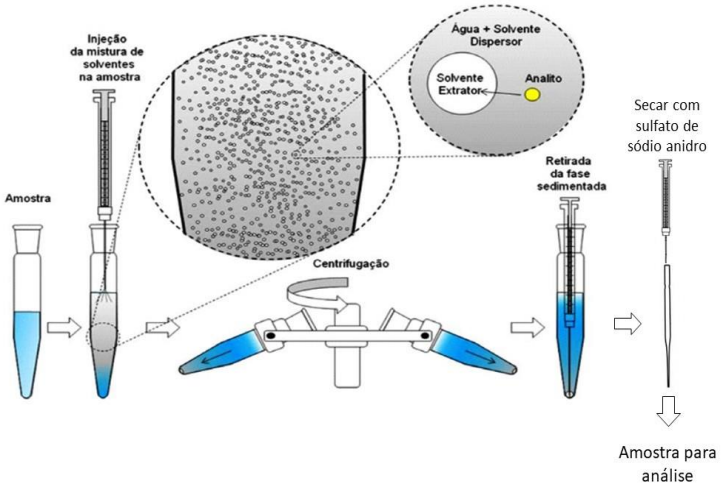


Figura 1. Esquema do processo de Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME)

Fonte: Primel, adaptado

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE – (HPLC do inglês “High Performance Liquid Chromatography) é uma técnica analítica baseada em princípios físico-químicos que busca separar analitos presentes em uma amostra. A separação ocorre pela interação intermolecular dos analitos entre a fases móvel e estacionária. Quando a amostra é analisada, os analitos de maior interação com a fase móvel são eluídos através da coluna cromatográfica, já aqueles que exibem maior interação com a fase estacionária permanecem retidos na coluna cromatográfica no tempo de retenção específico, fornecendo sinal analítico para o detector que converte em resultado. Esse sinal de resposta

pode variar a depender do tipo de detector utilizado na técnica de separação [6][7].

O CLAE é a técnica comumente utilizada para análises de polifenóis em amostras de mel e a quantificação simples, através do padrão externo de referência com a curva de calibração. Geralmente, algumas condições instrumentais de coluna, fase móvel e detector seguem tendências que influenciam no melhor desempenho das análises [7].

As Colunas de C18 e fase reversa são frequentemente utilizadas na separação de polifenóis, utilizando a pré-coluna para proteger a coluna, em alguns casos. O comprimento da coluna e tamanho de partículas também podem influenciar na sensibilidade, resolução e eficiência da análise, no entanto, não há precisão nas escolhas desses fatores, visto que, vários estudos expressam resultados satisfatórios em diversos parâmetros. Contudo, colunas mais longas geralmente apresentam melhores resultados[7].

A fase móvel usualmente aplicada na separação de compostos fenólicos é composta por sistema binário (A e B). A fase móvel A é frequentemente composta por solução aquosa acidificada (ácido acético, ácido fórmico ou ácido fosfórico). A fase móvel B é usualmente composta de metanol ou acetonitrila acidificados na mesma concentração da fase móvel A ou em concentrações diferentes (0 – 6%, geralmente de 0 – 1%). A acidificação das fases móveis viabiliza a separação dos ácidos fenólicos e picos com formas nítidas, importantes para análises [7].

A eluição por gradiente é preferencialmente aplicado na separação de compostos fenólicos, dado que, sistemas isocráticos aumentam a possibilidade de coeluição dos constituintes, ocasionando redução na seletividade da análise. Contudo, quando se utiliza sistemas isocráticos há implementação de rampas na metodologia onde, consequentemente, ocorrem variações dos percentuais dos solventes [7].

O detector ultravioleta (UV), é o mais usado na quantificação de ácidos fenólicos presentes em amostras de mel. A absorbância máxima dos compostos fenólicos é entre 260 e 370 nm e sua identificação pode ser feita utilizando padrão de referência em comparação com o tempo de retenção. Entretanto, o

detector de UV tem baixa sensibilidade e para constituinte em baixa concentração pode não ser aconselhável a utilização desse detector. Além disso, constituinte que apresentem espectro UV semelhante podem coeluirem no mesmo tempo de retenção e prejudicar na identificação dele [7].

3.2- OBJETIVO

3.2.1 - OBJETIVO GERAL

O presente trabalho objetivou identificar e quantificar os compostos fenólicos e avaliar a atividade antitumoral em amostra de mel do período seco de *T. angustula*, adotando como técnica de extração a DLLME e análise por CLAE-UV.

3.2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter fração rica em compostos fenólicos através da microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME);

- Identificar na amostra de MPS a presença de cinco ácidos fenólicos: ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido clorogênico, ácido *trans*-ferúlico, ácido gálico; e dois flavonoides: rutina e quercetina;

- Quantificar os compostos ácido cafeico e rutina, tendo como técnica analítica o CLAE – UV.

- Avaliar a atividade antitumoral em linhagem de glioma murino (C6) a partir da fração rica em compostos fenólicos.

3.3 - MATERIAL E MÉTODOS

O procedimento experimental para quantificar os compostos fenólicos presentes na amostra de MPS de *T. angustula* consistiu nas seguintes etapas:

I. Realização de estudo das condições a serem adotadas na DLLME;

II. Desenvolvimento do método cromatográfico para análise dos padrões a partir da solução mix e determinação das condições ideais de análise e identificação dos constituintes fenólicos;

III. Análise individual de cada padrão, da amostra de MPS e de amostras do MPS contaminada com os padrões, sob as mesmas condições cromatográficas estabelecidas na análise da solução mix de padrões, almejando identificar os constituintes fenólicos pelos tempos de retenção e absorbâncias;

IV. Construção da curva de calibração dos padrões de ácido cafeico e rutina, sob as mesmas condições cromatográficas pré-estabelecidas;

V. Quantificação do ácido cafeico e rutina na amostra MPS de *T. angustula*.

3.3.1 - Preparo da amostra de MPS por DLLME

As condições experimentais para DLLME de: solvente extrator, solvente dispersor, pH e tempo de centrifugação foram adaptadas da proposta por Campone *et al*., 2014. O extrato da amostra de MPS foi preparado a uma concentração de 0,1 $g.mL^{-1}$ e água destilada acidificada com ácido clorídrico (pH 2). A solução foi homogeneizada e filtrada por gravidade com papel de filtro. Em seguida, uma alíquota de 5 mL foi retirada do filtrado e adicionou-se o sal sulfato de amônio até ajustar a solução, novamente, para pH 2. Em Epeendorf de 2 mL foram adicionados 1300 µL da solução de MPS (pH 2), 225 µL de clorofórmio (solvente extrator) e 375 µL de acetona (solvente dispersor), seguido de centrifugação por 5 minutos à 600 rpm. Em seguida, a fase sedimentada foi retirada da mistura com microseringa e passou-se o líquido em coluna

empacotada com sulfato de sódio anidro, para secagem. A sequência dessa metodologia está representada na **FIGURA 1**. Do filtrado, foram realizadas análise por CLAE – UV e testes antitumoral (descrito no subtópico 3.3.4).

3.3.2 – Identificação e quantificação dos compostos fenólicos por CLAE-UV

A identificação dos compostos fenólicos e posterior quantificação foi realizada por CLAE-UV. Diferentes métodos propostos em referência bibliográfica foram testados, contudo as condições analíticas que proporcionaram melhor eficácia de seletividade, passaram por modificações propostas neste trabalho e estão apresentadas no **QUADRO 1.** Os padrões de ácidos fenólicos e flavonoides foram previamente codificados para facilitação do trabalho (**QUADRO 2).** Para a identificação dos constituintes sob investigação na amostra de MPS foram realizadas análises no CLAE-UV dos padrões em uma solução mix, dos padrões individualmente, da amostra MPS e de MPS contaminada com os padrões.

QUADRO 1. Condições cromatográficas estabelecidas para análise por CLAE – UV

Parâmetros	**Condições**
Fase móvel	Água (A) e Metanol (B) acidificados com ácido acético a 0,1%
Método de análise	Gradiente: 0 – 40 min 25 -100% B 40 – 50 min 100%B
Tempo de análise	50 minutos
Temperatura	25 °C
Fluxo	1,0 mL / minuto
Volume de injeção	30 µL
Comprimento de onda	245 nm
Coluna (Supelco analítica)	25 cm x 4,6 mm x 5 µm, fase reversar – C18 polímero

Para a quantificação dos constituintes de MPS foi construída uma curva de calibração, a partir de uma solução estoque de cada padrão, preparada na concentração de 100 $\mu g.mL^{-1}$ de metanol. A partir da solução estoque foram preparas outras soluções nas concentrações de 1, 3, 5 e 10 $\mu g.mL^{-1}$ em metanol.

As soluções foram filtradas utilizando o filtro de membrada (PTFE) de porosidade 0,45 µm e injetadas manualmente (30 µL) em CLAE-UV, com auxílio

de microseringa. As análises foram realizadas em triplicatas e as curvas de calibração foram construídas, através da média das áreas absolutas dos picos versus a concentração. A linearidade proposta pelo método foi avaliada usando o coeficiente de linearidade (R^2) da curva de calibração e a equação da reta utilizada para a quantificação dos constituintes na amostra.

QUADRO 2. Padrões de referência, seus respectivos códigos de identificação e estruturas molecular

Padrão de referência	Código
Ácido cafeico	1
Ácido *p*-cumárico	2
Ácido clorogênico	3
Ácido *trans*-ferúlico	4
Ácido gálico	5
Rutina	6
Quercetina	7

3.3.3 - Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram determinados através das equações 1 e 2, respectivamente, onde *S* corresponde ao desvio padrão do branco e *m*, ao coeficiente angular da curva.

$$LD = 3{,}3\ x\ \frac{s}{m} \qquad \text{Equação (1)}$$

$$LQ = 10\ x\ \frac{s}{m} \qquad \text{Equação (2)}$$

3.3.4 - Teste biológico: Atividade antitumoral em linhagem de glioma murino (C6)

As amostras de MPS utilizadas nos testes biológicos foram obtidas a partir da DLLME descrita no tópico 3.3.1.

A linhagem celular de glioma murino (C6) foi obtida em parceria com o laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular (LabNq) e os testes realizados em colaboração com o Instituto Anísio Teixeira. As culturas foram rotineiramente mantidas em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) e suplementado com 10% de soro fetal bovino e 100 $\mu g.mL^{-1}$ de estreptomicina e 100 $\mu I.mL^{-1}$ de penicilina em placas de cultura de 10 cm de diâmetro (TTP, Suíça) contendo 10 mL do meio. As células foram mantidas em incubadora a 37ºC em ambiente controlado com 5% de CO_2, com mudança de meio a cada 48 h.

Para as análises, as células foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de $3,1 \times 10^4$ $células.cm^{-2}$. As células foram tratadas com frações clorofórmicas de mel do período seco, nas doses 100-15000 $ng.mL^{-1}$. O controle negativo foi avaliado em oito poços (onde não houve adição da fração de mel). As placas foram tratadas em condições ambiente com 5% de CO_2, a 37ºC, por 72 h. Após o tempo de tratamento, o meio de cultura antigo foi substituído por meio novo contendo 1 $mg.mL^{-1}$ de MTT (Moosman *et al*., 1996) e lisadas com tampão de lise contendo 20% (p/v) de duodecil sulfato de sódio (SDS) em N,N-dimetilformamida 50% (v/v), pH 4,7. As análises foram feitas após 24 h, por espectrofotometria a 595 nm (Varioskan Flash™).

3.4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 – Identificação dos compostos fenólicos

As análises realizadas por CLAE-UV, da solução mix dos padrões permitiu observar a influência das amostras na solução, bem como, verificar o perfil das eluições. Tal ação possibilitou determinar o método ideal de separação, resultando em menor tempo por análise e redução do volume de solvente. O resultado referente a análise da solução mix de padrões viabilizou, ainda, a seleção das condições cromatográficas ideais a serem utilizadas nas demais análises. O cromatograma referente a solução mix de padrões (**FIGURA 2**), demonstra o perfil cromatográfico resultante de todos os padrões em uma única solução.

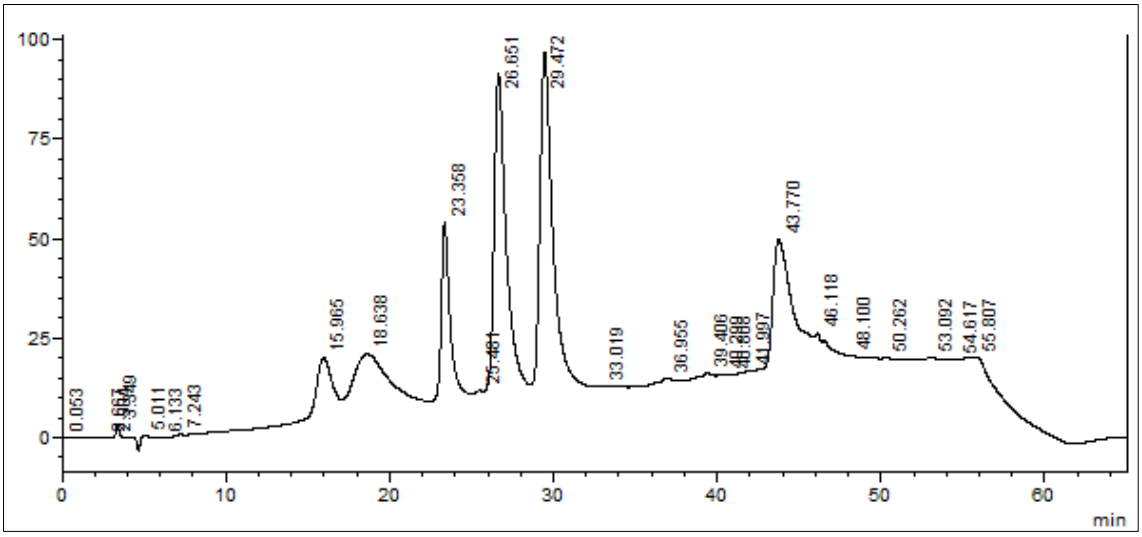


Figura 2. Perfil cromatográfico da análise da solução mix de padrões

Analisando os sinais analíticos obtidos no cromatograma da solução mix de padrões foi possível detectar seis sinais de áreas acentuadas nos tempos de retenção de 15,965 min; 18,638 min; 23,358 min; 26,651 min; 29,472 min e 43,770 min, entretanto, foram utilizadas sete substâncias padrões de referência (**QUADRO 2**). A ausência da detecção de um dos sinais pode ser justificada pela não absorção da radiação ultravioleta no comprimento de onda emitido pelo detector (245 nm) ou duas dessas substâncias coeluiram no mesmo tempo de

retenção e os sinais proporcionados sobrepuseram-se um ao outro. Essas suposições foram evidenciadas com as análises dos padrões individualmente, correlacionando seus tempos de retenção e o sinal analítico proporcionado.

Após a seleção das condições cromatográficas ideais para a separação dos padrões em mistura, cada padrão foi injetado separadamente e, através do respectivo tempo de retenção, foi possível identifica-los. A **FIGURA 3** representa uma compilação dos cromatogramas das análises de cada padrão analisado separadamente.

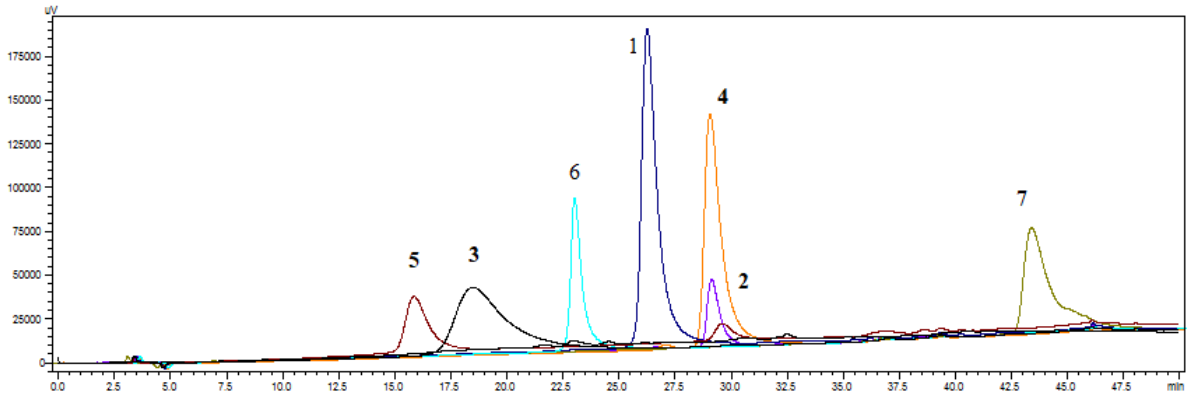


Figura 3. Compilação dos cromatogramas dos padrões de ácidos fenólicos e flavonoides. Ácido gálico (5), ácido clorogênico (3), rutina (6), ácido cafeico (1), ácido *p*-cumárico (2), ácido *trans*-ferúlico (4), quercetina (7)

Após a identificação dos padrões, verificou-se que o ácido *p*-cumárico (2) e o ácido *trans*-ferúlico (4) coeluiram no mesmo tempo de retenção, sendo apenas a intensidade do pico distinta, ocasionando na sobreposição de suas bandas cromatográficas. Alterações nas condições cromatográficas de análise foram realizadas, no entanto, não foi possível definir apenas um método que contemplasse a seletividade de todos os compostos fenólicos, sendo a alternativa prudente, optar por aquele que apresentasse maior seletividade e reprodutibilidade.

Apesar de todos os padrões estarem em concentrações semelhantes, os sinais analíticos apresentaram respostas com intensidades e área diferentes. A intensidade do sinal e o tamanho da área não pode ser considerado um fator diretamente proporcional à concentração do composto na amostra. Em alguns

casos, o comprimento de onda utilizado no detector pode ser mais sensível para um composto do que para outros, proporcionando respostas diferentes.

A análise do MPS foi realizada seguindo as condições cromatográficas anteriormente estabelecidas e seu perfil cromatográfico encontra-se exposto na **FIGURA 4**.

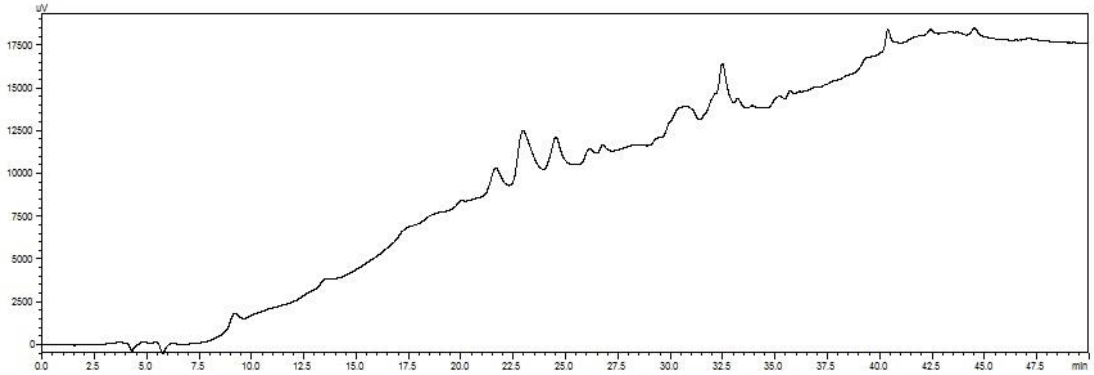
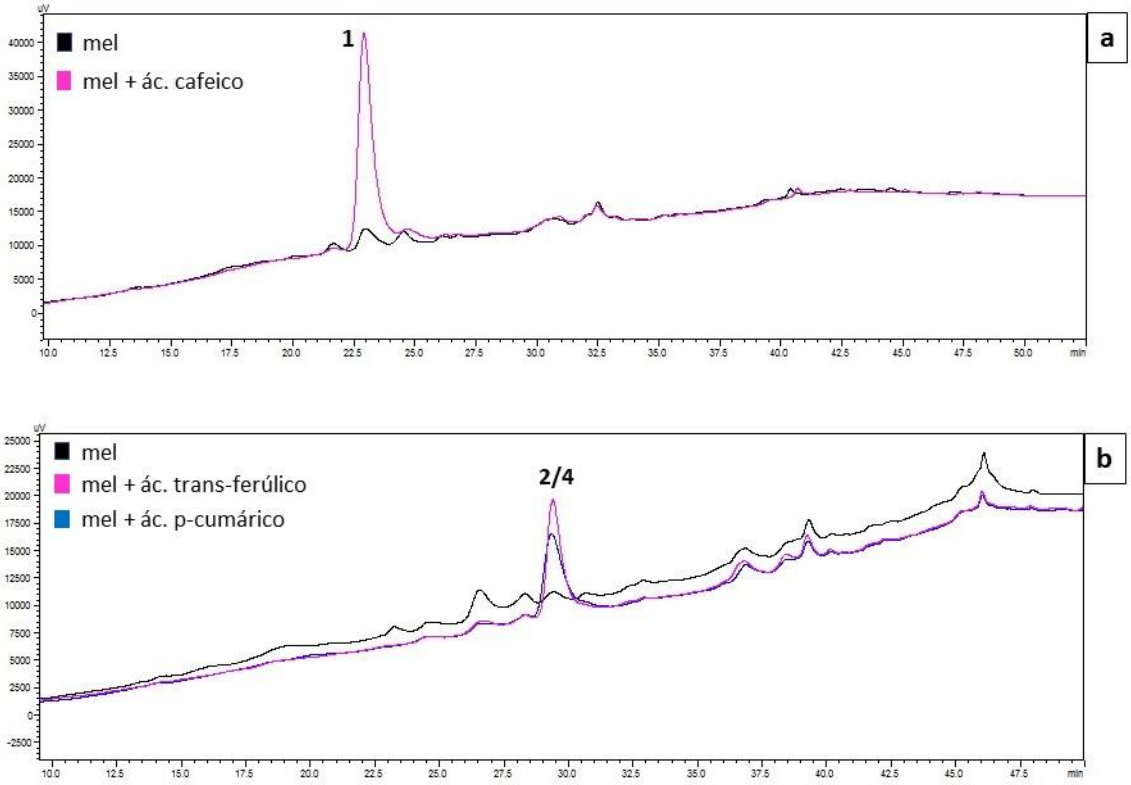


FIGURA 4. Cromatograma referente a amostra de MPS

Para a identificação dos padrões na amostra de MPS foi realizada a análise por CLAE-UV de MPS contaminadas com os padrões, individualmente. Os resultados obtidos estão representados na **FIGURA 5 a-f**.



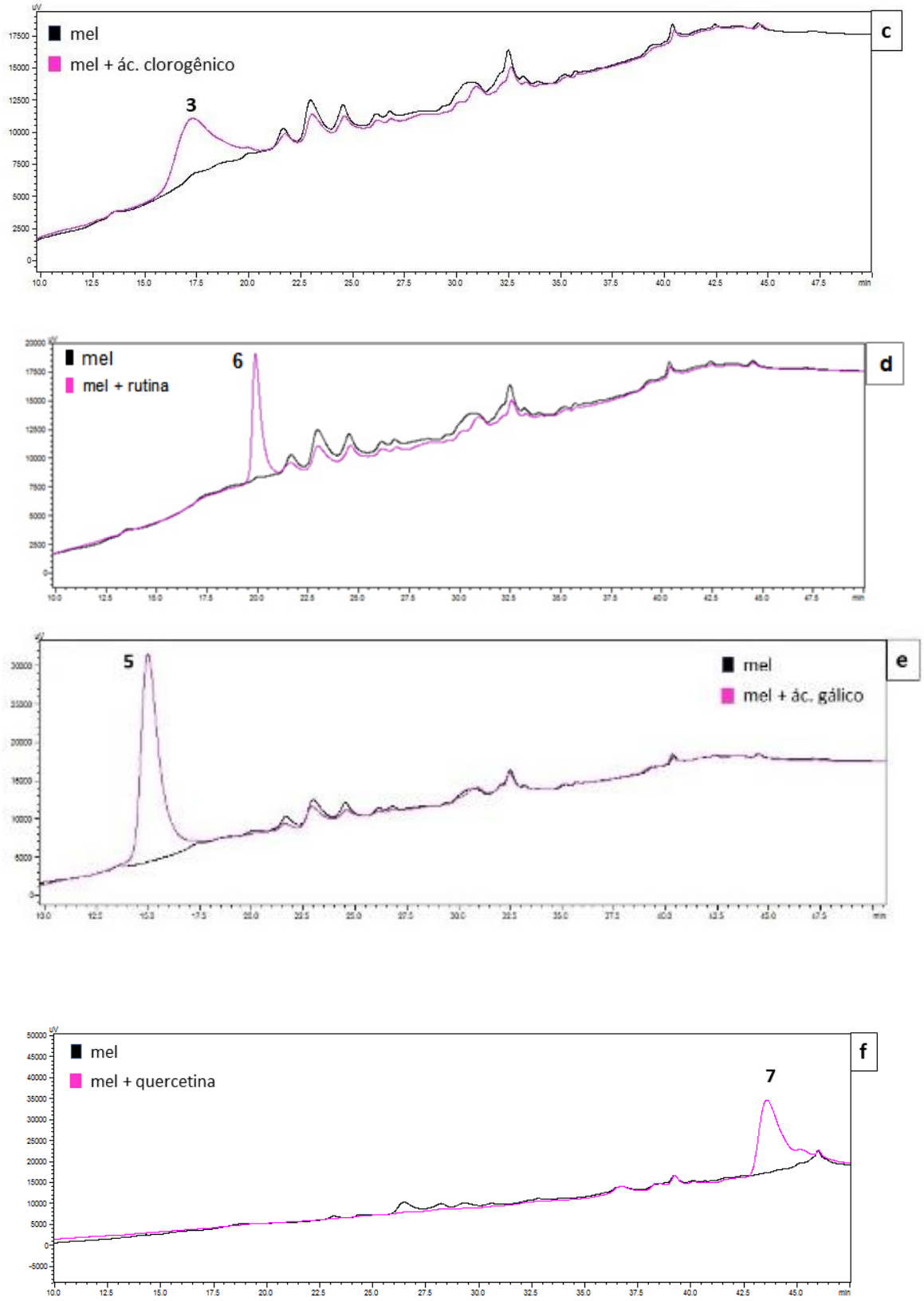


FIGURA 5. Cromatogramas referentes a coinjeção dos respectivos padrões na amostra de MPS e sua identificação

As análises dos cromatogramas apresentados na **FIGURA 5a-f** permitiram a confirmação da presença dos seguintes compostos fenólicos: ácido cafeico, ácido clorogênico e rutina. A **FIGURA 5a**, observa-se um incremento na altura do pico com tempo de retenção em 22,970 min e absorbância compatíveis ao observado para a substância **1**, relativo ao composto ácido cafeico; na **FIGURA 5c**, observa-se um incremento na altura do pico com tempo de retenção em 18,638 min, permitindo a suposição da presença da substância 3, o ácido clorogênico; na **FIGURA 5d**, tem-se, novamente um incremento no pico com tempo de retenção em 20,735 min atribuído a substância 6, o flavonoide rutina.

A análise dos cromatogramas, compilados na **FIGURA 5e,** da amostra de MPS e do padrão de ácido gálico não se observa um pico em 15,965 min, permitindo inferir a ausência deste composto fenólico na amostra testada de *T. angustula* ou as técnicas aplicadas deste estudo não permitiram sua detecção.

Na **FIGURA 5b** no cromatograma de MPS observa-se um pico com tempo de retenção em 29,472 min, a análise dos cromatogramas de MPS contaminado com os padrões de ácido *p*-cumárico e ácido *trans*-ferúlico também se observa picos neste tempo de retenção. Sendo assim, para a amostra de MPS, a informação sobre a presença destes padrões ficou inconclusiva. Não sendo possível afirmar se corresponde a um dos compostos fenólicos ou de uma mistura deles, sendo necessária a elaboração de um novo método cromatográfico, focado apenas na separação dos picos destes compostos na amostra.

Nos cromatogramas gerados para análises de MPS, **FIGURA 5f**, não foram observados pico em 43,770 min, tempo de retenção atribuído a substância 7, relativo ao flavonoide quercetina, não sendo possível sua identificação na amostra de mel de *T. angustula* analisada.

O estudo anterior do mel *T. angustula* obtidos na região de Florianópolis – SC, BILUCA *et al*., 2017, constatou presença de ácido *p*-cumárico, ácido *trans*-ferúlico e quercetina, entre outros ácidos fenólicos (que não foram avaliados neste estudo), contudo não foi detectado ácido clorogênico e a rutina não foi avaliada [8].

3.4.2 – Quantificação de ácido cafeico e rutina na amostra de MPS

A quantificação dos constituintes químicos presentes no MPS de *T. angustula* seguiu concentrada no ácido cafeico e rutina, devido a disponibilidade de tempo, resposta analítica do pico cromatográfico, quantidade de amostra e padrões para a realização das análises. Para tanto, foi construída uma curva de calibração com as soluções de ácido cafeico e rutina, separadamente, nas concentrações de 1, 3, 5 e 10 µg.mL^{-1}, em triplicata. As soluções foram analisadas por CLAE-UV, sob as mesmas condições cromatográficas estabelecidas e apresentadas na **QUADRO 1**. Os resultados experimentais foram tratados por Excel, a representação gráfica das curvas de calibração e respectivos coeficiente de correlação (R^2) estão representados na **FIGURA 6**.

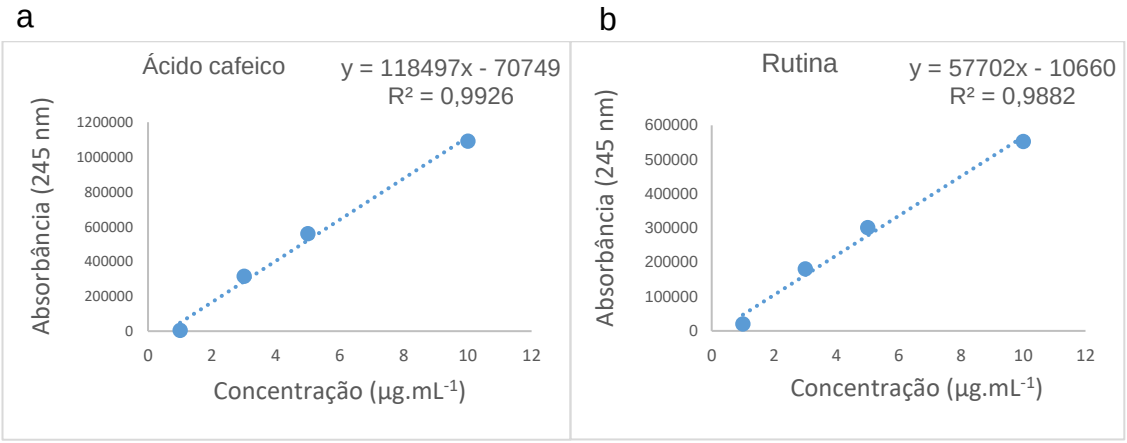


Figura 6. Representação gráfica da curva de calibração dos padrões de referência ácido cafeico (a) e rutina (b)

A partir das curvas de calibrações (**FIGURA 6**) foram obtidas as equações da reta para o ácido cafeico, y = 118497x – 70749 e para a rutina, y = 57702x–10660, com correlações lineares em 0,9926 e 0,9882, respectivamente. A determinação da área relativa dos compostos fenólicos em MPS foi obtida pela análise do cromatograma, através do sinal analítico correspondente a resposta dos constituintes, onde tem-se, 139267 e 43490 para o ácido cafeico e rutina, respectivamente. Assim, após a aplicação da equação da reta, foram encontrados na amostra de MPS de *T. angustula* as concentrações para ácido cafeico de 1,7723 µgAcCaf.100 mg^{-1} de mel e para a rutina de 0,9384 µgRut.100 mg^{-1} de mel.

As equações 1 e 2 (pág. 71), foram utilizadas para calcular os valores de LD e LQ respectivamente, e os resultados estão expressos na **TABELA 1**. É possível verificar baixo LD para ambos padrões, afirmando assim, que a metodologia aplicada neste estudo apresenta detecção de analitos em baixas concentrações. A concentração aceitável do LD é a que gera um sinal três vezes maior que o ruído do sistema ou que produza um sinal igual a 3s, onde s é o desvio padrão do ruído para o branco [9].

TABELA 1. Valores do Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LD) calculados para os padrões de ác. cafeico e rutina em µg

Padrão	LD	LQ
Ác. cafeico	0,0055	0,017
Rutina	0,011	0,034

Na literatura consultada não foram encontrados estudos de quantificação de rutina ou ácido cafeico em mel de ASF no Brasil. O estudo realizado por PIMENTEL et. al, 2013, com amostras de *Melipona compressives manaosensis*, uma ASF em Manaus – AM, trata da identificação de rutina por HPLC. A rutina é um flavonoide glicosilado, do subgrupo flavonol, o qual é encontrado na cera de abelha da espécie *Melipona*. Sua origem no mel não é floral, uma vez que a produção da cera destas abelhas vem das resinas de outras partes das plantas e não do polén e néctar como o mel. Sugere-se a transferência deste composto da cera para o mel, facilitada pelo fato que o mel de ASF são estocados em bolsas de cera. Tem-se explorado a conexão entre a características dos flavonoides presentes no mel de ASF e o seu potencial antimicrobial, sendo ainda considerado a ação sinérgica dos flavonoides e outros componentes do mel.

3.4.3 – Atividade antitumoral

Quanto ao estudo da ação antitumoral para os méis de *T. angustula*, os resultados indicaram uma potencial ação antitumoral em linhagem células de

glioma, provavelmente em consequência aos fitoativos presente em sua composição. Essa avaliação foi feita por meio da medida de sobrevivência relativa (%) ao controle pelo teste do MTT. A viabilidade celular foi quantificada pela conversão do MTT amarelo para o produto formado de cor púrpura (roxo) pelas desidrogenases mitocondriais das células vivas.

Os resultados apontaram atividade citotóxica na linhagem tumoral estudada do tipo dose/dependente. Foi possível determinar a Concentração Mínima Citotóxica (CMC), a partir da diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre a sobrevivência relativa (%) e o grupo controle (DMEM + DMSO, o solvente da amostra). Os resultados demonstraram que a mediana da CMC (**FIGURA 7**) foi de 1000 $ng.mL^{-1}$ de mel (variação: 100-15000 $ng.mL^{-1}$), com uma diferença de 16,19% do grupo controle.

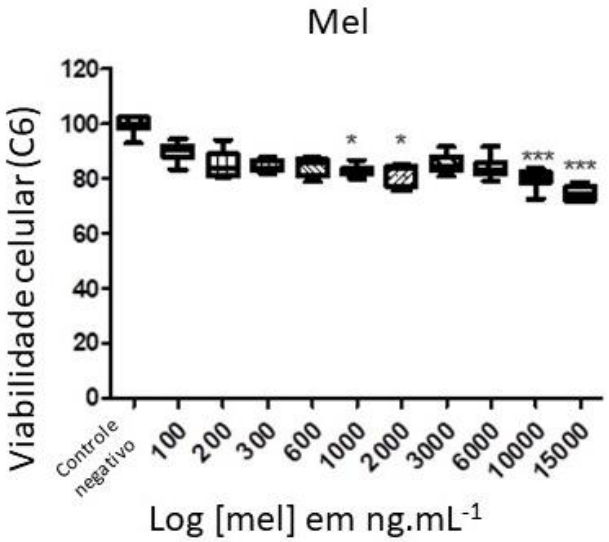


FIGURA 7. Viabilidade celular em linhagem de glioma murino (C6), expostas à fração clorofórmica do mel, nas doses de 100-15000 $ng.mL^{-1}$. Os dados apresentam distribuição não normal, representados por mediana e variação, analisados por Kruskal-Wall

3.5 – CONCLUSÃO

Dos sete compostos fenólicos analisado em amostras de mel de *T. angustula*, da Faz Faustino, município de Rio Antônio, do semiárido baiano, utilizando a técnica de extração DLLME e análises por CLAE- UV foi possível a identificação de: ácido cafeico, rutina e ácido clorogênico, além de ácido *p*-cumárico e/ou ácido *trans*-ferúlico. A quantificação foi possível para ácido cafeico e rutina, 1,7723 e 0,9384 μg.100 mg^{-1} de mel, respectivamente. Através das técnicas utilizadas neste estudo não foi possível a identificação de ácido gálico e quercetina.

Os compostos bioativos presentes na fração sedimentada do mel, apontaram redução nas atividades das desidrogenases mitocondriais das células da linhagem de glioma murino, sugerindo boa atividade antitumoral em pequenas concentrações (ng. mL^{-1}).

A composição do mel de abelha *T. angustula* rica em polifenóis, confere a este produto elevado valor nutricional e relevância no setor comercial. Os resultados desta pesquisa respaldam a valorização desse produto e ressalta a importância da meliponicultura da região, incentivando a expansão do cultivo, produção e contribui com o desenvolvimento econômico de comunidades produtoras da zona rural do sudoeste baiano.

3.7 – REFERÊNCIAS

[1] HOSSEN, M. S. *et al.* Beneficial roles of honey polyphenols against some human degenerative diseases: A review. **Pharmacological Reports**, v. 69, n. 6, p. 1194–1205, 2017.

[2] LUIZ, A. L.; MACIEL, E. V. S.; LANÇAS, F. M. Uma abordagem conceitual das técnicas miniaturizadas de preparo de amostra e suas aplicações na análise de resíduos e contaminantes em matrizes alimentares. **Scientia Chromatographica**, v. 7, n. 3, p. 157–182, 2015.

[3] REZAEE, M. *et al*., Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1116, n. 1–2, p. 1–9, 2006.

[4] CAMPONE, L. *et al*. Determination of phenolic compounds in honey using dispersive liquid – liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1334, p. 9–15, 2014.

[5] MEIRA, C. L. C. *et al*. Application of principal component analysis for the evaluation of the chemical constituents of Mimosa tenuiflora methanolic extract by DLLME/GC–MS. **Microchemical Journal**, v. 152, n. September 2019, p. 104284, 2020.

[6] JESUS, H. O. **Identificação e quantificação de piperamidas e constituintes voláteis em espécies do gênero piper**. 2019. Dissertação (Mestrado em Química) - Univerisdade Estadual do Sudoeste da Bahia, Jequié, 2019.

[7] PASCUAL-MATÉ, A.; OSÉS, S. M.; FERNÁNDEZ-MUIÑO, M. A.; SANCHO, M. T. **Analysis of Polyphenols in Honey: Extraction, Separation and Quantification Procedures**, Taylor and Francis Inc., 2018.

[8] 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.

[9] CARLOS, S.; Lanças, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise.** 6. ed. São Carlos: RiMa, 2004.

CAPÍTULO IV

QUIMIOMETRIA: TRATAMENTO ESTATÍSTICO UTILIZANDO ANÁLISES DOS COMPONENTES PRINCIPAIS

4.1 – INTRODUÇÃO

Os testes de análises estatísticas geralmente são adotados para verificar a semelhança e/ou diferença que ocorre entre os resultados. Todavia, existem ferramentas estatísticas que analisam parâmetros multivariados para tratamento das informações, agrupando os dados que se correlacionam, gerando novos conjuntos de informações a partir de modelos matemáticos. Uma dessas ferramentas é a Análise de Componentes Principais (PCA).

A PCA é uma técnica que se baseia na utilização de uma ferramenta estatística, não supervisionada, capaz de fornecer um sistema de coordenadas através de dados que se relacionam entre si, admitindo melhor compreensão dos resultados a partir das variáveis que colaboram para com ele [1 - 4].

4.2 – OBJETIVOS

Utilizar ferramentas quimiométricas para analisar os resultados obtidos nos parâmetros físico-químicos, potencial bioativo e composição química das duas amostras de mel de *T. angustula.*

4.3 - MATERIAL E MÉTODOS

Análise estatística dos dados

O tratamento estatístico dos parâmetros físico-químico do pH, acidez, açúcares redutores, umidade, cinzas e colocação; avaliação do perfil fitoquímico; do teor fenólicos e flavonoides foram realizados pela ferramenta estatística de Análise das Componentes Principais (PCA). Foram adotados os softwares Excel® (para refinamento estatístico básico) e Statistica® 7.0 para a PCA.

4.4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, os dados obtidos para as duas amostras de mel MPS e MPU, foram analisados e comparados aplicando o teste de igualdade entre as médias (teste F), para verificar a existência de dispersão entre os valores encontrados no mesmo grupo de análises; o teste de comparação de médias (teste t), para verificar se existe, ou não, diferença significativa entre as médias das amostras e a Análise de Componentes Principais (PCA).

A aplicação da PCA teve como objetivo identificar os fatores responsáveis pela distinção das amostras de mel. Para isso, foram analisadas 11 variáveis que são representadas na **TABELA 1**. A escolha da aplicação dessa ferramenta estatística pode ser explicada pelo fato de muitas dessas variáveis serem interdependentes e uma análise multivariada proporcionaria resultados mais esclarecedores e representativos.

Foram obtidas um total de três componentes principais (PC), dessas, duas foram selecionadas para justificar as correlações, baseando-se nos critérios de percentual de variância explicada, magnitude do autovalor e inflexão do gráfico *screen-plot*. Os valores associados às correlações entre os parâmetros analisados e as duas primeiras componentes principais estão expressos na **TABELA 1**. Foram consideradas as variáveis com contribuições significativas as que apresentaram valores acima de 0,7.

Tabela 1. Valores para as correlações entre componentes principais e variáveis do mel

Variáveis	**PC1**	**PC2**
Cinzas	**-0,9989**	-0,0130
Pfund	**-0,9998**	-0,0075
pH	**0,9972**	0,0692
Acidez	**-0,9987**	-0,0234
Açúcares redutores	**-0,9942**	-0,0128
Umidade	**0,9987**	0,0234
Fenólicos	0,1755	**0,9576**
Flavonoides	**-0,7379**	0,5567
Ácido clorogênico	**-0,9987**	-0,0234
Rutina	**-0,9987**	-0,0234
Ácido cafeico	**-0,9987**	-0,0234

FONTE: Autor, 2020

Os dados possibilitam a determinação de 11 parâmetros com valores significativos para PC1 (isentando apenas os fenólicos), sendo essa responsável por 87,83% da variação dos dados, comparado a PC2. A PC2 determinada por apenas um parâmetro (fenólicos), representa 10,29% da variância dos dados. Logo, considerando as duas PCs é possível explicar o total de 98,12% das variâncias dos dados.

O critério de inflexão do gráfico do *screen-plot* se baseia no fenômeno descrito pelo surgimento de uma inflexão no gráfico quando, PCs relacionadas as variâncias residuais são atingidas, possibilitando assim, relacionar o número das componentes principais com seu autovalor. No gráfico *screen-plot* (**FIGURA 1**), observa-se a inflexão na segunda PC, seguindo os critérios de seleção, deve-se escolher as duas primeiras PCs para explicar a variância dos dados, que explica o total de 98,12%.

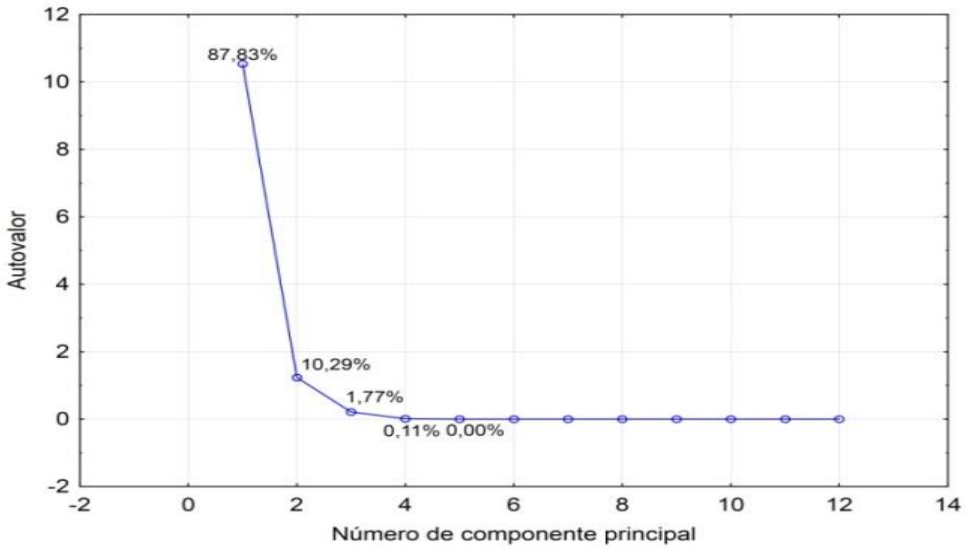
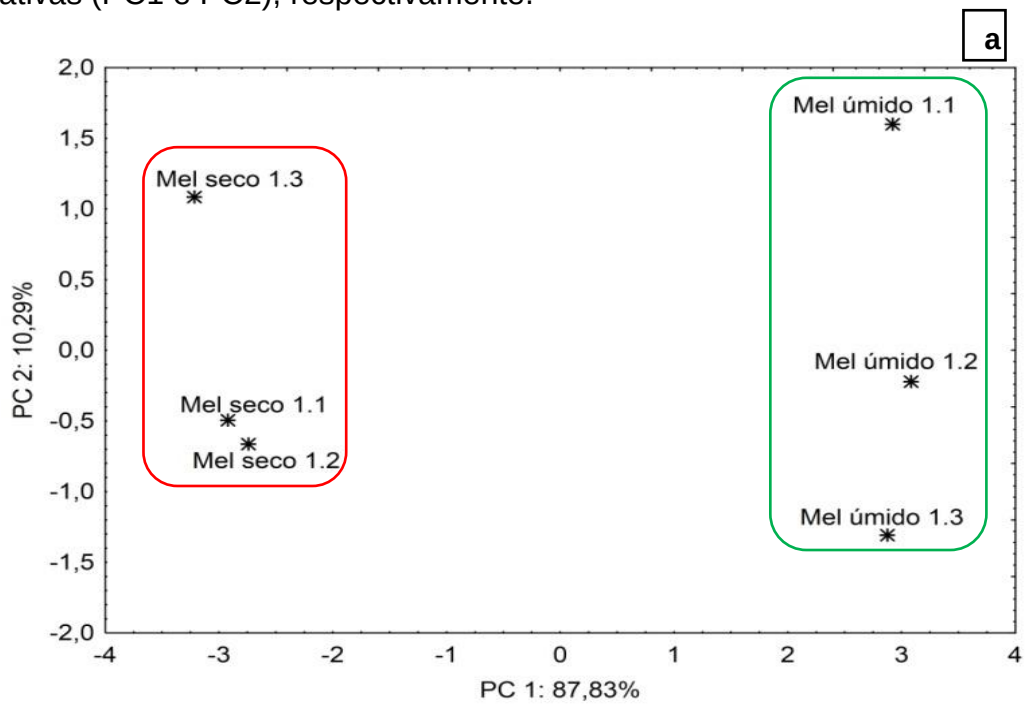


FIGURA 1. Gráfico *Screen-plot* para os dados provenientes das análises de mel

A aplicação de PCA e sua representação gráfica colabora para a interpretação do comportamento dos resultados destacando a correlação de similaridade e diferença dentro do conjunto de dados. A correlação entre as variáveis é caracterizada pelo cosseno do ângulo entre os vetores *loading*, quanto menor o ângulo entre os vetores, maior correlação entre as variáveis. A **FIGURA 2a** e **2b** apresentam gráficos do escores e *loading* com as PCs mais significativas (PC1 e PC2), respectivamente.



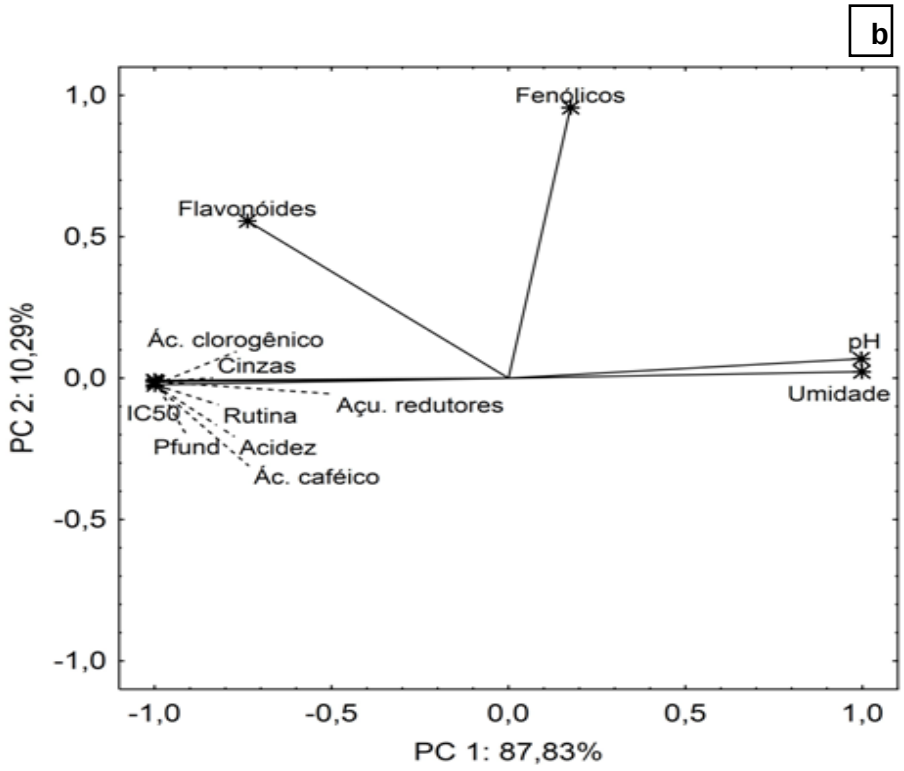


Figura 2. Gráfico de escores (**2a**) e gráfico de *loadings* (**2b**) para PC1 e PC2 das amostras de méis

Conforme a **FIGURA 2a**, existe diferença significativa e evidente entre as amostras de méis do período seco e úmido, pois houve agrupamento nas triplicatas das amostras nos mesmos períodos e separação entre as amostras dos períodos diferentes. Analisando a **FIGURA 2b**, a representação do gráfico de *loading*, identifica-se quais variáveis são responsáveis pelo afastamento e agrupamento das amostras. Os parâmetros físico-químico (cinzas, açucares redutores, escala Pfund e acidez) e os polifenóis caracterizam a semelhança para as amostras de mel do período seco. Em compensação, as variáveis pH e umidade foram os parâmetros decisivos, responsáveis pela correlação das amostras de mel do período úmido. Dos constituintes bioativos, o teor de fenólicos foi a variável de maior representatividade na variância, tal que foi o único fator responsável pela PC2.

4.5 - CONCLUSÃO

O teste t certificou a variação significativa para todos os parâmetros físico-químicos e similaridades entre os valores encontrados para fenólicos e flavonoides. A análise das componentes principais permitiu assegurar a variação entre as amostras de MPS e MPU e determinar quais variáveis foram responsáveis pela diferenciação, agrupando as amostras semelhantes e distinguindo-as.

Os resultados da avaliação quimiométrica para amostras de méis, coletados em diferentes períodos climáticos, corrobora com a justificativa de que o conjunto de diversos fatores influenciam nas características físico-química e composição química do mel, especialmente o local de cultivo e seus fatores climáticos e origem vegetal.

4.6- REFERÊNCIAS

[1] JOLLIFE, I. T.; CADIMA, J. Principal component analysis: A review and recent developments. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 374, n. 2065, 2016.

[2] STEWART, S.; IVY, M. A.; ANSLYN, E. V. The use of principal component analysis and discriminant analysis in differential sensing routines. **Chemical Society Reviews**, v. 43, n. 1, p. 70–84, 2014.

[3] PONTIS, J. A.; DA COSTA, L. A. M. A.; DA SILVA, S. J. R.; FLACH, A. Color, phenolic and flavonoid content, and antioxidant activity of honey from Roraima, Brazil. **Food Science and Technology**, v. 34, n. 1, p. 69–73, 2014.

[4] ÁVILA, S. *et al*., Bioactive compounds and biological properties of Brazilian stingless bee honey have a strong relationship with the pollen floral origin. **Food Research International**, v. 123, p. 1–10, 2019.