UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

**Composição química e capacidade sequestrante de espécies reativas de
oxigênio e nitrogênio de mel orgânico brasileiro**

CAMILA FURTUNATO DA SILVA

Piracicaba

2017

CAMILA FURTUNATO DA SILVA

**Composição química e capacidade sequestrante de espécies reativas de
oxigênio e nitrogênio de mel orgânico brasileiro**

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

**Dissertação apresentada ao Centro de Energia
Nuclear na Agricultura da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre em
Ciências**

**Área de Concentração: Química na Agricultura e
no Ambiente**

**Orientador: Prof. Dr. Severino Matias de
Alencar**

Piracicaba

2017

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Silva, Camila Furtunato da

Composição química e capacidade sequestrante de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio de mel orgânico brasileiro / Camila Furtunato da Silva; orientador Severino Matias de Alencar. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2017.

86 p. : il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Antioxidantes 2. Compostos fenólicos 3. Compostos voláteis 4. Óxido nítrico 5. Radicais livres 6. Vitamina C I. Título

CDU 678.048 : 638.162

Dedico este trabalho com amor:

Aos meus pais António e Nilça,

Aos meus irmãos Danila e Gabriel,

A minha sobrinha Karyne,

Ao meu namorado Eduardo.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, pela presença sublime em todos os momentos da minha vida.

A minha família, por me apoiar sempre nas minhas decisões, por acreditarem em mim mesmo quando perco as esperanças. Agradeço principalmente aos meus pais, por todo o cuidado e amor. Aos meus irmãos Danila F. da Silva e Gabriel F. da Silva, e sobrinha Karyne F. de Lima por todo incentivo.

Ao meu namorado Eduardo C. Nogueira por todo estímulo, carinho, compreensão e paciência, nestes longos anos de caminhada.

As minhas amigas, companheiras de laboratório de Bioquímica e Análise Instrumental, Jackeline Soares, Fernanda Juliano, Anna P. Silva, Thalita Obara, Caroline P. Belmonte, por tornarem doce e leve a rotina diária de análises. Pela forte parceria durante as análises (Jackeline), traduções (Anna), ensinamentos (Fernanda, Thalita, Caroline). Ao meu querido amigo Luciano Campestrine, por toda ajuda e prontidão sempre. E ao novo membro do laboratório Daniel Moraes.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Severino, pela orientação e todo conhecimento transmitido, pela acessibilidade e paciência ao longo do mestrado.

Agradeço as técnicas do laboratório, Ivani Moreno e Adna P. Massarioli, por todo o auxílio, companheirismo, amizade ao longo destes dois anos.

Ao prof. Dr. Valdemar Tornisielo, do Laboratório de Ecotoxicologia-CENA/USP, pelo auxílio nas análises de LC-MS/MS e ao técnico do laboratório Rodrigo Pimpinato.

A prof. Dr. Renata Sermarini do departamento de Ciências Exatas da ESALQ/USP, pela orientação e análises estatísticas do projeto.

A empresa Breyer e Cia Ltda pelo fornecimento das amostras, principalmente ao Henrique Breyer e Daniel Breyer pela amizade, ensinamentos e todo auxílio proporcionado.

As minhas eternas amigas da casa 4 da vila da pós-graduação, Suzan Leite, Césia Flores, Isaneli Batista (companheira de quarto), Bruna Wruck, Kelly Alves, pelos bons momentos proporcionados, pelas risadas, amizade e parceria.

As amigas, maninhas, da graduação que mesmo longe continuam presente em cada vitória.

Aos funcionários da secretaria de Pós-graduação do CENA/USP, Fábio, Cleide, Gilson, e a bibliotecária Marília por todo auxílio.

Ao apoio do programa da Universidade de São Paulo, pela concessão da moradia na Vila da Pós-graduação.

Ao apoio financeiro CAPES/Proex pela concessão da bolsa.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

*“O que eu faço, é uma gota no meio de um oceano.
Mas sem ela, o oceano será menor.”*

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

SILVA, C. F. **Composição química e capacidade sequestrante de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio de mel orgânico brasileiro**. 2017. 86 p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2017.

O Brasil apresenta grande potencial para a exploração da apicultura, dado ao seu vasto território e flora diversificada, o que permite diferentes variedades de méis com propriedades únicas. O estado do Paraná é um dos maiores produtores de méis do país e o investimento em produção que atenda aos mercados mais exigentes estimulou a produção do mel orgânico. O conhecimento desde a antiguidade sobre os efeitos benéficos à saúde pelo mel vem estimulando a pesquisa deste alimento nobre. Assim, este trabalho teve por objetivo estudar méis orgânicos brasileiros certificados (MO) para a caracterização do perfil fenólico, volátil, além da avaliação da capacidade de sequestro das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Os méis foram coletados nos apiários de apicultores com certificação orgânica de dois municípios do sul do Paraná, General Carneiro e Turvo-PR. Nos ensaios foram utilizados extratos fenólicos dos méis, obtidos por meio da utilização da resina Amberlite® XAD®2, bem como méis brutos *in natura*. Os extratos apresentaram conteúdo de compostos fenólicos significativo, sendo o melato (MO5), de General Carneiro, o de maior teor ($117,68 \pm 4,40$ mg EAG/g). Para as análises de sequestro das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, os extratos fenólicos foram sempre superiores aos méis brutos *in natura*. Os extratos fenólicos, de maneira geral, apresentaram alta capacidade de sequestro para o radical peroxila ($\text{ROO}\bullet$), ácido hipocloroso (HOCl) e óxido nítrico ($\text{NO}\bullet$). Em relação aos melatos, o extrato MO7 apresentou alta capacidade para o sequestro do HOCl ($\text{EC}_{50} = 4,83 \pm 0,13$ $\mu\text{g/mL}$), enquanto que o MO5 foi melhor para o sequestro do $\text{NO}\bullet$ ($\text{EC}_{50} = 2,16 \pm 0,18$ $\mu\text{g/mL}$). Pelo método HPLC-ABTS *on-line* foi possível identificar e quantificar a contribuição para a atividade antioxidante do ácido ferúlico no extrato (MO1) e do flavonoide kanferol na amostra (MO4). O ácido ascórbico foi identificado e quantificado por HPLC somente nos melatos (MO3, MO5 e MO7). Pela técnica de LC-MS/MS foram identificados a presença dos seguintes compostos fenólicos: ácido caféico, rutina e hesperidina em todos os extratos. A análise de compostos voláteis por SPME-CG/EM mostrou a presença de dois compostos, encontrados apenas nos melatos, que foram o terpineno-4-ol, que possui ação antifúngica, antiparasitológica e anti-inflamatória; e o 3,4-dimetil-1-deceno, podendo assim serem

utilizados como marcadores químicos destes méis. O conhecimento da composição química destes méis, bem como a composição fenólica bioativa, contribui para o fornecimento de antioxidantes naturais para a dieta, atenuando assim os efeitos negativos dos radicais livres.

Palavras-chave: Compostos fenólicos. Compostos voláteis. Ácido ascórbico. ABTS-*on line*. SPME- CG/MS. Ácido hipocloroso (HOCl). Óxido nítrico (NO•). *Apis mellifera*.

ABSTRACT

SILVA, C. F. **Chemical composition and Nitrogen and Oxygen Reactive Species scavenging activity of Brazilian organic honey.** 2017. 86 p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2017.

Brazil has a great potential to explore beekeeping due to its vast territory and diversified flora, what allows different varieties of honeys with unique characteristics. Parana state is one of the largest honey producers and the investment in production that meets the most demanding markets stimulated the organic honey production. The knowledge since early in history regarding the beneficial health effects promoted by honey is stimulating the scientific research of this noble food. Thus, this paper aimed to study certified Brazilian organic honeys (MO) in order to determine the phenolic and volatile profiles, and also the evaluation of radical scavenging capacity against Nitrogen and Oxygen Reactive Species (RNS and ROS, respectively). The honeys were collected from apiaries from beekeepers with the organic certification from two municipalities of southern Parana, General Carneiro and Turvo, PR. In the essays, phenolic extracts were obtained from honeys by using Amberlite® XAD®2 resin, as well as crude *in natura* honeys. The extracts showed a significant content in phenolic compounds, with honeydew (MO5), from General Carneiro, showing the highest content ($117,68 \pm 4,40$ mg AGE/g). For the analyzes to determine the radical scavenging capacity against RNS and ROS, the phenolic extracts always showed up superior results in comparison to crude *in natura* honeys. Phenolic extracts showed, in general, great capacity to scavenge peroxy radical ($\text{ROO}\cdot$), hypochlorous acid (HOCl) and nitric oxide ($\text{NO}\cdot$). In relation to honeydews MO7 extract showed the highest capacity to scavenge HOCl ($\text{IC}_{50} = 4,83 \pm 0,13$ $\mu\text{g/mL}$) while MO5 was the sample with better capacity to scavenge $\text{NO}\cdot$ ($\text{IC}_{50} = 2,16 \pm 0,18$ $\mu\text{g/mL}$). By using HPLC-ABTS on-line method it was possible to identify and to quantify the ferulic acid in MO1 extract, a compound with an important contribution to the antioxidant activity of this sample, as well as the flavonoid kaempferol in MO4 sample. Ascorbic acid was identified and quantified by HPLC only in the honeydew samples (MO3, MO5 and MO7). The analyzes developed by LC-MS/MS techniques indicated the presence of the phenolic compounds caffeic acid, rutin and hesperidin in all the extracts. The analysis of volatile substances developed by SPME-GC/MS promoted the identification of two compounds found only in the honeydew samples. The compounds were the terpinen-4-ol,

which has antifungal, antiparasitological and anti-inflammatory activities; and 3,4-dimethyl-1-decene. Both compounds can be used as chemical markers of these honeys. The knowledge of the chemical composition of the studied honeys, as well as their bioactive phenolic composition, contributes to supply natural antioxidants to human diet, thus attenuating the negative effects of free radicals.

Keywords: Phenolic compounds. Volatile compounds. Ascorbic acid. ABTS-on line. SPME – GC/MS. Hypochlorous acid (HOCl). Nitric oxide (NO•). *Apis mellifera*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1. As abelhas da espécie <i>Apis mellifera</i>	17
2.2. O Mel.....	18
2.3. Mel orgânico.....	21
2.4. Propriedades do mel	22
2.5. Importância econômica do mel	23
2.6. Radicais livres e espécies reativas	25
2.7. Antioxidantes.....	27
2.8. Compostos fenólicos	28
2.9. Compostos voláteis em méis	32
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.1. Coleta das amostras de mel orgânico	34
3.2. Extração dos compostos fenólicos dos méis.....	35
3.3. Teor de compostos fenólicos totais	36
3.4. Atividade antioxidante dos extratos e méis bruto <i>in natura</i>	37
3.4.1. Desativação de espécies reativas de oxigênio.....	37
3.4.1.1. Sequestro do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$).....	37
3.4.1.2. Sequestro do ácido hipocloroso ($HOCl$).....	37
3.4.1.3. Sequestro do radical peroxila ($ROO^{\cdot}$).....	38
3.4.2. Desativação de espécies reativas de nitrogênio.....	38
3.4.2.1. Sequestro do óxido nítrico ($NO^{\cdot}$).....	38
3.5. Composição química	39
3.5.1. Determinação simultânea de compostos fenólicos e atividade antioxidante on-line por HPLC-DAD-UV.....	39
3.5.2. Determinação da composição química por CG/EM	40
3.5.3. Determinação de ácido ascórbico por HPLC-DAD-UV ABTS $^{\cdot+}$ on-line	40
3.5.4. Determinação de compostos fenólicos por LC-MS/MS.....	41
3.5.5. Determinação da fração volátil do mel pela técnica de microextração em fase sólida (SPME)	41
3.6. Análise dos resultados	42

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1. Avaliação da metodologia de extração de compostos fenólicos.....	43
4.1.1. <i>Efeito da temperatura no teor de compostos fenólicos durante o armazenamento..</i>	44
4.2. Determinação do teor de compostos fenólicos totais dos méis orgânicos	45
4.3. Capacidade sequestrante de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.....	47
4.4. Determinação simultânea de compostos fenólicos e atividade antioxidante <i>on-line</i> por HPLC-DAD-UV	51
4.5. Determinação de compostos fenólicos por LC-MS/MS	55
4.6. Determinação de ácido ascórbico por HPLC	57
4.7. Determinação da fração volátil do mel pela técnica de CG/EM.....	60
5. CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS.....	70

1. INTRODUÇÃO

O mel é um alimento viscoso, aromático, doce, consumido e apreciado por pessoas em todas as partes do mundo (SILVA et al., 2016). É utilizado a mais de 4.000 anos, inclusive para a prevenção de diversas doenças, e atualmente vem sendo “redescoberto” pela população e pesquisadores (SPITERI et al., 2017).

As propriedades biológicas do mel, somado às exigências de qualidade deste produto pelos mercados internacionais, bem como a busca por alimentos livres de agrotóxicos e o respeito à preservação do meio ambiente, tem feito com que a produção de mel orgânico ganhe destaque (DAROLT, 2002).

Estima-se que o mel produzido em um dia é o resultado de pelo menos 1 milhão de interações entre abelhas e flores (BATISTA et al., 2012). É uma matriz rica em compostos, como açúcares, vitaminas, proteínas e fitoquímicos, como os compostos fenólicos, sendo que o seu conteúdo total depende da espécie de planta a partir da qual as abelhas recolhem o néctar (OROIAN; ROPCIUC, 2017). Há relatos que estes componentes podem atuar na diminuição da incidência de problemas cardiovasculares, favorecimento do sistema imunológico, prevenção doenças oculares, além de serem utilizados no tratamento de úlceras, feridas cutâneas e processos inflamatórios (LACHMAN et al., 2010). As doenças mencionadas possuem relação com o aumento de moléculas instáveis conhecidas como radicais livres, e particularmente as espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) (VASCONCELOS et al., 2007). Os compostos fenólicos são capazes de atenuar os efeitos destes processos, reduzindo assim o estresse oxidativo celular (CONFORTI et al., 2009).

Diversas são as formas para caracterização do mel, como, por meio da determinação das suas propriedades químicas, físicas ou biológicas (SORIA et al., 2004). Os méis são também comumente caracterizados por sua composição volátil, que compreende uma mistura complexa de diferentes famílias químicas, originadas de várias vias biosintéticas, incluindo terpenos, norisoprenóides e outros compostos, que são responsáveis pelas características de sabor e aroma (MANYI-LOH; NDIP; CLARKE, 2011).

Muitos trabalhos avaliaram a caracterização do mel para a compreensão da origem de suas propriedades bioativas, pois é grande o número de tipos de méis existentes, dado principalmente pela diversidade geográfica e botânica existente para sua produção.

Porém, pouquíssimos trabalhos trataram a caracterização e o estudo da capacidade de sequestro de espécies reativas por méis orgânicos, principalmente do mel brasileiro. Sendo assim, este trabalho tem como objetivo estudar méis orgânicos provenientes do Sul do Brasil, no que se diz respeito ao seu perfil fenólico, volátil e a capacidade de desativação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. As abelhas da espécie *Apis mellifera*

O centro de origem do gênero *Apis* é o sudeste da Ásia, onde várias espécies são encontradas. A *Apis mellifera* é nativa da África e expandiu-se naturalmente para Europa e Ásia, sendo introduzida pelos humanos para as Américas, algumas regiões da Austrália, Havaí, Japão e China (BREED, 2010). O gênero contém 11 espécies conhecidas, sendo a *A. mellifera* a mais importante para a apicultura, portanto fonte da maior parte de produção do mel no mundo (CRANE, 2009).

A introdução da *A. mellifera* no Brasil ocorreu em 1839 pelos portugueses, principalmente pelos padres Jesuítas, que extraíam a cera das abelhas para produção de velas. Em 1845, colonizadores alemães trouxeram mais abelhas, iniciando então a apicultura no sul do Brasil (SCHNEIDER; DeGRANDI-HOFFMAN; SMITH, 2004).

Em 1956, o geneticista Dr. Warwick Kerr liderou uma expedição para a África do Sul trazendo 36 rainhas africanas para o estado de São Paulo para a criação de abelhas que fossem mais produtivas, porém em outubro de 1957, um apicultor, acidentalmente deixou escapar 26 das abelhas rainhas africanas, ocorrendo então o processo de cruzamento natural entre as abelhas africanas com as europeias, assim este “acidente” mudou a história da apicultura para sempre, surgia então a abelha africanizada, que foram espalhadas para oeste e norte na América do Sul, América Central e México (ATHAYDE; STEPP; BALLESTER, 2016).

As abelhas africanizadas, embora muito produtivas, eram altamente agressivas o que fez com que os apicultores abandonassem a prática apícola. A retomada da apicultura só ocorreu após a conscientização de que com manejo apropriado era possível controlar as abelhas e foi assim que em 1980 houve a chamada “explosão doce”, quando o Brasil passou a ser um dos maiores produtores mundiais de mel subindo da 27ª posição para a 7ª (SOARES, 2004).

Para atingirem seu completo desenvolvimento, as abelhas passam por metamorfose, que é dividido em quatro fases: ovo, larva, pupa e inseto adulto. Tanto a rainha quanto as operárias são geradas a partir de ovos fertilizados com o mesmo genótipo, porém apresentam diferenças comportamentais de funções, fisiologia, morfologia e metabolismo (WANG; MA; XU, 2015). Já o zangão nasce de um ovo não-fecundado (óvulo) por reprodução assexuada ou partenogênese (WIESE, 2000).

Uma colônia de abelhas é constituída de uma abelha rainha, responsável pela reprodução, uma população, dependendo da época do ano, de zangões e milhares de abelhas operárias responsáveis pela execução de trabalhos dentro e fora da colmeia (ALI et al., 2016).

As abelhas realizam a tarefa vital de polinizar culturas agrícolas e espécies nativas. Portanto, são importantes economicamente na produção de produtos apícolas como mel, cera, geleia real, pólen e própolis, produtos que são amplamente utilizados como alimentos, bem como nas indústrias cosmética e farmacêutica (KEK et al., 2017; CHIESA et al., 2016; GBYLIK-SIKORSKA; SNIEGOCKI; POSYNIK, 2015).

As populações de abelhas são vulneráveis a contaminantes do ambiente, geradas pela industrialização, desenvolvimento habitacional e práticas agrícolas. Quando as abelhas saem para coletar água, néctar e pólen podem adquirir contaminantes no seu pelo corporal, por inalação ou pela ingestão dos poluentes presentes no pólen ou na água. Assim, abelhas ou mesmo os produtos das colmeias têm sido utilizados como bioindicadores de poluição ambiental, em relação à presença de resíduos de agrotóxicos, metais pesados e radionuclídeos (GÁRCIA-VALCÁRCEL et al., 2016).

2.2. O mel

O mel é um alimento natural elaborado pelas abelhas (*A. mellifera* ssp). Este alimento é resultado de múltiplas relações entre abelha e o meio ambiente (ATTANZIO et al., 2016). É também utilizado como adoçante em alimentos e a ciência ultimamente vem trabalhando no sentido de descobrir ou mesmo redescobrir suas propriedades biológicas (SPITERI et al., 2017).

A matéria-prima para elaboração do mel é o néctar das flores (mel floral), exsudados vegetais ou de excreções de insetos sugadores de partes vivas de plantas (mel extraflorais ou melato) (PERALTA et al., 2011; MANZANARES et al., 2011). Como exemplo de melato, nos períodos bianuais, a *Mimosa scabrella* Benthham conhecida popularmente como “bracatinga”, nativa do Brasil e de ocorrência na região sul do país, é infestada pela cochonilha (*Tachardiella* sp). Este inseto se alimenta da seiva da bracatinga excretando uma substância riquíssima em açúcares, sendo que as abelhas que se alimentam desta solução produzirão mel extrafloral ou melato, que dada essa interação ecológica tem o seu valor diferenciado, além de ser muito apreciado em toda Europa (SERAGLIO et al., 2016).

Há dezenas de tipos de mel de abelhas, que podem ser discriminados pela flora, lugar ou época de colheita. A origem do mel floral pode proceder do néctar das flores de uma única espécie vegetal (méis monoflorais) ou de várias (méis poliflorais). Precisamente, não existe

mel monofloral, porém, uma pequena quantidade de néctar de outras plantas não irá influenciar marcadamente no sabor e cor de um mel com predominância do néctar de uma única espécie de flores (BASTOS et al., 2002).

A produção propriamente dita do mel ocorre quando as abelhas misturam o néctar coletado com secreções das glândulas salivares e transportam esta substância até a colmeia, onde a mistura é distribuída para outras abelhas especializadas. Estas, por sua vez, são responsáveis pela etapa de amadurecimento, seguida da deposição nos favos. Cerca de 50% da água é retirada pela ventilação até que o teor de umidade esteja em torno de 18%. Após isto, as abelhas procedem a etapa de operculação com o fechamento dos alvéolos dos favos (WHITE JUNIOR, 1978). No néctar, do transporte até o armazenamento nos alvéolos, ocorrem transformações em sua concentração e composição química, a qual é mediada por enzimas. O néctar do trajeto da boca ao papo das abelhas (vesícula melífera) sofre a ação das enzimas invertase, amilase e glicose-oxidase, tornando assim pronto para ser regurgitado nos alvéolos do favo. Parte das reações nos alvéolos ocorre para a maturação do mel (CRANE, 1985).

O consumo de mel pelo homem é relatado desde a antiguidade, sendo que seu uso era estimulado pelo valor nutritivo e terapêutico (MEO et al., 2016). Este alimento contém aproximadamente 80% de carboidratos (35% de glicose, 40% frutose e 5% de sacarose) e 20% de água (Tabela 1), servindo assim como uma excelente fonte de energia (KAHRAMAN et al., 2010).

Tabela 1- Composição média nutricional de mel floral e mel extrafloral (melato)

	Mel floral	Mel extrafloral
	*Média	*Média
Água	17.2	16.3
Açúcares totais	79.7	80.5
Monossacarídeos		
Frutose	38.2	31.8
Glicose	31.3	26.1
Dissacarídeos		
Sacarose	0.7	0.5
Outros	5.0	4.0
Trissacarídeos		
Oligossacarídeos	3.1	10.1
Erlose	0.8	0.1
Melezitose	<0.1	4.0
Outros	0.5	3.0
Minerais	0.2	0.9
Amino ácidos, proteínas	0.3	0.6
Ácidos	0.5	1.1
pH	3.9	5.2

Legenda: *Média em grama por 100 gramas de mel

Fonte: Adaptado de Ajibola, Chamunorwa e Erlwanger (2012).

Em menores quantidades estão presentes aminoácidos, lipídeos, vitaminas, pigmentos, óleos essenciais, esteróis, fosfolípidos, enzimas, ácidos orgânicos, sais minerais e compostos fenólicos (PITA-CALVO; VÁSQUEZ, 2017).

Os aminoácidos presentes são histidina, glicina, alanina, prolina, sendo este último o principal, variando de 50-85% (p/p) do teor total de aminoácidos (PITA-CALVO; VÁSQUEZ, 2017; HERMOSÍN; CHICÓN, CABEZUDO, 2003).

Em relação às vitaminas, são encontradas normalmente o ácido ascórbico (vitamina C), tiamina (vitamina B1), ácido pantotênico (vitamina B5), riboflavina (vitamina B2), ácido nicotínico (vitamina B3), piridoxina (vitamina B6), biotina (vitamina B8), ácido fólico (vitamina B9) e cianocobalamina (vitamina B12) (CIULU et al., 2011). Dentre as vitaminas presente no mel, a mais importante é a vitamina C (ácido ascórbico), conhecida por suas propriedades redutoras, antioxidante natural, bem como pela sua importância para fins terapêuticos e também no metabolismo biológico. Participa ainda da formação do colágeno,

tecido conjuntivo, ossos, dentes, vasos sanguíneos, aumenta a absorção de ferro inorgânico e auxilia o organismo na assimilação de aminoácidos (SILVA et al., 2012).

Em relação aos minerais, o mais abundante é o potássio, porém contém ainda cálcio, sódio e elementos traços importantes como ferro, cobre, zinco e manganês (ALQARNI et al., 2014). Os ácidos orgânicos presentes incluem o fórmico, butírico, tartárico, pirúvico, acético, cítrico, succínico, málico, α -cetoglutárico, entre outros.

O que confere característica única ao mel, dentre outros adoçantes, é a presença de enzimas. Essas provêm das leveduras, néctar, pólen, das abelhas e micro-organismos. As enzimas mais importantes no mel são a glicose oxidase (responsável pela conversão da glicose em ácido glucônico), fosfatase ácida, invertase e diástase (SIDDIQUI et al., 2017). Por isto o mel é apreciado não apenas pelo seu sabor, mas também pelo elevado valor nutritivo e pela sua contribuição para a saúde (PITA-CALVO; VÁSQUEZ, 2017).

A composição do mel varia de acordo com os tipos de plantas que a abelha coleta o néctar, porém alguns compostos fenólicos são normalmente encontrados nos diversos tipos de méis, como os ácidos caféico, elágico, ferúlico, *p*-cumárico; flavonoides como apigenina, crisina, galangina, hesperidina, kanferol, pinocembrina e quercitina (PATRÍCIA et al., 2015).

2.3. Mel orgânico

O uso de agrotóxicos aumentou significativamente nas últimas décadas, impulsionados pela agricultura de alta tecnologia. Por outro lado, estas substâncias atingem não só o alvo de destino, mas também podem ser disseminados para o solo, água e alimentos causando disfunções nos seres humanos, animais e ao ecossistema. São potencialmente cancerígenos e causadores de disfunções no sistema nervoso e reprodutivo (LLORENT-MARTÍNEZ et al., 2011; TETTE et al., 2016). Por isto, é crescente a busca por alimentos produzidos sem o auxílio de agrotóxicos.

A produção orgânica de mel é baseada no sistema, que incentiva o uso de boas práticas agrícolas para manter o equilíbrio do ecossistema agrícola e promover a utilização sustentável dos recursos naturais, a qualidade ambiental, a saúde e o bem-estar de homens e animais (EUROPEAN UNION - EU, 2007). Também apresenta o caráter social, de assegurar empregabilidade para pequenos produtores, acesso a alimentação das famílias dos produtores evitando o êxodo rural (DAROLT, 2002).

A agricultura orgânica foi introduzida há menos de um século pelo filósofo austríaco Rudolf Steiner e, desde então, as áreas de produção orgânica têm aumentando globalmente,

impulsionadas pela demanda dos consumidores, principalmente da Europa e Estados Unidos. No entanto, ainda apenas 1 % da produção agrícola total atende a prática de cultivo orgânico (LORENZ; LAL, 2016).

No Brasil, na década de 80, houve uma expansão na busca por produtos orgânicos devido ao crescimento da conscientização ecológica e a busca por alimentos mais saudáveis. Portanto, neste período foram criadas várias cooperativas para produção de produtos orgânicos (ORMOND, 2002).

Para receber a certificação de orgânico, no caso do mel, o mesmo deve estar isento de qualquer contaminação química até o processo de embalagem final, mesmo à associada ao processo natural de migração das abelhas em busca das floradas, que os apicultores não podem controlar, pois estas podem estar contaminadas (BRASIL, 2007). Para que o mel seja seguro ao consumo humano, ele deve estar isento de qualquer contaminante de natureza química ou biológica. Contaminação indireta, por componentes químicos, pode ocorrer durante a aplicação de agrotóxicos na agricultura (PINHO et al., 2010).

A alimentação das abelhas deve ser especial, abelhas doentes devem ser afastadas e não se pode usar antibióticos para que o mel não perca a certificação de orgânico. A apicultura deve ser conduzida somente em plantações e pomares declarados como orgânicos, e os mesmos não devem sofrer ação de agrotóxicos em um raio de 4,8 km, nem estarem próximas a estações de tratamento de esgotos e estradas principais a um raio de 3,2 km (BRASIL, 2007).

O valor agregado estimula a produção de mel orgânico e amplia a oportunidade de desenvolvimento de uma região ou país. Sendo assim, as áreas de agricultura orgânica têm oferecido uma oportunidade ímpar para uma maior renda aos produtores (GEBREEYESYS; SONOBE, 2012).

2.4. Propriedades do mel

O mel possui várias atividades biológicas, bioquímicas e fisiológicas demonstradas em humanos e em animais (RAO et al., 2015). É um alimento funcional, pois além de nutrir pode contribuir de forma efetiva na prevenção e tratamento de doenças (ANJO, 2004).

A utilização do mel pode ser identificada desde a pré-história, com evidências de seu uso medicinal. Os interesses científicos, médico e do público em geral por compostos bioativos estão proporcionando a volta da exploração das propriedades dos méis. Sabe-se que tanto a origem botânica e geográfica do mel, as condições climáticas e ambientais,

influenciam sua composição, atividade antioxidante e características de benefício à saúde (EL-HASKOURY et al., 2017).

Da antiguidade até a atualidade, o mel é bem conhecido por seu alto valor nutricional e medicinal, possuindo efeitos cardioprotetor (ALVAREZ-SUAREZ et al., 2010; YAGHOUBI et al., 2008; AL-WAILI, 2004), anti-inflamatório (NOOH; NOUR-ELDIEN, 2016), antimicrobiano (BUENO-COSTA et al., 2016; SHOKRI; SHARIFZADEH, 2017) e cicatrizante (ALVAREZ-SUAREZ et al., 2016).

Sabe-se que os produtos apícolas, como o mel, apresentam potencial anticarcinogênico, porém ainda são necessários estudos para entender o mecanismo de ação (PREMRATANACHAI; CHANCHAO, 2014). O potencial profilático e terapêutico do mel na saúde humana, pode ser atribuído à presença de vários compostos (EL-HASKOURY et al., 2017), como os responsáveis pela atividade antioxidante (DRAGHI; FERNANDES, 2017). Assim, as técnicas terapêuticas que utilizam produtos apícolas que protegem e fortalecem o sistema imunológico são conhecidas como apiterapia (CAN et al., 2015).

2.5. Importância econômica do mel

Apesar do mel ser um produto de importância econômica no Brasil, poucos dados estão disponíveis para consulta e nem sempre são de fontes confiáveis.

A produção de mel no Brasil (Figura 1) foi de 37,82 mil toneladas em 2015, sendo a região sul a maior produtora, seguido da região Nordeste e Sudeste. O Paraná assumiu a primeira posição nacional com produção de 6,29 mil toneladas, seguido do Rio Grande do Sul (4,96 mil toneladas), Bahia (4,60 mil toneladas) e Minas Gerais (4,37 mil toneladas), ficando Santa Catarina na sétima posição do ranking nacional (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2015).

Figura 1- Estatística da produção de mel no Brasil

Fonte adaptada: IBGE (2015).

O aumento do consumo do mel nos últimos anos foi impulsionado por ser um produto natural, versátil e com propriedades antioxidantes, sendo ainda muito utilizado como aditivo em alimentos e bebidas (PASIAS; KIRIAKOUA; PROESTOS, 2017).

O Brasil apresenta alto potencial para a apicultura pela diversidade de sua flora, clima favorável e um extenso território. Em 2016 o Brasil exportou 24.202.954 kg de mel, um aumento de 8,99% em relação ao ano anterior (22.205.764 kg). A média do preço do mel foi de US\$ 3,80/kg, um aumento de 3,32% em relação ao ano de 2015 (US\$ 3,68/kg).

De acordo com a Associação Brasileira de Exportadores de Mel (ABEMEL, 2017), o principal país importador de mel brasileiro são os Estados Unidos (EUA), onde as exportações para este país representaram 81,52% do volume total exportado em 2014, seguido do Canadá (6,49%) e Alemanha (5,75%). Ainda segundo a associação, as importações de mel brasileiro pelos países europeus somam 2.680.432 kg, o que corresponde a 10,36% do volume total exportado pelo país.

Os três principais países exportadores de mel são China, Argentina e Vietnã, os quais juntos exportaram o volume de 233.965 toneladas de mel. O Brasil é apontado como o 8º maior exportador mundial de mel (25.317 toneladas), estando a frente da Alemanha e Chile (Tabela 2).

Tabela 2- Principais países exportadores de mel por volume

*Ranking mundial	País	Volume (toneladas)
1	China	129.824
2	Argentina	54.500
3	Vietnã	49.641
4	México	39.152
5	Ucrânia	36.336
6	Índia	26.976
7	Espanha	26.111
8	Brasil	25.317
9	Alemanha	22.547
10	Bélgica	20.006
15	Uruguai	10.725
20	Chile	7.034
Total mundial		623.657

Legenda: *Dados referem-se ao ano de 2014.

Fonte adaptada ABEMEL (2017).

2.6. Radicais livres e espécies reativas

O radical livre (RL) pode ser definido como um átomo ou molécula que apresenta um ou mais elétrons desemparelhados e nesta configuração, o composto torna-se suscetível à reatividade com a maioria das espécies químicas (VALKO et al., 2007; GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2000).

Os radicais livres mais importantes gerados nos organismos são conhecidos como espécies reativas de oxigênio e os radicais que contêm nitrogênio, as espécies reativas de nitrogênio (FERREIRA; ABREU, 2007). As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio podem ser radicais livres (contendo um elétron não emparelhado) como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), e radical hidroxila ($HO^{\bullet}$), ou não-radicalar como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso ($HOCl$) e peroxinitrito ($ONOO^-$) (HEMPEL; TREBAK, 2017).

A formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) são comuns e integrante do metabolismo humano sendo observadas em diversas condições fisiológicas, por exemplo, na geração de energia para alimentar processos biológicos na maioria dos organismos vivos como na fagocitose e na eliminação de agentes agressores (FERREIRA; ABREU, 2007) e durante o estresse oxidativo celular.

Quando o estresse oxidativo ocorre, o oxigênio pode levar à formação de RL/ERO, ao interagirem com moléculas do organismo (durante os processos celulares naturais) como o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxila ($\bullet OH$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Quando são gerados em maior concentração causam danos para o corpo, pois podem danificar ou modificar o ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA), proteínas, membranas celulares, enzimas, entre outras, causando perda de função ou morte celular. Estes danos estão associados a várias doenças neurodegenerativas (Alzheimer e Parkinson), câncer, diabetes, doenças cardiovasculares (aterosclerose), entre outras (CHAND et al., 2017).

Quando a produção de espécies reativas (ER) é elevada, o organismo pode controlar a produção, gerando equilíbrio destas espécies por intermédio de seu sistema antioxidante (SCHAFFER et al., 2001; FINKEL; HOLBROOK, 2000).

Os antioxidantes são agentes que anulam ou reduzem a oxidação pelo sequestro dos RL. O balanço vital e normal dos RL ou ERO nos organismos vivos é mantido pelos antioxidantes enzimáticos, tais como glutathione peroxidase, superóxido dismutase, glutathione reductase, catalase e antioxidantes não enzimáticos como alfa-tocoferol e ácido ascórbico, com ação protetora aos organismos contra os danos oxidativos (PEUCHANT et al., 2004).

As ERO são produzidas na cadeia transportadora de elétrons (CTE), na mitocôndria e nos complexos I e III (MURPHY, 2009). Na CTE, os elétrons NADH são transferidos para as moléculas de oxigênio (O_2) gerando moléculas de água (H_2O). Quando apenas um elétron é recebido, o O_2 é reduzido a superóxido ($O_2^{\bullet-}$), podendo ser convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Através da reação de Fenton, o H_2O_2 pode ser catalisado para formação de uma ERO altamente reativa, o radical hidroxila ($\bullet OH$) (THOMAS et al., 2009).

Nos neutrófilos ocorrerem a formação de ERN, como o óxido nítrico ($NO\bullet$), que é produzido endogenamente pela óxido nítrico sintase (ONS) por meio da conversão da l-arginina em l-citrulina (equação 1) (FREITAS; LIMA, FERNANDES, 2009).

As células do sistema imunológico produzem tanto $NO\bullet$ quanto $O_2^{\bullet-}$. Em condições inflamatórias, a elevação da concentração do $NO\bullet$ e $O_2^{\bullet-}$ pode contribuir com a formação de uma espécie mais reativa, o peroxinitrito ($ONOO^-$) (equação 2), que pode causar danos no DNA, comprometendo a viabilidade celular, bem como a oxidação lipídica (CARR; McCALL; FREI, 2000).

Além disto, nos alimentos, os radicais livres são a causa da oxidação lipídica, o que resulta em sua deterioração, principalmente nos alimentos ricos em gordura (KANNER et al., 1994).

Existe um grande interesse no estudo dos antioxidantes naturais devido, principalmente, às descobertas sobre o efeito negativo do desbalanço dos radicais livres nos organismos (VISIOLI et al., 2000; PIETTA, 2000), bem como o interesse pela busca de novos compostos antioxidantes para a substituição dos sintéticos.

2.7. Antioxidantes

Os antioxidantes previnem os efeitos deletérios dos radicais livres no corpo humano, e em alimentos, evitam a oxidação lipídica e de outros constituintes, que depreciam e prejudicam a aceitabilidade dos produtos (MOLYNEUX, 2004).

Os antioxidantes atuam na eliminação de processos que iniciam a peroxidação; quelatação de íons metálicos, impedindo assim que eles gerem espécies reativas ou decompondo os peróxidos; eliminação de $\text{O}_2\bullet^-$, prevenindo a formação de peróxidos; inibição da reação em cadeia da auto oxidação e/ou reduzindo as concentrações de O_2 (ASIMI; SAHU; PAL, 2013).

Os compostos antioxidantes não agem de maneira similar, cada qual possui um mecanismo de ação e, por isto podem ser classificados como capazes de inibir ou temporizar a oxidação por inativação de radicais livres, pela doação de átomos de hidrogênio ou elétrons, transformando assim os radicais em compostos estáveis. Já os compostos antioxidantes secundários participam de vários mecanismos de ação como: ligação de íons metálicos, inativando as ERO, convertendo assim o peróxido de hidrogênio em espécies não radicalares ou absorvendo a radiação UV (MAISUTHISAKUL; SUTTAJIT; PONGSAWATMANIT, 2007).

As fontes mais notáveis de antioxidantes naturais são as frutas e os legumes. O consumo destes vegetais leva a ingestão de polifenóis, flavonoides, carotenoides e ácido ascórbico. Uma dieta rica destes alimentos está associada a diminuição do risco da incidência de câncer e doenças relacionadas com o avanço da idade (LAU et al., 2005; PEREZ-VIZCAINO; DUARTE, 2010).

Por outro lado, existem os antioxidantes fenólicos sintéticos, tais como Butil-hidroxianisol (BHA), Butil-hidroxitolueno (BHT), Terc-butilhidroquinona (TBHQ), e o Propil Galato (GP), utilizados como conservantes de alimentos ou antioxidantes para estender a vida de prateleira de produtos alimentícios ricos em lipídeos (LI et al., 2009). No entanto, estudos apontam a associação desses compostos como prejudiciais ao fígado e promoção de câncer (ANAGNOSTOPOULOU et al., 2006). Por isto, tem-se buscado fontes alternativas em substituição aos antioxidantes sintéticos.

2.8. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos podem ser definidos, quimicamente, como substâncias que apresentam um anel aromático (C6) ligado a um ou mais grupos hidroxila (-OH), incluindo os seus derivados funcionais (Figura 2). São metabólitos secundários de plantas sintetizados a partir do ácido cinâmico, originado a partir da fenilalanina e em menor ocorrência da tirosina (via ácido chiquímico) (DEY et al., 2016; SHAHIDI; NACZK, 2003). Possuem papel importante na pigmentação, no crescimento e reprodução das plantas, assim como na resistência contra patógenos (GHASEMZADEH; GHASEMZADEH, 2011).

O ácido chiquímico é uma molécula chave na biossíntese de diversos metabólitos secundários. A via do ácido chiquímico representa o ponto central para a produção de muitos compostos envolvidos nas principais funções vitais das plantas, incluindo defesa, tais como flavonoides, ligninas, derivados de indol e muitos alcaloides aromáticos (SCALABRIN; RADAELLI; CAPODAGLIO, 2016).

Figura 2 - Classificação dos compostos fenólicos antioxidantes

Fonte: Shahidi e Ambigaipalan (2015)

Nas plantas, os compostos fenólicos participam de diversos processos vitais, tais como, lignificação, pigmentação de flores e frutos, polinização, crescimento, além de atuar como fator de proteção às condições de estresse, como radiação UV, deficiência de nutrientes, seca, defesa química contra insetos e patógenos microbianos (LATTANZIO; LATTANZIO; CARDINALI, 2006; GHASEMZADEH; GHASEMZADEH, 2011).

A sua estrutura química facilita a doação de hidrogênio ou elétrons do grupo hidroxila, posicionados ao longo do anel aromático, para atividades de sequestro de radicais livres e potencial quelante de metais (DEY et al., 2016). Os polifenóis são fortes antioxidantes que contribuem na defesa contra o estresse oxidativo causado pelo excesso de espécies reativas de oxigênio (HUANG et al., 2007).

Os ácidos fenólicos possuem um fenol ligado a um ácido carboxílico. São divididos em duas classes, os derivados dos ácidos hidroxibenzóicos (C6-C1) e os derivados do ácido hidroxicinâmico (C6-C3) (LEE; CHAN; MITCHELL, 2017) (Figura 3).

Estes compostos podem variar em estrutura, com diferenças no número e posição dos grupos hidroxila no anel aromático (KIM et al., 2006). É uma das classes mais importantes de ácidos orgânicos, presente frutas, legumes, plantas e mel (LI et al., 2016).

Figura 3 - Exemplos de estruturas químicas de ácidos fenólicos

Fonte: Tsao (2010).

Os flavonoides (Figura 4) representam a maior classe dos compostos fenólicos. São compostos de baixo peso molecular com um esqueleto de difenilpropano (C₆-C₃-C₆), constituído por dois anéis aromáticos, designados A e B, que são unidos por três átomos de carbono, formando um terceiro anel (chamado C), oxigenado e heterocíclico (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996; MATIAS; BUOSI; GOMES, 2016). Podem ser divididos em diferentes grupos dependendo do grau de oxidação do carbono da posição 4, do padrão de hidroxilação e da substituição da posição C3 (TESTAI, 2015). São comumente encontrados em vegetais, chá e vinho tinto (LI et al., 2015).

Figura 4- Exemplos de estruturas químicas de flavonoides

Fonte: Tsao, 2010.

Os estilbenos são caracterizados por apresentar em sua estrutura a presença de um núcleo 1,2-difeniletileno. Podem ser divididos em estilbenos monoméricos e oligoméricos (SHEN; WANG; LOU, 2009). Nas plantas, os estilbenos apresentam ação protetora contra estresses bióticos (KISELEV et al., 2016). O mais importante estilbeno é o resveratrol (3,4',5-trihidroxiestilbeno), comumente encontrado em uvas, *berries*, amendoim e vinho (PAUL et al., 2010).

As cumarinas possuem como estrutura molecular básica a 1,2-benzopirona (BEILLEROT et al., 2008). O composto mais simples desta classe é a cumarina, que é uma lactona derivada de ácido-hidroxicinâmico (LEITE et al., 2015). São encontradas em fungos, bactérias e plantas, particularmente em plantas comestíveis de diferentes famílias botânicas (WITAICENIS et al., 2014).

As lignanas são formadas a partir do acoplamento oxidativo de duas porções fenilpropano (C6-C3) unidas aos átomos do β -carbono. Outras oxidações e reações de formação de anel resultam em diferentes classes e estruturas de lignanas (PEUHU et al., 2013). Estão presentes em oleaginosas, sementes, frutas, legumes, nozes, cereais e chá (LANDETE, 2012).

Os taninos são polímeros de unidades de flavan-3-ol ligados primariamente por ligações C4-C8, com ligações C4-C6 o que dá origem a ramificação do polímero (FIGUEROA-ESPINOZA et al., 2015). São classicamente divididos em dois grupos, hidrolisável e não-hidrolisável (condensado), com base na sua resistência ou não a hidrólise em presença de água quente ou enzimas que catalisam estas reações. A divisão também pode ser realizada de acordo com suas características estruturais em quatro grupos: galotaninos, elagitaninos, taninos complexo e taninos condensados (KHANBABAEI; VAN-REE, 2001). Os taninos conferem a característica de adstringência, sendo encontrado em diversas espécies vegetativas, como por exemplo, romã, uvas e castanhas (ROMANI; CAMPO; PINELLI, 2012).

Portanto, os compostos fenólicos têm sido extensivamente estudados devido as suas propriedades, aos seus diversos benefícios para a saúde como antioxidantes, e para a prevenção de doenças inflamatórias, cardiovasculares, câncer e diabetes (ACOSTA-ESTRADA; GUTIÉRREZ-URIBE; SERNA-SALDÍVAR, 2014). Além disso, influenciam nas características nutricionais dos alimentos, contribuindo com a cor, sabor, aroma, sendo este último atribuído principalmente aos fenóis voláteis que são produzidos mediante a hidrólise de álcoois superiores ou até mesmo pelo metabolismo de micro-organismos, como leveduras e bactérias (RODRÍGUEZ et al., 2009).

2.9. Compostos voláteis em méis

Os compostos voláteis nos méis se apresentam em baixas concentrações, e são uma mistura complexa de substâncias com diversas propriedades físico-químicas e vários níveis de estabilidade (PLUTOWSKA et al., 2011). Pertencem a diversas classes químicas, como álcoois superiores, ésteres, ácidos graxos, cetonas, terpenos e aldeídos (PONTES; MARQUES; CÂMARA, 2007).

Embora todos os tipos de mel tenham um sabor/aroma intrínseco comum, cada néctar de flor ou secreções de plantas conferem diferentes aromas e sabores específicos que influenciam fortemente as suas características distintivas (ESCRICHEA et al., 2017).

Alguns compostos voláteis presentes em um tipo de mel podem ser utilizados como marcadores químicos na determinação de sua origem floral (NAYIK; NANDA, 2015). Assim, diferentes tipos de méis podem ser distinguidos por um composto característico. No entanto, o aroma da maioria dos méis depende de um grupo de compostos, como por exemplo, o furfuril mercaptano, o álcool benzílico, a δ -octalactona, a γ -decalactona, o eugenol, o ácido benzóico, o ácido isovalérico, o álcool fenil etílico e o 2-metoxifenol foram considerados compostos voláteis importantes na caracterização do mel de caju enquanto que o ácido isovalérico, γ -decalactona, ácido benzoico e vanilina para o mel de marmeleiro, ambos méis brasileiros (MOREIRA et al., 2002). Para o mel de melato de Carvalho (*Quercus ilex*), os compostos aminoacetofenona e propilanisol foram os mais importantes (JERKOVIĆ; MARIJANOVIĆ, 2010).

Geralmente a determinação da origem botânica do mel é realizada por análise de pólen (melissopalínológica), no entanto, esta técnica apresenta várias desvantagens, principalmente devido à alta habilidade requerida para interpretação dos resultados. Além disso, pode ocorrer falha analítica, especialmente quando uma pequena quantidade de pólen está presente no mel (BIANCHI et al., 2011).

A Cromatografia Gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) combina alta eficiência de separação e sensibilidade, fornecendo dados qualitativos e quantitativos na separação de compostos voláteis, sendo então a técnica geralmente empregada para determinação do perfil volátil (CUEVAS-GLORY et al., 2007).

A identificação de compostos aromáticos se torna desafiadora, pois nem sempre há concordância dos compostos propostos como marcadores, já que podem existir diferenças, mesmo dentro de um único tipo de mel de uma única origem floral, devido à variedade vegetal, origem geográfica ou local de produção (CASTRO-VÁZQUEZ et al., 2009).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta das amostras de mel orgânico

Foram coletadas 8 amostras de méis orgânicos provenientes de apiários localizados em dois municípios do sul do Paraná-PR, General Carneiro (26° 25' 44" Sul, 51° 19' 2" Oeste) e Turvo (25° 2' 47" Sul, 51° 32' 32" Oeste), nos meses de dezembro de 2015 a fevereiro de 2016 (Tabela 3). As amostras estavam de acordo com as normas de certificação internacional National Organic Program- USDA NOP e do European Organic Regulations -CEE (Processo nº 23511) e Brasil Orgânico (Processo nº 11-0030.11).

As Figuras 5 e 6 mostram o aspecto visual de um apiário de produção orgânica e de duas amostras de mel coletadas, respectivamente.

Tabela 3 - Localidades de amostragem do mel orgânico na região Sul do Brasil

Amostra	Cidade	Região	Apicultor	Coleta	Tipo (origem)
MO1	Turvo-PR	1	A	Novembro/2015	Mel (polifloral)
MO2	Turvo-PR	2	A	Novembro/2015	Mel (polifloral)
MO3	General Carneiro-PR	1	B	Dezembro/2015	Melato (<i>Mimosa scabrella</i>)
MO4	General Carneiro-PR	2	B	Dezembro/2015	Mel (polifloral)
MO5	General Carneiro-PR	1	B	Fevereiro/2016	Melato (<i>Mimosa scabrella</i>)
MO6	Turvo-PR	1	A	Fevereiro/2016	Mel (polifloral)
MO7	General Carneiro-PR	2	B	Fevereiro/2016	Melato (<i>Mimosa scabrella</i>)
MO8	Turvo-PR	2	A	Fevereiro/2016	Mel (polifloral)

Figura 5 – Aspecto de um apiário de produção de mel orgânico

Figura 6 – Aspecto de amostras de méis orgânicos utilizadas no trabalho. A esquerda: mel melato; a direita mel polifloral

3.2. Extração dos compostos fenólicos dos méis

O método de extração foi realizado conforme proposto por Ferreres et al. (1991), com modificações. Para cada amostra de mel, 60 g foi dissolvido em 300 mL de água destilada, sendo a solução acidificada até atingir pH 2,0 com HCl (1M). A solução resultante foi misturada com 90 g da resina Amberlite® XAD®2 (poro 9 nm; tamanho da partícula 0,3-1,2 nm), agitada por 15 minutos em agitador magnético e então empacotada em coluna de vidro (40 x 2 cm) (Figura 7). O material contido na coluna foi eluído com 500 mL de água acidificada (pH 2,0) e na sequência com 500 mL de água destilada neutra para remoção de açúcares. Os fenólicos adsorvidos na fase sólida foram eluídos com 500 mL de metanol e, em

seguida, concentrado em evaporador rotativo sob baixa pressão a 50°C. O extrato fenólico de mel obtido foi liofilizado e mantido a -22°C, até o momento das análises. A água residual neutra (extrato aquoso) também foi liofilizada e analisada.

Figura 7- Extração compostos fenólicos em coluna de vidro utilizando resina Amberlite® XAD®2

3.3. Teor de compostos fenólicos totais

A análise do teor de compostos fenólicos totais foi realizada de acordo com o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, descrito por Al-Duais et al. (2009). Uma alíquota de 20 µL de solução de extrato fenólico de mel na concentração de 2.500 ppm (2,5 mg em 1 mL de água ultrapura) ou solução de mel bruto *in natura* na concentração de 20.0000 ppm (20 mg em 1 mL de água ultrapura) foram adicionadas em uma microplaca de 96 poços. Em seguida, 100 µL do reagente Folin-Ciocalteu 10% em água foi adicionado e, após 5 minutos, 75 µL da solução de carbonato de potássio 7,5% foram acrescentados. Após a incubação por 40 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo de luz, a absorbância foi feita em leitora de microplacas (SpectraMax M3, Molecular Devices), a 740 nm. Os resultados foram expressos em equivalente ao ácido gálico por grama de extrato ou mel, calculado por meio do ajuste

com uma curva de calibração do padrão de ácido gálico (20 a 120 µg/mL). A análise foi realizada em duplicata.

3.4. Atividade antioxidante dos extratos e méis bruto *in natura*

3.4.1. Desativação de espécies reativas de oxigênio

3.4.1.1. Sequestro do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

O radical superóxido foi gerado pelo sistema NADH/PMS e a sua capacidade do sequestro foi determinada monitorando o efeito dos extratos de mel ou mel bruto *in natura* na redução do NBT para diformazana, conforme Melo et al. (2015). Para análise utilizou-se 100 µL NADH (166 µM), 50 µL NBT (43 µM), 100 µL de solução de extrato ou solução de mel nas concentrações de 78 a 10.000 ppm e 50 µL PMS (2,7 µM) diluídos em tampão fosfato 19 mM, pH 7,4. O monitoramento foi realizado espectrofotometricamente a 560 nm durante 5 minutos, à temperatura ambiente. Os resultados foram expressos em EC₅₀ (µg/mL) de solução de extrato ou mel. A análise foi realizada em duplicata.

3.4.1.2. Sequestro do ácido hipocloroso (HOCl)

A capacidade de sequestro do ácido hipocloroso (HOCl) foi determinada pelo monitoramento do efeito dos extratos de mel ou mel bruto *in natura* sobre a oxidação do diidrorodamina (DHR) para rodamina 123, induzida pelo ácido hipocloroso, de acordo com Melo et al. (2015). O ácido hipocloroso foi preparado por meio de solução de NaOCl (1%) com seu pH ajustado para 6,2 com adição da solução de H₂SO₄ 10%. A concentração do ácido hipocloroso foi determinada em espectrofotômetro a 235 nm utilizando o coeficiente de absorção molar de 100 M/cm e a diluição em tampão fosfato (100 mM, pH 7,4). O meio reacional continha 100 µL tampão fosfato (100 mM, pH 7,4), 100 µL de solução de extrato de mel nas concentrações de 2.44 a 312 ppm ou solução de mel nas concentrações de 78 a 10.000 ppm e 50 µL de DHR (5 µM) e 50 µL HOCl (5 µM) diluídos em tampão fosfato (100 mM, pH 7,4). A análise foi realizada em espectrofotômetro utilizando o comprimento $\lambda_{excitação}$ = 485 nm e $\lambda_{emissão}$ = 528 nm a 37°C. Os resultados foram expressos como EC₅₀ (µg/mL de solução de extrato ou mel). A análise foi realizada em duplicata.

3.4.1.3. Sequestro do radical peroxila (ROO•)

O ensaio foi realizado para medir cineticamente a capacidade dos extratos e do mel bruto *in natura* em sequestrar o radical ROO• gerado pelo AAPH, comparando-os com o antioxidante Trolox, de acordo com Melo et al. (2015). Este ensaio é também conhecido como capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC). Utilizou-se 30 µL de solução dos extratos de mel na concentração de 78 ppm ou solução de mel na concentração de 10.000 ppm diluídos em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7.4, controle ou padrão (Trolox); 60 µL da solução de fluoresceína (508,25 mM) e 110 uL de solução de AAPH (76 mM). As soluções, amostras e padrão foram diluídas em tampão fosfato de potássio (100 mM, pH 7,4). A fluorescência foi monitorada a emissão de $\lambda_{excitação} = 485$ nm e $\lambda_{emissão} = 520$ nm a cada minuto, durante 2 horas à 37°C. O valor ORAC foi obtido por meio dos valores da fluorescência medidos a cada minuto. Após isso, a área abaixo da curva (AUC) foi calculada pela equação 1:

$$AUC = 1 + \frac{(f_1 + f_2 + f_3 \dots + f_i)}{f_0} \quad (1)$$

Onde f_0 é a fluorescência relativa ao tempo 0 e f_i , a fluorescência relativa ao tempo i . A AUC_{net} é calculada pela subtração da AUC do branco do valor da AUC das amostras ou padrão, segundo a equação 2:

$$AUC_{net} = AUC_{extrato/padrão} - AUC_{branco} \quad (2)$$

O valor ORAC foi calculado por meio da regressão linear, com base nos valores da AUC do Trolox e expresso em equivalentes ao Trolox (µmol/g de extrato ou mel). A análise foi realizada em duplicata.

3.4.2. Desativação de espécies reativas de nitrogênio

3.4.2.1. Sequestro do óxido nítrico (NO•)

A capacidade de sequestro do óxido nítrico (NO•) pelos extratos de mel ou mel bruto *in natura* foi determinada utilizando a diaminofluoresceína-2 (DAF-2) como sonda. O método

utilizado foi modificado de Czerwińska, Kiss e Naruszewicz (2012). Na presença de oxigênio, a DAF-2 pode capturar o $\text{NO}^\bullet$ gerado por nitroprussiato de sódio diidratado (SNP) resultando em sua forma triazólica (DAF-2T). Para preparo das soluções dos reagentes e diluições das amostras, utilizou-se o tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7,4). Foram utilizados os volumes de 50 μL de solução de extrato de mel nas concentrações de 3.9 a 500 ppm ou solução de mel nas concentrações de 78 a 10.000 ppm, 50 μL de solução SNP (10 mM), 50 μL de solução de DAF-2 (12,5 μM) e 50 μL de tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7,4). O monitoramento da fluorescência foi realizado espectrofotometricamente a cada 5 minutos durante 2 horas com comprimento de $\lambda_{\text{excitação}} = 495 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 515 \text{ nm}$. Os resultados foram expressos como EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$ de solução de extrato ou mel). A análise foi realizada em duplicata.

3.5. Composição química

3.5.1. Determinação simultânea de compostos fenólicos e atividade antioxidante *on-line* por HPLC-DAD-UV

A análise pelo sistema de cromatografia líquida acoplada ao sistema de atividade antioxidante *on-line* foi realizada de acordo com o método desenvolvido por Koleva et al. (2001), com modificações. Para análise os extratos de mel foram filtrados em filtro de 0,22 μm antes da injeção de alíquotas de 20 μL no cromatógrafo. A análise do sequestro do radical livre $\text{ABTS}^{\bullet+}$ por HPLC-ABTS *on-line* foi realizada utilizando a solução metanólica do radical livre $\text{ABTS}^{\bullet+}$ 7 mM, que foi ajustada para absorbância de $0,700 \pm 0,020$ a 734 nm e reagiu com os compostos separados da amostra pós-coluna durante aproximadamente 1 minuto. Os eluatos separados por HPLC foram primeiramente detectados pelo detector de arranjo de fotodiodos (DAD) e, após eluição da coluna, ocorreu a reação no *coil* (15 m $\times$ 0.25 mm i.d. PEEK tubing) com o radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$. A vazão do reagente do ABTS foi de 0,8 mL/min e a perda de cor foi detectada por meio de picos negativos à 734 nm, através de um detector de UV. A separação previa por HPLC foi realizada utilizando um cromatógrafo equipado com uma coluna ODS - A (C18, coluna de 4.6 x 250 mm, partículas de 5 μm), detector de arranjo de fotodiodos (SPD-M10AVp, Shimadzu Co) e detector de UV-Vis (SPD-20 AV, Shimadzu). A fase móvel consistiu em água/ácido fórmico (99,75/0,25%) (A) e acetonitrila/água/ácido fórmico (59,75%/40%/0,25%) (B). O gradiente de eluição aumentou gradativamente, iniciando com 10% de B e aumentando para 20% B (10 min), 30% B (20

min), 50% B (35 min), 50% B (32 min), 90% B (38 min), 90% B (40) e diminuindo para 10 % B (45 min), num fluxo de 1 mL/min. Os resultados foram analisados por meio do software Class-VP e a atividade antioxidante para o composto foi expressa em equivalente ao Trolox. A análise foi realizada em duplicata.

3.5.2. Determinação da composição química por CG/EM

Para análise da fração não volátil os extratos de mel foram primeiramente derivatizados. A quantidade de 3 mg de extrato por amostra foi adicionada a 100 µL do reagente derivatizante N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (MSTFA), a mistura homogeneizada e aquecida em estufa à 70 °C, durante 15 minutos. Em seguida, o reagente foi evaporado sob fluxo de gás nitrogênio e o produto da derivatização (derivados do trimetilsilil – TMS) rediluído em hexano (800 µL). Após homogeneização, o sobrenadante foi transferido para outro *vial* para injeção no CG-EM.

A programação de temperatura foi iniciada com 80°C, durante 1 minuto, passando a 200°C (1°C. min⁻¹) por 5 minutos, 250°C (8°C. min⁻¹) durante 5 minutos, 300°C (5°C. min⁻¹) por 10 minutos e 320°C (10°C. min⁻¹) durante 10 minutos, totalizando 60 minutos de análise. O Hélio foi utilizado como gás de arraste, numa taxa de 0,8mL/minuto. O injetor foi aquecido a 280°C, no modo “splitless”, e o volume de injeção foi de 400 nL. O detector operou no modo “scanning” (m/z 30-600). A integração foi feita por meio do software LabSolutions-GCMS. Os ácidos fenólicos e derivados foram identificados por comparação com os dados obtidos do CG-EM (tempo de retenção e fragmentação iônica), padrões autênticos silanizados e eluídos nas mesmas condições e com a biblioteca Wiley® 8.

3.5.3. Determinação de ácido ascórbico por HPLC-DAD-UV ABTS•+ on-line

A determinação de ácido ascórbico foi realizado a partir do método modificado de Bresolin e Hubinger (2014). Para análise, 200 g de mel bruto *in natura* foram diluídos em 20 mL de solução de ácido metafosfórico 3% (m/v), na sequencia foram filtrados em filtro de 0,22 µm antes da injeção de alíquotas de 20 µL no cromatógrafo. A fase móvel consistiu tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹ (pH 2,5) operando em modo isocrático, num fluxo de 1 mL/min. O método de sequestro do radical livre ABTS•+ por HPLC-RP-ABTS *on-line* foi realizado de acordo com o descrito no item 3.5.1 Os resultados foram analisados

por meio do software Class-VP e expressos em mg/100 g de de mel. A análise foi realizada em duplicata.

3.5.4. Determinação de compostos fenólicos por LC-MS/MS

Para a identificação e quantificação dos compostos fenólicos foi utilizado o cromatógrafo líquido (Agilent 1200) com sistema de ionização por electrospray acoplado a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo (Agilent 6410), coluna Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6 x 250 mm, partículas de 5 μ m). Para análise os extratos de mel foram filtrados em filtro de 0,22 μ m antes da injeção de alíquotas de 5 μ L no cromatógrafo. A fase móvel consistiu em água/ácido fórmico (99,75/0,25%) (A) e acetonitrila/água/ácido fórmico (59,75%/40%/0,25%) (B). O gradiente de eluição aumentou gradativamente, iniciando com 10% de B e aumentando para 20% B (10 min), 30% B (20 min), 50% B (35 min), 50% B (32 min), 90% B (38 min), 90% B (40) e diminuindo para 10 % B (45 min), num fluxo de 1 mL/min. Para a aquisição dos dados de massas foi feita a seleção do íon precursor e dos íons produtos por meio da injeção de 5 μ L de solução dos padrões. A escolha dos íons e energias de colisão e fragmentação foram otimizadas para cada analito usando o software “mass Hunter optimizer B.02.00”. O sistema de electrospray operou no modo positivo com 3500 V, gás nebulizador 43 psi e temperatura da fonte a 350°C. Foi utilizado gás nitrogênio como nebulizador e de colisão. O sistema operou no modo de monitoramento de reação múltipla (MRM). Para a aquisição dos dados e operação do equipamento o software “Agilent mass Hunter data aquisition” foi utilizado e para o processamento dos dados o software “quantitative analyses”. A quantificação foi realizada através da construção da curva de calibração (concentrações de 0.5 a 2.0 ppm) com a utilização dos padrões.

3.5.5. Determinação da fração volátil do mel pela técnica de microextração em fase sólida (SPME)

O procedimento de microextração em fase sólida (SPME) foi realizado por meio do uso da fibra Divinilbenzeno/Carboxeno/Polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PMDS, Supelco Inc., Bellefonte, PA. USA) SPME, de acordo com Acevedo et al. (2017). Antes do uso a fibra foi condicionada, na porta de injeção do Cromatógrafo Gasoso (270°C por 60 minutos). Cerca de 2 g de amostra de mel bruto *in natura* diluída em 2 mL de água ultrapura, foi inserida em *vials* de 4 ml os quais foram hermeticamente fechados com septo de PTFE. A solução

permaneceu sob agitação e aquecimento a 60°C, durante 20 minutos sem exposição da fibra para equilibrar. Em seguida a fibra foi exposta no *headspace* e mantida a 60 °C por 40 min. Após o tempo de exposição, a fibra foi removida do frasco e prontamente introduzida dentro do injetor do cromatógrafo gasoso Shimadzu 2010 acoplado a um detector de espectrometria de massas Shimadzu QP 2010 Plus. Os compostos extraídos pela fibra foram dessorvidos no injetor a temperatura de 240°C, por 5 minutos no modo *splitless*. As amostras foram separadas em uma coluna capilar (30 m x 0.25 mm x 0,25 µm, J & W Scientific, Palo Alto, CA) RTX-5MS (Crossbond 5% difenil/95% de dimetilpolissiloxano). Os espectros de massa e cromatogramas de íons totais (TIC) foram obtidos por escaneamento automático com energia de ionização de 70 eV, em faixa de massa de m/z 20-550. Utilizou-se a rampa de temperatura inicial de 50°C por 1,5 minutos, passando a 200°C por 4 minutos, 240°C (5°C min⁻¹) por 10 minutos, 280°C (1°C min⁻¹) por 10 minutos e 290°C (5°C min⁻¹) por 5 min, sendo o tempo total da corrida de 60 minutos. O gás hélio foi usado como gás de arraste a uma velocidade linear de 36,3 cm.s⁻¹. Os compostos voláteis foram identificados tentativamente por meio da comparação dos seus espectros de massas com as bibliotecas do equipamento (Wiley® 8 e 1,2 FFNSC) e pela comparação dos índices de retenção tabelados (IRt). Os índices de retenção foram obtidos pela injeção da mistura de padrões de *n*-alcanos (C7-C30), e calculados (IRc) de acordo com a fórmula proposta por Babushok, Linstrom e Zenkevich (2011). A quantificação foi realizada pela normalização de área corrigida, utilizando os recursos do software GC-Solution®.

3.6. Análise dos resultados

A análise de variância dos resultados foi realizada por meio do software R (versão 3.4.0) e a análise de componentes principais (PCA) pelo software The Unscrambler® 9.7. Para a comparação das médias foi aplicado o teste de *Tukey* a 5% de probabilidade.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação da metodologia de extração de compostos fenólicos

Em geral, o procedimento analítico para a determinação de compostos fenólicos envolve três etapas básicas: extração da amostra, separação analítica e quantificação (GÓMEZ-CARAVACA et al., 2006). A extração dos compostos fenólicos é influenciada pela sua natureza química, pelo método de extração e pelo tamanho de partícula da amostra. A solubilidade dos compostos fenólicos por sua vez depende da polaridade do solvente e do grau de polimerização (NACZK; SHAHIDI, 2004).

Um dos métodos utilizados para a extração dos compostos fenólicos do mel é por meio da utilização da resina Amberlite® XAD®2. O procedimento para extração com a utilização dessa resina gera 3 extratos: ácido, aquoso e metanólico.

De acordo com Pyrzynska e Biesaga (2009), a resina Amberlite® XAD®2 adsorve compostos fenólicos do mel com uma taxa de recuperação de 80-90%. Os compostos fenólicos são adsorvidos na coluna, enquanto que os açúcares e outros compostos mais polares são eluídos com água acidificada. A fração fenólica total então é desorvida utilizando metanol.

Utilizando-se então este método de extração, para a amostra de mel MO1, foi encontrado que extrato metanólico apresentou alto teor de compostos fenólicos, quando comparado com o extrato aquoso, ou seja, $55,82 \pm 2,81$ mg por grama de extrato. Já para o extrato aquoso, este teor foi de apenas 4,5 % em relação ao extrato metanólico (Tabela 4).

Tabela 4- Teor de compostos fenólicos totais e capacidade de sequestro do radical oxigênio (ORAC) para os extratos obtidos da amostra de mel orgânico MO1

Amostra	Compostos fenólicos totais ¹ (mg EAG/g)	ORAC ² (μ mol Trolox/g)
Extrato metanólico	$55,82 \pm 2,81^a$	$950,24 \pm 64,25^a$
Extrato aquoso	$2,49 \pm 0,03^b$	$51,38 \pm 4,05^b$

Legenda:¹ Valores expressos como equivalentes ao ácido gálico (EAG) por grama de extrato liofilizado. ² Valores expressos como equivalentes ao Trolox por grama de extrato liofilizado. Resultados são as médias $\pm$ desvio padrão da duplicata. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa a $p < 0,05$ (Tukey).

Foi também avaliada a capacidade de sequestro, pelos dos extratos metanólico e aquoso da amostra MO1, do radical peroxila pelo método ORAC. Esta análise novamente demonstrou um maior resultado para o extrato metanólico ($950,24 \pm 64,25$ $\mu\text{mol trolox/g}$ de extrato). O extrato aquoso apresentou apenas 5,4% da atividade em relação ao extrato metanólico, ou seja, $51,38$ $\mu\text{mol trolox/g}$, o que também corrobora com o teor de fenólicos presente nos respectivos extratos (Tabela 4).

4.1.1. Efeito da temperatura no teor de compostos fenólicos durante o armazenamento

Foi realizado um ensaio com duas amostras de mel orgânico (MO1 e MO2) para avaliar se o armazenamento do mel sob refrigeração e temperatura ambiente, durante o período de 60 dias, influencia no teor de compostos fenólicos totais.

No recebimento das amostras, as mesmas foram particionadas em duas partes, ficando uma porção sob refrigeração ($7^{\circ}\text{C} \pm 2,0^{\circ}\text{C}$) e outra sob temperatura ambiente ($30^{\circ}\text{C} \pm 5,0^{\circ}\text{C}$). Após o período de armazenamento, os compostos fenólicos foram extraídos das amostras e avaliados. Como resultado foi encontrado que o teor de compostos fenólicos totais não é influenciado pela temperatura durante a estocagem. Porém em relação à capacidade de sequestro do radical oxigênio (ORAC), foi verificado que o armazenamento a temperatura ambiente promoveu uma redução significativa da capacidade antioxidante (Tabela 5).

Tabela 5- Teor de compostos fenólicos totais e capacidade de sequestro do radical oxigênio (ORAC) por tipo de armazenamento

Amostra	Compostos fenólicos totais ¹ (mg EAG/g)		ORAC ² ($\mu\text{mol Trolox/g}$)	
	Ambiente	*Refrigeração	Ambiente	*Refrigeração
MO1	$70,45 \pm 3,87^a$	$72,20 \pm 5,81^a$	$1.048,0 \pm 48,46^a$	$1.357,85 \pm 58,60^b$
MO2	$69,17 \pm 2,01^a$	$62,03 \pm 4,51^a$	$892,65 \pm 80,32^a$	$1.230,45 \pm 45,89^b$

Legenda: ¹ Valores expressos como equivalentes ao ácido gálico (EAG) por grama de extrato liofilizado. ² Valores expressos como equivalentes ao Trolox por grama de extrato liofilizado. *Armazenamento sob refrigeração a 7°C . Resultados são as médias $\pm$ desvio padrão da duplicata. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa a $p < 0,05$ (Tukey).

Embora a composição fenólica não seja afetada pelo armazenamento, outros compostos que possuem ação antioxidante foram preservados quando estocados sob

refrigeração, visto pelas diferentes respostas obtidas quando os extratos foram avaliados pelo ORAC. Cabe ressaltar que, o método de determinação de compostos fenólicos totais não é específico para mensurar a capacidade antioxidante bem como quantificar todos os componentes que possuem ação antioxidante em uma amostra. Já o método ORAC é capaz de avaliar o este potencial.

Estes ensaios foram importantes para definição da melhor forma se armazenar as amostras, no intuito de manter as suas propriedades antioxidantes, possibilitando assim a realização deste trabalho. Com isto, jugou-se extremamente importantes manter as amostras sob refrigeração, preservando assim a sua capacidade antioxidante.

Esta avaliação também se faz importante, pois o mel é um alimento que sofre muitas transformações em sua composição química durante a estocagem em condições tropicais, como as do Brasil. As alterações que ocorrem durante o armazenamento têm importância nestes países devido às altas temperaturas atingidas. A compreensão destas modificações é relevante para a melhoria da qualidade e, conseqüentemente, da competitividade do mel brasileiro nos mercados nacionais e internacionais (MOREIRA et al., 2007).

4.2. Determinação do teor de compostos fenólicos totais dos méis orgânicos

O mel é uma matriz complexa contendo uma variedade de compostos orgânicos com atividade antioxidante, portanto fonte significativa de antioxidantes naturais para nutrição humana (ZALIBERA et al., 2008).

Os extratos dos 8 méis orgânicos avaliados em relação ao teor de compostos fenólicos totais estão apresentados na Figura 8.

Figura 8- Teor de compostos fenólicos totais dos extratos de mel

Legenda: ¹ Valores expressos como equivalentes ao ácido gálico (EAG) por grama de extrato liofilizado. Resultados são as médias $\pm$ desvio padrão da duplicata. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa a $p < 0,05$ (Tukey).

Os resultados obtidos para o teor de compostos fenólicos totais dos extratos de mel foram (MO1) $73,15 \pm 4,47$ mg EAG/g; (MO2) $59,79 \pm 3,54$ mg EAG/g; (MO3) $49,79 \pm 3,83$ mg EAG/g; (MO4) $52,20 \pm 3,32$ mg EAG/g; (MO5) $117,68 \pm 4,40$ mg EAG/g; (MO6) $84,08 \pm 4,59$ mg EAG/g; (MO7) $83,19 \pm 7,23$ mg EAG/g; (MO8) $53,03 \pm 4,70$ mg EAG/g.

O extrato do mel de melato (MO5) ($117,68 \pm 4,40$ mg EAG/g), proveniente da região de General Carneiro-PR, diferiu significativamente de todos os outros. Geralmente os méis mais escuros, como o mel de melato, apresentam maior conteúdo fenólico do que os méis mais claros (MEDA et al., 2005). Estas variações são justificadas por variáveis qualitativas e quantitativas da natureza de seus constituintes fenólicos provenientes da origem botânica (ALJADI; KAMARUDDIN, 2004). Por outro lado, a coloração mais escura no mel também pode ser atribuída a reação de Maillard, que comumente ocorre em mel quando em condições de armazenamento, não tendo relação com o teor de compostos fenólicos.

Silva et al. (2013) investigaram o extrato de mel brasileiro de jandaíra (*Melipona subnitida*) e encontraram valores na faixa de 80,2 a 166,1 mg EAG/g extrato, o que é semelhante aos obtidos para os méis orgânicos da região sul do Brasil. Entretanto, os resultados encontrados no presente trabalho são superiores aos extratos de méis das abelhas da espécie *M. s. merrillae* do Estado do Amazonas (17-66 mg EAG/g) avaliados por Silva et al. (2013) e dos obtidos para extratos de méis não brasileiros avaliados por Can et al. (2015),

onde foi encontrado $0,29 \pm 0,12$ para mel polifloral e $0,61 \pm 0,05$ mg EAG/g para mel de pinheiro (*Pinus L.*).

Para as amostras de mel bruto *in natura* não foi possível mensurar o teor de compostos fenólicos totais. Uma explicação é a de que os açúcares e proteínas são interferentes neste tipo de matriz e então precisam ser removidos, como etapa de preparação da amostra, antes de serem analisadas (CAMPONE et al., 2014). Então, como o mel apresenta alto teor de açúcares, este teria também um efeito “diluidor” dos compostos fenólicos totais, impossibilitando a determinação destes compostos por este método. Apesar disto, alguns trabalhos determinaram o teor de fenólicos em mel bruto, como nos trabalhos de Al et al. (2009) em que encontraram 0,23-1,5 mg EAG/g para mel de melato e de Nayik e Nanda (2016) onde obtiveram $0,37 \pm 0,03$ mg EAG/g para mel de açafrão. Porém, deve-se salientar que os valores encontrados foram muito baixos e a vitamina C, normalmente presente em alguns tipos de méis, além de outros compostos redutores, podem resultar em resultados falso-positivo.

Em relação a estudos com mel orgânico, a única referência encontrada foi o da região de Trás-Os-Montes em Portugal, onde foi encontrado o teor de fenólicos de $0,68 \pm 0,023$ mg/g extrato (ESTEVINHO et al., 2012).

4.3. Capacidade sequestrante de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

As espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) são substâncias que podem induzir a danos oxidativos a vários alvos biológicos (substratos oxidáveis), tais como ácidos nucleicos (por exemplo, modificação de bases, rupturas de cadeia simples e dupla), lipídios (peroxidação e perda de ácidos graxos) e proteínas (oxidação de resíduos de aminoácidos específicos e formação de carbonilas) (MAGALHÃES et al., 2009). Como consequência, pode haver sérias complicações biológicas, tais como carcinogênese, mutagênese, envelhecimento celular e aterosclerose.

Os méis foram avaliados primeiramente em relação à capacidade de sequestro do radical peroxila, medido pelo método ORAC. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 6, os extratos de mel apresentaram alta capacidade de sequestro do radical peroxila.

Tabela 6- Capacidade de sequestro do radical peroxila (ORAC) de extratos e méis bruto *in natura*

Amostra	Extrato ¹ ($\mu\text{mol Trolox/g}$)	<i>In natura</i> ² ($\mu\text{mol Trolox/g}$)
MO1	1.785,35 $\pm$ 473,34 ^{ab}	6,57 $\pm$ 0,43 ^{bc}
MO2	1.752,31 $\pm$ 309,77 ^a	6,34 $\pm$ 1,16 ^{bc}
MO3	878,01 $\pm$ 107,14 ^{ab}	9,68 $\pm$ 0,79 ^a
MO4	1.015,68 $\pm$ 97,08 ^{ab}	8,21 $\pm$ 0,97 ^{ab}
MO5	996,04 $\pm$ 97,07 ^{ab}	4,75 $\pm$ 1,17 ^c
MO6	1.050,28 $\pm$ 222,70 ^{ab}	n.d
MO7	1.081,48 $\pm$ 121,77 ^{ab}	6,85 $\pm$ 0,87 ^{bc}
MO8	835,54 $\pm$ 136,54 ^b	n.d

Legenda: ¹ Valores expressos como equivalentes ao Trolox por grama de extrato liofilizado. ² Valores expressos como equivalentes ao Trolox por grama de mel. n.d= não detectado. Resultados são as médias $\pm$ desvio padrão da duplicata. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa a $p < 0,05$ (Tukey).

A capacidade de sequestro variou de 835,54 $\pm$ 136,54 a 1.785,35 $\pm$ 473,34 μmol de equivalente ao Trolox/g de extrato. O maior valor ORAC foi obtido para o extrato de mel MO1 (1.785,35 $\pm$ 473,34 μmol de Trolox/g de extrato) da região do Turvo-PR. Valores semelhantes foram obtidos, porém para extratos de própolis orgânica brasileira desta mesma região (1.950 μmol de Trolox/g de extrato) (TIVERON et al., 2016). Entretanto, a própolis já é bem conhecida pela literatura por sua alta atividade antioxidante.

Para o mel bruto *in natura* os resultados variaram de 4,75 $\pm$ 1,17 a 9,68 $\pm$ 0,79 μmol Trolox/g de mel. Sousa et al. (2016) obtiveram resultados variando de 0,089 a 0,543 μmol Trolox /g para o mel bruto *in natura* brasileiro de *Ziziphus joazeiro* Mart. (juazeiro) e *Mimosa quadrivalvis* L (Malícia). Berete et al. (2005) avaliaram mel comercial e encontraram o valor de 6.30 $\pm$ 0.22 μmol Trolox/g, enquanto que para o mel polifloral o resultado obtido foi de 8.22 $\pm$ 0.42 μmol Trolox/g. Estes valores são próximos aos encontrados para o mel orgânico (bruto *in natura*) do sul do Brasil, apesar de possuírem origens botânicas diferentes.

Os resultados para a capacidade de sequestro do ácido hipocloroso estão mostrados na Tabela 7.

Tabela 7- Capacidade de sequestro do ácido hipocloroso (HOCl) de extratos e méis bruto *in natura*

Amostra	Extrato ¹ (EC ₅₀)	In natura ² (EC ₅₀)
MO1	12,01 ± 1,69 ^c	618,27 ± 44,94 ^b
MO2	14,45 ± 3,06 ^c	677,14 ± 55,66 ^b
MO3	15,94 ± 2,76 ^c	152,12 ± 5,12 ^d
MO4	9,46 ± 1,79 ^{cd}	211,07 ± 11,79 ^c
MO5	10,54 ± 2,57 ^{cd}	171,97 ± 6,13 ^{cd}
MO6	26,10 ± 0,99 ^b	1374,92 ± 22,43 ^a
MO7	4,83 ± 0,13 ^d	143,93 ± 9,55 ^d
MO8	40,92 ± 1,44 ^a	1176,66 ± 67,02 ^a

Legenda: ¹ Valores expressos como EC₅₀ em ug/mL de solução de extrato liofilizado. ² Valores expressos como EC₅₀ em ug/mL de solução de mel *in natura*. n.d= não detectado. Resultados são as médias ± desvio padrão da duplicata. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa a $p < 0,05$ (Tukey).

Os resultados expressos em EC₅₀ (quantidade mínima necessária para inibir a formação de 50% do composto de interesse) variaram de 4,83 a 40,92 µg/mL para os extratos de mel. Notadamente, a maior atividade de sequestro deste radical foi dada pelo extrato do melato MO7 (4,83±0,13 µg/mL), seguido do extrato do mel M04 (9,46 ± 1,79 µg/mL) e extrato do melato MO5 (10,54 ± 2,57 µg/mL).

O mel bruto *in natura* apresentou valores de EC₅₀ que variaram de 143,93 a 1176,66 µg/mL. Quando comparados os resultados obtidos com um dos pouquíssimos trabalhos que estudaram o sequestro desta ERO, apresentado por Dor e Manomoodally (2014) para mel de gengibre, eucalipto, longan, os méis orgânicos apresentaram alta atividade de desativação do HOCl.

Em relação à análise de sequestro do radical superóxido, não houve capacidade de desativação deste radical pelos extratos e mel bruto *in natura* até a máxima concentração testada (10.000 µg/mL). O mesmo resultado também foi obtido por Acevedo et al. (2017), para mel de Ulmo produzido no Chile.

O sistema de defesa antioxidante é complexo, e os compostos com ação antioxidante atuam por diferentes mecanismos de ação, além de ocorrência de interações sinérgicas e antagônicas entre eles. Por isto nem sempre uma matriz será positivamente avaliada por uma análise, com isto a necessidade existência diversos métodos, já que apenas um não seria capaz de mensurar precisamente e quantitativamente tais atividades.

Para a análise de sequestro da espécie reativa de nitrogênio (ERN), os extratos e mel bruto *in natura* foram avaliados quanto a desativação do óxido nítrico (NO•), conforme mostrado na Tabela 8.

Tabela 8- Capacidade de sequestro do óxido nítrico (NO•) pelo extrato e mel *in natura*

Amostra	Extrato ¹ (EC ₅₀)	In natura ² (EC ₅₀)
MO1	3,97 ± 0,21 ^{bc}	553,58 ± 50,58 ^c
MO2	4,80 ± 1,16 ^{abc}	304,67 ± 26,89 ^d
MO3	4,65 ± 1,04 ^{bc}	469,90 ± 20,85 ^c
MO4	6,54 ± 0,58 ^{ab}	786,19 ± 63,35 ^b
MO5	2,16 ± 0,18 ^c	228,79 ± 26,88 ^d
MO6	4,63 ± 0,58 ^{bc}	277,28 ± 14,64 ^d
MO7	2,39 ± 0,23 ^c	286,96 ± 54,08 ^d
MO8	7,85 ± 0,45 ^a	2107,74 ± 173,04 ^a

Legenda: ¹ Valores expressos como EC₅₀ em ug/mL de solução de extrato liofilizado. ² Valores expressos como EC₅₀ em ug/mL de solução de mel *in natura*. n.d= não detectado. Resultados são as médias ± desvio padrão da duplicata. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística significativa a $p < 0,05$ (Tukey).

Os extratos de mel apresentaram valores de EC₅₀ que variaram de 2,16 a 7,85, os quais foram superiores ao mel bruto *in natura* (228,79 a 2107,74 µg/mL) e aos encontrados por Dor e Manomoodally (2014).

Em altas concentrações o NO* pode reagir com o ânion superóxido e produzir o peroxinitrito (altamente reativo) (PELUFFO; RADI, 2007), que pode induzir a hidroxilação, oxidação, peroxidação lipídica e danos no DNA (RADI et al., 2001).

De acordo com os ensaios de avaliação da desativação de ERO e ERN, pode-se verificar que as amostras apresentam comportamentos distintos, possuindo assim diferentes mecanismos de ação antioxidante. Exemplificando pelo melato (MO5), o qual é o mel com maior teor de compostos fenólicos totais (117,68 ± 4,40 mg EAG/g de extrato), pode-se verificar que o mesmo apresentou alta capacidade para a desativação do NO*, porém uma das menores atividades para a desativação do radical peroxila (996,04 ± 97,07 µmol Trolox/g de extrato; 4,75 ± 1,17 µmol Trolox/g de mel bruto *in natura*).

Ademais, a estrutura química, número e posição de hidroxilas, dos compostos fenólicos facilita a doação de hidrogênio ou elétrons do grupo hidroxila, posicionados ao longo do anel aromático, para atividades de sequestro de radicais livres, isto explicaria as diferentes respostas para as análises de captura das ERO e ERN pelos extratos e mel bruto *in natura*.

4.4. Determinação simultânea de compostos fenólicos e atividade antioxidante *on-line* por HPLC-DAD-UV

Avaliaram-se também os extratos dos méis orgânicos pela técnica HPLC–DAD *on-line* (sequestro do radical ABTS^{•+}). Dentre os extratos estudados, são apresentados os cromatogramas das amostras MO1 e MO4. Nestes méis foram detectados vários compostos (picos negativos) que contribuíram significativamente com a atividade antioxidante pelo sequestro do radical ABTS^{•+} (Tabelas 9 e 10 e Figuras 8 e 9). Além disto, estas foram as únicas amostras em que foi possível identificar e quantificar compostos fenólicos.

A amostra MO1 apresentou 15 picos que contribuíram com a atividade antioxidante. O pico 1 (T_r= 3.23 min.) apresentou maior atividade antioxidante (121,29 ± 16,24 µmol Trolox/100 g), seguido dos picos 4 (T_r= 9.26 min.) com 68,61±27,45 µmol Trolox/100 g e 2 (T_r= 4.29 min.) com 61,38±5,51 µmol Trolox/100 g. Dos compostos detectados com atividade antioxidante, o pico 10 (T_r= 22.35 min.) foi identificado como ácido ferúlico (confirmado pela técnica de CG/EM), com uma concentração de 54,20±6,12 mg/100 g e apresentando atividade antioxidante de 32,98±5,78 µmol Trolox/100 g.

O ácido ferúlico é um ácido fenólico, derivado do ácido hidroxicinâmico, presente em vários alimentos, como em grãos, ervas, frutas cítricas, e outros. Além de ser um antioxidante, possui ação anti-inflamatória, anti-hiperlipidêmica e anti-hipertensiva, previne doenças cardiovasculares, como aterosclerose, hipertensão e insuficiência cardíaca (LIAO et al., 2017).

Tabela 9 - Caracterização dos picos identificados com atividade antioxidante do extrato do mel orgânico MO1 por HPLC – DAD *on-line* (sequestro do radical ABTS^{•+})

Amostra	n° pico	Tr (min.)	Composto	¹ Concentração mg/100g	Área (734nm)	² Atividade antioxidante (µmol Trolox/100 g)	Atividade antioxidante (%)
MO1							
	1	3.23	n.d	—	39.1924,5	121,29±16,2 4	17,39
	2	4.29	n.d	—	174.806	61,38±5,51	8,80
	3	6.66	n.d	—	154.982	55,91±6,53	8,02
	4	9.26	n.d	—	2.010.115	68,61±27,45	9,84
	5	10.08	n.d	—	42.512,5	24,88±6,57	3,57
	6	11.45	n.d	—	160.499	57,43±14,56	8,23
	7	13.64	n.d	—	57.165,5	28,92±0,19	4,15
	8	15.30	n.d	—	85386,5	36,71±9,91	5,26
	9	19.18	n.d	—	82.275,5	35,85±4,16	5,14
	10	22.35	Ác.ferúlico	54,20±6,12	68.631	32,98±5,78	4,60
	11	29.45	n.d	—	70.210	32,52±4,74	4,66
	12	31.10	n.d	—	76.138,5	34,15±12,64	4,90
	13	32.56	n.d	—	55.939	28,58±1,41	4,10
	14	38.96	n.d	—	131.280,5	49,37±31,65	7,08
	15	43,54	n.d	—	60.484,5	29,84±5,72	4,28

Legenda: ¹ Resultados expressos em mg por 100 grama de extrato liofilizado. ² Resultados expressos em equivalentes ao Trolox por 100 grama de extrato liofilizado. Parâmetro de quantificação e detecção do composto: LOQ= 0,02 µg e LOD=0,01 µg, R²=0,999. Parâmetro de quantificação e detecção da atividade antioxidante: LOQ= 0,71µg e LOD 0,24, R²= 0,999.Tr = Tempo de retenção em minutos.

Figura 8- Cromatogramas da amostra MO1 da cidade do Turvo, detectados a 267 nm (pico positivo) e 734nm (pico negativo) por HPLC – DAD *on-line* (sequestro do radical ABTS•+). Os números dos picos se referem à Tabela 9

A amostra MO4 apresentou 11 picos que contribuíram para atividade antioxidante a 734 nm. O pico 1 ($T_r = 3.34$ min.) apresentou maior atividade antioxidante ($266,51 \pm 151,41 \mu\text{mol Trolox}/100$ g), seguido dos picos 2 ($T_r = 8.98$ min.) com atividade de $55,32 \pm 0,66 \mu\text{mol Trolox}/100$ g e pico 11 ($T_r = 36.44$ min.), identificado como kanferol (confirmado pela técnica de CG/MS) com concentração de $44,76 \pm 26,64$ mg/100 g e atividade de $42,00 \pm 6,27 \mu\text{mol Trolox}/100$ g).

O kanferol é um flavonoide da classe dos flavonóis de ocorrência em vários vegetais, frutas e plantas medicinais (ZABELA et al., 2016). Possui efeito terapêutico contra câncer e processos inflamatórios, é um potente eliminador de radicais livres e radical superóxido (RAJENDRAN et al., 2014). Outros trabalhos apontam a presença do kanferol em mel de *Rubus* e *Castanea sativa* da Galícia (Noroeste da Espanha) que apresentaram concentração entre 0,016-0,138 mg/100 g (ESCUREDO et al., 2012). Em mel Polonês polifloral a concentração foi 0,153 mg/100 g (SOCHA et al., 2011). No mel de Manuka (*Leptospermum scoparium*) a concentração variou de 0,13-17 mg/100 g (YAO et al., 2003).

Tabela 10- Caracterização dos picos identificados com atividade antioxidante do extrato do mel orgânico MO4 por HPLC – DAD *online* (sequestro do radical ABTS^{•+})

Amostra	n° pico	Tr min.	Composto	¹ Concentração mg/100g	Área	² Atividade antioxidante μmol (Trolox/100 g)	Atividade antioxidante (%)
MO4							
	1	3.34	n.d	—	918231,5	266,51±151,41	43,27
	2	4.28	n.d	—	152857	55,32±0,66	8,98
	3	10.07	n.d	—	71751	32,94±3,09	5,35
	4	11.00	n.d	—	58693	29,34±5,99	4,76
	5	12.83	n.d	—	41371,5	24,56±1,90	3,99
	6	19.23	n.d	—	89324	37,79±19,70	6,14
	7	20.52	n.d	—	73052,5	33,30±12,72	5,41
	8	25.52	n.d	—	62814,5	30,48±6,44	4,95
	9	32.67	n.d	—	77940	34,65±17,46	5,63
	10	34.81	n.d	—	57743,5	29,08±7,34	4,72
	11	36.44	Kanferol	44,76±26,64	104570	42,00±6,27	6,82

Legenda: ¹ Resultado expresso em mg por 100 grama de extrato liofilizado. ² Resultado expresso em equivalentes ao Trolox por 100 grama de extrato liofilizado. Parâmetro de quantificação e detecção do composto: LOQ= 0,25 ug e LOD=0,08 ug. R²=0,998. Parâmetro de quantificação e detecção da atividade antioxidante: LOQ= 0,71ug e LOD 0,24, R²= 0,999. Tr = Tempo de retenção em minutos.

Figura 9 - Cromatogramas da amostra MO4 de General Carneiro, detectados a 267 nm (pico positivo) e 734nm (pico negativo) por HPLC – DAD *on-line* (ABTS). Os números dos picos se referem à Tabela 10

4.5. Determinação de compostos fenólicos por LC-MS/MS

Sabendo que os compostos fenólicos são responsáveis pelo sequestro de radicais livres, possuindo efeitos benéficos para a saúde humana (KISHORE et al., 2011), foi também avaliada a composição fenólica dos extratos pela técnica de LC-MS/MS. Os resultados estão mostrados na Tabela 11.

Tabela 11- Identificação e quantificação de compostos fenólicos dos extratos dos méis orgânicos (MO1-MO8) por LC-MS/MS

Amostras	MO1	MO2	MO3	MO4	MO5	MO6	MO7	MO8	Tr (min)	H ⁺	MS	LOD (µg)	LOQ (µg)	R ²
¹ Ácido caféico (mg/100g de extrato)	4,622±0,092	2,925±0,035	4,695±0,210	4,423±0,014	3,564±0,055	3,345±0,028	6,557±0,068	2,653±0,00	12,81	179	135	0,011	0,0332	0,998
¹ Ácido ferúlico (mg/100g de extrato)	28,494±0,258	23,905±0,122	14,591±1,397	14,110±0,064	8,323±0,059	15,101±0,115	21,324±0,277	16,740±0,055	19,5	193	134,178	0,037	0,111	0,998
¹ Rutina (mg/100g de extrato)	4,752±0,164	<LOQ	33,397±0,880	31,438±0,653	36,120±0,042	15,608±0,924	2,488±3,837	18,206±0,196	20,70	609	300,301	0,071	0,213	0,998
¹ Hesperidina (mg/100g de extrato)	4,709±0,060	3,463±0,089	32,494±1,711	29,812±1,103	35,632±0,252	15,384±0,855	4,562±0,703	17,765±0,231	24,40	609	301,302	0,053	0,160	0,998

Legenda: ¹ Valores expressos em mg do composto por 100 gramas de mel. TR: Tempo de retenção. LOD: limite de detecção. LOQ: limite de quantificação. Resultados são as médias ± desvio padrão da duplicata. Tr = tempo de retenção em minutos.

Por esta técnica, foi possível confirmar a presença do ácido ferúlico, bem como identificar e quantificar ácido caféico, rutina e hesperidina.

O ácido caféico apresentou baixa concentração com teores variando de $2,653 \pm 0,00$ a $6,557 \pm 0,068$ mg/100 g, sendo o mel MO7 (melato) o de maior concentração. Seraglio et al. (2016) avaliaram o melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth) e, da mesma forma, encontraram ácido caféico ($0,020$ mg/100 g) e rutina ($0,0094$ mg/100 g).

Os ácidos caféico e ferúlico são ácidos fenólicos de interesse considerável devido às suas fortes propriedades antioxidantes, potencial inibidor do colesterol, ação anticâncer, antienvhecimento, além de possuírem efeitos bacteriostáticos (WANG et al., 2016).

Também foi possível identificar e quantificar a presença de um flavonoide da classe das flavonas, a rutina, que variou de $2,488 \pm 3,837$ a $36,120 \pm 0,042$ mg/100 g de extrato. A amostra com maior teor desta flavona foi a amostra MO5 (melato) ($36,120 \pm 0,042$ mg/100 g), seguida da amostra MO3 (melato) ($33,397 \pm 0,880$ mg/100 g). Outro flavonoide encontrado, da classe das flavanonas, foi a hesperidina que apresentou teores que variaram de $3,463 \pm 0,089$ a $35,632 \pm 0,252$ mg/100 g.

A rutina é relatada por possuir efeito neuroprotetor, anti Alzheimer, antidepressivos, antidiabéticos e anti-hipercolesterolêmicos (GANESHPURKAR; SALUJA et al., 2017). A hesperidina é um antioxidante com ação anti-inflamatória, antimicrobiana e anticarcinogênicos. É também chamado bioflavonoide devido a este amplo espectro de ação (IRANSHAHI et al., 2015).

4.6. Determinação de ácido ascórbico por HPLC

O ácido ascórbico, comumente conhecido por vitamina C, é encontrado em quase todos os tipos de mel e tem sido avaliado principalmente por seu efeito antioxidante. A determinação da vitamina C é um indicador instável, pois é muito vulnerável à oxidação química e enzimática e tem uma taxa de variação acelerada devido a vários fatores como luz, oxigênio ou calor (LEÓN-RUIZ; VERA; GONZÁLEZ-PORTO; ANDRÉS, 2013).

Para a determinação do ácido ascórbico utilizou-se a cromatografia líquida de alta eficiência, técnica comumente utilizada para avaliação deste componente em diversas matrizes. Os resultados estão mostrados na Tabela 12 e Figura 10.

Tabela 12- Quantificação de ácido ascórbico pela técnica de HPLC

Amostras	MO1	MO2	MO3	MO4	MO5	MO6	MO7	MO8	LOD (µg)	LOQ (µg)	R ²
¹ Ácido ascórbico (mg/100 g de mel)	n.d	n.d	2,75±0,39	<LOQ	3,75±0,04	n.d	6,22±0,17	n.d	0,03	0,08	0,999

Legenda: ¹ Valores expressos em mg do composto por 100 gramas de mel. Resultados são as médias ± desvio padrão da duplicata.

Figura 10 - Cromatogramas das amostras de melato (MO3, MO5, MO7) de General Carneiro, detectados a 250 nm (pico positivo) e 734nm (pico negativo) pela técnica de HPLC – DAD - UV *on-line* (ABTS^{•+}). O Composto 1 corresponde ao ácido ascórbico

Nota-se que dentre os méis avaliados, os que apresentaram alto teor de ácido ascórbico (pico 1) foram os melatos MO3 ($2,75 \pm 0,39$ mg/100 g), MO5 ($3,75 \pm 0,04$ mg/100 g) e MO7 ($6,22 \pm 0,17$ mg/100 g). Ainda de acordo com a figura 10, pode-se verificar que nos méis de melato (MO3, MO5 e MO7), o ácido ascórbico foi o maior responsável pelo sequestro do radical ABTS^{•+}. A sua presença também foi confirmada pela técnica de CG/EM.

Ciulu et al. (2016) quantificaram o teor de vitamina C por HPLC em méis e obtiveram valores de $0,32 \pm 0,007$ para mel de eucalipto, $0,2 \pm 0,2$ para mel de citrus e $0,01$ mg/100 g para mel polifloral. Chaikham, Kemsawasd e Apichartsrangkoon (2016) encontraram teores de que variaram de $0,05 \pm 0,01$ a $0,85 \pm 0,06$ mg/100 g. Mouhoubi-Tafinine, Ouchemoukh e Tamendjari (2016) investigaram mel da Argélia, por espectrofotometria, e encontraram valores de $0,39$ - $3,37$ mg/100 g.

4.7. Determinação da fração volátil do mel pela técnica de CG/EM

Existem dezenas de tipos de mel, os quais podem ser diferenciados pela flora, lugar ou época de colheita, etc. Os méis de diferentes origens possuem também aromas e sabores diferentes (BASTOS et al., 2002).

A análise permitiu identificar um total de 74 compostos pela técnica de extração por SPME nas 8 amostras de méis (Tabela 13). Dentre os compostos encontrados, estavam presentes pirrois, terpenos e derivados, derivados do benzeno, aldeídos, álcoois, cetonas, ácidos e neroisoprenóides. Destes compostos, seis foram comuns a todas as amostras. O primeiro, benzenoacetaldéido, apresentou uma porcentagem que variou de 4 a 12%, sendo que a maior concentração foi encontrada no mel MO4 (12%) e a menor nas amostras MO7 e MO8, ambas com 1%. Dentre os diversos aromas que este composto pode conferir, tem-se o característico de mel e aroma frutado. O segundo composto foi o terpeno óxido de *cis*-linalol, que variou de 2,40% (MO5) a 11,49% (MO8). Esse composto é caracterizado pelo aroma floral doce. O terceiro composto, também da classe dos terpenos, linalol (3,7-dimetil-1,6-octadieno-3-ol) apresentou um teor que variou de 2,21% (MO8) até 11,50% (MO1), sendo esta substância responsável pelos aromas floral doce, limão, laranja, citrus, anis, alfazema e frutado. Outro terpeno, óxido *trans*-linalol (2-furanometanol, 5-eteniltetraidro- α , α ,5-trimetil-, *trans*-) apresentou porcentagens de 3,75% (MO7 e MO8) a 30,91% (MO6). O óxido de linalol é um marcador floral de mel de citrus (TORNUK et al., 2013). Os derivados do linalol têm origem da fonte floral visitada pelas abelhas ou, de acordo com Moreira et al. (2010), alguns derivados de linalol podem ser produzidos no próprio mel durante o armazenamento, como o óxido *cis*-linalol e óxido de *trans*-linalol.

Tabela 13- Compostos voláteis extraídos por SPME e identificados por GC-MS com suas respectivas porcentagens de área das amostras de méis orgânico

Composto	Tr _{min}	IRc	IRt	Ion (m/z,abundância em parenteses)	Descrição de aroma	Amostras e porcentagem de área							
						MO1	MO2	MO3	MO4	MO5	MO6	MO7	MO8
1H-Pirrole (Pirrole)	10.38	945		67(100) 41(58) 39(58) 40(50) 28(42)	nozes, adocicado (c)	-	-	21,61	2,74	26,91	-	26,80	-
Benzaldeído	10.80	948	955(5)	77(100) 105(86) 106(85) 51(49) 50(28)	amêndoa, frutado, nozes, adocicado (a) açúcar queimado, madeira, cereja, doce (e)	7,76	9,61	-	5,41	-	-	-	5,56
Benzeno metanol (Álcool benzílico)	13.11	1028	1037(2)	79(100) 108(80) 107(62) 77(59) 51(26)		-	-	-	-	-	1	-	0,74
Benzenoacetaldeído	13.49	1036	1046(2)	91(100) 120(26) 92(26) 65(20) 39(12)	mel, adocicado (d) maçã; damasco; cereja; chocolate; uva; mel; jacinto; limão; melão; laranja; noz; frutado; pêssego; amendoim; (e)	2,27	2,33	4,66	12	4	2	1	1
Acetofenona (1-Fenil-1-etanona)	14.70	1054	1067(2)	105(100) 77(82) 120(33) 51(31) 43(16)	mosto, flores, amêndoa (d)	0,64	0,73	-	-	-	-	-	-
Óxido de cis-linalol	15.17	1072	1075(2)	59(100) 43(66) 55(30) 94(28) 68(26)	floral, doce (h)	6,91	7,07	6,73	4,90	2,41	10,44	2,96	11,49
Linalol (3,7-Dimetil-1,6-octadieno-3-ol)	15.56	1102	1100(5)	71(100) 93(71) 55(59) 43(71) 41(74) 55(59)	floral doce (b), limão, laranja, citrus, floral, anis, alafazema, frutado (e)	11,95	11,33	5,85	8,69	9,265	2,28	4,75	2,21
Nonanal	15.70	1105	1106(3)	57(100) 56(62) 41(58) 43(58) 44(56)	frutado,floral, doce, melão, lavanda, maçã, coco, uva, citrus, noz, pêssego, rosa, grama (e)	4,28	-	8,41	-	8,7	-	9,78	-
Ho-trienol	15.71	1106	1107(2)	71(100) 82(64) 43(50) 67(37) 41(22)	flores, fresco, frutado (a)	8,64	-	-	-	-	23,26	-	21,80
Benzeno etanol (2- Fenil etanol)	16.04	1112	1115(2)	91(100) 92(63) 122(34) 65(16) 39(6)	rosa, mel (f)	0,86	-	-	-	0,93	-	0,83	-
Óxido de trans-linalol (2-Furanometanol, 5 eteniltetraidro- α , α ,5-trimetil-,trans-)	16.07	1060	1147(3)	59(100) 94(49) 43(42) 55(36) 93(30)		13,54	14,44	13,8	6,66	5,12	30,91	3,75	3,75
Isoforona (3,5,5-trimetil-2 cicloexeno-1-ona)	16.34	1119	1117(5)	82(100) 54(20) 39(19) 138(15) 95(7)	hortelã (a)	3,19	3,18	3,62	13,4	3,14	0,61	2,35	0,84
3-Noneno-2-one	16.96	1132		55(100) 125(63) 43(58) 97(32) 71(32)		-	-	1,08	-	0,71	-	-	-

(Continua)

Tabela 13- Compostos voláteis extraídos por SPME e identificados por GC-MS com suas respectivas porcentagens de área das amostras de méis orgânico

(Continuação)														
Composto	Tr _{min}	IRc	IRt	Ion (m/z,abundância em parenteses)	Descrição de aroma	Amostras e porcentagem de área								
						MO1	MO2	MO3	MO4	MO5	MO6	MO7	MO8	
α,β -Pulenenona (3,6,6-trimetil-2-cicloexeno-1-ona)	17.10	1134		82(100) 54(10) 39(5) 41(4) 83(4) 110(4)		9,01	6,52	1,08	0,81	0,705	3,71	1,47	5,88	
<i>Trans</i> - Pinocarveol, (Biciclo[3.1.1]heptano-3-ol, 6,6-dimetil-2-metileno-, [1S-(1 α ,3 α ,5 α)])	17.12	1136	1140(2)	41(100) 55(87) 92(82) 70(68) 27(58) 39(58)		-	-	-	-	-	-	4,26	-	
4-Cetoisoforona (2,6,6-trimetil-2-cicloexeno-1,4-diona)	17.14	1136	1148(3)	68(100) 96(82) 152(48) 40(35) 39(32)		9,01	6,52	4,43	5,83	4,03	1,99		5,88	
Cis-Verbenol (Biciclo[3.1.1]hept-3-en-2-ol, 4,6,6-trimetil-, (1 α ,2 β ,5 α))	17.25	1139	1144(2)	94(100) 41(76) 43(73) 55(71) 91 (70) 109(69)		-	-	-	-	-	-	1,48	-	
α , β -Diidro- β -ionona (2-Hidroxi-3,5,5-trimetil-2-cicloexeno-1-ona)	17.31	1140		70(100) 154(78) 98(48) 41(46) 139(39)		-	-	-	2,03	-	-	-	-	
Mentona (2-Isopropil-5-metil- ciclohexanona)	17.32	1140	1150(2)	112(100) 69(86) 41(80) 55(52) 43(39) 97(35)		-	-	0,93	-	-	-	-	-	
1,8-Cineol (2- Oxabicyclo[2.2.2]octano, 1,3,3-trimetil)	17.46	1143	1031(2)	111(100) 43(92) 71(68) 55(48) 41(44)	hortelã, adocicado (d)	7,09	6,11	1,10	-	3,13	2,21	2,27	3,80	
2-Nonenal	17.69	1148		41(100) 27(50) 43(86) 55(79) 70(66)		-	-	-	-	-	-	1,03	-	
Ácido benzóico	17.70	1149	1162(4)	105(100) 122(89) 77(73) 51(37) 50(10)	frutado, cereja (f)	-	-	-	-	-	0,29	-	0,34	
2,5-Dimetilfurano	17.74	1149		96(100) 95(76) 43(57) 53(44) 81(30)	especiarias (b)	4,70	-	-	-	-	-	-	-	
Citronelal (3,7-Dimetil-6-octenal)	17.98	1155	1153(2)	41(100) 69(84) 55(53) 56(34) 67(26)		4,22	3,46	-	-	-	-	-	-	
1-Nonanol	18.08	1157	1170(1)	56(100) 55(84) 43(78) 41(74) 70(60)		-	-	5,33	2,44	6,03	1,38	5,57	-	
1,10-Decanodiol	18.10	1157		55(100) 68(67) 69(64) 67(59) 82(56)		3,28	3,16	-	-	-	-	-	-	
<i>Óxido de trans</i> -Linalol,(piranoide) (2H-Pirano-3-ol, 6-eteniltetraidro-2,2,6-trimetil-, <i>trans</i>)	18.25	1161	1171(2)	68(100) 59(76) 43(40) 67(54) 94(69)		2,335	2,15	0,735	-	-	-	-	-	
Terpineno-4-ol (1-(1-Metil-etil)-4-metil-3-ciclohexas-1-ol))	18.43	1164	1177(2)	71(100) 43(54) 93(50) 111(49) 41(35)	pungente, verde, defumado (g)	-	-	0,47	-	0,71	-	1,61	-	

Tabela 13- Compostos voláteis extraídos por SPME e identificados por GC-MS com suas respectivas porcentagens de área das amostras de méis orgânico

(Continuação)													
Composto	Tr _{min}	IRc	IRt	Ion (m/z,abundância em parenteses)	Descrição de aroma	Amostras e porcentagem de área							
						MO1	MO2	MO3	MO4	MO5	MO6	MO7	MO8
3-Hexenil butanoato, (Z)- (Ácido butanoico, 3-hexenil ester, (Z)-)	18.76	1171	1184(2)	82(100) 67(91) 71(84) 43(68) 41(32)		0,55	-	-	-	-	-	-	-
α-Terpineol (p-Ment-1-en-8-ol)	18.90	1174	1189(2)	59(100) 93(58) 121(47) 136(43) 81(37)	verde, flores (a)	0,51	-	0,42	-	1,87	-	2,34	-
Metil salicilato (2-Hidroxibenzoico ácido metil ester)	19.01	1177	1192(2)	120(100) 92(57) 152(41) 121(32) 65(26)	hortelã (d)	-	-	-	-	0,54	-	-	-
Mirtenol (6,6-Dimetilbiciclo[3.1.1]hept-2-ene-2-metanol)	19.12	1201	1194(2)	79(100) 91(38) 41(37) 39(30) 108(29)	erva,doce (d) baunilha, menta, medicinal (e)	-	-	-	-	0,41	0,66	2,3	0,53
Safranal (2,6,6-Trimetil-1-3-ciclohexadieno-1-carboxaldeído)	19.24	1204	1201(2)	107(100) 121(64) 105(47) 150(35) 91(95) 41(100) 44(46) 57(81) 43(80) 55(62)		2,50	2,80	0,59	-	-	-	-	-
Decanal	19.33	1206	1207(3)	82(42)	casca de laranja, sebo (d)	1,45	2,64	3,12	2,31	7,45	2,82	7,43	5,06
2-Pineno-4-ona	19.50	1212	1206(2)	107(100) 135(80) 80(73) 150(72) 91(62)		-	-	-	-	-	-	1,37	-
Davanona B	19.61	1212		111(100) 93(67) 69(50) 41(44) 55(38)		1,60	1,71	-	-	-	-	-	-
Verbenona (4,6,6-Trimetilbiciclo[3.1.1]hept-3-eno-2-ona)	19.93	1219	1211(4)	107(100) 135(46) 91(63) 80(54) 79(48)	menta, especiarias (e)	3,10	3,35	1,07	1,09	-	0,52	-	0,46
Não identificado	20.14	1224		55(100) 43(50) 67(41) 93(81) 111(74)		0,43	1,88	-	-	-	-	-	-
Ácido benzenoacético, etil ester	20.73	1237	1250(3)	91(100) 164(19) 65(11) 92(11) 89(3)		-	-	-	-	3,35	0,91	2,07	0,46
Anisaldeído (4-Metoxi benzaldeído)	21.07	1244	1251(2)	135(100) 92(25) 107(20) 77(45) 63(21)		-	-	0,41	-	-	-	-	-
Terpendiol	21.23	1248		67(100) 71(95) 43(92) 41(71) 82(63)		0,56	0,85	-	-	-	-	-	-
Ácido nonanóico	21.47	1254	1275 (2)	60(100) 73(83) 28(73) 57(56) 55(53)	verde, gordura, cera, queijo, azedo (e)	0,09	0,11	0,49	-	0,73	0,59	2	0,81
6-Metil-α-ionona (3-Buteno-2-ona, 4-(2,5,6,6-tetrametil-2-ciclohexeno-1-il))	21.61	1257		121(100) 43 (77) 136(57) 93(83) 91(28)		-	-	1,68	1,76	-	0,76	-	0,79
1-Decanol	21.62	1257	1272(2)	43(100) 41(99) 55(99) 56(81) 70(80)		-	1,81	-	-	1,76	-	1,91	-

Tabela 13- Compostos voláteis extraídos por SPME e identificados por GC-MS com suas respectivas porcentagens de área das amostras de méis orgânico

(Continuação)													
						Amostras e porcentagem de área							
						MO1	MO2	MO3	MO4	MO5	MO6	MO7	MO8
Composto	Tr _{min}	IRc	IRt	Ion (m/z,abundância em parenteses)	Descrição de aroma								
2-Metoxi-6-metil pirazina	21.71	1259		124(100) 123(70) 95(44) 94(40) 54(14)		-	1,06	-	-	-	-	-	-
2-Nonanol	22.61	1302		45(100) 43(39) 41(34) 55(35) 69(25) 56(22)	pepino (d)	-	-	0,40	-	-	-	-	-
Undecanal	22.83	1307	1306(2)	43(100) 57(96) 82(70) 41(69) 55(66)		-	-	-	-	1,09	-	0,50	-
2,4,6-Trimetil fenol	23.14	1314	1317(6)	121(100) 136(98) 135(35) 91(18) 77(10)		-	-	2,45	-	1,26	0,6	0,98	0,88
3,4,5-Trimetil fenol	23.16	1314	1314(5)	121(100) 136(56) 135(25) 91(14) 39(11)		-	-	-	9,53	-	-	-	-
Teaspirano (2,6,10,10-Tetrametil-1-oxaspiro- [4.5]dec-6-eno)	23.31	1318		138(100) 96(48) 82(43) 41(22) 109(21) 83(20)		0,30	-	0,27	-	-	-	-	-
p-Cresol, 2-metoxi (2-Metoxi-4-metilfenol)	23.72	1327	1192(2)	123(100) 138(72) 95(43) 77(24) 67(32) 55(16)		0,43	0,38	-	-	-	-	-	-
2,6-Dimetil-1,7-octadieno-3,6-diol	24.04	1335		67(100) 71(95) 43(92) 41(71) 82(63)		1,33	1,16	-	-	-	-	-	-
Eugenol (4-Alil-2-metoxifenol)	24.58	1347	1357(2)	164(100) 77(48) 103(42) 91(38) 55(38)	cravo, especiarias, mel (a)	4,39	4,56	0,38	-	1,94	0,41	1,96	0,54
Damascenona	25.51	1369	1382(5)	69(100) 121(38) 41(35) 39(14) 105(12)		-	-	1	3,78	0,62	1,06	0,35	1,16
Felandral (1-Ciclohexeno-1-carboxaldeido, 4-(1- metil-etil))	25.70		1373	109(100) 79(54) 81(52) 41(42) 67(40) 95(35)		3,19	2,49	1	-	-	-	-	-
Jasmona, (Z) (2-Ciclopenteno-1-ona, 3-metil-2-(2- pentenil)-, (Z)-)	25.94	1402	1394(2)	41(100) 110(90) 79(86) 92(82) 164(80) 55(72)		-	-	-	2,64	-	-	-	-
Dodecanal	26.15	1408	1408(2)	43(100) 57(97) 41(74) 55(62) 44(56)	noz, grama seca (g)	0,13	0,18	0,24	-	0,53	0,27	0,67	0,43
β-Cariofileno, trans-	26.77	1423		69(100) 41(98) 93(91) 133(69) 91(60)		0,46	0,71	1,63	-	-	-	-	-
6,10-Dimetil-5,9-undecadieno-2-ona	27.56	1442	1451(2)	43(100) 69(58) 41(43) 136(14) 151(14)		-	-	0,94	1,25	3,08	1,65	0,59	0,62
δ-Decenolactona (2H-Pirano-2-ona, 5,6-diidro-6-pentil-)	28.40	1463		97(100) 68(84) 41(29) 69(26) 108(8) 43(8)		-	-	-	1,79	-	-	-	-
Germacreno B (1,5-Ciclododecadieno, 1,5-dimetil-8-(1- metil-etilideno)-, (E,E)	32.11	1606	1550(2)	121(100) 93(82) 105(64) 107(55) 67(50) 119(44)		0,32	0,51	-	-	-	-	-	-

Legenda: (1) Karabagias et al., 2014; (2) Babushok, 2011; (3) Acevedo et al., 2017; (4) Jerković et al., 2010; (5) Pattamayutanon et al., 2017; (6) Moniruzzaman et al., 2014; (7) Kús et al., 2014; (a) Castro-Vázquez, Díaz-Maroto e Pérez-Coello, 2006; (b) Galvão et al., 2016; (c) Steen, 2017; (d) Acree e Arn, 2004. ; (e) Formisano et al., 2009; (f) Fan et al., 2006; (g) Phi et al., 2006; (h) Lasekan et al., 2015.

O composto óxido de trans-linalol e linalol foram relatados em mel de *Eucryphia cordifolia* com porcentagem de área de 3,62 e 0,30 respectivamente (ACEVEDO et al., 2017).

O quarto composto foi a isoforona (3,5,5-trimetil-2-ciclohexeno-1-ona), um norisoprenóide, com porcentagem que variou de 0,61% (MO6) a 13,40% (MO4). É característico pelo aroma de hortelã, sendo um composto volátil importante, presente em mel de *Erica arborea* (KĀSKONIENĒ; VENSKUTONIS, 2010). Os norisoprenóides, como a isoforona, já foram identificados em méis de eucalipto, alecrim e citrus em diferentes partes do mundo (SORIA; MARTÍNEZ-CASTRO; SANZ, 2008).

O quinto foi o α,β -pulenena (3,6,6-trimetil-2-ciclohexeno-1-ona) com teores que variaram de 0,71% (MO5) a 9,00% (MO1), seguido do decanal de 1,45% (MO1) a 7,45% (MO5) que é característico pelo aroma de casca de laranja. O decanal foi relatado em mel de *Arbutus unedo* L (BIANCHI; CARERI; MUSCI, 2005).

Nas amostras MO1 e MO2, o composto mais representativo foi o óxido de trans-linalol (2-furanometanol, 5-eteniltetraidro- α , α ,5-trimetil-,trans-) com porcentagens que variaram de 13,54% a 14,44%. O segundo composto de maior intensidade foi linalol (3,7-dimetil-1,6-octadieno-3-ol) com teores de 11,33% (MO2) e 11,95% (MO1).

Nos melatos, o 1H-pirrol (pirrol) foi o composto mais abundante MO3 (21,61%), MO5 (26,90%) e MO7 (26,80%). Esse composto confere aroma adocicado e de nozes. Os pirrois podem ocorrer pela reação de Maillard ou da pirólise de aminoácidos, quando o mel é submetido ao aquecimento (JERKOVIĆ et al., 2007). O 1H-pirrol já foi encontrado em mel de *Robinia pseudoacacia* L. e *Castanea sativa* L. (JERKOVIĆ et al., 2007).

No mel MO8, o composto mais abundante foi Ho-trienol (terpeno) (21,79%), o qual também esteve presente nas amostras MO1 (8,64%) e MO6 (23,26%). Este composto também foi encontrado no mel italiano de *Galactites tomentosa* (BIANCHI et al., 2011).

Dos compostos identificados, dois estão presentes apenas nos melatos. O primeiro é o terpineno-4-ol (1-(1-metiletil)-4-metil-3-ciclohexeno-1-ol), com porcentagens de 0,47% (MO3), 0,70% (MO5) e 1,71% (MO7). Este composto pertence a família dos compostos olfativos pungente, verde e defumado. O terpineno-4-ol já foi descrito em mel de *Erica arborea* (YANG et al., 2012) e em própolis italiana (PELLATI et al., 2013). Esta substância possui ação antifúngica (BRILHANTE et al., 2016), antiparasita (BALDISSERA et al., 2016) e anti-inflamatória (HART et al., 2000). O segundo composto foi o 3,4-dimetil-1-deceno com concentrações de 0,64% (MO3), 0,65% (MO5) e 0,56% (MO7), também presente em mel de *Rhus succedanea* (SHIMODA; WU; OSAJIMA, 1996).

Utilizando a ferramenta de análise de componentes principais (PCA), realizou-se uma abordagem quimiométrica dos dados coletados a partir dos cromatogramas do CG/EM. (Figura 11).

Figura 11- Distribuição fatorial (PCA) das amostras de méis orgânico (MO1- MO8)

Legenda: PC1 e PC2 (A), das amostras referentes aos méis (M01 a M08). Os grupos circutados representam os agrupamentos de amostras segundo suas características químicas e contribuição fatorial de PC1 e PC2 (B) das amostras.

A Figura 11A apresenta o gráfico de distribuição fatorial (*scores*) das amostras. Em relação aos eixos PC1 e PC2, verifica-se que aqueles componentes explicam 83% da variância presente nas amostras. A dispersão observada pode ser explicada através da análise dos gráficos de contribuição fatorial (*loadings* – Figura 11B), os quais indicam os compostos

que concorrem para a distribuição amostral observada nos eixos PC1 e PC2. A tendência das amostras provindas de PC foi de agruparem-se ao longo do eixo PC2 em três grupos. As amostras MO3, MO4, MO5 e MO8, agruparam-se nos eixos em PC1 negativo-PC2 negativo; as amostras MO1 e MO2 nos eixos PC1 positivo-PC2 negativo e as amostras MO6 e MO7 em PC2 positivo.

A análise da contribuição fatorial (Figura 11B), dos dados obtidos dos cromatogramas, revelou a presença de compostos das classes de álcoois, aldeídos e cetonas como majoritários, sendo que os mais proeminentes na dispersão dos resultados foram acetofenona ($T_r=14.7$ min.) óxido de *cis*-linalol ($T_r= 15.1$ min.), linalol ($T_r= 15.5$ min.), nonanal ($T_r= 15.7$ min.), α,β -Pulenenona ($T_r= 17.1$ min.), 1,8-cineol ($T_r= 17.4$ min.); citronelal ($T_r= 17.9$ min.), 1,10-decanodiol ($T_r= 18.1$ min.), óxido de *trans*-linalol ($T_r= 18.2$ min.), safranal ($T_r= 19.2$ min.), 2-pineno-4-ona ($T_r= 19.5$ min.), verbenona ($T_r= 19.9$ min.), eugenol ($T_r= 24.5$ min.) e felandral ($T_r= 25.7$ min.), todos predominantes no quadrante positivo.

5. CONCLUSÕES

O armazenamento a temperatura ambiente promoveu uma redução significativa da capacidade de sequestro do radical peroxila ($\text{ROO}\bullet$) pelos extratos. Portanto, é importante se manter o mel a temperatura de refrigeração para a preservação da atividade antioxidante.

As amostras de mel orgânico, proveniente da região sul do Brasil, apresentam compostos com capacidade de sequestro de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Os extratos apresentaram alta capacidade de sequestro para o radical peroxila ($\text{ROO}\bullet$) e óxido nítrico ($\text{NO}\bullet$), enquanto que o mel bruto *in natura* apresentou melhor potencial para a desativação do $\text{NO}\bullet$.

A capacidade de sequestro das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio pelos méis orgânicos também podem ser avaliadas em testes *in vivo*, na tentativa de comprovar o real efeito biológico e promoção dos benefícios à saúde.

As análises cromatográficas permitiram a identificação de compostos fenólicos que já são relatados na literatura por possuírem ações benéficas à saúde, tais como antioxidante, anticâncer, neuroprotetora, entre outras. Também foi possível a determinação de ácido ascórbico em teores significativo nos melatos.

A análise de compostos voláteis possibilitou conhecer a composição química dos constituintes destes méis e a análise quimiométrica auxiliou na visualização da separação dos méis em 3 grupos. Dos voláteis identificados, dois compostos estavam presentes apenas nos melatos, podendo assim serem considerados marcadores químicos.

REFERÊNCIAS

- ACEVEDO, F.; TORRES, P.; OOMAH, D.; ALENCAR, S. M.; MASSARIOLI, A. P.; MARTÍN-VENEGAS, R.; ALBARRAL-ÁVILA, V.; BURGOS- DÍAZ, C.; FERRER, R. RUBILAR, M. Volatile and non-volatile/semi-volatile compounds and in vitro bioactive properties of Chilean Ulmo (*Eucryphia cordifolia* Cav.) honey. **Food Research International**, v. 94, p. 20 -28, 2017.
- ACOSTA-ESTRADA, B.A.; GUTIÉRREZ-URIBE, J.A.; SERNA-SALDÍVAR, S.O. Bound phenolics in foods, a review. **Food Chemistry**, Barking, v. 152, p. 46-55, 2014.
- ACREE, T.; ARN, H. **Flavornet and human odor space**. Geneva, NY: Cornell University, New York State Agricultural Experiment Station, 2004. Disponível em: <<http://www.flavornet.org/flavornet.html>>. Acesso em: 03 abr. 2017.
- AJIBOLA, A.; CHAMUNORWA, J.P.; ERLWANGER, K.H. Nutraceutical values of natural honey and its contribution to human health and wealth. **Nutrition & Metabolism**, Basel, v. 9, p. 61-72, 2012.
- AL, M.L.; DANIEL, D.; MOISE, A.; BOBIS, O.; LASLO, L.; BOGDANOV, S. Physico-chemical and bioactive properties of different floral origin honeys from Romania. **Food Chemistry**, Barking, v. 112, p. 863-867, 2009.
- AL-DUAIS, M.; MULLER, L.; BOHM, V.; JETSCHKE, G. Antioxidant capacity and total phenolics of *Cyphostemma digitatum* before and after processing: use of different assays. **European of Food Research and Technology**, v. 228, p. 813-821, 2009.
- ALI, H.; ALGARNI, A.S.; OWAYSS, A.; HASSAN, A.M.; SMITH, B. Osmotic concentration in three races of honey bee, *Apis mellífera* L. under environmental conditions of arid zone. **Saudi Journal of Biological Sciences**, Riyadh, Saudi Arabia, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.12.006>.
- ALJADI, A.M.; KAMARUDDIN, M.Y. Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. **Food Chemistry**, Barking, v. 85, n. 4, p. 513-518, 2004.
- ALQARNI, A.; OWAYSS, A.A.; MAHMOUD, A.A.; HANNAN, M. Mineral content and physical properties of local and imported honeys in Saudi Arabia. **Journal of Saudi Chemical Society**, Riyadh, v. 18, n.5, p.618-625, 2014.
- ALVAREZ-SUAREZ, J.M.; TULIPANI, S.; ROMANDINI. S.; BERTOLI, E.; BATTINO, M. Contribution of honey in nutrition and human health: a review. **Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism**, Milano, v. 3, n. 1, p. 15-23, 2010.

ALVAREZ-SUAREZ, J.; GIAMPIERI, F.; GONZÁLEZ-PARAMÁS, A.M.; DAMIANI, E.; ASTOLFI, P.; MARTINEZ-SANCHEZ, G.; BOMPADRE, S.; QUILES, J.L.; SANTOS-BUELGA, C. Phenolics from monofloral honeys protect human erythrocyte membranes against oxidative damage. **Food and Chemical Toxicology**, Exeter, v. 50, n. 5, p. 1508-1516, 2012.

ALVAREZ-SUAREZ, J.M.; GIAMPIERI, F.; CORDERO, M.; GASPARRINI, M.; FORBES-HERNÁNDEZ, T.Y.; MAZZONI, L.; AFRIN, S.; BELTRÁN-AYALA, P. Activation of AMPK/Nrf2 signalling by Manuka honey protects human dermal fibroblasts against oxidative damage by improving antioxidant response and mitochondrial function promoting wound healing. **Journal of Functional Foods**, Amsterdam, v. 25, p. 38-49, 2016.

AL-WAILI, N.S. Natural honey lowers plasma glucose, C-reactive protein, homocysteine, and blood lipids in healthy, diabetic, and hyperlipidemic subjects: comparison with dextrose and sucrose. **Journal of Medicinal Food**, Larchmont, v. 7, p. 100-107, 2004.

ANAGNOSTOPOULOU, M.A.; KEFALAS, P.; PAPAGEORGIOU, V.P.; BOSKOU, D. Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*). **Food Chemistry**, Barking, v. 94, p. 19-25, 2006.

ANJO, D.F.C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **Jornal Vascular Brasileiro**, São Paulo, v. 3, n. 2, p. 145-154, 2004.

ASIMI, O.A.; SAHU, N.P.; PAL, A.K. Antioxidant capacity of crude water and ethylacetate extracts of some Indian species and their antimicrobial activity against *Vibrio vulnificus* and *Micrococcus luteus*. **Journal of Medicinal Plants Research**, Lagos, v. 7, n. 26, p. 1097-1915, 2013.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS EXPORTADORES DE MEL - ABEMEL. **Dados das exportações de mel**. Rio Claro, 2017. Disponível em: <http://brazilletsbee.com.br/INTELIG%C3%80NCIA%20COMERCIAL%20ABEMEL_MARCO_CONSOLIDADO_2017.pdf> Acesso em: 5 mar. 2017.

ATHAYDE, S.; STEPP, J.R.; BALLESTER, W. Engaging indigenous and academic knowledge on bees in the Amazon: implications for environmental management and transdisciplinary research. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, Heidelberg, v.12, p. 26-44, 2016. DOI 10.1186/s13002-016-0093-z.

ATTANZIO, A.; TESORIERE, L.; ALLEGRA, M.; LIVREA, M.A. Monofloral honeys by Sicilian black honeybee (*Apis mellifera* ssp. *sicula*). **Heliyon**, London, v. 2, n. 11, e00193, 2016. doi: 10.1016/j.heliyon.2016.e00193.

BABUSHOK, V. I.; LINSTROM, P. J.; ZENKEVICH, I. G. Retention Indices for frequently reported compounds of plant essential oils. **Journal of Physical and Chemical Reference Data**, New York, v. 40, n. 4, p. 043101-1- 043101-47, 2011.

BALDISSERA, M.D.; GRANDO, T.H.; SOUZA, C.F.; GRESSLER, L.T.; STEFANI, L.M.; SILVA, A.S.; MONTEIRO, S.G. In vitro and in vivo action of terpinen-4-ol, γ -terpinene, and α -terpinene against *Trypanosoma evansi*. **Experimental Parasitology**, New York, v. 162, p. 43-48, 2016.

BASTOS, D.H.M.; FRANCO, M.R.B.; DA SILVA, M.A.A.P.; JANZANTTI, N.S.; MARQUES, M.O.M. composição de voláteis e perfil de aroma e sabor de méis de eucalipto e laranja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 2, p. 122-129, 2002.

BATISTA, B.L.; DA SILVA, L.R.S.; ROCHA, B.A.; RORIGUES, J.L.; BERRETTA-SILVA, A.A.; BONATES, T.O.; GOMES, V.S.D.; BARBOSA, R.M.; BARBOSA, F. Multi-element determination in Brazilian honey samples by inductively coupled plasma mass spectrometry and estimation of geographic origin with data mining techniques. **Food Research International**, Ottawa, v. 49, p. 209-215, 2012.

BEILLEROT, A.; DOMINGUEZ, J.C. R.; KIRSCH, G.; BAGREL, D. Synthesis and protective effects of coumarin derivatives against oxidative stress induced by doxorubicin. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 18, p. 1102-1105, 2008.

BIANCHI, F.; CARERI, M.; MUSCI, M. Volatile norisoprenoids as markers of botanical origin of Sardinian strawberry-tree (*Arbutus unedo* L.) honey: Characterisation of aroma compounds by dynamic headspace extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Food Chemistry**, Barking, v. 89, p. 527-532, 2005.

BIANCHI, F.; MANGIA, A.; MATTAROZZI, M., MUSCI, M. Characterization of the volatile profile of thistle honey using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Food Chemistry**, Barking, v. 129, p. 1030-1036, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Cadeia produtiva de flores e mel**. Brasília, DF: IICA; MAPA/SPA, 2007. 140 p.

BRILHANTE, R.S.N.; CAETANO, E.P.; LIMA, R.A.; C.; MARQUES, F.J.F.; CASTELO-BRANCO, D.S.C.M. Terpinen-4-ol, tyrosol, and β -lapachone as potential antifungals against dimorphic fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 47, n. 4, p. 917-924, 2016.

BREED, M.D. Honeybees. **Encyclopedia of Animal Behavior**. Amsterdam: Elsevier, 2010. p. 89-96.

BRESOLIN, J.D.; HIBINGER, S.Z. Metodologia para determinação de ácido ascórbico em sucos de citrus utilizando cromatografia líquida de alta eficiência. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE INSTRUMENTAÇÃO AGROPECUÁRIA - SIAGRO, 3., 2014, São Carlos. São Carlos: Embrapa Instrumentação, 2014. p. 497-500.

BUENO-COSTA, F.M.; ZAMBIAZI, R.C.; BOHMER, B.W.; CHAVES, F.C.; SILVA, W.P.; ZANUSSO, J.T.; DUTRA, I. Antibacterial and antioxidant activity of honeys from the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **LWT - Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 65, p. 333-340, 2016.

CAMPONE, L.; PICCINELLI, A.L.; PAGANO, I.; CARAETTA, S.; DI SANZO, R.; RUSSO, M.; RASTRELLI. Determination of phenolic compounds in honey using dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1334, p. 9-15, 2014.

CAN, Z.; YILDIZ, O.; SAHIN, H.; TURUMTAY, E.A.; SILICI, S.; KOLAYLIF, S. An investigation of Turkish honeys: Their physico-chemical properties, antioxidant capacities and phenolic profiles. **Food Chemistry**, Barking, v. 180, p. 133-141, 2015.

CARR, A.; FREI, B. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? **FASEB Journal**, Bethesda, v. 13, p. 1007-1024, 1999.

CASTRO-VÁZQUEZ, L.; DÍAZ-MAROTO, M.C.; PÉREZ-COELLO, M.S. Volatile Composition and Contribution to the Aroma of Spanish Honeydew Honeys. Identification of a New Chemical Marker. **Journal and Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 54, p. 4809-4813, 2006.

CASTRO-VÁZQUEZ, L.; DÍAZ-MAROTO, M.C.; GONZÁLEZ-VIÑAS, M.A.; PÉREZ-COELLO, M.S. Differentiation of monofloral citrus, rosemary, eucalyptus, lavender, thyme and heather honeys based on volatile composition and sensory descriptive analysis. **Food Chemistry**, Barking, v. 112, p. 1022-1030, 2009.

CHAIKHAM, P.; KEMSAWASD, V.; APICHARTSRANGKON, A. Effects of conventional and ultrasound treatments on physicochemical properties and antioxidant capacity of floral honeys from Northern Thailand. **Food Bioscience**, Amsterdam, v. 15, p. 19-26, 2016.

CHAND, K.; RAJESHWARI, HIREMATHAD, A.; SINGH, M.; SANTOS, A.; KERI, R.S. A review on antioxidant potential of bioactive heterocycle benzofuran: Natural and synthetic derivatives. **Pharmacological Reports**, Kraków, Poland, v. 69, n. 2, p. 281-295, 2017.

CHIESA, L.M.; LABELLA, G.F.; GIORGI, A.; PANSERI, S.; PAVLOVIC, R.; BONACCI, S.; ARIOLI, F. The occurrence of pesticides and persistent organic pollutants in Italian organic honeys from different productive areas in relation to potential environmental pollution. **Chemosphere**, Oxford, v. 154, p. 482-490, 2016.

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

CONFORTI, F.; SOSA, S.; MARRELI, M.; MENICHINI, F.; STATTI, G.; UZUNOV, D.; TUBARO, A.; MENICHINI, F. The protective ability of Mediterranean dietary plants against the oxidative damage: The role of radical oxygen species in inflammation and the polyphenol, flavonoid and sterol contents. **Food Chemistry**, Barking, v. 112, p. 587-594, 2009.

CRANE, E. **Livro do mel**. 2. ed. São Paulo: Nobel, 1985. 226 p.

CRANE, E. Apis Species. In: RESH, V.H.; CARDÉ, R.T. **Encyclopedia of insects**. 2. ed. New York: Academic Press, 2009. cap. 9, p. 31-32.

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

CZERWIŃSKA, M.; KISS, A.K.; NARUSZEWICZ, M. A comparison of antioxidant activities of oleuropein and its dialdehydic derivative from olive oil, oleacein. **Food Chemistry**, Barking, v. 131, p. 940-947, 2012.

DAROLT, M.R. **Agricultura orgânica**: inventando o futuro. Londrina: IAPAR, 2002. 250 p.

DASURI, K.; ZHANG, L.; KELLER, J.N. Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 62, p. 170-185, 2013.

DEY, T.B.; CHAKRABORTY, S.; JAIN, K.K.; SHARMA, A.; KUHAD, R.C. Antioxidant phenolics and their microbial production by submerged and solid state fermentation process: A review. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 53, p. 60-74, 2016.

DOR, G.O.L.M.; MAHOMOODALLY, M.F. Chemical profile and in vitro bioactivity of tropical honey from Mauritius. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, Singapore, v. 4, p. 1002-1013, 2014. Suplemento 2.

DRAGHI, P.F.; FERNANDES, J.C.B. Label-free potentiometric biosensor based on solid-contact for determination of total phenols in honey and propolis. **Talanta**, Oxford, v. 164, p. 413-417, 2017.

EL-HASKOURY, R.; KRIAA, W.; LYOUSSE, B.; MAKNI, M. *Cetonia siliqua* honeys from Morocco: Physicochemical properties, mineral contents, and antioxidant activities. **Journal of Food and Drug Analysis**, Taipei City, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.11.016>. In press.

ESCRICHEA, I.; SOBRINO-GREGORIO, L.; CONCHADO, A.; JUAN-BORRÁS, M. Volatile profile in the accurate labelling of monofloral honey. The case of lavender and thyme honey. **Food Chemistry**, Barking, v. 26, p. 61-68, 2017.

ESCUREDO, O.; SILVA, L.R.; VALENTÃO, P.; SEIJO, M.C.; ANDRADE, P.B. Assessing Rubus honey value: Pollen and phenolic compounds content and antibacterial capacity. **Food Chemistry**, Barking, v. 130, n. 3, p. 671-678, 2012.

ESTEVINHO, L.M.; FEÁS, X.; SEIJAS, J.A.; VÁZQUEZ-TATO, M.P. Organic honey from Trás-Os-Montes region (Portugal): Chemical, palynological, microbiological and bioactive compounds characterization. **Food and Chemical Toxicology**, Exeter, v. 50, n. 2, p. 258-264, 2012.

EUROPEAN UNION- EU. **Council Regulation (EC) N° 834, of 28 of June of 2007**. On organic production and labelling of organic products and repealing Regulation (EEC) N° 2092/91. Brussel, 2007. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=OJ:L:2007:189:TOC>. Acesso em: 22 mar. 2017.

FAN, W.; QIAN, M. Characterization of Aroma Compounds of Chinese “Wuliangye” and “Jiannanchun” Liquors by Aroma Extract Dilution Analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 54, p. 2695-2704, 2006.

FERREIRA, I.C.F.R.; ABREU, R.M.V. Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. **Bionálise**, Viseu, Portugal, v. 4, n. 2, p. 32-39, 2007.

FERRERES, F.; TOMAS-BARBERAN, F.A.; GIL, M.I.; TOMAS-LORENTE, F. Na HPLC technique for flavonoid analysis in honey. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 56, n. 1, p. 49-56, 1991.

FIGUEROA-ESPINOZA, M.C.; ZAFIMAHOVA, A.; ALVARADO, P.G.M.; DUBREUCQ, E.; PONCET-LEGRAND, C. Grape seed and apple tannins: Emulsifying and antioxidant properties. **Food Chemistry**, Barking, v. 178, p. 38-44, 2015.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, London, v. 408, p. 239-247, 2000.

FREITAS, M.; LIMA, J.L.F.; FERNANDES, E. Optical probes for detection and quantification of neutrophils' oxidative burst. A Review. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 649, p. 8-23, 2009.

FORMISANO, C.; SENATORE, F.; PORTA, G. D.; SCOGNAMIGLIO, M.; BRUNO, M.; MAGGIO, A.; ROSSELLI, S.; ZITO, P.; SAJEVA, M. Headspace Volatile Composition of the Flowers of *Caralluma europaea* N.E.Br. (Apocynaceae). **Molecules**, Basel, v. 14, p. 4597- 4613, 2009.

GALVÃO, M.S.; NUNES, M. L.; CONSTANT, P. B. L.; NARAIN, N. Identification of volatile compounds in cultivars barker, collinson, fortuna and geadá of avocado (*Persea americana*, Mill.) fruit. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 36, n. 3, p. 439-447, 2016.

GANESHPURKAR, A.; SALUJA, A. The Pharmacological Potential of Rutin. **Saudi Pharmaceutical Journal**, Riyadh, Saudi Arabia, v. 25, n. 2, p. 149-164, 2017.

GÁRCIA-VALCÁRCEL, A.L.; MOLERO, E.; TADEO, J.L.; HERNANDO, M.D. Determination of selected environmental contaminants in foraging honeybees. **Talanta**, Oxford, v. 148, p. 1-6, 2016.

GBYLIK-SIKORSKA, M.; SNIEGOCKI, T.; POSYNIK, A. Determination of neonicotinoid insecticides and their metabolites in honey bee and honey by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 990, p. 132-140, 2015.

GEBREEYESYS, M.; SONOBE, S. Global value chains and markets formation process in emerging export activity: evidence from Ethiopian flower industry. **The Journal of Development Studies**, London, v. 48, n. 3, p. 335-348, 2012.

GHASEMZADEH, A.; GHASEMZADEH, N. Flavonoids and phenolic acids: role and biochemical activity in plants and human. **Journal of Medicinal Plants Research**, Lagos, v. 5, n. 31, p. 6697–6703, 2011.

GÓMEZ-CARAVACA, A.M.; GÓMEZ-ROMERO, M.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNANDEZ-GUTIÉRREZ, A. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 41, p. 1220-1234, 2009.

GUTTERIDGE, J.M.; HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 899, p. 136-147, 2000.

HART, P.H.; BRAND, C.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V.; PRAGER, R.H.; FINLAY-JONES, J.J. Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. **Inflammation Research**, Basel, v. 49, p. 619- 626, 2000.

HUANG, R.; XIA, R.; HU, L.; LU, Y.; WANG, M. Antioxidant activity and oxygen-scavenging system in orange pulp during fruit ripening and maturation. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 113, p. 166-172, 2007.

HEMPEL, N.; TREBAK, M. Crosstalk between calcium and reactive oxygen species signaling in cancer. **Cell Calcium**, Edinburgh, 2017. doi: 10.1016/j.ceca.2017.01.007. In press.

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

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Produção da agropecuária municipal**. Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2015/default.shm>>. Acesso em: 16 mar. 2016.

IRANSHAHI, M.; REZAEI, R.; PARHIZ, H.; ROOBAKHSH, A.; SOLTANI, F. Protective effects of flavonoids against microbes and toxins: The cases of hesperidin and hesperetin. **Life Sciences**, Oxford, v. 137, p. 125-132, 2015.

JERKOVIĆ, I.; MARIJANOVIĆ, Z. Oak (*Quercus frainetto* Ten.) Honeydew Honey-Approach to Screening of Volatile Organic Composition and Antioxidant Capacity (DPPH and FRAP Assay). **Molecules**, Basel, v. 15, p. 3744-3756, 2010.

JERKOVIĆ, I.; MASTELIĆ, J.; MARIJANOVIĆ, Z.; KLEIN, Ž.; JELIĆ, M. Comparison of hydrodistillation and ultrasonic solvent extraction for the isolation of volatile compounds from two unifloral honeys of *Robinia pseudoacacia* L. and *Castanea sativa* L. **Ultrasonic Sonochemistry**, Oxford, v. 14, p. 750-756, 2007.

KAHRAMAN, T.; BUYUKUNAL, S.K.; VURAL, A.; ALTUNATMAZ, S.S. Physico-chemical properties in honey from different regions of Turkey. **Food Chemistry**, Barking, v. 123, p. 41-44, 2010.

KAMARATOS, A.V.; TZIROGIANNIS, K.N.; IRAKLIANOU, S.A.; PANOUTSOPOULOS, G.I.; KANELLOS, I.E.; MELIDONIS, A.I. Manuka honey-impregnated dressings in the treatment of neuropathic diabetic foot ulcers. **International Wound Journal**, Oxford, v. 11, n. 3, p. 259-263, 2012.

KANNER, J. Oxidative processes in meat and meat products: quality implications. **Meat Science**, Barking, v. 36, p. 169–189, 1994.

KARABAGIAS, I.K.; BADEKA, A.; KONTAKOS, S.; KARABOURNIOTI, S.; KONTOMINAS, M.G. Characterisation and classification of Greek pine honeys according to their geographical origin based on volatiles, physicochemical parameters and chemometrics. **Food Chemistry**, Barking, v. 146, p. 548- 557, 2014.

KĀSKONIENĒ, V.; VENSKUTONIS, P.R. Floral Markers in Honey of Various Botanical and Geographic Origins: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 6, p. 620-634, 2010.

KASSIM, M.; ACHOUI, M.; MANSOR, M.; YUSOFF, K.M. The inhibitory effects of Gelam honey and its extracts on nitric oxide and prostaglandin E(2) in inflammatory tissues. **Fitoterapia**, Milano, v. 81, n. 8, p. 1196-1201, 2010.

KEK, S.P.; CHIN, N.L.; TAN, S.W.; YUSOF, Y.A.; CHUA, L.S. Molecular identification of honey entomological origin based on bee mitochondrial 16S rRNA and COI gene sequences. **Food Control**, Guildford, v. 78, p. 150-159, 2017.

KHANBABAEE, K.; VAN-REE, T. Tannins: Classification and definition. **Natural Product Reports**, London, v. 18, n. 6, p. 641-649, 2001.

KIM, K.H.; TSAO, R.; YANG, R.; CUI, S.W. Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. **Food Chemistry**, Barking, v. 95, p. 466-473, 2006.

KING, A.; YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **Journal of the American Dietetic Association**, Chicago, v. 50, n. 2, p. 213-218, 1999.

KISELEV, K.V.; GRICORCHUK, V.P.; OGNEVA, Z.V.; SUPRUN, A.R.; DUBROVINA, A.S. Stilbene biosynthesis in the needles of spruce *Picea jezoensis*. **Phytochemistry**, London, v. 131, p. 57-67, 2016.

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**, New York, v. 31, p. 322-325, 2011.

KOLEVA, I.I.; NIEDERLÄNDER, H.A.G.; VAN BEEK, T.A. Application of ABTS radical cation for selective on-line detection of radical scavengers in HPLC eluates. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 73, n. 14, p. 3373–3381, 2001.

KÚS, P.M.; JERCOVIĆ, I.; TUBEROSO, C.I.G.; MARIJANOVIĆ, Z.; CONGIU, F. Cornflower (*Centaurea cyanus* L.) honey quality parameters: Chromatographic fingerprints, chemical biomarkers, antioxidant capacity and others. **Food Chemistry**, Barking, v. 142, p. 12-18, 2014.

LACHMAN, J.; OSÁK, M.; HEJTMÁNKOVÁ, A.; KOVÁŘOVÁ, E. Evaluation of antioxidant activity and total phenolics of selected Czech honeys. **LWT - Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 43, n. 1, p. 52-58, 2010.

LANDETE, J.M. Plant and mammalian lignans: A review of source, intake, metabolism, intestinal bacteria and health. **Food Research International**, Ottawa, v. 46, n. 1, p. 410-424, 2012.

LASEKAN, O.; SEE, N.S. Key volatile aroma compounds of three black velvet tamarind (*Dialium*) fruit species. **Food Chemistry**, Barking, v. 168, p. 561-565, 2015.

LATTANZIO, V.; LATTANZIO, V.M.T.; CARDINALI, A. Role of phenolics in the residence mechanism of plants against fungal pathogens and insects. **Phytochemistry**, London, v. 37, p. 23-67, 2006.

LAU, F.C.; SHUKITT-HALE, B.; JOSEPH, J.A. The beneficial effects of fruit polyphenols on brain aging. **Neurobiology of Aging**, Fayetteville, v. 26, n. 1, p. 128-132, 2005.

LEE, J.; CHAN, B.L.S.; MITCHELL, A.E. Identification/quantification of free and bound phenolic acids in peel and pulp of apples (*Malus domestica*) using high resolution mass spectrometry (HRMS). **Food Chemistry**, Barking, v. 214, p. 301-310, 2017.

LEITE, J.C.A.; CASTRO, T.M.X.; BARBOSA-FILHO, J.M.; SIQUEIRA-JUNIOR, J.P.; MARQUES-SANTOS, L.F. Photoprotective effect of coumarin and 3-hydroxycoumarin in sea urchin gametes and embryonic cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Lausanne, v. 146, p. 44-51, 2015.

LEÓN-RUIZ, V.; VERA, S.; GONZÁLEZ-PORTO, A.V.; ANDRÉS, M.P.S. Analysis of water-soluble vitamins in honey by isocratic RP-HPLC. **Food Analytical Methods**, New York, v. 6, p. 448-496, 2013.

LI, J.; JIA, S.; YOON, S.J.; LEE, S.J.; KWON, S.W.; LEE, J. Ion-pair dispersive liquid-liquid microextraction solidification of floating organic droplets method for the rapid and sensitive detection of phenolic acids in wine samples using liquid chromatography combined with a core-shell particle column. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 45, p. 73-79, 2016.

LI, X.; JI, C.; SUN, Y.; YANG, M.; CHU, X. Analysis of synthetic antioxidants and preservatives in edible vegetable oil by HPLC/TOF-MS. **Food Chemistry**, Barking, v. 113, p. 692-700, 2009.

LI, N.; ZHANG, P.; WU, H.; WANG, H.; LIU, F.; WANG, W. Natural flavonoids function as chemopreventive agents from Gancan (*Glycyrrhiza inflata* Batal). **Journal of Functional Foods**, Amsterdam, v. 19, part A, p. 563-574, 2015.

LIAO, Z.; HE, H.; ZENG, G.; LIU, D.; TANG, L.; YIN, D.; CHEN, D. Delayed protection of Ferulic acid in isolated hearts and cardiomyocytes: Upregulation of heat-shock protein 70 via NO-ERK1/2 pathway. **Journal of Functional Foods**, Amsterdam, v. 34, p. 18-27, 2017.

LLORENT-MARTÍNEZ, E.J.; ORTEGA-BARRALES, P.; FERNÁNDEZ-DE-CÓRDOVA, M.L.; RUIZ-MEDINA, A. Trends in flow-based analytical methods applied to pesticide detection: A review. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 684, p. 30-39, 2011.

LORENZ, K.; LAL, R. Chapter Three-environmental impact of organic agriculture. **Advances in Agronomy**, New York, v. 139, p. 99-152, 2016.

MAGALHÃES, L.M.; LUCIO, M.; SEGUNDO, M.A.; REIS, S.; LIMA, J.F.C. Automatic flow injection based methodologies for determination of scavenging capacity against biologically relevant reactive species of oxygen and nitrogen. **Talanta**, Oxford, v. 78, n. 4-5, p. 1219-1226, 2009.

MAISUTHISAKUL, P.; SUTTAJIT, M.; PONGSAWATMANIT, R. Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. **Food Chemistry**, Barking, v. 100, p. 1409-1418, 2007.

MANZANARES, A.B.; GARCÍA, Z.H.; GALDÓN, B.R.; RODRÍGUEZ, R.E.; ROMERO, C.D. Differentiation of blossom and honeydew honeys using multivariate analysis on the physicochemical parameters and sugar composition. **Food Chemistry**, Barking, v. 126, p. 664- 672, 2011.

MANYI-LOH, C.E. NDIP, R.N.; CLARKE, A.M. Volatile compounds in honey: a review on their involvement in aroma, botanical origin determination and potential biomedical activities. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 12, p. 9514-9532, 2011.

MATIAS, I.; BUOSI, A.S.; GOMES, F.C.A. Functions of flavonoids in the central nervous system: Astrocytes as targets for natural compounds. **Neurochemistry International**, Oxford, v. 95, p. 85-91, 2016.

MEDA, A.; LAMIENT, C.E.; ROMITO, M.; MILLOGO, J.; NACOUUMA, O.G. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Faso honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, Barking, v. 91, p. 571-577, 2005.

MELO, P.S.; MASSARIOLI, A.P.; DENNY, C.; SANTOS, L.F.; FRANCHIN, M.; PEREIRA, G.E.; VIEIRA, T.M.S.; ROSALEN, O.L. Winery by-products: Extraction optimization, phenolic composition and cytotoxic evaluation to act as a new source of scavenging of reactive oxygen species, **Food Chemistry**, Barking, v. 181, p. 160-169, 2015.

MEO, S.A.; AL-ASIRI, S.A.; MAHESAR, A.L.; ANSARI, M.J. Role of honey in modern medicine. **Saudi Journal of Biological Sciences**, Riyadh, Saudi Arabia, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.12.010>. In press.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, Songkhla, Thailand, v. 26, p. 211-219, 2004.

MONIRUZZAMAN, M.; RODRÍGUEZ, I.; RODRÍGUEZ- CABO, T.; CELA, R.; SULAIMAN, S.A.; GAN, S.H. Assessment of dispersive liquid–liquid microextraction conditions for gas chromatography time-of-flight mass spectrometry identification of organic compounds in honey. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1368, p. 26-36, 2014.

MOREIRA, A.V.B.; MANCINI-FILHO, J. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 17, n. 4, p. 411-424, 2004.

MOREIRA, R.F.A.; TRUGO, L.C.; PIETROLUONGO, M.; DE-MARIA, C.A.B. Flavor composition of cashew (*Anacardium occidentale*) and marmeleiro (*Croton* Species) honeys. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 50, n. 26, p. 7616-7621, 2002.

MOREIRA, R.F.A.; DE MARIA, C.A.B.; PIETROLUONGO, M.; TRUGO, L.C. Chemical changes in the non-volatile fraction of Brazilian honeys during storage under tropical conditions. **Food Chemistry**, Barking, v. 104, p. 1236-1241, 2007.

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

MOUHOUBI-TAFININE, Z.; OUCHEMOUKH, S.; TAMENDJARI, A. Antioxydant activity of some algerian honey and própolis. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 88, p. 85-90, 2016.

MURPHY, M.P. How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biochemical Journal**, London, v. 417, p. 1-13, 2009.

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

NAYIK, G.A.; NANDA, V. Characterization of the volatile profile of unifloral honey from Kashmir Valley of India by using solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 240, p. 1091-1100, 2015.

NAYIK, G.A.; NANDA, V. A chemometric approach to evaluate the phenolic compounds, antioxidant activity and mineral content of different unifloral honey types from Kashmir, India. **LWT - Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 74, p. 504-513, 2016.

NOOH, H.Z.; NOUR-ELDIEN, N.M. The dual anti-inflammatory and antioxidant activities of natural honey promote cell proliferation and neural regeneration in a rat model of colitis. **Acta Histochemica**, Jena, Germany, v. 118, p. 588-595, 2016.

ORMOND, J.G.P.; de PAULA, S.R.L.; FAVARET, F.; ROCHA, L.T.M. Agricultura orgânica: quando o passado é futuro. **BNDES Setorial**, Brasília, DF, n. 15, p. 3-34, 2002.

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

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

PATTAMAYUTANON, P.; ANGELI, S.; THAKEOW, P.; ABRAHAM, J.; DISAYATHANOOWAT, T.; CHANTAWANNAKUL, P. Volatile organic compounds of Thai honeys produced from several floral sources by different honey bee species. **PlosOne**, San Francisco, v. 12, n. 2, e0172099, 2017. doi: 10.1371/journal.pone.0172099.

PATRÍCIA, V.; OLIVERIO, V.; TRINY, L.; FLAVIÁN, M. Meliponini biodiversity and medicinal uses of pot-honey from El Oro province in Ecuador. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 26, n. 6, p. 502-506, 2015.

PAUL, S.; MIZUNO, C.; LEE, H.J.; ZHENG, X.; CHAJKOWISK, S.; RIMOLDI, J.M.; CONNEY, A.; SUH, N.; RIMANDO, A.M. *In vitro* and *in vivo* studies on stilbene analogs as potential treatment agents for colon cancer. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 45, p. 3702-3708, 2010.

PELLATI, F.; PRENCIPE, F.O.; BENVENUTI, S. Headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry characterization of propolis volatile compounds. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 84, p. 103-111, 2013.

PELUFFO, G.; RADI, R. Biochemistry of protein tyrosine nitration in cardiovascular pathology. **Cardiovascular Research**, London, v. 75, p. 291-302, 2007.

PERALTA, E.D.; KOBLITZ, M.G.B. Mel. In: KLOBLITZ, M.G.B. (Ed.). **Matérias-primas alimentícias: composição e controle da qualidade**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. cap. 9, p. 267-289.

PEREZ-VISCAINO, F.; DUARTE, J. Flavonols and cardiovascular disease. **Molecular Aspects of Medicine**, Oxford, v. 31, p. 478-494, 2010.

PEUCHANT, E.; BRUN, J.L.; RIGALLEAU, V.; DUBORG, L.; THOMAS, M.J.; DANIEL, J.Y.; LENG, J.J.; GIN, H. Oxidative and antioxidative status in pregnant women with either gestational or type 1 diabetes. **Clinical Biochemistry**, Toronto, v. 37, p. 293-298, 2004.

PEUHU, E.; PAUL, P.; REMES, M.; HOLMBON, T.; EKLUND, P.; SJÖHOLM, R.; ERIKSSON, E. The antitumor lignan Nortrachelogenin sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-induced cell death by inhibition of the Akt pathway and growth factor signaling. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 86, n. 5, p. 571-583, 2013.

PHI, N. T. L.; NISHIYAMA, C.; CHOI, H.S.; SAWAMURA, M. Evaluation of characteristic croma compounds of citrus Natsudaïdai Hayata (Natsudaïdai) cold-pressed peel oil. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tokyo, v. 70, n. 8, p. 1832-1838, 2006.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.

PINHO, G.P.; NEVES, A.A.; QUEIROZ, M.E.L.R.; SILVÉRIO, F.O. Optimization of the liquid-liquid extraction method and low temperature purification (LLE-LTP) for pesticide residue analysis in honey samples by gas chromatography. **Food Control**, Guildford, v. 21, p. 1307-1311, 2010.

PITA-CALVO, C.; VÁZQUEZ, M. Differences between honeydew and blossom honeys: A review. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 59, p. 79-87, 2017.

PLUTOWSKA, B.; CHMIEL, T.; DYMERSKI, T.; WARDENCKI, W. A headspace solid-phase microextraction method development and its application in the determination of volatiles in honeys by gas chromatography. **Food Chemistry**, Barking, v. 126, n. 3, p. 1288-1298, 2011.

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

PREMRATANACHAI, P.; CHANCHAO, C. Review of the anticancer activities of bee products. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Singapore, v. 4, n. 5, p. 337-344, 2014.

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

RADI, R.; PELUFFO, G.; ALVAREZ, M.N.; NAVILIAT, M.; CAYOTA, A. Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 30, p. 463-488, 2001.

RAJENDRAN, P.; RENGARAJAN, T.; NANDAKUMUR, N.; PALANISWAMI, R.; NISHIGAKI, Y.; NISHIGAKI, I. Kaempferol, a potential cytostatic and cure for inflammatory disorders. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v. 86, p. 103-112, 2014.

RAO, P.V.; KRISHNAN, K.T.; SALLEH, N.; GAN, S.H. Biological and therapeutic effects of honey produced by honey bees and stingless bees: a comparative review. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Curitiba, v. 26, p. 657-664, 2015.

RICE-EVANS, C.A.; MILLEER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 20, n. 7, p. 933-935, 1996.

RODRÍGUEZ, H.; CURIEL, J.A.; LANDETE, J.M.; RIVAS, B.L.; FELIPE, F.L.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; MANCHEÑO, J.M.; MUÑOZ, R. Food phenolics and lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 132, p. 79-90, 2009.

ROMANI, A.; CAMPO, M.; PINELLI, P. HPLC/DAD/ESI-MS analyses and anti-radical activity of hydrolyzable tannins from different vegetal species. **Food Chemistry**, Barking, v. 130, p. 214-221, 2012.

SCALABRIN, E.; RADAELLI, M.; CAPODAGLIO, G. Simultaneous determination of shikimic acid, salicylic acid and jasmonic acid in wild and transgenic *Nicotiana langsdorffii* plants exposed to abiotic stresses. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 103, p. 53-60, 2016.

SCHAFER, F.Q.; BUETTNER, G.R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 30, n.11, p. 1191-1212, 2001.

SCHNEIDER, S.S.; DeGRANDI-HOFFMAN, G.; SMITH, D.R. The African honey bee: factors contributing to a successful biological invasion. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 49, p. 351-376, 2004.

SERAGLIO, S.K.T.; VALESE, A.C.; DAGUER, H.; BERGAMO, G.; AZEVEDO, M.S.; GONZAGA, L.V.; FETT, R.; COSTA, A.C.O. Development and validation of a LC-ESI-MS/MS method for the determination of phenolic compounds in honeydew honeys with the diluted-and-shoot approach. **Food Research International**, Ottawa, v. 87, p. 60-67, 2016.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Phenolics in food and nutraceuticals**. 2. ed. Boca Raton: CRC press, 2003. 576 p.

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

SHEN, T.; WANG, X.N.; LOU, H.X. Natural stilbenes: an overview. **Natural Product Reports**, London, v. 26, n. 7, p. 916-935, 2009.

SHIMODA, M.; WU, Y.; OSAJIMA, Y. Aroma Compounds from Aqueous Solution of Haze (*Rhus succedanea*) Honey Determined by Adsorptive Column Chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 44, p. 3913-3918, 1996.

SHOKRI, H.; SHARIFZADEH, A. Effet fongicide de miels différents contre les espèces de *Candida fluconazole-résistants* isolées de patients VIH+ avec une candidose. **Journal of Medical Mycology**, Paris, 2017. Doi: 10.1016/j.mycmed.2017.01.004. In press.

SIDDIQUI, A.J.; MUSHARRAF, S.G.; CHOUDHARY, M.I.; RAHMAN, A. Application of analytical methods in authentication and adulteration of honey. **Food Chemistry**, Barking, v. 217, p. 687-698, 2017.

SILVA, I.A.A.; SILVA, T.M.S.; CAMARA, C.A.; QUEIROZ, N.; MAGNANI, M.; NOVAIS, J.S.; SOLEDADE, L.E.B.; LIMA, E.O.; SOUZA, A.L.; SOUZA, A.G. Phenolic profile, antioxidant activity and palynological analysis of stingless bee honey from Amazonas, Northern Brazil. **Food Chemistry**, Barking, v. 151, p. 3552-3558, 2013.

SILVA, P.M.; GAUCHE, C.; GONZAGA, L.V.; COSTA, A.C.O.; FETT, R. Honey: Chemical composition, stability and authenticity. **Food Chemistry**, Barking, v. 196, p. 309-32, 2016.

SILVA, T.M.S.; SANTOS, F.P.; EVANGELISTA-RODRIGUES, A.; SILVA, E.M.S.; SILVA, G.S.; NOVAIS, J.S. Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaíra (*Melipona subnitida*) honey. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 29, p. 10-18, 2013.

SILVA, V.L.; CERQUEIRA, M.R.; LOWINSSOHN, MATOS, M.A.C.; MATOS, R.C. Amperometric detection of ascorbic acid in honey using ascorbate oxidase immobilised on amberlite IRA-743. **Food Chemistry**, Barking, v. 133, p. 1050-1054, 2012.

SINGLETON, B.V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidant by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, New York, v. 299, p. 152-179, 1999.

SOARES, A.E.E. Captura de enxames com caixas iscas e sua importância no melhoramento de abelhas africanizadas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 15., CONGRESSO BRASILEIRO DE MELIPONICULTURA 1., 2004, Natal. **Anais eletrônicos...** Natal: CBA, SEBRAE, 2004. Disponível em: <http://www.serapis.com.br/site/artigoscientificos/conf_captura_enxames_caix_isca_abelha_afric.pdf> Acesso em: 31 jul. 2017.

SOCHA, R.; JUSZCZAK, L.; PIETRZYK, S.; GAŁKOWSKA, D.; FORTUNA, T.; WITCZAK, T. Phenolic profile and antioxidant properties of Polish honeys. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 46, p. 528-534, 2011.

SORIA, A.C.; MARTÍNEZ-CASTRO, I.; SANZ, J. Some aspects of dynamic headspace analysis of volatile components in honey. **Food Research International**, Ottawa, v. 41, n. 8, p. 838-848, 2008.

SORIA, A.C.; GONZÁLEZ, M.; DE LORENZO, C.; MARTÍNEZ-CASTRO, I.; SANZ, J. Characterization of artisanal honeys from Madrid (Central Spain) on the basis of their melissopalynological, physicochemical and volatile composition data. **Food Chemistry**, Barking, v. 85, n. 1, p. 121-130, 2004.

SOUSA, J.M.; SOUZA, E.L.; MARQUES, G.; MEIRELES, B.; CORDEIRO, A.T.M.; GULLÓN, B.; PINTADO, M.M.; MAGNANI, M. Polyphenolic profile and antioxidant and antibacterial activities of monofloral honeys produced by Meliponini in the Brazilian semiarid region. **Food Research International**, Ottawa, v. 84, p. 61-68, 2016.

SPITERI, M.; ROGERS, K.M.; JAMIN, E.; THOMAS, F.; GUYADER, S.; LEES, M.; RUTLEDGE, D.N. Combination of ¹H NMR and chemometrics to discriminate manuka honey from other floral honey types from Oceania. **Food Chemistry**, Barking, v. 217, p. 766-722, 2017.

STEEN, I.; WAEHRENS, S.S.; PETERSEN, M.A.; MÜNCHOW, M.; BREDIE, W.L.P. Influence of serving temperature on flavour perception and release of *Bourbon Caturra* coffee. **Food Chemistry**, Barking, v. 219, p. 61-68, 2017.

TESTAI, L. Flavonoids and mitochondrial pharmacology: A new paradigm for cardio protection. **Life Sciences**, Oxford, v. 135, p. 68-76, 2015.

TETTE, P.A.S.; GUIDI, L.R.; GLÓRIA, M.B.A.; FERNANDES, C. Pesticides in honey: A review on chromatographic analytical methods. **Talanta**, Oxford, v. 149, p. 124-141, 2016.

THOMAS, C.; MACKEY, M.M.; DIAZ, A.A.; COX, D.P. Hydroxyl radical is produced via the Fenton reaction in submitochondrial particles under oxidative stress: implications for diseases associated with iron accumulation. **Redox Report**, Edinburgh, v. 14, n. 3, p. 102-108, 2009.

TIVERON, A.P.; ROSALEN, P.L.R.; FRANCHIN, M.; LACERDA, R.C.C.; BUENO-SILVA, B.; BENSO, B.; DENNY, C.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M. Chemical characterization and antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory activities of South Brazilian organic propolis. **PlosOne**, San Francisco, v.11, n.11, e0165588, 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0165588.

TORNUK, F.; KARAMAN, S.; OZTURK, I.; TOKER, O.S.; TASTEMUR, B.; SAGDIC, O.; DOGAN, M.; KAYACIER, A.; Quality characterization of artisanal and retail Turkish blossom honeys: Determination of physicochemical, microbiological, bioactive properties and aroma profile. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 46, p. 124-131, 2013.

TSAO, R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. **Nutrients**, Basel, v. 2, p. 1231-1246, 2010.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; BENFATO, V.M.; BENFATO, M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n.5, p. 1323-1338, 2007.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Exeter, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VISIOLI, F.; KEANEY JUNIOR, J.F.; HALLIWELL, B. Antioxidants and cardiovascular disease; panaceas or tonics for tired sheep? **Cardiovascular Research**, London, v. 47, n. 409, 2000.

WANG, Q.; ZHOU, K.; NING, Y.; ZHAO, G. Effect of the structure of gallic acid and its derivatives on their interaction with plant ferritin. **Food Chemistry**, Barking, v. 123, p. 260-267, 2016.

WANG, Y.; MA, L.T.; XU, B.H. Diversity in life history of queen and worker honey bees, *Apis mellifera* L. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, Suwon, South Korea v. 18, p. 145-149, 2015.

WHITE JUNIOR, J.W.H. Honey. **Advances in Food Research**, New York, v. 24, p. 278-374, 1978.

WIESE, H. **Apicultura**: novos tempos. 4. ed. Guaíba: Agropecuária, 2000. 424 p.

WITAICENIS, A.; SEITO, L.N.; CHAGAS, A.S.; JUNIOR, L.D.A.; LUCHINI, A.C.; RODRIGUES-ORSI, P.; CESTARIA, S.H.; STASI, L.C.D. Antioxidant and intestinal anti-inflammatory effects of plant-derived coumarin derivatives. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 21, p. 240-246, 2014.

XU, Z. Important antioxidant phytochemicals in agricultural food products. In: XU, Z.; HOWARD, L.R. (Ed.). **Analysis of antioxidant-rich phytochemicals**. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2012. p. 1–16.

YAGHOobi, N.; AL-WAILI, N.; GHAYOUR-MOBARHAN, M.; PARIZADEH, S.M.; ABASALTI, Z.; YAGHOobi, Z.; YAGHOobi, F.; ESMAEILI, H.; KAZEMI-BAJESTANI, S.M.; AGHASIZADEH, R.; SALOOM, K.Y.; FERNS, G.A. Natural honey and cardiovascular risk factors; effects on blood glucose, cholesterol, triacylglycerole, CRP, and body weight compared with sucrose. **Scientific World Journal**, Boynton Beach, v. 20, p. 463–469, 2008.

YANG, Y.; BATTESTI, M.J.; PAOLINI, J.; MUSELLI, A.; TOMI, P.; COSTA, J. Melissopalynological origin determination and volatile composition analysis of Corsican “*Erica arborea* spring maquis” honeys. **Food Chemistry**, Barking, v. 134, p. 37-47, 2012.

YAO, L.; DATTA, N.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; FERRERES, F.; MARTOS, I.; SINGANUSONG, R. Flavonoids, phenolic acids and abscisic acid in Australian and New Zealand *Leptospermum* honeys. **Food Chemistry**, Barking, v. 81, n. 2, p. 159-168, 2003.

ZABELA, V.; SAMPATH, C.; OUFIR, M.; MORADI-AFRAPOLI, F.; BUTTERWECK, V.; HAMBURGER, M. Pharmacokinetics of dietary kaempferol and its metabolite 4-hydroxyphenylacetic acid in rats. **Fitoterapia**, Milano, v. 115, p. 189-197, 2016.

ZALIBERA, M.; STAŠKOA, A.; ŠLEBODOVÁA, A.; JANČOVIČOVÁB, V.; ČERMÁKOVÁČ, T.; BREZOVÁA, V. Antioxidant and radical-scavenging activities of Slovak honeys – An electron paramagnetic resonance study. **Food Chemistry**, Barking, v. 110, n. 2, p. 512-521, 2008.