



UFRR

UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS

IOLETE DO NASCIMENTO ARAÚJO MACIEL

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E BOTÂNICA DE MEL  
AMARGO PROVENIENTE DO MUNICÍPIO DO CANTÁ - RR

Boa Vista, RR

2013

IOLETE DO NASCIMENTO ARAÚJO MACIEL

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E BOTÂNICA DE MEL  
AMARGO PROVENIENTE DO MUNICÍPIO DO CANTÁ - RR

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Recursos Naturais da Universidade Federal de Roraima, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais. Área de concentração: Bioprospecção.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Adriana Flach.

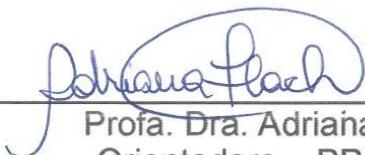
Boa Vista, RR

2013

## IOLETE DO NASCIMENTO ARAÚJO MACIEL

**Atividade antioxidante, caracterização química e botânica de mel amargo  
proveniente do município do Cantá - RR**

Dissertação apresentada como pré-requisito para conclusão do Curso de Mestrado em Recursos Naturais da Universidade Federal de Roraima, defendida em 08 de outubro de 2013 e avaliada pela seguinte Banca Examinadora:



---

Profa. Dra. Adriana Flach  
Orientadora – PRONAT



---

Prof. Dr. Silvio José Reis da Silva  
Membro – Museu Integrado de Roraima



---

Prof. Dr. Habel Nasser Rocha da Costa  
Membro – Universidade Federal de Roraima



---

Prof. Dr. Luiz Antonio Mendonça Alves da Costa  
Membro – Universidade Federal de Roraima

À Letícia Maria, minha querida filha, pelo  
carinho e afeto incondicional. Te amo filha.



## AGRADECIMENTOS

A Deus, meu refúgio espiritual.

À Universidade Federal de Roraima, pela oportunidade.

Ao CNPq pelo financiamento.

Ao meu marido, Márcio Ferreira Maciel, por estar sempre ao meu lado com carinho, apoio, incentivo e compreensão;

À minha filha, Letícia Maria Araújo Maciel, por me receber “todos os dias” com o sorriso aberto e abraço apertado, que renova as minhas energias e me encoraja a continuar na batalha.

À minha família: mãe, pai, sogro, sogra, irmãos, cunhados, primos, sobrinhos... Pelo incentivo e apoio.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Adriana Flach, pelo exemplo, pelos ensinamentos, dedicação, paciência e apoio, mas também, por ter me permitido desfrutar de sua amizade.

Ao Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Luiz Antônio Mendonça Alves da Costa, por sempre estar disposto a colaborar com suas críticas, sugestões e orientações.

Ao Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> José Silvio Reis da Silva, pela análise melissopalínológica, pelas dicas e sugestões.

À Dr<sup>a</sup> Andréa Flores, curadora do Museu Integrado de Roraima, pela identificação botânica e sugestões.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Lúcia Belém Pinheiro, da Universidade Federal do Amazonas, por ceder gentilmente, o laboratório de espectrometria de massas; e ao Felipe Moura, doutorando que me auxiliou no preparo das amostras e análises por ESI/MS/MS e APCI/MS/MS.

Aos professores da banca examinadora, que colaboraram com suas críticas e sugestões.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais, que colaboraram com a minha formação, contribuindo com discussões e compartilhando conhecimentos nas aulas ministradas.

Ao Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Márcio Akira Couceiro e à Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Flavia Antunes, pelo incentivo na participação da seleção do mestrado e realização desta pesquisa.

Aos colegas de caminhada “do mestrado”, pelo carinho, apoio e desabafos. Em especial, à Debora, à Elisangela, à Érica Veras, à Érika Perli, à Mayara, ao Leandro e ao Edmar, que estiveram mais próximos e compartilharam comigo sua companhia, carinho, ombro amigo e amizade.

Aos colegas do laboratório de moléculas bioativas, Edneide, Etyene, Gilmar, Iolanda (minha irmã querida) e Márcia, pela demonstração de carinho, respeito e colaboração no

desenvolvimento desta pesquisa, seja nas injeções no CG-EM, nas análises espectrofotométricas, no preparo dos extratos ou nas conversas e cafezinhos tão agradáveis.

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

Meu sincero “muito obrigada”!

## RESUMO

No município do Cantá-RR a produção de mel amargo é atribuída pelos apicultores da região ao período de floração das plantas do gênero *Vochysia*. Esta pesquisa tem como objetivo investigar a existência de marcadores químicos que possam confirmar a origem botânica deste mel, bem como verificar sua composição química e atividade antioxidante. Para tanto, foram elaborados extratos de mel amargo por XAD-2, C18, líquido-líquido e mel bruto liofilizado. Para comparação da constituição foram obtidos também os extratos etanólicos das flores sem anteras e das anteras das flores (ricos em pólen). Os extratos de mel por XAD-2 e etanólicos das flores foram fracionados, sendo obtidos extratos hexânico, clorofórmico, acetato de etila e metanólico. Análises por espectrometria de massas foram realizadas com os diversos extratos e verificou-se uma grande semelhança entre os espectros. Por meio de padrões autênticos, foram identificados a crisina e o ácido cafeico nos extratos do mel amargo. Nas análises dos extratos hexânicos, por meio de cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), foram identificados diversos *n*-alcanos e *n*-alcenos com tempos de retenção e índices de retenção idênticos no mel e nas flores. Para determinar a posição da dupla ligação realizou-se uma derivatização com dimetildissulfeto. Os *n*-alcenos semelhantes nos extratos do mel e das flores apresentaram insaturação na posição 1. Análises espectrofotométricas foram realizadas para quantificar os compostos fenólicos e foram obtidos 94,64 mg ácido gálico/100g de mel e os flavonoides com 86,23 g quercetina/100g de mel. O mel apresentou uma coloração branca, com base na escala de Pfund e a atividade antioxidante, um IC<sub>50</sub> de 16,94 mg/mL, determinado por meio do método do DPPH. Este trabalho permitiu confirmar a origem botânica do mel obtida por melissopalínologia e por dados químicos, além de caracterizar quimicamente o mel através da quantificação de algumas classes de produtos naturais e sua atividade antioxidante.

Palavras-chave: Vochysaceae. Fenólicos. Flavonoides. Hidrocarbonetos.

## ABSTRACT

The bitter honey production in the city of Cantá-RR has been attributed by beekeepers in the region to the period of flowering plants of the genus *Vochysia*. This research aims to investigate the existence of chemical markers that can confirm the botanical origin of the honey, as well as verify their chemical composition and antioxidant activity. Thus, we prepared extracts of bitter honey by XAD-2, C18, liquid-liquid (dichloromethane) and lyophilized honey. For comparison of the constitution were also obtained the extracts ethanol of the flowers without anthers and of the anthers of the flowers, rich in pollen. The extracts of honey XAD-2 and ethanol flowers were fractionated, obtaining extracts with hexane, chloroform, ethyl acetate and methanol. Mass spectrometric analyzes were performed with the different extracts and there was a great similarity between the spectra. By using authentic standards, chrysin and caffeic acid were identified in the extracts of bitter honey. In hexanic extract analyzes, through gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), several *n*-alkanes and *n*-alkenes were identified with times of retention and identical retention index in the honey and in the flowers. To determine the position of the double bond, a derivatization with dimethyl disulfide was performed. The similar *n*-alkenes in extracts of honey and flowers presented unsaturation at position 1. Spectrophotometric analyses were performed to quantify the phenolic compounds getting to result of 94,64 mg of gallic acid /100 g of honey and flavonoids with 86,23 g/100g honey. The honey presented a white coloration, based on the Pfund scale and antioxidant activity one IC<sub>50</sub> of 16,94 mg / mL, determined by means of the DPPH method. This work confirmed the botanical origin of honey obtained by melissopalynology and chemical data, and also contributed to the chemical characterization of the honey through quantification of some classes of natural products and their antioxidant activity.

Key words: Vochysaceae. Phenolics. Flavonoids. Hydrocarbons.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Distribuição da família Vochysaceae.-----	18
Figura 2 -	Flavonoide ligado a um anel pirrolizidinico.-----	20
Figura 3 -	Desenho simplificado de uma fonte de ionização por eletrospray.-----	23
Figura 4 -	Estrutura química básica dos flavonoides em relação à origem biossintética.-----	26
Figura 5 -	Principais classes dos flavonoides.-----	27
Figura 6 -	Complexo flavonoide- $Al^{+3}$ , em solução metanólica de cloreto de alumínio. -----	28
Figura 7 -	Perfil espectrofotométrico do radical 2-2-difenil-picril-hidrazil (DPPH). -----	31
Figura 8 -	Material botânico coletado contendo folhas, flores (A), frutos (B), casca e resina (C).-----	34
Figura 9 -	Padrão utilizado para análise de compostos fenólicos.-----	40
Figura 10 -	Padrão utilizado para análise de flavonas e flavonóis.-----	42
Figura 11 -	Padrão utilizado para análise de flavononas e diidroflavonóis.---	43
Figura 12 -	(A) Soluções estoque de pinocembrina, KOH e DNP e (B) sistema de aquecimento da solução estoque de pinocembrina, solução estoque da amostra e brancos da curva e da amostra.----	44
Figura 13 -	Estrutura básica das antocianinas.-----	46
Figura 14 -	Padrão utilizado para análise de carotenoides.-----	47
Figura 15 -	Estrutura química do radical 2-2-difenil-picril-hidrazil (DPPH).-	47
Figura 16 -	Soluções estoque de DPPH, mel e 5 diluições da solução de mel, dispostos da esquerda para direita.-----	48
Figura 17 -	Espectros de massas por ESI/MS no modo negativo do extrato da antera, das flores (A); extrato das flores sem antera (B); extrato do mel por XAD-2 (C); extrato do mel por C18 (D), extrato líquido-líquido (E) e por último, mel liofilizado (F).-----	53
Figura 18 -	(A) Espectro de massas do padrão de crisina, (B) fragmentação do íon 253 do padrão e (C) fragmentação do íon 253 do extrato	

	de mel por C18.-----	55
Figura 19 -	Proposta de fragmentação do íon 253.-----	57
Figura 20 -	(A) espectro de massas do extrato de mel (XAD-2) e (B) do padrão de ácido cafeico, bem como (C) os fragmentos (MS/MS) característicos do ácido cafeico (padrão) e (D) fragmentos MS/MS característicos para o ácido cafeico da amostra. -----	58
Figura 21 -	(A) Espectro de massas do íon 179 presente nos extratos de mel por C18 e (B) mel liofilizado.-----	59
Figura 22 -	Cromatogramas de íons totais dos extratos das flores (EEF-hex) e do mel (EM-hex).-----	62
Figura 23 -	Espectro de massas do hexadecano e fragmentos majoritários. --	62
Figura 24 -	Espectro de massas do hexadeceno e fragmentos majoritários. --	63
Figura 25 -	Espectro de massas do hexadeceno derivatizado apresentando íons estáveis $m/z$ 243 e 75.-----	66
Figura 26 -	Mecanismo de fragmentação do hexadeceno apresentando instauração na posição 2.-----	67
Figura 27 -	Espectro de massas de hexadeceno derivatizado apresentando íons estáveis $m/z$ 257 e 61.-----	67
Figura 28 -	Mecanismo de fragmentação do hexadeceno apresentando instauração na posição 1.-----	68
Figura 29 -	Cromatogramas de íons totais das anteras das flores (EEAF) e das flores sem antera (EEF).-----	70
Figura 30 -	Ensaio da curva padrão, na ordem crescente de concentração de ácido gálico.-----	74
Figura 31 -	Curva de calibração do ácido gálico, equação da reta e coeficiente de correlação ( $R^2$ ).-----	75
Figura 32 -	Branco (à esquerda) e solução de reação da amostra de mel (triplicata em azul).-----	75
Figura 33 -	Ensaio da curva padrão, na ordem crescente de concentração de quercetina.-----	79
Figura 34 -	Curva de calibração da quercetina, equação da reta e coeficiente de correlação ( $R^2$ ).-----	80
Figura 35 -	Branco (à esquerda) e solução de reação da amostra de mel	

	(triplicata à direita).-----	80
Figura 36 -	Ensaio da curva padrão, na ordem decrescente de concentração, do teor de pinocembrina.-----	83
Figura 37 -	Curva de calibração da pinocembrina, equação da reta e coeficiente de correlação ( $R^2$ ).-----	84
Figura 38 -	Branco (à esquerda) e triplicada da amostra de mel (à direita).---	85
Figura 39 -	Curva de calibração da atividade antioxidante. -----	92

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Classificação dos compostos fenólicos de acordo com o esqueleto básico.-----	24
Tabela 2 -	Classificação da coloração do mel segundo a escala de <i>Pfund.</i>	29
Tabela 3 -	Análise melissopalínológica de mel amargo. -----	50
Tabela 4 -	Rendimento dos extratos do mel, das flores e da antera das flores por diferentes tipos de extração. -----	51
Tabela 5 -	Fracionamento do extrato do mel por XAD-2. -----	52
Tabela 6 -	Fracionamento do extrato das flores (EEF). -----	52
Tabela 7 -	Constituintes identificados nos extratos das flores e do mel amargo.-----	64
Tabela 8 -	Posição da dupla de alcenos derivatizados dos extratos de mel e flor, frente à fração hexânica.-----	69
Tabela 9 -	Concentração, média e desvio padrão (DP) do ácido gálico, lidos a $\lambda = 798$ nm.-----	74
Tabela 10 -	Absorbâncias da amostra de mel amargo, média e desvio padrão.-----	76
Tabela 11 -	Teor de fenólicos totais em equivalente de ácido gálico. -----	77
Tabela 12 -	Concentração, média e desvio padrão (DP) do padrão de quercetina, lidos a $\lambda = 437$ nm.-----	79
Tabela 13 -	Absorbâncias do mel e média $\pm$ desvio padrão.-----	81
Tabela 14 -	Teor de flavonas e flavonóis em equivalente de quercetina.----	82
Tabela 15 -	Concentração, média e desvio padrão (DP) da pinocembrina, lidos a $\lambda = 493$ nm.-----	84
Tabela 16 -	Absorbâncias do mel, média e desvio padrão. -----	85
Tabela 17 -	Teor de flavononas e diidroflavonóis em equivalente de pinocembrina.-----	87
Tabela 18 -	Absorbâncias do mel, média e desvio padrão. -----	88

Tabela 19 -	Teor de flavonoides totais determinados em miligramas de flavonoides por 100 g de mel e expressos em média e desvio padrão.-----	89
Tabela 20 -	Absorbâncias do mel, média e desvio padrão. -----	90
Tabela 21 -	Concentração, absorvância, média e desvio padrão do ensaio da atividade antioxidante.-----	91

## ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABTS	Ácido 2,2-azino- <i>bis</i> (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfônico
APCI-MS	Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry
API	Atmospheric Pressure Ionization
API-MS	Atmospheric Pressure Ionization Mass Spectrometry
BSTFA	<i>bis</i> (trimetilsilil)trifluoroacetamida
CG-EM	Espectrometria de massas acoplada à cromatografia a gás
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DMDS	Dimetildissulfeto
DNP	2,4-dinitrofenilidrazina
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EEAF	Extrato etanólico das anteras das flores
EEF	Extrato etanólico das flores sem antera
EEF-AcE	Extrato etanólico das flores – fração acetato de etila
EEF-Clor	Extrato etanólico das flores – fração clorofórmica
EEF-Hex	Extrato etanólico das flores – fração hexânicas
EEF-MeOH	Extrato etanólico das flores – fração metanólica
EM-AcE	Extrato de mel – fração acetato de etila
EM-Clor	Extrato de mel – fração clorofórmica
EMel-XAD-2	Extrato de mel extraído com resina Amberlite XAD-2
EM-Hex	Extrato de mel – fração hexânica
EM-MeOH	Extrato de mel – fração metanólica
ESI	Electrospray Ionization
ESI-MS	Electrospray Ionization Mass Spectrometry
ESI-MS/MS	Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry
eV	Elétrons-volt
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
HCl	Ácido clorídrico
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
I.R.	Índice de retenção
IRc	Índice de retenção calculado
IRI	Índice de retenção da literatura
KOH	Hidróxido de potássio
<i>m/z</i>	Razão entre a massa e a carga de um fragmento
MS	Mass spectrometry
MS/MS	Tandem mass spectrometry
Nupenerg	Núcleo de Pesquisas Energéticas
RMN	Ressonância magnética nuclear
T.R.	Tempo de retenção
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
UV-visível	Ultravioleta-visível

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b>	14
1.1	A APICULTURA NO BRASIL	15
1.1.1	Mel	16
1.1.2	Mel amargo	17
1.2	GENERALIDADES DA FAMÍLIA VOCHYSACEAE	18
1.2.1	Particularidades do gênero <i>Vochysia</i>	19
1.3	MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DA ORIGEM BOTÂNICA DE MÉIS	20
1.3.1	Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)	22
1.3.2	Espectrometria de massas com ionização à pressão atmosférica (API)	22
1.4	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO MEL	23
1.4.1	Compostos fenólicos	24
1.4.2	Carotenoides	26
1.4.3	Flavonoides	26
1.4.4	Determinação da cor do mel	28
1.4.5	Atividade antioxidante	29
2	<b>OBJETIVO</b>	32
2.1	OBJETIVO GERAL	32
2.1.2	Objetivos específicos	32
3	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	33
3.1	MATERIAIS	33
3.2	COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MEL	33
3.2.1	Procedimentos para análise polínica de mel	33
3.3	COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO	34
3.4	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DO MEL	35
3.4.1	Extração em fase sólida (SPE) com Amberlite XAD-2	35
3.4.2	Extração em fase sólida com cartucho C18	35
3.4.3	Preparo do extrato líquido-líquido	36
3.5	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DAS FLORES	36
3.6	FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS	37
3.6.1	Fracionamento dos extratos de mel e das flores	37
3.7	ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO À PRESSÃO ATMOSFÉRICA (API)	37
3.7.1	Preparo das amostras	37
3.7.2	Espectrometria de massas com ionização por electrospray (ESI-MS)	38
3.7.3	Espectrometria de massas com ionização química à pressão atmosférica (APCI-MS)	38
3.8	CROMATOGRAFIA A GÁS ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM)	38
3.8.1	Derivatização com BSTFA	39
3.8.2	Derivatização com DMDS/I <sub>2</sub>	39
3.9	ANÁLISES ESPECTROFOTOMÉTRICAS DO MEL	39
3.9.1	Determinação do teor de compostos fenólicos	40
3.9.1.1	Curva de calibração do ácido gálico	40

3.9.1.2	Doseamento da amostra -----	41
<b>3.9.2</b>	<b>Determinação do teor de flavonoides -----</b>	<b>41</b>
<b>3.9.2.1</b>	<b>Flavonas e flavonóis -----</b>	<b>42</b>
3.9.2.1.1	Curva de calibração da quercetina -----	42
3.9.2.1.2	Doseamento da amostra -----	42
<b>3.9.2.2</b>	<b>Flavonas e diidroflavonois -----</b>	<b>43</b>
3.9.2.2.1	<i>Preparo da solução estoque de 2,4-dinitrofenilidrazina (DNP) -----</i>	<i>43</i>
3.9.2.2.2	<i>Preparo da solução estoque de pinocembrina (1 mg/mL) -----</i>	<i>43</i>
3.9.2.2.3	<i>Preparo da solução estoque de KOH a 10% -----</i>	<i>44</i>
3.9.2.2.4	Curva de calibração de pinocembrina -----	44
3.9.2.2.5	Branco da curva de calibração -----	45
3.9.2.2.6	Doseamento da amostra -----	45
3.9.2.2.7	Branco da amostra -----	45
<b>3.9.2.3</b>	<b>Antocianinas -----</b>	<b>45</b>
<b>3.9.3</b>	<b>Determinação do teor de Carotenoides -----</b>	<b>46</b>
<b>3.9.4</b>	<b>Análise da cor -----</b>	<b>47</b>
<b>3.9.5</b>	<b>Atividade antioxidante -----</b>	<b>47</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO -----</b>	<b>50</b>
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA ORIGEM BOTÂNICA DO MEL -----	50
4.2	PREPARO DOS EXTRATOS -----	51
4.3	ANÁLISES POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS -----	52
4.4	ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA A GÁS ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM) -----	61
<b>4.4.1</b>	<b>Comparação entre os extratos hexânicos das flores e do mel ---</b>	<b>61</b>
<b>4.4.2</b>	<b>Determinação da posição das duplas em alceno por derivatização com dimetildissulfeto (DMDS) -----</b>	<b>65</b>
<b>4.4.3</b>	<b>Extrato etanólico das flores -----</b>	<b>70</b>
<b>4.4.4</b>	<b>Hidrocarbonetos relacionados às abelhas e aos produtos apícolas -----</b>	<b>72</b>
4.5	ANÁLISES ESPECTROFOTOMÉTRICAS DO MEL -----	73
<b>4.5.1</b>	<b>Determinação do teor de compostos fenólicos -----</b>	<b>73</b>
4.5.1.1	Curva de calibração do ácido gálico -----	74
<b>4.5.2</b>	<b>Determinação do teor de flavonoides -----</b>	<b>78</b>
4.5.2.1	Curva de calibração de quercetina -----	79
<b>4.5.3</b>	<b>Flavononas e diidroflavonois -----</b>	<b>83</b>
4.5.3.1	Curva de calibração de pinocembrina -----	83
<b>4.5.4</b>	<b>Teor de antocianinas -----</b>	<b>88</b>
<b>4.5.5</b>	<b>Teor de carotenoides -----</b>	<b>89</b>
<b>4.5.6</b>	<b>Análise da cor -----</b>	<b>90</b>
<b>4.5.7</b>	<b>Atividade Antioxidante -----</b>	<b>91</b>
<b>4.5.8</b>	<b>Interação entre os compostos analisados espectrofotometricamente -----</b>	<b>93</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES -----</b>	<b>95</b>
	<b>REFERÊNCIAS -----</b>	<b>97</b>
	<b>APÊNDICES -----</b>	<b>108</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O mel é um dos principais produtos elaborados pelas abelhas, formado majoritariamente por açúcares naturais e por uma variedade de compostos secundários, em menor concentração, que atribuem cores, odores e sabores diversos. Além do mel as abelhas produzem própolis, geleia real, pólen, cera e apitoxina, contudo, o mel é o produto de maior interesse para a indústria alimentícia e farmacêutica, por ser uma fonte de alimento com elevado teor nutritivo e propriedades medicinais (ALVAREZ-SUARES et al., 2010a, VIUDA-MARTOS et al., 2008).

Em Roraima a atividade apícola manejada apresenta-se em contínuo crescimento, porém essa expansão não está sendo acompanhada de estudos na mesma proporção, visto que existem poucas informações voltadas aos méis produzidos no estado. Nos municípios de Cantá e Mucajaí os apicultores têm relatado a ocorrência de mel amargo. Por meio de observações, os apicultores do município do Cantá, relacionam este tipo de mel à planta conhecida vernaculamente como “casca-grossa”, devido à produção de mel, de sabor amargo, no período de floração dessas árvores.

Estudos palinológicos relacionados à identificação botânica dos méis amargos dos municípios de Mucajaí e Cantá sugerem que são provenientes das plantas do gênero *Protium* (MARQUES-SOUZA; KERR, 2003) e da espécie *Vochysia guianensis* Aubl (SILVA, 2005), respectivamente. Entretanto, não existem estudos que caracterizem os compostos secundários e identifiquem possíveis marcadores químicos da origem botânica destes méis.

Essa interação entre as abelhas e as plantas percebida pelos apicultores da região por meio da produção do mel amargo, está amparada pela ecologia química, ramo da ciência química que estuda a interação entre os organismos e o meio ambiente, e a variedade de aromas, cores e secreções que atuam como mediadoras das diferentes interações, como uma forma de decodificação da linguagem química da vida (FLACH, 2005, PIANARO et al., 2007, VIDAL, 2012).

Mediante o exposto, este trabalho amparou-se na necessidade de obtenção de dados consistentes acerca dos constituintes do mel amargo, da atividade antioxidante, bem como da presença de constituintes que pudessem ser utilizados como marcadores da origem botânica do mel amargo. Nesse contexto, esta pesquisa abordou uma investigação acerca da composição do mel amargo do município do Cantá e de compostos que pudessem atuar como marcadores de origem botânica desse mel, por meio da comparação entre os constituintes do mel e das flores da *Vochysia sp.* Assim, devido à escassez de conhecimentos em relação à

composição e origem desse produto, esta pesquisa visou auxiliar o banco de informações científicas acerca deste tipo de mel, bem como proporcionar uma base para novas pesquisas sobre os méis amargos provenientes do estado de Roraima.

As análises foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia e Química Fina, situado no Departamento de Química, no Laboratório de Cromatografia do Núcleo de Pesquisas Energéticas (NUPENERG) da Universidade Federal de Roraima e no Laboratório de Espectrometria Massas da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

Assim sendo, como embasamento teórico, este referencial apresenta um breve relato acerca da apicultura e da produção de mel no Brasil, com ênfase para a ocorrência de mel amargo, objeto de estudo deste trabalho. Em seguida, discorre acerca das características gerais da família Vochysaceae e particularidades do gênero *Vochysia*, gênero ao qual está associado o mel amargo do município do Cantá. Além disso, dispõe sobre os métodos de determinação da origem floral do mel e, por fim, a caracterização das classes de compostos estudadas e a atividade antioxidante do mel.

## 1.1 A APICULTURA NO BRASIL

A introdução das abelhas *Apis* no Brasil foi realizada oficialmente por intermédio do Decreto nº 72, de 12 de julho de 1839, promulgado pelo então Imperador Dom Pedro II (Confederação Brasileira de Apicultura, 2011).

Estudos relatam a introdução da abelha europeia *Apis mellifera* no Sul do Brasil pelos Padres Jesuítas, com o objetivo de obtenção de cera para a produção de velas, utilizadas em cultos religiosos; outros afirmam que o Reverendo Antônio Carneiro as trouxe da Europa para o Rio de Janeiro em 1839. Posteriormente, ocorreram várias introduções devido ao incentivo à imigração (NOGUEIRA-NETO, 1972).

Em 1956 o geneticista Estevam Kerr levou para o Rio de Janeiro a abelha africana *A. mellifera scutellata*. O cruzamento dessas abelhas com as europeias gerou um híbrido mais resistente e com maior capacidade de produção. Assim, com o manejo dessa nova espécie, iniciou-se a atividade apicultora (SOUZA, 2011). Popularmente *A. mellifera* é conhecida como abelha africanizada e é amplamente difundida no país, estando presente em todos os estados brasileiros. Em Roraima a existência das abelhas africanizadas data da década de 1970. Em 1976, estudos relataram a presença destes insetos na cidade de Santa Helena de Uairém, fronteira Brasil-Venezuela (SILVA, 2005).

A apicultura é uma atividade manejada, rentável e muito antiga, ocorrendo também na forma extrativista. Além do mel, a apicultura oferece a própolis, a geleia real, o pólen, a apitoxina (veneno) e a cera (SEBRAE, 2011).

Estudos revelam que produtos apícolas como o mel e o pólen apresentam características de alimentos com propriedades bioativas, contribuindo para a prevenção ou mesmo cura de doenças. E a que a geleia real, a apitoxina e a própolis são consideradas como fonte para produção de medicamentos e cosméticos enquanto a cera é utilizada na composição de cosméticos e velas artesanais, com mercado garantido na indústria de medicamentos, têxtil, e na fabricação de polidores, vernizes e na embalagem de alimentos (SILVA, 2006). Contudo, a importância das abelhas se dá não somente pelos produtos apícolas, mas pelo importante papel na polinização das plantas superiores, contribuindo diretamente para a preservação e manutenção da variabilidade genética das espécies vegetais (SILVA, 2005).

### 1.1.1 Mel

De acordo com a Legislação Brasileira (Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000) entende-se por mel:

O produto alimentício produzido pelas abelhas a partir do néctar das flores ou das secreções procedentes de partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas que ficam sobre partes vivas de plantas, que as abelhas recolhem, transformam, combinam com substâncias específicas próprias, armazenam e deixam maturar nos favos da colmeia (BRASIL, 2000, p.16).

A utilização do mel pelos humanos remonta à pré-história. Os antigos egípcios utilizavam na alimentação e em vários tratamentos terapêuticos e nos cultos religiosos de algumas culturas era oferecido aos deuses em forma de bebida. O mel também foi muito utilizado como adoçante natural, no combate a diversas doenças respiratórias, gastrointestinais e no uso tópico em ferimentos e queimaduras (PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2003).

O mel apresenta-se como uma solução viscosa, supersaturada de açúcares, o que lhe confere sabor agradável e doce. Silva (2006) reporta-se ao mel como um adoçante natural, energético, saudável, cicatrizante, antibacteriano e com notável aroma. A presença de certas substâncias como os compostos fenólicos, vitaminas, aminoácidos, sais minerais, ácidos orgânicos e algumas enzimas, mesmo que minoritárias, confere ao mel propriedades

terapêuticas como atividade antioxidante e cicatrização de ferimentos (BALTRUSAITYTĖ; VENSKUTONIS; CEKSTERYTE, 2007; GÓMES-CARAVACA et al., 2006).

A maior parte dos méis apícolas produzidos provém do néctar das plantas, uma solução aquosa de açúcares em concentrações variadas, sendo a composição glicídica do mel formada basicamente por D-glicose, D-frutose e sacarose (MOREIRA; MARIA, 2001).

Os néctares coletados pelas abelhas e depositados nas colmeias passam por processos químicos e biológicos realizados no organismo das abelhas pela ação de enzimas como a invertase, diástase, glicose oxidase, catalase e fosfatase, adicionadas ao néctar no processo de transferência das plantas para a colmeia, devido à liberação de secreções de glândulas relacionadas ao aparelho digestivo das abelhas para maturação. E o processo físico que ocorre por meio da desidratação e concentração dos componentes sólidos do mel (LEGLER, 2011). A composição do mel apícola varia de acordo com a espécie da planta de onde as abelhas coletam o néctar, possibilitando a existência de grande variedade de méis (ALVAREZ-SUAREZ et al., 2010; FEARNLEY et al., 2012).

A produção de mel apícola obtida de floradas silvestres está cada vez mais escassa, tanto no Brasil como no mundo, devido à diminuição da cobertura vegetal original. Assim, a apicultura vem sendo adaptada às culturas florestais e agrícolas. Contudo, muitos apicultores exploram apenas a vegetação existente não modificando a vegetação local, e ao implantar um apiário, valorizam o mel silvestre, contribuindo para a preservação de espécies de abelhas e de plantas nativas, diminuindo a degradação antrópica do ambiente (RIBEIRO; SANTOS, 2009).

### 1.1.2 Mel amargo

O mel apícola geralmente possui sabor doce e agradável ao paladar humano. No entanto, o mel amargo, eventualmente produzido pelas abelhas *Apis*, apresenta-se como um produto diferenciado dos demais tipos de mel devido ao sabor pouco apreciado, sendo na maioria das vezes um empecilho à comercialização.

Nos Estados Unidos alcaloides pirrolizidínicos característicos de *Senecio jacobea* L foram identificados em amostras de méis amargos (DEINZER et al, 1977) e, devido a sua alta toxidez, a presença dos mesmos tem sido monitorada desde então (WIEDENFELD, 2011).

No Brasil são citados méis amargos provenientes de *Hortia brasiliana* Vand. (Rutaceae), planta do Cerrado do Brasil Central, de *Mimosa scabrella* Benth (Mimosaceae) e *Senecio jacobea* L. (Asteraceae), ambas do Sul do Brasil (BARTH, 1989). O mel monofloral

da bracinga (*Mimosa scabrella Benth*), de ocorrência na região sul do Brasil, rico em glicose, caracteriza-se pela cor escura, granulação fina e sabor amargo (EMBRAPA, 1988). Contudo, não existem dados da constituição química e da origem do sabor amargo nos méis cuja origem botânica é atribuída a estas plantas.

Marques-Souza e Kerr (2003) analisaram palinologicamente uma amostra de mel amargo do município do Mucajaí/RR e identificaram o pólen do gênero *Protium sp.* (Burseraceae) pertencente à planta, de sabor amargo, conhecida vernaculamente como “breu”. Em 2005, Silva apresentou um estudo acerca da análise polínica em amostras de mel amargo da Colônia da Confiança, Município de Cantá, Roraima e verificou que o mel amargo estudado originou-se da espécie *V. guianensis* Aubl (Vochysaceae). Entretanto, não há na literatura estudos que comparem a composição química dos méis amargos com a composição química das plantas que possivelmente originaram estes méis em Roraima.

## 1.2 GENERALIDADES DA FAMÍLIA VOCHYSACEAE

Grande parte da família Vochysaceae está localizada em regiões da América Central e América do Sul (figura 1), sendo que apenas os gêneros *Erismadelphus* e *Korupodendron* apresentam ocorrência na África Tropical Ocidental (LITT; CHECK, 2002).

No Brasil, a família Vochysiaceae ocorre em vários ecossistemas, apresentando diversidade de espécies nas regiões Guiano-Amazônica, Planalto Central e na Floresta Atlântica (BAUDOIN; TILLEQUIN; KOCH, 1983; VIANNA, 2006).

Figura 1 – Distribuição da família Vochysaceae.



Fonte: Heywood et al. (2007).

Estudos das características anatômicas e fisiológicas demonstraram que a família Vochysaceae apresenta flores zigomorfas e número de pétalas e estames reduzidos. E por meio de análises de DNA verificou-se que, a família Vochysaceae, incluída na subclasse Rosidae, pertence à ordem das Myrtales e incorpora duas tribos (BAUDOUIN; TILLEQUIN; KOCH, 1983; LITT; CARMO-OLIVEIRA; MORRETES, 2009; CARNEVALE NETO et al., 2011; STEVENSON, 2003). A tribo Erismeeae que é formada pelos gêneros *Erismadelphus* (3 espécies) e *Erisma* (20 espécies), e a tribo Vochysieae que é composta pelos gêneros *Callisthene* (10 espécies), *Qualea* (45 espécies), *Salvertia* (1 espécie), *Ruizteranea* (16 espécies), *Korupodendron* (1 espécie) e *Vochysia* com 105 espécies (LITT; STEVENSON, 2003).

Atualmente na família Vochysaceae identificaram-se cerca de 90 metabólitos secundários, sendo a maioria dos compostos isolados ou sintetizados, pertencentes aos gêneros *Qualea* e *Vochysia*. Dentre os compostos isolados ou sintetizados estão incluídos triterpenos da classe dos lupanos (6), dos ursanos (13) e oleananos (18), derivados de ácido elárgico (10), flavonoides (36) e uma chalcona, além de outras classes (CARNEVALE NETO et al., 2011).

Estudos etnofarmacológicos atribuem à família Vochysaceae diversas características, como antidiarreica, anti-inflamatória e antioxidante, além do combate a cólicas intestinais, azia, amebíase e infecções gripais (CARNEVALE NETO et al., 2011).

### **1.2.1 Particularidades do gênero *Vochysia***

*Vochysia* é um gênero neotropical que ocupa preferencialmente as regiões de floresta tropical, subtropical e savanas, sendo ausente nas regiões de clima árido ou semi-árido. No território brasileiro esse gênero possui aproximadamente 80 espécies distribuídas pela Floresta Amazônica e ao longo da Floresta Atlântica (VIANNA, 2006).

O gênero possui uma morfologia floral semelhante e as espécies apresentam, aparentemente, os mesmos tipos polinizadores, sendo as mariposas e abelhas os visitantes mais comuns, seguidos dos beija-flores e borboletas (SANTOS; AFONÇO; OLIVEIRA, 1997).

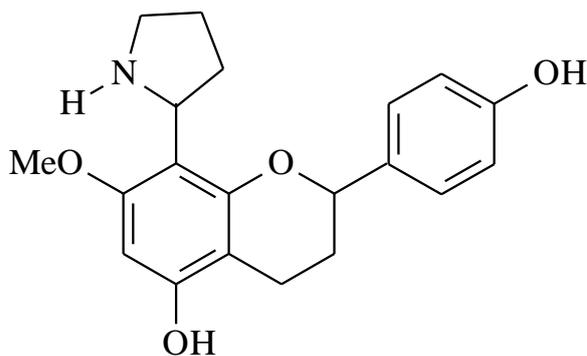
Vários pesquisadores dedicam-se ao estudo ao gênero *Vochysia*. No estado do Paraná verificou-se a ocorrência de três espécies de *Vochysia*: *V. bifalcata* Warm., *V. magnifica* Warm. e *V. tucanorum* Mart. A espécie *V. tucanorum* Mart., é a que apresenta a maior

distribuição no estado, provavelmente por estar presente em áreas de preservação. Indícios sugerem que o desmatamento ocorrido no século XX afetou a distribuição da família Vochysiaceae no estado do Paraná. Assim, a espécie *V. tucanorum* Mart. apresenta ocorrência em formações secundárias e a *V. bifalcata* Warm. é a única espécie registrada em locais originais (NEGRELLE; MOROKAWA; RIBAS, 2007).

A *V. cinnamomea* é um arbusto de 6 m de altura que ocorre em cerrados abertos na região de Uberlândia. Seu período de floração estende-se de março a abril, apresentando inflorescência alongada, podendo atingir até 40 cm de comprimento (SANTOS; AFONÇO; OLIVEIRA, 1997).

A *Vochysia guianensis* Aubl ocorre nas florestas, no cerrado e nas proximidades de montanhas, apresentando floração intensa em alguns anos, no período de setembro à dezembro (SILVA, 2005). Baudouin, Tillequin e Koch (1983) realizaram estudo fitoquímico com os frutos de *V. guianensis* e isolaram a voquisina, um flavonoide ligado a um anel pirrolizidínico (figura 2). No município do Cantá-RR a ocorrência de mel amargo pode estar relacionada a presença desta planta nas proximidades dos apiários.

Figura 2 - Flavonoide ligado a um anel pirrolizidínico.



Voquisina

### 1.3 MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DA ORIGEM BOTÂNICA DE MÉIS

Os principais métodos utilizados na determinação da origem botânica dos méis são: melissopalínologia (BARTH, 1989, 2004) e comparação química dos constituintes do mel com o néctar ou outras partes das plantas, pois apesar do mel ser um produto de origem

animal, elaborado pelas abelhas, por meio da coleta de néctar ou exsudatos de plantas ou ainda da secreção de animais sugadores, grãos de pólen também são encontrados no mel (MOREIRA; MARIA, 2001).

A presença de pólen no mel pode ser explicada devido ao fato de grãos de pólen maduros, caírem no néctar da própria flor ou devido à abelha os derrubar ao pousar sobre a flor durante a coleta do néctar: as abelhas encostam-se às anteras e se impregnam de grãos de pólen, contaminando o néctar coletado ao depositá-lo nas colmeias. Por este motivo, os grãos de pólen encontrados no mel são utilizados para identificar e quantificar a origem floral do mel, em um estudo denominado melissopalínologia. A comparação do pólen das flores com o encontrado nos méis é realizada por meio da coleta de pólen na flora que circunda as colmeias ou em palinotecas. Esta técnica tem sido extensivamente utilizada para determinar a origem botânica de méis. No Brasil, destacam-se os trabalhos da pesquisadora Ortrud Monika Barth, da Fiocruz, que desde a década de 1970 publica artigos na área palinológica (BARTH, 1989, 2004).

Em Roraima foram identificados pólenes de uma série de plantas que constavam em méis dos municípios do Cantá-RR (SILVA, 2005). Também foram identificados pólenes em méis provenientes de Mucajaí (MARQUEZ-SOUZA; KERR, 2003).

A comparação dos compostos dos méis com os compostos do néctar constituem os marcadores químicos do mel. Moreira e Maria (2001) relatam a determinação da origem floral através da comparação de glicídios do mel e do néctar das plantas. A análise dos compostos secundários apresenta considerável crescimento, devido à evolução das técnicas microquímicas de extração e análise (CUEVAS-GLORY, et al., 2007). Nas técnicas microquímicas são empregadas extração em fase sólida ou microextrações para a separação dos constituintes do mel e do néctar.

Alguns artigos discutem marcadores químicos de méis obtidos de colmeias introduzidas em grandes extensões de monoculturas e caracterizados como monoflorais. Alissandrakis (2007) caracterizou 33 amostras de mel cítrico extraído por microextração em fase sólida (SPME) e analisado por CG-EM. A partir da análise dos constituintes, o autor definiu constituintes que foram considerados como marcadores da origem do mel. Truchado, Ferreres e Tomas-Barberan (2009) analisaram tanto os méis quanto néctares por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodo, acoplado à espectrometria de massas (CLAE/DAD/EM) para caracterizar constituintes. No entanto, na análise dos méis de eucalipto os constituintes não estavam presentes no néctar, mas em méis de laranja o flavonoide esperidina foi encontrado tanto no mel, quanto no néctar. Fearnley et

al. (2012) identificaram o ácido trimetoxibenzóico esterificado com maltose como marcador do mel de *Leptosperm scoparium* através de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com ionização por electrospray (CLAE/ESI/EM) e ressonância magnética nuclear (RMN).

A extração de constituintes das flores e sua comparação com os constituintes do mel (ALISSANDRAKIS et al. 2003) e ainda, a caracterização dos isótopos de carbono treze (JATI, 2007) também têm sido utilizadas para caracterizar a origem de méis

Recentemente, tem sido utilizada mais de uma técnica para caracterização da origem botânica. Em 2010 Féas et al. utilizaram-se da melissopalínologia e aliada à análise físico-química e em 2012 Yang et al. utilizaram-se da análise por melissopalínologia associada às análises de voláteis do néctar e do mel. Nesse contexto, esta pesquisa fundamentou-se nas análises por espectrometria de massas por ionização (API) e cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), para determinação da origem botânica do mel amargo do município do Cantá-RR.

### **1.3.1 Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)**

Um espectrômetro de massas pode ser compreendido como um instrumento que contém cinco componentes: o primeiro é formado pela unidade de entrada da amostra, responsável por receber a amostra em ambiente atmosférico e enviá-la a pressões mais baixas na região da fonte de íons (segundo componente) e o terceiro compõe-se do analisador de massas, que separa os íons da amostra com base na razão massa/carga ( $m/z$ ); em seguida os íons são contados pelo detector de massas e por fim, os dados são registrados no sistema de dados (PAVIA et al., 2012).

Na introdução da amostra, o espectrômetro acoplado a cromatógrafo a gás tem sido bastante versátil, pois possibilita a separação dos componentes de uma amostra complexa e a determinação individual do espectro de cada componente (PAVIA et al., 2012) e tem sido amplamente utilizado para a análise de voláteis ou volatilizáveis.

### **1.3.2 Espectrometria de massas com ionização à pressão atmosférica (API)**

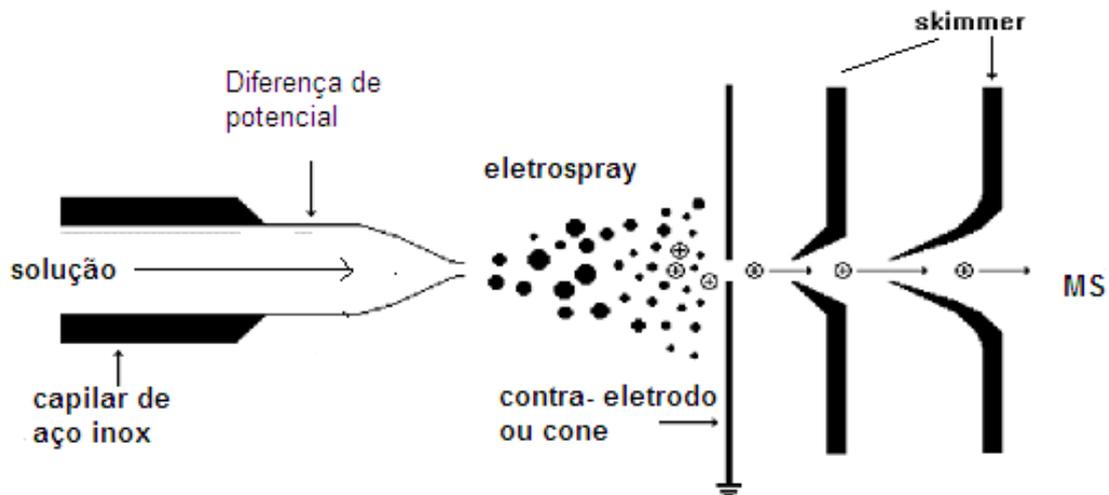
A espectrometria de massas constitui hoje uma das técnicas instrumentais mais abrangentes, com aplicações em diversas áreas da química, biologia, ciências médicas e

tecnológicas. Apesar de existirem várias estratégias para separação e detecção, a etapa de ionização é que apresenta o maior número de diferentes estratégias, devido à grande variedade de tipos de amostras. Uma vez gerados os íons, os processos de separação e detecção podem ser escolhidos de acordo com características mais ou menos comuns, como sensibilidade, resolução e precisão de  $m/z$  e custo (MORAES; LAGO, 2003).

Tanto a ionização por electrospray (ESI) como a ionização química (APCI) são técnicas brandas de ionização e ocorrem à pressão atmosférica (NIESSEN, 2003).

A ionização por “electrospray” (ESI) é uma técnica utilizada para estudar biomoléculas com alto peso molecular, compostos lábeis e não voláteis (figura 3). Nesta técnica as espécies do analito são ionizadas em solução e transferidas para a fase gasosa como entidades isoladas, geralmente na forma de moléculas protonadas ou cátions (modo positivo), ou ainda como moléculas desprotonadas (modo negativo) ou ânions (PAVIA et al., 2012).

Figura 3 - Desenho simplificado de uma fonte de ionização por electrospray.



Fonte: Sawaya (2006)

#### 1.4 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO MEL

O mel apresenta diversas classes de metabólitos secundários, dentre as quais pode-se citar: compostos fenólicos, flavonoides, carotenoides, compostos nitrogenados, ácidos graxos e terpenos, entre outros (GHELDOLF; ENGESETH, 2002).

### 1.4.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são produzidos no metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para seu crescimento, reprodução e pigmentação. Nos alimentos contribuem para a coloração, adstringência, aroma e estabilidade oxidativa. Sua estrutura básica consiste em uma hidroxila ligada ao benzeno, mas a estrutura química variável permite a existência de cerca de cinco mil compostos que estão presentes na forma livre ou ligados a glicosídeos (NACZK; SHAHIDI, 1995, 2004).

Pode-se definir um composto fenólico como “uma classe de compostos que inclui uma grande diversidade de estruturas, simples e complexas, que possuem pelo menos um anel aromático no qual pelo menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila” (SIMÕES et al., 2007, p. 519) e são classificados segundo a tabela 1, abaixo:

Tabela 1 – Classificação dos compostos fenólicos de acordo com o esqueleto básico.

<b>Esqueleto básico</b>	<b>Classe de compostos fenólicos</b>
C6	Fenóis simples, benzoquinonas
C6-C1	Ácidos fenólicos
C6-C2	Acetofenonas e ácidos fenilacéticos
C6-C3	Fenilpropanoides: ácidos cinâmicos e compostos análogos, fenilpropenos, cumarinas, isocumarinas e cromonas
C6-C4	Naftoquinonas
C6-C1-C6	Xantonas
C6-C2-C6	Estilbenos, antraquinonas
C6-C3-C6	Flavonoides e isoflavonoides
(C6-C3) <sub>2</sub>	Lignanas
(C6-C3-C6) <sub>2</sub>	Diflavonoides
(C6) <sub>n</sub>	Melaninas vegetais
(C6-C3) <sub>n</sub>	Ligninas
(C6-C1) <sub>n</sub>	Taninos hidrolisáveis
(C6-C3-C6) <sub>n</sub>	Taninos condensados

Fonte: Simões et al. (2007).

Khalil et al. (2011) afirmam que os compostos fenólicos estão diretamente relacionados às propriedades organolépticas do mel (cor, sabor e aroma) e aos efeitos benéficos à saúde humana, comportando-se como marcadores da origem botânica dos méis, pois sua composição varia de acordo com a fonte do néctar.

Dentre os compostos bioativos, os fenólicos apresentam-se como um grupo de grande

interesse, representando os principais compostos secundários, amplamente difundidos nas plantas e microrganismos.

A caracterização dos compostos fenólicos é realizada por meio de análises dos compostos fenólicos totais, pela quantificação individual ou de apenas um grupo de compostos. Devido à variação da solubilidade dos compostos fenólicos, para realização de extração utilizam-se diversos solventes, dentre eles o metanol, etanol, acetona, água, acetato de etila, propanol e diversas combinações (ÂNGELO; JORGE, 2007).

Para a quantificação dos compostos fenólicos existem várias técnicas espectrofotométricas, sendo o método de Folin-Denis muito utilizado para a determinação de fenólicos totais em vegetais (ÂNGELO; JORGE, 2007) e em méis (LIANDA, 2009).

O método Folin-Ciocalteu foi desenvolvido por Otto Folin e Vintila Ciocalteu em 1927 para a realização da análise de tirosina e, por ser mais sensível aos fenóis e diminuir a tendência à precipitação, tem substituído o método de Folin-Denis. O reagente de fenol é preparado a partir da adição de tungstato de sódio e molibdato de sódio a certo volume de água, seguido da adição de ácido clorídrico, ácido fosfórico, sulfato de lítio e pequena quantidade de bromo líquido, em procedimento meticuloso (FOLIN; CIOCALTEU, 1927).

Independente do tipo de reagente utilizado a espectrofotometria não é específica, pois identifica todos os grupos fenólicos presentes no extrato e a quantidade de hidroxilas e os grupos potencialmente oxidáveis apresentam-se por meio da intensidade da coloração azul (ÂNGELO; JORGE, 2007).

A cromatografia à gás (CG) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) são técnicas utilizadas tanto na separação, quanto na quantificação de compostos fenólicos (ÂNGELO; JORGE, 2007; MEDA et al., 2005).

Lianda (2009) ao trabalhar com análise de méis elegeu a CLAE com fase reversa (octadecil-C18), devido à rapidez e reprodutibilidade da identificação de substâncias fenólicas, quando acoplada ao detector de arranjo de fotodiodos e identificou ácidos fenólicos e flavonoides, com base na comparação dos tempos de retenção de padrões, juntamente com as análises dos respectivos espectros de absorção no UV.

Os ácidos fenólicos caracterizam-se por apresentarem um anel benzênico ligado a um grupo carboxílico e a um ou mais grupos hidroxilas ou metoxila, atribuindo-lhes propriedade antioxidante. Apresentam-se distribuídos em dois grupos, os derivados dos ácidos benzoicos e os derivados dos ácidos cinâmicos (ÂNGELO; JORGE, 2007; KHALIL et al., 2011, SOARES, 2002).

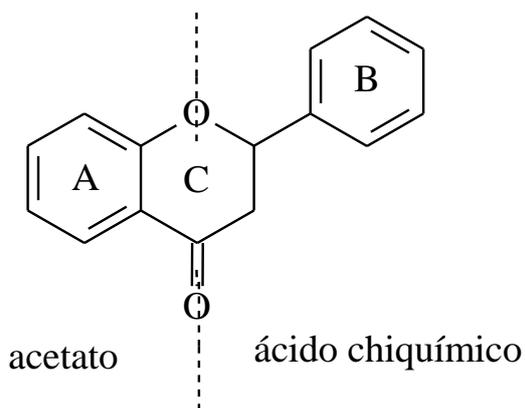
### 1.4.2 Carotenoides

Os carotenoides caracterizam-se por apresentarem substâncias com características funcionais e atividade antioxidante. Pertencem ao grupo de pigmentos responsáveis pela coloração amarela e vermelha das frutas, sendo utilizados comercialmente como corantes alimentícios (TAN et al., 1989; UENOJO; JUNIOR; PASTORE, 2007).

### 1.4.3 Flavonoides

A estrutura química básica dos flavonoides (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) apresentada na figura 4 é resultante de duas rotas biossintéticas: a rota do ácido chiquímico, que origina a fenilalanina e a rota acetato via ácido malônico. O anel **A** do esqueleto básico dos flavonoides é formado pela rota do acetato e a via do ácido chiquímico, precursor do ácido cinâmico, é responsável pela formação do anel aromático **B** e a ponte de três carbonos. (LIANDA, 2009; ZUANAZZI; MONTANHA, 2007).

Figura 4 - Estrutura química básica dos flavonoides em relação à origem Biosintética.

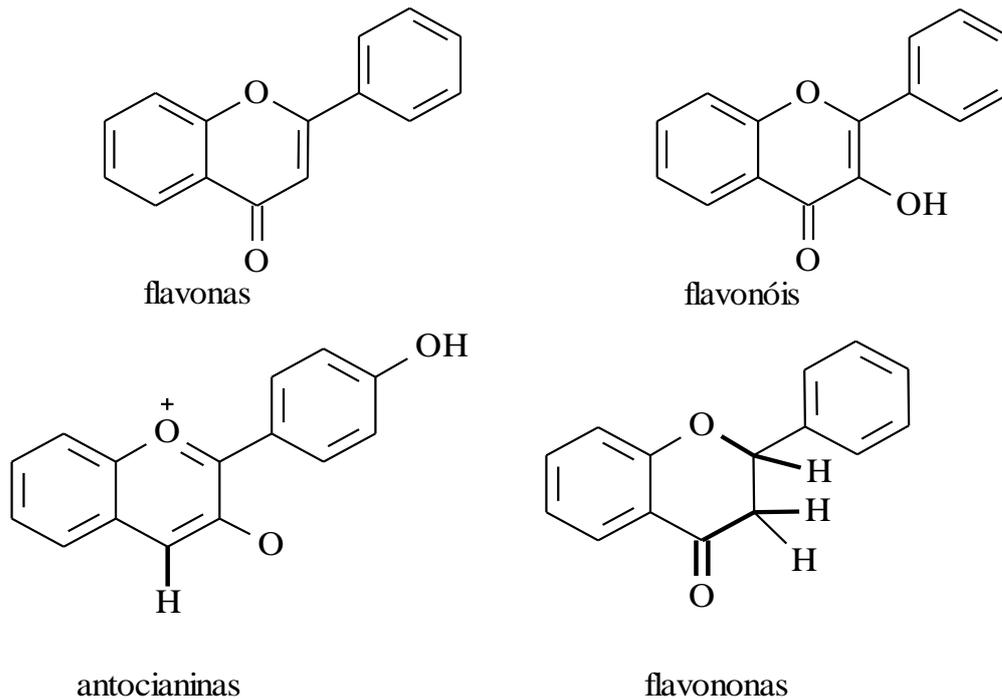


Fonte: Zuanazzi; Montanha (2007).

De acordo com a substituição no heterocíclo (C) ocorre à formação de importantes classes de flavonoides, como por exemplo, podem-se citar os flavonóis, as flavonas, flavononas e antocianinas (figura 5), podendo também estar na forma acíclica como nas

chalconas. As substituições nos anéis **A** e **B** originam diferentes compostos dentro de cada classe de flavonoides. Nos méis, os flavonoides incluem flavonas, flavononas e flavonóis (HOLLMAN; KATAN, 1999; LIANDA, 2009).

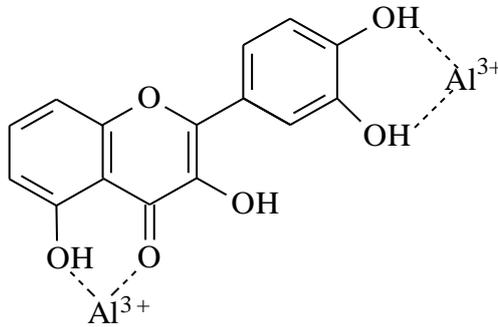
Figura 5 – Algumas classes dos flavonoides.



Fonte: Cook, Sammam (1996).

O alumínio forma complexos estáveis à complexação do cátion alumínio em duas bandas de absorção (figura 6): A banda II ocorre entre 240-285 nm devido à absorção do anel “A” (sistema benzoíla), e a banda I ocorre entre 300-450 nm referente à complexação no anel “B” (sistema cinamoíla). A estabilidade do complexo obtido possibilita a determinação de agrupamentos de flavonas e flavonóis (GÓMES-CARAVACA et al., 2006; LIANDA, 2009; TYLKOWSKI, 2010). Para a quantificação dos flavonoides por meio da espectroscopia de UV-visível utilizam-se várias técnicas descritas na literatura, de acordo com o agrupamento ou compostos específicos a se quantificar. Por exemplo, com auxílio do reagente cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) pode-se quantificar, com maior eficiência, as flavonas e os flavonóis.

Figura 6 – Complexo flavonoide- $\text{Al}^{3+}$ , em solução metanólica de cloreto de alumínio.



Fonte: Lianda (2009).

#### 1.4.4 Determinação da cor do mel

A cor do mel está correlacionada com a sua origem floral, processamento e armazenamento, fatores climáticos durante o fluxo do néctar e a temperatura na qual o mel amadurece na colmeia. Portanto, a diversidade florística de uma região pode ser identificada por meio da variabilidade de coloração dos seus méis (LACERDA et al., 2010).

A cor e aparência física são os principais critérios utilizados pelos consumidores na escolha de um mel. Essa preferência contribui com o aumento do preço dos méis com coloração mais clara no mercado mundial. Contudo, muitos autores apresentam análises em que méis com coloração mais escura e sabor acentuado são os produtos de reações entre substâncias fenólicas, ferro, minerais e da instabilidade da frutose. Dessa maneira, méis com coloração escurecida possuem o indicativo de maior concentração de minerais, vitaminas B e C e apresentam pH mais elevado além da presença de cálcio e ferro. Já os méis com tonalidade mais clara estão diretamente relacionados ao sódio, elemento constituinte das cinzas dos méis (LACERDA et al., 2010).

No mercado internacional a preferência é por méis com classificação entre extra-branco e âmbar extra-claro (MOURA, 2010). A cor dos méis pode ser determinada por análises espectrofotométricas, que consistem na leitura da absorbância que é relacionada com a cor, expressa em milímetros (mm), de acordo com a escala de *Pfund* (VARGAS, 2006) descrita na tabela 2.

Tabela 2 - Classificação da coloração do mel segundo a escala de *Pfund*.

<b>Cor do mel</b>	<b>Escala de <i>Pfund</i> (mm)*</b>	<b>Abs <sub>635 nm</sub></b>
Branco-água	0 – 8	0,114 – 0,125
Extra-branco	8 – 16,5	0,125 – 0,148
Branco	16,5 – 34	0,148 – 0,195
Âmbar extra-claro	34 – 50	0,195 – 0,238
Âmbar claro	50 – 85	0,238 – 0,333
Âmbar	85 – 114	0,333 – 0,411
Âmbar escuro	114 ou mais	0,411 ou mais

Fonte: Vargas (2006)

Pontis (2011) utilizando-se da escala de *Pfund* classificou os méis de diferentes regiões do estado de Roraima com valores entre 31,12 e 166,68 mm*Pfund*, referentes às cores variando entre branco e âmbar escuro.

#### 1.4.5 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos méis apícolas relacionada aos compostos fenólicos, flavonoides e carotenoides tem sido bastante estudada, devido ao fato de atuarem em doenças degenerativas, cardiovasculares e câncer (BALTRUSAITYTĖ; VENSKUTONIS; CEKSTERYTE, 2007; LIANDA, 2009; SOCHA et al., 2011).

Os flavonoides quercetina, apigenina e luteolina se apresentaram como antioxidantes propícios no combate à proliferação de células carcinógenas. Contudo, a utilização de antioxidantes polifenólicos derivados de alimentos induz a reações que requer um estudo minucioso, uma vez que seu mecanismo ainda não é claro (LIANDA, 2009).

Segundo Cook e Samman (1996) a atividade antioxidante dos flavonoides está diretamente relacionada aos seus arranjos estruturais, onde os mesmos atuam na prevenção da formação dos radicais livres por meio do sequestro dos íons metálicos. Estes autores descrevem as seguintes características estruturais como importantes para a atividade antioxidante dos flavonoides:

a) a presença do grupo hidroxila na posição três do anel C, onde os flavonóis são exemplo de flavonoides nestas condições;

b) a ligação dupla entre os carbonos dois e três do anel C, cuja hidrogenação diminui o efeito antiperoxidativo;

c) e com relação ao número de grupos hidroxilas, quanto maior seu número nos anéis A e B, maior a atividade sequestradora de radicais livres.

O valor medicinal dos méis é atribuído, em grande parte, à atividade antioxidante (ALJADI; KAMARUDDIN, 2004), definida como quaisquer substâncias que presentes em baixas concentrações em determinado substrato oxidável, diminuem ou inibem a oxidação desse substrato (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1986).

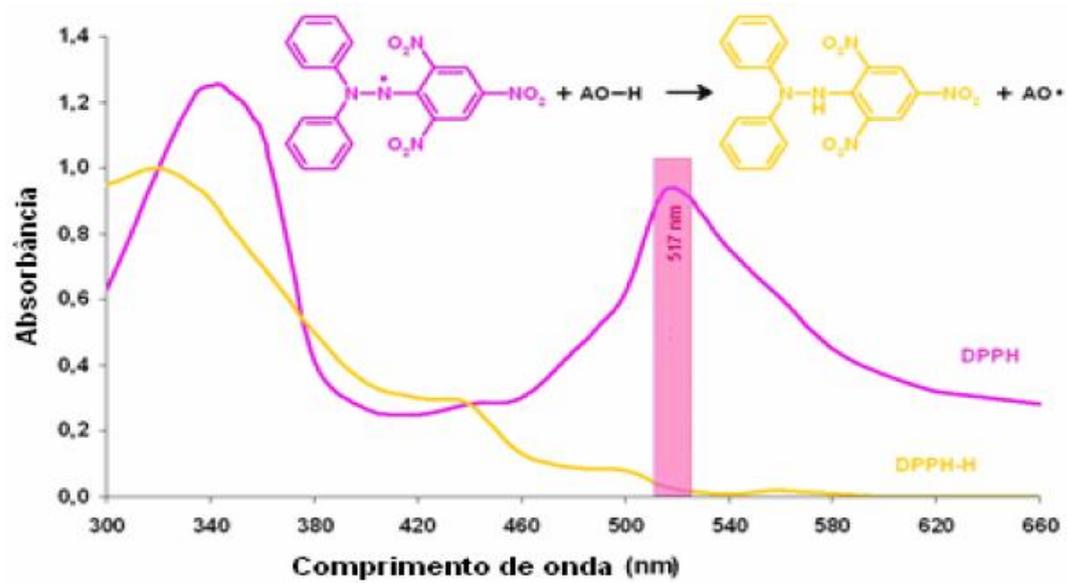
Assim, devido a grande importância à saúde humana (CHANG et al. 2011), diversos pesquisadores tem se dedicado ao estudo de méis, e, muitos utilizaram-se do método do DPPH para determinar a atividade antioxidante (ESTEVINHO et al. 2008; ISLAN, 2012; LECHEMAN et al. 2010; SANT'ANA et al. 2012).

Em virtude da grande diversidade de compostos, vários ensaios *in vitro* têm sido desenvolvidos para determinar a capacidade antioxidante de diversas amostras. Os ensaios estão baseados em dois tipos: cinética química e transferência de elétrons. Este último caracteriza-se pelo sequestro dos radicais livres associados à degradação oxidativa (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

Dentre vários ensaios espectrofotométricos, os métodos do DPPH, do sistema beta caroteno/ácido linoleico, do ABTS e FRAP são os mais utilizados na determinação da atividade antioxidante *in vitro*. Nesse estudo foi utilizado o método do DPPH, por ser um método simples, reprodutível e caracterizado pela redução do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila na presença de um antioxidante doador de hidrogênio, reação que pode ser acompanhada por meio do decaimento na absorbância da amostra analisada (MOLINEUX, 2004, GENOVESE et al., 2008), sendo bastante utilizado devido sua simplicidade e rapidez (BRAND-WILLIAMS et al., 1995).

A molécula de DPPH (figura 7) é considerada um radical livre estável por apresentar um elétron desemparelhado que pode se deslocar por toda a sua estrutura, resultando em uma coloração violeta escura, que é caracterizada por apresentar uma banda de absorção em cerca de 520 nm quando em solução de etanol ou metanol (LIANDA, 2009, MOLYNEUX, 2004).

Figura 7 – Perfil espectrofotométrico do radical 2,2-difenil-picril-hidrazil (DPPH).



Fonte: Passos (2010).

Não existem relatos da atividade antioxidante de méis amargos e este fato motivou a realização destes experimentos neste trabalho.

## **2 OBJETIVO**

Esta dissertação norteou-se pelos seguintes objetivos:

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Investigar a existência de marcadores químicos que possam confirmar a origem botânica do mel amargo proveniente do município do Cantá/RR, bem como verificar sua composição química e atividade antioxidante.

#### **2.1.2 Objetivos específicos**

Caracterizar a origem botânica do mel através da comparação da composição química dos extratos de mel e de *Vochysia* sp.;

Determinar o teor de fenólicos, flavonoides, carotenoides e a cor do mel;

Verificar a atividade antioxidante do mel.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia de trabalho desta pesquisa está embasada em dois pilares: o primeiro aborda a caracterização botânica do mel amargo utilizando-se das análises melissopalínológica e botânica; e análises por espectrometria de massas e cromatográfica. O segundo pilar aborda a caracterização do mel com base nas análises espectrofotométricas e da atividade antioxidante do mel.

#### 3.1 MATERIAIS

Os padrões utilizados nas quantificações e nas análises por espectrometria de massas foram adquiridos de Sigma-Aldrich e os solventes para análise foram destilados para eliminar contaminantes antes de serem utilizados.

#### 3.2 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MEL

Uma amostra de mel amargo de aproximadamente 20 kg foi obtida de um apiário localizado na Vila do Vinte, Serra Grande II, município de Cantá-RR (01° 52.879' N; 060° 35.978' O) em novembro de 2011. O município está localizado no centro leste do estado de Roraima, apresenta clima quente e semiúmido, com estação seca de outubro a março e estação chuvosa de abril a setembro. A precipitação média varia de 1750 a 2000 mm e a média da temperatura é de 27,5 °C (RORAIMA, 2010).

A identificação melissopalínológica foi realizada pelo biólogo Doutor Silvio José Reis da Silva, do Museu Integrado de Roraima e professor da Universidade Estadual de Roraima (UERR). O procedimento de análise inicialmente elaborado por Erdtman em 1960 foi adaptado por Silva em 1998 e apresenta-se descrito a seguir.

##### 3.2.1 Procedimentos para análise polínica de mel.

Inicialmente homogeneizou-se aproximadamente 50 ml da amostra de mel em água destilada na proporção de 1:1 em seguida, centrifugou-se a 3000 rpm por 20 min. Após esse procedimento, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se novamente a mistura de água e mel

ao centrifugado sem agitação do sedimento, procedendo-se com nova centrifugação a 3000 rpm por 20 min. Este procedimento foi realizado por 5 vezes. Ao precipitado obtido, adicionou-se água destilada, solubilizando-se o sedimento e procedeu-se com nova centrifugação a 3000 rpm por 20 min. Posteriormente, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se ao precipitado 5 mL de ácido acético glacial, agitou-se, centrifugou-se a 3000 rpm por 20 min e descartou-se o sobrenadante. Em seguida adicionou-se 5 mL de solução de acetólise (9 partes de anidrido acético e 1 parte de ácido sulfúrico), ferveu-se em banho-maria por 2 min, centrifugou-se a 3000 rpm por 20 min e descartou-se o sobrenadante. Ao precipitado adicionou-se água destilada, agitou-se e centrifugou-se a 3000 rpm por 20 min. Novamente descartou-se o sobrenadante e adicionou-se ao precipitado 10 mL de água glicerinada na proporção de 1:1, agitou-se e descartou-se o sobrenadante. Por fim, os tubos centrifugados foram mantidos emborcados até o momento de montagem e análise das lâminas (SILVA, 1998).

### 3.3 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

O material botânico (galhos contendo folhas, frutos, flores e resina) foi coletado nos meses de setembro e novembro de 2012 às margens da BR-401, Bairro Santa Cecília, município do Cantá (figura 8).

Figura 8 – Material botânico coletado contendo folhas, flores (A), frutos (B), casca e resina (C).



A coleta foi realizada com o auxílio de uma escada e podão. Nesta pesquisa foram utilizadas apenas as flores, parte da planta em que a abelha coleta o néctar, para comparação de constituintes. Sendo que, as demais partes coletadas (folhas, frutos, galhos e resina) estão

sendo analisadas pelo aluno de Iniciação científica, Gilmar Prado. Parte do material botânico coletado foi utilizado para a elaboração de duas exsiccatas. Estas foram identificadas pela Doutora Andréia Flores do Museu Integrado de Roraima, local onde uma exsiccata está depositada sob o Tombo “MIRR 10569”. A segunda exsiccata está depositada no herbário da UFRR. As demais flores foram utilizadas para a elaboração dos extratos a serem analisados.

### 3.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DO MEL

Do mel amostrado foram preparados quatro extratos: extratos metanólicos com resina Amberlite XAD-2 e Sep-pak C18, extrato líquido-líquido diclorometânico e uma porção de mel *in natura* preparada por liofilização.

#### 3.4.1 Extração em fase sólida (SPE) com Amberlite XAD-2

No preparo do extrato em fase sólida por XAD-2 foram utilizados 50 g de mel homogeneizados com 50 mL de água destilada com pH 2, filtrado e reservado. Em seguida, misturou-se 75 g de Amberlite XAD-2 em 200 mL de metanol e manteve-se por agitação mecânica por 30 min. Em sequência a resina foi filtrada, lavada com água acidificada com HCl (pH 2) e água destilada. A seguir a resina foi empacotada em coluna de vidro. E o mel acidificado e reservado foi depositado na coluna e lavado com 250 mL de água com pH 2 e em seguida com 250 mL de água destilada. Por fim, adicionou-se 300 mL de metanol e coletou-se o extrato. Este último foi concentrado em evaporador rotativo, contudo, por ainda conter água, extrato foi liofilizado e armazenado em dessecador até o momento das análises (KASSIM et al., 2010; LIANDA, 2009; YAO et al., 2003, 2004)

#### 3.4.2 Extração em fase sólida com C18

Inicialmente acoplou-se o cartucho Sep-Pak C18 (200 mg, Waters) em coluna de vidro e lavou-se com 10 mL de metanol e em seguida, com 10 mL de água destilada. A amostra de mel (10 g) foi solubilizada com 50 mL de água destilada e agitada por aproximadamente 10 minutos. A solução foi filtrada adicionada a coluna e eluída com o auxílio de uma bomba de vácuo. Na sequência lavou-se a coluna com água destilada (10 mL) e por último, com metanol (10 mL). O extrato metanólico coletado foi concentrado em

evaporador rotativo, liofilizado e armazenado sob vácuo até o momento das análises (TRUCHADO; FERRERES; TOMAS-BARBERAN, 2009).

### 3.4.3 Preparo do extrato líquido-líquido

Primeiramente montou-se o sistema de extração líquido-líquido e em seguida, transferiu-se em balão de fundo redondo, 500 mL de diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) e 250 mL de diclorometano no corpo extrator conectado ao condensador. No segundo momento, pesou-se 200 g de mel e homogeneizou-se com 300 mL de água destilada por 10 minutos. Após a homogeneização, filtrou-se e depositou-se delicadamente sobre o diclorometano do corpo extrator. Após a montagem do sistema e adição da amostra, ligou-se a manta de aquecimento e regulou-se a temperatura até gotejamento discreto e contínuo. Após 72 horas de extração contínua desligou-se a manta aquecedora e coletou-se a fase orgânica, secou-se com sulfato de sódio e concentrou-se em evaporador rotativo (BOUSETA; COLLIN, 1995; PONTIS, 2011).

### 3.5 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DAS FLORES

As flores foram submetidas à extração a frio em etanol. Para tanto, logo após a coleta, o material foi limpo (retirada manual de pequenos insetos e sujidades) e em seguida foi separada, com o auxílio de uma tesoura, a antera das demais partes das flores. As anteras foram pesadas (massa fresca de 2 g) e em seguida foram imersas em etanol (50 mL) e agitadas manualmente. Rapidamente filtrou-se e concentrou-se em evaporador rotativo. Este procedimento foi realizado com o fim de se obter um extrato enriquecido de pólen. O extrato das anteras das flores foi identificado como extrato etanólico das anteras das flores (EEAF). As demais partes das flores foram pesadas (massa fresca de 65,96 g) e imersas em etanol (600 mL). Após 24 h a temperatura ambiente, procedeu-se da filtração, secagem com sulfato de sódio e concentração em evaporador rotativo. Este procedimento foi repetido por cinco vezes, com o propósito de se obter o máximo de extrato. Em seguida o extrato etanólico das flores identificado por EEAF foi liofilizado e armazenado em dessecador sob vácuo até o momento das análises.

### 3.6 FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS

Os extratos das flores (EEF) e de mel por XAD-2 foram particionados utilizando-se solventes orgânicos com polaridade crescente.

#### 3.6.1 Fracionamento dos extratos de mel e das flores.

Para o fracionamento do extrato de mel pesou-se 500 mg de extrato em recipiente tarado, transferiu-se para um gral de porcelana para maceração com uma pequena porção de sílica gel. A amostra foi adicionada à coluna cromatográfica empacotada com 18 g de sílica gel 230-400 mesh. Na sequência procedeu-se o fracionamento com 600 mL de hexano, 600 mL de diclorometano, 750 mL de acetato de etila e 750 mL de metanol. As frações obtidas foram concentradas em evaporador rotativo e os extratos foram armazenados sob refrigeração até o momento das análises cromatográficas.

O mesmo procedimento foi realizado para o particionamento do extrato das flores.

### 3.7 ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO À PRESSÃO ATMOSFÉRICA (API)

As análises por espectrometria de massas com ionização à pressão atmosférica (API) foram realizadas no Laboratório de Espectrometria de massas da Universidade Federal do Amazonas, sob a orientação da Profa. Dra. Maria Lucia Belém Pinheiro. Os espectros de massas foram adquiridos em um espectrômetro do tipo *ion trap* (Thermo - LCQ Fleet) equipado com uma fonte de API (*eletrospray* ou *APCI*) programada para operar nos modos positivo e negativo de aquisição. As informações foram registradas através do modo de aquisição contínua disponível no *LCQ Fleet Tune*, com faixa monitorada de  $m/z$  100-1000.

#### 3.7.1 Preparo das amostras

Os extratos (1 mg) foram solubilizados com 1 mL de metanol e 1 mL de diclorometano (para os extratos diclorometano). Do solubilizado foi retirada uma alíquota de 20  $\mu$ L e diluída em 1 mL de metanol grau HPLC (obtendo-se uma concentração entre 15 e 20

ppm) e aplicadas por inserção direta em *looping* de 5µL, sendo utilizada a seringa do próprio equipamento como veículo de transporte.

### 3.7.2 Espectrometria de massas com ionização por electrospray (ESI-MS)

As análises por electrospray foram realizadas de acordo com as seguintes condições analíticas:

ESI (+): voltagem do spray, 5 kV; gás de bainha, 10 arb; gás auxiliar, 5 arb; *gás sweep*, 0 arb; temperatura do capilar, 200 °C; voltagem do capilar, 40 V; lente do tubo, 115 V; bombeamento da seringa, 20 µL/min;

ESI (-): voltagem do spray, 5 kV; gás de bainha, 10 arb; gás auxiliar, 5 arb; *gás sweep* 0 arb; temperatura do capilar, 200 °C; voltagem do capilar -40 V; lente do tubo -115 V; bombeamento da seringa 20 µL/min;

### 3.7.3 Espectrometria de massas com ionização química à pressão atmosférica (APCI-MS)

As análises por ionização química foram realizadas de acordo com as seguintes condições analíticas:

APCI (+): *voltagem da descarga*, 3 kV; temperatura de vaporização, 300 °C; gás de bainha, 30 arb; gás auxiliar, 10 arb; *gás sweep*, 0 arb; temperatura do capilar, 200 °C; voltagem do capilar, 40 V; lente do tubo, 115 V; bombeamento da seringa, 30 µL/min;

APCI (-): *voltagem da descarga*, 3 kV; temperatura de vaporização 300 °C; *gás de bainha*, 30 arb; gás auxiliar, 10 arb; *gás sweep*, 0 arb; temperatura do capilar 200 °C; voltagem do capilar, -40 V; lente do tubo, -115 V; bombardeamento da seringa 30 µL/min.

### 3.8 CROMATOGRAFIA A GÁS ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM).

Os ensaios por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) foram realizados no Núcleo de Pesquisas energéticas (NUPENERG), sob a orientação do Prof. Dr. Luiz Antônio Mendonça Alves da Costa, do Departamento de Química da Universidade Federal de Roraima. Os extratos foram derivatizados e injetados em um cromatógrafo a gás da Shimadzu (modelo GC2010), acoplado a um detector de massas do mesmo fabricante (modelo GCMS-QP2110Plus), operado a 70 eV. O cromatógrafo estava equipado com coluna capilar de sílica fundida Rtx-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Como gás de arraste utilizou-se o hélio. As injeções das amostras foram da ordem de 1 µL a partir de uma solução 10 mg/mL e as condições gerais de análise foram: temperatura do injetor de 240°C; modo de injeção: split (10:1) com purga de 3 mL/min; controle de fluxo de gás: velocidade linear; fluxo de gás de arraste: 1,02 mL/min; temperatura da interface: 310°C; temperatura da fonte de íons: 280°C; e programação do forno: 50°C - 310°C (3°C/min), mantendo por 20 minutos a temperatura final.

### **3.8.1 Derivatização com BSTFA**

Utilizando-se aproximadamente 10 mg dos extratos preparados, derivatizou-se com 200 µl de piridina e 100 µl de BSTFA (*bis*(trimetilsilil)trifluoracetamida).

### **3.8.2 Derivatização com DMDS/I<sub>2</sub>.**

As frações hexânicas de mel (EMel-XAD-2) e das flores sem antera (EEFlor) foram solubilizadas com éter etílico e tratadas com 200 µL de dimetildissulfeto (DMDS) e 100 µL da solução de iodo (20 mg de I<sub>2</sub> em 2 mL de éter etílico). As misturas reacionais foram mantidas em capela de exaustão sob agitação contínua e sob refluxo por uma noite a 50°C. Após esse período, adicionou-se 2 mL da solução aquosa de tiosulfato de sódio (1g de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> em 10 mL de água destilada) e 500 µL de hexano bidestilado para a interrupção da reação (mudança de cor do vermelho para transparente).

A fase orgânica foi extraída, seca com sulfato de sódio anidro e evaporada em atmosfera de nitrogênio. As amostras derivatizadas foram analisadas por CG-EM (FRANCIS; VELAND, 1981).

## **3.9 ANÁLISES ESPECTROFOTOMÉTRICAS DO MEL**

As análises espectrofotométricas foram realizadas em espectrofotômetro registrador UV-Visível da marca Shimadzu, modelo UV-mini 1240, realizadas no Laboratório de Biotecnologia e Química Fina da Universidade Federal de Roraima.

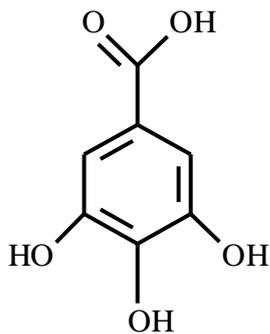
Antecedendo as quantificações foram realizados ensaios para visualizar o maior pico de absorvância de cada padrão, mediante a obtenção de um espectro de varredura na região do UV-Visível.

Na elaboração das curvas de calibração utilizou-se uma sequencia de concentrações que possibilitou a plotagem das amostras nas referidas curvas. Com esse procedimento obtiveram-se os dados das equações da reta ( $Y= A + B.X$ ) e dos coeficientes de correlação ( $R^2$ ) para então efetuar os cálculos de concentração de cada constituinte quantificado.

### 3.9.1 Determinação do teor de compostos fenólicos

O teor dos compostos fenólicos foi verificado, de acordo com a metodologia de Folin-Ciocalteu, utilizando-se o ácido gálico (figura 9) como padrão (FOLIN; CIOCALTEU, 1927).

Figura 9 – Padrão utilizado para análise de compostos fenólicos.



ácido gálico

#### 3.9.1.1 Curva de calibração do ácido gálico

Para elaboração da curva padrão foram realizados ensaios com o ácido gálico, observando-se o comprimento de onda na região do visível e selecionando o comprimento de

onda 798 nm. Para a leitura foram preparadas cinco soluções de diferentes concentrações. Para tanto foram pipetadas alíquotas de 100, 200, 300, 400, 600 e 800  $\mu\text{L}$  a partir da solução estoque de ácido gálico (0,1 mg/mL), acrescidas de 2000  $\mu\text{L}$  de solução aquosa de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) a 15%, 300  $\mu\text{L}$  do reagente Folin-Ciocalteu e água destilada até o volume final de 5 mL. Todos os pontos da curva foram elaborados em triplicata.

#### 3.9.1.2 Doseamento da amostra

Sequencialmente, foi elaborada a solução estoque de mel na concentração de 0,1 g/mL e, a partir dela foram retiradas três alíquotas (500  $\mu\text{L}$ ) para elaboração das soluções de reação depositadas em balão volumétrico, adicionados 300  $\mu\text{L}$  do reagente Folin-Ciocalteu, 2000  $\mu\text{L}$  da solução aquosa de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) a 15% e água destilada até o volume de 5 mL.

O branco constituiu-se de 2000  $\mu\text{L}$  de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) a 15%, 300  $\mu\text{L}$  de reagente de Folin-Ciocalteu e água. As soluções foram preparadas em balão volumétrico, transferidas para tubos de ensaio e armazenadas ao abrigo da luz por 2 h.

Decorrido o tempo de reação, as soluções foram homogeneizadas em agitador de tubos e as absorbâncias foram lidas a 798 nm.

#### 3.9.2 Determinação do teor de flavonoides

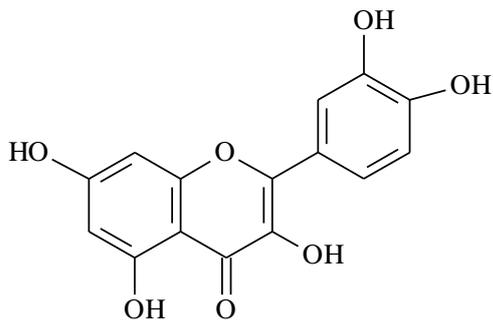
O teor de flavonoides foi determinado pelo somatório de três metodologias. Para determinação das antocianinas utilizou-se a metodologia descrita por Francis apud Araújo (ARAÚJO, 2007). A metodologia de complexação do cloreto de alumínio na determinação das flavonas e flavonóis (ALVES; KUBOTA, 2013; ESTEVINHO et al., 2012; GÓMEZ-CARAVACA et al., 2006; KHALIL et al., 2011; TENORE et al., 2012; TYLKOWSKI et al., 2010) e, para a determinação das flavononas e diidroflavonóis foi utilizada a 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNP), um reagente para estes flavonoides (ALVAREZ-SOARES et al., 2010b) bastante utilizado no estudo da própolis (MIGUEL et al., 2010; TYLKOWSKI et al., 2010; VALENCIA et al., 2012).

Estas metodologias implantadas no Laboratório de Biotecnologia e Química Fina da Universidade Federal de Roraima têm sido utilizadas para análises de méis (PONTIS, 2011).

### 3.9.2.1 Flavonas e flavonóis

Para a determinação do teor de flavonas e flavonóis utilizou-se a quercetina (figura 10) como padrão de quantificação (DOWD, 1959).

Figura 10 – Padrão utilizado para análise de flavonas e flavonóis.



quercetina

#### 3.9.2.1.1 Curva de calibração da quercetina

Para elaboração da curva de calibração foram realizados ensaios observando-se o comprimento de onda na região do visível e selecionado o comprimento de onda 437 nm. A curva de calibração de quercetina foi elaborada mediante os resultados obtidos da leitura espectrofotométrica dos pontos, em triplicata de 40, 60, 120, 140 e 160  $\mu\text{L}$  de solução estoque de quercetina (0,1 mg/mL) acrescidos de 3000  $\mu\text{L}$  de  $\text{AlCl}_3$  a 5% e metanol até o volume de 5 mL.

Para cada ponto da curva de calibração foi elaborado um branco composto da alíquota de quercetina (40 a 160  $\mu\text{L}$ ) e metanol até o volume de 5 mL. Este procedimento foi necessário para evitar a variação das leituras de cada triplicata da curva padrão.

#### 3.9.2.1.2 Doseamento da amostra

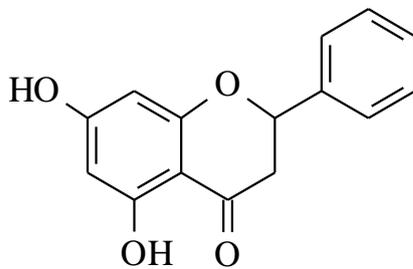
Posteriormente, foram aferidas as absorbâncias da solução aquosa de mel (0,2 g/mL) expressas em média  $\pm$  desvio padrão. Para tanto, da solução estoque de mel foram retiradas

três alíquotas de 2000  $\mu\text{L}$  e acrescidas de 3000  $\mu\text{L}$  de  $\text{AlCl}_3$  a 5%, sendo o branco constituído de 3000  $\mu\text{L}$  de  $\text{AlCl}_3$  a 5% e metanol.

### **3.9.2.2 Flavonas e diidroflavonois**

O teor de flavonas e diidroflavonois foi determinado por meio da utilização da pinocembrina (figura 11) como padrão de quantificação (AGARWAL; VEMANARADHYA; MEHTA, 2012).

Figura 11 – Padrão utilizado para análise de flavononas e diidroflavonois.



pinocembrina

Previamente foram elaboradas as soluções de DNP, pinocembrina (1mg/mL) e KOH a 10% [metanol/água (7:3)], conforme modo de preparo descrito abaixo.

#### *3.9.2.2.1 Preparo da solução estoque de 2,4-dinitrofenilidrazina (DNP)*

Pesou-se 0,5 g do reagente 2,4-dinitrofenilidrazina (DNP), previamente seco a 60 °C, em estufa com circulação de ar por 3 horas. Em seguida solubilizou-se o reagente com 1mL de ácido sulfúrico 96% e pequena quantidade de metanol. Após este procedimento, a solução foi transferida para um balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com metanol.

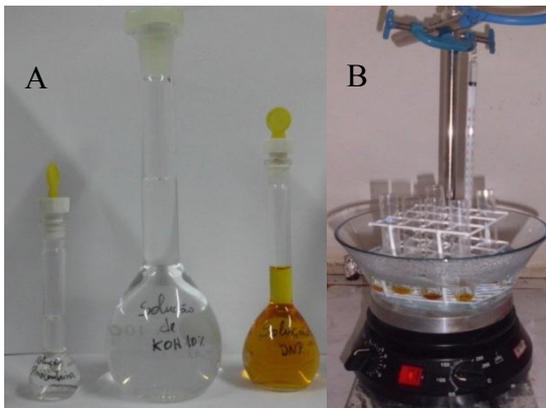
#### *3.9.2.2.2 Preparo da solução estoque de pinocembrina (1 mg/mL)*

Pesou-se 0,005 g de pinocembrina, solubilizou-se com metanol, transferiu-se o solubilizado para balão volumétrico de 5 mL e completou-se o volume com metanol.

### 3.9.2.2.3 Preparo da solução estoque de KOH a 10%

Pesou-se 10 g de KOH e solubilizou-se com solução de metanol/água (7:3), transferiu-se o solubilizado para balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com solução de metanol/água. Das soluções estoques (figura 12-A) preparadas anteriormente, foram elaboradas as soluções para a leitura do padrão (pinocembrina) e do mel, bem como os brancos do padrão (pinocembrina) e do mel (figura 12-B).

Figura 12 - (A) Soluções estoque de pinocembrina, KOH e DNP; (B) sistema de aquecimento da solução estoque de pinocembrina, solução estoque da amostra e brancos da curva e da amostra.



### 3.9.2.2.4 Curva de calibração de pinocembrina

Primeiramente pipetou-se uma alíquota de 0,4 mL de solução estoque de pinocembrina (1mg/mL) e misturou-se com 0,8 mL de solução de DNP. A mistura foi mantida sob aquecimento a 50 °C durante 50 min (figura 11-B). Após resfriamento à temperatura ambiente, foram adicionados 2,8 mL de KOH a 10% em metanol/água (7:3).

Para elaboração dos pontos da curva de calibração foram realizados ensaios observando-se o comprimento de onda na região do visível e selecionado o comprimento de onda 437 nm. Para tanto, foram pipetadas alíquotas de 25, 75, 100, 150 e 200  $\mu$ L da mistura e adicionados metanol até atingir o volume final de 5 mL. Em seguida as soluções foram transferidas para tubos de ensaio, homogeneizadas em agitador de tubos e as absorvâncias foram medidas.

#### 3.9.2.2.5 Branco da curva de calibração

O branco da curva foi preparado misturando-se 0,4 mL de metanol e 0,8 mL de DNP. A mistura, então, foi mantida sob aquecimento a 50 °C durante 50 min (figura 12-B). Após resfriamento à temperatura ambiente foram adicionados 2,8 mL de KOH a 10% em metanol/água (7:3). Após homogeneização pipetaram-se alíquotas de 25, 75, 100, 150 e 200 µL e adicionou-se metanol até o volume de 5 mL. Em seguida centrifugou-se a 2800 rpm durante 5 minutos e as absorbâncias foram aferidas.

#### 3.9.2.2.6 Doseamento da amostra

Para a amostra de mel foram misturados 0,2 mL de solução estoque de mel (2 g/mL) e 0,4 mL de DNP. A mistura foi mantida sob aquecimento a 50 °C durante 50 min (figura 12-B). Após resfriamento à temperatura ambiente, foi adicionado 1,4 mL de KOH a 10% em metanol/água (7:3). Da mistura resultante foi pipetada uma alíquota de 0,5 mL e adicionado metanol até o volume de 5 mL.

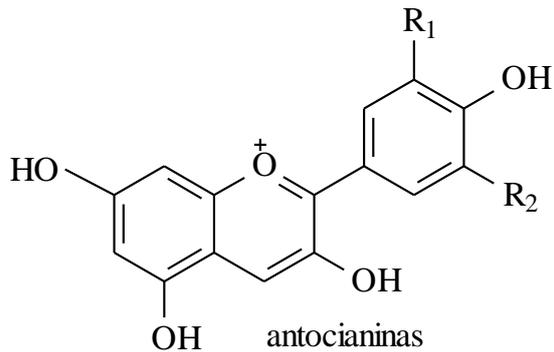
#### 3.9.2.2.7 Branco da amostra

O branco da amostra foi preparado misturando-se 0,2 mL de metanol e 0,4 mL de DNP. A mistura foi então mantida sob aquecimento a 50 °C durante 50 min (figura 12-B). Após o resfriamento à temperatura ambiente foi adicionado 1,4 mL de KOH a 10% em metanol/água (7:3). Desta mistura, retirou-se uma alíquota de 0,15 mL e adicionou-se metanol até o volume de 5 mL. Em seguida centrifugou-se a 2800 rpm durante 5 minutos e as absorbâncias foram aferidas.

### **3.9.2.3 Antocianinas**

Para determinação do teor de antocianinas (figura 13) utilizou-se a metodologia descrita por Francis apud Araújo (ARAÚJO, 2007).

Figura 13 - Estrutura básica das antocianinas.



Na determinação do teor de antocianinas preparou-se inicialmente uma solução extratora composta de 15% de HCl 1,5 N e 85% de etanol a 95%. Na sequência, com o auxílio do sonificador preparou-se uma solução estoque de mel a 0,5 g/mL em solução extratora. Da solução estoque de mel foram retiradas três alíquotas (1 mL), que foram depositadas em três balões de 5 mL e o volume foi aferido com solução extratora. As absorbâncias foram lidas a 515 nm contra um branco composto de solução extratora. Em seguida efetuou-se o teor de antocianinas mediante utilização da Equação (1):

Equação (1):

$$\text{Ant (mg/100g)} = \frac{[(\text{abs}).(\text{fator de diluição})]}{98,2}$$

Onde:

Ant = teor de antocianinas expresso em mg/100g

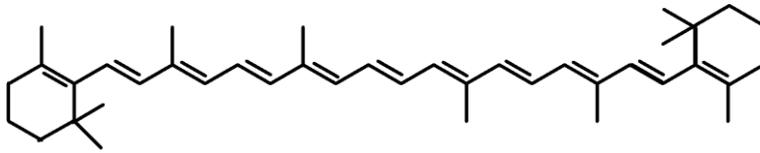
Abs = absorbância da amostra

Fator de diluição = 100 (g/mL) dividido pela concentração de mel (g/mL).

### 3.9.3 Determinação do teor de Carotenoides

O conteúdo dos carotenoides (figura 14) foi verificado de acordo com metodologia descrita por Alvarez-Suarez (2010), com algumas adaptações.

Figura 14 – Padrão utilizado para análise de carotenoides.



$\beta$ -caroteno

A amostra de mel (1 g) foi agitada a 500 rpm com 10 mL de hexano-acetona (6:4) por 10 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi retirado e a absorvância medida a 450 nm.

### 3.9.4 Análise da cor

A cor foi analisada de acordo com a metodologia descrita por Lacerda et al. (2010) consistindo na medida de absorvância em comprimento de onda de 635 nm de uma solução a 50% de mel em água destilada e centrifugada a 3200 rpm por 5 minutos, contra um branco composto apenas de água destilada. A cor foi expressa em mm *Pfund*, de acordo com a Equação (2):

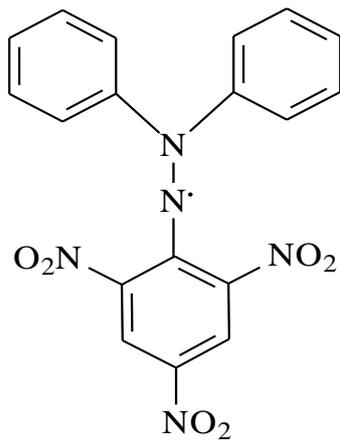
Equação (2):

$$\text{Cor} = (371,39 \times \text{abs } 635 \text{ nm}) - 38,70$$

### 3.9.5 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante do mel amargo foi determinada pelo método de capacidade sequestrante do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (figura 15).

Figura 15 – Estrutura química do radical 2,2-difenil-picril-hidrazil (DPPH).



2-2-difenil-picril-hidrazil

Para tanto foram utilizadas nesse experimento uma solução metanólica a 1  $\mu$ M de DPPH e uma solução estoque de mel com concentração de 100 mg/mL. Para obtenção da melhor faixa de atividade antioxidante foram realizadas várias diluições a partir da concentração inicial. Da solução de mel foram elaboradas cinco diluições (figura 16) com as seguintes concentrações: 6 mg/mL, 8 mg/mL, 10 mg/mL, 12 mg/mL e 14 mg/mL, das quais foram retiradas alíquotas para o doseamento com DPPH (em triplicata).

Figura 16 - Soluções estoque de DPPH, de mel e 5 diluições da solução de mel dispostos da esquerda para direita.



Os testes foram realizados em tubos de ensaio com uma mistura de 3,5 mL de solução padrão de mel e 1,5 mL de DPPH para elaboração da solução de reação da amostra. As absorbâncias de cada ponto, em triplicata, foram lidas a 515 nm após 30 minutos da reação e incubação no escuro. O branco foi constituído de 3,5 mL da solução padrão (mel) acrescido de 1,5 mL de metanol e o controle positivo com 1,5 mL de solução de DPPH e 3,5 mL de

metanol. A porcentagem da atividade antioxidante (AA%) foi determinada por meio da Equação (3) de acordo com Mensor et al., (2001).

Equação (3):

$$AA\% = 100 - \frac{[(\text{Abs. da amostra} - \text{Abs do branco})]}{[\text{Abs do controle}]} \times 100$$

Onde:

Abs<sub>amostra</sub> = absorbância da solução de DPPH e a solução amostra a ser verificada (mel e padrão)

Abs<sub>branco</sub> = absorbância da solução da amostra (mel e padrão) e metanol

Abs<sub>controle</sub> = absorbância da solução de DPPH e metanol

Após a determinação da atividade antioxidante utilizou-se o programa Origin para plotagem dos valores da atividade antioxidante versus concentrações das soluções e determinou-se o IC<sub>50</sub>.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta pesquisa é parte integrante do projeto “Avaliação da constituição química de produtos apícolas e sua atividade biológica no estado de Roraima”, que iniciou suas atividades em 2005. E esta dissertação se ateve à caracterização da origem botânica do mel amargo, bem como sua caracterização química. Para tanto, foram realizadas análises melissopalinológica e elaborados diversos extratos com o fim de compará-los quimicamente.

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DA ORIGEM BOTÂNICA DO MEL

Um dos objetivos do projeto de dissertação foi a caracterização da origem botânica do mel, com a proposta de buscar dados químicos que comprovassem a origem determinada por melissopalinologia. A análise melissopalinológica da amostra de mel (tabela 3) demonstrou uma predominância do pólen de *Vochysia sp* (Vochysaceae).

Tabela 3 – Análise melissopalinológica de mel amargo.

Pólen	Mel amargo
<i>Vochysia sp</i>	91,2%
<i>Ataleia maripa</i>	2,0%
<i>Mimosa pudica</i>	3,3%
Poaceae	1,3%
Indeterminado	2,7%

Paralelamente a este resultado, realizou-se a coleta de flores de *Vochysia sp.* e foram elaborados extratos das flores e do mel para comprovação química da hipótese de que mel amargo é oriundo das plantas deste gênero. Entretanto, devido a grande semelhança entre as espécies *V. guianensis* Aubl e *V. glaberrima*, identificadas durante esta pesquisa, na região do município do Cantá e por não haver material botânico contendo flores e frutos suficientes para realizarmos a comparação das espécies, optou-se por não definir em nível de espécie a planta analisada. Este fator ainda está associado a grande dificuldade de identificação das plantas, pois a espécie *V. glaberrima* não se encontra registrada como ocorrente no estado de Roraima.

## 4.2 PREPARO DOS EXTRATOS

Para a obtenção de extratos de mel com características diferentes, foram elaborados os extratos: líquido-líquido com o solvente diclorometano e os extratos por extração em fase sólida com a resina Amberlite XAD-2 e com o cartucho de Sep-pak C18 ambos utilizando-se do metanol como solvente.

Para elaboração dos extratos das flores, inicialmente separou-se as anteras com o auxílio de uma tesoura, obtendo-se duas amostras: com anteras e as flores sem anteras. A extração da antera separadamente e de forma rápida com o auxílio de ultrassom foi realizada para verificar se os constituintes encontrados no mel estão presentes no pólen, já que os constituintes poderiam ser advindos do pólen e não do néctar da flor. Entretanto, não foi possível coletar néctar em quantidade significativa para análise de constituintes secundários, pois a flor é bastante pequena e a produção de néctar é muito reduzida. Logo, como estratégia de comparação extraiu-se constituintes da flor, técnica já utilizada para caracterizar néctar de *Spathodea campanulatta* (FLACH, 2005).

Os extratos foram elaborados com etanol a frio e na tabela 4, estão apresentados os seus rendimentos.

Tabela 4- Rendimento dos extratos do mel, das flores e da antera das flores por diferentes tipos de extração.

<b>Tipo de extração</b>	<b>Amostra</b>	<b>Cor</b>	<b>Rendimento %</b>
Líquido-líquido (diclorometano)	Mel	Amarelado	0,098
XAD-2 (metanol)	Mel	Amarelado	0,167
C18 (metanol)	Mel	Amarelado	0,113
Etanólico a frio	Flor	Amarelado	12,81
Etanólico a frio	Antera da flor	Esbranquiçado	0,715

Como os extratos têm uma composição complexa, optou-se por realizar um fracionamento do extrato do mel e das flores que foram realizados em coluna cromatográfica filtrante com sílica gel, utilizando-se e como solvente hexano, clorofórmico, acetato de etila e metanol. Os dados do fracionamento do extrato de mel encontram-se na tabela 5.

Tabela 5 – Fracionamento do extrato do mel por XAD-2.

Fração	Solvente	Aspecto	Massa obtida (mg)
EM-hex	Hexano	Não observado	6,6
EM-clor	Clorofórmio	Esbranquiçado	146,0
EM-AcE	Acetato de etila	Levemente amarelado	14,6
EM-MeOH	Metanol	Amarelado	9,52

Do extrato etanólico das flores sem antera, obteve-se as frações particionadas, apresentadas na tabela 6. Contudo, o extrato da antera da flor não pôde ser fracionado, pois o mesmo apresentava uma massa muito pequena. Dessa forma, optou-se apenas em derivatizá-la e compará-la com os extratos fracionados das flores sem antera e, com os extratos fracionados das flores e do mel, realizaram-se as análises comparativas utilizando-se a cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).

Tabela 6 – Fracionamento do extrato das flores (EEF).

Fração	Solvente	Aspecto	Massa obtida (mg)
EEF-hex	Hexano	Não observado	7,3
EEF-clor	Clorofórmio	Esbranquiçado	106,0
EEF-AcE	Acetato de etila	Amarelado	33,0
EEF-MeOH	Metanol	Amarelo escuro	49,2

Assim, para atingir o objetivo de confirmar quimicamente a origem floral, traçaram-se duas estratégias, a saber: a primeira estratégia baseou-se na análise direta por espectrometria de massas pelas técnicas de eletrospray (ESI/MS) e por ionização química (APCI); a segunda estratégia buscou comparar os constituintes voláteis presentes no mel, nas flores e nas anteras das flores utilizando-se a cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).

#### 4.3 ANÁLISES POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

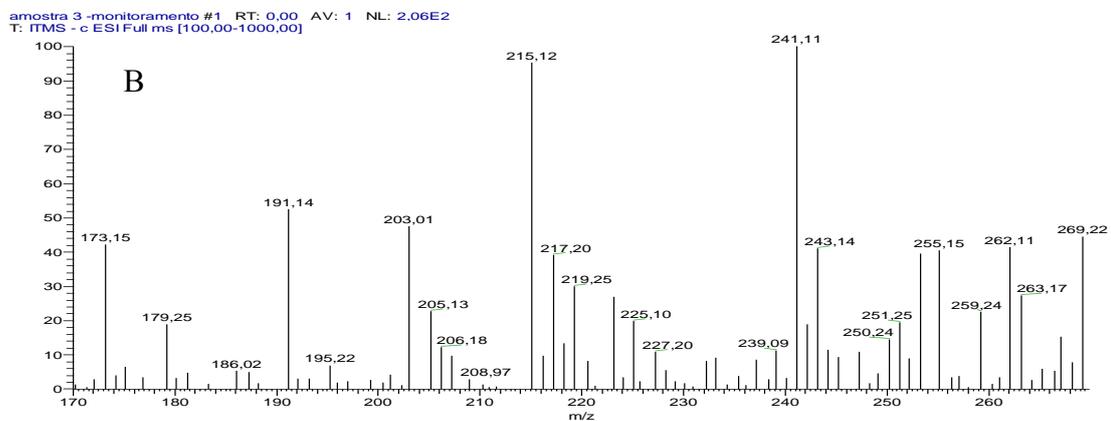
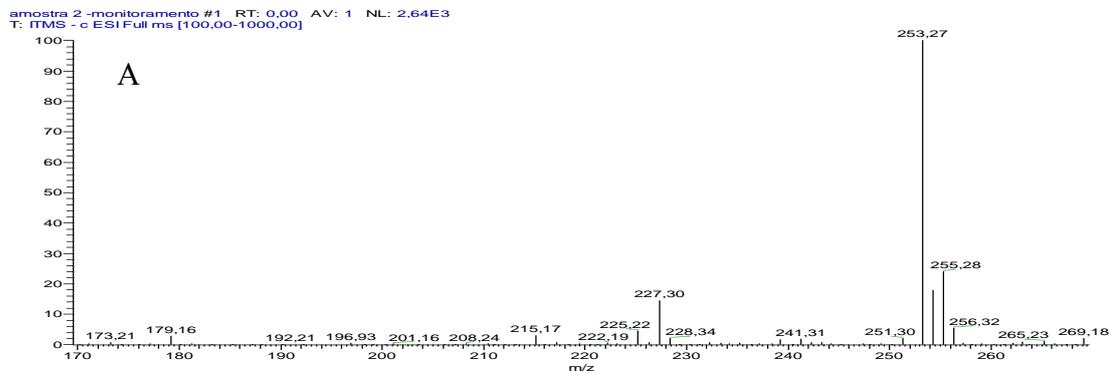
As análises por espectrometria de massas foram realizadas no laboratório de espectrometria de massas da Central Analítica da Universidade Federal do Amazonas, por intermédio de cooperação como os professores Maria Lúcia Belém Pinheiro e Afonso Duarte Leão de Souza e com o auxílio do doutorando Felipe Moura Araújo da Silva.

No ensaio foram obtidos perfis de espectros de massas por ESI-MS e APCI-MS nos modos positivo e negativo dos extratos das anteras, flores e mel. Os perfis obtidos foram comparados e selecionados íons que estavam presentes em ambos os espectros das amostras. Após análise e seleção dos íons de interesse, as soluções foram novamente injetadas para obtenção da respectiva fragmentação (MS/MS).

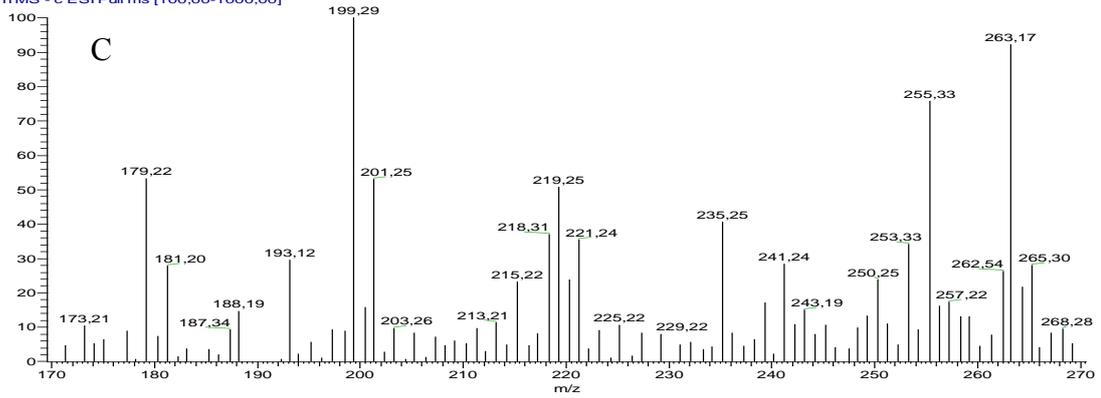
Após análise dos espectros, foi possível verificar que tanto no ESI quanto no APCI o modo negativo apresentou uma melhor caracterização das amostras; e para melhor visualização dos espectros de massas foram selecionadas e ampliadas às faixas de interesse. Por apresentarem um perfil muito similar, foram abordados apenas os espectros de massas das análises por ESI-MS no modo negativo.

As análises dos extratos da flor e do mel por ESI/MS demonstraram similaridade conforme figura 17.

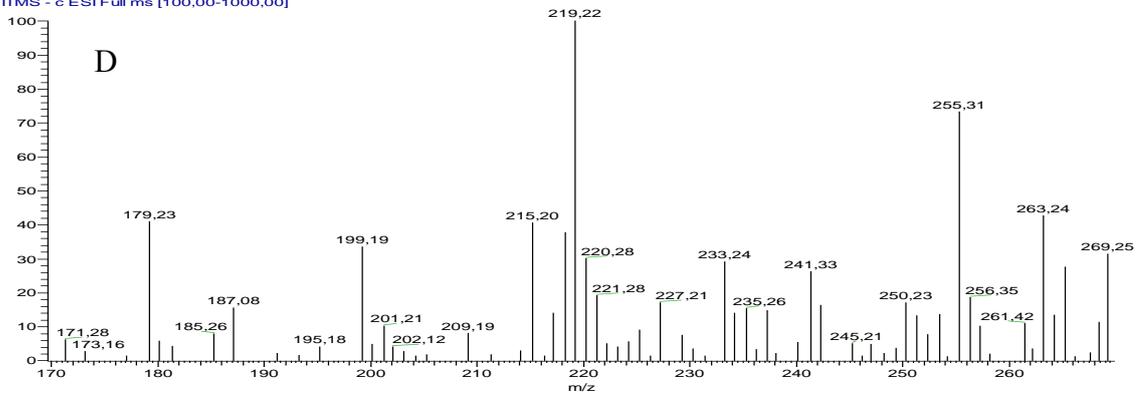
Figura 17 - Espectros de massas por ESI/MS no modo negativo do extrato da antera das flores (A); extrato das flores sem antera (B); extrato do mel por XAD-2 (C); extrato do mel por C18 (D), extrato líquido-líquido (E) e do mel liofilizado (F).



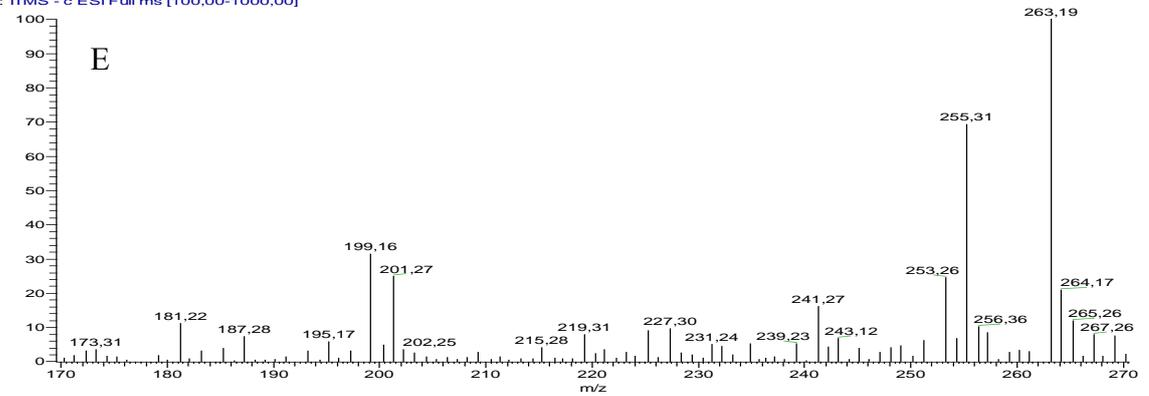
amostra 4-monitoramento #1 RT: 0,00 AV: 1 NL: 1,43E2  
T: ITMS - c ESI Full ms [100,00-1000,00]



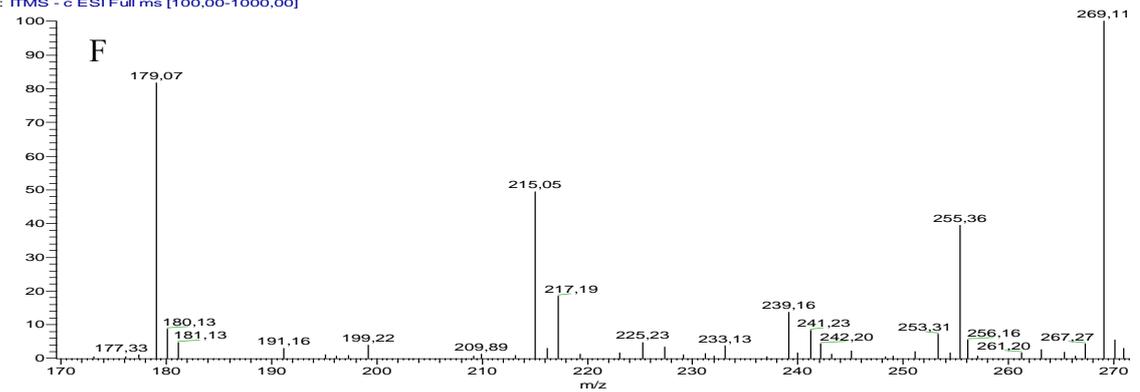
amostra 5-monitoramento #1 RT: 0,00 AV: 1 NL: 7,44E1  
T: ITMS - c ESI Full ms [100,00-1000,00]



amostra 6-monitoramento\_121121125618 #129 RT: 2,09 AV: 1 NL: 7,30E2  
T: ITMS - c ESI Full ms [100,00-1000,00]



amostra 8-monitoramento\_121121125618 #1 RT: 0,00 AV: 1 NL: 1,75E2  
T: ITMS - c ESI Full ms [100,00-1000,00]

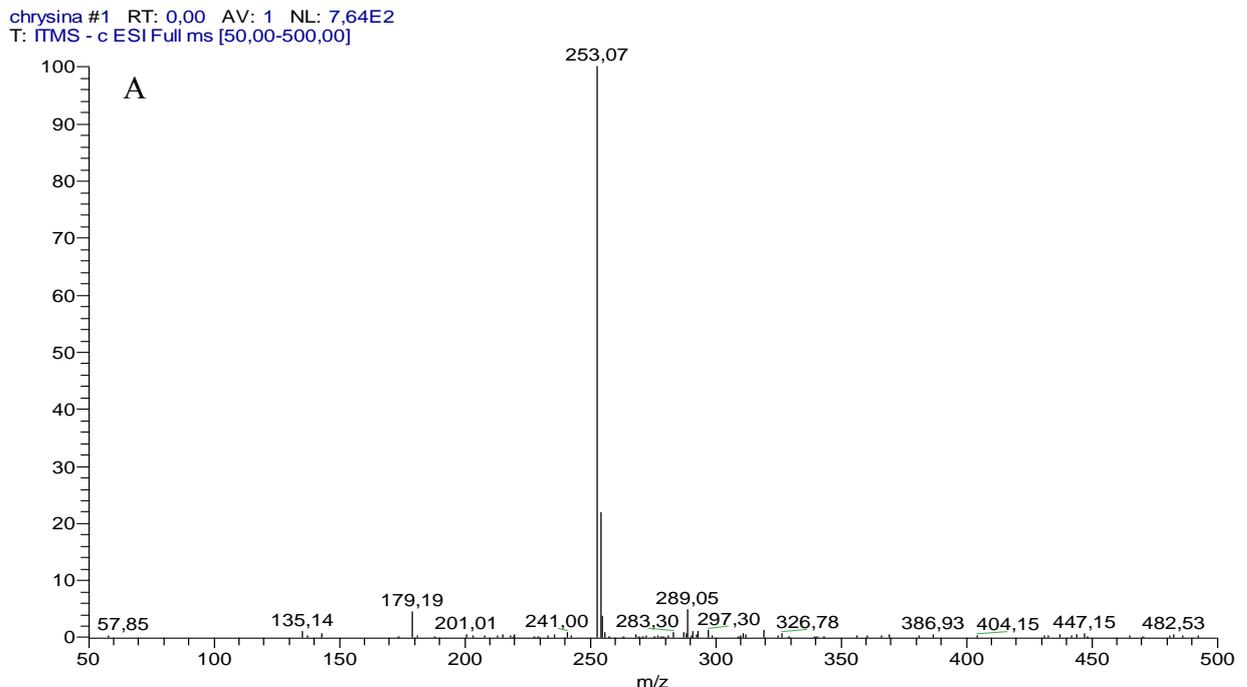


Observando-se a faixa dos espectros de massas compreendida entre  $m/z$  170 e  $m/z$  270, percebe-se a existência de íons semelhantes entre os extratos da antera da flor, extrato da flor sem antera e dos diferentes extratos de mel. Os íons  $m/z$  179,  $m/z$  253,  $m/z$  255 e  $m/z$  269, por exemplo, estão presentes em vários extratos, com diferentes intensidades. Estes compostos estão relacionados ao ácido cafeico, que apresenta  $m/z$  179, a crisina com  $m/z$  253, a pinocembrina com  $m/z$  255 e a com apigenina  $m/z$  269. Contudo, para confirmar esta semelhança de massa carga comparou-se a fragmentação destes íons com a fragmentação de seus respectivos padrões.

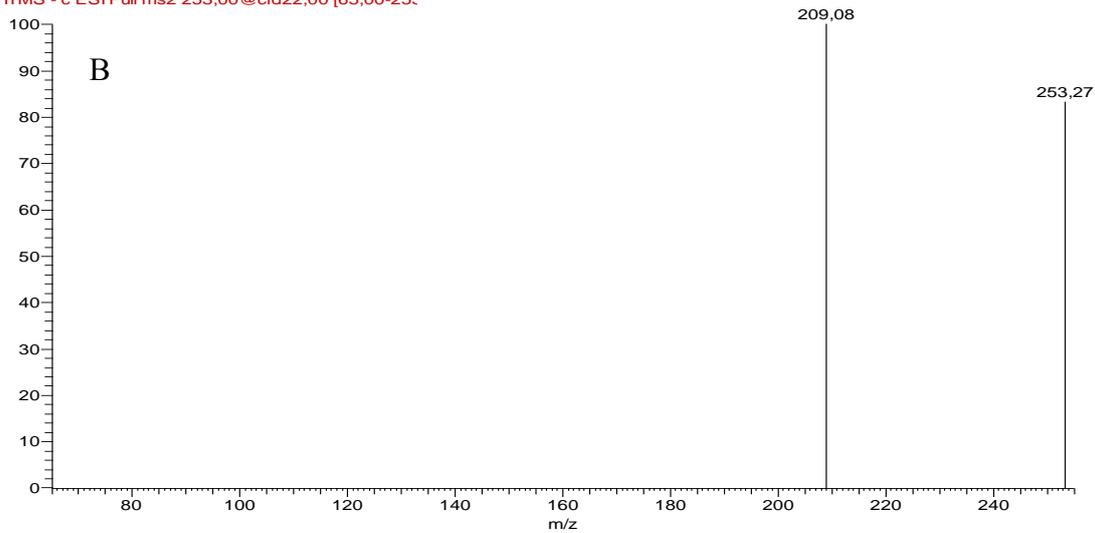
Portanto, os padrões de ácido cafeico, crisina, pinocembrina e apigenina foram utilizados para comparação dos compostos referentes aos íons  $m/z$  179, 253, 255 e 269 presentes nos extratos do mel, da antera da flor e da flor sem antera, respectivamente.

Assim, na figura 18 observa-se a comparação entre o padrão crisina (A) e sua respectiva fragmentação (B), em comparação com a fragmentação do íon 253 do extrato líquido-líquido de mel.

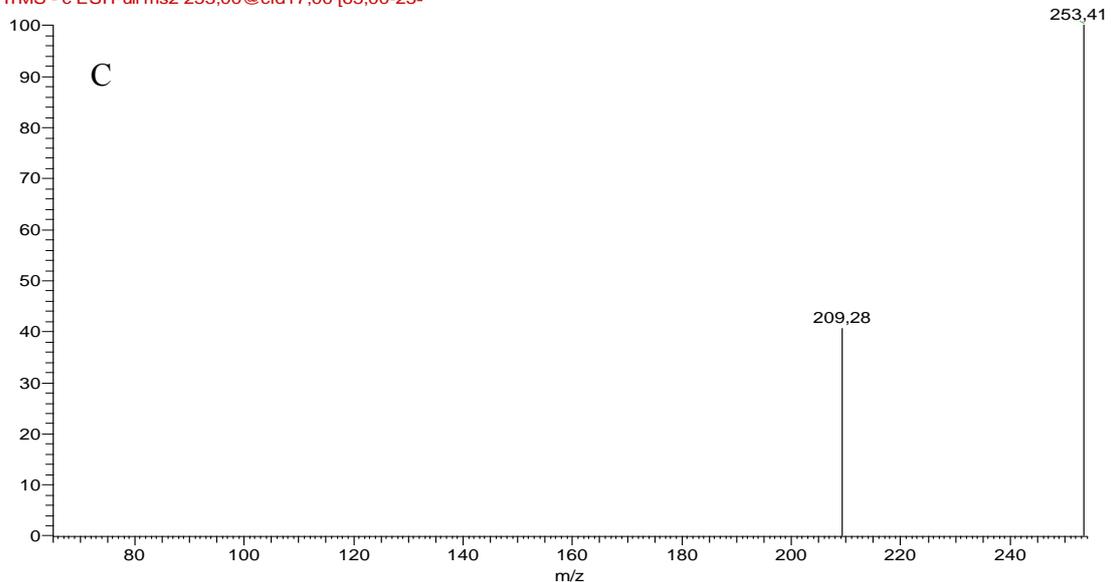
Figura 18 – Espectro de massas do padrão de crisina (A), fragmentação do íon 253 do padrão (B) e fragmentação do íon 253 presente na amostra 6, referente ao extrato líquido-líquido de mel (C).



chrysin #76 RT: 0,99 AV: 1 NL: 2,36  
F: ITMS - c.ESI Full ms2 253,00@cid22,00 [65,00-253]



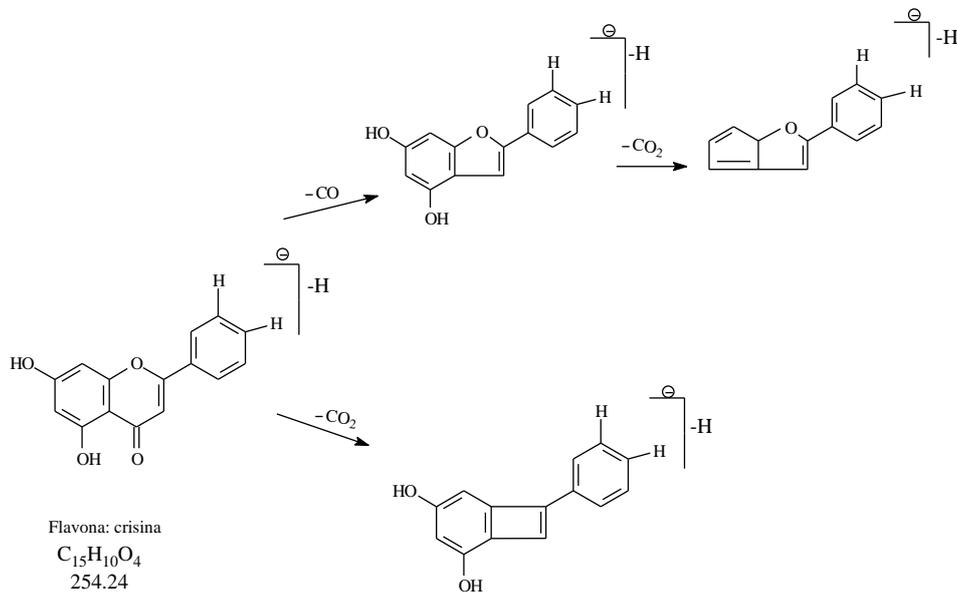
amostra 6-monitoramento\_121121125618 #230 RT: 3,48 AV: 1 NL: 8,09  
F: ITMS - c.ESI Full ms2 253,00@cid17,00 [65,00-253]



Fabre et al. (2001) determinaram a fragmentação de agliconas de flavonoides utilizando-se da cromatografia líquida de alta eficiência e da espectrometria de massas. As análises foram realizadas no modo negativo de ionização por terem apresentado resultados mais eficientes. Assim, os autores apresentaram o íon molecular de 15 agliconas flavonoides das classes de flavonas, flavonóis e flavanonas, apresentando uma proposta de fragmentação e abundância relativa.

Com base na proposta de fragmentação da flavona luteolina sugerida por Fabre et al. (2001), foi possível elaborar uma proposta para a crisina, por também pertencer ao grupo das flavonas (figura 19).

Figura 19 - Proposta de fragmentação do íon 253:



De acordo com a proposta de fragmentação apresentada por Fabre et al., (2001), pode-se verificar que na rota de fragmentação com eliminação de  $CO_2$ , pode-se formar o íon  $m/z$  209, que pode ser detectado na fragmentação da crisina (padrão) e na amostra 6 (extrato líquido-líquido de mel). Os demais fragmentos ( $m/z$  181 e 165) também puderam ser observados, contudo, por não se tratar de um composto isolado os espectros estavam bastante contaminados com outros íons fragmentos.

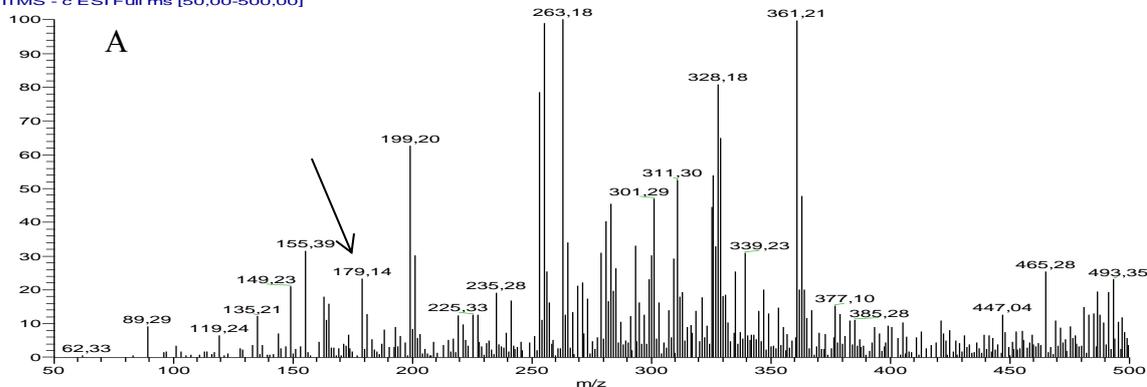
Em relação a sua presença no extrato das anteras e do mel, pode-se supor que o pólen da planta presente no mel pode ser extraído e assim estar presente nas duas amostras.

Analisando-se o espectro de massas do extrato por XAD-2 do mel, foi possível verificar a presença do íon 179, característico do ácido cafeico. Assim, para a comparação do espectro de massas analisado nas mesmas condições, foi possível certificar-se da presença deste composto no mel amargo.

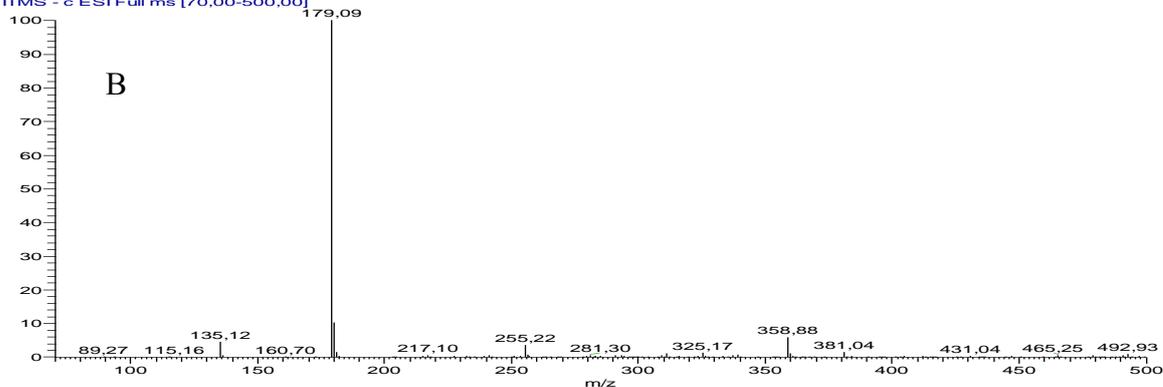
Abaixo, pode-se observar os espectros (MS) do padrão de ácido cafeico, do extrato de mel (XAD-2), bem como os fragmentos (MS/MS) característicos para o ácido cafeico apresentados no padrão e na amostra (figura 20).

Figura 20 - Espectro de massas do extrato de mel por XAD-2 (A); Espectro de massas do padrão de ácido cafeico (B); Fragmentação (MS/MS) do padrão de ácido cafeico (C) e Fragmentação do íon  $m/z$  179 do extrato XAD-2 (D).

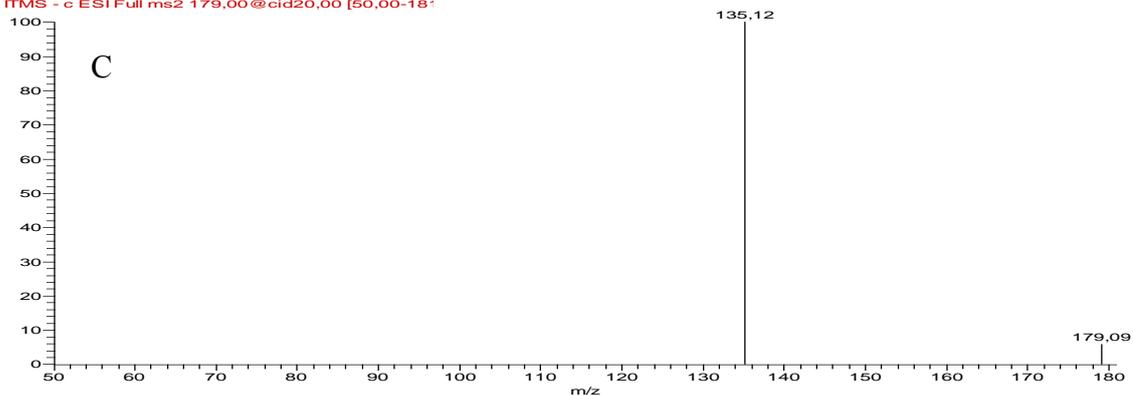
xad(1) #1 RT: 0,00 AV: 1 NL: 5,92E2  
T: ITMS - c ESI Full ms [50,00-500,00]



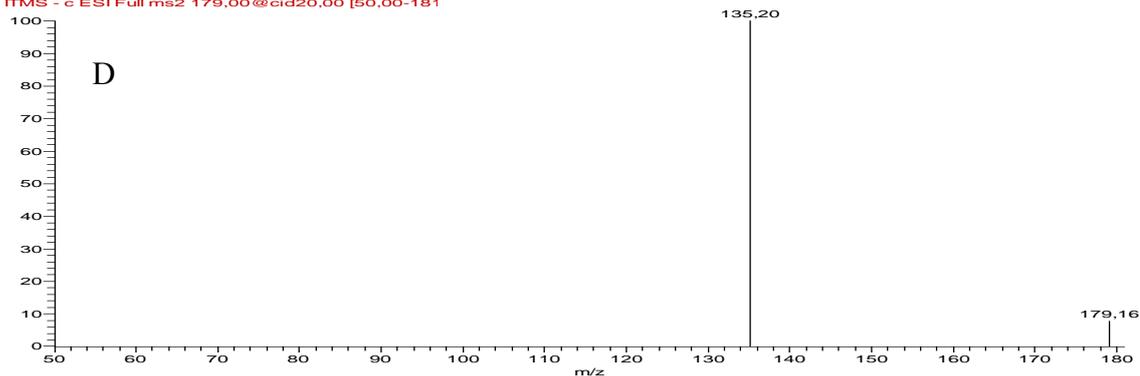
Ac cafei. #1 RT: 0,00 AV: 1 NL: 1,77E3  
T: ITMS - c ESI Full ms [70,00-500,00]



Ac cafei. #36 RT: 0,41 AV: 1 NL: 4,56E2  
F: ITMS - c ESI Full ms2 179,00@cid20,00 [50,00-181]

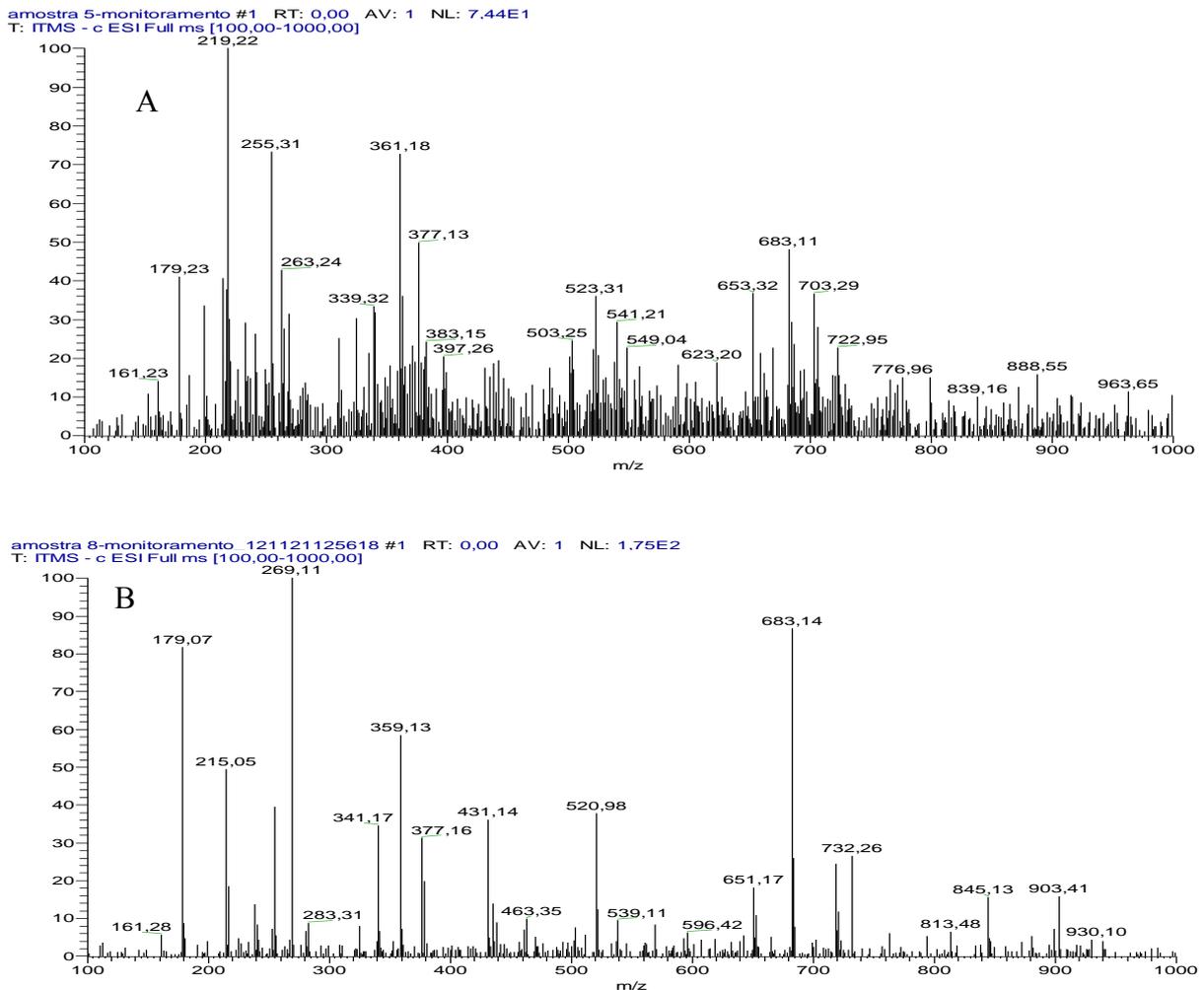


xad #142 RT: 1,14 AV: 1 NL: 1,95E1  
F: ITMS - c ESI Full ms2 179,00@cid20,00 [50,00-181]



Na figura 21 também é possível observar a presença do íon 179 nos extratos de mel por C18 (amostra 5) e no extrato liofilizado (amostra 8).

Figura 21 – Espectro de massas do íon 179 presente nos extratos de mel por C18 (A) e no mel liofilizado (B).



Tendo em vista a realização das análises dos padrões de pinocembrina e apigenina em condições analíticas diferentes das análises dos extratos, não foi possível avaliar os resultados frente à comparação da fragmentação dos padrões com os fragmentos dos íons  $m/z$  255 e  $m/z$  269, presentes nos extratos. Apesar destes obstáculos, os íons  $m/z$  255 e  $m/z$  269 podem ser caracterizados como marcadores da origem botânica do mel.

Nas análises por espectrometria de massas por ESI/MS e comparação com padrões autênticos, foi possível verificar a presença dos constituintes crisina e ácido cafeico no mel

amargo. Contudo, com os dados disponíveis, não foi possível confirmar a origem botânica do mel.

Esta técnica já foi utilizada para a caracterização da origem botânica da própolis. Em análises da composição química da própolis, por ESI-MS/MS, Alexandra Sawaya (2006) identificou mediante comparação com padrões e espectros presentes na literatura, dentre vários compostos analisados por meio de inserção direta, os íons  $[M-H]^-$  do ácido *p*-cumárico ( $m/z$  163), com os fragmentos  $m/z$  163, 119 e 93, a crisina ( $m/z$  253) com os fragmentos  $m/z$  209, 143 e 119 e a pinocembrina ( $m/z$  255) que apresentou como fragmentos os íons  $m/z$  227, 213, 185, 171, 151, 145 e 107.

McNab et al. (2009) apresentaram resultados de análises por ESI-MS de diversos flavonoides e citam, dentre outros flavonoides, a crisina, identificada pelo íon  $[M-H]^-$   $m/z$  253 e seus respectivos fragmentos  $m/z$  209, 185, 181, 211, 210, 225, 165 e 151. Em estudo realizado com extratos da própolis por ESI(-)-MS para determinar, além de outros, sua composição química, Buriol et al. (2009) sugeriram por meio da comparação com padrões, a identidade de alguns íons observados, como a presença de canferida ( $m/z$  299), do ácido *p*-cumárico ( $m/z$  163), do ácido cafeico ( $m/z$  179) e do ácido 3-prenil-4-diidrocinnamoxi-cinâmico ( $m/z$  363). Kassim (2010), analisando a atividade anti-inflamatória de méis com o uso de espectrometria de massas e cromatografia líquida de alta eficiência, quantificou e identificou vários compostos fenólicos, como o ácido elágico ( $m/z$  303), o ferrulico ( $m/z$  175) e ainda, a crisina ( $m/z$  253), quercetina ( $m/z$  301) e camferide ( $m/z$  298).

Bertoncelj et al. (2011) identificaram através da cromatografia líquida de alta eficiência associada a espectrometria de massas, os íons  $[M-H]^-$  dos flavonoides miricetina ( $m/z$  317), luteolina ( $m/z$  285), quercetina ( $m/z$  301), naringenina ( $m/z$  271), apigenina ( $m/z$  269), camferol ( $m/z$  285), pinocembrina ( $m/z$  255), crisina ( $m/z$  253) e galangina ( $m/z$  269) em amostras de mel esloveno, com base em padrões de referência.

Tenore et al. (2012) apresentaram em artigo recente, o MS/MS do ácido gálico ( $m/z$  169), composto pelos fragmentos  $m/z$  125, 81 e 79, do ácido cafeico ( $m/z$  179) com o íon  $m/z$  125, o ácido *p*-cumárico ( $m/z$  163) composto pelos íons  $m/z$  119 e 93, a crisina ( $m/z$  253) com os fragmentos  $m/z$  151, 177 e 77 e a pinocembrina ( $m/z$  255), que apresentou os fragmentos  $m/z$  179, 151 e 77.

Dos flavonoides citados, pode-se observar uma semelhança na fragmentação do íon  $m/z$  253, obtendo-se os fragmentos  $m/z$  225, 209, 181, 165 e 143 apresentada pelos autores e a fragmentação obtida na análise dos extratos do mel e das flores, neste trabalho. Podendo-se observar os íons  $m/z$  225, 209 e 165 na fragmentação obtida com os extratos identificados por

amostras 2, 3, 4 e 6 referentes aos extratos etanólico da antera das flores, extrato etanólico das flores, extrato metanólico por XAD-2 e o extrato líquido-líquido por diclorometano.

Buscando-se uma melhor caracterização da origem botânica do mel, foram realizadas análises por cromatografia à gás acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), cujos resultados das análises estão dispostas a seguir.

#### 4.4 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA A GÁS ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM)

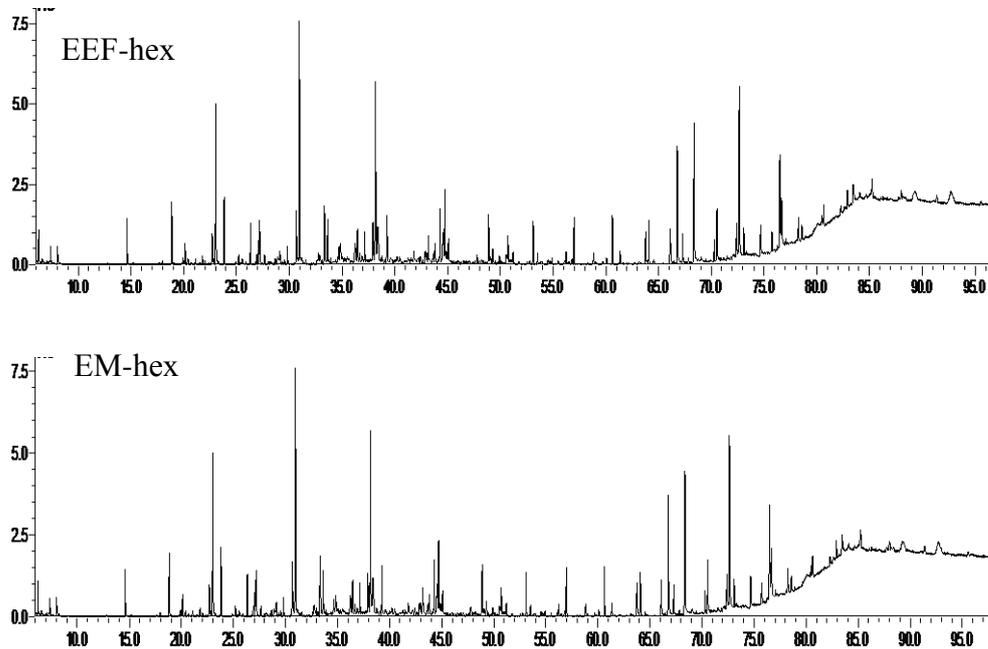
As análises por CG-EM foram realizadas com as frações do extrato de mel (XAD-2), com as frações do extrato das flores sem antera e com o extrato da antera das flores (rico em pólen). E para a comparação entre a constituição dos extratos, principal objetivo deste estudo, procedeu-se inicialmente a observação dos cromatogramas, seguido das análises dos tempos de retenção (T.R.), índice de retenção (I.R) e similaridade dos espectros de massas entre os extratos do mel, das flores e das anteras das flores.

Os espectros de massas dos extratos foram comparados com padrões, com os espectros de massas da biblioteca computacional Wiley 275, com os espectros da literatura (ADAMS, 2001), com artigos diversos e por meio do índice de retenção calculado com base no padrão de *n*-alcanos (VAN DEN DOOL; KRATZ, 1963).

##### 4.4.1 Comparação entre os extratos hexânicos das flores e do mel

Observando os cromatogramas do extrato das flores (EEF-hex) e do extrato de mel (EM-hex) a seguir, pode-se perceber uma forte semelhança entre eles (figura 22). Contudo, uma investigação dos constituintes com base na comparação dos tempos de retenção, espectros de massas e índices de retenção são fundamentais para o fortalecimento das análises.

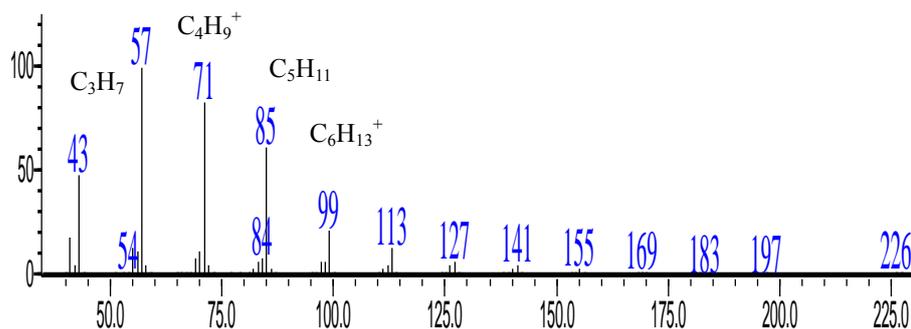
Figura 22 – Cromatogramas de íons totais dos extratos das flores (EEF-hex) e do mel (EM-hex).



Nesse sentido, uma investigação detalhada dos espectros de massas permitiu verificar a presença de uma série de compostos com índices e tempos de retenção semelhantes nos dois extratos. Estes foram identificados com base nos espectros de massas da literatura Adams (2001) e por meio da comparação com os tempos de retenção do padrão de *n*-alcanos (C7 a C30).

Vários picos apresentaram espectros de massas com o mesmo perfil. O espectro de massas da figura 23 apresenta este perfil correspondente a hidrocarbonetos saturados, que são caracterizados por apresentarem fragmentos com diferença de 14 unidades de massa ( $\text{CH}_2$ ). O maior pico do aglomerado relacionado ao fragmento  $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}$ , seguido dos fragmentos  $\text{C}_n\text{H}_{2n}$  e  $\text{C}_n\text{H}_{2n-1}$  (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007).

Figura 23 - Espectro de massas do hexadecano e fragmentos majoritários.



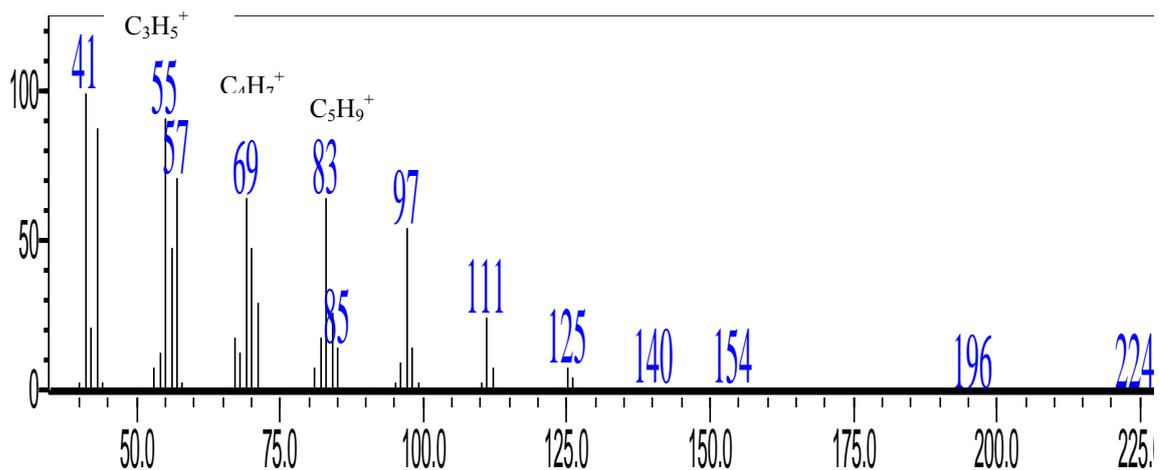
O hexadecano apresenta massa molecular de 226 Da e um padrão de fragmentação com 14 unidades de massa entre cada íon. Assim, os íons majoritários  $C_6H_{13}^+$  ( $m/z$  85),  $C_5H_{11}^+$  ( $m/z$  71),  $C_4H_9^+$  ( $m/z$  57) e  $C_3H_7^+$  ( $m/z$  43) representam os carbocátions mais estáveis e caracterizam o padrão de fragmentação previsível para hidrocarbonetos alifáticos saturados.

Dessa forma, com base na análise do padrão de hidrocarbonetos, foi possível comparar os tempos de retenção do padrão de *n*-alcanos, com o tempo de retenção dos hidrocarbonetos presentes nos extratos analisados nas mesmas condições cromatográficas e a comparação dos espectros de massas permitiu a identificação de uma série de *n*-alcanos.

Reportando-se à rota biosintética, os hidrocarbonetos são elaborados a partir de ácidos graxos. Ácidos saturados como o palmítico e insaturados como o oleico são oriundos da rota biosintética do acetato e apresentam um número par de carbonos. A partir da descarboxilação dos ácidos graxos saturados, são constituídos os hidrocarbonetos saturados e dos ácidos insaturados são produzidos os hidrocarbonetos insaturados (SAMUELS; KUNST, 2003, FLACH, 2005).

Outros compostos apresentaram padrão de fragmentação no espectro de massas consistente com hidrocarbonetos insaturados, observando-se uma diferenciação com duas unidades de massas a menos que o *n*-alcano (figura 24).

Figura 24 - Espectro de massas do hexadeceno e fragmentos majoritários.



A sequência de fragmentação com picos afastados por 14 unidades de massa, forma um aglomerado onde o maior pico corresponde ao  $C_nH_{2n-1}$  característicos de alcenos, sendo os carbocátions majoritários formados por  $C_5H_9^+$  ( $m/z$  69), o  $C_4H_7^+$  ( $m/z$  55) e o  $C_3H_5^+$  ( $m/z$  41).

A presença do íon  $m/z$  41, característico de um cátion alila (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007) é indicativo da presença da dupla na posição terminal. No entanto, não é possível caracterizar a posição da dupla com uma simples análise dos espectros, sendo necessário para tal a realização de uma derivatização.

Na tabela 7 podemos verificar a composição do mel amargo e das flores como uma forma de identificar a origem botânica do mel analisado. Observa-se que uma série de alcanos que estão presentes no mel e no extrato das flores constituem evidências da origem botânica do mel.

Tabela 7 – Constituintes identificados nos extratos das flores e do mel amargo.

	TR*		IR <sub>C</sub> *		IR <sub>L</sub> *	%		Composto
	Mel	Flor	Mel	Flor		Mel	Flor	
1.	14,648	14,611	1201	1200	1200	1,31	1,71	dodecano <sup>a, b</sup>
2.	18,868	18,833	1301	1301	1300	2,56	2,47	tridecano <sup>a, b</sup>
3.	22,724	22,695	1393	1393	_____	1,01	1,06	tetradeceno
4.	23,055	23,018	1401	1400	1400	5,89	6,7	tetradecano <sup>a, b</sup>
5.	-----	23,814	-----	1420	1419	-----	2,87	trans-β-cariofileno
6.	-----	26,318	-----	1481	1485	-----	1,8	germacreno D
7.	27,104	27,067	1500	1499	1500	1,25	0,93	pentadecano <sup>a, b</sup>
8.	30,691	30,656	1593	1592	1590	2,46	1,98	hexadeceno <sup>a, b *</sup>
9.	30,978	30,942	1600	1599	1600	7,62	11,2	hexadecano <sup>a, b</sup>
10.	33,354	33,324	1664	1663	_____	3,35	2,44	NI
11.	36,502	36,468	1752	1751	_____	1,02	1,3	NI
12.	37,181	37,146	1772	1771	_____	1,01	1,02	NI
13.	37,954	37,919	1795	1794	1790	1,75	1,43	octadeceno <sup>a, b *</sup>
14.	38,193	38,159	1802	1801	1800	3,94	7,27	octadecano <sup>a, b</sup>
15.	42,436	-----	1929	1927	1922	0,64	-----	hexadecanoato de metila <sup>a</sup>
16.	43,202	43,172	1953	1953	_____	0,54	0,72	NI
17.	44,755	44,721	2002	2001	2000	1,31	2,91	eicosano <sup>a, b</sup>
18.	50,755	50,723	2201	2200	2200	1,49	0,74	docosano <sup>a, b</sup>
19.	56,275	-----	2400	-----	2400	0,46	-----	tetracosano <sup>a</sup>
20.	60,623	60,643	2570	2571	_____	1,93	1,98	NI
21.	63,799	63,765	2700	2699	2700	2,06	1,04	heptacosano <sup>a, b</sup>
22.	66,132	66,096	2800	2799	2800	2,11	1,33	octacosano <sup>a, b</sup>
23.	66,802	66,766	2829	2828	_____	6,46	4,86	NI

Continua

24.	67,308	67,281	2852	2851	---	0,30	1,04	óleo de silicone <sup>d</sup>
25.	68,387	68,351	2899	2898	2900	3,68	6,76	nonacosano <sup>b</sup>
26.	70,564	70,525	3000	2998	3000	2,35	2,15	triacontano <sup>c</sup>
27.	72,675	72,642	3097	3095	3100	2,91	8,07	hentriaontano <sup>c</sup>
28.	74,717	74,683	3190	3189	3200	1,23	1,09	dotriacontano <sup>c</sup>
29.	76,700	76,492	3282	3272	3300	1,23	4,75	tritriacontano <sup>c</sup>

TR\* = tempo de retenção.

IR<sub>c</sub>\* = índice de retenção calculado

IR<sub>l</sub>\* = índice de retenção da literatura.

a = identificação por IR e ADAMS.

b = identificação por padrão de hidrocarbonetos.

c = identificação com base no índice de Kováts.

d = contaminação

----- não detectado

NI = não identificado

--- = não disponível

Fonte: autor

Na análise dos compostos, também foi verificada uma série de *n*-alcenos apresentando tempos de retenção semelhantes, presentes nos extratos do mel e nas flores. Contudo, para determinação da posição da instauração e certificação de que se tratam dos mesmos compostos foi realizada a determinação da posição das duplas ligações com base na derivatização com dimetildissulfeto e as análises estão dispostas a seguir.

#### 4.4.2 Determinação da posição das duplas em alceno por derivatização com dimetildissulfeto (DMDS)

Para a determinação da posição da dupla ligação, existem diversos métodos descritos na literatura: transformação em diol, mercuração, ozonólise, divisão oxidativa, metiltiolção, epoxidação e adição de tetracianoetileno. Dentre os diversos métodos, a metiltiolção é uma das reações aplicadas na determinação de duplas, pois cada composto com duplas ligações dará origem a apenas um único produto e com bom rendimento o que possibilita reação com misturas e pequenas quantidades de amostra. O produto possui ainda uma fragmentação bem característica em espectrometria de massas (ATTYGALLE, 1998, FLACH, 2005, PIANARO, 2007)

A reação de derivatização com dimetilssulfeto (DMDS) em iodo ocorre com a inserção de grupos  $-SCH_3$  nos carbonos da dupla ligação, onde o iodo atua como um agente catalisador. Os produtos formados quando analisados por EM por impacto eletrônico apresentam um perfil de fragmentação bastante característico, pois os íons resultantes da clivagem na ligação entre os carbonos onde os grupos  $-SCH_3$  foram inseridos, formam dois fragmentos de alta intensidade, cujo somatório corresponde ao íon molecular  $[M]^+$  permitindo determinar a posição da dupla ligação.

O procedimento para determinação da posição da dupla ligação em alcenos lineares foi descrito em 1981 por Francis e Veland. No mesmo ano Francis analisou ésteres e determinou a posição da instauração com base na derivatização com dimetildissulfeto (DMDS) e acrescentou que a técnica é simples e pode ser aplicada a compostos de baixa polaridade.

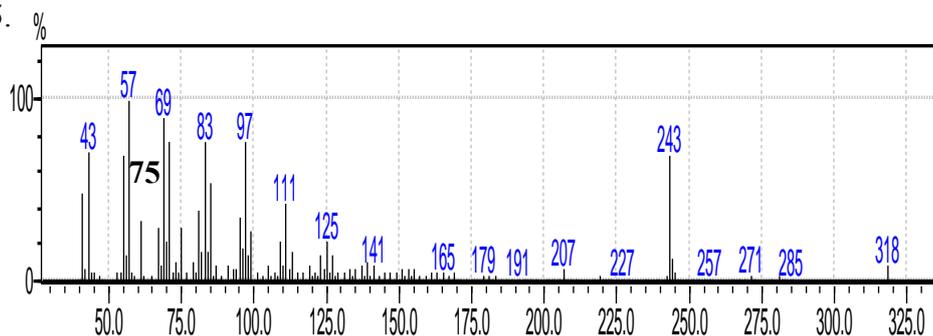
Portanto, com base na observação do espectro os autores citaram a fragmentação característica da porção referente ao hidrocarboneto, acrescida do íon  $m/z$  61, o que identifica a estrutura  $CH_3S-$  e a presença de um íon de grande intensidade correspondente ao composto derivatizado e clivado na posição da dupla ligação.

A derivatização com dimetildissulfeto tem sido bastante utilizada pelo grupo de pesquisa da Doutora Anita Jocelyne Marsaioli, da Universidade Estadual de Campinas – São Paulo. Nesse sentido, pode-se citar: Flach (2005), Pianaro (2007) e Pomini (2009). Assim, apesar de existirem diversas metodologias para reação de derivatização, a reação de dimetildissulfeto em iodo apresenta-se satisfatória para determinar a posição da dupla ligação. (BUSER, 1983, FLACH, 2005).

Dessa forma, utilizou-se da reação de derivatização com dimetildissulfeto (DMDS) e iodo, para determinação da posição da dupla dos alcenos.

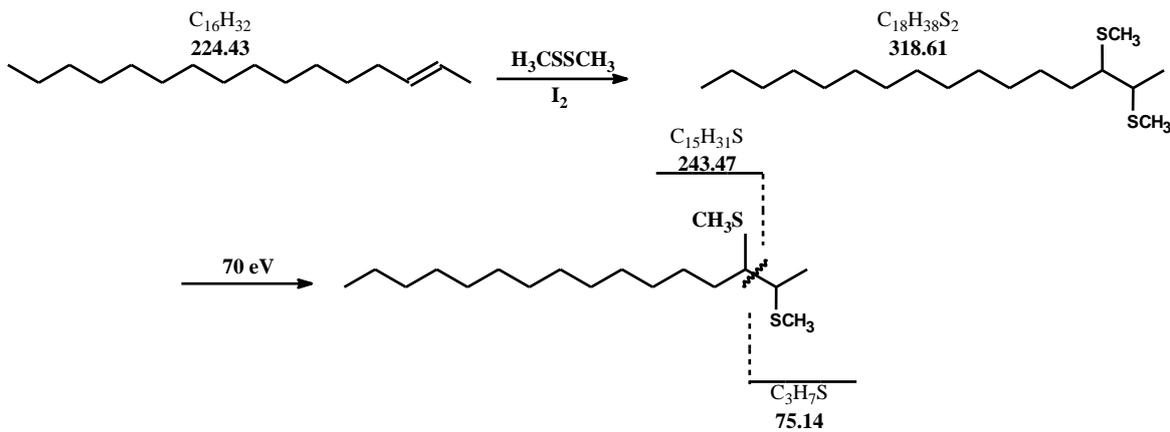
Para o hexadeceno obteve-se dois derivados com íon molecular  $m/z$  318 apresentados nas figuras 25 e 26. Na figura 25 pode-se observar o espectro de massas do hexadeceno com dupla ligação na posição 2.

Figura 25 - Espectro de massas do hexadeceno derivatizado apresentando íons estáveis  $m/z$  243 e 75.



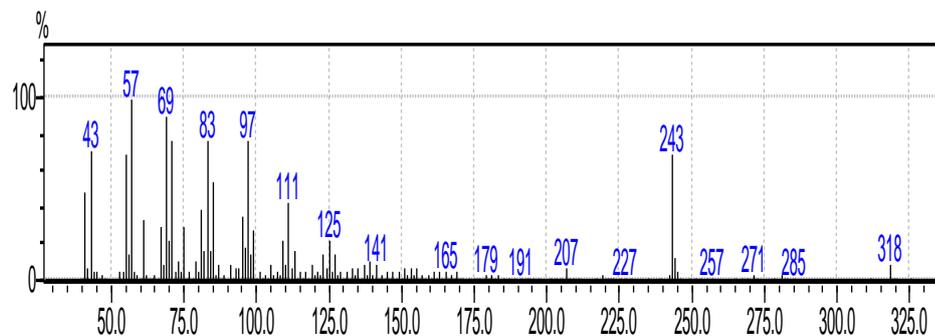
O espectro de massas do composto de  $m/z$  318 eluído em 54,397 minutos, com fragmentos principais de  $m/z$  243 e  $m/z$  75, em menor proporção, apresentou uma fragmentação característica de alcenos com dupla ligação localizada na posição 2, e caracteriza o hexadec-2-eno, como pode ser observado no mecanismo de fragmentação representado na figura 26 .

Figura 26 – Mecanismo de fragmentação do hexadeceno, apresentando instauração na posição 2.



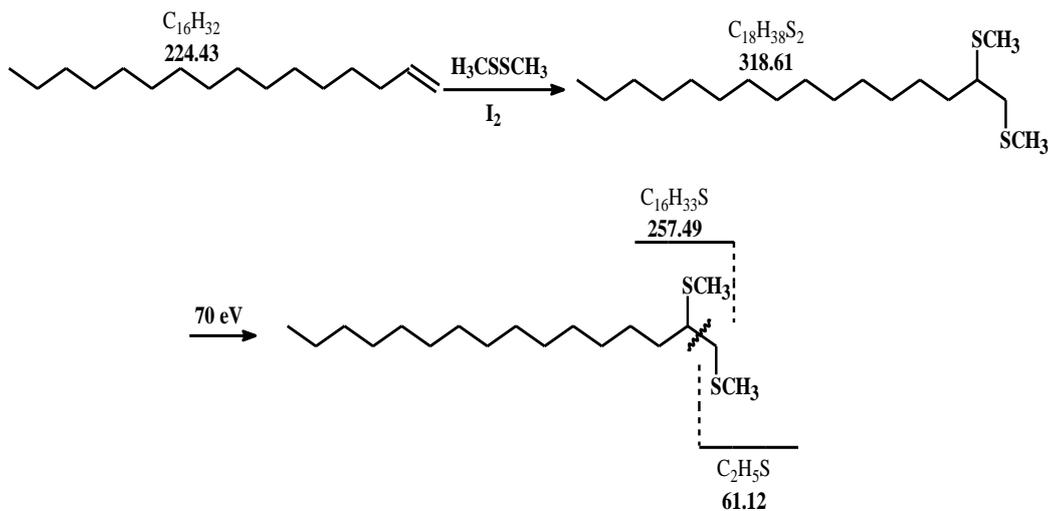
Outro espectro de massas de massa molecular 318 foi detectado e pode-se verificar uma fragmentação com íons majoritários  $m/z$  257 e 61, como pode ser observado no espectro de massas apresentado na figura 27.

Figura 27 - Espectro de massas de hexadeceno derivatizado apresentando íons estáveis  $m/z$  257 e 61.



O espectro de massas de íon molecular  $m/z$  318 eluído com um tempo de retenção 55,82 minutos caracteriza o composto  $C_{16}H_{32}$ , com dupla ligação na posição 1, como observado no mecanismo de fragmentação apresentado na figura 28.

Figura 28 – Mecanismo de fragmentação do hexadeceno apresentando insaturação na posição 1.



O mesmo procedimento também foi realizado para os demais compostos insaturados e os respectivos mecanismos estão dispostos nos anexos. Diante das análises dos espectros de massas dos extratos derivatizados com DMDS, foi possível identificar os alcenos representados na tabela 8.

Com base na identificação da posição da dupla, observou-se que os alcenos hexadec-1-eno, octadec-1-eno, eicos-1-eno e tetracos-1-eno apresentaram um mesmo padrão de fragmentação e estão presentes tanto no extrato do mel, quanto no extrato das flores analisadas. É importante acrescentar que todos os alcenos identificados no mel apresentaram insaturação na posição 1. Já nas flores observou-se a presença de dupla ligação nas posições 1 e 2.

Outra peculiaridade observada nos extratos das flores foi a presença de dois compostos com a insaturação nas posições 1 e 2. Este fator não foi verificado na análise do mel, onde os alcenos com dupla na posição 2 podem ter sido transformados em outros compostos por ação enzimática.

Tabela 8 – Posição da dupla de alcenos derivatizados dos extratos de mel e flor, frente à fração hexânica.

Fórmula molecular	Massa molecular do alceno	Íons característicos ( $m/z$ )	Extrato	Composto
C <sub>15</sub> H <sub>40</sub>	210	243 e 61	Flor	Pentadec-1-eno
C <sub>16</sub> H <sub>32</sub>	224	257 e 61	Flor e mel	Hexadec-1-eno
	224	243 e 75	Flor	Hexadec-2-eno
C <sub>17</sub> H <sub>34</sub>	238	271 e 61	Mel	Heptadec-1-eno
C <sub>18</sub> H <sub>36</sub>	252	285 e 61	Flor e mel	Octadec-1-eno
	252	271 e 75	Flor	Octadec-2-eno
C <sub>20</sub> H <sub>40</sub>	280	313 e 61	Flor e mel	Eicos-1-eno
C <sub>22</sub> H <sub>44</sub>	308	341 e 61	Mel	Docos-1-eno
C <sub>24</sub> H <sub>48</sub>	336	369 e 61	Flor e mel	Tetracos-1-eno

De acordo com os dados apresentados, foi possível verificar que o mel amargo proveniente do município do Cantá apresenta uma composição bastante semelhante à composição das flores analisadas, esta forte semelhança química juntamente com a análise melissopalínológica indica que este mel é proveniente de *Vochysia* sp.

Ante as disposições acima apresentadas é importante acrescentar, que esta pesquisa foi pioneira na identificação e comparação dos constituintes das flores de *Vochysia* sp. e dos constituintes presentes no mel amargo, elaborado eventualmente pelas abelhas *Apis* do município do Cantá.

Na caracterização de mel de eucalipto, por exemplo, se atribui ao mesmo a presença do hotrienol, apesar deste constituinte estar presente nos voláteis da maioria dos méis, tendo sido identificado inclusive em mel silvestre de Roraima (PONTIS, 2011). Em relação a méis amargos, a literatura relata a presença de alcaloides em méis de senécio cujos constituintes característicos da planta foram identificados por CLAE/EM (CREWS, 1997).

Em 1998, Silva e Rebouças apresentaram no Boletim do Museu Integrado de Roraima uma análise palínológica de 56 amostras de mel e compararam com o néctar e/ou pólen de 31 plantas do estado de Roraima. Nas análises, os pesquisadores verificaram a presença de pólen de *Protium* sp. e *Vochysia guianensis*, em méis de sabor amargo, sugerindo a provável origem deste tipo de mel em Roraima.

Em 2003 Marque-Souza e Kerr determinaram, por análise melissopalínológica a origem botânica do mel amargo do município do Mucajaí como sendo originário da planta conhecida vernaculamente com “breu” do gênero *Protium* sp. Entretanto, em 2005, Silva determinou utilizando-se da mesma técnica, a origem botânica do mel amargo do município do Cantá como proveniente de *Vochysia guianensis*.

Vochysiaceae foi citada como origem botânica de mel proveniente de Cáceres-MT, no entanto, o trabalho foi resultante apenas de levantamento por questionários aplicados a apicultores não havendo qualquer referência de mel ou qualquer outro dado melissopalínológico ou químico (Silva, 2005).

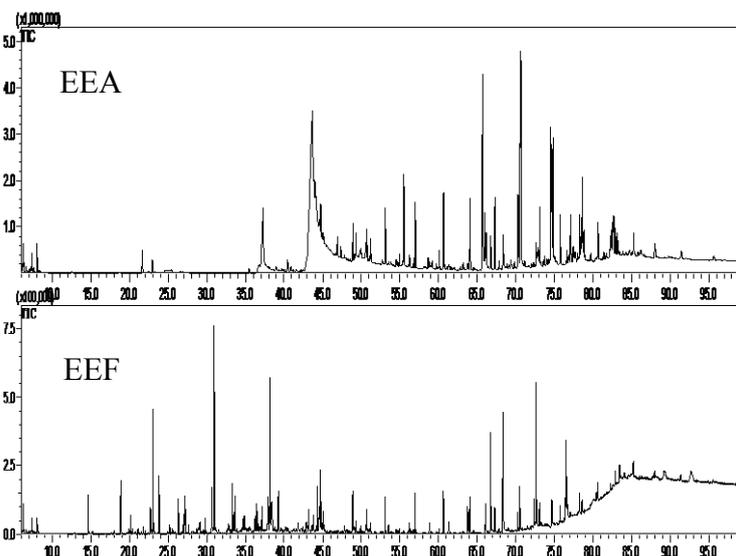
Desta forma este trabalho possui o maior número de evidências da origem do mel amargo do município do Cantá e constitui o primeiro trabalho brasileiro onde se somam os dados químicos e palínológicos para determinar a origem floral de mel.

Para descartar a possibilidades de os constituintes do pólen terem contaminado o mel, realizou-se uma comparação entre os extratos da antera das flores (rico em pólen) e das flores sem antera.

#### 4.4.3 Extrato etanólico das flores

Na análise comparativa dos cromatogramas dos extratos da antera (EEAF) e das flores (EEF) sem antera, pode-se perceber uma diferença significativa no tempo de retenção dos constituintes (figura 29).

Figura 29 – Cromatogramas de íons totais das anteras das flores (EEAF) e das flores sem antera (EEF).



Na antera, os picos de maior intensidade apresentaram tempos de retenção entre 40 e 80 minutos, sendo o majoritário eluído em aproximadamente 70 minutos.

Nas flores sem antera, o tempo de retenção da maioria dos constituintes apresenta-se entre 20 e 45 minutos, apesar da existência de três sinais representativos na região entre 65 e 80 minutos. Contudo, conferindo-se os tempos de retenção entre os cromatogramas, verificou-se, que esses sinais apresentam tempos de retenção distintos.

Em 1997 Oliveira, Prates e Peralba quantificaram e identificaram os *n*-alcanos presentes nas ceras de plantas forrageiras. Sendo identificados alcanos de C20 a C37. Destes, o C29, o C31 e o C33 apresentaram as maiores concentrações com predominância dos compostos de número ímpar de carbonos em relação aos de números pares.

Vogel e Hadacek (2004) analisaram a composição química de diferentes partes das flores de *Nelumbo nucifera* e a classificaram em três grandes grupos de compostos: os hidrocarbonetos alifáticos, os compostos aromáticos e os terpenoides. Sendo os constituintes voláteis das pétalas das flores compostos por uma série de *n*-alcanos (C15-C17), diversos alcenos, alcadienos e alcatrienos em grande proporção e, nas anteras identificaram 1,4-dimetoxibenzeno (94%) e compostos terpênicos (5,4%).

Stafanello et al. (2006) analisaram os compostos voláteis presentes em diversas flores e verificaram que, dentre os hidrocarbonetos de cadeia longa identificados, o tricosano, o pentacosano e o heneicosano foram os mais frequentes. Os pesquisadores mencionaram que os compostos voláteis emitidos pelas flores são um sinal químico para atrair polinizadores e repelir predadores.

Witkowska-Banaszczak (2013), ao analisar os componentes do óleo essencial das flores de *Trollius europaeus*, identificou o ácido hexadecanoico (7,54%), o ácido tetradecanoico (4,24%), o ácido dodecanoico (3,10%) e os hidrocarbonetos eicosano (20,03%) e hexadecano (8,63%), além de outros constituintes em menor proporção.

Nesse estudo, a análise da composição do extrato das flores sem antera revelou a existência de vários hidrocarbonetos alifáticos, em especial *n*-alcanos (como observados na tabela anterior).

Nas anteras foram identificados os compostos octadecen-1-ol e o ácido tetradecanoico, além de diversos constituintes em menor proporção não identificados. Percebe-se, portanto que, a composição do extrato das flores sem antera é distinto da composição das anteras das flores.

#### 4.4.4 Hidrocarbonetos relacionados às abelhas e aos produtos apícolas

Os hidrocarbonetos são bastante citados nas análises de diversos produtos apícolas e nos extratos cuticulares das abelhas. As análises envolvem pesquisas voltadas à organização social das abelhas, à divisão de tarefas, a feromônios associados à comunicação entre os seres vivos e a relação com o ambiente na identificação de parceiros do grupo, entre vários outros fatores.

É importante mencionar que os compostos voláteis do mel podem ser originados por transferência de constituintes voláteis da planta; pela conversão de constituintes da planta pela abelha; na produção de compostos pelas abelhas; pela produção de compostos durante o processamento pós-colheita; e, também, pela ação de microrganismos (MOREIRA; MARIA, 2003).

Tan e colaboradores (1989) identificaram nos méis monoflorais da Nova Zelândia, dentre outros compostos, os hidrocarbonetos (C1 a C33). Destes, os alcanos que apresentaram maior concentração foram o C23, o C25, o C27 e o C29. Os autores acreditam que a presença de hidrocarbonetos de alta massa molecular é devido à existência de cera não eliminada totalmente, no processamento do mel.

Jiménez et al. (2004) analisaram a qualidade de cera de abelha comercial com base no padrão de hidrocarbonetos e de ésteres e relataram que a constituição de hidrocarbonetos saturados e insaturados pode ser utilizada para diferenciar ceras de abelha pura, de cera adulterada.

Flach (2005) analisou o comportamento de colônias de abelhas sem ferrão puras e invadidas e observou que houve alteração na concentração de hidrocarbonetos, dentre outros constituintes, de ceras produzidas por operárias de colônias invadidas, em relação às ceras produzidas por operárias de colônias puras.

Em 2007, Pianaro et al. analisaram os constituintes presentes nos betumes das colônias de abelhas *M. scutellaris* e *M. rufiventris* preservadas de invasores e os constituintes de *M. scutellaris* invadida e concluíram que, apesar da constituição do betume das abelhas ser formada por *n*-alcanos (C14 a C33) e *n*-9-alcenos (C23 a C33), entre outros compostos, houve uma significativa mudança na concentração destes constituintes no betume das abelhas invadidas.

No trabalho de Nunes et al. (2009), foram identificados o nonadecano, o eicosano, o heptacosano e o nonacosano em extratos cuticulares de abelhas sem ferrão e, no sudeste

asiático Leonhardt Bluthgen e Schmitt (2010) identificaram o heptacosano e o nonacosano em extratos cuticulares de meliponíneos.

Em 2011, Alissandrakis et al. investigaram a combinação de compostos presentes nos méis de eucalipto em méis de castanha, comparando com os constituintes presentes nos extratos das flores, com o intuito de identificar possíveis marcadores botânicos. Dentre vários constituintes, os pesquisadores observaram diversos hidrocarbonetos alifáticos saturados.

Nascimento e Nascimento (2012) identificaram uma série de *n*-alcanos, *n*-alcenos e *n*-alcadienos ao analisarem a composição de hidrocarbonetos cuticulares em quatro colônias de abelhas sem ferrão *Melipona asilvai*. E verificaram que a combinação de hidrocarbonetos está associada à identificação das abelhas da mesma espécie.

Como um dos objetivos do projeto foi caracterizar quimicamente o mel amargo, foi realizada a quantificação de algumas classes de compostos, por meio de análises espectrofotométricas e a bioprospecção da atividade antioxidante.

#### 4.5 ANÁLISES ESPECTROFOTOMÉTRICAS DO MEL

As análises espectrofotométricas do mel foram realizadas em triplicata e abrangeram os compostos fenólicos, flavonoides, carotenoides, análise da cor e a atividade antioxidante. Para fins didáticos serão apresentados todos os procedimentos e cálculos efetuados.

##### 4.5.1 Determinação do teor de compostos fenólicos

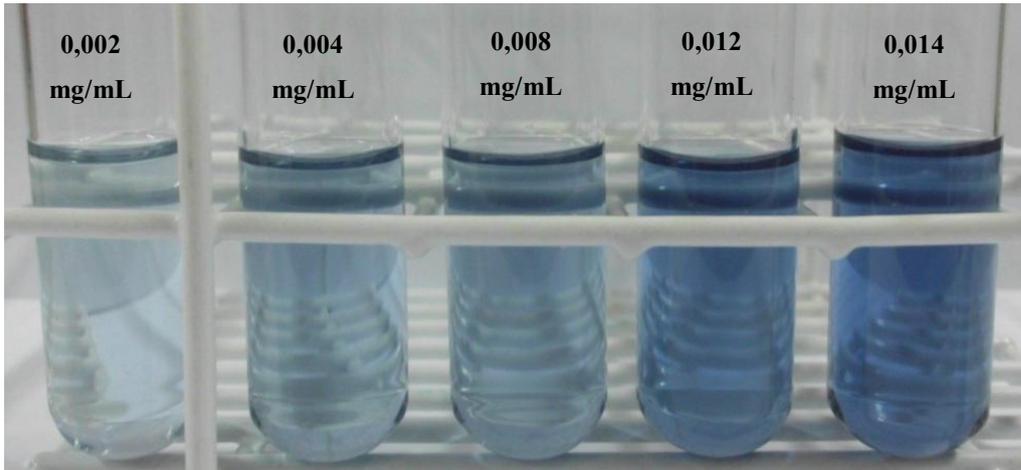
Os compostos fenólicos foram quantificados pelo método de Folin-Ciocalteu (FOLIN; CIOCALTEU, 1927), reagente que na presença de compostos fenólicos, em meio alcalino, oxida os fenolatos, reduzindo os ácidos de fosfomolibdato-fosfotungstato a óxidos de tungstênio e molibdênio, formando um complexo cuja coloração é azul, com intensidade de cor que varia de acordo com a quantidade de hidroxilas oxidáveis (ÂNGELO; JORGE, 2007, SEREN; BESTER, 2012).

O método Folin-Ciocalteu tem sido bastante utilizado na quantificação de compostos fenólicos (ALVAREZ-SUAREZ et al., 2010b, ALVES; KUBOTA, 2013, CHANG et al., 2011, ESTEVINHO et al., 2012, GÓMEZ-CARAVACA et al., 2006, JASICKA-MISIAK et al., 2012, KHALIL et al., 2011, MARGHITAS et al., 2009), apesar de, originalmente, ter sido desenvolvido para análise da tirosina e do triptofano (FOLIN; CIOCALTEU, 1927).

#### 4.5.1.1 Curva de calibração do ácido gálico

O ensaio da curva padrão, demonstrada por meio das soluções na figura 30 apresenta as cinco concentrações de ácido gálico em ordem crescente.

Figura 30 – Ensaio da curva padrão, na ordem crescente de concentração de ácido gálico.



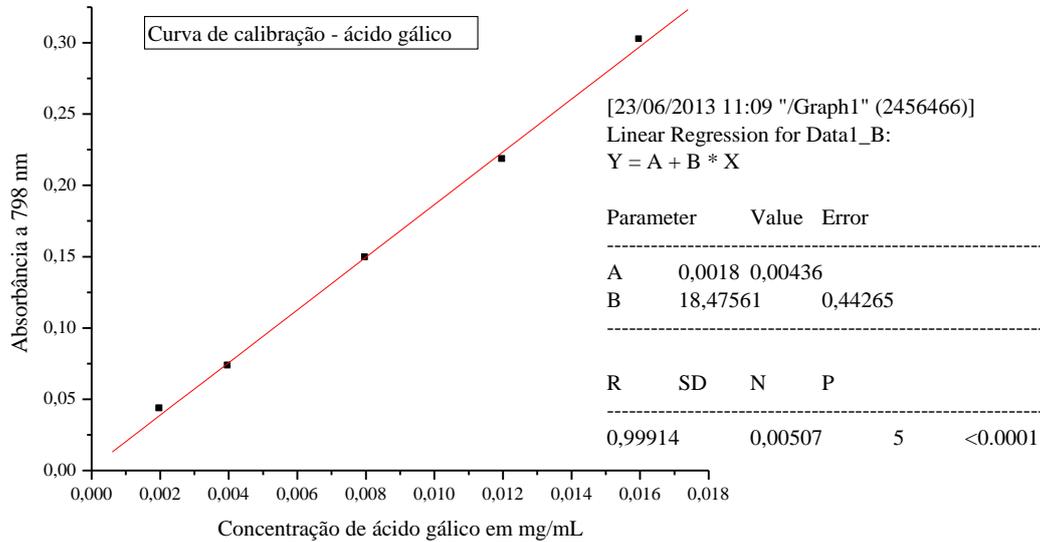
A partir destas soluções, foram obtidas as absorvâncias a 789 nm cujos resultados obtidos estão expressos na tabela 9.

Tabela 9 – Concentração, média e desvio padrão (DP) do ácido gálico, lidos a  $\lambda = 798$  nm.

Concentração	0,002 mg/mL	0,004 mg/mL	0,008 mg/mL	0,012 mg/mL	0,016 mg/mL
<i>A</i>	0,048	0,071	0,149	0,218	0,301
<i>A</i>	0,042	0,072	0,148	0,217	0,306
<i>A</i>	0,040	0,078	0,149	0,220	0,300
Média	0,043	0,073	0,149	0,218	0,302
Desvio Padrão	$4,16 \times 10^{-3}$	$3,78 \times 10^{-3}$	$5,77 \times 10^{-4}$	$1,52 \times 10^{-3}$	$3,21 \times 10^{-3}$

A partir das concentrações de ácido gálico e da média das absorvâncias, elaborou-se no programa Origin a curva de calibração (figura 31), obtendo-se a equação da reta e o coeficiente de correlação ( $R^2$ ).

Figura 31 – Curva de calibração do ácido gálico, equação da reta e coeficiente de correlação ( $R^2$ ).



Em seguida, foi realizada a análise em triplicata, da reação com a amostra de mel amargo e seu respectivo branco, segundo o método Folin-Ciocalteu (figura 32).

Figura 32 - Branco (à esquerda) e solução de reação da amostra de mel (triplicata em azul).



Os resultados das absorvâncias, média e desvio padrão da amostra de mel amargo estão expressos na tabela 10.

Tabela 10 – Absorbâncias da amostra de mel amargo, média e desvio padrão.

Mel amargo (0,1 g/mL)	Leitura UV – VIS A. (798 nm)			Média Abs ± DP
	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	
	0,175	0,177	0,178	0,176 ± 1,5x10 <sup>-3</sup>

A partir da equação da reta ( $Y = 0,0018 + 18,47561.X$ ), calculou-se, para cada absorbância, a concentração de compostos fenólicos totais no mel amargo, expressos em mg de ácido gálico/mL de solução (Cálculo 1).

Cálculo 1: Concentração de ácido gálico em mg/mL:

Para Abs = 0,175:

$$\begin{aligned}
 Y &= A + B \cdot X \\
 0,175 &= 0,0018 + 18,47561 X \\
 X &= 0,00937 \text{ mg/mL}
 \end{aligned}$$

De posse das concentrações determinou-se a massa de compostos fenólicos presentes no volume final da solução de reação (Cálculo 2):

Cálculo 2: Massa de compostos fenólicos presente em 5 mL de solução:

$$\begin{aligned}
 C &= m/V \\
 m &= 0,00937 \text{ mg/mL} \times 5 \text{ mL} \\
 m &= 0,04687 \text{ mg}
 \end{aligned}$$

Em seguida, determinou-se a quantidade de mel presente na alíquota pipetada (Cálculo 3):

Cálculo 3: Massa de mel presente na alíquota pipetada (0,5 ml):

$$\begin{aligned}
 C &= m/V \\
 m &= 0,1 \text{ g/mL} \times 0,5 \text{ mL} \\
 m &= 0,05 \text{ g}
 \end{aligned}$$

O teor encontrado foi convertido em mg de ácido gálico/100 g de mel e expresso como média e desvio padrão (Cálculo 4):

Cálculo 4: Concentração de compostos fenólicos presentes em 100 g de mel amargo:

<b>Compostos fenólicos</b>	<b>Massa de mel</b>
0,04687 mg	0,05 g
X =	100 g
X =	93,78 mg

Os cálculos acima apresentados foram realizados para cada absorvância e os resultados, apresentados como média e desvio padrão do teor de compostos fenólicos totais, expressos em equivalente de ácido gálico (mg/100 g de mel) na tabela 11.

Tabela 11 - Teor de fenólicos totais em equivalente de ácido gálico.

<b>Mel amargo (0,1 g/mL)</b>	<b>Teor de Fenóis Totais Equivalentes de ácido gálico (mg/100g de mel)</b>
	Média ± DS
	94,6400 ± 0,8240

Na amostra de mel amargo analisada, o teor de fenólicos totais foi de 94,64 mg por 100 g de mel. E a concentração de fenólicos nessa amostra apresentou um teor mais elevado em relação aos resultados das análises de cinco amostras de méis do município do Cantá-RR (PONTIS, 2011), onde os valores de fenólicos totais variaram entre 27,4 e 53,5 mg de ácido gálico por 100 g de mel, embora não tenha sido citada a presença de mel amargo em suas análises.

Oliveira et al. (2012) compararam o perfil de compostos fenólicos e flavonoides por HPLC, em méis de *A. melifera*, *Melipona fasciculata* e *M. flavolineata* provenientes de quatro municípios do nordeste paraense. O perfil mostrou que o ácido gálico encontra-se em grande proporção nas diversas amostras analisadas, sendo, muitas vezes, o constituinte fenólico majoritário.

Em 2009, Lianda analisou por meio do reagente Folin-Denis, quatro méis silvestres e cinco méis de laranjeiras do Rio de Janeiro, obtendo teores de fenólicos entre 42,8 e 78,2 mg/100g de mel para méis silvestres e 35,7 a 53,2 mg/100g de mel para os méis de laranja, respectivamente.

Alvarez-Soares et al. (2010b) estudaram diversas propriedades de méis cubanos monoflorais, dentre elas o conteúdo de compostos fenólicos totais. De acordo com os

resultados, o mel de linho, classificado como âmbar, apresentou o maior teor de compostos fenólicos (59,58 mg/ 100g de mel). Por outro lado, méis de mangrove preto, classificado como branco e videira de natal, como mel extra-branco, apresentaram os menores teores de compostos fenólicos, com valores de 23,36 e 21,3 mg em equivalente de ácido gálico por 100 g de mel, respectivamente.

Chang et al. (2011) determinaram o teor de compostos fenólicos em 16 méis de várias fontes florais e os resultados obtidos variaram de 100,8 mg a 60,5 mg de equivalente em ácido gálico por 100 g de mel.

Khalil et al. (2011) investigaram o conteúdo de compostos fenólicos em méis da Malásia, de diferentes origens florais, utilizando a mesma metodologia descrita nesse estudo, obtendo concentrações de 1,52 mg para méis tropicais da ilha do Boréu, 1,85 mg para o mel “B” e em três amostras de méis de Tualang (2,88 a 4,22 mg de ácido gálico por 100 g de mel). Contudo, os teores obtidos ficaram abaixo de teor de fenólicos presentes no mel de Manuka, utilizado como referência padrão (5,26 mg em equivalente de ácido gálico por 100 g de mel). Khalil acrescenta que a variação do teor de fenólicos pode estar associada às diferentes origens florais e às condições de armazenamento.

Jasicka-Misiak et al. (2012) analisaram 15 méis de urze e os resultados obtidos variaram de 59,9 mg a 76,2 mg em equivalente de ácido gálico por 100g de mel. Sendo que dentre as quinze amostras, oito apresentaram teores de compostos fenólicos acima de 70,0 mg/100g de mel.

Não foram encontrados dados, na literatura, que quantifiquem o teor de fenólicos em méis amargos.

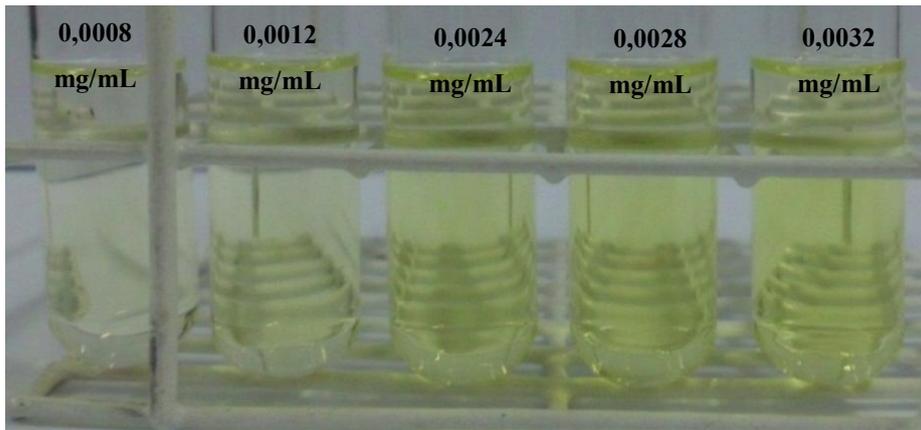
#### **4.5.2 Determinação do teor de flavonoides**

O teor de flavonoides foi verificado mediante as metodologias de complexação com cloreto de alumínio para as flavonas e flavonóis (ALVES; KUBOTA, 2013, KHALIL et al., 2011, TYLKOWSKI et al, 2010); por 2,4-dinitrofenil-hidrazina na quantificação das flavonas e diidroflavonóis (MIGUEL et al., 2010, TYLKOWSKI et al., 2010); e para antocianinas o teor foi verificado por meio da leitura de solução em três comprimentos de onda e cálculo do teor através de fórmula.

#### 4.5.2.1 Curva de calibração de quercetina

O ensaio da curva padrão, demonstrada por meio das soluções, na figura 33, apresenta as cinco concentrações de quercetina em ordem crescente.

Figura 33 - Ensaio da curva padrão, na ordem crescente de concentração de quercetina.



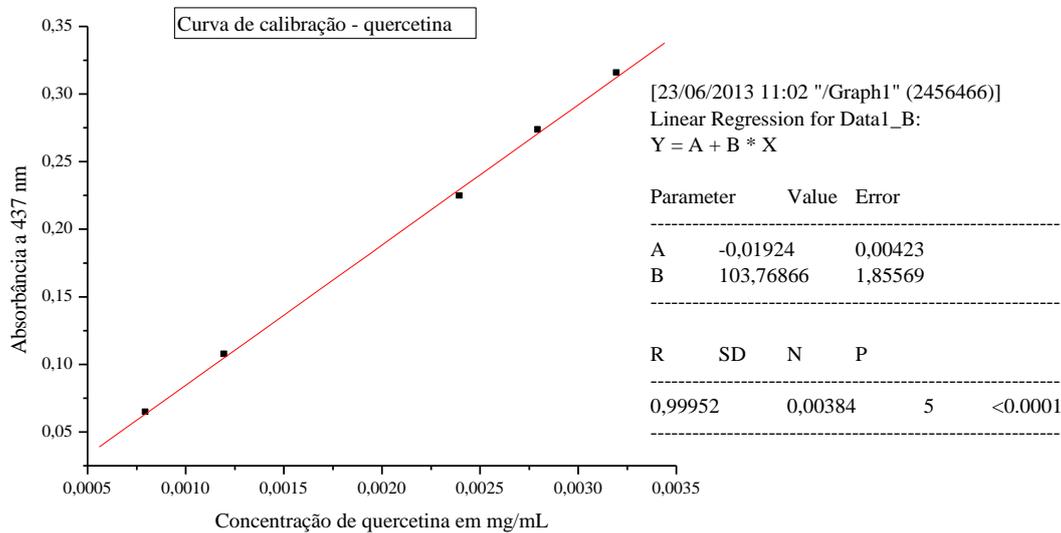
Os resultados das leituras de cada triplicata estão expressos na tabela 12 e indicam a média e o desvio padrão (DP) das absorvâncias de cada concentração do padrão.

Tabela 12 - Concentração, média e desvio padrão (DP) do padrão de quercetina, lidos a  $\lambda = 437$  nm.

Concentração	0,0008 mg/ml	0,0012 mg/ml	0,0024 mg/ml	0,0028 mg/ml	0,0032 mg/ml
<i>A</i>	0,064	0,109	0,220	0,274	0,319
<i>A</i>	0,065	0,109	0,222	0,271	0,318
<i>A</i>	0,063	0,104	0,230	0,274	0,309
Média das <i>A</i>	0,064	0,107	0,224	0,273	0,315
Desvio padrão	0,010	0,003	0,005	0,002	0,005

A partir da média e desvio padrão, foi elaborada a curva padrão, obtendo-se por intermédio desta a equação da reta e o coeficiente de correlação ( $R^2$ ) apresentados na figura 34.

Figura 34 – Curva de calibração da quercetina, equação da reta e coeficiente de correlação ( $R^2$ ).



Na sequência, foram elaboradas a triplicata e o branco da amostra (figura 35) para a determinação de flavonas e flavonóis.

Figura 35 – Branco (à esquerda) e solução de reação da amostra de mel (triplicata à direita).



Os resultados das absorbâncias, média e desvio padrão da amostra de mel amargo estão expressos na tabela 13.

Tabela 13 – Absorbâncias do mel e média  $\pm$  desvio padrão.

Mel amargo (0,2 g/mL)	Leitura UV – VIS Abs. (437 nm)			Média
	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	Abs $\pm$ DP
	0,178	0,179	0,180	0,179 $\pm$ 0,001

Com o apoio da equação da reta ( $Y = - 0,01924 + 103,76866.X$ ), foram efetuados os cálculos de concentração de flavonas e flavonóis (para cada absorbância aferida), expressos em miligrama de quercetina por mililitro de solução. O procedimento matemático do ensaio está descrito abaixo:

Cálculo 5: Concentração de quercetina em mg/mL:

Para Abs = 0,178:

$$\begin{aligned}
 Y &= A + B.X \\
 0,178 &= - 0,01924 + 103,76866X \\
 X &= 0,0019 \text{ mg/mL}
 \end{aligned}$$

Nesse ensaio, a concentração de quercetina foi de 0,0019 mg/mL. Logo, conhecendo-se a concentração quercetina por mililitro de solução, determinou-se o teor de quercetina presente no ensaio (5 mL), de acordo com o cálculo a seguir:

Cálculo 6: Massa de quercetina presente em 5 mL de solução:

$$\begin{aligned}
 C &= m/V \\
 m &= 0,019 \text{ mg/mL } 5\text{mL} \\
 m &= 0,0095 \text{ mg de quercetina}
 \end{aligned}$$

Em seguida, estimou-se a quantidade de mel de concentração 0,2 g/mL presente na alíquota pipetada (2 mL), mediante o cálculo de concentração descrito abaixo:

Cálculo 7: Massa de mel presente na alíquota pipetada (0,5 ml):

$$\begin{aligned}
 C &= m/V \\
 m &= 0,2 \text{ g/mL. } 2 \text{ mL} \\
 m &= 0,4 \text{ g de mel}
 \end{aligned}$$

Por último, foi determinado o teor de quercetina em 100 mg de mel amargo (Cálculo 8):

Cálculo 8: Concentração de quercetina presente em 100 g de mel amargo:

<b>Quercetina</b>	<b>Massa de mel</b>
0,0095 mg	0,4 g
X =	100 g
X =	2,375 mg

Após realização dos cálculos de 5 a 8, determinou-se o teor de flavonas e flavonóis. Os resultados estão representados em média e desvio padrão expressos em equivalente de quercetina (mg/100 g de mel), descritos na tabela 14, abaixo:

Tabela 14 - Teor de flavonas e flavonóis em equivalente de quercetina.

Mel amargo (0,2 g/mL)	Teor de flavonas e flavonóis
	Equivalente de quercetina (mg/100g de mel)
	Média ± DP
	2,3875 ± 0,0125

A análise de flavonas e flavonóis, pelo método descrito, mostrou a presença de 2,38 mg desses flavonoides em equivalente de quercetina por 100 g de mel. Valores semelhantes foram encontrados por Pontis (2011) ao analisar dez amostras de mel do estado de Roraima, das quais, cinco amostras foram oriundas do município do Cantá. Nestas análises, Pontis obteve valores com teores de flavonas e flavonóis entre 0,30 e 4,86 mg em equivalente de quercetina por 100 g de mel, porém não foi citada a ocorrência de mel amargo.

Duarte (2009) analisou diversos méis produzidos por abelhas *A. mellifera* e determinou uma concentração de flavonas e flavonóis bem acima do determinado nesse estudo. Os resultados obtidos oscilaram entre 11,69 e 49,50 mg em equivalentes de quercetina por 100 g de mel.

Chang et al. (2011) com a mesma metodologia e utilizando a rutina como padrão observou uma variação de flavonoides de 2,30 e 0,60 mg em equivalente de rutina por 100 mel de gramas de mel.

Alvarez-Soares et al. (2010b) obtiveram teores de flavonoides oscilando entre 2,52 e 1,09 mg em equivalente de catequina por 100 g de mel. Khalil et al., 2011, investigando méis da Malásia verificaram uma variação na concentração do conteúdo de flavonoides de acordo com a origem, obtendo valores entre 1,15 mg para mel tropical, proveniente da ilha de

Bornéu, e 2,53 mg para os méis de Tualang, ambos em equivalente de catequinas por 100 g de mel. Tais teores ficaram abaixo do teor de fenólicos do mel de Manuka (3,45 mg), utilizado como teor padrão no experimento.

Em 2012, Estevinho et al. avaliaram a qualidade dos méis orgânicos produzidos em Portugal, por meio da sua composição química e microbiológica. Nos méis analisados, todos os parâmetros verificados estão dentro do padrão determinado pela Legislação vigente. E quanto ao teor de flavonoides, a concentração determinada está entre 49,4 e 56,3 mg em equivalente de catequina por 100g de mel.

Nesse contexto pode-se perceber que o teor de flavonas e flavonóis quantificado nesse estudo encontra-se dentro dos valores citados por diversos pesquisadores. Contudo, em suas pesquisas não foi relatada a presença de mel amargo.

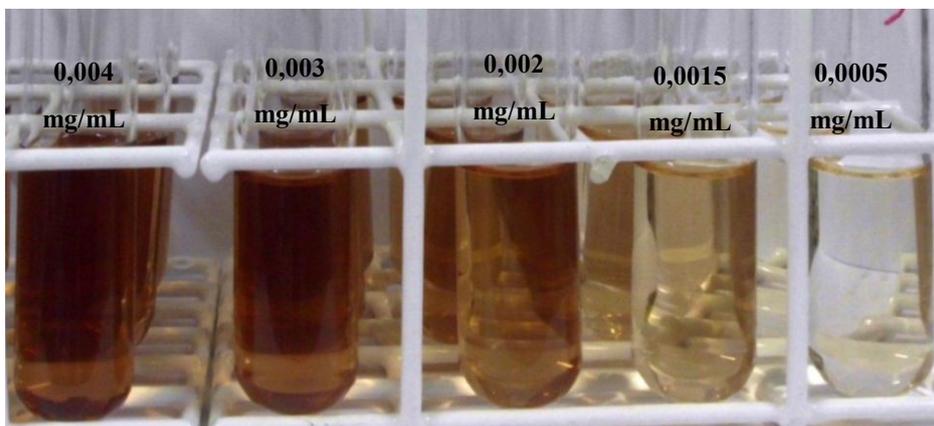
#### 4.5.3 Flavononas e diidroflavonois

O teor de flavonas e diidroflavonóis foi determinado de acordo com Tylkowski et al. (2010) e Miguel et al. (2010).

##### 4.5.3.1 Curva de calibração de pinocembrina

O ensaio da curva padrão na ordem decrescente de concentração do teor de pinocembrina, está exposto na figura 36.

Figura 36 - Ensaio da curva padrão na ordem decrescente de concentração, do teor de pinocembrina.



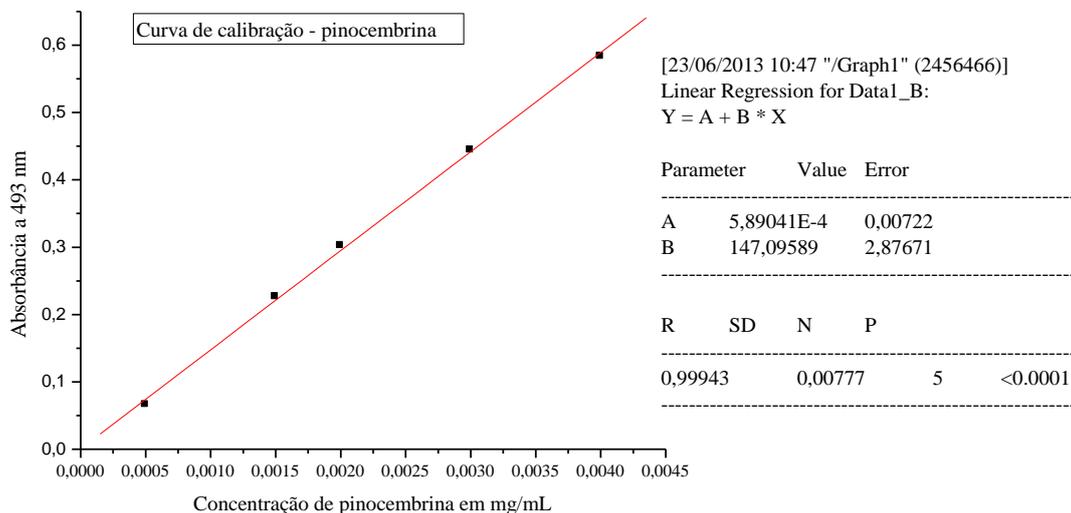
As leituras dos pontos da curva de calibração de pinocembrina, expressos na tabela 15 indicam a média e o desvio padrão (SD) das absorbâncias.

Tabela 15 – Concentração, média e desvio padrão (DP) da pinocembrina, lidos a  $\lambda = 493$  nm.

Concentração	0,0005	0,0015	0,002	0,003	0,004
	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml
Abs	0,063	0,227	0,300	0,454	0,565
Abs	0,069	0,228	0,305	0,440	0,574
Abs	0,068	0,225	0,301	0,440	0,612
Média das abs	0,066	0,226	0,302	0,444	0,583
DP	0,003	0,001	0,003	0,008	0,024

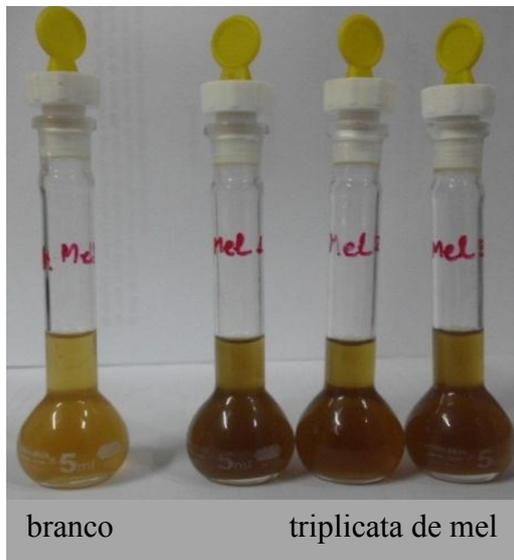
A partir das médias das absorbâncias e das concentrações dos pontos da curva de calibração, foi elaborada a curva de calibração de pinocembrina e obtiveram-se, mediante a curva, os dados da equação da reta e o coeficiente de correlação ( $R^2$ ), apresentados na figura 37.

Figura 37 – Curva de calibração da pinocembrina, equação da reta e coeficiente de correlação ( $R^2$ ).



Em seguida elaborou-se a triplicata de mel e seu respectivo branco (figura 38), aferindo-se as respectivas absorbâncias.

Figura 38 – Branco (à esquerda) e triplicada da amostra de mel (à direita).



As médias e o desvio padrão, bem como o teor de flavononas e diidroflavonois expressos em equivalente de pinocembrina por 100 g de mel estão dispostos na tabela 16.

Tabela 16 – Absorbâncias do mel, média e desvio padrão.

Mel amargo (0,2 g/mL)	Leitura UV – VIS A. (437 nm)			Média
	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	Abs ± DP
	0,242	0,246	0,245	0,2440 ± 0,002

Para determinação da concentração das flavonas e diidroflavonois, primeiramente calculou-se a concentração de pinocembrina por meio da equação da reta ( $Y = 0,00058 + 147,09589 X$ ), utilizando-se para valores de “Y” as absorbâncias do mel (0,242; 0,246; 0,245). O cálculo 9 exemplifica a determinação da concentração de pinocembrina no ensaio.

Cálculo 9 – Concentração de pinocembrina em mg/mL

Para Abs = 0,242:

$$\begin{aligned}
 Y &= A + B \cdot X \\
 0,242 &= 0,00058 + 147,09589X \\
 X &= 0,00164 \text{ mg/mL}
 \end{aligned}$$

Da solução estoque de mel (0,2 g/mL) retirou-se uma alíquota de 0,2 mL e adicionou-se 1,4 mL de KOH e 0,4 mL de DNP, produzindo uma solução de reação de 2 mL. Sequencialmente determinou-se a massa de mel presente na alíquota pipetada (Cálculo 10).

Cálculo 10: Massa de mel presente na solução de reação.

$$C = m/V$$

$$m = 0,2 \text{ g/mL} \times 0,2 \text{ mL}$$

$$m = 0,04 \text{ g de mel}$$

Da solução de reação retiraram-se três alíquotas (triplicata) de 0,5 mL, que foram depositadas em balões volumétricos de 5 mL, tendo seus volumes completados com metanol, compondo uma solução com massa de 0,01 g de mel (Cálculo 11).

Cálculo 11: Massa de mel presente na alíquota pipetada.

$$C = m/V$$

$$m = 0,2 \text{ g/mL} \times 0,5 \text{ mL}$$

$$m = 0,01 \text{ g de mel}$$

Pode-se concluir que, se na alíquota de mel (0,5 g) existe 0,01 g de mel e 0,00828 mg de pinocembrina, em 100 g de mel existe uma concentração de 82,8 mg de pinocembrina. A equação matemática está apresentada no cálculo 12, abaixo.

Cálculo 12: Concentração de pinocembrina presente em 100 g de mel.

<b>Pinocembrina</b>	<b>Massa de mel</b>
0,00828 mg	0,01 g
X =	100 g
X =	82,8 mg

A tabela 17 apresenta o teor de flavonas e diidroflavonois em equivalente de pinocembrina por 100 g de mel.

Tabela 17 - Teor de flavononas e diidroflavonóis em equivalente de pinocembrina.

Mel amargo (0,1 g/mL)	Teor de flavononas e diidroflavonóis (mg/100 g de mel)
	Média ± DS
	82,7300 ±0,7000

No que diz respeito ao teor de flavonas e diidroflavonois, o ensaio obteve 82,73 mg em equivalentes de pinocembrina por 100 g de mel. Na literatura poucos trabalhos citam análises colorimétricas para a determinação de flavonas e diidroflavonois em méis. Destes, pode-se citar Pontis (2011) ao apresentar a análise colorimétrica de dez méis do estado de Roraima, onde consta, dentre outros, a composição de flavonas e diidroflavonois em equivalente de pinocembrina, com teores variando entre 17,06 e 26,06 mg por 100g de mel.

Contudo, existem vários estudos relacionados a estes compostos na própolis. Por exemplo, Valencia et al. (2012) analisaram o efeito sazonal na composição química e biológica da própolis, incluindo o teor de flavonas e flavonóis, utilizando o reagente cloreto de alumínio e o teor de flavononas e diidroflavonois, por meio do reagente DNP. A pesquisa revelou nas quatro amostras analisadas, dentre outros compostos, a presença de pinocembrina e pinobancsina. Ficou evidente ainda, que o teor de flavonoides e fenólicos é bem maior no outono e no verão, do que no inverno.

No mel, o estudo das flavonas e diidroflavonois está baseado na utilização da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), tanto para quantificá-los como para identificá-los. Martos et al. (2000) nas análises com méis de eucalipto oriundos da Itália, Portugal e Espanha, quantificou por meio da CLAE, dentre outros compostos, os flavonoides pinobancsina (3,5,7 – triidroflavonona) e pinocembrina (5,7-diidroflavonona), acrescentando que o teor de flavonoides nos méis é bastante variado, devido à possível contaminação de própolis na colmeia.

Muitos pesquisadores quantificaram diversos compostos presentes no mel utilizando-se desse recurso. Dentre eles, pode-se citar: Ferreres et al. (1996), Martos et al. (1997), Gheldof; Wang; Engeseth, (2002), Yao et al. (2003, 2004), Gómes-Caravaca et al. (2006), Pyrzynska; Biesaga (2009), Iurlina et al. (2009), Bertonecelj et al. (2011), Jésicka Misiack et al. (2012) e Biesaga; Pyrzynska (2013).

Chang et al. (2002) realizou um estudo com própolis oriundas do Brasil, Inglaterra, Itália e Nova Zelândia, no qual foram utilizados dois métodos colorimétricos com o uso do reagente cloreto de alumínio na quantificação de flavonas e flavonóis e do reagente 2,4-

dinitrofenil-hidrazina, na quantificação dos flavononas e diidroflavonois. No ensaio, os pesquisadores obtiveram a pinocebrina como flavonona mais abundante. Contudo, devido à falta do reagente comercial “padrão”, os pesquisadores utilizaram a naringenina nas quantificações das flavonas e diidroflavonois, e para as flavonas e flavonóis, utilizaram a quercetina como padrão. Com base nos resultados (2,82 – 7,83 g em equivalente de quercetina e 7,13 – 21,84 g em equivalente de naringenina), os pesquisadores sugeriram que sejam utilizadas as duas metodologias para quantificação real do conteúdo de flavonoides totais, fortalecendo o procedimento realizado nesta pesquisa.

#### 4.5.4 Teor de antocianinas

O teor de antocianinas foi analisado em triplicata, com a concentração de 0,1 g/mL de mel e determinado de acordo com o Cálculo 9.

Cálculo 9: Concentração de mel na alíquota pipetada:

$$\begin{aligned} C1.V1 &= C2.V2 \\ 0,5\text{g/mL} \cdot 1 \text{ mL} &= C2 \times 5 \\ C2 &= 0,1 \text{ g/mL} \end{aligned}$$

Após leitura a 515 nm, obtiveram-se as absorvâncias apresentadas na tabela 18.

Tabela 18 – Absorvâncias do mel, média e desvio padrão.

Mel amargo (0,1 g/mL)	Leitura UV – VIS			Média Abs ± DP
	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	
	0,110	0,111	0,110	0,110 ± 0,006

De posse das absorvâncias, determinou-se o teor de antocianinas em 100g de mel por meio do cálculo 10, abaixo:

Cálculo 10: Concentração de antocianinas presente em 100 g de mel.

$$\text{Antocianinas (mg/100g)} = \frac{[(\text{abs}).(\text{fator de diluição})]}{98,2}$$

$$\text{Antocianinas} = \frac{[0,110. 1000]}{98,2}$$

$$\text{Antocianinas} = 1,12 \text{ mg/100 g de mel}$$

Onde o fator de diluição foi determinado pela equação apresentada no cálculo 11, abaixo:

Cálculo 11: Fator de diluição do mel:

$$\text{Fator} = 100/\text{concentração de mel}$$

$$\text{Fator} = 100/0,1$$

$$\text{Fator} = 1000$$

Portanto, o teor de antocianinas no ensaio foi de 1,12 mg por 100 g de mel. Entretanto, na literatura não foi possível localizar análises do teor de antocianinas para comparação de resultados.

Por fim, o teor de flavonoides totais obtido pelo somatório do teor de flavonas e flavonóis, flavononas e diidroflavonois, bem como o teor das antocianinas, está registrado por meio da média e desvio padrão na tabela 19, a seguir.

Tabela 19 - Teor de flavonoides totais determinados em miligramas de flavonoides por 100 g de mel e expressos em média e desvio padrão.

Teor de flavonoides totais mg/100g de mel expressos em Média ± Desvio padrão	
Flavonas e flavonóis	2,3875 ± 0,0125
Flavononas e diidroflavonois	82,7300 ± 0,7000
Antocianinas	1,1200 ± 0,0050
Flavonoides totais	86,2375 ± 0,7175

#### 4.5.5 Teor de carotenoides

Quanto à quantificação de carotenoides, utilizou-se a metodologia empregada por Alvarez-Suarez (2010b), mas não foi possível determiná-lo, provavelmente porque o teor de carotenoides na amostra analisada estava abaixo do nível de detecção do equipamento utilizado. Neste método os autores acima citados observaram o conteúdo de carotenoides de

5,57 mg, 4,89 mg e 1,17 mg, em equivalente de beta caroteno por kg de mel e verificou que em méis de coloração extra-branco não foi possível determinar o conteúdo de beta caroteno, concluindo que a cor do mel está diretamente relacionada ao teor de carotenoides.

#### 4.5.6 Análise da cor

Atinente à cor do mel realizou-se análise colorimétrica de acordo com a metodologia descrita por Lacerda et al (2010). Os resultados das leituras a 635 nm estão expressos na tabela 20.

Tabela 20 – Absorbâncias do mel, média e desvio padrão.

Mel amargo (1 g/mL)	Leitura UV – VIS <i>A</i> (635 nm)			Média
	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	Abs ± DP
	0,163	0,156	0,161	0,160 ± 0,004

Após a análise determinou-se a cor do mel mediante utilização da equação apresentada no cálculo 13, a seguir:

Cálculo 13: Determinação da cor do mel, em mm de *Pfund*.

$$\text{Cor} = (371,39 \times \text{Abs}_{635 \text{ nm}}) - 38,70$$

$$\text{Cor} = (371,39 \times 0,160) - 38,70$$

$$\text{Cor} = 20,7224 \text{ mm}$$

De acordo com a classificação dos méis apresentada na escala de *Pfund* (tabela apresentada no referencial teórico, página 29), as absorbâncias entre 0,148 e 0,195 correspondem a valores entre 16,4 e 34 mm e apresentam coloração branca. Nesse contexto, verificou-se que a cor do mel analisado é branca.

Duarte (2009) detectou para méis de *A. mellifera* cores oscilando entre 23,3 e 108 mm de *Pfund*, equivalentes às cores branca e âmbar. ALVES et al. (2005) declara que méis com coloração mais clara, no mercado mundial, apresentam preços mais elevados, uma vez que estes são mais apreciados pelos consumidores.

#### 4.5.7 Atividade Antioxidante

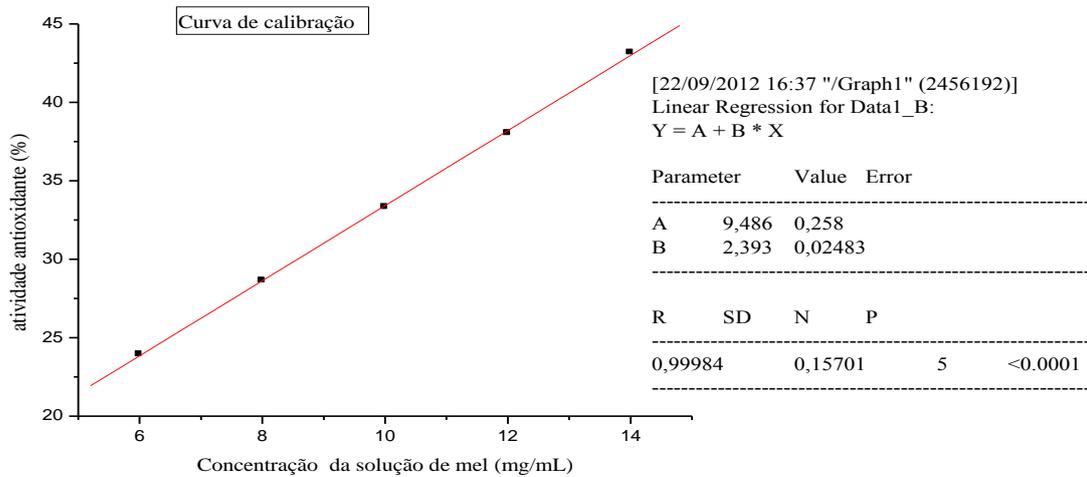
Para determinação da atividade antioxidante do mel amargo, inicialmente elaborou-se a triplicata referente ao controle e a absorbância lida a 515 nm. Em seguida, foram elaborados os pontos (em triplicata) do branco, da amostra e a partir das leituras verificou-se o percentual antioxidante (tabela 21).

Tabela 21 – Concentração, absorbância, média e desvio padrão do ensaio da atividade antioxidante.

<b>Doseamento da amostra com DPPH</b>					
Concentração	Absorbância			Média ± DP	%AA
6 mg/ml	0,185	0,185	0,185	0,185 ± 0,0	23,93%
8 mg/ml	0,175	0,176	0,175	0,175 ± 0,0006	28,63%
10 mg/ml	0,164	0,166	0,166	0,165 ± 0,001	33,33%
12 mg/ml	0,156	0,156	0,156	0,156 ± 0,00	38,03%
14 mg/ml	0,145	0,145	0,146	0,145 ± 0,0006	43,16%
<b>Absorbâncias do branco</b>					
	0,007	0,007	0,007	0,007 ± 0,0	
	0,008	0,008	0,008	0,008 ± 0,0	
	0,009	0,010	0,010	0,009 ± 0,0005	
	0,011	0,011	0,011	0,011 ± 0,0	
	0,012	0,012	0,012	0,012 ± 0,0	
<b>Absorbâncias do controle – DPPH</b>					
	0,236	0,234	0,234	0,234 ± 0,001	

Após determinar o percentual da atividade antioxidante, obteve-se por meio da plotagem dos dados que relacionam o percentual antioxidante e a concentração de cada diluição preparada, no programa Origin, a curva de calibração (figura 39) da atividade antioxidante, o coeficiente de correlação ( $R^2 = 99984$ ) e a equação da reta ( $Y = 9,486A + 2,393B.X$ ).

Figura 39 - Curva de calibração da atividade antioxidante.



Com apoio da equação da reta determinou-se a concentração que captura 50% dos radicais livres do DPPH ( $IC_{50}$ ), na qual, quanto menor o seu valor, maior o poder antioxidante das substâncias presentes na amostra (Cálculo 14).

Cálculo 14: Determinação da concentração inibitória ( $IC_{50}$ ).

$$Y = A + B \cdot X$$

$$50 = 9,486 + 2,393 X$$

$$x = 16,94 \text{ mg/mL}$$

Com base nos cálculos efetuados verificou-se que, a atividade antioxidante do mel amargo apresentou uma concentração inibitória de 16,94 mg/mL. O resultado obtido ficou abaixo dos valores obtidos por Pontis (2011), que analisou dez amostras de méis do estado de Roraima e obteve resultados mais significativos, com  $IC_{50}$  de 3,17 a 8,79.

Contudo, no estado do Pará, Oliveira et al. (2012) compararam a atividade antioxidante de méis de três diferentes espécies de abelhas e verificaram que, os méis de coloração mais escura apresentaram tanto o teor de compostos fenólicos mais elevados, como uma melhor atividade antioxidante, sendo que os méis de *A. melífera* apresentaram os melhores resultados para a atividade antioxidante, com o  $IC_{50}$  entre 8,87 e 41,76.

Valores semelhantes foram obtidos por Lianda (2009) onde a mesma analisando méis do Rio de Janeiro obteve índices entre 10,81 e 19,74 mg/mL, para méis silvestres; e 29,85 a 52,64 mg/mL para méis de laranja.

Sant'Ana et al. (2012) analisaram 21 amostras de mel oriundas do Rio de Janeiro e de Minas Gerais e determinaram a atividade antioxidante por três diferentes métodos. No que concerne ao método do radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), obtiveram valores de EC<sub>50</sub> variando entre 10,19 e 404,64 mg/mL

Estevinho et al. (2008) analisaram méis de Portugal, comparando méis claros e escuros por meio de ensaio com DPPH e verificaram que os méis de coloração clara apresentaram 68,17 mg/mL e os méis de coloração escura 24,27 mg/mL.

Em 2010, Lachman et al. analisaram méis de várias fontes florais e determinaram para o método do DPPH, utilizando o ácido ascórbico como equivalente, a concentração variando entre 44,19 e 9,87 mg/100g de mel.

Em 2012, Islan et al. analisaram oito amostras de mel de diferentes áreas de Bangladesh e verificaram que, a atividade antioxidante pelo método de DPPH variou entre 33,6 e 97,5 % apresentando uma boa correlação entre os compostos fenólicos (0,869) e flavonoides (0,786).

#### **4.5.8 Interação entre os compostos analisados espectrofotometricamente**

O conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides, bem como a capacidade antioxidante dos méis variam de acordo com a origem floral e condições ambientais nas quais a planta está inserida (AL-MAMARY et al., 2002). Sendo que, a vegetação de climas tropicais, com elevada exposição à luz solar, apresenta maior concentração de compostos fenólicos (SPAYD et al., 2002).

Em 2010, Kalil, Sulaiman e Boukraa apresentaram uma revisão acerca das propriedades antioxidantes do mel e concluíram que, a ação antioxidante dos méis ocorre devido à presença de diversos compostos como o ácido caféico, crisina, galangina, pinocembrina, pinobancsina, acacetina, quercetina e canferol, pois estes apresentam predominância nos méis estudados. E ainda, que a combinação destes compostos apresentam uma ação farmacológica promissora na prevenção de câncer, doenças cardiovasculares, doenças infecciosas, prevenção do envelhecimento e conservação de alimentos.

É importante ressaltar, que os compostos fenólicos e flavonoides são considerados marcadores com potencialidade para a determinação da origem botânica, contribuindo com a cor e sabor, como também para diversos benefícios à saúde humana (CHANG et al., 2011, JASICKA-MISIAK et al., 2012).

Ademais, méis de coloração branca geralmente apresentam teores de compostos fenólicos e carotenoides abaixo da concentração destas substâncias nos méis de coloração escura, apesar da nossa pesquisa indicar teores de fenólicos elevados no mel analisado.

Diante dos resultados apresentados pode-se observar que nos méis existe uma grande variação na ação antioxidante e no teor de compostos fenólicos e flavonoides. E que tal diversidade pode estar atrelada à variedade de espécies vegetais.

Portanto, a análise de compostos secundários da amostra de mel amargo obtida no município no Cantá-RR, apresentou uma concentração média de compostos secundários e ação antioxidante em relação aos méis de diversas regiões do país.

## 5 CONCLUSÕES

Reportando-se aos objetivos propostos neste trabalho conclui-se que:

Esta pesquisa constitui o primeiro trabalho brasileiro de identificação da origem botânica do mel amargo agregando dados melissopalinológicos e análises químicas.

A identificação melissopalinológica apresentou um teor de 91,2% de pólen de *Vochysia* sp. sendo compatível com as análises químicas realizadas.

Logo, define-se o mel amargo, oriundo do município do Cantá (Vila do 20), como mel de *Vochysia* sp.

As análises dos extratos das flores sem antera, das anteras das flores e dos diferentes extratos do mel, por CG-EM foram bastante eficientes. Na fração hexânica do mel e das flores, foi possível verificar a presença de diversos hidrocarbonetos, sendo identificados *n*-alcanos de C12 a C33 e *n*-alcenos C16, C18, C20 e C24 caracterizando os marcadores químicos de identificação botânica do mel amargo. Já no extrato das anteras (rico em pólen) foi possível verificar uma diferença na composição, sendo identificados os compostos octadecen-1-ol e o ácido tetradecanoico, fortalecendo a premissa de que os constituintes presentes no mel são provenientes do néctar da flor e não do pólen.

Para a identificação da posição da dupla dos *n*-alcenos foi necessário a realização de uma derivatização, sendo utilizada, para tanto a derivatização por DMDS. Assim, foi possível detectar os compostos: pentadec-1-eno, hexadec-1-eno, hexadec-2-eno, heptadec-1-eno, octadec-1-eno, octadec-2-eno, eico-1-eno, docos-1-eno, tetracos-2-eno. Destes, os compostos que apresentaram posição “1”, estiveram presentes tanto no mel quanto nas flores, já os compostos com posição “2”, da dupla ligação, apresentaram-se apenas nas flores.

Com a reação de DMDS foi possível verificar, também, a presença dos compostos hexadecen-1-eno e hexadecen-2-eno e os compostos octadecen-1-eno e octadecen-2-eno, isômeros não detectados antes da reação. Comprovando-se a presença de *n*-alcenos com a dupla ligação na posição 1, para os compostos presentes no mel e nas flores e *n*-alcenos com dupla na posição 2, apenas nas flores.

Nas análises por espectrometria de massas com ionização por electrospray foi possível verificar um perfil de similaridade entre os extratos etanólico das flores sem antera e os extratos do mel por XAD-2, C18, líquido-líquido (diclorometano) e do mel liofilizado.

Utilizando-se de padrões autênticos foram identificados os compostos crisina (*m/z* 253) e ácido cafeico (*m/z* 179) nos extratos; e os compostos de *m/z* 255 e *m/z* 269 (não

identificados) podem ser considerados marcadores característicos da origem botânica deste tipo de mel, pois estão presentes tanto nos extratos de mel quanto no extrato das flores. Contudo, sugerem-se novas análises com o propósito de identificar o íon  $m/z$  255 e o  $m/z$  269 além de outros constituintes ainda não elucidados.

De acordo com as análises espectrofotométricas verificou-se que os compostos fenólicos apresentaram-se em maior concentração, com teor de 94,64 mg/100g de mel em equivalentes de ácido gálico.

Os flavonoides, quantificados com base no somatório de três metodologias apresentaram teor de 86,23 mg/100g de mel, correspondentes à 2,38 mg/100g de mel em equivalente de quercetina, para o teor de flavonas e flavonóis; 82,73 mg/100g de mel em equivalentes de pinocembrina no teor de flavononas e diidroflavonois e 1,12 mg/100g de mel de antocianinas, mas não foi possível determinar o teor de carotenoides por meio da metodologia utilizada.

Atinente à cor do mel amargo, com valores entre 16,4 e 34 mm de acordo com a escala de Pfund, corresponde à coloração branca.

Em relação à atividade antioxidante, com base no método do DPPH, o mel apresentou uma concentração inibitória ( $IC_{50}$ ) de 16,94 mg/mL, esta concentração está na média de concentrações inibitórias de diferentes méis do país.

Por fim, sugere-se que sejam realizadas análises químicas e biológicas necessárias, tanto da planta quanto do mel, com o fim de complementar os dados obtidos e enriquecer os dados científicos, pouco explorados, da região Norte.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, R.P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatograph/Quadrupole Mass Spectroscopy**. Illions: Allured Publishing Corporation, 2001.
- AGARWAL, G.; VEMANARADHYA, G. G.; MEHTA, D. S. Evaluation of chemical composition and efficacy of Chinese própolis extract on *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacte actinomucetemcmitans*: Am *in vitro* study. **Contemporary Clinical Dentistry**. v. 3, n. 3, p. 256-261, jul-set. 2012.
- ALISSANDRAKIS, E. et al. Ultrasound-assisted extraction of volatile compounds from citrus flowers and citrus honey. **Food Chemistry**. v. 82, n.4, p. 575–582, set. 2003.
- ALISSANDRAKIS, E. et al. Aroma investigation of unifloral Greek citrus honey using solid-phase microextraction coupled to gas chromatographic–mass spectrometric analysis. **Food Chemistry**. v. 100, n. 1, p. 396–404, 2007.
- ALISSANDRAKIS, E. et al., Investigation of organic extractives from unifloral chestnut (*Castanea sativa L.*) and eucalyptus (*Eucalyptus globulus Labill.*) honeys and flowers to identification of botanical marker compounds. **Food Science and Technology**. v. 44, p. 1042-1051, oct. 2011.
- ALJADI, A.M.; KAMARUDDIN, M.Y. Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. **Food Chemistry**. v. 85, p. 513-518, 2004.
- ALVAREZ-SUAREZ, J. M. et al. Contribution of honey in nutrition and human health: a review. Mediterranean. **Journal of Nutrition and Metabolism**. v. 3, p.15–23, 2010a.
- ALVAREZ-SUAREZ, J. M. et al. Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. **Food and Chemical Toxicology**. v 48, n.8-9, p. 2490–2499, ago./set. 2010b.
- ALVES et al. Características físico-químicas de amostras de mel de *Melipona mandacaia* smith (hymenoptera: apidae) **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 25, n. 4, p. 644-650, out. dez. 2005.
- AL-MAMARY et al. Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. **Nutrition Research**. v. 22, p. 1041–1047, 2002.
- ALVES, E.; KUBOTA, E. H. Conteúdo de fenólicos, flavonoides totais e atividade antioxidante de amostras de própolis comerciais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. V. 34, n. 1, p. 37-41, 2013.
- ÂNGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, v. 66, n.1, p. 232-240, 2007.

ARAÚJO, P. G. L. et al.  **$\beta$ -caroteno, ácido ascórbico e antocianinas totais em polpa de frutos de aceroleira conservada por congelamento durante 12 meses.** Ciências Tecnologia de Alimentos. Campinas, v. 27, n. 1, p. 104-107, jan.-mar. 2007.

ATTYGALLE, A. B. Microchemical techniques. In: HAYNES, F. H.; MILLAR, J. G. (Org.). **Methods in Chemical Ecology: Chemical Methods.** Ed. Chapman e Hall. 1998, v. 1, p. 207-281.

BALTRUSAITYTĖ, V.; VENSKUTONIS, P. R.; CEKSTERYTE, V. Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts. **Food Chemistry.** v. 101, n. 2, p. 502–514, fev. 2007.

BARTH, M. O. **O pólen no mel brasileiro.** Rio de Janeiro: Luxor, 1989. 150p.

BARTH, O. M. Melissopalynogy in Brasil: a review of pollen analysis of honeys, propolis and pollen loads of bees. **Scientia Agricola.** v.61, n.3, p.342-350, 2004.

BAUDOIN, G.; TILLEQUIN, F.; KOCH, M. Isolement, structure et synthèse de la vochysine, pyrrolidinoflavanne de *Vochysia guianensis*. **Journal of Natural Products.** v. 46, n. 5, p. 681-687, set./out. 1983.

BERTONCELJ J. et al. LC-DAD-ESI/MS analysis of flavonoids and abscisic acid with chemometric approach for the classification of Slovenian honey. **Food Chemistry.** v. 127, n. 1, p. 296–302, jul. 2011.

BIESAGA; PYRZYNSKA. Stability of bioactive polyphenols from honey during different extraction methods. **Food Chemistry.** v. 136, n. 1, p. 46–54, jan. 2013.

BOUSETA, A; COLLIN, S. Optimized Likens-Nickerson Methodology for Quantifying Honey Flavors. **Journal Agricultural Food Chemistry.** v. 43, p. 1890 – 1897, 1995.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science e Technology.** London, v. 28, n. 1, p. 25-30, jul.1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa n. 11, de 20 de outubro de 2000. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel. **Diário Oficial da União,** Brasília, n. 204, out. 2000.

BUSER, H. R. et al. Determination of Double Bond Position in Mono-Unsaturated Acetates by Mass Spectrometry of Dimethyl Disulfide Adducts. **Analytical Chemistry.** v 55, n. 6, p. 818-822, may, 1983.

BURIOL, L. et al., Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico. **Química Nova.** Guarapuava, v. 32, n. 2, p. 296-302, fev. 2009.

CARMO-OLIVEIRA, R.; MORRETES, B. L. Stigmatic surface in the Vochysiaceae: reproductive and taxonomic implications. **Acta Botânica Brasileira.** v. 23, n. 3, São Paulo, Jul./Set. 2009.

- CHANG, C. et al. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Method. **Journal of Food and Drug Analysis**. v. 10, n.3, p. 178-182, may. 2002.
- CHANG, X. et al. Antioxidative, antibrowning and antibacterial activities of sixteen floral honeys. **Food function**. v. 2, p. 541-546, ago. 2011.
- COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **The Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 7, n. 2, p. 66-76, fev. 1996.
- CBA. Confederação Brasileira de Apicultura. Brasil Apícola. Disponível em: <<http://www.brasilapicola.com.br/brasil-apicola>>. Acesso em: 22 dez. 2011.
- CREWS, C. et al. determination of pyrrolizidine alkaloids in honey from selected sites by solid phase extraction and HPLC-MS. **Food additives and contaminants**. v. 14, n. 5, p. 419-428, jul. 1997.
- CROTTI, A. E. M. et al., Espectrometria de massas com ionização por “electrospray”: Processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química nova**. Ribeirão Preto, v. 29, n. 2, p. 287-292, jan. 2006.
- CUEVAS-GLORY, L. F. et al. A review of volatile analytical methods for determining the botanical origin of honey. **Food Chemistry**. v. 103, n. 3, p. 1032–1043, 2007.
- DEINZER, M. L. et al. Pyrrolizidine Alkaloids: Their Occurrence in honey from Tansy Ragwort (*Senecio jacobea L.*). **Science**. v. 195, p. 497-499, fev.1977.
- DOWD, Spectrophotometric Determination of . **Analytical chemistry**. v. 31, n. 07, p 1184-1187, jul. 1959.
- DUARTE, A. W. F. **Mel de abelhas nativas e africanizadas do Estado de Alagoas: composição química, segurança microbiológica e atividade terapêutica**. 2009. 141 p. Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Universidade Federal de Alagoas, Alagoas, 2009.
- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Florestas. **Manual Técnico da bracatinga (*Mimosa scabrella benth*)**. Curitiba, 1988. 70 p.
- ESTEVINHO, L. et al. Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. **Food and Chemical Toxicology**. v. 46, n. 12. p. 3774-3779. dez. 2008.
- ESTEVINHO et al. Organic honey from Trás-Os-Montes region (Portugal): Chemical, palynological., Microbiological and bioactive compounds characterization. **Food and Chemical Toxicology**. v. 50, n. 2, p. 258–264, fev. 2012

FABRE N. et al., Determination of Flavone, Flavonol, and Flavanone Aglycones by Negative Ion Liquid Chromatography Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry. **American Society for Mass Spectrometry**. v. 12, p. 707–715, may, 2001.

FEARNLEY, L. et al. Compositional analysis of manuka honeys by night-resolution mass spectrometry: Identification of a manuka-enriched archetypal molecule. **Food Chemistry**. v. 132, n. 2, p. 948-953, mai. 2012.

FEÁS, X. et al. Characterization of artisanal honey produced on the Northwest of Portugal by melissopalynological and physico-chemical data. **Food and Chemical Toxicology**. v. 48 n. 12, p. 3462–3470, dez. 2010.

FERRERES, F., et al. Natural Occurrence of Abscisic Acid in Heather Honey and Floral Nectar. **Journal Agricultural Food Chemistry** v. 44, p. 2053-2056, 1996.

FLACH, A. **Ecologia Química de Maxillariinae, Spathodea Campanulata e Meliponiinae**. 2005. 202p. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas. Campinas- SP. 2005.

FOLIN, O.; CIOCALTEU, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. **The Journal of Biological Chemistry**. v.73, p. 627-650, 1927.

FRANCIS, G. W. Alkylthiolation for the determination of double-bond position in unsaturated fatty acid esters. **Chemistry and Physics of Lipids**. v. 29, p. 369-374, set. 1981.

FRANCIS G. W.; VELAND K. Alkylthiolatio for the determination of double-bond positions in linear alkenes. **Journal of chromatography**. V. 219, p. 379-384, Amsterdam, jul. 1981.

GENOVESE, M. I. et al. Bioactive compounds and antioxidant capacity of exotic fruits commercial frozen pulps from Brazil. **Food Science and Technology**. v. 14, p. 207-214, 2008.

GHELDOLF, N.; WANG, X.; ENGESETH. N.J. Identification and Quantification of Antioxidant Components of Honeys from Various Floral Sources. **Journal Agric. Food Chemistry**. v. 50, p. 5870-5877, 2002.

GÓMES-CARAVACA, A. M. et al. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 41, p. 1220–1234, jun. 2006.

HALLIWELL, B; GUTERIDGE J. M. C. Oxygen free radicaís and iron in relation to biology and medicine : some problems and concepts. **Archieves of Biochemistry and Biophysis**. v 246, p 501-514, 1986.

HEYWOOD V. H. et al. **Flowrening Plant Families of the Wold**. Firefly Books LTD – Canadá. 2007. p.336.

HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. **Food and Chemical Toxicology**. v. 37, n. 9/10, p. 937-942, set./out. 1999.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. I. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 53, n. 6, p. 1881-1856, fev. 2005.

ISLAN, A. et al. Physicochemical and antioxidant properties of Bangladeshi honeys stored for more than one year. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. v. 12. p. 177, 2012.

IURLINA, M. O., et al., .Major flavonoids of Argentinean honeys. Optimisation of the extraction method and analysis of their content in relationship to the geographical source of honeys. **Food Chemistry**. v. 115, p. 1141–1149, jan. 2009.

JASICKA-MISIAK, I. et al. Phenolic compounds and abscisic acid as potential markers for the floral origin of two Polish unifloral honeys. **Food Chemistry**. v. 131, n. 4, p. 1149–1156, abr. 2012.

JATI, S. R. Qualidade do mel de abelha, no estado de Roraima, Brasil. **Ambiente: Gestão e Desenvolvimento**. v. 2, n. 1, p. 5-15, 2007.

JIMÉNEZ, J. J. et al., Quality assurance of commercial beeswax Part I. Gas chromatography–electron impact ionization mass spectrometry of hydrocarbons and monoesters. **Journal of Chromatography A**. v. 1024, p. 147–154, oct. 2004.

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

KHALIL, M. I.; SULAIMAN, S. A.; BOUKRAA, L. Antioxidant Properties of Honey and Its Role in Preventing Health Disorder. **The Open Nutraceuticals Journal**. v. 3, p. 6-16, 2010.

KHALIL, M. I. et al. Phenolic Acid Composition and Antioxidant Properties of Malaysian Honeys. **Journal of Food Science**. v. 76, n. 6, p. 21-28, mai. 2011.

LACERDA, J. J. J. et al. Influência das características físico-químicas e composição elementar nas cores de méis produzidos por *Apis mellifera* no Sudoeste da Bahia utilizando análise multivariada. **Química Nova**. Vitória da Conquista, v. 33, n. 5, p. 1022-1026, abr. 2010.

LACHMAN, et al. Evaluation of antioxidant activity and total phenolics of selected Czech honeys. **Food Science and Technology**. v. 43 p. 52–58, jun. 2010.

LEGLER, S. **Inspeção e controle de qualidade do mel**. SEBRAERN, Rio Grande do Norte, 26 abr. 2011. Disponível em: <r/agricultura/pesquisas/inspeção\_mel01.doc>. Acesso em: 26 abr. 2011.

LEONHARDT, S. D.; BLUTHGEN, N.; SCHMITT, T. Chemical Profiles of Body Surfaces and Nests from Six Bornean Stingless Bee Species. **Journal Chemical Ecology**. v. 37, p. 98-104, 2010.

LIANDA, R. L. P. **Perfil de substâncias fenólicas de méis brasileiros por cromatografia líquida de alta eficiência e avaliação do potencial antioxidante**. 2009. 156p. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

LITT, A.; CHEEK, M., *Korupodendron songweanum*, a new genus and species of Vochysiaceae from West-Central Africa. **American Journal of Botany**. v. 54, n. 1, p.13–17, mai. 2002.

LITT, A.; STEVENSON, D. W. Floral development and morphology of Vochysiaceae. I. The structure of the gynoecium. **American Journal of Botany**. v. 90, n. 11, p. 1533–1547, 2003.

MARQUES-SOUZA, A.C.; KERR, W.E. Mel amargo de breu (*Protium* sp., Burseraceae). **Acta Amazônica**. Manaus, v. 33, n. 2, p. 339-340, 2003.

MARGHITAS et al. In vitro antioxidant capacity of honeybee-collected pollen of selected floral Origin harvested from Romania. **Food Chemistry**. v. 115, n. 3, p. 878–883, ago. 2009.

MARTOS, I., et al. Flavonoid Composition of Tunisian Honeys and Propolis. **Journal Agric. Food Chemistry**. v. 45, p. 2824-2829, 1997.

MARTOS, I., et al. Identification of Flavonoid Markers for the Botanical Origin of *Eucalyptus* Honey . **Journal Agricultural Food Chemistry**. v. 48, p. 1498-1502, 2000.

MCNAB, H. et al., Negative ion ESI–MS analysis of natural yellow dye flavonoids—Anisotropic labelling study. **International Journal of Mass Spectrometry**. v. 284, p. 57–65, jun. 2009.

MEDA, A. et al. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkin Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**. v. 91, n. 3, p. 571-577, 2005.

MENSOR, L.L. et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**. v. 15, n. 2, p. 127-130, 2001.

MIGUEL et al. Phenols and antioxidant activity of hydro-alcoholic extracts of propolis from Algarve, South of Portugal. **Food and Chemical Toxicology**. v. 48, p. 3418–3423, 2010.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity Songklanakarín **Journal of Science and Technology**. v. 26, 2004.

MORAES, C. B.; LAGO, C. L. Espectrometria de Massas com ionização por “electrospray” aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas. **Química Nova**. Piracicaba, v. 26, n. 4, p. 556-563, 2003.

MOREIRA, R. F. A.; MARIA, C. A. B. Glicídios no mel. **Química Nova**. Rio de Janeiro, v. 24, n. 4, p. 516-525, 2001.

MOURA, S. G. **Boas práticas apícolas e a qualidade do mel de abelhas *Apis mellifera linnaeus*, 1758**. 2010. 76p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Piauí. Teresina. 2010.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications. **Lancaster**: Technomic, 1995.

NACZK, M; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**. v. 1054, n. 1-2, p. 95-111, out. 2004.

NASCIMENTO, D. L.; NASCIMENTO, F. S. Acceptance Threshold Hypothesis is Supported by Chemical Similarity of Cuticular Hydrocarbons in a Stingless Bee, *Melipona asilvai*. **Journal Chemical Ecology**. v.38, p. 1432-1440, oct. 2012.

NEGRELLE, R. R. B.; MOROKAWA R.; RIBAS, C. P. *Vochysia* Aubl. do Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum Biological Sciences**. Maringá, v. 29, n.1, p. 29-38, 2007.

CARNEVALE NETO, F. et al. *Vochysiaceae*: secondary metabolites, ethnopharmacology and pharmacological potential. **Phytochem Rev**. v. 10, p. 413–429, jun. 2011.

NIESSEN, W. M. A. Progress in liquid chromatography–mass spectrometry instrumentation and its impact on high-throughput screening. **Journal of Chromatography A**. v. 1000, p. 413–436, 2003.

NOGUEIRA-NETO, P. Notas sobre a história da apicultura brasileira. In: CAMARGO, J.M.F. **Manual de apicultura**. São Paulo, 1972. p. 17-29.

NUNES, T. M. et al. Chemical Signals in the Stingless Bee, *Frieseomelitta varia*, Indicate caste, Gender, Age and Reproductive Status. **Journal Chemical Ecology**. v. 35, p. 1172-1180, 2009.

OLIVEIRA, D. E. PRATES, E.R. PERALBA, M.C. Identificação e quantificação de *n*-alcanos presentes em ceras de plantas forrageiras. **Revista brasileira de zootecnia**. v. 26, n. 5, p. 881-886, 1997.

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

PAVIA, D. L. et al. Espectrometria de massas. In: PAVIA, D. L. et al. (Org.). **Introdução à espectroscopia**. Tradução: Pedro Barros. 4. ed. São Paulo: Centage Leanin, 2012. p. 399-499.

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

PASSOS, I. S. C. **Avaliação da atividade antioxidante e perfil cromatográfico de extratos do falso jaborandi (*Piper aduncum*)**. 2010. 88p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Vale do Rio Doce. Governador Valadares. 2010.

PIANARO, et al. Chemical Changes Associated with the Invasion of a *Melipona scutellaris* Colony by *Melipona rufiventris* Workers. **Journal Chemical Ecology**. v. 33, p. 971-984, abr. 2007.

PIANARO, A. **Ecologia Química de abelhas brasileiras: *Melipona rufiventris*, *Melipona scutellaris*, *Plebeia droryana*, *Nannotrigona testaceicornis*, *Tetragonisca angustula* e *Centris trigonoides***. 2007. 138p. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP. 2007.

POMINI, A. M. **Acil-Homosserina Lactonas Produzidas pelas Bactérias Fitopatogênicas *Pantoea ananatis* e *ethylobacterium mesophilicum* e Defesa Química no *Opilão oplobunus mexicanus***. 2009. 274 p. Tese (Doutorado em Ciências). Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas. Campinas-SP. 2009.

PONTIS, J. A. **Análise de voláteis, quantificação de fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante em méis de Roraima**. 2011. 132p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2011.

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

RIBEIRO, A. S; SANTOS, C.S. Apicultura uma alternativa na busca do desenvolvimento sustentável. **Revista Verde**. Mossoró, v.4, n.3, p. 01-06, jul./set. 2009.

SAMUELS, A. L. KUNST, L. Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. **Progress in Lipid Research**. v. 42, p. 51-80, 2003.

SANT'ANA, L. D.O. et al. Characterization of Monofloral Honeys with Multivariate Analysis of Their Chemical Profile and Antioxidant Activity. **Journal of Food Science**. v. 71, n. 1, p. 135-140, 2012.

SANTOS M. L.; AFONÇO, A. P.; OLIVEIRA, P. E. Biologia floral de *Vochysia cinnamomea* Pohl (Vochysiaceae) em cerrados do Triângulo Mineiro, MG. **Revista Brasileira de Botânica**. v. 20, n. 2, p. 119-126, São Paulo, dez, 1997.

SAWAYA, A. C. H. F. **Análise da composição química de própolis brasileira por espectrometria de massas**. 2006. 103p. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de química, Laboratório Thomson de Espectrometria de massas. 2006.

SEBRAE. Serviço de apoio às micro e pequenas empresas. **A apicultura no Brasil**. Disponível em: <[http://www.sebrae.com.br/setor/apicultura/sobre-apicultura/apicultura-no-brasil/historia/integra\\_bia/ident\\_unico/688](http://www.sebrae.com.br/setor/apicultura/sobre-apicultura/apicultura-no-brasil/historia/integra_bia/ident_unico/688)>. Acesso em: 27 nov. 2011.

RORAIMA (Estado). Secretaria de Estado do Planejamento e Desenvolvimento de Roraima. **Informações Socioeconômicas do Município de Cantá – RR 2010/ [Elaboração: Divisão de Estudos e Pesquisas]**. Boa Vista: CGEES/SEPLAN, 2010. 62 p.

SEREM; BESTER. Physicochemical properties, antioxidant activity and cellular protective effects of honeys from southern Africa. **Food Chemistry**. v. 133, p. 1544–1550, 2012.

SILVA, R. A. et al. Composição e propriedades terapêuticas do mel de abelha, **Alimentação nutrição**. Araraquara, v.17, n.1, p.113-120, jan./mar. 2006.

SILVA, S. J. R. **Fontes de pólen, pólen tóxico e mel amargo utilizados por três subespécies de abelhas *Apis mellifera* L., (africanas, italianas e cárnicas) na Amazônia Setentrional Roraima, Brasil**. 2005. 159p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2005.

SILVA, S. J. R.; REBOUÇAS, M. A. P. Plantas melíferas de Roraima – Parte II. **Boletim do Museu Integrado de Roraima**. Boa Vista, v. único, n. 4, p. 31-38, 1998.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrofotométrica de compostos orgânicos**. Tradução: Alencastro, R. B. 7ª ed., Rio de Janeiro: LTC, 2007, 490p.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia - Da Planta ao Medicamento**. Florianópolis: UFRGS, 2007. 1097p.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista Nutrição**. v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SOCHA, R. et al. Phenolic profile and antioxidant properties of Polish honeys. **International Journal of Food Science and Technology**. v. 46, p. 528–534, 2011.

SOUZA, D. C. A história da apicultura no Brasil. **SEBRAE**, São Paulo, 27 nov. 2011. Disponível em: <[http://sebrae.com.br/setor/apicultura/sobre-apicultura/apiculturanoBrasil/historia/integra\\_bia/ident\\_unico/688](http://sebrae.com.br/setor/apicultura/sobre-apicultura/apiculturanoBrasil/historia/integra_bia/ident_unico/688)>. Acesso em: 27 nov. 2011.

SPAYD et al. Separation of Sunlight and Temperature Effects on the Composition of *Vitis vinifera* cv. Merlot Berries. **American Society for Enology and Viticulture**. v. 53, n. 3, 2002.

STEFANELLO, M. É. A. Óleo essencial de *Gochnatia polymorpha* (LESS) cabr. ssp *Floccosa* Cabr. **Química Nova**. Curitiba, v. 29, n. 5, p. 999-1002, jul. 2006.

TAN, S. T. et al. Extractives from New Zealand Unifloral Honeys. 2. Degraded Carotenoids and Other Substances from Heather Honey. **Journal Agricultural Food Chemistry**. v. 37, n. 5, p. 1217-1221, 1989.

TENORE et al. Nutraceutical potential of monofloral honeys produced by the Sicilian black honeybees (*Apis mellifera* ssp. *Sicula*). **Food and Chemical Toxicology**. v. 50, p. 955–1961, 2012.

TRUCHADO, P.; FERRERES, F.; TOMAS-BARBERAN, F. A. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry reveals the widespread occurrence of flavonoid glycosides in honey, and their potential as floral origin markers. **Journal of Chromatography A**. v. 1216, n. 43, p. 7241–7248, out. 2009.

TYLKOWSKI, B. et al. Extraction of biologically active compounds from propolis and concentration of extract by nanofiltration. **Journal of Membrane Science**. v. 348, v. 1-2, p. 124–130, fev. 2010.

UENOJO, M.; JÚNIOR, M. M. R.; PASTORE, G. M. Carotenóides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. **Química Nova**. v. 30, n. 3, p 616-622, 2007.

VALENCIA et al. Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran própolis. **Food Chemistry**. v. 131, p. 645–651, 2012.

VAN DEN DOOL, J.; KRATZ, P. D. J. Generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal Chromatography**. v. 11, p. 463-471, 1963.

VARGAS, T. **Avaliação da qualidade do mel produzido na região dos Campos Gerais do Paraná**. 2006. 134p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Ponta Grossa. Ponta Grossa. 2006.

VIDAL, D. M. **Identificação e síntese dos componentes do feromônio sexual de *Condylorrhiza vestigialis* (LEP.: CRAMBIDAE) E *Edessa meditabunda* (HEM: PENTATOMIDAE)**. 2012. 207p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2012.

VIANNA, M. C. Vochysiaceae na reserva biológica de poço das antas, Silva Jardim, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**. Rio de Janeiro, v. 57, n. 3, p. 659-666, 2006.

VIUDA-MARTOS, M. et al. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. **Journal of Food Science**. v. 73, n. 9, p. 117-124, 2008.

VOGEL S.; HADACEK. F. Contributions to the functional anatomy and biology of *Nelumbo nucifera* (Nelumbonaceae) III. An ecological reappraisal of floral organs. **Plant Systematics and Evolution**. v. 249, p. 173–189, oct. 2004.

WIEDENFELD, H. Plants containing pyrrolizidine alkaloids: toxicity and problems. **Food Additives and Contaminants**. v. 28, n. 3, p. 282-292, mar. 2011.

WITKOWSKA-BANASZCZAK, E. Identification of the components of the essential oil from *Trollius europaeus* flowers. **Acta Physiol Plant**. v. 35, p. 1421-1425, dez. 2013.

YANG, Y. et al. Melissopalynological origin determination and volatile composition analysis of Corsican “chestnut grove” honeys. **Food Chemistry**.v. 132, n. 4, p. 2144-2154, jun. 2012.

YAO, L., et al. Flavonoids, phenolic acids and abscisic acid in Australian and New Zealand *Leptospermum* honeys. **Food Chemistry**. v. 81, n. 2, p. 159-168, may. 2003.

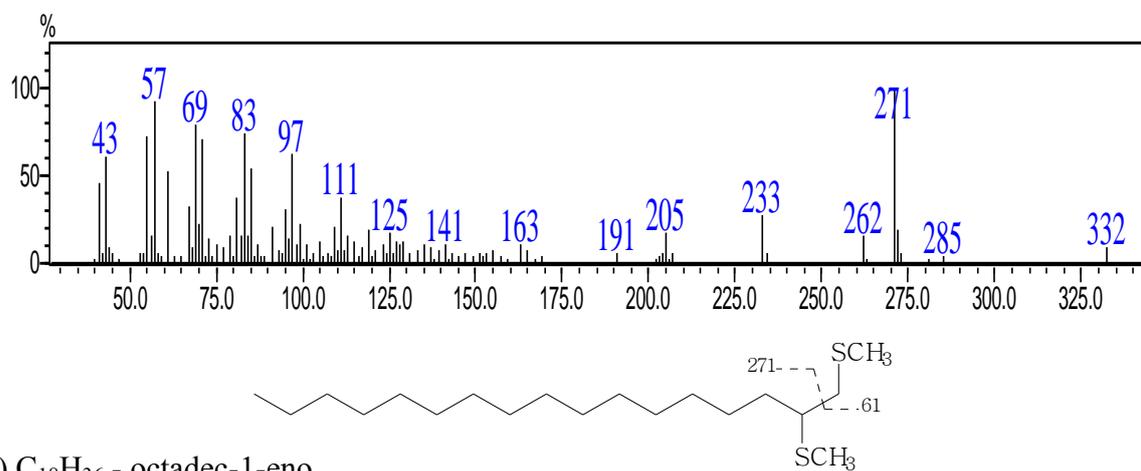
YAO, L., et al. Phenolic acids and abscisic acid in Australian *Eucalyptus* honeys and their potential for floral authentication. **Food Chemistry**. v. 86, n. 2, p. 169–177, jul. 2004.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonoides. In: SIMÕES, C. M. O. et al.(org.) **Farmacognosia - Da Planta ao Medicamento**. Florianópolis: UFRGS, 2007.p. 577- 614.

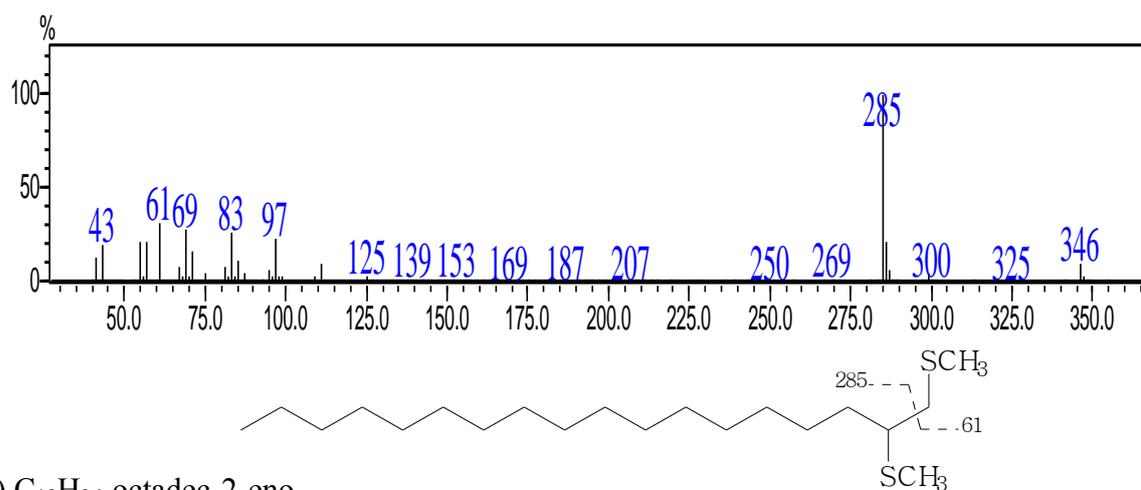
## APÊNDICES

Espectros de massas de alcenos derivatizados com DMDS.

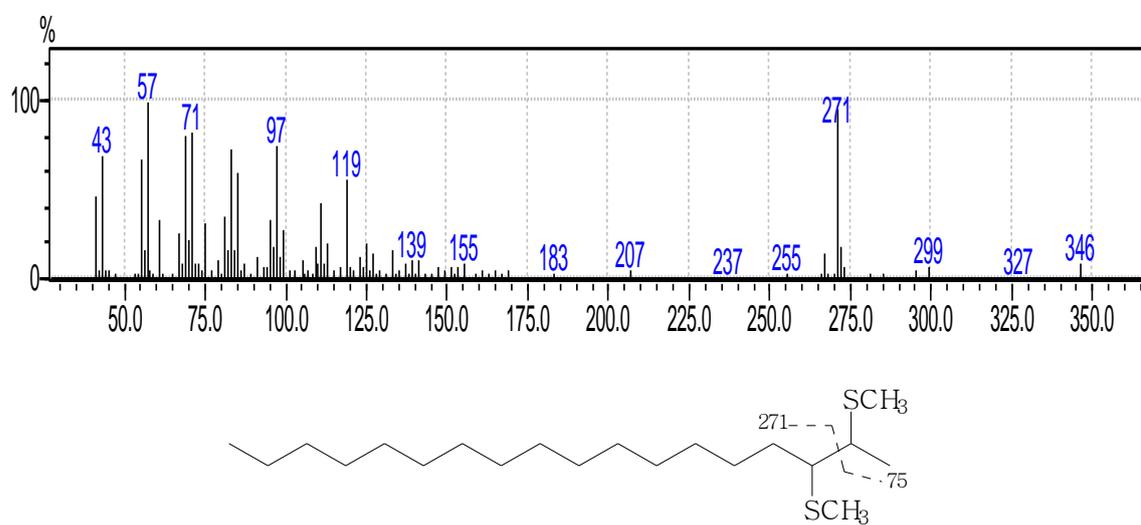
a)  $C_{17}H_{34}$  – heptadec-1-eno

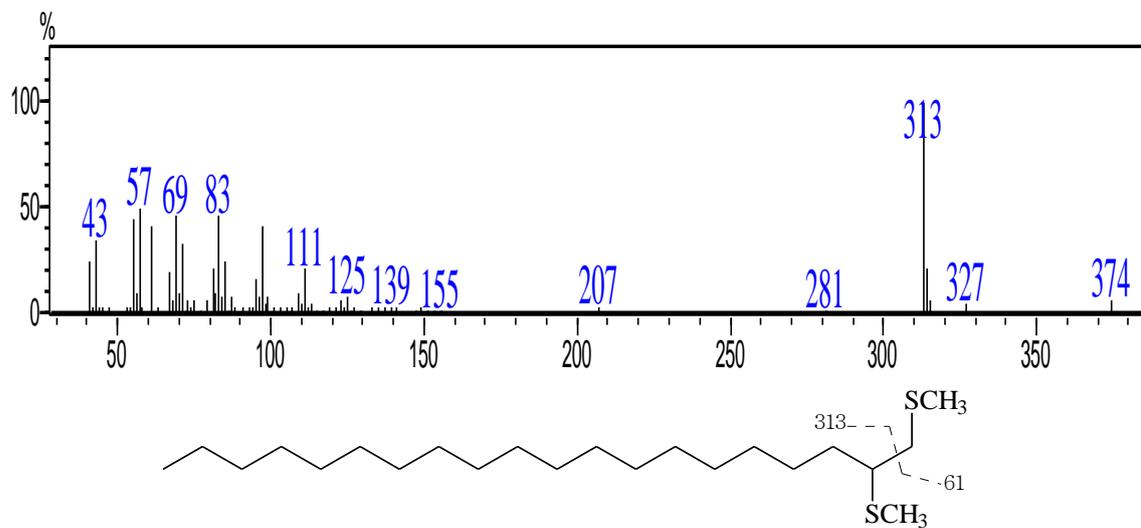
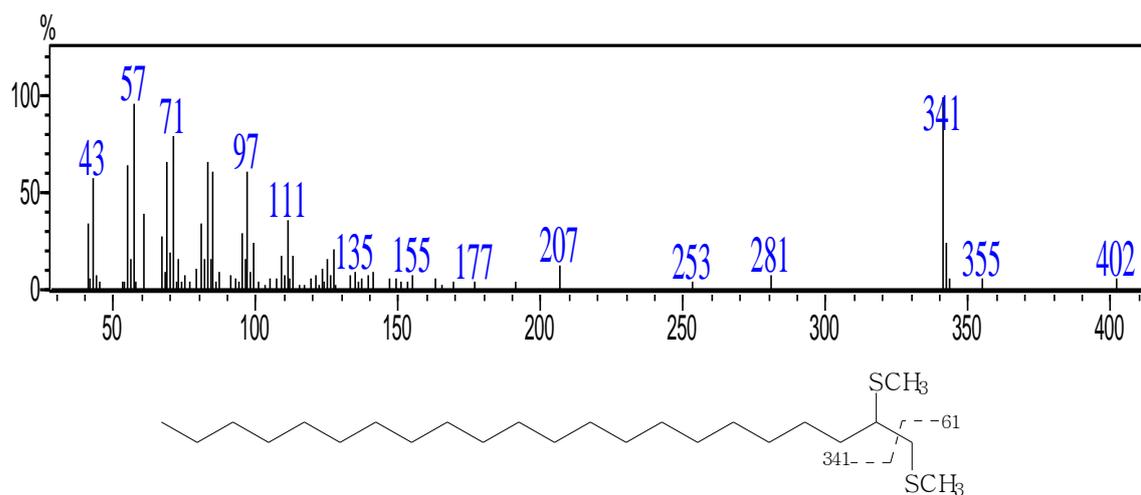


b)  $C_{18}H_{36}$  - octadec-1-eno



c)  $C_{18}H_{36}$ -octadec-2-eno



d) C<sub>20</sub>H<sub>40</sub> – heicos-1-enoe) C<sub>22</sub>H<sub>44</sub> - docos-1-enof) C<sub>24</sub>H<sub>48</sub> - tetracos-1-eno