

Mônia Stremel Azevedo

**MEL DE MELATO DE BRACATINGA (*Mimosa scabrella*  
Bentham) DO PLANALTO SERRANO DE SANTA  
CATARINA: DISCRIMINAÇÃO E POTENCIALIDADE  
FUNCIONAL**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do título de Doutor em Ciência dos Alimentos.  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Carolina de Oliveira Costa.

Florianópolis  
2017

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

Azevedo, Mônia Stremel

Mel de Melato de Bracatinga (*Mimosa scabrella* bentham) do Planalto Serrano de Santa Catarina: Discriminação e Potencialidade Funcional / Mônia Stremel Azevedo ; orientadora, Ana Carolina de Oliveira Costa. – Florianópolis, SC, 2017.

201p.

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

Inclui referências

1. Ciência dos alimentos. 2. Mel de melato de bracatinga. 3. Aminoácidos livres e proteínas. 4. Compostos fenólicos e minerais. 5. Alimento funcional. I. Costa, Ana Carolina de Oliveira. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. III. Título.

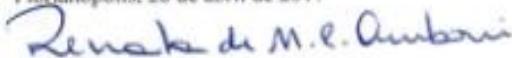
**MEL DE MELATO DE BRACATINGA (*Mimosa scabrella* Bentham)  
DO PLANALTO SERRANO DE SANTA CATARINA:  
DISCRIMINAÇÃO E POTENCIALIDADE FUNCIONAL**

Por

**Mônia Stremel Azevedo**

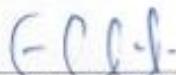
Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de "Doutorado em Ciência dos Alimentos", e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos.

Florianópolis, 28 de abril de 2017

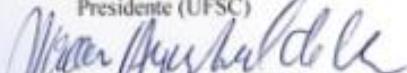


Prof. (a). Dr. (a). Renata Dias de Mello Castanho Amboni  
Coordenador

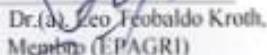
**Banca Examinadora:**



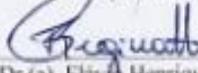
Prof.(a). Dr.(a). Edna Regina Amante,  
Presidente (UFSC)



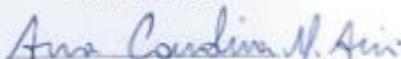
Prof.(a). Dr.(a). Marco Antônio Leal de Oliveira,  
: Membro (UFJF)



Dr.(a). Zeo Teobaldo Kroth,  
Membro (EPAGRI)



Prof.(a). Dr.(a). Flávio Henrique Reginatto,  
Membro (UFSC)



Prof.(a). Dr.(a). Ana Carolina Maisonnave Arisi,  
Membro (UFSC)



Este trabalho é dedicado à apicultura catarinense sustentável, socialmente justa e ambientalmente correta.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Grande Arquiteto do Universo pelas pessoas e oportunidades a mim presenteadas! Em especial, para a conclusão desta importante etapa, gostaria de agradecer:

Ao meu amado esposo e companheiro *para o que der e vier* Cristiano Rodrigo Azevedo, pelo incentivo incondicional para conclusão de mais esta etapa em nossa vida, mesmo em momentos difíceis, me lembrando a cada dia, que obstáculos surgem para nos fazer mais fortes! Obrigado pelo amor, companheirismo e compreensão! Te amo imensamente!

Aos meus pais, Osnir Carlos Stremel e Iara Cardoso Stremel, que sempre se fizeram presentes de coração e em oração, fazendo do amor e alegria a chave para transmitir força, tranquilidade e paz para a filha! Amo vocês imensamente!

Ao irmão de coração Leandro Azevedo (*in memoriam*), pelo apoio e incentivo para chegarmos até aqui. Você também faz parte desta conquista! Te amamos imensamente!

À minha especialíssima Orientadora, Profa. Dra. Ana Carolina de Oliveira Costa, pela oportunidade de realização deste trabalho e confiança depositada! Imensamente agradecida por todo o apoio, ensinamentos e amizade ao longo deste período, me fazendo evoluir a cada dia, pessoal e profissionalmente! Obrigada por, simplesmente, tudo nesta jornada!

Aos demais membros do Laboratório de Química de Alimentos pela amizade, aprendizado e convivência feliz diária! Em especial à Profa. Roseane Fett pela acolhida com alegria e apoio de sempre! Ao Luciano Gonzaga pela parceria, ensinamentos, apoio, amizade e sugestões sempre importantes para a realização deste trabalho! Às colegas de estudo de mel de melato de bracinga Siluana Seraglio, Greice Bergamo e Gabriela Rocha: vocês fazem parte deste trabalho de *corpo e alma*, não tenho palavras para agradecer cada minuto dedicado de nossa convivência e troca de experiências e principalmente, por tornarem leves cada dia de trabalho intenso.

Ao Engenheiro Agrônomo Saulo Luis Poffo da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina pela parceria, oportunidades de aprendizagem, trabalhos de campo e contatos com apicultores colaboradores, imprescindíveis para a realização deste estudo.

Aos apicultores colaboradores do Planalto Serrano de Santa Catarina pela contribuição com amostras, convívio, ensinamentos e,

principalmente, por acreditarem na pesquisa: José Charles Becker, Edson José Wiguers, Adorli Nheus, Fabiano Ferreira de Melo, José Alceu Perão, Indalécio Borguesan e Alfonso Pickler, Jovets Peres da Silva e Mariléia Corrêa da Silva e Natal Roberto Corrêa.

Aos membros do Laboratório de Biologia Molecular pela acolhida e dias felizes de trabalho no estudo de proteômica em mel, em especial, à Profa. Dra. Ana Carolina Maisonave Arisi por disponibilizar o laboratório, apoio técnico e científico e sua importante colaboração para a realização deste trabalho, ao colega Pedro Alexandre Valentim Neto pela parceria alegre, ensinamentos e apoio técnico importantes para a realização e sucesso deste estudo e à colega Gabriela Rossi pelas valorosas trocas de experiências e pelo apoio técnico no treinamento para tratamento de dados.

Ao Serviço Laboratorial Avançado de Santa Catarina do Laboratório Nacional Agropecuário do Rio Gande do Sul do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, nas pessoas de Heitor Daguer e Andressa Camargo Valesse pela disponibilização de laboratório e apoio para a determinação de compostos fenólicos deste trabalho. Querida companheira de jornada Andressa, imensurável nosso aprendizado nesta etapa de nossas vidas, crescemos juntas e a cada dia. Obrigada pela parceria e amizade!

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

Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior pela bolsa concedida.

Aos Professores Drs. Marcone Augusto Leal de Oliveira, Flávio Henrique Reginatto, Ana Carolina Maisonnave Arisi, Edna Regina Amante, Roseane Fett e Leo Teobaldo Kroth por aceitarem o convite para participar da banca examinadora e pelas contribuições a este trabalho.

Aos grandes Amigos e Mestres que me apoiaram e incentivaram desde o início do retorno de minha carreira acadêmica, Prof. Dr. Flávio Henrique Reginatto, Prof. Dr. Gustavo Amadeu Mücke e Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira, meu eterno agradecimento.

*"Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer."*

*Albert Einstein*



AZEVEDO, M. S. **Mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) do Planalto Serrano de Santa Catarina: discriminação e potencialidade de alimento funcional.** 2017. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 201 p.

## RESUMO

O mel, além de altos teores de frutose e glicose, apresenta em sua composição menores concentrações de compostos com importantes propriedades nutricionais e discriminatórias. Méis de melato têm sido especialmente valorizados pelo sabor forte característico e possíveis efeitos benéficos à saúde quando comparados aos méis florais, incluindo mel de melato de bracatinga (MMB), obtido a partir de exsudato de cochonilhas (*Tachardiella* sp) que infestam a espécie bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham). Assim, a discriminação com relação à garantia de origem em termos de fonte (floral ou melato) e identificação geográfica, bem como a avaliação de classes de compostos com possíveis propriedades bioativas, se tornam importantes aspectos de controle de qualidade e autenticidade. Devido à relevância econômica e produtiva no mercado internacional e escassez de estudos sobre o MMB, os objetivos deste estudo foram: determinar aminoácidos livres (AAL) a fim de elucidar a contribuição de cochonilhas (*Tachardiella* sp) e abelhas (*Apis mellifera*) ao MMB e discriminar geograficamente este mel de cinco municípios do Planalto Serrano de Santa Catarina utilizando quimiometria; discriminar méis de melato e floral, de mesma espécie botânica (*Mimosa scabrella* Bentham) a partir da comparação do perfil de proteoma utilizando análise de componentes principais (PCA); e determinar compostos fenólicos totais (TCP) e individuais, minerais e capacidade antioxidante *in vitro* pelos mecanismos de captura de radical livre (DPPH) e redução férrica (FRAP) a fim de avaliar a qualidade com relação à potencialidade funcional. Os resultados obtidos evidenciaram a presença predominante dos AAL serina (Ser), prolina (Pro), asparagina (Asn), ácido aspártico (Asp) e ácido glutâmico (Glu) com concentrações que variaram de < LQ para Pro, Asn e Asp a 1216 mg kg<sup>-1</sup> para Glu em melato de cochonilhas (M), e de 56,7 mg kg<sup>-1</sup> para Ser a 1447 mg kg<sup>-1</sup> para Glu em MMB; a partir desta determinação observou-se uma efetiva contribuição de Pro pela abelha ao MMB e a discriminação de acordo com sua origem geográfica utilizando quimiometria. O perfil de proteoma apresentou um maior valor médio

de *spots* proteicos em MMB (160) quando comparado ao mel floral de bracatinga (84) e *spots* proteicos comuns (45), que quando submetidos à PCA, discriminou estes méis de mesma espécie botânica. As concentrações obtidas para as capacidades antioxidantes *in vitro* variaram de 16,5 a 43,4 mg EAA 100 g<sup>-1</sup> para DPPH e de 523 a 1004 μmol FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 100 g<sup>-1</sup> para FRAP, e de 84,4 a 197 mg EAG 100 g<sup>-1</sup> para TPC que, quando comparado a outros méis de melato, o MMB apresentou maiores resultados; além disto, apresentou maior número e diversidade de compostos fenólicos individuais, maiores concentrações de quercetina e ácidos benzoico, cafeico, clorogênico, ferúlico, cumárico e siríngico, compostos predominates diferenciados (ácido benzoico: 46,7 a 1520 μg 100g<sup>-1</sup>, ácido 3,4-dihidroxibenzoico: 96,7 a 228 μg 100g<sup>-1</sup> e ácido salicílico: de 75,7 a 830 μg 100g<sup>-1</sup>) e compostos fenólicos ainda não reportados em méis de melato (coniferaldeído, hesperidina, isoramnetina, pinobanksina). Os macroelementos de maior concentração foram K<sup>+</sup> (de 2323 a 6332 mg kg<sup>-1</sup>), Ca<sup>2+</sup> (de 4,80 a 140 mg kg<sup>-1</sup>) e Mg<sup>2+</sup> (de 40,4 a 80,7 mg kg<sup>-1</sup>), apresentando maiores concentrações destes e menores concentrações de Na<sup>+</sup> (de 2,42 a 13,3 mg kg<sup>-1</sup>) quando comparado a méis de melato de outros estudos. A análise de matriz de correlação de Pearson entre as determinações de TPC, DPPH, FRAP, compostos fenólicos individuais e minerais demonstrou potencial influência sinérgica dos macroelementos na ação antioxidante através dos mecanismos analisados. A partir destes resultados, juntamente com as ações funcionais evidenciadas *in vivo* de méis relacionadas aos compostos antioxidantes e potencial sinergismo constituintes da menor fração da composição melífera, o MMB demonstrou características benéficas potenciais de propriedades funcionais. Além disto, a determinação de AAL e perfil proteômico, associados às ferramentas quimiométricas, podem representar uma estratégia analítica para autenticação de MMB com relação à discriminação geográfica e entre tipos de méis (floral e melato), respectivamente.

**Palavras-chave:** Mel de melato. *Mimosa scabrella* Benth. Aminoácidos livres. Proteínas. Compostos fenólicos. Minerais. Alimento funcional.

## ABSTRACT

Honey, besides high levels of fructose and glucose, present in its composition, compounds in smaller concentrations of special interest with important nutritional and discriminatory properties. Honeydew honeys have been specially valued because of the different sensory attributes and possible health beneficial effects when compared to floral honeys, including bracatinga honeydew honey (Bhh), obtained from exudates of plant-sucking insects (*Tachardiella* sp.) that infest the bracatinga species (*Mimosa scabrella* Bentham). Then, discrimination with respect to origin guarantee in terms of source (floral or honeydew) and geographic identification, as well as evaluation from compound classes with potential bioactive properties, become important aspects of quality control and authenticity. Due to the economic and productive importance in the international market and lack of studies about Bhh, the aims of this study were: to determine free amino acids (FAA) to elucidate the contribution from plant-sucking insects (*Tachardiella* sp.) and bees (*Apis mellifera*) to the Bhh and to discriminate geographically this honey from five municipalities of the Serrano Plateau from Santa Catarina using chemometrics; to discriminate floral and honeydew honeys of the same botanical species (*Mimosa scabrella* Bentham) from the comparison of the proteome profile using principal component analysis (PCA); and to determine total phenolic compounds (TPC) and individual phenolic compounds, minerals and *in vitro* antioxidant capacity by free radical capture (DPPH) and ferric reducing (FRAP) mechanisms in order to evaluate the quality in relation to functional potentiality. The results obtained evidenced the predominant presence of the FAA serine (Ser), proline (Pro), asparagine (Asn), aspartic acid (Asp) and glutamic acid (Glu) with concentrations ranging from <LQ for Pro, Asn and Asp at 1216 mg kg<sup>-1</sup> for Glu in honeydew from plant-sucking insects (H) and from 56.7 mg kg<sup>-1</sup> for Ser at 1447 mg kg<sup>-1</sup> for Glu in Bhh; from this determination an effective contribution of Pro by the bee to the Bhh and the discrimination according to its geographical origin using chemometrics was observed. The proteome profile showed a higher average value of protein spots in Bhh (160) compared to the bracatinga floral honey (84) and common protein spots (45), which when subjected to the PCA, discriminated these honeys from same botanical species. The concentrations obtained for *in vitro* antioxidant capacities ranged from 16.5 to 43.4 mg AAE 100 g<sup>-1</sup> for DPPH and from 523 to 1004 μmol FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 100 g<sup>-1</sup> for FRAP, and from 84.4 a 197 mg GAE 100 g<sup>-1</sup> for TPC which, when compared to other honeydew

honey, Bhh showed higher results; furthermore presented higher number and diversity of individual phenolic compounds, higher concentrations of quercetin and benzoic, caffeic, chlorogenic, ferulic, cumaric and syringic acids, differentiated major compounds (benzoic acid: from 46.7 to 1520  $\mu\text{g } 100\text{g}^{-1}$ , 3,4-dihydroxybenzoic acid: 96.7 to 228  $\mu\text{g } 100\text{g}^{-1}$  and salicylic acid: 75.7 to 830  $\mu\text{g } 100\text{g}^{-1}$ ) and phenolic compounds not yet reported in honeydew honeys (coniferaldehyde, hesperidin, isorhamnetin and pinobanksin). The predominant macroelements were  $\text{K}^+$  (from 2323 to 6332  $\text{mg } \text{kg}^{-1}$ ),  $\text{Ca}^{2+}$  (from 4.80 to 140  $\text{mg } \text{kg}^{-1}$ ) and  $\text{Mg}^{2+}$  (from 40.4 to 80.7  $\text{mg } \text{kg}^{-1}$ ), showing higher concentrations of these and lower concentrations of  $\text{Na}^+$  (from 2.42 to 13.3  $\text{mg } \text{kg}^{-1}$ ) when compared to honeydew honeys from other studies. Pearson correlation matrix analysis between TPC, DPPH, FRAP, individual phenolic compounds and minerals showed potential synergistic influence of the macroelements on the antioxidant action through the mechanisms analyzed. From these results and functional actions evidenced *in vivo* of honeys related to the antioxidant compounds and potential synergism of constituents of the smallest fraction of the honey composition, the Bhh demonstrated potential beneficial characteristics of functional properties. In addition, the AAL determination and proteomic profile, associated with chemometric tools, can represent an analytical strategy for authentication of this honey with respect to the geographical discrimination and kinds of honeys (floral and honeydew), respectively.

**Keywords:** Honeydew honey. *Mimosa scabrella* Bentham. Free amino acids. Proteins. Phenolic compounds. Minerals. Functional food.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema do estudo em mel de melato de bracatinga.....	31
Figura 2: (a) Vista de povoamento nativo de bracatinga. (b) Tronco reto: casca interna e externa. (c) Detalhes de folhas e flores. (d) Galho com folhas, flores e frutos. ....	42
Figura 3: Coleta de melato para produção de mel de melato de bracatinga. ....	44
Figura 4: (a) Esquema de coleta de floema pela cochonilha; (b) esquema de câmara filtro do sistema digestivo de um Homóptero. ....	46
Figura 5: Anatomia interna da abelha. ....	47
Figura 6: Exsudato de cochonilha (melato) em bracatingas coletado pelas abelhas para produção de mel.....	48
Figura 7: Distribuição da produção regional de mel (%) no Brasil em 2015.....	49
Figura 8: Municípios de amostragem do Planalto Serrano de Santa Catarina.....	69
Figura 9: Diagrama simplificado da reação (a) e do procedimento (b) de derivatização utilizado pelo Kit EZ: faast GC-MS for free amino acid analysis. ....	70
Figura 10: TIC obtido pelo GC-MS para mistura de 32 aminoácidos livres (100 nmol mL <sup>-1</sup> ) e PI (Norvalina 200 nmol mL <sup>-1</sup> ). ....	75
Figura 11: TIC obtido pelo GC-MS para amostras de (a) mel de melato de bracatinga e (b) melato de cochonilhas.....	76
Figura 12: (a) Dendograma para municípios do Planalto Serrano de Santa Catarina resultante de CA dos dados correspondentes às concentrações de aminoácidos livres (AAL) em mel de melato de bracatinga (MMB). (b) Pesos resultantes de PCA para AAL de MMB. (c) Escores resultantes de PCA para regiões do planalto serrano de SC correspondentes às concentrações de AAL. ....	87
Figura 13: Escores resultantes de PCA para amostras de mel de melato de bracatinga e mapa geográfico dos municípios do Planalto Serrano de Santa Catarina. ....	89
Figura 14: Microfotografia do tipo polínico da espécie <i>Mimosa scabrella</i> Bentham.....	111
Figura 15: Mapas representativos de perfil proteico de mel floral de bracatinga (MFB) e mel de melato de bracatinga (MMB). Primeira dimensão: 250 µg de proteínas em tampão IPG foram adicionados aos strips com gradiente linear de pH 3 a 10; segunda dimensão: géis SDS-PAGE 12,5% e coloração com Coomassie Brilliant Blue G-250.....	112

Figura 16: Escores resultante de PCA para mel de melato de bracatinga (MMB) e mel floral de bracatinga (MFB) correspondentes aos 45 spots comuns (Vol %). .....	115
Figura 17: Resultados obtidos (média ± DP) de TPC (compostos fenólicos totais, mg EAG 100 g <sup>-1</sup> ), DPPH (capacidade antioxidante por captura de radical, mg EAA 100 g <sup>-1</sup> ) e FRAP (capacidade antioxidante por redução férrica, µmol FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 100 g <sup>-1</sup> ) para as regiões de BS, UP, LG, BR e UB.....	150
Figura 18: Resultados obtidos na determinação de compostos fenólicos para as regiões de BS, UP, LG, BR e UB.....	159
Figura 19: Resultados obtidos para cátions (média ± DP) para as regiões de BS, LG, BR e UB de K <sup>+</sup> (a), Na <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup> e Mg <sup>2+</sup> (b).....	168

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores permitidos para os parâmetros físico-químicos de identidade e qualidade de mel floral/mel de melato, respectivamente, conforme órgãos regulamentadores.....	36
Tabela 2 Comparação entre teores médios de alguns parâmetros de identidade e qualidade de mel de melato e mel floral.....	39
Tabela 3: Avaliação do desempenho analítico de aminoácidos livres por GC-MS. ....	77
Tabela 4: Concentrações médias ( $\text{mg kg}^{-1} \pm U$ ) de aminoácidos livres em amostras de mel de melato de bracatinga (MMB) e melato de cochonilhas (M).....	80
Tabela 5: Concentração média ( $\text{mg kg}^{-1} \pm U$ ) de aminoácidos livres em mel de melato de bracatinga. ....	83
Tabela 6: Aminoácidos livres ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) obtidos por outros autores em méis de melato e floral.....	85
Tabela 7: Correlações obtidas em análise de matriz de correlação. ....	86
Tabela 8: Número de spots totais, spots comuns (%), coeficientes angulares ( $a$ ) e coeficientes de correlação ( $r$ ) de gráficos de dispersão de mapas 2DE dos dois tipos de méis (MMB e MFB) de mesma espécie <i>Mimosa scabrella</i> Bentham. ....	113
Tabela 9: Número de spots médios, desvio padrão (DP), spots comuns e desvio padrão relativo (DPR) de mapas 2DE dos dois tipos de méis (MMB e MFB) de mesma espécie <i>Mimosa scabrella</i> Bentham. ....	113
Tabela 10: Coeficientes angulares ( $a$ ) e coeficientes de correlação ( $r$ ) dos gráficos de dispersão dos mapas 2DE para comparação entre replicatas de preparo dos dois tipos de méis (MMB e MFB) de mesma espécie <i>Mimosa scabrella</i> Bentham. ....	114
Tabela 11: Resultados obtidos para compostos fenólicos totais (TPC), capacidades antioxidantes por captura de radical (DPPH) e redução férrica (FRAP) em amostras de mel de melato de bracatinga. ....	148
Tabela 12: Capacidades antioxidantes obtidas por outros autores em méis de melato. ....	151
Tabela 13: Concentração ( $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ) de compostos fenólicos em mel de melato de bracatinga ( <i>Mimosa scabrella</i> Bentham) das regiões de Bocaina do Sul e Urupema (SC).....	153
Tabela 14: Concentração ( $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ) de compostos fenólicos em mel de melato de bracatinga ( <i>Mimosa scabrella</i> Bentham) das regiões de Urupema, Lages e Bom Retiro (SC).....	155

Tabela 15: Concentração ( $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ) de compostos fenólicos em mel de melato de bracatinga ( <i>Mimosa scabrella</i> Bentham) das regiões de Bom Retiro e Urubici (SC). .....	157
Tabela 16: Compostos fenólicos quantificados por outros autores em méis de melato de outras espécies ( $\mu\text{g } 100\text{g}^{-1}$ ).....	161
Tabela 17: Avaliação da performance analítica de minerais por CZE-DAD .....	165
Tabela 18: Concentração ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) de cátions por CZE-DAD em mel de melato de bracatinga ( <i>Mimosa scabrella</i> Bentham). .....	167
Tabela 19: Cátions observados por outros autores em méis de melato ( $\text{mg kg}^{-1}$ ).....	170
Tabela 20: Valores de correlações ( $r$ ) obtidos entre as determinações de compostos fenólicos ( $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ), minerais ( $\text{mg kg}^{-1}$ ), TCP ( $\text{mg GAE } 100\text{g}^{-1}$ ), DPPH ( $\text{mg AAE } 100\text{g}^{-1}$ ) e FRAP ( $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O } 100\text{g}^{-1}$ ). .....	172
Tabela 21: Faixas de teores de carboidratos, macroelementos e compostos fenólicos obtidos em mel de melato de bracatinga ( <i>Mimosa scabrella</i> Bentham) na mesorregião do planalto serrano de SC, valores de ingestão dietética de referência (DRI) e ingestão diária recomendada (IDR). .....	174

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Amostragem de mel de melato de bracatinga (MMB) e melato de cochonilha (M).....	68
Quadro 2: Compostos fenólicos encontrados em méis de melato. ....	134
Quadro 3: Informações relacionadas à amostragem de mel de melato de bracatinga .....	139
Quadro 4: Gradiente de fase móvel para separação cromatográfica de compostos fenólicos. ....	142



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 2DE: Eletroforese em gel bidimensional (do inglês, *two dimensional gel electrophoresis*)
- 2DE PAGE: Eletroforese em gel bidimensional de poliacrilamida (do inglês *two dimensional gel electrophoresis polyacrylamide gel electrophoresis*)
- 5-HMF: 5-Hidroximetilfurfural
- $\alpha$ : coeficiente angular
- AAL: Aminoácidos livres
- AOAC: Associação Oficial de Químicos Analistas, do inglês *Association of Official Analytical Chemists*
- Asn: Asparagina
- Asp: Ácido aspártico
- BR: Bom Retiro
- BS: Bocaina do Sul
- CA: Análise de agrupamentos, do inglês *cluster analysis*
- CHAPS: 3-[(3-Colamidopropil)dimetilamônio]-2-hidroxi-1-propanosulfonato, do inglês 3-[(3-*cholamidopropyl*)*dimethylammonio*]-1-*propanesulfonate*.
- CTBA: Brometo de cetil-trimetil-amônio, do inglês *cetyltrimethylammonium bromide*
- CZE-DAD: Eletroforese capilar de zona com detector de arranjo de diodos, do inglês *capillary zone electrophoresis-diode array detector*)
- DPPH: Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil, do inglês *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*
- DPR: Desvio padrão relativo
- DRI: Ingestão dietética de referência, do inglês *dietary reference intakes*
- DTT: 1,4-Ditiotreitol
- EAA: Equivalente ao ácido ascórbico
- EAG: Equivalente ao ácido gálico
- EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- Epagri: Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina
- ESI: Ionização por eletrospray, do inglês *electrospray ionization*
- FRAP: Capacidade antioxidante/reutora férrica, do inglês *ferric reducing/antioxidant power*
- GAC: Química analítica verde, do inglês *green analytical chemistry*
- GC-MS: Cromatografia à gás acoplada à espectrometria de massas, do inglês *gas chromatography-mass spectrometer*

Glu: Ácido glutâmico

ICP-MS: Espectrometria de massas por plasma indutivamente acoplado, do inglês *inductively coupled plasma - mass spectrometer*

IDR: Ingestão diária recomendada

IEF: Focalização isoeletrica, do inglês *isoelectric focusing*

IPG: Gradiente imobilizado de pH, do inglês *immobilized pH gradient*

LC-MS: Cromatografia à líquido acoplada à espectrometria de massas, do inglês *liquid chromatography-mass spectrometer*.

LD: Limite de detecção

LG: Lages

LQ: Limite de quantificação

M: Melato de cochoilhas

MAPA: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

MFB: Mel floral de bracatinga

MM: Massa molar

MMB: Mel de melato de bracatinga

MMQO: Método dos mínimos quadrados ordinários

NMWL: Limite de massa molecular nominal, do inglês *nominal molecular weight limit*

PC: Componente principal, do inglês *principal component*

PCA: Análise de componentes principais, do inglês *principal component analysis*

PI: Padrão interno

pI: Ponto isoeletrico

PIQ: Parâmetros de identidade e qualidade

Pro: Prolina

PSA: Persulfato de amônia

*r*: coeficiente de correlação

$R^2$ : coeficiente de determinação

RMF: Resíduo mineral fixo

RR: Rio Rufino

RSA: Percentual de captura de radicais, do inglês *radical scavenging activity*

SDS: Dodecil-sulfato de sódio, do inglês *dodecyl sulphate sodium*

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poli(acrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio, do inglês *polyacrylamide gel electrophoresis-sodium dodecyl sulfate*

Ser: Serina

TBS: Tetraborato de sódio

TCA: Ácido tricloroacético, do inglês *trichloroacetic acid*

Temed: Tetrametiletilenodiamina, do inglês *N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine*

TIC: Cromatograma de íons totais, do inglês, *total ion chromatogram*

TPC: Compostos fenólicos totais, do inglês *total phenolic compounds*

Anvisa: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

TPTZ: 2,4,6-tris-(2-piridil)-s-triazina

$t_R$ : Tempo de retenção

Tris: Tris-(hidroximetil)-aminometano

TRITON X100: 4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil-polietileno glicol, do inglês *4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenyl-polyethylene glycol*

U: Incerteza de medição

UB: Urubici

UP: Urupema

Vol %: Percentagem de volume de spots proteicos



## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	29
<b>CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>33</b>
<b>1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>35</b>
1.1 MEL.....	35
1.1.1 Propriedades físico-químicas e composição.....	36
1.1.2 Classificação.....	37
1.1.3 Compostos de menores concentrações em méis florais e de melato .....	40
1.2 BRACATINGA ( <i>Mimosa scabrella</i> Bentham) .....	41
1.3 COCHONILHA ( <i>Tachardiella</i> sp.) .....	45
1.4 ABELHAS .....	47
1.4.1 Melato .....	48
1.5 APICULTURA CATARINENSE.....	49
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>51</b>
<b>CAPÍTULO 2: DETERMINAÇÃO DE AMINOÁCIDOS LIVRES NA DISCRIMINAÇÃO GEOGRÁFICA DE MEL DE MELATO DE BRACATINGA (<i>Mimosa scabrella</i> Bentham) DO PLANALTO SERRANO DE SANTA CATARINA.....</b>	<b>59</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>62</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>67</b>
2.1 IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA DA ESPÉCIE <i>Mimosa scabrella</i> Bentham. ....	67
2.2 AMOSTRAGEM .....	67
2.3 MATERIAL .....	69
2.4 MÉTODOS .....	69
2.4.1 Derivatização.....	69
2.4.2 Condições cromatográficas .....	71
2.4.3 Sistemas de controle e garantia de qualidade .....	71
2.4.4 Avaliação Ecoescala Analítica .....	73
2.4.5 Análise estatística.....	73
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>75</b>
3.1 REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE AAL .....	75
3.2 SISTEMAS DE CONTROLE E GARANTIA DE QUALIDADE .	77
3.3 AVALIAÇÃO ECOESCALA ANALÍTICA .....	78
3.4 ANÁLISE DE AMOSTRAS.....	79

3.4.1 Mel de melato de bracatinga (MMB) e melato de cochonilhas (M)	79
3.4.2 Mel de melato de bracatinga (MMB)	82
<b>4 CONCLUSÃO</b>	<b>91</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>93</b>

**CAPÍTULO 3: COMPARAÇÃO DE PROTEOMA PARA DISCRIMINAÇÃO ENTRE MÊIS FLORAL E DE MELATO DE MESMA ESPÉCIE BOTÂNICA (*Mimosa scabrella* Bentham) UTILIZANDO ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS ... 99**

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>102</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>107</b>
2.1 AMOSTRAGEM	107
2.2 REAGENTES	107
2.3 ANÁLISE DE PÓLEN	107
2.4 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNA PARA ELETROFORESE EM GEL BIDIMENSIONAL (2DE)	108
2.5 ELETROFORESE EM GEL BIDIMENSIONAL (2DE) EM MEL DE MELATO DE BRACATINGA (MMB) E MEL FLORAL DE BRACATINGA (MFB)	109
2.6 DIGITALIZAÇÃO DE IMAGENS E ANÁLISE DE DADOS ...	110
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>111</b>
<b>4 CONCLUSÃO</b>	<b>116</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>119</b>

**CAPÍTULO 4: COMPOSTOS FENÓLICOS, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E MINERAIS EM MEL DE MELATO DE BRACATINGA (*Mimosa scabrella* Bentham) DO PLANALTO SERRANO DE SC: CARACTERÍSTICAS POTENCIAIS DE ALIMENTO FUNCIONAL ..... 125**

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>129</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>139</b>
2.1 AMOSTRAGEM	139
2.2 MÉTODOS	140
2.2.1 Instrumentação e parâmetros analíticos	140
2.3 MATERIAL	144
2.3.1 Reagentes e padrões	144
2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	145
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>147</b>

3.1 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PELOS MÉTODOS DE DPPH E FRAP E DE TPC PELO MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEU .....	147
3.2 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR LC-ESI-MS/MS .....	152
3.3 DETERMINAÇÃO DE MINERAIS POR CZE-DAD .....	164
3.3.1 Desempenho analítico e conformidade do sistema.....	165
3.3.2 Confirmação da identificação de minerais por ICP-MS.....	166
3.3.3 Análise de amostras.....	166
3.4 MATRIZ DE CORRELAÇÃO DE PEARSON .....	171
<b>4 CONCLUSÃO .....</b>	<b>175</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>177</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>189</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>191</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>197</b>



## INTRODUÇÃO

O mel é um alimento com propriedades adoçantes e nutricionais de importância econômica em todo o mundo, sendo o mais importante produto primário apícola utilizado pela humanidade desde a antiguidade, mas somente nos últimos anos vêm sendo demonstradas suas propriedades nutricionais (ESCUREDO et al., 2013). Apresentando-se como uma solução supersaturada de carboidratos (ALVAREZ-SUAREZ et al., 2010; KWAKMAN et al., 2010), principalmente frutose e glicose, os quais podem ser utilizados como fonte energética para o corpo humano, o mel também apresenta em sua composição classes de compostos em menores concentrações com propriedades antioxidantes tais como compostos fenólicos (ISLA et al., 2011), enzimas (MEDA et al., 2005), produtos da reação de Maillard (TURKMEN et al., 2006), aminoácidos e proteínas (GOMEZ-CARAVACA et al., 2006), bem como minerais e demais elementos traços com importantes funções biológicas (ESCUREDO et al., 2013). Estes compostos podem conferir ao mel características potenciais de propriedades funcionais, fornecendo benefícios adicionais à saúde, além de suas funções nutricionais básicas (WONG; LAI; CHAN, 2015), sendo alguns destes também comumente utilizados para discriminação botânica e geográfica (GASIC et al., 2014, 2015; KAYGUSUZ et al., 2016; SERGIEL; POHL; BIESAGA, 2014; SILICI; KARAMAN, 2014), e entre tipos de méis (RAMON-SIERRA; RUIZ-RUIZ; ORTIZ-VAZQUEZ, 2015). Devido às ações funcionais registradas, o mel tem sido citado como agente terapêutico (ORYAN; ALEMZADEH; MOSHIRI, 2016; PATZOLD; BRUCKNER, 2006) e suas propriedades físico-químicas têm sido relacionadas com processo de certificação que determina qualidade, origens geográficas, botânicas e entomológicas (SILVA et al., 2013).

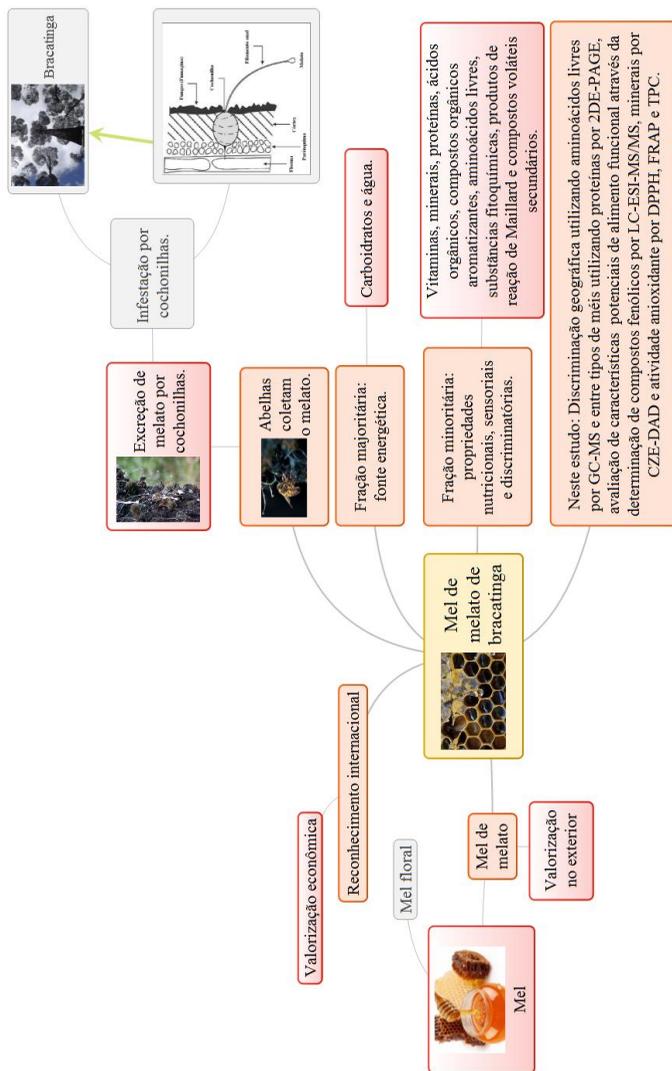
O mel é elaborado por abelhas melíferas a partir do néctar floral (mel floral) e de exsudatos sacarínicos de partes vivas de plantas ou de excreções de insetos sugadores de seiva que se encontram sobre as plantas (mel de melato) (BRASIL, 2002) e, especialmente, méis de melato estão sendo valorizados por consumidores e indústrias alimentícias em países da Europa Central e Oriental devido, principalmente, ao sabor forte característico que difere de méis florais. O aumento do interesse por méis de melato em países europeus requer sua diferenciação entre estes e outros tipos de méis (florais) como uma resposta ao mercado consumidor e à valorização econômica (JERKOVIC et al., 2010; SIMOVA et al., 2012).

A apicultura é uma atividade em que se sustenta uma das cadeias produtivas mais importantes do estado de Santa Catarina (SEBRAE, 2014), o qual o mel produzido recebe premiações como "melhor mel do mundo" desde 1979 por sua qualidade e atributos sensoriais, atraindo interesses na sua comercialização e exportação. Além disso, tradicionalmente no estado, a cada dois anos, a bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) é infestada por cochonilhas (*Tachardiella* sp.), produzindo melato, que coletado pelas abelhas melíferas, produzem o mel de melato de bracatinga (MMB) (MAZUCHOWSKI; RECH; TORESAN, 2014), sendo este também premiado em congresso internacional de apicultura na categoria mel escuro.

Publicações sobre as propriedades físico-químicas e biológicas de méis brasileiros são limitadas (BORSATO et al., 2014; BUENO-COSTA et al., 2016), especialmente acerca dos princípios ativos que corroboram para efeitos benéficos à saúde, prevenção de doenças (BORSATO et al., 2014) e discriminação de méis de melato. Neste contexto, além de sua relevância econômica e produtiva dos méis da região do sul do Brasil no mercado internacional, especialmente, do estado de Santa Catarina, os objetivos deste estudo foram: discriminar geograficamente o MMB do Planalto Serrano de Santa Catarina utilizando a determinação de aminoácidos livres por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas e quimiometria; discriminar méis floral e de melato de mesma espécie botânica (*Mimosa scabrella* Bentham) utilizando perfil de proteoma obtido por eletroforese em gel bidimensional e análise de componentes principais; evidenciar a qualidade do MMB com relação à potencialidade funcional utilizando determinações de capacidade antioxidante *in vitro* através dos mecanismos de captura de radical livre (DPPH) e de redução férrica (FRAP), compostos fenólicos por cromatografia à líquido acoplada à espectrometria de massas sequencial e minerais por eletroforese capilar de zona e detector de arranjo de diodos.

A Figura 1 apresenta um esquema da abordagem utilizada no presente estudo.

Figura 1: Esquema do estudo em mel de melato de bracatinga.



Ao final deste trabalho são apresentadas as considerações finais com relação ao presente estudo, bem como perspectivas acerca da continuidade do projeto de pesquisa desenvolvido.

## **CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**



## 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 MEL

O mel é um produto natural fluido, viscoso, aromático e doce, com sabor e aroma característicos de sua origem e cor variável de quase incolor a pardo-escuro, elaborado por abelhas melíferas a partir do néctar floral (mel floral) e de exsudatos sacarínicos de partes vivas de plantas ou de excreções de insetos sugadores de seiva que se encontram sobre as plantas (mel de melato), onde este é recolhido, transformado e combinado com substâncias específicas próprias, para então ser levado para a colmeia pelas abelhas, para amadurecimento em favos para sua posterior alimentação, não devendo ser adicionado qualquer outra substância que altere sua composição original (ALVES et al., 2005; BOFFO et al., 2012; BRASIL, 2000; CODEX, 2001; CONSONNI; CAGLIANI; COGLIATI, 2013; EUROPEAN COMMISSION, 2002; KASKONIENE et al., 2008).

Para a produção do mel, em uma reação física, este é desidratado até que o teor de umidade fique abaixo de 18%, ocorrendo a partir da absorção de água no papo das abelhas e uma posterior evaporação pelo bater das asas dos insetos na colmeia. A transformação dos carboidratos do mel ocorre pela ação das enzimas invertase, amilase e glicose-oxidase para posterior depósito deste no interior dos alvéolos dos favos, onde são cobertos por uma fina camada de cera em um processo chamado de operculação e, nesta etapa, o mel é considerado maduro (FREITAS, 2011).

No Brasil a identidade e qualidade do mel são preconizadas pela Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), baseada em normas e diretivas do Mercosul, conforme Resolução MERCOSUL GMC, nº 56/99 e em padrões norte-americanos e europeus (CODEX, 2001; EUROPEAN COMMISSION, 2002), estão descritas na portaria nº 367 de 4 de setembro de 1997 do MAPA e são utilizadas para a classificação do mel de *A. mellifera*, que atendem parcialmente às características do produto de abelhas sem ferrão (ASF) (CARVALHO et al., 2005).

A Tabela 1 ilustra os parâmetros físico-químicos de identidade e qualidade (PIQ) recomendados pelos órgãos regulamentadores com os valores máximos e mínimos permitidos para mel e mel de melato, respectivamente.

Tabela 1: Valores permitidos para os parâmetros físico-químicos de identidade e qualidade de mel floral/mel de melato, respectivamente, conforme órgãos regulamentadores.

Parâmetros	BRASIL, 2000	CODEX alimentarius, 2001	EC, 2001
Açúcares redutores (%, mín.)	65/60	60/45	60/45
Umidade (%, máx.)	20	20	20
Sacarose (%, máx.)	6/15	5	5
Sólidos insolúveis em água (%, máx.)	0,1	0,1	0,1
Cinzas (%, máx.)	0,6/1,2	NI	NI
Acidez (mEq kg <sup>-1</sup> , máx.)	50	50	50
Atividade diastásica (mín.)	8 (Göthe)	8 (Shade)	8 (Shade)
5-HMF (mg kg <sup>-1</sup> , máximo)	60	40 (PT: 80)	40 (PT: 80)
Condutividade elétrica (mS/cm)	NI	máx. 0,8/mín. 0,8	máx.0,8

Legenda: EC - Comissão Europeia, do inglês *European Commission*; PT - Países Tropicais; 5-HMF - 5-Hidroximetilfurfural; NI - Não informado. Dois valores: mel floral/mel de melato, respectivamente. Um valor: não há diferença entre os dois tipos de mel. Fonte: Adaptado de Brasil (2000), CODEX (2001) e Comissão Europeia (2001).

### 1.1.1 Propriedades físico-químicas e composição

O mel, de pH que pode variar de 3,4 a 6,1 (PATZOLD; BRUCKNER, 2006), pode apresentar composição variável e é dependente de diversos fatores como composição do néctar e/ou melato, condições climáticas, manejo do apicultor e espécie de abelha envolvida na produção (CARVALHO et al., 2005).

Podendo conter mais de 200 substâncias (ESCUREDO et al, 2013), o mel é constituído, principalmente, de uma solução supersaturada de açúcar, com mais de 95% de sua massa seca composta por carboidratos (principalmente monossacarídeos glicose e frutose) e água (cerca de 20%) (GIROLAMO; D'AMATO; RIGHETTI, 2012; PATZOLD; BRUCKNER, 2006). Porém, também apresenta em sua composição diferentes nutrientes como vitaminas; minerais (óxidos de

potássio, cálcio, magnésio e sódio e, microelementos e elementos traços como chumbo, cádmio, zinco, ferro, magnésio, manganês, alumínio, silício, boro, estanho, bário, prata, molibdênio e cromo); enzimas ( $\alpha$ -glicosidase,  $\beta$ -glicosidase, catalase, fosfatases, peroxidases); ácidos orgânicos (principalmente ácido glucônico), compostos orgânicos aromatizantes, aminoácidos livres (predominantemente prolina); substâncias fitoquímicas transferidas da planta no momento da colheita (flavonoides: apigenina, pinocembrina, canferol, quercetina, galangina, crisina, hesperetina; ácidos fenólicos: elágico, cafeico, *p*-cumárico e ferúlico); ácido ascórbico; carotenóides, produtos da reação de Maillard e numerosos compostos voláteis como componentes secundários. No entanto, são os componentes da menor fração da composição total do mel responsáveis pelas possíveis propriedades nutricionais, sensoriais e diferenciação entre tipos de mel (ESCRICHE et al., 2014; GIROLAMO; D'AMATO; RIGHETTI, 2012; JERKOVIC et al., 2009; MADEJCZYK; BARALKIEWICZ, 2008; PATZOLD; BRUCKNER, 2006; TURKMEN et al., 2006).

A importância da composição melífera não se atém às contribuições para ingestão diária recomendada, mas sim, aos efeitos fisiológicos, que sugerem efeitos benéficos à saúde associados ao mel, como a manutenção de balanço oxidativo intracelular (ESCUREDO et al., 2013).

A composição está, também, rigidamente associada à origem botânica e geográfica, uma vez que solo e clima determinam a florada melífera (ALIFERIS et al., 2010; BERTONCELJ et al., 2011; BOFFO et al., 2012; ESCUREDO et al., 2013; KASKONIENE et al., 2008; MANYI-LOH; NDIP; CLARKE, 2011; MANZANARES, et al., 2011; SCHIEVANO et al., 2012), modo de armazenamento e até mesmo tecnologia de processamento aplicada (SCHIAVANO et al., 2012).

### 1.1.2 Classificação

No que diz respeito a sua origem, o mel pode ser classificado como floral ou melato (BOFFO et al., 2012; BRASIL, 2000; SANZ et al., 2005), e a mistura contendo ambas origens é considerada para avaliação de parâmetros em regulamentações brasileira e europeia (BRASIL, 2000; EUROPEAN COMMISSION, 2001). Méis monoflorais, também chamados de uniflorais, são originários de uma única espécie de planta e no Brasil, são produzidos principalmente por abelhas da espécie *Apis Mellifera* ou por ASF (Meliponinae), mantendo suas características físico-químicas e sensoriais, sendo muito apreciadas para o comércio e

sua origem determinada facilmente pelo reconhecimento de grãos de pólen dominantes. Méis heteroflorais, também denominados pluriflorais ou silvestres, são produzidos a partir de diversas espécies de plantas, podendo ser produzidos pelas espécies de abelhas citadas anteriormente, apresentando propriedades variadas conforme a espécie de abelhas envolvida, florada e fatores climáticos. No Brasil, há ainda outro produto denominado mel de cana, extrafloral, elaborado pelas abelhas a partir da seiva de cana-de-açúcar após a colheita (BARTH, 2004; BRASIL, 2000).

#### 1.1.2.1 Mel de melato

O mel de melato é definido como alimento obtido principalmente de secreções de partes vivas de plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas que se encontram sobre estas. Estes insetos perfuram partes da planta, alimentam-se da seiva e excretam o excesso de gotículas de melato que são recolhidos pelas abelhas (BRASIL, 2000; CODEX, 2001; EUROPEAN COMMISSION, 2002).

Méis de melato apresentam sabor e odor forte característico, cor mais escura quando comparado aos méis florais (variando do castanho claro ou esverdeado a uma tonalidade negra, dependentemente de sua maturação e melato utilizado), maior condutividade elétrica (possivelmente devido à maior concentração de compostos minerais) (LACHMAN et al., 2007), menor teor de monossacarídeos (glicose e frutose), possível razão pelo qual usualmente não cristaliza, além de maior teor de oligossacarídeos (principalmente melezitose ou erlose, que apresentaram potencial atividade prebiótica em populações de bifidobactérias e lactobacilos no intestino humano), maior teor de cinzas, maior pH e maior teor de nitrogênio (CAMPOS et al., 2003; SANZ et al., 2005, SIMOVA et al., 2012). Em especial, mel de melato de bracinga (*Mimosa scabrella* Bentham) apresenta maior pH (como pode ser observado na Tabela 2) e pode apresentar sabor ácido ou amargo (FREITAS, 2011).

Na Tabela 2 é apresentada a comparação do teor médio de alguns dos parâmetros de identidade e qualidade de mel floral e mel de melato, onde pode-se observar a diferença, principalmente com relação ao pH, açúcares redutores, sacarose e resíduo mineral fixo.

Tabela 2 Comparação entre teores médios de alguns parâmetros de identidade e qualidade de mel de melato e mel floral.

<b>Determinações</b>	<b>Mel de melato</b>	<b>Mel floral</b>
Umidade (%)	16,0 a 19,4	16,8 a 20,8
*pH	3,9 a 6,9	3,5 a 5,3
Acidez (mEq kg <sup>-1</sup> )	8,90 a 48,8	15,5 a 41,8
*Açúcares redutores (%)	40,6 a 67,2	65,4 a 77,1
Frutose (%)	36,0 a 44,1	35,9 a 42,1
Glicose	24,3 a 34,3	29,2 a 38,7
Prolina (mg kg <sup>-1</sup> )	664 a 1689	310 a 1057
*Condutividade elétrica (mS cm <sup>-1</sup> )	0,83 a 2,09	0,20 a 0,80
Cor (mm Pfund)	71,0 a 150	39,0 a 150
5-HMF (mg kg <sup>-1</sup> )	< LD a 28,4	0,70 a 26,0
*RMF (%)	0,02 a 6,47	0,06 a 0,39
Atividade diastásica (unidades Göthe)	4,70 a 25,8	8,90 a 35,9

Legenda: \*Parâmetros que podem discriminar entre méis de melato e floral; LD - Limite de detecção; 5-HMF- 5-hidroximetilfurfural; RMF - Resíduo mineral fixo. Fonte: Adaptada de Campos et al. (2003), Fechner et al. (2016), Manzanares et al. (2011), Rybak-Chmielewska et al. (2013) e Paixão (1990).

A partir dos dados relacionados na Tabela 2 podem ser observadas faixas maiores de resultados obtidos para os parâmetros de pH, condutividade elétrica e resíduo mineral fixo (RMF) e menores valores para açúcares redutores em méis de melato quando comparados aos méis florais. É possível verificar também que, de um modo geral, os méis relacionados apresentam-se de acordo com os limites estabelecidos pelos respectivos órgãos regulamentadores apresentados na Tabela 1, com exceção dos valores abaixo do limite estabelecido para açúcares redutores (40,6% - Paixão, 1990) e atividade diastásica (4,70 °Göthe - Manzanares et al., 2011), e acima para cinzas (RMF: 6,70% - Campos et al., 2003), para alguns méis de melato.

Méis de melato estão sendo valorizados por consumidores e indústrias alimentícias devido ao seu sabor forte diferenciado quando comparado aos méis florais (JERKOVIC et al., 2010). Em algumas regiões, especialmente da Europa central e oriental, o mel de melato é popularmente mais valorizado em função de seu possível maior efeito benéfico para saúde em relação ao mel floral, evidenciado por estudos recentes, onde este apresentou maiores atividade antioxidante e antiomicrobiana (ESCRICHE et al., 2014; SIMOVA et al., 2012). Devido ao crescimento do mercado de mel de melato, em alguns países da Europa é exigida a diferenciação deste para atender a demanda ao consumidor, que pode ser realizada geralmente por meio de sua

composição química específica, como por exemplo açúcares, minerais ou voláteis, mas há uma maior complexidade quando busca-se a diferenciação entre méis de melato (SIMOVA et al., 2012). Logo, classes de compostos específicos que caracterizem este tipo de mel podem ser uma alternativa, uma vez que a análise melissopalínológica<sup>1</sup>, por vezes, pode não ser possível de ser realizada (JERKOVIC et al., 2010).

### 1.1.3 Compostos de menores concentrações em méis florais e de melato

Além dos métodos utilizados para avaliação de parâmetros de identidade e qualidade em méis recomendados pela legislação vigente, uma abordagem tradicional para identificação de origem geográfica e botânica de mel é dada por análises melissopalínológicas e sensoriais. Outros métodos analíticos quantitativos (incluindo análises físico-químicas) (CHEN et al., 2012; CHUDZINSKA; BARALKIEWICZ, 2010; TIWARI et al., 2013) e técnicas como cromatografia à gás acoplada à espectrometria de massas (GC/MS, do inglês *gas chromatography-mass spectrometry*), cromatografia à líquido acoplada à espectrometria de massas (LC/MS, do inglês *liquid chromatography-mass spectrometry*), ressonância magnética nuclear (NMR, do inglês *nuclear magnetic resonance*), espectroscopia de infravermelho (IR, do inglês *infrared spectroscopy*), cromatografia iônica (IC, do inglês *ion-chromatography*), espectroscopia de infravermelho próximo (NIR, do inglês *near-infrared spectroscopy*), espectroscopia de emissão atômica (AES, do inglês *atomic emission spectroscopy*), espectroscopia de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP-AES, do inglês *inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy*), espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES, do inglês *inductively coupled plasma-optical emission spectrometry*) também têm sido utilizadas para identificação de origem geográfica e botânica em méis (ALIFERIS et al., 2010, BOFFO et al., 2012; CHEN et al., 2012; CONSONNI; CAGLIANI; COGLIATI, 2013; SILVA et al., 2013; TIWARI et al., 2013).

Uma vez que os compostos da menor fração da composição total do mel apresentam classes de compostos responsáveis por possíveis propriedades nutricionais, sensoriais e de discriminação, como por

---

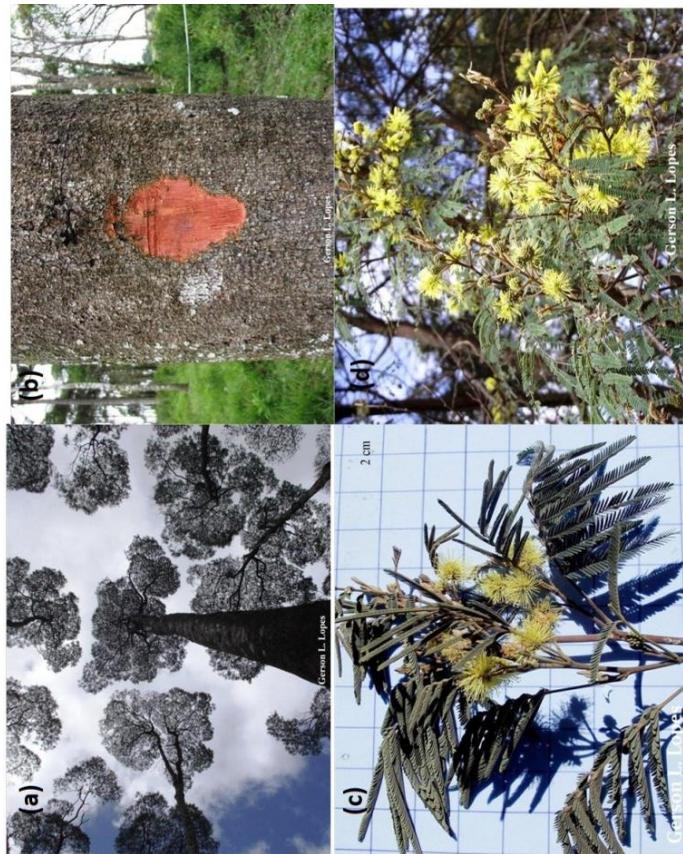
<sup>1</sup> Estudo da morfologia do grão de pólen em amostras de mel.

exemplo, minerais, enzimas e substâncias fitoquímicas (ESCUREDO et al., 2013; GIROLAMO; D'AMATO; RIGHETTI, 2012; PATZOLD; BRUCKNER, 2006), estas classes de compostos específicos têm sido utilizadas para elucidação destas propriedades. Aminoácidos livres como arginina, triptofano, cistina, fenilalanina, serina, lisina e metionina têm sido incluídos como marcadores químicos (ANKLAM, 1998; NOZAL et al., 2004) ou na discriminação de origem botânica (PIRINI et al., 1992; SILICI; KARAMAN, 2014) e geográfica (COMETTO et al., 2003); as propriedades antioxidantes de compostos fenólicos, como ácidos fenólicos e flavonoides, têm demonstrado efetividade na redução de riscos de doenças cardíacas e autoimunes, câncer e processos inflamatórios (HABIB et al., 2014; ISLA et al., 2011) e na prevenção de reações de oxidação deteriorativa em alimentos como escurecimento enzimático em frutas e vegetais e oxidação lipídica em carnes (LACHMAN et al., 2010), além de auxiliarem como marcadores de origem botânica (GASIC et al., 2014; SERGIEL; POHL; BIESAGA, 2014); minerais, como potássio, cálcio, ferro, magnésio, sódio, zinco e cobre, têm sido comumente utilizados para discriminação de origem botânica e geográfica (ESCUREDO et al., 2013; MONIRUZZAMAN et al. 2014; POHL et al, 2012; RIZELIO et al., 2012; SILVA et al., 2016); e tem sido demonstrado que proteínas do metabolismo de carboidratos ( $\alpha$ -glucosidase,  $\beta$ -glucosidase, amilase e glucose oxidase) e da geleia real contribuem substancialmente em atividades biológicas antioxidantes e em funções de regeneração de fígado, citoprotetora e imunorregulatória, e atividade antimicrobiana (BILIKOVA; SIMUTH, 2010; GOMEZ-CARAVACA et al., 2006; KWAKMAN e al., 2010; MEDA et al., 2005; ROSSANO et al., 2012).

## 1.2 BRACATINGA (*Mimosa scabrella* Bentham)

A bracatinga é uma das poucas espécies tipicamente arbóreas do gênero *Mimosa* e pouco exigente quanto às condições químicas de solo. Sua árvore de forma perenifólia pode atingir de 4 a 18 m de altura e de 20 a 30 cm de diâmetro na altura do peito (DAP), podendo alcançar até 50 cm ou mais na idade adulta (Figuras 2(a) e 2(b)). O florescimento da bracatinga ocorre a partir do terceiro ano de vida até a senescência da árvore e, suas flores são amarelas, pequenas, agrupadas em capítulos pedunculados, axilares ou terminais, em racemos curtos, onde somente 10% das flores formam frutos (Figuras 2(c) e 2(d)) (BRASIL, 2011; CARVALHO, 2002).

Figura 2: (a) Vista de povoamento nativo de bracatinga. (b) Tronco reto: casca interna e externa. (c) Detalhes de folhas e flores. (d) Galho com folhas, flores e frutos.



Fonte: Herbário Online Gerson Luiz Lopes, Laboratório de Manejo Florestal, Departamento de Engenharia Florestal, UNICENTRO, (2014), PR

Assim como outras espécies arbóreas pioneiras, a bracatinga apresenta um ciclo de vida relativamente curto, cerca de 20 a 25 anos (BAGGIO, 1994). Nativa de climas frios, a área de ocorrência natural de bracatinga estende-se desde a latitude de 21°30' S (MG) até 29°50' S (RS) e sua variação de altitude pode variar de 350 m (SC) a 2000 m (SC). Na América Central, chegou a ser introduzida em altitudes de até 2500 m (CARVALHO, 2002).

A bracatinga é uma espécie florestal de múltiplo uso, típica do ecossistema Floresta Ombrófila Mista, associado ao bioma Mata Atlântica. Na região noroeste do planalto catarinense, em assentamentos de reforma agrária, quase a metade da renda financeira das famílias assentadas (49%, em média) é proveniente do manejo de bracatingais (formações florestais em que a bracatinga é a espécie predominante) para produção de madeira, por exemplo (EMBRAPA, 2016; STEENBOCK et al., 2011).

Em relação às demais espécies arbóreas de ocorrência natural neste tipo de floresta, a bracatinga apresenta floração precoce. Em SC, o florescimento da espécie ocorre entre junho e outubro, dependentemente da região (BRASIL, 2011). O florescimento nesta época, associada à elevada densidade populacional em que a espécie ocorre, é de grande importância para o fornecimento de recursos tróficos e sobrevivência das populações de insetos polinizadores. A polinização de bracatinga é promovida especialmente por *Trigona* sp., *Apis mellifera* e *Melipona* sp. (Hymenoptera), porém, já foi identificada uma grande diversidade de abelhas visitando flores de *Mimosa scabrella*, totalizando quarenta e quatro espécies e quatro famílias, sendo Apidae a que apresentou os visitantes mais abundantes e fiéis, e Halictidae a que apresentou maior diversidade de espécies (STEENBOCK; REIS, 2013). Além de pólen e néctar, também é citada a intensa visitação de *A. mellifera* ao caule de árvores de bracatinga, que realiza a coleta de excreções de colônias de cochonilhas que ali se estabelecem, onde, avaliando a produtividade destas excreções em bracatingais com 437 plantas/ha, identificou-se, em média, 8.300 cochonilhas/árvore, 64,5 mL de secreção/cochonilha/dia, 0,54 L de secreções/árvore/dia, 235 L/ha/dia e 70.478 L de secreções/ha/período (10 meses), caracterizando a importância destas excreções como recursos tróficos para as populações naturais de insetos (BRASIL, 2011).

A bracatinga é uma espécie muito versátil utilizada para diversos fins, como por exemplo: o tronco pode ser utilizado para produção de lenha e artefatos de madeira; galhos e folhas para alimentação animal; sementes para projetos de recuperação de áreas degradadas e como fonte

de galactomananas<sup>2</sup>; com florescimento precoce, apresenta elevada aptidão apícola (BRASIL, 2011); também podendo ser obtido mel de melato, produzido por abelhas que coletam as excreções açucaradas de cochonilhas (*Tachardiella* sp.) as quais se aproveitam da seiva elaborada de bracatingais (MOREIRA et al., 2011).

Dentre as principais pragas, poucos insetos podem ser considerados pragas de bracatinga, que, porém, não constituem limitações sérias, dentre estes estão *Ceroplastes confluens*: cochonilha-de-cera; *Tachardiella* sp.: cochonilha; *Hylesia* sp.: mariposa; *Oncideres impluviata*: serrador-dos-galhos (BRASIL, 2002).

Tradicionalmente a cada dois anos em SC, período em que corresponde ao ciclo de vida da cochonilha, a bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) é infestada por cochonilhas (*Tachardiella* sp.), produzindo melato de janeiro a junho, que coletado pelas abelhas melíferas, produzem o mel de melato de bracatinga (MMB), de cor mais escura, como pode ser observado na Figura 3.

Figura 3: Coleta de melato para produção de mel de melato de bracatinga.



Fonte: Mariléia Corrêa da Silva (Arquivo pessoal)

Além da bracatinga, há também produção de melato a partir do *Eucalyptus* sp., *Inga excelsum*, *Schizolobium excelsum*, *Cecropia pachystachya*, *Ricinus communis*, *Acacia mangium* e *Quercus rotundifolia*. Como regiões produtoras de mel de melato em SC podem ser citadas Planalto Sul, Bom Retiro, Urubici, Vale do Rio Canoas, Lages, Painelel, Bocaina do Sul, São Joaquim, Santa Terezinha e Alto Vale do Itajaí (FREITAS, 2011; MAZUCHOWSKI; RECH; TORESAN, 2014).

<sup>2</sup> Polissacarídeos neutros constituídos por unidades de  $\beta$ -D-manose e  $\alpha$ -D-galactose.

### 1.3 COCHONILHA (*Tachardiella* sp.)

A cochonilha do gênero *Tachardiella*, que possivelmente infesta a bracinga, está classificado na classe de Insetos, ordem Homoptera, subordem Sternorrhyncha, superfamília Coccoidea e família Kerriidae, onde estes últimos se caracterizam pela produção de laca (incrustação resinosa) (BEN-DOV, 2006; BUZZI, 2010; KONDO; GULLAN, 2011; LIMA, 1942).

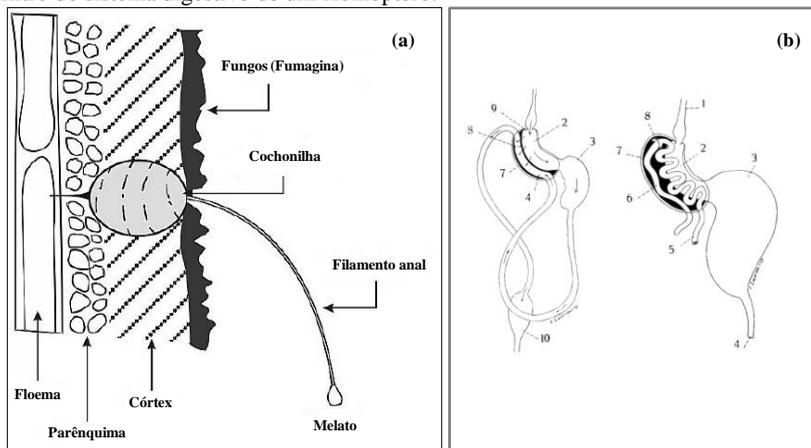
Muitos estudos mencionam os aspectos benéficos de cochonilhas (Coccoidea), particularmente da família Kerriidae, como produtores de laca, porém pouco é mencionado sobre seu melato, muito utilizado pelas abelhas para produção de mel em todo mundo. O primeiro registro da relação entre melato de Coccoidea e abelhas foi em 1826 por Dalman (diretor do Museu de História Natural de Estocolmo), onde foi identificada a coleta de melato de *Coccus hemicyphus* em "Norway spruce" (*Picea abies*) por abelhas melíferas (KUNKEL, 1997). Kunkel (1997) relatou a ocorrência de *Xylococcus* spp. em *Mimosa Scabrella* e *Inga* no Brasil e Colômbia. Os insetos da superfamília Coccoidea, são conhecidos como coccídeos, cochonilhas ou escamas, onde há mais 6000 espécies catalogadas (BUZZI, 2010).

As cochonilhas constituem um dos principais grupos de insetos-praga em diversos sistemas de produção, podendo infestar plantas silvestres e cultivadas. Os insetos sugadores comumente exibem adaptações morfológicas e fisiológicas associadas com seu modo particular de alimentação, em tecidos específicos, assim, a maioria apresenta especificidade para espécies hospedeiras (CORREA et al., 2011). A interação parasitária de um Coccoidea com a planta é dependente da qualidade da seiva desta que está relacionada com a quantidade de nitrogênio, podendo o aumento de compostos nitrogenados alterar consideravelmente a qualidade de melato, aumentando em até seis vezes a quantidade de carboidratos e até quatro vezes a quantidade de aminoácidos livres, estimulando o crescimento da população de insetos (KUNKEL, 1997).

As cochonilhas alimentam-se da seiva das plantas, picando-as e aspirando o líquido, fixando a proteína e expelindo o que não é absorvido pelo seu organismo, resultando no melato, constituído principalmente de dextrina, sacarose e açúcares elementares (PAIXÃO, 1990).

Na Figura 4 são ilustrados os esquemas de (a) coleta de floema pela cochonilha e (b) *câmara filtro* do sistema digestivo de um Homóptero, o qual apresenta uma disposição singular.

Figura 4: (a) Esquema de coleta de floema pela cochonilha; (b) esquema de câmara filtro do sistema digestivo de um Homóptero.



(a) Fonte: Chamorro, Nates-Parra e Kondo (2013); (b) Legenda: 1. Esôfago, 2. Mesenteron, 3. Mesenteron (2ª porção), 4 e 5. Mesenteron (3ª porção), 6. Proctodacum; 7. *Câmara Filtro*, 8. Ponto de embocadura dos tubos de Malpighi, 9. Válvula cardíaca, 10. Reto. Fonte: Lima (1942).

A sucção de alimentos do inseto sugador se dá através da passagem da seiva da planta pelo aparelho bucal através da faringe e contração de músculos dilatadores para o tubo digestivo, que consiste de uma *câmara filtro*, representada por duas partes, levemente afastadas e unidas por uma bainha de tecido conjuntivo. A parte líquida da seiva aspirada passa imediatamente da porção anterior do tubo digestivo para a porção terminal (através das paredes epiteliais em contato com a *câmara filtro*), sendo expelida pelo ânus pouco tempo depois de ingerida, restando somente um suco alimentício concentrado em condições de fácil absorção. Assim, explica-se o fato destes insetos excretarem líquido açucarado, por vezes, em grande quantidade (LIMA, 1942).

Abelhas são frequentemente associadas a cochonilhas em uma relação de mutualismo, porém estudos sobre estas interações não são comuns, embora em algumas regiões da Europa, as associações entre abelhas e cochonilhas sejam importantes na produção de mel. Abelhas melíferas do gênero *Apis* são consideradas importantes polinizadoras de culturas agrícolas em todo o mundo e são muito conhecidas pela exploração do melato em diversas espécies de plantas (KONRAD et al., 2009). Para que as abelhas possam fazer uso de melato, é necessário que

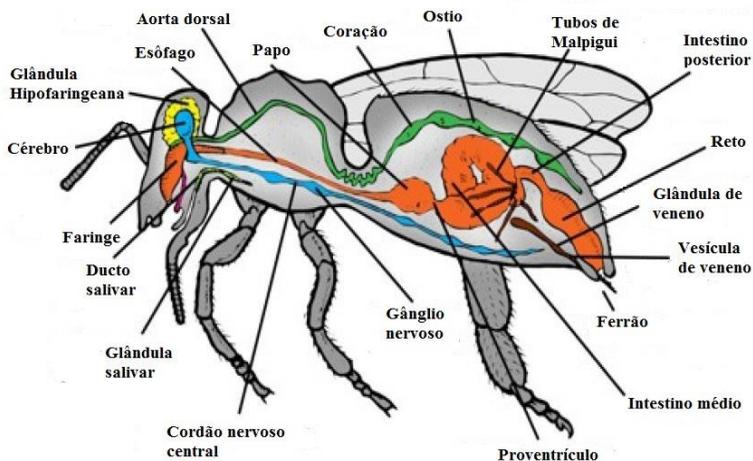
haja uma grande extensão da espécie de planta disponível em épocas e regiões específicas (KUNKEL, 1997).

#### 1.4 ABELHAS

Abelhas, descendentes das vespas, são seres que vivem coletivamente em grandes sociedades buscando a sobrevivência da própria espécie, em perfeita harmonia com a natureza, a qual proporciona às abelhas produtos vegetais como pólen, néctar, resinas ou óleos, em troca da perpetuação da espécie vegetal através da polinização (FILHO et al., 2007; WISE, 1974). Dentre as abelhas produtoras de mel, a espécie mais difundida é *Apis mellifera* (família Apidae, gênero *Apis*), um dos insetos polinizadores mais antigos e de grande importância em todo o mundo, devido a sua antiga domesticação (ALVES et al., 2005; CARVALHO et al., 2005).

As abelhas apresentam exoesqueleto que fornece proteção para os órgãos internos e contra a perda de água, além de sustentação muscular, e é constituído de cabeça, tórax e abdome. Na Figura 5 pode ser observada a anatomia interna da abelha.

Figura 5: Anatomia interna da abelha.



Fonte: Adaptado de EMBRAPA (2002).

No processo alimentar da abelha, a ingestão é realizada pela boca, segue pelo esôfago através do tórax até alcançar o papo (também

conhecido por estômago do mel, falso estômago, vesícula melífera, vesícula nectarífera). O papo é um depósito de alimento, para onde este é transportado e transformado em mel, para após ser depositado nos favos ou liberado pelo proventrículo para o ventrículo onde ocorre a digestão deste alimento e assimilação pelo intestino delgado, terminando na ampola retal que representa o final do tubo alimentar da abelha. Para nutrição do organismo das abelhas são necessários carboidratos, proteínas, gorduras, minerais, vitaminas e água para diluição e preparo do alimento; estes podem ser encontrados naturalmente no néctar, melato, pólen e água (WIESE, 1974).

### 1.4.1 Melato

Melato é um vocábulo que, em biologia, refere-se às secreções de partes vivas de plantas ou de excreções de insetos sugadores que se alimentam do floema de plantas. O melato, que pode ser uma importante fonte de carboidratos em ecossistemas agrícolas em ocasiões de pouca disponibilidade de néctares por algumas culturas ou por períodos reduzidos, é procurado e coletado pelas abelhas melíferas como fonte de carboidratos alternativa, passando pelos mesmos processos enzimáticos para produção do mel e, o produto final, entretanto, é diferenciado em suas propriedades físico-químicas, constituindo o mel de melato (CAMPOS et al., 2003; KONRAD, et al., 2009).

Em certas regiões de SC a existência desta secreção é bastante acentuada em bracingas (Figura 6), podendo proporcionar boa produção de mel se floradas não houverem nas proximidades (WIESE, 1974).

Figura 6: Exsudato de cochonilha (melato) em bracingas coletado pelas abelhas para produção de mel.



Fonte: Mariléia Corrêa da Silva (Arquivo pessoal).

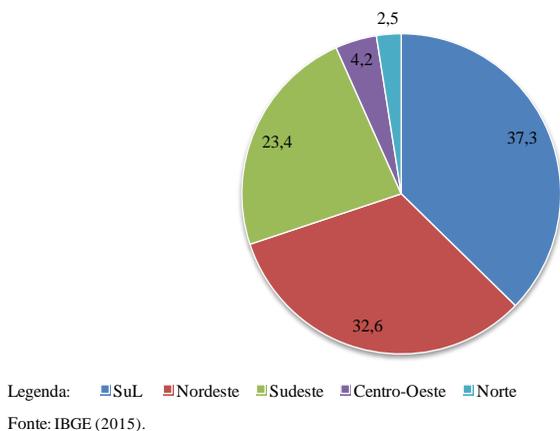
O melato constitui uma substância viscosa, com uma concentração variada de carboidratos, dextrina e em menores concentrações, aminoácidos, proteínas, minerais, ácidos, vitaminas, além de algas e fungos. Estas substâncias não são específicas de sua origem, dificultando a determinação da origem botânica do melato, em função da inexistência de pólen específico, não sendo possível a realização da análise palinológica<sup>3</sup> (JERKOVIC, et al., 2010; MANYILOH; NDIP; CLARKE, 2011; PAIXÃO, 1990).

### 1.5 APICULTURA CATARINENSE

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2015 o Brasil produziu 37,8 mil toneladas de mel, com redução de 1,7% em relação ao ano de 2014.

A distribuição da produção regional do mel no Brasil em 2015 está ilustrada na Figura 7.

Figura 7: Distribuição da produção regional de mel (%) no Brasil em 2015.



De acordo com a Figura 7, em 2015, a região Sul do Brasil foi a maior produtora de mel, com 37,3% da distribuição percentual regional, seguida por 32,6% no Nordeste, 23,4% no Sudeste, 4,2% no Centro-Oeste e 2,5% na região Norte, apresentando queda na produção nas regiões Sul, Norte e Centro-Oeste, quando comparado ao ano de 2014.

<sup>3</sup> Estudo da morfologia do grão de pólen.

A região Sul apresentou a maior queda de produção, cerca de 14,2%, sendo o excesso de chuvas e o uso de agrotóxicos em lavouras seriam as principais causas citadas para esta redução. O estado do Paraná foi o maior produtor nacional de mel (6,29 mil toneladas) e Santa Catarina, que ocupava a terceira posição em 2014, registrou queda de 40% na produção, passando a ocupar a sétima posição no *ranking* da produção nacional (IBGE, 2015).

De acordo com a Associação Brasileira de Exportadores de Mel (ABEMEL), em 2014 o Brasil posicionou-se na oitava posição entre os Países exportadores de mel (setor liderado pela China, Argentina e Nova Zelândia), obtendo um faturamento para o setor apícola de aproximadamente R\$ 283 milhões. E dependentemente da exportação, o consumo de mel apresentou queda de 47,6% com relação ao ano de 2013, que de acordo com SEBRAE (2014), o principal motivo da diminuição de consumo pelos brasileiros deve-se ao preço do mel no País ser mais alto que aquele utilizado para exportação. Em 2016, o Brasil apresentou um incremento de 8,9% com relação a 2015 (24,2 mil toneladas). O principal país importador de mel brasileiro foi os EUA (81,5% do volume exportado), com os estados de São Paulo e Santa Catarina como os maiores exportadores (51,3%).

A apicultura é uma das cadeias produtivas mais importantes do estado de Santa Catarina, que já ocupou a 3ª posição entre os estados produtores de mel no Brasil em 2014 e primeiro lugar de produção/km<sup>2</sup>, totalizando cerca de 350 a 450 mil colmeias distribuídas entre 30 mil apicultores, reunidos entre 60 associações ligadas à Federação das Associações de Apicultores de Santa Catarina (Faasc) (SAR, 2014; SEBRAE, 2014). Estudos já sugeriram Santa Catarina como o estado brasileiro com a maior diversidade floral e de mel, com 200 tipos do produto e as flores de eucalipto, vassouras, bracinga, uva-do-Japão, laranjeira são as mais comuns para a produção do mel floral. Além disso, com a prática da polinização, as abelhas garantem um aumento na produção agrícola equivalente a mais de US\$ 100 milhões anuais ao estado (FREITAS, 2011).

Ademais, desde 1979, o mel de Santa Catarina recebe destaque com prêmios de "melhor mel do mundo": município de São Joaquim em Atenas, 1979 (Anexos A e B) pelo mel floral de "canudo de pito" (*Escallonia bifida* Link & Otto) e a empresa Prodapys do município de Araranguá na Austrália em 2007 (Anexo C) e na Ucrânia em 2013 (Anexo D), destacando Santa Catarina e atraindo interesses na comercialização de seu mel (SEBRAE, 2014).

## REFERÊNCIAS

ABEMEL. Associação Brasileira dos Exportadores de Mel. **Dados das exportações de Mel**. Disponível em: <<http://www.beebrazil.com/>> Acesso em: 19 jan. 2017.

ALIFERIS, K. A. et al. Botanical discrimination and classification of honey samples applying gas chromatography/mass spectrometry fingerprinting of headspace volatile compounds. **Food Chemistry**, n. 121, p. 856-862, 2010.

ALVES, R. M. O. et al. Características físico-químicas de amostras de mel de *Melipona mandacaia* Smith (Hymenoptera: Apidae). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 644-650, Campinas, 2005.

BAGGIO, A. J. **Estudo sobre el agroflorestral tradicional de la bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) en Brasil: produtividade, manejo de resíduos y elaboración de compost**. Tese Doutorado. Universidad Politécnica de Madrid. Madrid, 1994.

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

BEN-DOV, Y. A. **Systematic catalogue of eight scale insect families (Hemiptera: Coccoidea) of the world: Aclerdidae, Asterolecaniidae, Beesoniidae, Carayonemidae, Conchaspidae, Dactylopiidae, Kerriidae and Lecanodiaspididae**. Elsevier, Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo, 2006.

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

BILIKOVA, K.; SIMUTH, J. New criterion for evaluation of honey: quantification of Royal Jelly Protein Apalbumin 1 in honey by ELISA. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, 8776-8781, 2010.

BOFFO, E. F. et al. Identification of components of Brazilian honey by <sup>1</sup>H NMR and classification of its botanical origin by chemometric methods. **Food Science and Technology**, n. 49, p. 55-63, 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n° 11, de 20 de outubro de 2000**. Regulamento técnico de identidade e qualidade do mel. MAPA, Brasília, 2000.

\_\_\_\_\_. Conselho Nacional de Meio Ambiente. **Resolução n. 310 de 05 de julho de 2002**. Diário Oficial República Federativa do Brasil, Brasília, 2002.

\_\_\_\_\_. Ministério do Meio Ambiente. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro** - Região sul. Brasília, p. 478-493, 2011.

BUZZI, Z. J. **Entomologia Didática**. 5ª ed. Curitiba: UFPR, 2010.

CAMPOS, G. et al. Classificação do mel floral ou mel de melato. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 1, p. 1-5, 2003.

CARPANEZZI, A.A. et al. **Manual técnico da bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham)**. Colombo, Paraná: Embrapa, 1988.

CARVALHO, P. E. R. **Bracatinga**. Circular Técnica, 59. Colombo, Paraná: Embrapa, 2002.

CARVALHO, C. A. L. **Mel de abelhas sem ferrão: contribuição para caracterização físico-química**. Série Meliponicultura, n. 4, Universidade Federal da Bahia/SEAGRI, 2005.

CHAMORRO, F. J.; NATES-PARRA, G.; KONDO, T. Mielato de *Stigmacoccus asper* (Hemiptera: Stigmacoccidae): recurso melífero de bosques de roble en Colombia. **Revista Colombiana de Entomologia**, v. 39, p. 61-70, 2013.

CHEN, L. et al. Classification of Chinese honeys according to their floral origin by near infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 135, p. 338-342, 2012.

CHUDZINSKA, M.; BARALKIEWICZ, D. Estimation of honey authenticity by multielements characteristics using inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) combined with chemometrics. **Food and Chemical Toxicology**, n. 48, p. 284-290, 2010.

CODEX STAN 12. Codex Alimentarius Commission. **Codex Standard for Honey**, n. 12, rev. 2, p. 1-8, 2001.

COMETTO, P. M. et al. Comparison of free amino acids profile in honey from three Argentinian regions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 5079-5087, 2003.

CONSONNI, R.; CAGLIANI, L. R.; COGLIATI, C. Geographical discrimination of honeys by saccharides analysis. **Food Control**, v. 32, p. 543-548, 2013.

CORREA, L. R. B. et al. Estudos biológicos do gênero *Planococcus* (Hemiptera: Pseudococcidae) em diferentes hospedeiros. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, n. 2, p. 233-240, São Paulo, 2011.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Produção de mel. Morfologia e biologia das Abelhas Apis melífera**. Disponível em <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>> Acesso em: 23 jan. 2014.

---

\_\_\_\_\_. **Sistema para manejo de bracatingais**. Disponível em <<https://www.embrapa.br/busca-de-produtos-processos-e-servicos/-/produto-servico/1483/sis-bracatinga---sistema-para-manejo-de-bracatingais>> Acesso em 12 jan. 2016.

ESCRICHE, I. et al. Suitability of antioxidant capacity, flavonoids and phenolic acids for floral authentication of honey. Impact of industrial thermal treatment. **Food Chemistry**, v. 142, p. 135-143, 2014.

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

EUROPEAN COMMISSION . Council Directive 2001/110/EC. **Relating to honey**. Journal of European Communities, p. 47-52, 2001.

FILHO, H. B. et al. Inventário da fauna de abelhas (Hymenoptera, Apoidea) em uma área de caatinga da região de Jequié, BA. **Bioscience Journal**. v. 23, Supplement 1, p. 24-29, Uberlândia, 2007.

FREITAS, C. A. **Doce e lucrativo negócio**. Agropecuária Catarinense, v. 24, n. 2, p. 21-26, 2011.

GASIC, U. et al. Phenolic profile and antioxidant activity of Serbian polyfloral honeys. **Food Chemistry**, v. 145, p. 599-607, 2014.

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

GOMEZ-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, 2006.

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

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da Pecuária Municipal - 2015**, v. 43, p. 1-49. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>> Acesso em: 19 jan. 2017.

ISLA, M. I. et al. Physico chemical and bioactive properties of honeys from Northwestern Argentina. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, p. 1922-1930, 2011.

JERKOVIC, I. et al. Headspace, volatile and semi-volatile organic compounds diversity and radical scavenging activity of ultrasonic solvent extracts from *Amorpha fruticosa* honey samples. **Molecules**, v. 14, p. 2717-2728, 2009.

\_\_\_\_\_. \_\_\_\_\_. Molecular diversity of volatile compounds in rare willow (*Salix* spp.) honeydew honey: identification of chemical biomarkers. **Molecular Diversity**, v. 14, p. 237-248, 2010.

KONDO, T.; GULLAN, P. J. Taxonomic review of the genus *Tachardiella* Cockerell (Hemiptera: Kerriidae), with a key to species of lac insects recorded from the new world. **Neotropical Entomology**, v. 40, p. 345-367, 2011.

KONRAD, R. et al. Honeydew feeding in the solitary bee *Osmia bicornis* as affected by aphid species and nectar availability. **Journal of Insect Physiology**, v. 55, p. 1158-1166, 2009.

KUNKEL, H. Soft scales as beneficial insects: scale insect honeydew as forage for honey production. *Soft Scale Insects – Their biology, natural enemies and control*, p. 291-302, 1997.

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

\_\_\_\_\_. Evaluation of antioxidant activity and total phenolics of selected Czech honeys. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, p. 52-58, 2010.

LIMA, C. **Insetos do Brasil: Homópteros**. Escola Nacional de Agronomia, Série Didática, n. 4, p. 191-307, 1942.

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

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

MANZANARES, A. B. et al. Differentiation of blossom and honeydew honeys using multivariate analysis on the physicochemical parameters and sugar composition. **Food Chemistry**, v. 126, p. 664-672, 2011.

MAZUCHOWSKI, J. Z.; RECH, T. D.; TORESAN, L. **Bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham): Cultivo, manejo e usos da espécie.** Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina: Florianópolis, 2014.

MONIRUZZAMAN, M. et al. Determination of mineral, trace element, and pesticide levels in honey samples originating from different regions of Malaysia compared to Manuka honey. **Biomed Research International**, n. 359890, 2014.

MOREIRA, P. A. et al. Genetic diversity and mating system of bracatinga (*Mimosa scabrella*) in a re-emergent agroforestry system in southern Brazil. **Agroforest Systems**, v. 83, p. 245-256, 2011.

NOZAL, M. J. et al. Rapid and sensitive method for determining free amino acids in honey by gas chromatography with flame ionization or mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1047, p. 137-146, 2004.

PAIXÃO, V. C. **O mel: produção, tecnologia, comercialização.** 1ª ed. Lisboa: Livraria Clássica Editora, 1990.

PATZOLD, R.; BRUCKNER, H. Gas chromatographic detection of D-amino acids in natural and thermally treated bee honeys and studies on the mechanism of their formation as result of the Maillard reaction. **European Food Research and Technology**, v. 223, p. 347-354, 2006.

PIRINI, A. et al. Capillary gas chromatographic determination of free amino acids in honey as a means of discrimination between different botanical sources. **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 15, p. 165-170, 1992.

POHL, P. et al. Different aspects of the elemental analysis of honey by flame atomic absorption and emission spectrometry: a review. **Food Analytical Methods**, v. 5, p. 737-751, 2012.

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

SANZ, M. L. et al. A contribution to the differentiation between nectar honey and honeydew honey. *Food Chemistry*, v. 91, p. 313-317, 2005.

SAR. Secretaria do Estado da Agricultura e da Pesca. **Secretaria da Agricultura e da Pesca lança programa para incentivar a produção de mel catarinense**. Disponível em:

<<http://www.sc.gov.br/index.php/mais-sobre-agricultura-e-pesca/3575-secretaria-da-agricultura-e-da-pesca-lanca-programa-para-incentivar-a-producao-de-mel-catarinense>> Acesso em: 16 mai. 2014.

SCHIEVANO, E. et al. An NMR-based metabolomic approach to identify the botanical origin of honey. *Metabolomics*, v. 8, p. 679-690, 2012.

SEBRAE. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Apicultura: Relatório de Inteligência, setembro, 2014**. Disponível em: <[https://atendimento.sebrae-sc.com.br/webroot/projetos/portal\\_sebrae-sc/downloads/mercado/2015/relatorios/relatorio-setembro-2015-apicultura.pdf](https://atendimento.sebrae-sc.com.br/webroot/projetos/portal_sebrae-sc/downloads/mercado/2015/relatorios/relatorio-setembro-2015-apicultura.pdf)> Acesso em 19 jan. 2015.

SERGIEL, I.; POHL, P.; BIESAGA, M. Characterisation of honeys according to their content of phenolic compounds using high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, v. 145, p. 404-408, 2014.

SILICI, S.; KARAMAN, K. Chemometric approaches for the characterization of Turkish rhododendron and honeydew honeys depending on amino acid composition. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 37, p. 864-877, 2014.

SILVA, A. S. et al. Classification of Honeys from Pará state (Amazon region, Brazil) produced by three different species of bees using chemometric methods. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 24, n. 7, p. 1135-1145, 2013.

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

SIMOVA, S. et al. A rapid differentiation between oak honeydew honey and nectar and other honeydew honeys by NMR spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 134, p. 1706-1710, 2012.

STEENBOCK, W. et al. **Ocorrência da bracatinga (*Mimosa scabrella* Benth.) em bracatingais manejados e em florestas secundárias na região do planalto catarinense**. Revista *Árvore*, v. 35, n. 4, p. 845-857, Viçosa, 2011.

\_\_\_\_\_. REIS, M. S. Domesticação da paisagem em bracatingais de assentamentos rurais no noroeste do planalto catarinense. **Ciência Florestal**, v. 23, p. 427-437, Santa Maria, 2013

TIWARI, K. et al. Identification of monofloral honey using voltammetric electronic tongue. **Journal of Food Engineering**, v. 117, p. 205-210, 2013.

TURKMEN, N. et al. Effects of prolonged heating on antioxidant activity and colour. **Food Chemistry**, n. 95, p. 653-657, 2006.

WIESE, H. **Nova apicultura**. 1<sup>a</sup> ed. Florianópolis, SC: Associação Catarinense de Apicultores, 1974.

**CAPÍTULO 2: DETERMINAÇÃO DE AMINOÁCIDOS LIVRES  
NA DISCRIMINAÇÃO GEOGRÁFICA DE MEL DE MELATO  
DE BRACATINGA (*Mimosa scabrella* Bentham) DO PLANALTO  
SERRANO DE SANTA CATARINA**

Capítulo publicado: Azevedo, M. S.; Seraglio, S. K. T.; Rocha, G.; Balderas, C. B.; Piovezan, M.; Gonzaga, L. V.; Falkenberg, D. B.; Fett, R.; de Oliveira, M. A. L.; Costa, A. C. O. Free amino acid determination by GC-MS combined with a chemometric approach for geographical classification of bracatinga honeydew honey (*Mimosa scabrella* Bentham). *Food Control*, doi: 10.1016/j.foodcont.2017.03.008.



**DETERMINAÇÃO DE AMINOÁCIDOS LIVRES NA  
DISCRIMINAÇÃO GEOGRÁFICA DE MEL DE MELATO DE  
BRACATINGA (*Mimosa scabrella* Bentham) DO PLANALTO  
SERRANO DE SANTA CATARINA**

**RESUMO**

Méis de melato estão crescentemente sendo valorizados por consumidores e indústrias alimentícias, especialmente, mel de melato de bracatinga (MMB), produzido no estado de Santa Catarina (SC), obtido a partir do exsudato de cochonilhas (*Tachardiella* sp.) que infestam a espécie botânica bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham). O aumento do interesse por méis de melato em alguns países europeus requer sua diferenciação entre outros tipos de méis e entre méis de melato como resposta ao mercado consumidor. A autenticação é um importante aspecto de controle de qualidade e sua relação com a garantia de origem em termos de fonte e identificação geográfica necessita ser determinada. O objetivo deste estudo foi discriminar o MMB de cinco regiões da mesorregião do planalto serrano de SC, a partir da determinação de aminoácidos livres (AAL) por GC-MS associada às ferramentas quimiométricas de análises de agrupamento (CA) e de componentes principais (PCA), bem como elucidar a contribuição de AAL de cochonilhas (*Tachardiella* sp.) e de abelhas (*Apis mellifera*) ao MMB. Os resultados obtidos variaram de 133 a 490 e de 56,7 a 333 mg kg<sup>-1</sup> para serina (Ser), de < LQ a 168 e de 303 a 1067 mg kg<sup>-1</sup> para prolina (Pro), de < LQ a 653 e de 66 a 1072 mg kg<sup>-1</sup> para asparagina (Asn), de < LQ a 348 e de 81,7 a 453 mg kg<sup>-1</sup> para ácido aspártico (Asp), e de 27,5 a 1216 e de 111 a 1447 mg kg<sup>-1</sup> para ácido glutâmico (Glu), em melato de cochonilhas (M) e MMB, respectivamente. As concentrações obtidas neste estudo apresentaram-se maiores quando comparadas aos outros estudos envolvendo méis de melato e florais, que pode estar relacionado à espécie botânica *M. scabrella* B. Os resultados demonstraram também que, dentre os AAL analisados, Pro é fornecida exclusivamente pela abelha e, a partir da quantificação de AAL, este tipo de mel pôde ser discriminado de acordo com sua origem geográfica utilizando as ferramentas estatísticas multivariadas CA e PCA, evidenciando uma estratégia analítica para autenticação deste mel.

Palavras-chave: Mel de melato de bracatinga. *Mimosa scabrella* Bentham. Aminoácidos livres. GC-MS. Discriminação geográfica. Quimiometria.



## 1 INTRODUÇÃO

Em méis, os aminoácidos livres podem originar de diferentes fontes como néctar, abelhas e pólen (COMETTO; FAYE; NARANJO, 2003) ou estar principalmente relacionados à presença de pólen no mel (PINHEIRO et al., 2015), podendo apresentar concentrações totais entre 0,05 e 0,2%, com cerca de 70 e 15% de prolina e fenilalanina, respectivamente, do total destes aminoácidos; sendo prolina relatada como aminoácido oriundo da espécie de abelha envolvida (PIRINI et al., 1992).

O perfil de aminoácidos tem sido incluído como marcador químico quando relacionado às outras determinações de composição (NOZAL et al., 2004) ou sendo utilizado para discriminação de origem botânica (PIRINI et al., 1992; SILICI; KARAMAN, 2014) e geográfica (COMETTO; FAYE; NARANJO, 2003).

Pirini et. al. (1992) avaliaram méis da região de Bologna, na Itália, e relataram que mel de castanha e lima podem apresentar maior concentração de prolina quando comparado a outros aminoácidos, cerca de 0,06 e 0,04%, respectivamente; as concentrações de asparagina e ácido aspártico podem discriminar entre méis de acácia e alecrim; méis de acácia e lima podem ser diferenciados pelo seu teor de lisina; a presença de triptofano e cistina podem caracterizar o mel de acácia e metionina pode ser utilizado na distinção entre méis de acácia e castanha.

Aminoácidos livres também têm sido quantificados em méis de melato, tais como: ácido aspártico, serina, glicina, lisina, cisteína, ácido glutâmico, treonina, alanina, prolina, valina, metionina, tirosina, histidina, arginina, fenilalanina, hidroxiprolina, leucina, isoleucina, glutamina, cistina, asparagina, ornitina, triptofano, ácido  $\alpha$ -aminoadípico, ácido  $\alpha$  e  $\beta$ -aminobutírico e trans 4-hidroxiprolina, com com lisina ( $167 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e prolina ( $207 \text{ mg kg}^{-1}$ ) em maiores concentrações em méis de melato de *Pinus* spp. da Turquia (SILICI; KARAMAN, 2014); prolina ( $263 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e leucina ( $85,5 \text{ mg kg}^{-1}$ ) em maiores concentrações em espécies não definidas da Polônia (JANISZEWSKA et al., 2012); fenilalanina ( $3002 \text{ mg kg}^{-1}$ ), prolina ( $946 \text{ mg kg}^{-1}$ ), leucina ( $877 \text{ mg kg}^{-1}$ ), tirosina ( $664 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e isoleucina ( $597 \text{ mg kg}^{-1}$ ) como aminoácidos majoritários em espécies não definidas da Turquia (KIVRAK et al., 2015).

Méis de melato estão crescentemente sendo valorizados por consumidores e indústrias alimentícias em todo o mundo, devido principalmente, ao sabor forte característico que diferem de méis florais.

Assim, este aumento no interesse por méis de melato em países europeus requer sua diferenciação entre estes e outros tipos de méis (florais) como uma resposta ao mercado consumidor (JERKOVIC et al., 2010; SIMOVA et al., 2012). A discriminação entre méis de melato e florais se torna difícil uma vez que há diferentes fontes visitadas pelas abelhas para produção destes dois tipos de méis, e sua composição pode depender, além da fonte de origem (melato ou floral), de condições climáticas e de solo, estocagem e de técnicas de processamento (ESCUREDO et al., 2013; JANISZEWSKA et al., 2012; MANYI-LOH et al., 2011). Embora alguns estudos sugiram que méis de melato possam ser distinguidos de méis florais por sua cor mais escura, maiores condutividades elétrica, pH, acidez, cinzas, substâncias nitrogenadas e concentrações de di- e trissacarídeos, e menores concentrações de monossacarídeos, bem como através de análise melissopalínológica (BOGDANOV; RUOFF; ODDO, 2004; CASTRO-VASQUEZ et al., 2006; SIMOVA et al., 2012), a discriminação geográfica de méis é uma abordagem de especial interesse para fins de monitoramento deste produto. Nesta proposta, usualmente são selecionados parâmetros específicos ou marcadores químicos, como compostos orgânicos voláteis (YANG et al., 2012), razão isotópica multielementar (SCHELLENBERG et al., 2010), composição mineral (RIZELIO et al., 2012), carboidratos (CONSONNI; CAGLIANI; COGLIATI, 2013), análises melissopalínológicas (CORVUCCI et al., 2015), bem como perfil e concentrações de aminoácidos (PATZOLD; BRUCKNER, 2006).

De uma forma geral, as avaliações envolvendo discriminação geográfica são associadas à abordagens quimiométricas, objetivando encontrar parâmetros que evidenciem especificidades de diferentes tipos de méis.

Embora os aminoácidos possam originar de diferentes fontes, como néctar, abelha melífera e pólen (COMETTO; FAYE; NARANJO, 2003), ou estarem principalmente relacionados à presença de pólen em méis (PINHEIRO et al., 2015), em mel de melato de bracatinga (MMB), estes podem originar do floema da espécie *Mimosa scabrella* Bentham que serve de alimento para as cochonilhas, pois esta espécie pertence à família Leguminosae, uma espécie com capacidade de fixar nitrogênio e que pode conter até 0,4% de substâncias nitrogenadas como proteínas, aminoácidos e amidas (CAMARGO-RICALDE et al., 2010; MAZUCHOWSKI; RECH; TORESAN, 2014), sugerindo um maior número de aminoácidos livres (AAL) e/ou maiores concentrações destes em MMB, mesmo após o processamento de cochonilhas.

Uma vez que perfis e razões de aminoácidos podem caracterizar regiões específicas, a determinação destes tem sido utilizada para discriminação de origens botânica e geográfica de méis. Dentre as técnicas cromatográficas utilizadas destaca-se a cromatografia a gás (GC, do inglês *gas chromatography*), cromatografia a líquido (LC, do inglês *liquid chromatography*) e o espectrômetro de massas (MS) tem sido reportado como o mais sensível e seletivo dentre os detectores utilizados, além de permitir a elucidação estrutural dos compostos analisados (KIVRAK, 2015; NOZAL et al., 2004; PATZOLD; BRUCKNER, 2006).

Com relação aos métodos baseados em GC para determinação de aminoácidos, todos requerem a etapa de derivatização para produção de adutos voláteis e baseiam-se, principalmente, em reações rápidas em solução aquosa em que os aminoácidos reagem com solução de cloroformiato de etila, cloroformiato de metila ou N-metil-N-terc-butildimetilsilil-trifluoracetamida (NOZAL et al., 2004).

Com base no exposto, este estudo foi realizado para determinar aminoácidos livres (AAL) por GC-MS, pela primeira vez em mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) (MMB) e melato de cochonilhas (*Tachardiella* sp.) (M), objetivando propor uma discriminação geográfica entre méis de melato de mesma espécie e mesorregião utilizando quimiometria, bem como elucidar a contribuição destes AAL de cochonilhas (*Tachardiella* sp.) e de abelhas (*Apis mellifera*) ao MMB.



## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA DA ESPÉCIE *Mimosa scabrella* Benth.

Com a colaboração e suporte técnico do Eng<sup>o</sup> Agrônomo Saulo Luis Poffo da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI), foram selecionados para este estudo produtores de MMB com apiários próximos aos bracatingais dos municípios de interesse. Objetivando garantir a autenticidade do MMB, a identificação botânica da espécie *Mimosa scabrella* Benth foi confirmada pelo Prof. Dr. Daniel de Barcellos Falkenberg por comparação com amostra depositada no Herbário FLOR do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Catarina sob número de identificação FLOR 8578. As amostras foram coletadas em seus habitats naturais e a identificação foi realizada utilizando a metodologia taxonômica tradicional (STUESSY, 2009).

### 2.2 AMOSTRAGEM

As amostras utilizadas neste trabalho corresponderam a cinco municípios do Planalto Serrano do estado de Santa Catarina, identificadas utilizando os acrônimos apresentados no Quadro 1. No período de fevereiro a junho de 2014, 21 amostras de favos de MMB foram coletadas de três colmeias selecionadas aleatoriamente de cada apiário. Em duas regiões, foi possível coletar um total de 9 amostras de melato de cochonilhas (M) em bracatingais com localização próxima aos apiários utilizados nas coletas de MMB.

As amostras de M foram coletadas de forma manual diretamente da gota excretada através do ânus do afídeo em microtubos de polipropileno de 1 mL e transportadas sob refrigeração. As amostras de MMB foram transportadas sob refrigeração ( $5 \pm 2$  °C), drenadas em funil de vidro, homogeneizadas com bastão de vidro, centrifugadas a 2000 rpm por 10 min (Fanem, 280R, São Paulo, Brasil) em laboratório e ambas (amostras de MMB e M) foram então armazenadas sob congelamento ( $-18 \pm 2$  °C), até o momento das análises.

Quadro 1: Amostragem de mel de melato de bracatinga (MMB) e melato de cochonilha (M).

<b>Amostragem de MMB</b>			
<b>Município</b>	<b>Coordenadas Geográficas</b>	<b>Número de amostras</b>	<b>Identificação do apiário</b>
Bocaina do Sul (BS)	Altitude: 858 m Latitude: 27° 44' 32" Longitude: 49° 56' 25"	5	BS1; BS2; BS3; BS4; BS5.
Bom Retiro (BR)	Altitude: 870 m Latitude: 27° 48' 29" Longitude: 49° 32' 1"	3	BR1; BR2; BR3.
Lages (LG)	Altitude: 930 m Latitude: 27° 49' 0" Longitude: 50° 19' 35"	4	LG1; LG2; LG3; LG4.
Urubici (UB)	Altitude: 1087 m Latitude: 28° 1' 39" Longitude: 49° 36' 45"	3	UB1; UB2; UB3.
Urupema (UP)	Altitude: 1342 m Latitude: 28° 17' 38" Longitude: 49° 55' 54"	6	UP1; UP2; UP3; UP4; UP5; UP6.
<b>Amostragem de M</b>			
<b>Município</b>	<b>Coordenadas Geográficas</b>	<b>Número de amostras</b>	<b>Identificação do apiário</b>
Bocaina do Sul (BS)	Altitude: 858 m Latitude: 27° 44' 32" Longitude: 49° 56' 25"	3	BS3; BS4; BS5
Urupema (UP)	Altitude: 1342 m Latitude: 28° 17' 38" Longitude: 49° 55' 54"	6	UP1; UP2; UP3; UP4; UP5; UP6.

A Figura 8 ilustra a localização de amostragem no Planalto Serrano de Santa Catarina.

Figura 8: Municípios de amostragem do Planalto Serrano de Santa Catarina.



## 2.3 MATERIAL

Os padrões analíticos com concentração de  $200 \text{ nmol mL}^{-1}$  (alanina (Ala), sarcosina (Sar), glicina (Gly), ácido  $\alpha$ -aminobutírico (Aba), valina (Val), ácido  $\beta$ -aminoisobutírico ( $\beta$ -AiB), norvalina (Parão Interno, PI), leucina (Leu), allo-Isoleucina (aIle), isoleucina (Ile), treonina (Thr), serina (Ser), prolina (Pro), asparagina (Asn), tioprolina (Tpr), ácido aspártico (Asp), metionina (Met), hidroxiprolina (Hyp), ácido glutâmico (Glu), fenilalanina (Phe), ácido  $\alpha$ -aminoadípico (Aaa), ácido  $\alpha$ -aminopimélico (Apa), glutamina (Gln), ornitina (Orn), glicina-prolina (Gpr), lisina (Lys), histidina (His), hidroxilisina (Hly), tirosina (Tyr), prolina-hidroxiprolina (Php), triptofano (Trp), cistationina (Cth), cistina (Cys)), reagentes e coluna cromatográfica Zebron ZB-AAA GC foram fornecidos pelo Kit utilizado neste estudo *EZ: faast GC-MS for free amino acid analysis* (Phenomenex, Torrance, CA, E.U.A.). Água ultrapura foi obtida através do sistema Milli-Q Simplicity<sup>®</sup> UV (Millipore Corporation, Saverne, Alsace, França).

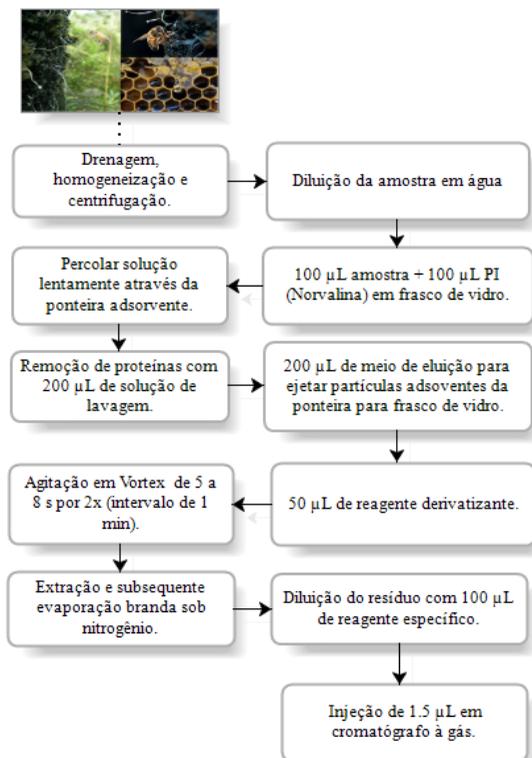
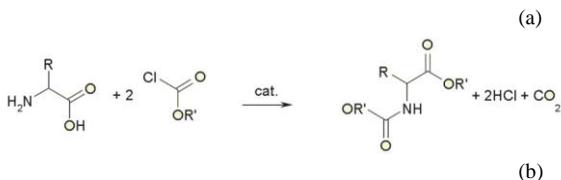
## 2.4 MÉTODOS

### 2.4.1 Derivatização

A derivatização de aminoácidos foi realizada em soluções aquosas de amostras em concentrações na faixa de 20 a  $100 \text{ mg mL}^{-1}$ , assegurando que a concentração de cada aminoácido presente na solução permanecesse na faixa de trabalho da curva de calibração.

O procedimento de tratamento de amostra foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante, cujos diagramas simplificados da reação e procedimento de derivatização utilizados pelo Kit *EZ: faast GC-MS for free amino acid analysis* são apresentados nas Figuras 9 (a) e (b), respectivamente.

Figura 9: Diagrama simplificado da reação (a) e do procedimento (b) de derivatização utilizado pelo Kit *EZ: faast GC-MS for free amino acid analysis*.



Fonte: Manual do usuário Kit *EZ: faast GC-MS for free amino acid analysis*.

O *software Agilent G1701EA GC/MSD Chemstation* (Santa Clara, CA, E.U.A.) foi utilizado para aquisição e processamento de dados, utilizando área de picos obtidos a partir do cromatograma de íons totais (TIC, do inglês *total ion chromatogram*).

#### 2.4.2 Condições cromatográficas

As análises foram desenvolvidas em um cromatógrafo a gás modelo 7890 acoplado a um espectrômetro de massas modelo 5975C (Agilent Technology, Palo Alto, CA, E.U.A.). As condições cromatográficas utilizadas foram de acordo com as recomendações do fabricante (*Kit:faast GC-MS for free amino acid analysis*), consistindo de fluxo de gás de arraste (He, 99,999% de pureza, Air Liquid Brasil Ltda, Florianópolis, Brasil) constante de  $1,1 \text{ mL min}^{-1}$ ; programação de temperatura de forno com gradiente iniciando em  $110 \text{ }^\circ\text{C}$ , com aumento de  $30 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$  até a temperatura final de  $320 \text{ }^\circ\text{C}$ ; temperatura da entrada de amostra (*inlet*) de  $250 \text{ }^\circ\text{C}$  e injeção de  $1,5 \text{ } \mu\text{L}$  em uma razão de *split* de 1:15; temperaturas do MS de  $240 \text{ }^\circ\text{C}$  para fonte de ionização,  $180 \text{ }^\circ\text{C}$  para o analisador de massas quadrupolo e  $310 \text{ }^\circ\text{C}$  para a linha de transferência. O modo *scan*, operado na faixa de  $45\text{-}450 \text{ m/z}$  com taxa de amostragem de  $3,5 \text{ scans s}^{-1}$  foi utilizado para aquisição de dados a fim de identificar possíveis compostos característicos nas diferentes regiões durante análise.

#### 2.4.3 Sistemas de controle e garantia de qualidade

Neste estudo, os parâmetros linearidade, efeito de matriz, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação e incerteza de medição foram avaliados (EURACHEM, 2014; EURACHEM/CITAC, 2012; EUROPEAN COMMISSION, 2002), juntamente com o parâmetro de conformidade do sistema (do inglês *system suitability*).

##### 2.4.3.1 Conformidade do sistema (*System suitability*)

O sistema cromatográfico foi avaliado por meio do desvio padrão relativo (DPR) obtido para dez injeções consecutivas de uma solução de padrão analítico de AAL e PI. A repetibilidade foi calculada para os parâmetros de área de pico corrigida, calculada como  $\text{área}_{(\text{analito})}/\text{área}_{(\text{PI})}$  e tempo de retenção corrigido, calculado como  $t_{\text{R}(\text{analito})}/t_{\text{R}(\text{PI})}$ .

#### 2.4.3.2 Linearidade e efeito de matriz

As curvas de calibração, na faixa linear de 50 a 200 nmol mL<sup>-1</sup>, foram preparadas em cinco níveis equidistantes, de diferentes soluções estoque, em triplicatas independentes no dia da análise e realizadas injeções aleatórias. A linearidade foi avaliada a partir do método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) com verificação das premissas de normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e homoscedasticidade (teste de Bartlett) de resíduos (BURKE, 2001; SHAPIRO; WILK, 1965). O efeito de matriz foi avaliado através do método de adição padrão, em função da indisponibilidade de amostra branco, e os coeficientes angulares foram comparados pelo teste-*t* com avaliação prévia da homogeneidade das variâncias pelo teste *F* de Snedecor (SNEDECOR; COCHRAN, 1989).

#### 2.4.3.3 Precisão e exatidão

A repetibilidade (precisão *intra-day*) foi determinada através da análise de triplicatas independentes da mistura de padrões de AAL, nos níveis de concentração de 50 e 100 nmol mL<sup>-1</sup>, preparadas em mesmo dia, e a exatidão foi determinada por meio da recuperação aparente de amostras fortificadas, em triplicatas independentes, nos dois níveis de concentração citados anteriormente. Os resultados foram expressos como DPR (%) (EURACHEM, 2014).

#### 2.4.3.4 Limites de detecção e quantificação

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

#### 2.4.3.5 Incerteza de medição

A incerteza expandida (*U*) foi estimada de acordo com o procedimento apresentado por Konieczka e Namiesnik (2010) e EURACHEM/CITAC (2012). A equação final (Equação 1) desenvolvida abrangeu as fontes de incerteza padrão relativa de concentração de padrões ( $u_{r(\text{stand})}$ ), calibração ( $u_{r(\text{cal})}$ ), precisão ( $u_{r(\text{rep})}$ ) e exatidão ( $u_{r(\text{acc})}$ ), considerando um fator de cobertura (*k*) de 2 (intervalo de confiança de aproximadamente 95%).

$$U = k \sqrt{(u_{r(stand)})^2 + (u_{r(cal)})^2 + (u_{r(rep)})^2 + (u_{r(acc)})^2} \quad (1)$$

#### 2.4.4 Avaliação Ecoescala Analítica

O método analítico utilizado foi avaliado através da ferramenta semi-quantitativa Eco-escala Analítica (do inglês, *Analytical Eco-Scale*) proposta por Galuszka et al. (2012), o qual sugere que uma análise ideal, conforme os princípios da química analítica verde (GAC, do inglês *green analytical chemistry*), receba uma pontuação de 100. Então, penalidades de pontos específicos são atribuídos para cada parâmetro analítico de acordo com o grau da concentração de reagentes, risco, consumo de energia e geração de resíduos, reduzindo o valor de 100 e distanciando o método de uma análise adequada. O resultado da pontuação classifica o método para aplicação em GAC de acordo com a escala: > 75 (excelente), > 50 (aceitável) e < 50 (inadequada).

#### 2.4.5 Análise estatística

O pacote estatístico Statsoft Statistica<sup>®</sup> (Ultimate Academic) licenciado pela Superintendência de Governança Eletrônica e Tecnologia da Informação e Comunicação (SeTIC) - UFSC foi utilizado para análises estatísticas. A análise de distribuição de normalidade dos dados obtidos foi realizada a partir do teste de Shapiro-Wilk (SHAPIRO; WILK, 1965) e, nos casos de evidência de não normalidade de distribuição, o teste não paramétrico Mann-Whitney foi utilizado para identificar diferenças entre dois grupos independentes e o teste de Wilcoxon foi utilizado para comparar duas variáveis (AAL presentes em MMB e M) (BURKE, 2001). Para a análise apenas das amostras de MMB, foram utilizadas as duplicatas de preparo dos AAL analisados (n=42) e, nos casos de evidência de não normalidade de distribuição dos dados, o teste não paramétrico Kruskal-Wallis, utilizado para comparação de pelo menos três grupos, foi aplicado para identificar diferenças estatisticamente significativas entre as regiões; as ferramentas estatísticas multivariadas de análise de agrupamentos (CA, do inglês *cluster analysis*) e análise de componentes principais (PCA, do inglês *principal component analysis*) foram utilizadas para verificar a tendência no conjunto de dados objetivando discriminar geograficamente as regiões analisadas. Diferenças entre os valores médios obtidos em um intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ) foram

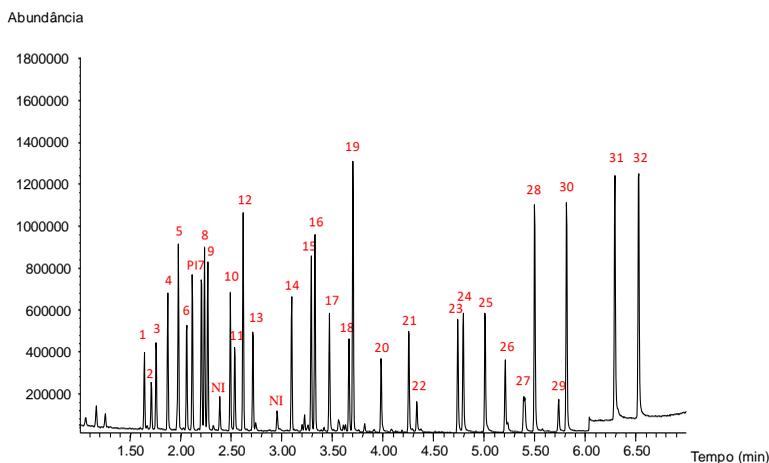
considerados estatisticamente diferentes e os resultados expressos como média  $\pm$  incerteza expandida ( $U$ ).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 REAÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE AAL

O procedimento de derivatização consistiu em *clean-up*, seguido de extração em fase sólida, com derivatização em fase orgânica e reagente cloroformiato de alquila (que reage com os grupamentos amins e carboxilas, produzindo derivativos estáveis a temperatura ambiente), para posterior extração líquido-líquido. As condições cromatográficas e parâmetros recomendados pelo Kit *EZ:faast GC-MS for free amino acid analysis* permitiu a identificação de 32 AAL, com boa resolução, como pode ser observado na Figura 10.

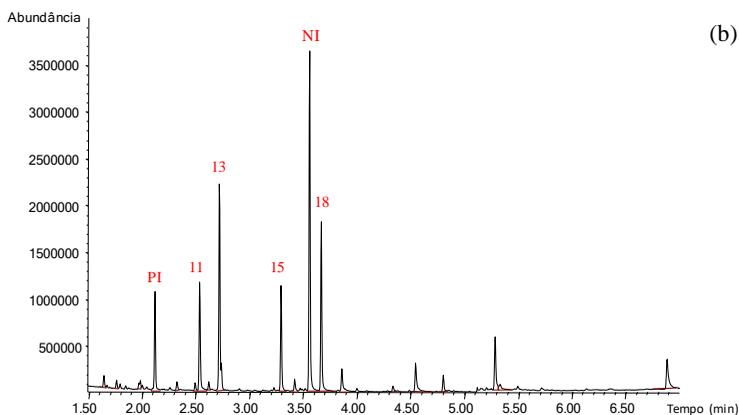
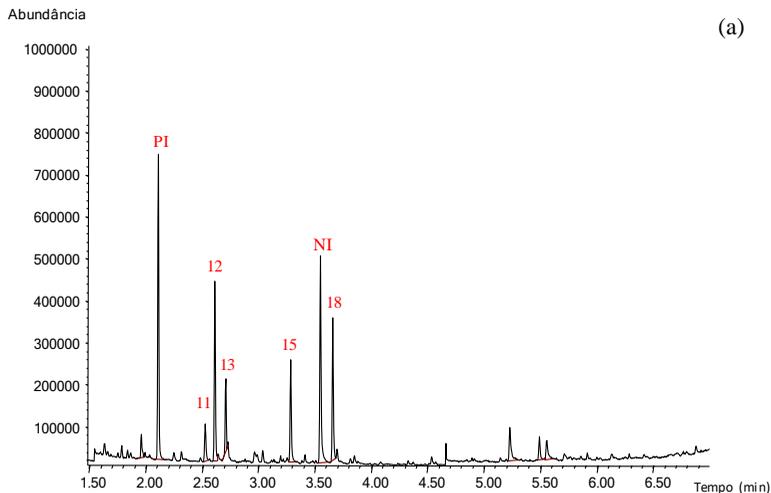
Figura 10: TIC obtido pelo GC-MS para mistura de 32 aminoácidos livres (100 nmol mL<sup>-1</sup>) e PI (Norvalina 200 nmol mL<sup>-1</sup>).



Legenda - 1: Ala; 2: Sar; 3: Gly; 4: ABA; 5: Val; 6:  $\beta$ -AiB; PI: Norvalina; 7: Leu; 8: alle; 9: Ile; 10: Thr; 11: Ser; 12: Pro; 13: Asn; 14: Tpr; 15: Asp; 16: Met; 17: Hyp; 18: Glu; 19: Phe; 20: Aaa; 21: Apa; 22: Gln; 23: Orn; 24: Gpr; 25: Lys; 26: His; 27: Hly; 28: Tyr; 29: Php; 30: Trp; 31: Cth; 32: Cys. Condições cromatográficas - injeção: 1,5  $\mu$ L; split 1:15 a 250  $^{\circ}$ C; gás de arraste: hélio com vazão de 1,1 mL min<sup>-1</sup>; gradiente de temperatura: 110  $^{\circ}$ C, com aumento de 30  $^{\circ}$ C min<sup>-1</sup> até 320  $^{\circ}$ C; condições MS - temperaturas de fonte, MS e linha de transferência: 240, 180 e 310  $^{\circ}$ C, respectivamente; faixa de *scan*: 45 a 450 m/z; taxa de amostragem: 3,5 scans s<sup>-1</sup>.

A aplicação do método demonstrou a presença predominante dos AAL Ser, Pro, Asn, Asp e Glu nas amostras de MMB e M, como pode ser observado na Figura 11(a) e (b). Portanto, a verificação da performance analítica com relação aos parâmetros de validação para a quantificação proposta foi realizada somente para estes analitos.

Figura 11: TIC obtido pelo GC-MS para amostras de (a) mel de melato de bracatinga e (b) melato de cochonilhas.



Legenda - PI: Norvalina 200 nmol mL<sup>-1</sup>; 11: Ser; 12: Pro; 13: Asn; 15: Asp; 18: Glu; NI: Não identificado.

A comparação do espectro de massa do composto não identificado (NI) com os compostos referência da biblioteca NIST/2011 apresentou probabilidade de até 73% de identificação para o composto Metil-Leucina, porém, por indisponibilidade de padrão analítico para procedimento de derivatização e possível confirmação, este composto não foi utilizado na avaliação do presente estudo.

### 3.2 SISTEMAS DE CONTROLE E GARANTIA DE QUALIDADE

A avaliação dos parâmetros de validação de um método analítico assegura medições analíticas confiáveis, sendo parte integrante de sistemas de controle e garantia de qualidade (QA/QC, do inglês *quality assurance and quality control systems*), e a estimativa da incerteza de medição é uma ferramenta que favorece ainda mais a confiabilidade dos resultados (KONIECZKA; NAMIESNIK, 2010). Uma vez que alguns parâmetros de validação do método proposto pelo Kit *EZ:faast GC-MS for free amino acid analysis* foram avaliados para matriz mel por Nozal et al. (2004), neste trabalho foram avaliados os parâmetros de linearidade, efeito de matriz, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação, incerteza de medição e conformidade do sistema.

A Tabela 3 ilustra os resultados obtidos para a avaliação do desempenho analítico do método.

Tabela 3: Avaliação do desempenho analítico de aminoácidos livres por GC-MS.

Parâmetros	Ser	Pro	Asn	Asp	Glu
Linearidade (nmol mL <sup>-1</sup> )	50 a 200	50 a 200	50 a 200	50 a 200	50 a 200
$R^2$	0,9935	0,9944	0,9910	0,9939	0,9931
LD (nmol mL <sup>-1</sup> )	11,5	6,45	11,5	11,5	14,8
LQ (nmol mL <sup>-1</sup> )	38,5	21,5	38,4	38,4	49,3
Precisão instrumental					
Área do pico corrigida (DPR, %)	2,16	1,62	2,30	2,07	2,12
Tempo de retenção corrigido (DPR, %)	0,01	0,02	0,02	< 0,01	0,01
Precisão <i>Intraday</i> (DPR, %)	≤ 5,98	≤ 1,88	≤ 4,03	≤ 2,43	≤ 1,70
Exatidão (%)	101 a 104	96,5 a 96,9	86,3 a 95,6	80,6 a 82,0	82,5 a 85,1
$U$ (%)	18,3	10,8	17,8	14,7	23,8

Legenda:  $R^2$  - coeficiente de determinação; LD - limite de detecção; LQ - limite de quantificação;  $U$  - incerteza expandida.

A curva de calibração apresentou linearidade na faixa avaliada de acordo com resultados obtidos para  $R^2$  ( $\geq 0,99$ ), testes de normalidade ( $p$

$\geq 0,05$  pelo teste de Shapiro-Wilk) e homoscedasticidade ( $p \geq 0,05$  pelo teste de Bartlett) para todos os analitos, indicando que o uso do método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) foi aplicado adequadamente. O DPR para a precisão instrumental foi  $\leq 2,30\%$  para área do pico e  $\leq 0,02\%$  para o tempo de retenção, demonstrando que o sistema instrumental estava adequado para o uso. O DPR para a precisão *intra-day* apresentou valores  $\leq 5,98\%$ , que está em concordância com o critério de aceitabilidade de 10% e a exatidão variou de 80,6 a 104%, que está de acordo com o critério de aceitabilidade de 80 a 110% (EUROPEAN COMMISSION, 2002). Não foi identificado efeito de matriz na faixa avaliada, uma vez que a falta de ajuste ( $p > 0,05$ ) não foi observada quando a inclinação média ( $a$ ) da equação de regressão linear da curva aquosa foi comparada com a inclinação média ( $a$ ) da curva em matriz mel por aplicação do teste  $t$ , uma vez que as variâncias foram consideradas homogêneas quando comparadas pelo teste F ( $p > 0,05$ ).

Os valores observados para incerteza expandida do método foram 18,3, 10,8, 17,8, 14,7 e 23,8% para Ser, Pro, Asn, Asp e Glu, respectivamente, e a avaliação da exatidão foi a maior fonte de incerteza, demonstrando concordância com trabalhos que determinaram a incerteza expandida em procedimentos contendo extração em fase sólida e extração líquido-líquido previamente à análise em GC-MS em matrizes complexas, apresentado resultados de até 24,3% (ABREU et al., 2006; STEPAN et al., 2004).

### 3.3 AVALIAÇÃO ECOESCALA ANALÍTICA

Embora o método proposto utilize reação de derivatização, etapa que deve ser evitada de acordo com GAC, o procedimento utilizado neste estudo é rápido (aproximadamente 15 min por amostra) e os reagentes são manipulados por um período curto de tempo e em pequenos volumes (na ordem de  $\mu\text{L}$ ), permitindo que o uso de uma capela de exaustão efetiva e equipamentos de proteção individual (comumente encontrados em laboratórios de química) mantenham o operador em segurança. De acordo com a abordagem de Galuszka et al. (2013), o método proposto atende à alguns requisitos de GAC tais como mínima quantidade de amostra, medições *in situ*, método automatizado, mínima geração de resíduo (850  $\mu\text{L}$ , aproximadamente), método multi-analito (32 aminoácidos) e mínimo consumo de energia (15 min, incluindo preparo de amostra e análise em GC-MS), evidenciando

análise aceitável de acordo com a ferramenta Ecoescala Analítica, com pontuação final de 51 (> 50).

### 3.4 ANÁLISE DE AMOSTRAS

#### 3.4.1 Mel de melato de bracatinga (MMB) e melato de cochonilhas (M)

Alguns autores têm avaliado somente a concentração de AAL totais em melatos de cochonilhas em suas espécies hospedeiras, tais como Fischer et al. (2002) que analisou melato da espécie *Metopeurum fuscoviride* em *Tanacetum vulgare* da Alemanha; Dhami et al. (2011) em melato de *Ultracoelostoma* spp. em *Nothofagus* spp., melato de *Coelostomidia wairoensis* em *Kunzea ericoides* e melato de *Coelostomidia zealandica* em *Myoporum laetum* e *Pittosporum crassifolium* da Nova Zelândia; e somente um estudo quantificou os AAL individualmente em melato de *Tuberculatos quercicola* em *Quercus dentata* do Japão (YAO; AKIMOTO, 2002). A falta de estudos na matriz melato de cochonilhas pode dever-se à dificuldade de coleta deste material (volume na ordem de  $\mu\text{L}$ ) podendo ainda estar localizados nas extremidades mais altas das plantas, como ocorre por exemplo, na espécie *M. scabrella* B., hospedeira de cochonilhas produtoras de melato, objeto de estudo do presente trabalho. Para este estudo foi possível coletar M de bracatingais próximos aos apiários utilizados na coleta de MMB das regiões de BS e UP.

Os resultados da determinação de AAL em amostras MMB e M destas duas regiões da mesorregião do planalto serrano de SC estão ilustrados na Tabela 4.

Tabela 4: Concentrações médias ( $\text{mg kg}^{-1} \pm U$ ) de aminoácidos livres em amostras de mel de melato de bractanga (MMB) e melato de cochoilhas (M).

Região	Ser		Pro		Asn		Asp		Glu	
	MMB	M	MMB	M	MMB	M	MMB	M	MMB	M
BS3	178 ± 32	282 ± 52	466 ± 50	113 ± 12	215 ± 38	279 ± 49	297 ± 43	215 ± 32	788 ± 187	1216 ± 289
BS4	236 ± 43	167 ± 31	303 ± 33	28,5 ± 3,1	244 ± 43	338 ± 60	330 ± 48	21,9 ± 3,2	868 ± 207	27,5 ± 6,5
BS5	286 ± 52	133 ± 24	492 ± 53	<LQ	550 ± 97	300 ± 53	403 ± 59	<LQ	887 ± 211	243 ± 58
<b>Média</b>	<b>233</b>	<b>194</b>	<b>420</b>	<b>70,9</b>	<b>336</b>	<b>306</b>	<b>343<sup>b</sup></b>	<b>79,0</b>	<b>848</b>	<b>495</b>
UP1	331 ± 60	210 ± 38	506 ± 55	<LQ	611 ± 108	<LQ	176 ± 26	65,7 ± 9,7	849 ± 202	464 ± 110
UP2	159 ± 29	310 ± 57	574 ± 62	<LQ	281 ± 50	325 ± 58	150 ± 22	285 ± 42	491 ± 117	752 ± 179
UP3	144 ± 26	380 ± 70	435 ± 47	<LQ	346 ± 61	356 ± 63	181 ± 26	348 ± 51	911 ± 217	837 ± 199
UP4	315 ± 58	490 ± 90	600 ± 64	168 ± 18	510 ± 90	653 ± 115	148 ± 22	141 ± 21	719 ± 171	617 ± 147
UP5	312 ± 57	137 ± 25	447 ± 48	48,1 ± 5,2	447 ± 79	129 ± 23	138 ± 20	<LQ	806 ± 192	354 ± 84
UP6	282 ± 52	237 ± 43	476 ± 51	<LQ	628 ± 111	<LQ	193 ± 28	<LQ	797 ± 190	458 ± 109
<b>Média</b>	<b>257</b>	<b>294</b>	<b>506<sup>d</sup></b>	<b>108<sup>e</sup></b>	<b>471</b>	<b>366</b>	<b>164<sup>c</sup></b>	<b>210</b>	<b>762</b>	<b>581</b>
<sup>a</sup> p S-W	0,10	0,29	0,09	<0,01	0,18	0,36	0,04	0,08	0,05	0,96
<sup>a</sup> p M-W	0,60	0,20	0,30	0,57	0,20	0,80	0,02	0,60	0,44	0,44
<sup>a</sup> p W	0,85		0,01		0,37		0,13		0,11	

Legenda: Ser (serina); Pro (prolina); Asn (asparagina); Asp (ácido aspártico); Glu (ácido glutâmico); BS (Bocaina do Sul); UP (Urupema); 1 a 6: diferentes apiários; <sup>a</sup>valor de  $p$  (nível de significância de 5%); S-W (teste de normalidade de Shapiro-Wilk); <sup>b,c</sup>Letras diferentes em mesma coluna indicam diferença significativa entre as duas regiões de acordo com o teste de Mann-Whitney (M-W) ( $p < 0,05$ ). <sup>d,e</sup>Letras diferentes em mesma linha indicam diferenças significativas entre as duas variáveis (MMB e M) para cada AAL (Ser, Pro, Asn, Asp and Glu) de acordo com o teste de Wilcoxon (W) ( $p < 0,05$ ).

Os resultados de AAL predominantes variaram de 144 a 331 mg kg<sup>-1</sup> em MMB e de 133 a 490 mg kg<sup>-1</sup> em M para Ser; de 303 a 600 mg kg<sup>-1</sup> em MMB e de < LQ a 168 mg kg<sup>-1</sup> em M para Pro; de 215 a 628 mg kg<sup>-1</sup> em MMB e de < LQ a 653 mg kg<sup>-1</sup> em M para Asn; de 138 a 403 mg kg<sup>-1</sup> em MMB e de < LQ a 348 mg kg<sup>-1</sup> em M para Asp; e de 491 a 911 mg kg<sup>-1</sup> em MMB e de 27,5 a 1216 mg kg<sup>-1</sup> em M para Glu. Devido a falta de estudos com relação às concentrações de AAL em M, principalmente melato de cochonilhas utilizados para produção de mel, pode-se verificar que os AAL identificados em M estão em concordância com aqueles comumente encontrados em melatos de outras espécies (DHAMI et al., 2011). Ácido aspártico, serina, asparagina, glutamina, glicina e fenilalanina foram os aminoácidos encontrados em melato de *Metopeurum fuscoviride* com asparagina e glutamina como aminoácidos predominantes (FISCHER et al., 2002); valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, ácido glutâmico e tirosina foram detectados nas espécies analisadas por Dhami et al. (2011), com prolina como o aminoácido mais abundante. As concentrações de AAL encontrados no presente estudo foram maiores quando comparadas ao estudo de Yao e Akimoto (2002), que obteve concentrações de, aproximadamente, 51, 37, 12 e 3,0 mg kg<sup>-1</sup> para Ser, Pro, Asp e Glu, respectivamente, em melato de *Tuberculatos quercicola* em *Quercus dentata*.

#### 3.4.1.1 Estatística aplicada ao mel de melato de bracinga (MMB) e melato de cochonilhas (M)

Até o presente momento não há estudos de comparação entre a composição de AAL em melatos de cochonilhas e o mel de melato obtido a partir desta matéria prima, a fim de identificar a origem destes constituintes presentes no mel. Neste trabalho foi possível verificar a contribuição de AAL de cochonilhas (*Tachardiella* sp.) e abelhas *Apis mellifera* ao produto final MMB.

A normalidade dos dados obtidos foi verificada por meio do teste de Shapiro-Wilk ( $p > 0,05$ ) e pode-se observar na Tabela 4 que Pro em M e Asp em MMB não apresentaram distribuição de dados normal, então o teste não paramétrico Mann-Whitney, utilizado para comparar grupos independentes, foi utilizado para detectar possíveis diferenças entre as duas origens geográficas e observou-se que somente Asp em MMB apresentou diferença significativa estatisticamente ( $p < 0,05$ ), indicando que a região onde o MMB é produzido influencia na concentração deste AAL. Com relação à origem geográfica do M, não foram constatadas diferenças significativas entre as concentrações

médias dos AAL predominantes. A partir do teste não paramétrico de Wilcoxon, que compara grupos dependentes, foi possível comparar os AAL de MMB e M, com o objetivo de investigar a contribuição destes pela abelha ao mel, e pode ser verificado na Tabela 4 que somente Pro apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparadas as concentrações médias obtidas em MMB e M, enquanto não foram observadas diferenças significativas para Ser, Asn, Asp e Glu ( $p > 0,05$ ). Logo, por meio da análise realizada, pode-se sugerir que a contribuição efetiva das abelhas, nas regiões e apiários analisados, foi Pro, demonstrando resultados significativamente maiores em MMB quando comparados ao M, Ser, Asn, Asp e Glu podem ser fornecidos e/ou consumidos pelas abelhas após o processamento das cochonilhas.

### **3.4.2 Mel de melato de bracinga (MMB)**

O aumento da demanda por méis de melato em alguns países europeus requer sua diferenciação de outros tipos de méis, e entre eles como uma resposta ao mercado consumidor. Além disso, devido à contaminação entre méis, a autenticação é um importante aspecto de controle de qualidade e sua relação com a garantia de origem, em termos de fonte e identificação geográfica, necessita ser determinada (SIMOVA et al., 2012).

Os resultados para a determinação de AAL em amostras de MMB de cinco municípios do Planalto Serrano de SC estão registrados na Tabela 5.

Tabela 5: Concentração média ( $\text{mg kg}^{-1} \pm U$ ) de aminoácidos livres em mel de melato de bracatinga.

Região	Ser	Pro	Asn	Asp	Glu
BS1	320 ± 58	569 ± 61	529 ± 94	408 ± 60	1339 ± 319
BS2	333 ± 61	489 ± 53	1072 ± 190	453 ± 66	1447 ± 344
BS3	178 ± 32	466 ± 50	215 ± 38	296 ± 43	788 ± 187
BS4	236 ± 43	303 ± 33	244 ± 43	330 ± 48	868 ± 207
BS5	286 ± 52	492 ± 53	550 ± 97	403 ± 59	886 ± 211
<b>Média</b>	<b>271<sup>b</sup></b>	<b>464<sup>a</sup></b>	<b>522<sup>a,b</sup></b>	<b>378<sup>b</sup></b>	<b>1065<sup>b</sup></b>
UP1	331 ± 60	506 ± 55	611 ± 108	176 ± 26	849 ± 202
UP2	159 ± 29	574 ± 62	281 ± 50	150 ± 22	491 ± 117
UP3	144 ± 26	435 ± 47	346 ± 61	181 ± 26	911 ± 217
UP4	315 ± 58	600 ± 65	510 ± 90	148 ± 22	719 ± 171
UP5	312 ± 57	447 ± 48	447 ± 79	137 ± 20	806 ± 192
UP6	282 ± 52	476 ± 51	628 ± 111	193 ± 28	797 ± 190
<b>Média</b>	<b>257<sup>a,b</sup></b>	<b>506<sup>a,b</sup></b>	<b>471<sup>b</sup></b>	<b>164<sup>a,b</sup></b>	<b>762<sup>a,b</sup></b>
LG1	140 ± 26	862 ± 93	243 ± 43	203 ± 30	546 ± 2,87
LG2	162 ± 30	674 ± 73	276 ± 49	280 ± 41	595 ± 5,80
LG3	165 ± 30	592 ± 64	211 ± 37	340 ± 50	880 ± 7,27
LG4	175 ± 32	584 ± 63	190 ± 34	339 ± 50	657 ± 12,1
<b>Média</b>	<b>160<sup>a,b</sup></b>	<b>678<sup>a,b</sup></b>	<b>230<sup>a,b</sup></b>	<b>290<sup>a,b</sup></b>	<b>670 ± 148<sup>a,b</sup></b>
BR1	89,8 ± 16	778 ± 84	104 ± 18	142 ± 21	296 ± 70
BR2	56,7 ± 10	1067 ± 115	66,0 ± 12	81,7 ± 12	111 ± 26
BR3	80,7 ± 15	929 ± 100	122 ± 21	157 ± 23	181 ± 43
<b>Média</b>	<b>75,7<sup>a</sup></b>	<b>924<sup>b</sup></b>	<b>97,2<sup>a</sup></b>	<b>127<sup>a</sup></b>	<b>196<sup>a</sup></b>

Legenda: Ser (serina); Pro (prolina); Asn (asparagina); Asp (ácido aspártico); Glu (ácido glutâmico); BS (Bocaina do Sul); UP (Urupema); LG (Lages); BR (Bom Retiro); UB (Urubici); 1 a 6: diferentes apiários; <sup>a,b</sup>Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as regiões de acordo com o teste de Kruskal-Wallis (K-W) ( $p < 0,05$ ).

Tabela 5: Concentração média ( $\text{mg kg}^{-1} \pm U$ ) de aminoácidos livres em mel de melato de bracatinga (Conclusão).

Região	Ser	Pro	Asn	Asp	Glu
UB1	191 $\pm$ 35	420 $\pm$ 45	308 $\pm$ 54	172 $\pm$ 25	798 $\pm$ 190
UB2	193 $\pm$ 35	511 $\pm$ 55	283 $\pm$ 50	171 $\pm$ 25	583 $\pm$ 139
UB3	209 $\pm$ 38	335 $\pm$ 36	336 $\pm$ 59	234 $\pm$ 34	651 $\pm$ 155
<b>Média</b>	<b>198<sup>a,b</sup></b>	<b>422<sup>a</sup></b>	<b>309<sup>a,b</sup></b>	<b>193<sup>a,b</sup></b>	<b>677<sup>a,b</sup></b>
<sup>c</sup> <i>p</i> S-W	0,21	0,03	0,01	0,05	0,20
<sup>c</sup> <i>p</i> K-W	0,03	0,01	0,01	< 0,01	0,02

Legenda: Ser (serina); Pro (prolina); Asn (asparagina); Asp (ácido aspártico); Glu (ácido glutâmico); UB (Urubici); 1 a 3: diferentes apiários; <sup>a,b</sup>resultados médios com letras diferentes em mesma coluna indicam diferença significativa entre as regiões de acordo com o teste de Kruskal-Wallis (K-W) ( $p < 0,05$ ).<sup>c</sup>valor de *p* (nível de significância de 5%); S-W (teste de normalidade de Shapiro-Wilk).

Os resultados encontrados em MMB nas regiões amostradas variaram de 56,7 a 333  $\text{mg kg}^{-1}$  para Ser, de 303 a 1067  $\text{mg kg}^{-1}$  para Pro, de 66,0 a 1072  $\text{mg kg}^{-1}$  para Asn, de 81,7 a 453  $\text{mg kg}^{-1}$  para Asp e de 111 a 1447  $\text{mg kg}^{-1}$  para Glu. Os valores obtidos neste estudo para os AAL em MMB, em média, foram maiores do que os resultados observados por outros autores em méis florais e de melato (Tabela 6).

Tabela 6: Aminoácidos livres (mg kg<sup>-1</sup>) obtidos por outros autores em méis de melato e floral.

Autores	Mel	Localidade	Ser	Pro	Asn	Asp	Glu
*Iglesias et al. (2004)	Méis de melato de espécies variadas	Espanha	71,2	905	239	267	389
*Iglesias et al. (2006)	Méis florais de diferentes origens botânicas	Espanha	299	674	80,1	47,9	78,3
Janiszewska et al. (2012)	Mel de melato de espécies não definidas	Polónia	9,58	264	Não informado	12,2	11,4
Janiszewska et al. (2012)	Méis florais de diferentes origens botânicas	Polónia	6,20 a 15,7	189 a 293	3,23 a 28,5	4,28 a 30,7	5,65 a 13,6
Kivrak, 2015	Mel de melato de espécie não definidas	Turquia	ND	943	4,89	ND	85,1
Nozal et al. (2004)	Méis florais de diferentes origens botânicas	Espanha	11,7 a 12,8	243 a 467	20,1 a 93,9	17,4 a 126	16,9 a 192
Silici e Karaman (2014)	Mel de melato de <i>Pinus</i> spp.	Turquia	4,7	207	Não informado	39,8	42,4
Neste estudo	Mel de melato de <i>Mimosa scabrella</i> Bentham	Brasil	56,7 a 333	303 a 1067	66 a 1072	81,7 a 453	111 a 1447

Legenda: \*Resultados em peso seco; Ser: serina; Pro: prolina; Asn: Asparagina; Asp: Ácido aspártico; Glu: Ácido glutâmico; ND: não detectado.

Embora poucos estudos tenham quantificado AAL em méis, os resultados apresentados na Tabela 6 estão em concordância com a hipótese de maiores concentrações de AAL na espécie *M. scabrella* B.

#### 3.4.2.1 Quimiometria aplicada às amostras de mel de melato de bracinga (MMB)

Até o momento, a determinação de aminoácidos tem sido utilizada somente para discriminação entre méis de melato e florais (IGLESIAS et al., 2004; SILICI; KARAMAN, 2014), não havendo registros de determinação de AAL para discriminação entre méis de melato.

A partir dos resultados obtidos na Tabela 5, os resultados de AAL que não apresentaram distribuição normal por meio do teste de Shapiro-Wilk ( $p < 0,05$ ) foram Pro e Asn, então, o teste não paramétrico Kruskal-Wallis foi utilizado para verificar diferenças significativas entre as regiões analisadas. Observou-se que, a um nível de significância de 5%, Ser, Asp e Glu apresentaram diferença significativa entre as regiões de BR e BS, Pro entre as regiões de BR e UB e Asn entre as regiões de BR e UP ( $p < 0,05$ ).

A Tabela 7 ilustra os resultados obtidos a partir da análise de matriz de correlação das variáveis de MMB (AAL) utilizando *software* StatSoft Statistica®

Tabela 7: Correlações obtidas em análise de matriz de correlação.

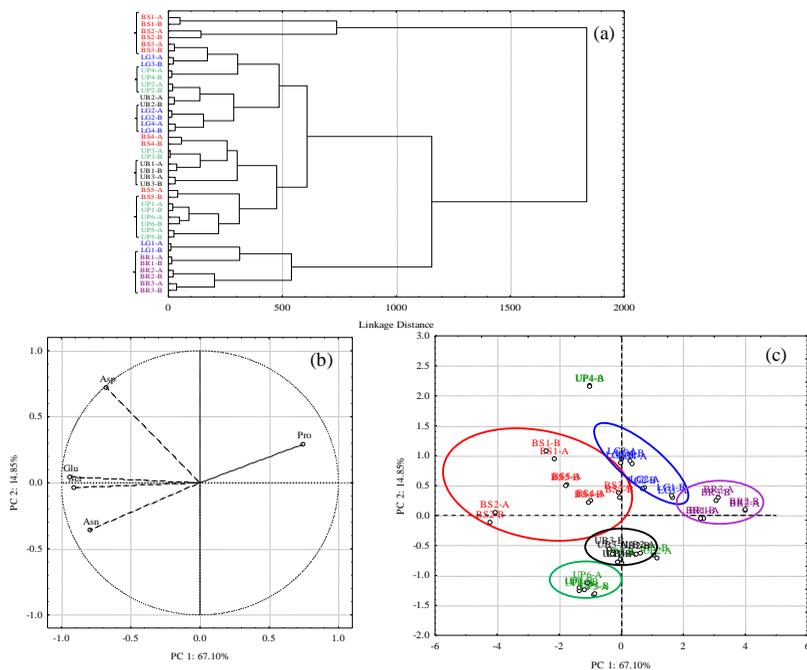
Variáveis	Ser	Pro	Asn	Asp	Glu
Ser	1,00	<b>-0,61*</b>	<b>0,72*</b>	<b>0,56*</b>	<b>0,78*</b>
Pro		1,00	<b>-0,45*</b>	<b>-0,31*</b>	<b>-0,66*</b>
Asn			1,00	0,30	<b>0,73*</b>
Asp				1,00	<b>0,65*</b>
Glu					1,00

\*Correlações significativas a um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ) n=42.

A partir da avaliação da Tabela 7 podem ser observadas correlações significativas a um nível de significância de 5% entre Ser, Pro, Asn, Asp e Glu. Então estas variáveis foram selecionadas para PCA para buscar discriminar amostras de MMB de acordo com as regiões analisadas do planalto serrano de SC, bem como identificar as variáveis responsáveis pelos agrupamentos.

A técnica de CA (*Complete linkage, euclidean distances*) foi utilizada para examinar a tendência no conjunto de dados a fim de investigar possíveis agrupamentos de amostras de MMB do Planalto Serrano de Santa Catarina. A partir da quantificação de AAL predominantes, foi possível avaliar a similaridade entre os municípios analisados e pode ser observado na Figura 12(a) seis agrupamentos principais que representam os municípios de BS, UB, LG, UP (dois agrupamentos) e BR.

Figura 12: (a) Dendrograma para municípios do Planalto Serrano de Santa Catarina resultante de CA dos dados correspondentes às concentrações de aminoácidos livres (AAL) em mel de melato de bracatinga (MMB). (b) Pesos resultantes de PCA para AAL de MMB. (c) Escores resultantes de PCA para regiões do planalto serrano de SC correspondentes às concentrações de AAL.

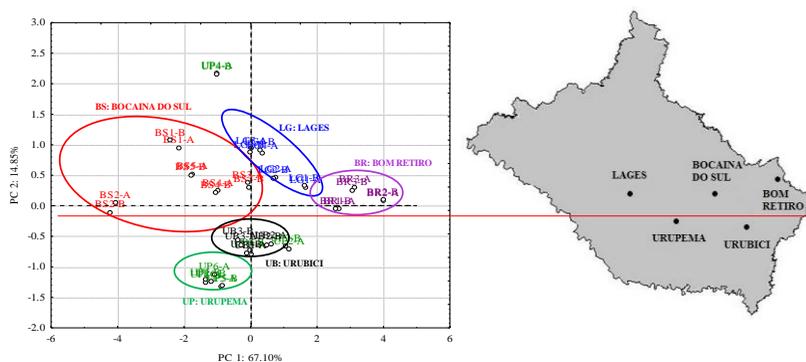


A Figura 12(b) ilustra o gráfico de pesos das principais PCs para as variáveis (AAL) dos MMB analisados e pode ser observado que PC1 explica a maior parte da variabilidade dos dados com 67,1% para Ser, Pro, Asn e Glu enquanto que para PC2, 14,8% é explicada pela variável Asp, e ambas PCs apresentaram valores próximo a 1 (devida à

proximidade ao círculo unitário). Estes valores são considerados adequados, uma vez que se obteve uma variância total explicada  $\geq 70\%$  (CHUDZINSKA; BARALKIEWICZ, 2010; KAISER et al., 1960; RIZELIO et al., 2012); confiabilidade esta justificada pela soma das duas primeiras PCs explicarem 82% da variância total dos dados obtidos, bem como a garantia de origem geográfica das amostras analisadas que, segundo Fechner et al. (2016), pode validar o modelo de classificação quimiométrico proposto. Além disso, a Figura 12(b) demonstra a distribuição das variáveis que melhor representam PC1 com relação à PC2, permitindo a identificação das variáveis responsáveis pelos agrupamentos dos municípios nos respectivos quadrantes na Figura 12(c), podendo-se sugerir que as correlações entre Asn, Glu e Ser são responsáveis pelo agrupamento na região de BS, Asn pelo agrupamento nas regiões de UP e UB e um comportamento diferenciado de Pro foi responsável pelo agrupamento das regiões de LG e BR, uma vez que a concentração média obtida nas variáveis analisadas apresentou maiores concentrações de Asp e Glu em BS, maiores concentrações de Pro em BR e maiores concentrações de Asn e Ser na regiões de BS e UP, bem como menores concentrações em quadrantes opostos. A Figura 12(c) representa o gráfico de distribuição das amostras de MMB de acordo com seus escores e demonstra que estas amostras podem diferir de acordo com sua origem geográfica nos municípios de BS, LG, BR, UB e UP.

A Figura 13 ilustra os escores resultantes de PCA para amostras de MMB (Figura 12(c)) e o mapa geográfico dos municípios do Planalto Serrano de Santa Catarina utilizados neste estudo (Figura 8).

Figura 13: Escores resultantes de PCA para amostras de mel de melato de bracinga e mapa geográfico dos municípios do Planalto Serrano de Santa Catarina.



De acordo com as coordenadas geográficas apresentadas no Quadro 1, através da quantificação dos AAL Asp, Glu e Pro foi possível discriminar entre dois municípios muito próximos (BS e BR); e a quantificação de Asn e Ser permitiu a discriminação entre os municípios de UP e UB, que apresentam maiores altitudes com relação às demais localizações. No entanto, algumas amostras de MMB apresentaram concentrações similares, provavelmente devido à proximidade entre estes municípios (Figura 13). Assim, a distribuição das amostras apresentou discriminação similar ao mapa de localização geográfica dos municípios analisados do Planalto Serrano de Santa Catarina, particularmente com relação à orientação geográfica norte e sul, como é demonstrado na Figura 13: municípios de BS, LG e BR encontram-se nos quadrantes superiores do gráfico de escores (orientação norte do mapa de localização geográfica) enquanto os municípios de UP e UB encontram-se nos quadrantes inferiores do gráfico (orientação sul do mapa).



## 4 CONCLUSÃO

Neste estudo, pela primeira vez, AAL foram determinados em MMB (*Mimosa scabrella* Bentham) e M (*Tachardiella* sp.).

Quando comparados os resultados obtidos de AAL em MMB e M, com exceção de Pro, que eventualmente não foi observada em M, Ser, Asn, Asp e Glu foram encontrados em ambos grupos amostrais diferindo somente na concentração destes. Logo, somente Pro diferiu significativamente, podendo-se sugerir que a efetiva contribuição da abelha nos municípios e apiários analisados foi Pro.

A partir da determinação de AAL em MMB de cinco municípios do Planalto Serrano de Santa Catarina, foram observadas maiores concentrações dos aminoácidos analisados quando comparados aos resultados obtidos por outros estudos em méis de melato e florais. As técnicas de CA e PCA apresentaram eficiência na discriminação destas amostras de méis de acordo com sua origem geográfica previamente conhecida, além de ser possível a identificação dos principais AAL responsáveis pelos agrupamentos das amostras nestes municípios. Além disso, a classificação obtida pela PCA forneceu uma discriminação similar ao mapa de localização geográfica dos municípios do Planalto Serrano de Santa Catarina.

Estes resultados demonstraram que AAL predominantes podem ser considerados uma estratégia analítica para autenticação destes méis com relação à identificação geográfica.



## REFERÊNCIAS

- ABREU, S. M.; CABONI, P.; CABRAS, P.; GARAU, V. L.; ALVES, A. Validation and global uncertainty of a liquid chromatographic with diode array detection method for the screening of azoxystrobin, kresoxim-methyl, trifloxystrobin, famoxadone, pyraclostrobin and fenamidone in grapes and wine. **Analytica Chimica Acta**, v. 573-574, p. 291-297, 2006.
- ANKLAM, E. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. **Food Chemistry**, v. 63, n. 4, p. 549-562, 1998.
- BOGDANOV, S.; RUOFF, K.; ODDO, L. P. Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys: a review. **Apidologie**, v.35, p. S4-S17, 2004.
- BURKE, S. Missing values, outliers, robust statistics and non-parametric methods, statistics and data analysis. **LCGC Europe**, online Supplement, 19-24, 2001.
- CAMARGO-RICALDE, S. L. et al. Effect of mycorrhizae on seedlings of six endemic *Mimosa* L. species (Leguminosae-Mimosoideae) from the semi-arid Tehuacán-Cuicatlán Valley, Mexico. **Trees**, v. 24, p. 67-78, 2010.
- CASTRO-VAZQUEZ, L.; DIAZ-MAROTO, C.; PEREZ-COELLO, M. S. Volatile composition and contribution to the aroma of Spanish honeydew honeys. Identification of a new chemical marker. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 4809-4813, 2006.
- CHUDZINSKA, M.; BARALKIEWICZ, D. Estimation of honey authenticity by multielements characteristics using inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) combined with chemometrics. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 284-290, 2010.
- COMETTO, P. M.; FAYE, P. F.; NARANJO, R. D. P. Comparison of free amino acids profile in honey from three argentinian regions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 5079-5087, 2003.

CONSONNI, R.; CAGLIANI, L. R.; COGLIATI, C. Geographical discrimination of honeys by saccharides analysis. **Food Control**, v. 32, p. 543-548, 2013.

CORVUCCI, F. et al. The discrimination of honey origin using melissopalynology and Raman spectroscopy techniques coupled with multivariate analysis. **Food Chemistry**, v. 169, p. 297-304, 2015.

DHAMI, M. K. et al. Species-specific chemical signatures in scale insect honeydew. **Journal of Chemical Ecology**, v. 37, p. 1231-1241, 2011.

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

EURACHEM. **The fitness for purpose of analytical methods, a laboratory guide to method validation and related topics**. 2<sup>a</sup> ed., 2014. Disponível em: < <https://www.eurachem.org/> > Acesso em: 15 mar. 2015.

EURACHEM/CITAC **Guide quantifying uncertainty in analytical measurement**, 3<sup>a</sup> ed., 2012.

EUROPEAN COMMISSION. **Council Directive 2002/657/EC, Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results**. Official Journal of the European Communities, p. 8-36, 2002.

FECHNER, D. C. et al. Multivariate classification of honeys from Corrientes (Argentina) according to geographical origin based on physicochemical properties. **Food Bioscience**, v. 15, 49-54, 2016.

FISCHER, M. K. et al. Age-specific patterns in honeydew production and honeydew composition in the aphid *Metopeurum fuscoviride*: implications for ant-attendance. **Journal of Insect Physiology**, v. 48, p. 319-326, 2002.

GALUSZKA, A.; KONIECZKA, P.; MIGASZEWSKI, Z. M.; NAMIESNIK, J. Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 37, p. 61-72, 2012.

GALUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, Z.; NAMIESNIK, J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 50, p. 78-84, 2013.

IGLESIAS, M. T. et al. Usefulness of amino acid composition to discriminate between honeydew and floral honeys. Application to honeys from a small geographic area. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 84-89, 2004.

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

JANISZEWSKA, K.; ANIOŁOWSKA, M.; NOWAKOWSKI, P. Free amino acids content of honeys from Poland. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 62, n.2, p. 85-89, 2012.

JERKOVIC, I. et al. Molecular diversity of volatile compounds in rare willow (*Salix* spp.) honeydew honey: identification of chemical biomarkers. **Molecular Diversity**, v. 14, p. 237-248, 2010.

KAISER H. The application of electronic computers to factor analysis. **Educational and Psychological Measurement**, v. 20, p. 141-151, 1960.

KIVRAK, I. Free Amino Acid Profiles of 17 Turkish Unifloral Honeys. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 38, p. 855-862, 2015.

KONIECZKA, P.; NAMIESNIK, J. Estimating uncertainty in analytical procedures based on chromatographic techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 882-891, 2010.

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

MAZUCHOWSKI, J. Z.; RECH, T. D.; TORESAN, L. **Bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham): Cultivo, manejo e usos da espécie**. Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina: Florianópolis, 2014.

NOZAL, M. J. et al. Rapid and sensitive method for determining free amino acids in honey by gas chromatography with flame ionization or mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1047, p. 137-146, 2004.

PATZOLD, R.; BRUCKNER, H. Gas chromatographic detection of D-amino acids in natural and thermally treated bee honeys and studies on the mechanism of their formation as result of the Maillard reaction. **European Food Research and Technology**, v. 223, p. 347-354, 2006.

PINHEIRO, L. A. et al. Effects of pollen, sugars and honeydew on lifespan and nutrient levels of *Episyrphus balteatus*. **Biocontrol**, v. 60, p. 47-57, 2015.

PIRINI, A. et al. Capillary gas chromatographic determination of free amino acids in honey as a means of discrimination between different botanical sources. **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 15, p. 165-170, 1992.

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

SCHELLENBERG, A. et al. Multielement stable isotope ratios (H, C, N, S) of honey from different European regions. **Food Chemistry**, v. 121, p. 770-777, 2010.

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, v. 52, p. 591-611, 1965.

- SILICI, S.; KARAMAN, K. Chemometric approaches for the characterization of Turkish rhododendron and honeydew honeys depending on amino acid composition. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 37, p. 864-877, 2014.
- SIMOVA, S. et al. A rapid differentiation between oak honeydew honey and nectar and other honeydew honeys by NMR spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 134, p. 1706-1710, 2012.
- SNEDECOR, G. W.; COCHRAN, W. G. **Statistical Methods**. 8th ed. Iowa: State University Press, 1989.
- STEPAN, R.; HAJŠLOVA, J.; KOCOUREK, V.; TICHÁ, J. Uncertainties of gas chromatographic measurement of troublesome pesticide residues in apples employing conventional and mass spectrometric detectors. **Analytica Chimica Acta**, v. 520, p. 245-255, 2004.
- STUESSY, T. F. **Plant taxonomy: the systematic evaluation of comparative data**. 2nd ed. New York: Comumbia University Press, 2009.
- YANG, Y. et al. Melissopalynological origin determination and volatile composition analysis of Corsican “*Erica arborea* spring maquis” honeys. **Food Chemistry**, v. 134, p. 37-47, 2012.
- YAO, I.; AKIMOTO, S. Flexibility in the composition and concentration of amino acids in honeydew of the drepanosiphid aphid *Tuberculatus quercicola*. **Ecological Entomology**, v. 27, p. 745-752, 2002.



**CAPÍTULO 3: COMPARAÇÃO DE PROTEOMA PARA  
DISCRIMINAÇÃO ENTRE MÊIS FLORAL E DE MELATO DE  
MESMA ESPÉCIE BOTÂNICA (*Mimosa scabrella* Bentham)  
UTILIZANDO ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS**

Capítulo publicado: Azevedo, M. S.; Valentim-Neto, P. A.; Seraglio, S. K. T.; da Luz, C. F. P.; Arisi, A. C. M.; Costa, A. C. O. Proteome comparison for discrimination between honeydew and floral honeys from botanical species *Mimosa scabrella* Bentham by principal component analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, doi: 10.1002/jsfa.8317.



## COMPARAÇÃO DE PROTEOMA PARA DISCRIMINAÇÃO ENTRE MÉIS FLORAL E DE MELATO DE MESMA ESPÉCIE BOTÂNICA (*Mimosa scabrella* Bentham) UTILIZANDO ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS

### RESUMO

Devido à crescente valorização e apreciação de méis de melato em países europeus, e também às recorrentes misturas existentes entre os tipos de méis, a autenticação é um importante aspecto de controle de qualidade, fazendo-se necessário determinar sua relação com a garantia em termos de fonte (melato ou floral) a fim de discriminar estes tipos de méis como uma resposta ao mercado consumidor. Pertencente à composição minoritária do mel, além da importância de seus efeitos fisiológicos, as proteínas podem diferir de acordo com a fonte de produção de mel e sua qualidade tem sido relacionada às funções fisiológicas de seus compostos específicos, especialmente, proteínas de originárias de néctar, pólen, exsudação de cochonilhas e secreções de glândulas cefálicas de abelhas. Neste contexto, os objetivos deste estudo foram realizar a extração de proteínas de méis floral e de melato de mesma espécie botânica *Mimosa scabrella* Bentham e discriminar estes méis através da comparação do perfil de proteoma obtido por eletroforese em gel bidimensional utilizando análise de componentes principais (PCA). Tubos de ultrafiltração e pré-concentração foram utilizados para remoção de interferentes como pólen e carboidratos, previamente à extração proteica, e os resultados da análise de comparação de géis dos dois tipos de méis demonstrou um maior valor médio de *spots* proteicos em mel de melato de bracinga (160) quando comparado ao mel floral de bracinga (84), evidenciando uma diferença em média de 76 *spots* entre os dois tipos de méis e 45 *spots* proteicos comuns quando correlacionados automaticamente pelo *software*. O perfil de proteoma associado à PCA mostrou-se eficiente para a discriminação entre estes dois tipos de méis de mesma espécie botânica quando utilizados percentagem de volume de *spots* proteicos comuns, destacando-se como uma ferramenta usual para discriminação entre tipos de mel, mesmo não realizando identificação de proteínas específicas.

**Palavras-chave:** Proteínas. Mel floral de bracinga. Mel de melato de bracinga. *Mimosa scabrella* Bentham. 2DE. Análise de componentes principais.



## 1 INTRODUÇÃO

A composição proteica do mel tem sido pouco investigada, mas sabe-se que a concentração de nitrogênio é de aproximadamente 0,04 a 0,79% em média e que somente de 40 a 65% do nitrogênio total é correspondente a nitrogênio proteico, enquanto que o restante é atribuído aos aminoácidos livres (BILIKOVA; SIMUTH, 2010; GIROLAMO; D'AMATO; RIGHETTI, 2012).

A autenticidade de mel pode ser avaliada através de suas propriedades que podem ser definidas por análises instrumentais, físicas e químicas, e sua valorização tem sido relacionada às funções fisiológicas de compostos específicos. Dentre estes, encontram-se as proteínas originárias de néctar, pólen e, especialmente, de secreções de glândulas de abelhas melíferas, tais como as enzimas relacionadas ao metabolismo de carboidratos ( $\alpha$ -glucosidase,  $\beta$ -glucosidase, amilase e glucose oxidase) e proteínas da geleia real (RJ, do inglês *Royal Jelly*) (BILIKOVA; SIMUTH, 2010). Estudos têm demonstrado que proteínas destes grupos apresentaram atividades biológicas antioxidantes e bactericidas, normalmente atribuídas aos compostos fenólicos (KWAKMAN et al., 2010, MEDA et al., 2005), e especificamente, proteínas RJ demonstraram ação na regeneração de fígado, citoprotetora sobre hepatócitos, função imunorregulatória *in vitro* e *in vivo* e fonte de aminoácidos essenciais (ROSSANO et al., 2012).

Em mel de melato de bracinga (*Mimosa scabrella* Benth), além das fontes já citadas anteriormente (néctar, pólen, secreções de glândulas de abelhas melíferas), as proteínas também podem originar do floema da espécie *Mimosa scabrella* Benth que alimenta a cochonilha. Esta espécie pertence à família Leguminosae, com capacidade de fixar nitrogênio, podendo conter até 0,4% de substâncias nitrogenadas (proteínas, aminoácidos e amidas), sendo comumente utilizada para aumentar a fertilidade do solo (CAMARGO-RICALDE et al., 2010; MAZUCHOWSKI; RECH; TORESAN, 2014). Além disso, uma investigação proteômica em exsudatos de cochonilhas (*Acyrtosiphon pisum*) apresentou mais de 140 *spots* em análise de eletroforese bidimensional (2DE, do inglês *two dimensional gel electrophoresis*), e após isolamento, evidenciou uma ampla diversidade proteica (SABRI et al., 2013). Portanto, pode-se sugerir um maior número de proteínas e/ou maiores concentrações destas em mel de melato de bracinga (MMB) quando comparado aos outros méis de melato e, conseqüentemente, em méis florais, mesmo após o processamento da cochonilha, e esta diferença pode ser utilizada para

discriminação entre méis de melato e florais, inclusive de mesma espécie botânica.

A proteômica é definida como análise em larga escala de proteínas em um sistema biológico em um determinado momento de tempo, e inclui não somente a estrutura e função de uma proteína, mas também o estudo das modificações das proteínas, suas interações, localização intracelular e a quantificação de sua abundância. O perfil global de proteínas em Ciências dos Alimentos oferece múltiplas aplicações, tais como controle de qualidade e segurança alimentar, avaliação de processamento de alimentos e aspectos nutricionais e identificação de novos ingredientes alimentares com efeitos benéficos à saúde humana (CIFUENTES, 2007). Uma abordagem proteômica em investigação de produtos melíferos pode ser realizada através da análise de proteínas como compostos bioativos, podendo-se fazer uso de técnicas como eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE do inglês, *polyacrylamide gel electrophoresis-sodium dodecyl sulfate*), eletroforese em gel bidimensional (2DE, do inglês *two-dimensional gel electrophoresis*) e espectrometria de massas (MS, do inglês *mass spectrometry*); ou ainda, uma abordagem através da análise de atividade biológica de proteínas em nível de proteoma, como identificação e determinação de alterações em expressão proteica, informação sobre a presença de isoformas, modificações translacionais e interações proteicas (MEDA et al., 2005; JAMNIK; RASPOR; JAVORNIK, 2012).

A técnica para análise proteômica mais comumente utilizada é a 2DE para determinação de massas molares (MM) relativas das proteínas presentes em uma amostra. Esta consiste na separação de proteínas com base em seu ponto isoelétrico (pI) e MM. Na primeira etapa (primeira dimensão), chamada de focalização isoelétrica (IEF, do inglês *isoelectric focusing*), a amostra, após extraída e purificada, é submetida à migração eletroforética em fita de gel contendo um gradiente de pH até alcançar o pH onde sua carga líquida seja zero (pI); na segunda etapa (segunda dimensão), a tira resultante da primeira dimensão é submetida à eletroforese tradicional (SDS-PAGE) para separação das proteínas pelas MM. Após a separação das proteínas, a composição pode ser identificada qualitativamente e quantitativamente através da espectrometria de massas (MORAES et al., 2013). Alguns estudos têm reportado sobre o uso da técnica de SDS-PAGE (BARONI et al., 2002; BILIKOVA; SIMUTH, 2010; BRUDZYNSKI et al., 2013; NISBET et al., 2009; WANG et al., 2009; WON et al., 2008; YADZIR et al., 2011) e de 2DE (GIROLAMO; D'AMATO; RIGHETTI, 2012; HAYASHI et

al., 2011; ROSSANO et al., 2012) para separação de proteínas em amostras de mel. Ramon-Sierra, Ruiz-Ruiz e Ortiz-Vazquez (2015) discriminaram, utilizando SDS-PAGE, méis de abelhas sem ferrão e de abelhas *Apis mellifera*.

Uma vez que tem sido relatado que méis de melato apresentam maior teor de substâncias nitrogenadas (BOGDANOV; RUOFF; ODDO, 2004; SIMOVA et al., 2012), pode-se sugerir que a alta especificidade e/ou concentrações variadas de proteínas em méis possam discriminar tipos de méis (florais e de melato) de mesma espécie, incluindo de abelha, utilizando percentagem de volume de *spots* proteicos (Vol %) originários de 2DE, não havendo relatos da utilização desta técnica para esta discriminação.

Um protocolo de extração proteica varia de acordo com a amostra a ser investigada e a preparação consiste, primeiramente, em uma etapa de lise celular (podendo-se fazer uso de inibidores de proteases para impedir a degradação das proteínas) realizada através de ciclos de congelamento/descongelamento em N<sub>2</sub> líquido, sonicação e/ou maceração. Em seguida é utilizada uma solução de extração contendo agentes caotrópicos (como ureia e tioureia que desfazem interações não covalentes como as ligações de hidrogênio), detergentes não iônicos ou zwitteriônicos como 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato) (CHAPS, do inglês 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate) e TRITON X100 (do inglês 4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenyl-polyethylene glycol) que auxiliam na solubilização das proteínas, agentes redutores (como 1,4-ditiotreitol (DTT) ou β-mercaptoetanol, que rompem as ligações dissulfeto intra e intercadeias) e tampão com anfólitos carregadores que auxiliam na solubilização de proteínas, bem como manter a condutividade mais estável ao longo do gradiente de pH (MORAES et al., 2013).

Embora a combinação de alguns parâmetros físico-químicos estejam sendo propostos para a discriminação de méis florais e de melato, incluindo resíduo mineral fixo, cor, pH, perfil de carboidratos, prolina e análise melissopalínológica (BOGDANOV; RUOFF; ODDO, 2004; CONTI et al., 2007; MANZANARES et al., 2011; SANZ et al., 2005), há especial interesse por métodos analíticos específicos para esta discriminação já citados na literatura, tais como espectroscopia de ressonância magnética nuclear (SIMOVA et al., 2012), melissopalínologia e espectroscopia Raman (CORVUCCI et al., 2015); e determinação de aminoácidos livres por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS, do inglês *liquid*

*chromatography-mass spectrometry*) ou detector de arranjo de diodos (DAD), (COMETTO et al., 2003; SILICI; KARAMAN, 2014); e a análise de componentes principais (PCA, do inglês *Principal component analysis*) é a ferramenta estatística comumente utilizada para análise multivariada de dados nestas amostras. Apesar de não haver relatos do emprego de 2DE em discriminação de méis, esta técnica é amplamente utilizada em análises proteômicas.

Neste contexto, este estudo objetivou discriminar, pela primeira vez, méis floral e de melato de mesma espécie botânica *Mimosa. scabrella* Bentham utilizando comparação de proteoma obtido por 2DE utilizando PCA.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 AMOSTRAGEM

As amostras de mel de melato de bracatinga (MMB) e mel floral de bracatinga (MFB) foram coletadas de apiários dos municípios de Urupema (UP) e Urubici (UB), respectivamente, do Planalto Serrano do estado de Santa Catarina, totalizando três amostras de MMB (três favos coletados de três colmeias selecionadas aleatoriamente, no período de abril a junho de 2014) e três amostras comerciais de MFB. As amostras foram transportadas sob refrigeração ( $5 \pm 2$  °C) e os favos de MMB foram drenados em funil de vidro e homogeneizados em laboratório. As amostras (MMB e MFB) foram centrifugados a 2000 rpm por 10 min (Fanem, 280R, São Paulo, Brasil) para posterior congelamento ( $-18 \pm 2$  °C) até o momento da análise.

### 2.2 REAGENTES

Os reagentes ácido tricloroacético (TCA, do inglês *trichloroacetic acid*), DTT, ureia, tioureia, CHAPS, Tris-(hidroximetil)-aminometano (Tris)-HCl, SDS, glicina, N,N-metilenobisacrilamida, PSA (Persulfato de amônia) e Temed (Tetrametiletilenodiamina) de pureza  $\geq 98\%$ , agarose e glicerol para biologia molecular foram obtidos de Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, E.U.A.); Coomassie Brilliant Blue G-250 de Bio-Rad (Hercules, CA, E.U.A.); água ultrapura foi obtida através do sistema Milli-Q Simplicity<sup>®</sup> UV (Millipore Corporation, Saverne, Alsace, França).

### 2.3 ANÁLISE DE PÓLEN

A análise de pólen foi realizada pelo Centro de Pesquisa em Palinologia do Instituto Botânico do Departamento do Meio Ambiente do estado de São Paulo para confirmação da especificação de mel monofloral da espécie *Mimosa scabrella* Bentham do produto comercial MFB utilizado neste estudo. As amostras foram processadas sem aplicação de acetólise, de acordo com *European Standard Protocol* (MAURIZIO; LOUVEAUX, 1965) para estudos palinológicos, o qual 10 g de amostra de mel foram dissolvidas em 20 mL de água destilada (MAURIZIO; LOUVEAUX, 1965; VON DER OSHE et al., 2004) e o sedimento ressuspensão em glicerol:água (1:1) para posterior montagem e observação em lâmina de microscópio ótico (Olympus BX50, com

ampliação de lente de 400 a 1000 vezes). A identificação dos grãos de pólen foi realizada com base em dados da literatura (BARTH, 1989; ROUBIK; MORENO, 1991) e grãos de pólen referência previamente identificados pertencentes ao Centro de Pesquisa em Palinologia do Instituto Botânico do Departamento do Meio Ambiente do estado de São Paulo. Os grãos de pólen foram identificados utilizando o termo "tipo polínico" que significa que o pólen pertence a uma única espécie de planta, bem como a um grupo de espécies ou apresentam morfologia polínica similar. Em cada amostra, o resultado foi analisado em termos de tipo de pólen dominante, considerando representações superiores e inferiores de cada pólen e contribuições de néctar das plantas (nectaríferas, poliníferas e anemófilas) (BARTH, 1970a, b, c, d, e, 1989, 1990). A determinação da origem botânica foi baseada nas frequências de tipos polínicos de espécies nectaríferas e a determinação da origem geográfica foi baseada no espectro do pólen, que deve ser conforme a flora de uma determinada região e/ou de acordo com espectro de pólen referência ou descrição na literatura. As imagens foram avaliadas através do *software* ImageProplus<sup>®</sup>.

#### 2.4 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNA PARA ELETROFORESE EM GEL BIDIMENSIONAL (2DE)

A proteína total foi extraída de um *pool* de três amostras de MMB (coletado de três colmeias selecionadas aleatoriamente) e um *pool* de três amostras de MFB (produto comercial) e realizada triplicata de extração, obtendo-se três extratos de cada tipo de mel. As alíquotas em triplicatas de 2,5 g de *pools* de MMB e MFB foram diluídas em 2,5 mL de água ultra-purificada e transferidas para um tubo de ultra-filtração de 15 mL com uma membrana de limite de massa molar nominal (NMWL, do inglês *Nominal Molecular Weight Limit*) de 10 kDa (Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit, Millipore Corporation, U.S.A.) para purificação (principalmente remoção de açúcares e pólen) e pré-concentração por centrifugação a 4 °C e 5000 x g (Eppendorf, modelo 5810 R, Hamburgo, Alemanha) até volume de interesse (750 µL, aproximadamente). As proteínas foram precipitadas *overnight* com solução de TCA 12%/DTT 0,12% em acetona e centrifugadas a 4 °C e 20000 x g, os *pellets* de proteínas secos foram ressuspensos em 300 µL de uma solução contendo ureia 7 mol L<sup>-1</sup>, tiourea 2 mol L<sup>-1</sup>, CHAPS 0,3 g L<sup>-1</sup>, solução tampão IPG (do inglês *Immobilized pH gradient*) 0,2 mL L<sup>-1</sup>, pH 4-7 e DTT 0,15 g L<sup>-1</sup> como descrito previamente por Valentim-Neto et al. (2016). As concentrações proteicas foram

determinadas através do 2D Quant Kit (GE Healthcare, Uppsala, Suécia). Os procedimentos de extração proteica e de separação 2DE foram realizados em paralelo para as amostras MMB e MFB.

## 2.5 ELETROFORESE EM GEL BIDIMENSIONAL (2DE) EM MEL DE MELATO DE BRACATINGA (MMB) E MEL FLORAL DE BRACATINGA (MFB)

Os extratos proteicos em triplicata das amostras de MMB e MFB foram analisados por eletroforese em gel bidimensional (2DE). Três géis foram produzidos por amostra totalizando seis géis. A focalização isoeletrica (IEF, do inglês *Isoelectric Focusing*) foi realizada utilizando a tira desidratada de poliacrilamida (*strips*) com gradiente de pH imobilizado (IPG) de 13 cm na faixa linear entre 3-10 (GE Healthcare, Uppsala, Suécia). Os *strips* foram reidratados por 18 h com uma solução contendo 250 µg de proteína total solúvel diluída em solução de reidratação contendo solução tampão IPG 0,2 mL L<sup>-1</sup> pH 3-10 em um volume total de 250 µL.

Após reidratação, os *strips* com gradiente linear de pH na faixa entre 3-10, contendo as amostras, foram submetidos à IEF (primeira dimensão) em sistema Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare, Uppsala, Suécia). Sobre cada extremidade do *strip* foi colocado papel *pre-cut electrode wick* (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) hidratado em 150 µL de água e sobre estes os eletrodos de acordo com recomendações do fabricante. A programação para migração das moléculas sob ação de um campo elétrico em gel de poliacrilamida e pH na faixa linear entre 3-10 até alcançar seu ponto isoeletrico foi de 50 V até 25 V h, de 500 V até 500 V h, gradiente de voltagem de 1000 V até 750 V h, gradiente de voltagem de 4000 V até 2500 V h, gradiente de voltagem de 8000 V até 15000 V h a um limite de 50 mA por *strip*. Após IEF, *strips* foram mantidos sob -80 °C por pelo menos 18 h para então as proteínas nos IPG *strips* sofrerem redução com uma solução de DTT 10 mg mL<sup>-1</sup> em 5 mL de tampão de equilíbrio (ureia 6 mol L<sup>-1</sup>, Tris-HCl 50 mmol L<sup>-1</sup> pH 8,8, glicerol 3 mL L<sup>-1</sup>, SDS 0,2 g L<sup>-1</sup> e azul de bromofenol 2,5 mg L<sup>-1</sup>), preservando o estado totalmente reduzido de proteínas não alquiladas seguido por alquilação (de grupos tióis impedindo sua re-oxidação durante a eletroforese) com iodoacetamida 25 mg mL<sup>-1</sup> em mesma solução tampão citada anteriormente.

A eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, segunda dimensão) foi realizada em sistema SE-600 Ruby (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) com refrigeração. Os géis de

poliacrilamida 12,5% (contendo 0,27% N,N-metilenobisacrilamida, Tris-HCl 375 mmol L<sup>-1</sup>, SDS 0,1%, PSA 0,06% e Temed 0,06%) foram polimerizados com etiqueta numerada para identificação e *strips* e marcadores de massa molecular foram aplicados sobre os géis e selados com solução de agarose (agarose 0,5%, Tris-HCl 25 mmol L<sup>-1</sup>, glicina 192 mmol L<sup>-1</sup> e SDS 0,1%). A eletroforese foi realizada em gradiente de amperagem de 15 mA por gel por 25 min seguida de 30 mA por gel por 4 h e a temperatura foi mantida em 10 °C utilizando um circulador termoestático Multi Temp III thermostatic circulator (GE Healthcare, Uppsala, Suécia). Ao término da eletroforese, a fixação e a coloração dos *spots* de proteínas foi de acordo com Ferrari et al. (2014) que utiliza Coomassie Brilliant Blue G-250 0,01 g L<sup>-1</sup>.

## 2.6 DIGITALIZAÇÃO DE IMAGENS E ANÁLISE DE DADOS

Os géis das amostras de MMB e MFB foram digitalizados pelo Image Scanner System II (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) e a análise de pI, MM, intensidade, área e volume dos *spots* foi realizada através do *software* ImageMaster Platinum, versão 7.0 (GE Healthcare, Uppsala, Suécia). Os volumes de *spots* relativos (Vol %) foram comparados e analisados entre os seis géis dos dois tipos de mel (MMB e MFB) e os *spots* comuns aos seis géis foram selecionados e seu Vol % analisado através de PCA utilizando o pacote estatístico Statsoft Statistica® (Ultimate Academic) licenciado pela Superintendência de Governança Eletrônica e Tecnologia da Informação e Comunicação (SeTIC) - UFSC. Diferenças entre os Vol % obtidos em um intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ) foram considerados significantes estatisticamente.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, dois tipos de mel (MMB e MFB) de mesma espécie botânica *M. scabrella* B. foram submetidos à comparação de perfil proteômico comparativo.

A análise melissopalínológica foi realizada na amostra comercial de MFB a fim de confirmar a especificação de "mel monofloral de bracatinga". O principal tipo de pólen encontrado neste tipo de mel foi 92% de origem botânica *M. scabrella* de propriedade nectarífica, como pode ser observado na microfotografia do tipo polínico característico da espécie *Mimosa scabrella* Bentham (Figura 14), confirmando sua origem botânica e fitogeográfica (87%) como Floresta Ombrófila do Sul do Brasil, estando de acordo com a especificação de rotulagem do produto.

Figura 14: Microfotografia do tipo polínico da espécie *Mimosa scabrella* Bentham.

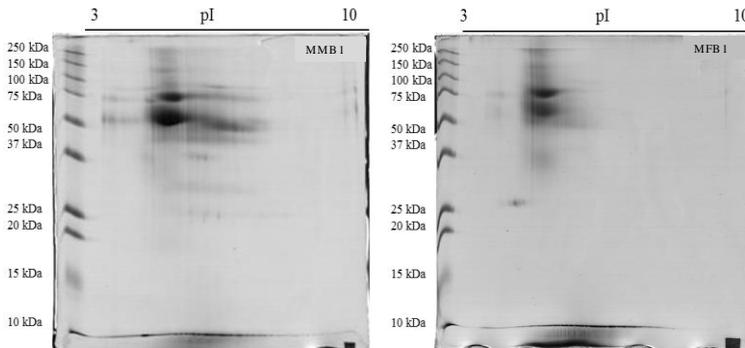


Com relação à dificuldade de extração e concentração de proteínas em amostras de méis, diferentes procedimentos têm sido utilizados através de protocolos específicos envolvendo solubilização em água ou solução tampão, centrifugação, diálise *overnight* (para remoção de açúcares e pólen) e secagem (HAYASHI et al., 2011; RAMON-SIERRA; RUIZ-RUIZ; ORTIZ-VAZQUEZ, 2015; ROSSANO et al., 2012), ultrafiltração (WANG et al., 2009; WON et al., 2008), ou utilizando esferas de captura *Proteominer*<sup>TM</sup> (GIROLAMO; D'AMATO; RIGHETTI, 2012). No entanto estes procedimentos podem demandar maior tempo, alto custo ou requerer maior quantidade de amostra (25 a 200 g). Devido à alta viscosidade de MMB causada pela presença de carboidratos (OUCHEMOUKH et al., 2010), especialmente maiores concentrações de oligossacarídeos característico deste tipo de mel quando comparado ao mel floral (SIMOVA et al., 2012), houve

uma dificuldade para a extração proteica, logo, tubos de ultrafiltração (NMWL de 10 kDa) foram utilizados para remoção destes interferentes, tais como pólen e carboidratos, bem como realizar a pré-concentração de proteínas. Os tubos de ultrafiltração apresentaram eficiência na remoção destes interferentes previamente à extração de proteínas nas amostras de méis floral e de melato através de simples diluição da amostra em água ultrapurificada e centrifugação a 4 °C e 5000 x g até volume de pré-concentração de aproximadamente 750 µL e utilização de menor massa de amostra de mel (2,5 g).

Cada tipo de mel (MMB e MFB) foi submetido à triplicata de preparo e a proteína solúvel total extraída apresentou valores médios de 0,42 e 0,16 mg g<sup>-1</sup> para MMB e MFB, respectivamente, então os seis extratos foram preparados e, um gel 2DE foi realizado para cada extrato, obtendo-se os perfis eletroforéticos com *spots* proteicos exclusivos e comuns de 10 a 250 kDa apresentados na Figura 15, os quais os três géis de extratos de proteínas do MMB e os três géis de MFB foram comparados.

Figura 15: Mapas representativos de perfil proteico de mel floral de bracinga (MFB) e mel de melato de bracinga (MMB). Primeira dimensão: 250 µg de proteínas em tampão IPG foram adicionados aos strips com gradiente linear de pH 3 a 10; segunda dimensão: géis SDS-PAGE 12,5% e coloração com Coomassie Brilliant Blue G-250.



A análise proteômica foi realizada por meio da avaliação dos seis géis utilizando o *software* ImageMaster e um valor médio de  $122 \pm 43$  *spots* proteicos foram detectados em todos os géis, variando de 65 a 168 *spots* totais como pode ser observado na Tabela 8.

Tabela 8: Número de spots totais, spots comuns (%), coeficientes angulares ( $a$ ) e coeficientes de correlação ( $r$ ) de gráficos de dispersão de mapas 2DE dos dois tipos de méis (MMB e MFB) de mesma espécie *Mimosa scabrella* Bentham.

Géis	Spots totais	Spots comuns (%)	$a$	$r$
MFB1	94	62	0,25	0,52
MFB2	93	60	0,58	0,62
MFB3	65	71	0,37	0,61
MMB1	158	97	0,96	0,92
MMB2	153	93	0,84	0,92
MMB3 (ref.)	168	91	-	-

O reduzido número de trabalhos que objetivou a obtenção do perfil de proteoma em amostras de méis utilizando 2DE, comumente selecionou e isolou os *spots* proteicos para identificação de proteínas, não relatando o número total de *spots* observados nas amostras para comparação com o presente estudo (GIROLAMO; D'AMATO; RIGHETTI, 2012; HAYASHI et al., 2011; ROSSANO et al., 2012).

O valor médio de *spots* proteicos para os três géis de mesmo tipo de mel variou de  $84 \pm 16$  *spots* para MFB a  $160 \pm 7,6$  *spots* para MMB, apresentando DPR menores do que 14% (Tabela 9).

Tabela 9: Número de spots médios, desvio padrão (DP), spots comuns e desvio padrão relativo (DPR) de mapas 2DE dos dois tipos de méis (MMB e MFB) de mesma espécie *Mimosa scabrella* Bentham.

Tipo de mel	Spots totais médios	DP	Spots comuns (%)	DPR (%)
MFB	84	16	54	14
MMB	160	7,6	28	12

A variabilidade entre os seis géis foi analisada através de gráficos de dispersão de *spots* comuns e, ao comparar os géis 2DE dos dois tipos de mel (MMB e MFB) utilizando MMB3 como gel referência (por apresentar maior número de *spots* totais), os coeficientes angulares ( $a$ ) variaram de 0,25 a 0,96 e os coeficientes de correlação ( $r$ ) variaram de 0,52 a 0,92 (Tabela 8), apresentando valores de  $a$  e  $r$  com alta variabilidade, no entanto, pode ser observado valores de  $a$  e  $r$  próximos a 1 quando correlacionadas as triplicatas apenas de géis de MMB (de 0,84 a 0,96 para  $a$  e 0,92 para  $r$ ) e menores valores quando

correlacionadas triplicatas dos géis MFB (de 0,25 a 0,58 para  $a$  e de 0,52 a 0,62 para  $r$ ), evidenciando diferenças na percentagem de volume dos *spots* comuns entre MMB e MFB.

Com o objetivo de validar a análise proteômica comparativa e verificar a variabilidade experimental de géis ou de extratos proteicos (CANGAHUALA-INOCENTE et al., 2013), a repetibilidade de *spots* detectados foi avaliada por comparação dos gráficos de dispersão para *spots* comuns entre as três replicas de preparo para cada tipo de mel. Os coeficientes angulares dos gráficos de dispersão variaram de 0,66 a 1,85 e de 0,84 a 0,96 para MFB e MMB, respectivamente, e os coeficientes de correlação variaram de 0,55 a 0,82 e de 0,88 a 0,92 para MFB e MMB, respectivamente (Tabela 10).

Tabela 10: Coeficientes angulares ( $a$ ) e coeficientes de correlação ( $r$ ) dos gráficos de dispersão dos mapas 2DE para comparação entre replicatas de preparo dos dois tipos de méis (MMB e MFB) de mesma espécie *Mimosa scabrella* Bentham.

Tipo de mel	Comparação	$a$	$r$
MFB	MFB1 x MFB2	1,85	0,73
	MFB1 x MFB3	1,41	0,55
	MFB2 x MFB3	0,66	0,82
MMB	MMB1 x MMB2	0,87	0,88
	MMB1 x MMB3	0,96	0,92
	MMB2 x MMB3	0,84	0,92

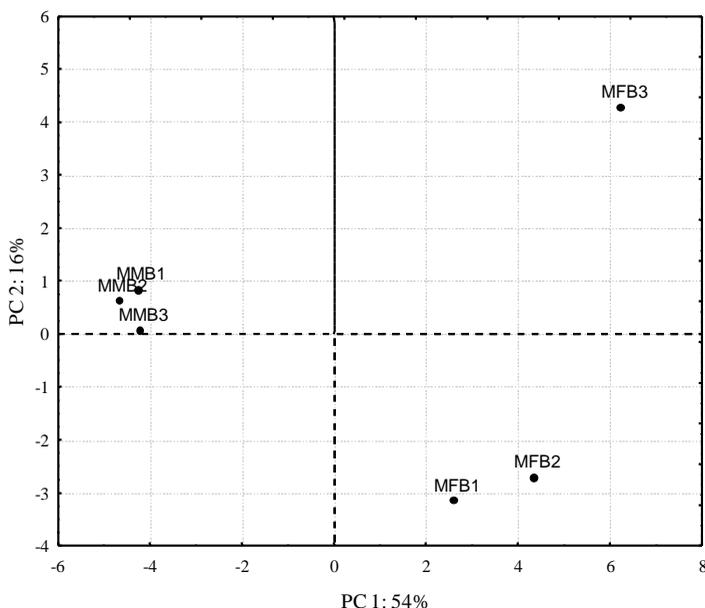
A variabilidade observada neste estudo entre os *spots* de replicatas de géis dos dois diferentes tipos de méis foi considerada aceitável, uma vez que a alta concentração de carboidratos e baixa concentração proteica podem dificultar o procedimento de extração e, até o momento, não há registros de avaliação de repetibilidade de *spots* detectados em amostras de méis por 2DE, sendo este o primeiro estudo que avalia a variabilidade experimental de géis ou de extratos proteicos em amostras de mel.

Quando comparados os três géis de MMB e os três géis de MFB, estes apresentaram 45 *spots* comuns correlacionados automaticamente pelo *software*, correspondendo a 54 e 28% do número de *spots* proteicos totais detectados em MFB e MMB, respectivamente (Tabela 9). A partir destes resultados pode-se observar similaridades entre os 2 tipos de mel através dos *spots* proteicos comuns, mas também pode ser observado o pequeno percentual de *spots* comuns quando comparado ao número de *spots* totais em MMB. O número de *spots* encontrado em MMB (160) foi maior que aquele encontrado em MFB (84), diferindo em 76 *spots*

proteicos que pode ser de especial interesse com relação à discriminação entre tipos de mel, além de apresentar uma diferença significativa no Vol % dos *spots* correlacionados ( $p < 0,05$ ) em 19 dos 45 *spots* comuns.

A análise de componentes principais foi realizada utilizando Vol % de *spots* comuns, a fim de discriminar amostras de MFB e MMB, e o gráfico de escores resultante pode ser observado na Figura 16.

Figura 16: Escores resultante de PCA para mel de melato de bracatinga (MMB) e mel floral de bracatinga (MFB) correspondentes aos 45 *spots* comuns (Vol %).



A partir da avaliação da Figura 16 pode ser observado o distanciamento da replicata MFB3 quando comparado aos demais géis de méis florais de bracatinga (MFB1 e MFB2) devido ao menor Vol % de *spots* comuns obtidos neste gel, que pode sugerir certa variabilidade experimental de preparo de gel ou de extrato proteico nesta replicata. Apesar do comportamento diferenciado da replicata MFB3, PC1 e PC2 explicaram 70% da variabilidade total dos dados e, neste caso, PCA discriminou entre os géis de MFB e MMB, demonstrando que estas amostras puderam diferir de acordo com o tipo de mel de mesma espécie botânica *Mimosa scabrela* Bentham.



## 4 CONCLUSÃO

Neste estudo, o uso de técnica de ultrafiltração foi eficiente na eliminação de interferentes como pólen e carboidratos, bem como proporcionou a possibilidade de pré-concentração por meio de centrifugação, sendo de especial interesse em casos quando há pouca disponibilidade de amostra e baixa concentração de proteínas para o procedimento de extração.

Mel de melato de bracinga apresentou um valor médio de *spots* proteicos de 160 e 84 foi o valor obtido para MFB, evidenciando uma diferença, em média, de 76 *spots* proteicos entre os dois tipos de méis, com 45 *spots* comuns quando correlacionados automaticamente pelo *software*. A partir do volume percentual de *spots* comuns da comparação do perfil proteômico (45), foi possível discriminar MMB e MFB de mesma espécie botânica *Mimosa scabrella* Bentham por meio da PCA, demonstrando ser uma ferramenta eficiente para discriminação entre tipos de mel, mesmo não se realizando identificação de proteínas específicas. Ademais, o maior número de *spots* proteicos em MMB (76), quando comparado ao MFB, pode ser um diferencial deste tipo de mel, tendo em vista a importância de proteínas como compostos bioativos.



## REFERÊNCIAS

BARONI, M. V. et al. Assessment of the floral origin of honey by SDS-PAGE immunoblot techniques. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 1362-1367, 2002.

BARTH, O. M. Análise microscópica de algumas amostras de mel. 1. Pólen Dominante. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 42, p. 351-366, 1970a.

\_\_\_\_\_. Análise microscópica de algumas amostras de mel. 2. Pólen Acessório. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 42, p. 571-590, 1970b.

\_\_\_\_\_. Análise microscópica de algumas amostras de mel. 3. Pólen Isolado. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 42, p. 747-772, 1970c.

\_\_\_\_\_. Análise microscópica de algumas amostras de mel. 4. Espectro polínico de algumas amostras de mel do Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 30, p. 575-582, 1970d.

\_\_\_\_\_. Análise microscópica de algumas amostras de mel. 5. Melato (“honeydew”) em mel de abelhas. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 30, p. 601-608, 1970e.

\_\_\_\_\_. **O pólen no mel brasileiro**. Rio de Janeiro: Luxor Editora, 1989.

\_\_\_\_\_. Pollen in monofloral honeys from Brazil. **Journal of Apicultural Research**, v. 29, n. 2, p. 89-94, 1990.

BILIKOVA, K.; SIMUTH, J. New criterion for evaluation of honey: quantification of royal jelly protein Apalbumin 1 in honey by ELISA. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 8776-8781, 2010.

BOGDANOV, S.; RUOFF, K.; ODDO, L. P. Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys: a review. **Apidologie**, v. 35, p. S4-S17, 2004.

BRUDZYNSKI, K.; SJAARDA, C.; MALDONADO-ALVAREZ, L. A New look on protein-polyphenol complexation during honey storage: is this a random or organized event with the help of dirigent-like proteins? **Plos One**, v.8, ed. 8, n. e72897, 2013.

CAMARGO-RICALDE, S. L. et al. Effect of mycorrhizae on seedlings of six endemic *Mimosa* L. species (Leguminosae-Mimosoideae) from the semi-arid Tehuacán-Cuicatlán Valley, Mexico. **Trees**, v. 24, p. 67-78, 2010.

CANGAHUALA-INOCENTE, G. C. et al. Identification of six differentially accumulated proteins of *Zea mays* seedlings (DKB240 variety) inoculated with *Azospirillum brasilense* strain FP2. **European Journal of Soil Biology**, v. 58, p. 45-50, 2013.

CIFUENTES, A. **Foodomics: Proteomics in Food Science**. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2007.

COMETTO, P. M. et al. Comparison of free amino acids profile in honey from three Argentinian regions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 5079-5087, 2003.

CONTI, M. E. et al. Characterization of Italian honeys (Marche Region) on the basis of their mineral content and some typical quality parameters. **Chemistry Central Journal**, v. 1, p. 1-14, 2007.

CORVUCCI, F. et al. The discrimination of honey origin using melissopalynology and Raman spectroscopy techniques coupled with multivariate analysis. **Food Chemistry**, v. 169, p. 297-304, 2015.

FERRARI C. et al. Expressed proteins of *Herbaspirillum seropedicae* in maize (DKB240) roots–bacteria interaction revealed using proteomics. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, p. 2267-2277, 2014.

GIROLAMO, F., D'AMATO, A., RIGHETTI, P. G. Assessment of the floral origin of honey via proteomic tools. **Journal of Proteomics**, v. 75, p. 9688-9699, 2012.

HAYASHY, T. et al. Immunological characterization of honey proteins and identification of MRJP 1 as an IgE-Binding protein. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 75, n. 3, p. 556-560, 2011.

JAMNIK, P., RASPOR, P., JAVORNIK, B. A proteomic approach for investigation of bee products: royal jelly, propolis and honey. **Food Technology and Biotechnology**, v. 50, n. 3, p. 270-274, 2012.

KWAKMAN, P. H. S. et al. How honey kills bacteria. **The FASEB Journal**, v. 24, p. 2576-2582, 2010.

MANZANARES, A. B. et al. Differentiation of blossom and honeydew honeys using multivariate analysis on the physicochemical parameters and sugar composition. **Food Chemistry**, v. 126, p. 664-672, 2011.

MAURIZIO, A.; LOUVEAUX, J. **Pollens de plantes mellifères d'Europe**. Union des Groupements Apicoles Français: Paris, 1965.

MAZUCHOWSKI, J. Z.; RECH, T. D.; TORESAN, L. **Bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham): Cultivo, manejo e usos da espécie**. Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina: Florianópolis, 2014.

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

MORAES, C. S. et al. **Série em biologia molecular: métodos experimentais no estudo de proteínas**. 1ª ed. Rio de Janeiro: IOC, 2013.

NISBET, C. et al. **The investigation of protein profile of different botanic origin honey and density saccharose- adulterated honey by SDS-PAGE method**. Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi, v. 15, ed. 3, p. 443-446, 2009.

OUCHEMOUKH, S. et al. HPLC sugar profiles of Algerian honeys. **Food Chemistry**, v. 121, p. 561-568, 2010.

RAMON-SIERRA, J. M.; RUIZ-RUIZ, J. C.; ORTIZ-VAZQUEZ, E. L. Electrophoresis characterisation of protein as a method to establish the entomological origin of stingless bee honeys. **Food Chemistry**, v. 183, p. 43-48, 2015.

- ROSSANO, R. et al. What are the proteolytic enzymes of honey and what they do tell us? A fingerprint analysis by 2-D Zymography of unifloral honeys. **Plos One**, v. 7, n. 11, e49164, 2012.
- ROUBIK, D. W.; MORENO, J. E. P. **Pollen and spores of Barro Colorado Island**. Missouri Botanical Garden: St Louis, 1991.
- SABRI, A. et al. Proteomic investigation of Aphid honeydew reveals an unexpected diversity of proteins. **Plos One**, v. 8, n. 9, e74656, 2013.
- SANZ, M. L. et al. A contribution to the differentiation between nectar honey and honeydew honey. **Food Chemistry**, v. 91, p. 313-317, 2005.
- SILICI, S.; KARAMAN, K. Chemometric approaches for the characterization of Turkish rhododendron and honeydew honeys depending on amino acid composition. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 37, p. 864-877, 2014.
- SIMOVA, S. et al. A rapid differentiation between oak honeydew honey and nectar and other honeydew honeys by NMR spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 134, p. 1706-1710, 2012.
- VALENTIM-NETO et al. Leaf proteome comparison of two GM common bean varieties and their non-GM counterparts by principal component analysis. **Journal of the Science of Food and Agricultural**, v. 96, n. 3, p. 927-932, 2016.
- VON DER OHE, W. et al. Harmonized methods of melissopalynology. **Apidologie**, v. 35, p. S18-S25, 2004.
- WANG, J. et al. Rapid determination of the geographical origin of honey based on protein fingerprinting and barcoding using MALDI TOF MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 10081-10088, 2009.
- WON, S. et al. Honey major protein characterization and its application to adulteration detection. **Food Research International**, v. 41, p. 952-956, 2008.

YADZIR, Z. H. M. et al. **Identification of major allergens of wildflower honey**. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, v. 42, ed. 2, p. 370-375, 2011.



**CAPÍTULO 4: COMPOSTOS FENÓLICOS, ATIVIDADE  
ANTIOXIDANTE E MINERAIS EM MEL DE MELATO DE  
BRACATINGA (*Mimosa scabrella* Bentham) DO PLANALTO  
SERRANO DE SC: CARACTERÍSTICAS POTENCIAIS DE  
ALIMENTO FUNCIONAL**



**COMPOSTOS FENÓLICOS, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E MINERAIS EM MEL DE MELATO DE BRACATINGA (*Mimosa scabrella* Bentham) DO PLANALTO SERRANO DE SC: CARACTERÍSTICAS POTENCIAIS DE ALIMENTO FUNCIONAL**

**RESUMO**

A busca por uma alimentação saudável e as diversas ações funcionais já evidenciadas cientificamente, favoreceram nos últimos anos, a valorização e o consumo de mel. Este apresenta em sua composição, além de altos teores de frutose e glicose, menores concentrações de compostos de especial interesse com funções biológicas e propriedades antioxidantes, que podem conferir características benéficas potenciais de propriedades funcionais. Em especial, méis de melato têm apresentado crescente valorização por suas propriedades sensoriais, físico-químicas e maiores capacidades antioxidantes *in vitro* quando comparado aos méis florais, apresentando relevância econômica e produtiva no mercado internacional dos méis da região do sul do Brasil, especialmente do estado de Santa Catarina. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar parâmetros que possam evidenciar características potenciais de alimento funcional do mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) (MMB) relacionadas às propriedades antioxidantes a partir da determinação da capacidade antioxidante *in vitro* pelos mecanismos de captura de radical livre (DPPH) e redução férrica (FRAP), compostos fenólicos e minerais. Os resultados obtidos foram de 16,5 a 43,4 mg EAA 100 g<sup>-1</sup> para DPPH, de 523 a 1004 µmol FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 100 g<sup>-1</sup> para FRAP e de 84,4 a 197 mg EAG 100 g<sup>-1</sup> para compostos fenólicos totais. Quando comparado à outros méis de melato, o MMB apresentou concordância com resultados obtidos por outros autores para as determinações de capacidade antioxidante DPPH e FRAP, e maiores resultados com relação aos compostos fenólicos totais, sugerindo a contribuição de agentes não fenólicos envolvidos no processo de ação antioxidante. Ademais, apresentou maior número e diversidade de compostos fenólicos, com maiores concentrações de quercetina e ácidos benzoico, cafeico, clorogênico, ferúlico, cumárico e siríngico, compostos majoritários diferenciados (com valores em µg 100g<sup>-1</sup> de 46,7 a 1520 para ácido benzoico, de 96,7 a 228 para ácido 3,4-dihidroxibenzoico e de 75,7 a 830 para ácido salicílico) e compostos ainda não reportados em méis de melato (com valores em µg 100g<sup>-1</sup> de < LD a 13,9 para coniferaldeído, de 1,91 a 91,2 para hesperidina, de

4,16 a 15,9 para isoramnetina, e de < LQ a 19,5 para pinobanksina). Os macroelementos majoritários observados em MMB foram  $K^+$  (de 2323 a 6332  $mg\ kg^{-1}$ ),  $Ca^{2+}$  (de 4,80 a 140  $mg\ kg^{-1}$ ) e  $Mg^{2+}$  (de 40,4 a 80,7  $mg\ kg^{-1}$ ), com maiores concentrações destes e menores concentrações de  $Na^+$  (de 2,42 a 13,3  $mg\ kg^{-1}$ ) quando comparado a outros méis de melato. Por meio da análise de matriz de correlação de Pearson entre as determinações realizadas (TPC, DPPH, FRAP, compostos fenólicos e minerais), foi possível observar potencial influência sinérgica dos macroelementos na ação antioxidante através dos mecanismos analisados. Devido às ações funcionais já evidenciadas do mel relacionadas às classes de compostos antioxidantes e potencial sinergismo constituintes da menor fração da composição melífera, o MMB demonstrou características benéficas potenciais de propriedades funcionais, podendo-se inferir acerca do uso deste produto com alegação de propriedade funcional para indivíduos sem restrições com relação à ingestão de carboidratos.

Palavras-chave: Mel de melato de bracinga. *Mimosa scabrella* Bentham. Capacidade antioxidante. Fenólicos. Minerais. Alimento funcional.

## 1 INTRODUÇÃO

O conceito de alimentos funcionais foi introduzido no Japão em meados de 1980 com o objetivo de redução de gastos com saúde pública, tornando-se o País pioneiro no desenvolvimento de processos de regulamentação específica para estes alimentos, os quais acompanham um selo de aprovação do Ministério da Saúde e Bem-estar japonês, sendo este princípio adotado mundialmente, porém, com denominações e critérios de aprovação variando conforme o país (STRINGHETA et al., 2007). A comissão europeia tem sua regulamentação conduzida pela Agência Europeia de Segurança Alimentar (EFSA, do inglês *European Food Safety Authority*) por meio da Regulamentação de Nutrição e Declarações de Saúde (NHCR, do inglês *Nutrition and Health Claims Regulation*) e a agência regulamentadora de alimentos e medicamentos, FDA (do inglês *Food and Drug Administration*) tem sua regulamentação baseada na Lei Federal de Alimentos, Medicamentos e Cosméticos dos Estados Unidos (FD&C Act, do inglês *Federal Food, Drug, and Cosmetic Act*), o qual, até o momento não apresenta definição legal para o termo "alimentos funcionais" ou "nutracêuticos" (WONG; LAI; CHAN, 2015).

De modo geral, conceitua-se alimento funcional como aquele que, em virtude dos componentes fisiologicamente ativos, fornecem benefícios à saúde, além de nutrição básica, consumidos em dietas convencionais, demonstrando capacidade de regular funções corporais de forma a auxiliar na proteção contra doenças crônicas, evidenciado através de comprovação científica (BRASIL, 1999; EUROPEAN COMMISSION, 2006; WILDMAN, 2007; WONG; LAI; CHAN, 2015). Na ausência de uma definição legal, os produtos alimentares com benefícios para a saúde podem ser regulamentados como alimentos convencionais, suplementos alimentares, alimento para uso dietético especial, alimento-medicamento ou droga e baseado no uso a que se pretende dar ao produto e na descrição de rótulos ou ingredientes deste (NOONAN; NOONAN, 2004; WONG; LAI; CHAN, 2015).

A Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) não define o termo "alimento funcional", mas em termos de "alegação de propriedade funcional", relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano, e "alegação de propriedade de saúde", que afirma, sugere ou implica a existência de relação entre o alimento ou ingrediente com doença ou condição relacionada à saúde. A regulamentação é realizada por meio da

Resolução nº 18 de 30 de abril de 1999, que apresenta as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos para sua utilização, bem como por meio da Resolução nº 19 de 30 de abril de 1999, que apresenta os procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem.

De acordo com Anvisa (BRASIL, 1999a), as diretrizes para a utilização da alegação de propriedades funcionais ou de saúde dos alimentos ou ingredientes são:

i) poder, além de funções nutricionais básicas, quando se tratar de nutriente, produzir efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica; ii) são permitidas alegações de função e/ou conteúdo para nutrientes e não nutrientes, podendo ser aceitas aquelas que descrevem o papel fisiológico do nutriente ou não nutriente no crescimento, desenvolvimento e funções normais do organismo, mediante demonstração de eficácia e, para nutrientes com funções plenamente reconhecidas pela comunidade científica, não será necessária a demonstração da eficácia ou análise da mesma para alegação funcional na rotulagem; iii) no caso de uma nova propriedade funcional, há a necessidade de comprovação científica da alegação de propriedades funcionais e/ou de saúde e da segurança de uso, segundo as Diretrizes Básicas para Avaliação de Risco e Segurança dos Alimentos; iv) as alegações podem fazer referências à manutenção geral da saúde, ao papel fisiológico dos nutrientes e não nutrientes e à redução de risco de doenças, mas não são permitidas alegações de saúde que façam referência à cura ou prevenção de doenças.

A comprovação de alegação de propriedades funcionais e/ou de saúde de alimentos e/ou de ingredientes, deve ser conduzida com base em: "i) consumo previsto ou recomendado pelo fabricante; ii) finalidade, condições de uso e valor nutricional, quando for o caso; iii) evidências científicas" (BRASIL, 1999b). E as evidências científicas aplicáveis à

comprovação de alegação de propriedade funcional e/ou de saúde, conforme o caso, deve contemplar:

i) ensaios bioquímicos; ii) ensaios nutricionais e/ou fisiológicos e/ou toxicológicos em animais de experimentação; iii) estudos epidemiológicos; iv) ensaios clínicos; v) evidências abrangentes da literatura científica, organismos internacionais de saúde e legislação internacionalmente reconhecida sobre as propriedades e características do produto; vi) comprovação de uso tradicional, observado na população, sem associação de danos à saúde (BRASIL, 1999b).

O mel tem sido utilizado, desde a antiguidade, como alimento e adoçante tradicional (ESCUREDO et al., 2013) e em aplicações medicinais, mas somente nos últimos anos, devido à busca por alimentos benéficos à saúde, houve um aumento do consumo de mel, intensificando pesquisas com relação às suas propriedades funcionais (IURLINA et al., 2009; ORYAN; ALEMZADEH; MOSHIRI, 2016) e medicinais, apresentando-se como uma opção para tratamento de doenças na medicina alternativa denominada Apiterapia (BOGDANOV et al., 2008). Importantes ações do mel têm sido evidenciadas, tais como agente antimicrobiano de acordo com testes *in vitro* e *in vivo* para distúrbios de pele (MAJTAN et al., 2013; McLOONE; WARNOCK; FYFE 2016); agente antioxidante (LACHMAN et al., 2010) e antimicrobiano em bactérias gram-positivas (BUENO-COSTA et al., 2016) e bactérias gram-negativas (LIU et al., 2013), agente antioxidante na inibição de dano oxidativo em eritrócitos (BLASA ET AL., 2007) agente antitumoral (NOOR et al., 2014), anti-inflamatório em células de carcinoma de cólon humano (LIU et al., 2013) e agente antiviral para vírus Influenza (WATANABE et al., 2014) conforme testes *in vitro*; adequações em perfis glicêmicos e lipídicos séricos em modelo experimental de diabetes (ARABMOAZZEN et al., 2015), indução à espermatogênese (37% de aumento), mel de melato apresentou atividade antiúlcera (MAYER et al., 2014) e mel monofloral da espécie *Mimosa scabrella* apresentou atividade anti-inflamatória de pele (BORSATO et al., 2014), com resultados evidenciados em testes *in vivo*.

Al-Waili (2003) avaliou o consumo de mel por 2 semanas (dieta regular complementada com 1,2 g de mel por kg de peso corporal) entre homens e mulheres de 20 a 45 anos e foi evidenciado em exame sanguíneo o aumento na concentração de agentes oxidantes (ácido

ascórbico: 47%;  $\beta$ -caroteno: 3%; ácido úrico: 12% e glutathion redutase: 7%), ferro sérico (20%), monócitos (50%), cobre sérico (33%), redução de açúcar (5%) com discretas elevações em linfócitos, eosinófilos, zinco, magnésio, hemoglobina e hematócrito.

O estudo de revisão de Erejuwa, Sulaiman e Wahab (2012) cita o mel como "novo antioxidante" para tratamento de doenças crônicas comumente associadas ao estresse oxidativo ou associado às terapias convencionais, detalhando estudos *in vivo* envolvendo trato gastrointestinal, fígado, pâncreas, rim, órgãos reprodutivos e plasma ou soro, destacando o sinergismo entre o mel e medicamentos utilizados para tratamento em ratos diabéticos.

A composição nutricional de méis florais e de melato compreende, em média, de 80% de carboidratos, 17% de água, 0,2 a 0,9% de minerais, 0,3 a 0,6% de aminoácidos e proteínas e de 0,5 a 1,1% de ácidos orgânicos com valores de pH entre 3,9 e 5,2 (AJIBOLA; CHAMUNORWA; ERLWANGER, 2012). A importância nutricional do mel não está relacionada diretamente com os níveis de ingestão diária recomendada (IDR), mas sim aos efeitos fisiológicos múltiplos de sua composição (BOGDANOV et al., 2008).

Além de uma solução supersaturada de carboidratos (Al et al., 2009), o qual representa uma fonte de energia para o corpo humano, o monossacarídeo de maior concentração em méis de melato é a frutose, que têm apresentado correlação significativa negativa com índice glicêmico (IG), ou seja, quanto maior a concentração de frutose menor será o IG (BOGDANOV et al. 2008). O mel é constituído também de classes de compostos em menores concentrações de especial interesse com propriedades antioxidantes como compostos fenólicos (ISLA et al., 2011; SERAGLIO et al., 2016), enzimas (MEDA et al., 2005), carotenoides (Al et al., 2009), produtos da reação de Maillard (TURKMEN et al., 2006); aminoácidos e proteínas (GOMEZ-CARAVACA et al., 2006). Estudos têm avaliado acerca da variabilidade e diversidade de compostos antioxidantes em méis e da possível combinação ou contribuição sinérgica destes na capacidade antioxidante total (BLASA et al., 2007; ESCUREDO et al., 2013) e, além das classes de compostos citadas anteriormente, há diferentes concentrações e tipos de minerais, com importantes funções biológicas (ESCUREDO et al., 2013), podendo também exercer influência neste parâmetro (GHELDOLF; WANG; ENGESETH, 2002). Bogdanov et al. (2008) e Ajibola, Chamunorwa e Erlwanger (2012) citam diversos efeitos nutricionais e benefícios à saúde relacionados à ingestão de mel nas áreas de saúde bucal, gastroenterologia, cardiovascular,

oftalmologia, nutrição infantil e de atletas, se consumido em doses elevadas (50 a 80 g) por indivíduos normais. O alto perfil nutricional de mel originário da diversidade de nutrientes (mesmo que em pequenas quantidades) incentiva seu uso como alimento a ser inserido em dietas convencionais (AJIBOLA; CHAMUNORWA; ERLWANGER, 2012).

O mel apresenta antioxidantes naturais enzimáticos e não enzimáticos, e sua habilidade de captura de radical (relacionada ao teor de fenólicos totais, especialmente flavonoides, transferidos da planta no momento da colheita), demonstra forte correlação com capacidade antioxidante. Os compostos já citados na literatura responsáveis pelo efeito antioxidante em diferentes tipos de méis são flavonoides, ácidos fenólicos, ácido ascórbico, proteínas, aminoácidos carotenoides, ácidos orgânicos e produtos da reação de Maillard (ESCRICHE et al., 2014; ESCUREDO, et al., 2013; GASIC et al., 2014; HABIB et al., 2014; JERKOVIC et al., 2009; LACHMAN et al., 2010; TURKMEN et al., 2006), demonstrando efetividade na redução de riscos de doenças cardíacas e autoimunes, câncer e processos anti-inflamatórios (HABIB et al., 2014), prevenindo reações de oxidação deteriorativa em alimentos, tais como escurecimento enzimático em frutas e vegetais e oxidação lipídica em carnes (LACHMAN et al., 2010).

Em algumas regiões, especialmente na Europa central e oriental, o mel de melato é popularmente mais valorizado em função de sua maior atividade antioxidante e bactericida quando comparado ao mel floral (ESCRICHE, et al.; 2014; SIMOVA et al., 2012). Em especial, a capacidade antioxidante *in vitro* de méis de melato comumente tem apresentado maiores resultados com relação aos méis florais, além de correlações significativas com determinações de fenólicos e flavonoides totais, prolina e minerais (AL et al., 2016; CHIS et al., 2016; ESCUREDO et al., 2013; ESCRICHE et al., 2014).

Seraglio et al. (2016) aplicaram um método desenvolvido e validado para determinação de compostos fenólicos em MMB e revelaram uma grande diversidade de compostos fenólicos, sendo detectados e quantificados até 20 compostos em *pools* de amostras do Planalto Serrano de Santa Catarina e, ácidos benzoico, 3,4-dihidroxibenzoico e salicílico foram os compostos com maior concentração. Compostos fenólicos também têm sido investigados em méis de melato de diversas origens de acordo com o Quadro 2.

Quadro 2: Compostos fenólicos encontrados em méis de melato.

<b>Autores</b>	<b>Origem</b>	<b>Compostos</b>	<b>Compostos predominantes</b>
Can et al. (2015).	Turquia	Ácidos gálico, protocateuico, <i>p</i> -hidroxibenzoico, cafeico, siríngico, <i>p</i> -cumárico e ferúlico, epicatequina, rutina e apigenina.	Ácido 3,4-dihidroxibenzoico ( $74460 \pm 10540 \mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ) e rutina ( $53862 \pm 12420 \mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ).
Daher e Gulaçar (2008).	França e Itália	Galangina, crisina 2-metoxicrisina, pinocembrina, ácido ferúlico, ácido salicílico e trimetilfenol.	Pinocembrina ( $675 \text{ a } 685 \mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ), crisina ( $199 \text{ a } 471 \mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ) e ácido salicílico ( $203 \text{ a } 349 \mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ).
Escriche et al. (2014).	Espanha	Ácidos cafeico e <i>p</i> -cumárico, naringenina, pinocembrina, crisina, galangina, quercetina, canferol e miricetina.	Ácido <i>p</i> -cumárico ( $31400 \mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ).
Haroun et al. (2012).	Turquia	Ácidos protocateuico, cafeico, siríngico, <i>p</i> -cumárico e ferúlico, quercetina, luteolina, apigenina, pinocembrina, crisina e acetina.	Ácido 3,4-dihidroxibenzoico ( $164 \text{ a } 599 \mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ) e ácido cafeico ( $256 \mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ).
Silici, Sarioğlu e Karaman (2013).	Turquia	Ácidos gálico, clorogênico, cumárico, ferúlico e cafeico, catequina e epicatequina.	Catequina ( $119 \mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ).
Socha et al. (2011).	Polônia	Ácidos gálico, <i>p</i> -cumárico, ferúlico, cafeico, sinápico e clorogênico.	Ácidos <i>p</i> -cumárico ( $534 \pm 30,8 \mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ) e gálico ( $136 \pm 4,30 \mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ).
Tuberoso et al. (2011).	Croácia	-	Ácido salicílico ( $1380 \mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ).

A cromatografia a líquido (LC, do inglês *liquid chromatography*) é considerada a técnica de separação ideal para a determinação de compostos fenólicos em diferentes amostras e, acoplada a detectores como arranjo de diodos (DAD, do inglês *diode array detector*) e/ou espectrometria de massas (MS, do inglês *mass spectrometer*) possibilita a identificação e quantificação de diversos compostos em diferentes concentrações (KECKES et al., 2013). A caracterização de compostos fenólicos em diferentes tipos e origens de mel pode ser realizada pela técnica de LC-DAD (KUS et al., 2014; RODIL et al., 2010), porém, devido à complexidade da matriz, interferentes podem afetar a sensibilidade e seletividade do método (RODIL et al., 2010; SERGIEL; POHL; BIESAGA, 2014), então LC-MS (GASIC et al., 2014; KECKES et al., 2013; PASINI et al., 2013) e LC-MS/MS (BIESAGA; PYRZYNSKA, 2013; SERGIEL; POHL; BIESAGA, 2014) estão sendo frequentemente utilizadas para a detecção de compostos fenólicos, baseadas em massas molares exatas e fragmentação padrão, fornecendo alta seletividade e sensibilidade.

A atividade antioxidante *in vitro* de méis têm sido avaliada principalmente utilizando as determinações de DPPH (captura de radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazil, do inglês *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*), FRAP (capacidade antioxidante/redutora férrica, do inglês *ferric reducing/antioxidant power*), ABTS (captura do radical 2,2-Azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico), do inglês *2,2-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)*), CUPRAC (capacidade antioxidante/redutora de  $\text{Cu}^{2+}$ , do inglês *cupric reducing/antioxidant capacity*) e TPC (compostos fenólicos totais, do inglês *total phenolic compounds*), sendo TPC, DPPH e FRAP as determinações mais comumente utilizadas (AL et al., 2009; CAN et al., 2015; CHIS et al., 2016; ESCUREDO et al., 2013; KUÇUC et al., 2007; LACHMAN et al., 2010; TUBEROSO et al., 2011; WILCZYNSKA, 2010). Em função da possível superestimação da concentração de TPC devido à contribuição de agentes não fenólicos presentes no sistema redutor do reagente Folin-Ciocalteu (tais como açúcares e aminoácidos) (SHAHIDI; ZHONG, 2015), esta determinação é considerada como um marcador de avaliação de capacidade antioxidante total (CAN et al., 2015; EVERETTE et al., 2010).

Assim como os compostos fenólicos, os minerais (macro e microelementos) também apresentam influência na manutenção do balanço oxidativo intracelular (ESCUREDO et al., 2013), sendo também essenciais em diversas funções biológicas como manter reações fisiológicas normais, indução do metabolismo energético e de diversas enzimas, auxiliando em sistemas circulatórios e como catalisadores de diversas reações bioquímicas (ALQARNI et al., 2014; CHUDZINSKA; BARALKIEWICZ, 2011; DOLINSKY, 2009; SILVA et al., 2016). As propriedades nutricionais e medicinais dos méis também estão, dentre outras, vinculadas aos minerais presentes, podendo variar de acordo com o tipo e origem do mel (dependentemente da capacidade de absorção da planta) e principalmente da matéria prima utilizada (néctar ou melato) e pólen (MADEJCZYK; BARALKIEWICZ, 2008), que estão relacionados à composição de solo e condições climáticas (ESCUREDO et al., 2013; MONIRUZZAMAN et al. 2014; POHL et al, 2012; SILVA et al., 2016).

Estudos têm demonstrado que as concentrações de minerais em méis podem variar de 200 a 10.000 mg  $\text{kg}^{-1}$  e potássio tem sido o elemento de maior concentração, compreendendo cerca de um terço da concentração total de minerais (ALQARNI et al., 2014; CHUA et al., 2012; GREMBECKA; SZEFER, 2013; POHL et al., 2012). A presença de elementos essenciais como cálcio, potássio, sódio e magnésio e

outros elementos como ferro, cobre, manganês e zinco em méis pode conferir valor nutricional a este alimento, podendo ser considerado uma importante fonte complementar (POHL et al., 2012; FERMO et al., 2013) para indivíduos sem restrições com relação à ingestão de carboidratos (DUARTE, 2006).

Méis de melato normalmente apresentam maiores concentrações de minerais quando comparados aos méis florais, resultando em maior condutividade elétrica, sendo esta reportada como importante marcador para estes tipos de méis (LACHMAN et al., 2007).

Madejczyk e Baralkiewicz (2008) encontraram em méis de melato da Polônia, concentrações vinte vezes maior de potássio e três vezes maior de magnésio quando comparados à méis florais, e de um modo geral, potássio também tem apresentado maiores valores médios em méis de melato (de 148 a 3640 mg kg<sup>-1</sup>) em países como Anatólia, Polônia, Índia, Albânia, Itália, Nova Zelândia e Malásia; e apesar de certa variabilidade em alguns países (Albânia, Itália, Polônia e Nova Zelândia), também são encontrados maiores valores de cálcio (de não detectado a 123 mg kg<sup>-1</sup>), sódio (de 8,51 a 12393 mg kg<sup>-1</sup>), magnésio (de 1,48 a 89,5 mg kg<sup>-1</sup>), manganês (de 0,23 a 14,1 mg kg<sup>-1</sup>), cobre (de não detectado a 0,46 mg kg<sup>-1</sup>), zinco (de 2,35 a 18,1 mg kg<sup>-1</sup>) e alumínio (de 5,15 a 36,3 mg kg<sup>-1</sup>) (CHUA et al., 2012; CHUDZINSKA; BARALKIEWICZ, 2010; BONTEMPO et al., 2015; FERMO et al., 2013; GREMBECKA; SZEFER, 2013; KAYGUSUZ et al., 2016; MADEJCZYK; BARALKIEWICZ, 2008; NAYIK et al., 2016; SERGIEL; POHL, 2010; VANHANEN, EMMERTZ; SAVAGE, 2011); evidenciando assim, a maior concentração de minerais em méis de melato quando comparados à méis florais de diversas origens.

Para a determinação de minerais em mel, as espectrometrias de massas e atômica (ICP-MS, do inglês *inductively coupled plasma - mass spectrometer* e ICP-OES do inglês *inductively coupled plasma - optical emission spectrometry*) são normalmente escolhidas pela maior sensibilidade e exatidão (BETTAR et al., 2015; BONTEMPO et al.; 2015; CHUDZINSKA; BARALKIEWICZ, 2010; 2011; GASIC et al., 2015; KAYGUSUZ et al., 2016), no entanto, quando aplicadas em análises de rotina podem se tornar de alto custo operacional. Assim, para a determinação de minerais majoritários presentes no mel pode se fazer uso de técnicas como espectrometria de absorção e emissão atômica (FAAS, do inglês *flame atomic absorption spectrometry*; FAES, do inglês *flame atomic emission spectrometry*; GFAAS, do inglês *graphite furnace atomic absorption spectroscopy*) (ALQARNI et al., 2012; BARONI et al., 2009; GREMBEKA; SZEFER, 2013;

MONIRUZZAMAN et al., 2014; NAYIK et al., 2016; POHL et al., 2009) que especificamente, em matrizes complexas como mel (em função de sua alta concentração de carboidratos), requerem decomposição orgânica com ácidos purificados e aquecimento em frascos abertos ou fechados, dependentemente do elemento a ser analisado (POHL et al., 2012) uma vez que estes podem estar complexados com diferentes classes de compostos (SERGIEL; POHL, 2010); também podem ser utilizadas as técnicas de cromatografia iônica (FERMO et al., 2013; PASQUINI et al., 2014). ou eletroforese capilar de zona (CZE, do inglês *capillary zone electrophoresis*) (FRANCHINI et al. 2007; RIZELIO et al., 2012; SUAREZ-LUQUE et al., 2005), o qual o preparo de amostra pode ser realizado através de simples diluição. Rizelio et al (2012) demonstraram não haver diferenças significativas entre os resultados obtidos por CZE utilizando simples diluição no preparo de amostra quando comparado com os resultados obtidos por ICP-MS, para as mesmas amostras, utilizando digestão ácida, evidenciando que os macroelementos analisados encontravam-se livres na amostra.

Publicações sobre as propriedades de méis brasileiros são limitadas, especialmente acerca dos princípios ativos que corroboram para efeitos benéficos à saúde e prevenção de doenças como as classes de compostos antioxidantes, que remetem à aplicação do mel como alimento funcional (DUARTE, 2006) mediante às diversas atividades biológicas já citadas anteriormente. Neste contexto, além da relevância econômica e produtiva no mercado internacional dos méis da região do Sul do Brasil, especialmente, do estado de Santa Catarina e o mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) (MMB), o objetivo deste estudo foi determinar compostos fenólicos por LC-ESI-MS/MS, minerais por CE-DAD, capacidade antioxidante *in vitro* através dos mecanismos de captura de radical livre (DPPH) e redução férrica (FRAP) e compostos fenólicos totais em MMB, a fim de evidenciar características benéficas potenciais de propriedades funcionais deste produto.



## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 AMOSTRAGEM

As amostras de MMB utilizadas neste trabalho corresponderam a cinco municípios do Planalto Serrano do estado de Santa Catarina, identificadas utilizando os acrônimos apresentados no Quadro 3. Os locais de coleta podem ser observados na Figura 8 do capítulo 2 deste trabalho. No período de fevereiro a junho de 2014, 21 amostras de favos de MMB foram coletados de três colmeias selecionadas aleatoriamente de cada apiário. As amostras foram transportadas sob refrigeração ( $5 \pm 2$  °C), drenadas em funil de vidro, homogeneizadas com bastão de vidro, centrifugadas a 2000 rpm por 10 min (Fanem, 280R, São Paulo, Brasil) em laboratório então armazenadas sob congelamento ( $-18 \pm 2$  °C) até o momento das análises.

Quadro 3: Informações relacionadas à amostragem de mel de melato de bracinga

<b>Amostragem de mel de melato de bracinga</b>			
<b>Município</b>	<b>Coordenadas Geográficas</b>	<b>Número de amostras</b>	<b>Identificação do apiário</b>
Bocaina do Sul (BS)	Altitude: 858 m Latitude: 27° 44' 32" Longitude: 49° 56' 25"	5	BS1; BS2; BS3; BS4; BS5.
Bom Retiro (BR)	Altitude: 870 m Latitude: 27° 48' 29" Longitude: 49° 32' 1"	3	BR1; BR2; BR3.
Lages (LG)	Altitude: 930 m Latitude: 27° 49' 0" Longitude: 50° 19' 35"	4	LG1; LG2; LG3; LG4.
Urubici (UB)	Altitude: 1087 m Latitude: 28° 1' 39" Longitude: 49° 36' 45"	3	UB1; UB2; UB3.
Urupema (UP)	Altitude: 1342 m Latitude: 28° 17' 38" Longitude: 49° 55' 54"	6	UP1; UP2; UP3; UP4; UP5; UP6.

## 2.2 MÉTODOS

### 2.2.1 Instrumentação e parâmetros analíticos

#### 2.2.1.1 Capacidade antioxidante *in vitro* pelo método DPPH e FRAP

A determinação da atividade antioxidante *in vitro* pelo método de DPPH foi realizada de acordo com Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) com adaptações de Kim et al. (2002), o qual o volume de 2,9 mL de DPPH 0,1 mmol L<sup>-1</sup> em metanol 80% (v/v) foi adicionado a 100 µL de amostra diluída adequadamente, permanecendo em repouso e em ausência de luz por 30 min, para posterior leitura da absorbância antes da adição das amostras e após 30 min a 515 nm, utilizando um espectrofotômetro UV-Vis (Spectro Vision SB 1810-60 S, Beijing, China). A capacidade das amostras em capturar os radicais DPPH foi descrita em percentual de captura de radicais (% RSA, do inglês *radical scavenging activity*), de acordo com a Equação 2, e os resultados expressos em mg EAA 100 g<sup>-1</sup> de amostra de mel através de interpolação com curva analítica de ácido ascórbico constituída de seis níveis de concentrações equidistantes de 20 a 120 mg L<sup>-1</sup>.

$$\% \text{ RSA} = [1 - (\text{absorbância da amostra}_{t=30 \text{ min}} / \text{absorbância DPPH}_{t=0 \text{ min}}) \times 100] \quad (2)$$

#### 2.2.1.2 Capacidade antioxidante *in vitro* pelo método FRAP

A determinação da capacidade antioxidante *in vitro* pelo método de FRAP foi realizada de acordo com Benzie e Strain (1996), com adaptações de Bertoneclj et al. (2007), o qual 400 µL de cada amostra diluída adequadamente foi transferida para tubos de polipropileno e adicionado 3,6 mL do reagente FRAP (tampão acetato 0,3 mol L<sup>-1</sup>, pH 3,6 ajustado com HCl, TPTZ 0,01 mol L<sup>-1</sup> em HCl 0,04 mol L<sup>-1</sup> e cloreto férrico 0,02 mol L<sup>-1</sup>, na proporção 10:1:1 (v/v/v)), mantido em banho de aquecimento (Fisaton, São Paulo, Brasil) a 37 ± 2 °C por 10 min para posterior leitura da absorbância a 595 nm, utilizando um espectrofotômetro UV-Vis (Spectro Vision SB 1810-60 S, Beijing, China). A capacidade antioxidante foi expressa em µmol de Fe<sup>2+</sup> 100 g<sup>-1</sup> de amostra de mel através da interpolação com curva analítica de sulfato ferroso heptahidratado constituída de sete níveis de concentrações equidistantes de 20 a 300 µmol L<sup>-1</sup>.

#### 2.2.1.3 TPC pelo método de Folin-Ciocalteu

A determinação de TPC pelo método de Folin-Ciocalteu foi realizado de acordo com Singleton e Rossi (1965), o qual 100 µL de

cada amostra diluída adequadamente foi adicionado à mistura de reagente de Folin-Ciocalteu (0,5 mL) e água ultrapurificada (4 mL) em balão volumétrico de 10 mL, permanecendo em repouso por 2 minutos e adicionados 1,5 mL de carbonato de sódio 20% (m/v) e o volume final aferido com água ultrapurificada para posteriormente permanecer em repouso por 2 h em ausência de luz e realização da leitura da absorbância a 765 nm, utilizando um espectrofotômetro UV-Vis (Spectro Vision SB 1810-60 S, Beijing, China). Os resultados foram expressos em mg EAG 100g<sup>-1</sup> de amostra de mel através da interpolação com curva analítica de ácido gálico constituída de sete níveis de concentrações equidistantes de 20 a 300 mg L<sup>-1</sup>.

#### 2.2.1.4 Compostos fenólicos por LC-ESI-MS/MS

A identificação e quantificação de compostos fenólicos foi realizada de acordo com método validado por Seraglio et al. (2016), o qual 100 µL de amostra foi diluída em 900 µL de fase móvel constituída de 98% de água ultrapurificada e 2% de acetonitrila adicionado de ácido fórmico 0,1%, para posterior injeção em LC-ESI-MS/MS. Diluições posteriores foram realizadas quando necessário.

O sistema de LC-ESI-MS/MS consistiu de um espectrômetro de massas do tipo triploquadropolar AB SCIEX QTRAP<sup>®</sup> 5500 (Applied Biosystems, Concord, Califórnia, E.U.A.) equipado com célula de colisão Quved LINAC<sup>®</sup>, guia de íons Qjet<sup>®</sup>, fonte de ionização (tipo ESI) Turbo V<sup>TM</sup>, detector AcQuRate<sup>TM</sup> e eletrônica Fast eQTM, gerador de gases PEAK Generator (PEAK Scientific Instruments, Escócia) e bomba de infusão Harvard Apparatus (Holliston, Massachusetts, E.U.A.) acoplado a um cromatógrafo líquido de alta eficiência modelo 1290 Agilent (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha) equipado com bomba binária, sistema desgaseificador, autoamostrador com controle de temperatura e capacidade para 108 posições para recipientes de 2,0 mL e forno para seis colunas analíticas. A separação foi realizada em coluna de fase reversa C18 (L) Venusil XBP (Bonna-Agela Technologies, Wilmington, Delaware, E.U.A.) com 100 mm de comprimento, 2,1 mm de diâmetro interno, 3 µm de tamanho de partícula e 150 Å de tamanho de poro. Para a separação cromatográfica foram utilizadas as condições de gradiente de fase móvel constituído de água ultrapura acidificada com ácido fórmico 0,1% (A) e acetonitrila contendo ácido fórmico 0,1% (B), conforme Quadro 4, temperatura de 30 °C para coluna cromatográfica, volume de injeção de amostra de 5 µL, abertura de válvula de descarte de 1,9 min de corrida e

parâmetros operacionais otimizados em modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM), positivo ou negativo.

Quadro 4: Gradiente de fase móvel para separação cromatográfica de compostos fenólicos.

Tempo (min)	Vazão ( $\mu\text{L min}^{-1}$ )	FM A (%)	FM B (%)
0	300	98	2
4	300	98	2
7	300	80	90
14	300	10	90
15	300	10	90
17	300	98	2

A identificação dos compostos foi realizada de acordo com o tempo de retenção, íon precursor, fragmento principal (íon de quantificação) e fragmento secundário (íon de confirmação) por comparação com padrões comerciais. A aquisição e tratamento de dados foram realizados através do *software* Analyst<sup>®</sup> versão 1.6.2 (AB SCIEX Pte. Ltd., Cingapura). As análises foram realizadas no Serviço Laboratorial Avançado de Santa Catarina (SLAV-SC) do Laboratório Nacional Agropecuário do Rio Gande do Sul (LANAGRO-RS) do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA).

#### 2.2.1.5 Minerais por CZE-DAD

A identificação e quantificação de minerais por CZE-DAD foi realizada de acordo com o método de Rizelio et al. (2012) com adaptação na extremidade de injeção, o qual os parâmetros de performance analítica conformidade do sistema (*system suitability*), linearidade, efeito de matriz, seletividade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação foram verificados (EURACHEM, 2014); o parâmetro *system suitability* foi avaliado através do desvio padrão relativo (DPR) de dez injeções consecutivas da mistura de padrões analíticos e PI e a repetibilidade foi avaliada pela área de pico corrigida como  $\text{área}_{\text{(analito)}}/\text{área}_{\text{(PI)}}$  e tempo de migração corrigido ( $t_{\text{m(analito)}}/t_{\text{m(PI)}}$ ). As amostras de MMB foram diluídas de 3 a 30% (m/m) em água ultrapurificada de modo que todos os cátions analisados permanecessem na faixa de trabalho da curva analítica, centrifugadas a 14000 rpm (Eppendorf, modelo 22331, Hamburgo, Alemanha) e diluídas

juntamente com PI na proporção 9:1 (v/v, amostra: solução de PI com concentração final de  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ ).

Um sistema de eletroforese capilar (CE, do inglês *capillary electrophoresis*) modelo 7100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, E.U.A.) equipado com DAD e controlador de temperatura foi utilizado para esta determinação. A aquisição e tratamento de dados foram realizados por meio do *software* HP ChemStation®. A separação foi conduzida em um capilar de sílica fundida (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, E.U.A.) com dimensões de 48,5 cm de comprimento total (40 cm de comprimento efetivo x  $75 \text{ }\mu\text{m}$  de diâmetro interno). As condições de separação utilizadas foram de acordo com o método de Rizelio et al. (2012), com eletrólito de corrida constituído de imidazol  $30 \text{ mmol L}^{-1}$ , ácido acético  $300 \text{ mmol L}^{-1}$  e ácido láctico  $140 \text{ mmol L}^{-1}$  com pH 3,0, injeção hidrodinâmica a 50 mbar durante 3 s, tensão de 15 kV com polaridade positiva e modo de detecção indireto a 215 nm.

#### 2.2.1.6 Determinação de macro e microelementos por ICP-MS

Uma determinação semiquantitativa de macro e microelementos por ICP-MS foi utilizada para confirmação dos macroelementos observados por meio da técnica de CE-DAD. As amostras de MMB foram previamente submetidas à digestão ácida assistida por micro-ondas, o qual 1 g de amostra de mel foi adicionado a frascos de teflon juntamente com 3 mL de ácido nítrico 65% (v/v) e 1 mL de peróxido de hidrogênio 30% (v/v) com programação de potência e tempo em micro-ondas de 1 min a 250 W, 1 min a 0 W, 5 min a 250 W, 5 min a 400 W e 5 min a 650 W, seguido por 5 min de ventilação, para posterior diluição com água ultrapurificada até 50 mL de volume final. Soluções branco foram preparadas e analisadas juntamente com as amostras.

Um sistema ICP-MS Perkin Elmer modelo NexION 300D (Shelton, E.U.A.) equipado com sistema pneumático foi utilizado para esta determinação. Os parâmetros instrumentais foram potência de radiofrequência de 1600 W, cones amostrador e *skimmer* de platina, modo de varredura de pico *sweeps/reading* 20, *dwell time* de 50 ms, vazão de gás principal de  $18,0 \text{ L min}^{-1}$ , gás intermediário de  $1,20 \text{ L min}^{-1}$  e nebulizador de  $1,12 \text{ L min}^{-1}$ . As amostras foram digeridas em um forno de micro-ondas Mega modelo MLS 1200 (Milestone, Sorisole, Itália). As análises foram realizadas no Laboratório de Espectrometria Atômica do Departamento de Química da UFSC.

## 2.3 MATERIAL

### 2.3.1 Reagentes e padrões

#### 2.3.1.1 Capacidade antioxidante *in vitro* pelos métodos DPPH e FRAP

Radical DPPH, 2,4,6-tris-(2-piridil)-s-triazina (TPTZ), metanol, ácido clorídrico e ácido cítrico foram utilizados de Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, E.U.A.); ácido ascórbico, cloreto férrico, acetato de sódio e sulfato ferroso heptahidratado, de pureza grau analítico, foram utilizados de Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil); e as soluções de trabalho foram preparadas no momento do uso.

#### 2.3.1.2 Método de Folin-Ciocalteu para determinação de TPC

O reagente Folin-Ciocalteu e carbonato de sódio foram utilizados de Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, E.U.A.) e ácido gálico de Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e as soluções de trabalho foram preparadas no momento do uso.

#### 2.3.1.3 Compostos fenólicos por LC-ESI-MS/MS

Os padrões apigenina, isoramnetina, pinobanksina, ácido ferúlico, ácido sinápico, ácido *p*-aminobenzoico, ácido *p*-cumárico, 4-metilumbeliferona, ácido vanílico, rutina, naringina, catequina, sinapaldeído, ácido cafeico, ácido clorogênico, coniferaldeído, siringaldeído, crisina, hesperidina, ácido siríngico, canferol, naringenina, galato de epigalocatequina, epicatequina, pinocembrina, galangina e luteolina foram utilizados de Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, E.U.A.), ácido salicílico da Nuclear (Diadema, São Paulo, Brasil), quercetina de Fluka (Saint Gallen, Suíça), ácido gálico de Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil), ácido benzoico de Riedel-de Haën (Seelze, Alemanha) e ácido 3,4-dihidroxibenzoico da Acros Organic (Geel, Bélgica). As soluções foram preparadas individualmente em concentrações de 1000 mg L<sup>-1</sup>, isoramnetina 1250 mg L<sup>-1</sup> e pinobanksina 1150 mg L<sup>-1</sup> em DMSO ou metanol e armazenadas sob congelamento a -18 ± 2 °C. As soluções de trabalho contendo a mistura destes analitos foram preparadas em metanol e mantidas a -18 ± 2 °C até o momento da análise.

#### 2.3.1.4 Minerais por CZE-DAD

Os padrões cloretos de potássio, bário (padrão interno, PI), sódio, cálcio, magnésio e de manganês, imidazol, ácidos acético e láctico e hidróxido de sódio foram adquiridos da Sigma Aldrich (Santa Ana, CA,

E.U.A.). As soluções de trabalho contendo a mistura destes analitos ( $100 \text{ mmol L}^{-1}$ ) foram preparadas diariamente em água ultrapurificada obtida de sistema Milli-Q Simplicity<sup>®</sup> UV system from Millipore Corporation (Saverne, Alsace, França) e mantidas sob refrigeração a  $5 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  até o momento da análise.

### 2.3.1.5 Determinação de macro e microelementos por ICP-MS

Solução padrão multielementar  $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ , utilizada para calibração do equipamento, foi preparada a partir de *Multi-element Calibration Standard 3* contendo prata, alumínio, arsênico, bário, berílio, bismuto, cálcio, cádmio, cobalto, cromo, célio, cobre, ferro, gálio, mercúrio, índio, potássio, lítio, magnésio, manganês, sódio, níquel, chumbo, rubídio, selênio, estrôncio, tálio, vanádio, urânio e zinco  $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  (Perkin Elmer, Inc, Shelton, Ct, E.U.A.) e diluição realizada com ácido nítrico 1% (v/v); ácido nítrico (Merck, Darmstadt, Alemanha) foi duplamente destilado para purificação em aparelho de destilação de quartzo sub-fervente (Kürner Analysentechnik, Rosenheim, Alemanha) e peróxido de hidrogênio da Merck (Suprapur<sup>®</sup>, Darmstadt, Alemanha) foram utilizados para a análise.

## 2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O pacote estatístico Statsoft Statistica<sup>®</sup> (Ultimate Academic) licenciado pela Superintendência de Governança Eletrônica e Tecnologia da Informação e Comunicação (SeTIC) - UFSC foi utilizado para as análises estatísticas e *software* Microsoft Excel<sup>®</sup> (Microsoft Office, 2007) foi utilizado para elaboração de gráficos de colunas. A análise de distribuição de normalidade dos dados obtidos foi realizada pelo teste de Shapiro-Wilk (SHAPIRO; WILK, 1965) e, nos casos de evidência de não normalidade de distribuição dos dados, o teste não paramétrico Kruskal-Wallis (BURKE, 2001), utilizado para comparação de pelo menos três grupos, foi aplicado para identificar diferenças estatisticamente significativas entre as regiões. Diferenças entre os valores médios obtidos em um intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ) foram considerados estatisticamente diferentes e os resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP) e gráficos de colunas foram utilizados para visualização destes resultados.



### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, os parâmetros de identidade e qualidade umidade, açúcares redutores, resíduo mineral fixo (RMF), condutividade elétrica, 5-hidroximetilfurfural, atividade distásica, acidez livre, pH e cor foram determinados visando avaliar a qualidade e autenticidade do MMB utilizado. Os resultados, apresentados nos Apêndices A e B deste estudo evidenciaram que o produto se encontrava de acordo com a legislação vigente para mel de melato, com exceção dos parâmetros RMF e acidez livre, que podem estar relacionados à origem botânica e geográfica deste mel.

#### 3.1 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE PELOS MÉTODOS DE DPPH E FRAP E DE TPC PELO MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEU

A capacidade antioxidante *in vitro* de MMB foi avaliada a partir dos mecanismos de captura de radicais livres e de redução férrica objetivando verificar sua correlação com compostos fenólicos e minerais presentes neste mel e investigar a influência destas classes nas potenciais características funcionais deste mel. Em função da possível superestimação dos resultados na determinação de TPC, devido à contribuição de agentes redutores não fenólicos presentes no sistema do método de Folin-Ciocalteu (SHAHIDI; ZHONG, 2015), esta determinação tem sido considerada um marcador de capacidade redutora antioxidante em méis, utilizada como complemento na avaliação da capacidade antioxidante total (CAN et al., 2015; EVERETTE et al., 2010).

Na Tabela 11 são apresentados os resultados obtidos para capacidade antioxidante pelos métodos DPPH e FRAP e determinação de TPC.

Tabela 11: Resultados obtidos para compostos fenólicos totais (TPC), capacidades antioxidantes por captura de radical (DPPH) e redução férrica (FRAP) em amostras de mel de melado de bracinga.

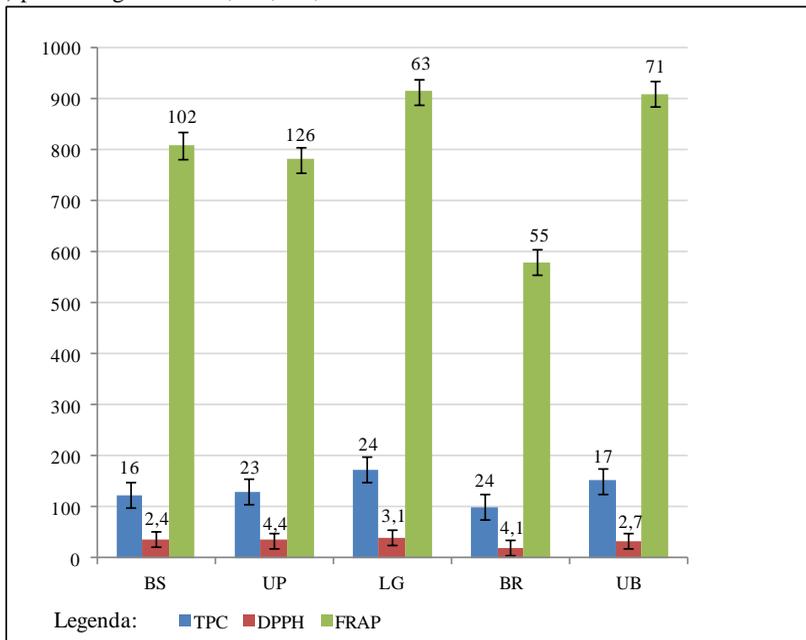
Região	TPC (mg EAG 100 g <sup>-1</sup> )	DPPH (mg EAA 100 g <sup>-1</sup> )	FRAP ( $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 100 g <sup>-1</sup> )
BS1	105 ± 4,29	36,0 ± 0,26	675 ± 9,80
BS2	108 ± 6,66	34,1 ± 1,65	732 ± 5,73
BS3	142 ± 1,97	36,8 ± 0,35	903 ± 18,8
BS4	128 ± 2,07	40,2 ± 0,87	899 ± 7,87
BS5	135 ± 7,46	34,8 ± 1,57	832 ± 7,75
Média ± DP	124 ± 16,4 <sup>a,b</sup>	36,4 ± 2,39 <sup>a,b</sup>	808 ± 102 <sup>a,b</sup>
UP1	114 ± 4,28	34,3 ± 0,62	764 ± 16,7
UP2	132 ± 5,36	28,5 ± 1,48	657 ± 14,4
UP3	107 ± 2,36	32,6 ± 0,51	669 ± 7,90
UP4	131 ± 2,11	40,5 ± 0,95	947 ± 6,31
UP5	167 ± 7,39	35,5 ± 1,54	867 ± 17,9
Média ± DP	130 ± 23,5 <sup>a,b</sup>	34,3 ± 4,36 <sup>a,b</sup>	781 ± 126 <sup>a,b</sup>
LG1	160 ± 5,18	37,4 ± 0,91	861 ± 12,8
LG2	145 ± 5,78	37,3 ± 0,17	902 ± 22,6
LG3	197 ± 3,66	43,4 ± 1,82	1005 ± 10,4
LG4	187 ± 9,46	41,9 ± 1,32	890 ± 26,6
Média ± DP	172 ± 24,0 <sup>b</sup>	40,0 ± 3,10 <sup>b</sup>	914 ± 62,6 <sup>b</sup>
BR1	126 ± 1,70	24,8 ± 0,48	635 ± 7,50
BR2	84,5 ± 1,14	16,6 ± 0,52	525 ± 11,5
BR3	86,8 ± 2,46	19,7 ± 0,57	577 ± 15,1
Média ± DP	99,2 ± 23,6 <sup>a</sup>	20,3 ± 4,13 <sup>a</sup>	579 ± 54,7 <sup>a</sup>
UB1	164 ± 2,07	35,5 ± 1,33	959 ± 19,1
UB2	140 ± 5,89	31,7 ± 1,08	858 ± 14,1
Média ± DP	152 ± 17,2 <sup>a,b</sup>	33,6 ± 2,70 <sup>a,b</sup>	909 ± 71,2 <sup>a,b</sup>
<sup>c</sup> p S-W	0,83	0,04	0,20
<sup>c</sup> p K-W	0,02	0,01	0,04

BS (Bocaina do Sul); UP (Urupema); LG (Lages); BR (Bom Retiro); UB (Urubici); 1, 2, 3, 4, e 5 (diferentes apiários); <sup>a,b</sup>resultados médios com letras diferentes em mesma coluna indicam diferença significativa entre as regiões pelo teste de Kruskal-Wallis (K-W) ( $p < 0.05$ ); <sup>c</sup>valor de  $p$  (nível de significância de 5%); S-W (teste de normalidade de Shapiro-Wilk).

De acordo com a Tabela 11 os resultados obtidos em MMB variaram de 84,4 a 197 mg EAG 100 g<sup>-1</sup> para TPC, de 16,6 a 43,4 mg EAA 100 g<sup>-1</sup> para DPPH e de 525 a 1004 μmol FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 100 g<sup>-1</sup> para FRAP. Pode-se observar ainda que os dados obtidos para a determinação de DPPH não apresentaram distribuição normal através do teste de Shapiro-Wilk ( $p < 0,05$ ), logo, o teste não paramétrico Kruskal-Wallis foi utilizado para verificação de diferenças significativas entre as regiões analisadas e pode ser verificado que, em um intervalo de confiança de 95%, somente LG e BR apresentaram diferença significativa nas determinações de TPC, DPPH e FRAP ( $p < 0,05$ ), demonstrando similaridades nas demais regiões para os resultados obtidos. De acordo com as coordenadas geográficas apresentadas no Quadro 3, a diferença significativa observada entre LG e BR para estas determinações pode ser atribuída à maior diferença de longitude (maior longitude de Lages e menor longitude de BR) dentre as regiões analisadas.

A Figura 17 representa o gráfico de colunas para os resultados obtidos (média ± DP) na Tabela 11.

Figura 17: Resultados obtidos (média  $\pm$  DP) de TPC (compostos fenólicos totais, mg EAG 100 g<sup>-1</sup>), DPPH (capacidade antioxidante por captura de radical, mg EAA 100 g<sup>-1</sup>) e FRAP (capacidade antioxidante por redução férrica,  $\mu$ mol FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 100 g<sup>-1</sup>) para as regiões de BS, UP, LG, BR e UB.



Na Figura 17 podem ser visualizadas as similaridades obtidas para faixas de resultados encontrados para as regiões de BS, UP e UB, além das diferenças obtidas para as faixas de valores observadas para as regiões de LG (mais altas) e BR (mais baixas) para estas determinações.

A Tabela 12 ilustra a comparação dos resultados obtidos neste estudo com méis de melato de outras espécies e origens. Em função da diversidade de unidades de expressão de resultados para a determinação de DPPH, os resultados obtidos neste estudo foram comparados com trabalhos que utilizaram a expressão de resultados em mg EAA 100 g<sup>-1</sup>.

Tabela 12: Capacidades antioxidantes obtidas por outros autores em méis de melato.

<b>Autores</b>	<b>Méis de melato</b>	<b>Origem</b>	<b>TPC (mg EAG 100 g<sup>-1</sup>)</b>	<b>DPPH (mg EAA 100 g<sup>-1</sup>) % de inibição</b>	<b>FRAP (<math>\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}</math> 100 g<sup>-1</sup>)</b>
Al et al. (2016)	Espécie não definida	Romênia	23,0 a 125		-
Can et al. (2015)	Espécies <i>Quercus robur</i> L. e <i>Tilia platyphyllos</i>	Turquia	61,2 a 120	SC <sub>50</sub>	1,48 a 3,07
Chis et al. (2016)	Espécie não definida	Romênia e Polónia	108 a 215	IC <sub>50</sub>	-
Escuredo et al. (2013)	Espécie não definida	Espanha	141 $\pm$ 43,1	IC <sub>50</sub>	-
Kaygusuz et al. (2016)	<i>Quercus robur</i> L. e <i>Pinus</i> L.	Turquia	58,6 a 130	-	-
Lachman et al. (2010)	Espécie não definida	República Tcheca	19,3 a 24,2	37,6 a 44,1	-
Lukasiewicz, Kowalski e Makarewica. (2015)	Espécie não definida	Polónia	53,3 $\pm$ 1,50	% de inibição	-
Meda et al. (2005)	Espécie não definida	África	113 a 115	24,8 a 32,4	-
Mellen et al. (2015)	Espécie não definida	Eslováquia	88,2 a 91,7	-	-
Socha et al. (2011)	Espécie não definida	Polónia	6,08 $\pm$ 0,14	% de inibição	-
Tuberoso et al. (2011)	<i>Salix</i> spp.	Croácia	120 $\pm$ 1,41	mmol CAET kg <sup>-1</sup>	1260 $\pm$ 120
Wilczynska. (2010)	Espécie não definida	Polónia	58,2 a 71,8	% de inibição	-
Neste estudo	<i>Mimosa scabrella</i> B.	Brazil	84,5 a 197	16,5 a 43,4	525 a 1004

SC<sub>50</sub>, IC<sub>50</sub>, % de inibição, mmol CAET (capacidade antioxidante equivalente ao trolox) kg<sup>-1</sup>; outras formas de expressão de resultados para DPPH.

De acordo com a Tabela 12, os valores obtidos neste estudo apresentaram concordância com os valores obtidos em méis de melato de outras espécies para a determinação de DPPH (LACHMAN et al., 2010) e para FRAP (TUBEROSO et al., 2011), porém apresentou maiores resultados para a determinação de TPC (Al et al., 2009; CAN et al., 2015; ESCUREDO et al., 2013; KAYGUSUZ et al., 2016; LACHMAN et al., 2010; LUKASIEWICZ; KOWALSKI; MAKAREWICA, 2015; MEDA et al., 2005; MELLEN et al., 2015; SOCHA et al., 2011; TUBEROSO et al., 2011; WILCZYNSKA, 2010). Resultados inferiores foram encontrados quando comparados aos resultados de Chis et al. (2016); bem como obteve-se maiores resultados quando comparados aos méis florais destes mesmos estudos para TPC, que pode evidenciar a contribuição de agentes não fenólicos presentes no sistema de redução do método de Folin-Ciocalteu, tais como proteínas, aminoácidos, minerais e a possível complexação destes com compostos fenólicos (EVERETTE et al., 2010). Embora carboidratos sejam citados como agentes não fenólicos que podem contribuir neste sistema de redução (SHAHIDI; ZHONG, 2015), especialmente em altas concentrações ( $100 \text{ mg mL}^{-1}$ ) e na presença de compostos fenólicos (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTOS, 1999), a diluição aplicada à amostra para análise neste estudo ( $1,4 \text{ mg mL}^{-1}$ ) reduziu potencialmente a possibilidade de contribuição de carboidratos.

### 3.2 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR LC-ESI-MS/MS

A determinação de compostos fenólicos presentes em amostras de MMB foi realizada utilizando o método desenvolvido e validado por Seraglio et al. (2016) visando elucidar a composição desta classe de compostos antioxidantes não enzimáticos naturais presentes em mel, o qual tem apresentado maior atividade antioxidante quando comparado aos méis florais (ESCRICHE et al., 2014) com forte correlação com determinações de compostos fenólicos totais (CHIS et al., 2016; ESCUREDO et al., 2013). Os resultados obtidos para esta determinação são apresentados nas Tabelas 13, 14 e 15.

Tabela 13: Concentração ( $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ) de compostos fenólicos em mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benthham) das regiões de Bocaina do Sul e Urupeema (SC).

Composto	BS1	BS2	BS3	BS4	BS5	UPI	UP2	UP3
4-Metiltumbeliferona	< LD							
Ácido 3,4-dihidroxiobenzóico	129 ± 5,04	97,0 ± 3,01	123 ± 5,81	111 ± 1,47	128 ± 8,54	133 ± 3,79	114 ± 7,21	132 ± 4,46
Ácido benzoico	46,7 ± 1,96	55,3 ± 9,87	135 ± 4,93	169 ± 26,6	176 ± 3,23	66,4 ± 1,49	140 ± 8,38	220 ± 30,3
Ácido cafeico	17,5 ± 1,53	10,6 ± 2,00	< LQ	< LQ	< LQ	25,4 ± 1,73	18,2 ± 1,00	37,0 ± 2,07
Ácido clorogênico	9,08 ± 0,07	5,21 ± 0,22	17,8 ± 0,89	6,71 ± 0,77	23,9 ± 3,08	19,2 ± 2,90	57,1 ± 5,37	33,5 ± 5,92
Ácido ferúlico	11,0 ± 1,38	13,6 ± 1,65	28,3 ± 4,59	7,64 ± 0,30	20,2 ± 3,72	56,2 ± 5,32	15,9 ± 0,75	30,1 ± 1,06
Ácido gálico	43,6 ± 0,55	43,4 ± 3,33	39,1 ± 1,68	35,8 ± 0,84	39,4 ± 1,96	29,4 ± 2,16	29,4 ± 2,78	29,1 ± 2,84
Ácido <i>p</i> -aminobenzoico	< LQ							
Ácido <i>p</i> -cumárico	29,2 ± 0,90	29,4 ± 1,01	26,4 ± 2,07	19,4 ± 0,72	28,2 ± 0,19	39,4 ± 1,01	31,5 ± 1,25	46,3 ± 0,88
Ácido salicílico	80,3 ± 4,27	98,9 ± 1,87	106 ± 5,53	92,1 ± 2,01	220 ± 7,23	109 ± 2,30	75,7 ± 2,50	89,7 ± 4,11
Ácido sinápico	< LD							
Ácido siríngico	21,9 ± 1,42	23,1 ± 6,48	23,2 ± 0,57	18,7 ± 0,05	49,2 ± 0,09	16,3 ± 0,71	14,9 ± 0,84	20,0 ± 2,65
Ácido vanílico	< LD							
Apigenina	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	2,51 ± 0,27	< LQ	< LD	< LQ
Camferol	14,3 ± 1,82	11,7 ± 0,94	15,5 ± 0,82	10,2 ± 0,29	22,1 ± 1,18	24,2 ± 1,73	13,6 ± 1,55	32,2 ± 4,32
Catequina	< LD							
Coniferaldeído	< LQ	< LQ	< LD	< LD	< LD	13,4 ± 1,16	5,98 ± 0,78	9,00 ± 1,73
Crisina	4,31 ± 0,16	3,42 ± 0,26	< LQ	< LQ	6,59 ± 0,19	< LD	< LD	< LD
Epicatequina	< LD	< LD	< LD	LD	< LD	< LD	< LD	< LD
Galangina	< LQ	< LQ	< LD	< LD	< LQ	< LD	< LD	< LD
Galato de epigalocatequina	< LD							
Hesperidina	1,91 ± 0,35	1,91 ± 0,34	6,00 ± 0,35	2,32 ± 0,13	16,3 ± 1,65	< LD	< LD	< LD
Isoramnetina	7,85 ± 0,50	9,13 ± 0,29	12,5 ± 0,22	7,22 ± 0,99	11,4 ± 0,81	11,9 ± 0,66	6,13 ± 0,52	12,9 ± 0,20
Luteolina	3,95 ± 0,44	3,32 ± 0,51	6,01 ± 0,28	3,57 ± 0,13	5,61 ± 0,78	10,0 ± 1,08	4,56 ± 0,48	14,4 ± 0,63

Tabela 13: Concentração ( $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ) de compostos fenólicos em mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) das regiões de Bocaina do Sul e Urupema (Conclusão).

Composto	BS1	BS2	BS3	BS4	BS5	UPI	UP2	UP3
Naringenina	4,78 $\pm$ 0,13	2,70 $\pm$ 0,14	4,35 $\pm$ 0,08	3,90 $\pm$ 0,12	8,39 $\pm$ 0,51	4,40 $\pm$ 0,28	3,72 $\pm$ 0,62	1,20 $\pm$ 0,19
Naringina	< LD							
Pinobanksina	6,23 $\pm$ 0,29	2,96 $\pm$ 0,07	5,09 $\pm$ 0,33	4,64 $\pm$ 0,03	9,91 $\pm$ 0,11	5,11 $\pm$ 0,28	4,40 $\pm$ 0,25	1,59 $\pm$ 0,03
Pinocembrina	4,76 $\pm$ 0,67	3,19 $\pm$ 0,19	1,28 $\pm$ 0,03	< LQ	7,40 $\pm$ 0,40	< LD	< LD	< LD
Quercetina	17,2 $\pm$ 0,50	17,2 $\pm$ 0,96	23,8 $\pm$ 1,33	17,9 $\pm$ 0,65	29,0 $\pm$ 0,98	16,4 $\pm$ 0,76	15,1 $\pm$ 2,02	16,6 $\pm$ 1,21
Sinapaldeído	< LD							
Siringaldeído	< LQ	5,04 $\pm$ 0,71	< LQ	< LQ				

Legenda: BS (Bocaina do Sul) UP (Urupema); 1, 2, 3, 4 e 5: diferentes apiários; LD: limite de detecção ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ); LQ: limite de quantificação ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ); (LD/LQ): galato de epigallocatequina (0,03/0,80); pinobanksina (0,03/0,46); naringina (0,05/0,80); quercetina (0,05/0,80); ácido clorogênico (0,10/0,40); naringenina (0,10/0,20); isoramnetina (0,13/0,50); 4-metilumbeliferona (0,20/0,80); coniferaldeído (0,20/1,60); crisina (0,20/0,80); ácido sinápico (0,20/0,80); ácido vanílico (0,20/0,40); galangina (0,20/1,60); hesperidina (0,20/0,40); sinapaldeído (0,20/0,40); ácido *p*-aminobenzoico (0,20/1,60); pinocembrina (0,20/0,40); apigenina (0,20/0,80); camferol (0,20/1,60); luteolina (0,20/0,40); ácido salicílico (0,20/3,20); ácido *p*-cumárico (0,20/0,80); catequina (0,40/1,60); epicatequina (0,40/1,60); siringaldeído (0,40/1,60); ácido 3,4-dihidroxidobenzóico (0,40/0,80); ácido sirínico (0,80/1,60); ácido gálico (0,80/1,60); ácido ferúlico (1,60/3,20); ácido cafeico (1,60/12,8); ácido benzoico (3,20/12,8).

Tabela 14: Concentração ( $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ) de compostos fenólicos em mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Benthham) das regiões de Urupema, Lages e Bom Retiro (SC).

Composto	UP4	UP5	LG1	LG2	LG3	LG4	BRI	BR2
4-metilumbeliferona	<LD							
Ácido dihidroxiobenzóico	165 ± 5,47	123 ± 5,28	210 ± 11,4	140 ± 5,38	205 ± 8,52	228 ± 22,7	135 ± 3,48	120 ± 2,14
Ácido benzoico	249 ± 9,45	123 ± 19,3	632 ± 52,4	1520 ± 36,4	1361 ± 160	679 ± 71,9	1121 ± 34,8	931 ± 50,1
Ácido cafeico	30,0 ± 3,61	<LQ	38,7 ± 1,99	31,9 ± 3,69	21,1 ± 1,84	38,7 ± 1,73	<LQ	<LQ
Ácido clorogênico	38,3 ± 0,33	14,9 ± 2,33	40,9 ± 4,05	54,3 ± 7,84	29,3 ± 1,16	23,4 ± 3,30	110 ± 7,45	92,0 ± 15,5
Ácido ferúlico	64,1 ± 8,85	15,8 ± 0,16	14,0 ± 1,67	23,5 ± 4,26	29,4 ± 1,31	33,2 ± 1,68	43,9 ± 8,14	46,5 ± 6,44
Ácido gálico	28,4 ± 2,15	27,3 ± 0,83	39,2 ± 2,46	33,4 ± 1,71	43,2 ± 2,21	41,5 ± 4,90	20,6 ± 0,61	16,0 ± 0,47
Ácido <i>p</i> -aminobenzoico	<LQ							
Ácido <i>p</i> -cumárico	48,8 ± 2,10	17,9 ± 0,47	33,4 ± 0,06	33,3 ± 3,67	41,3 ± 2,51	35,5 ± 2,36	22,0 ± 1,69	24,1 ± 0,85
Ácido salicílico	107 ± 2,60	108 ± 3,36	255 ± 8,20	232 ± 28,8	238 ± 12,0	186 ± 16,2	596 ± 2,16	830 ± 9,77
Ácido sinápico	<LD							
Ácido siríngico	18,1 ± 2,09	18,0 ± 1,96	133 ± 6,97	43,2 ± 6,14	62,0 ± 1,98	77,9 ± 7,19	30,3 ± 2,33	63,4 ± 2,05
Ácido vanílico	<LD							
Apigenina	<LQ	<LQ	<LQ	2,76 ± 0,11	<LQ	<LD	4,16 ± 0,29	6,91 ± 0,23
Camferol	10,6 ± 0,32	12,8 ± 0,94	18,1 ± 1,04	26,6 ± 2,84	25,1 ± 0,52	13,3 ± 2,36	35,8 ± 0,92	34,1 ± 2,53
Catequina	<LD							
Coniferaldeído	12,3 ± 1,55	<LQ	<LQ	<LQ	<LD	<LQ	12,8 ± 0,69	8,53 ± 0,87
Crisina	<LD	<LQ	3,94 ± 0,26	6,40 ± 0,40	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Epicatequina	<LD							
Galangina	<LD	<LD	<LQ	4,67 ± 0,68	<LD	<LD	<LQ	<LD
Galato de epigalocatequina	<LD							
Hesperidina	<LD	<LD	91,2 ± 10,5	26,4 ± 4,67	22,2 ± 2,05	15,6 ± 0,42	10,7 ± 0,72	12,6 ± 0,29
Isorametina	15,6 ± 0,46	8,64 ± 0,38	13,3 ± 1,09	8,91 ± 0,96	7,48 ± 0,20	10,9 ± 1,50	9,34 ± 0,44	9,18 ± 0,48
Luteolina	2,96 ± 0,38	6,06 ± 0,88	5,02 ± 0,10	8,33 ± 0,79	4,80 ± 0,47	3,95 ± 0,08	16,9 ± 1,16	21,4 ± 2,89

Tabela 14: Concentração ( $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ) de compostos fenólicos em mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) das regiões de Urupema, Lages e Bom Retiro (Conclusão).

Composto	UP4	UP5	LG1	LG2	LG3	LG4	BRI	BR2
Naringenina	2,65 $\pm$ 0,24	1,40 $\pm$ 0,19	0,46 $\pm$ 0,02	2,31 $\pm$ 0,43	1,65 $\pm$ 0,31	2,50 $\pm$ 0,14	10,1 $\pm$ 0,50	15,7 $\pm$ 0,71
Naringina	< LD							
Pinobanksina	3,41 $\pm$ 0,21	1,70 $\pm$ 0,02	1,92 $\pm$ 0,23	3,94 $\pm$ 0,63	1,85 $\pm$ 0,08	2,91 $\pm$ 0,04	12,3 $\pm$ 0,97	19,5 $\pm$ 1,05
Pinocembrina	< LQ	< LQ	3,51 $\pm$ 0,34	6,42 $\pm$ 0,44	1,74 $\pm$ 0,33	0,97 $\pm$ 0,12	2,31 $\pm$ 0,30	1,50 $\pm$ 0,20
Quercetina	14,0 $\pm$ 0,26	12,9 $\pm$ 1,18	35,0 $\pm$ 0,36	71,4 $\pm$ 11,0	36,8 $\pm$ 1,44	24,1 $\pm$ 0,33	45,0 $\pm$ 2,53	57,2 $\pm$ 4,98
Sinapaldeído	< LD							
Siringaldeído	5,45 $\pm$ 0,53	< LQ	3,92 $\pm$ 0,24	6,55 $\pm$ 0,44	< LQ	< LQ	4,89 $\pm$ 0,12	7,06 $\pm$ 0,20

UP (Urupema); LG (Lages); BR (Bom Retiro); 1, 2, 3, 4 e 5: diferentes apiários; LD (Limite de detecção,  $\mu\text{g } \text{L}^{-1}$ ) e LQ (Limite de quantificação,  $\mu\text{g } \text{L}^{-1}$ ) de acordo com a legenda da Tabela 13.

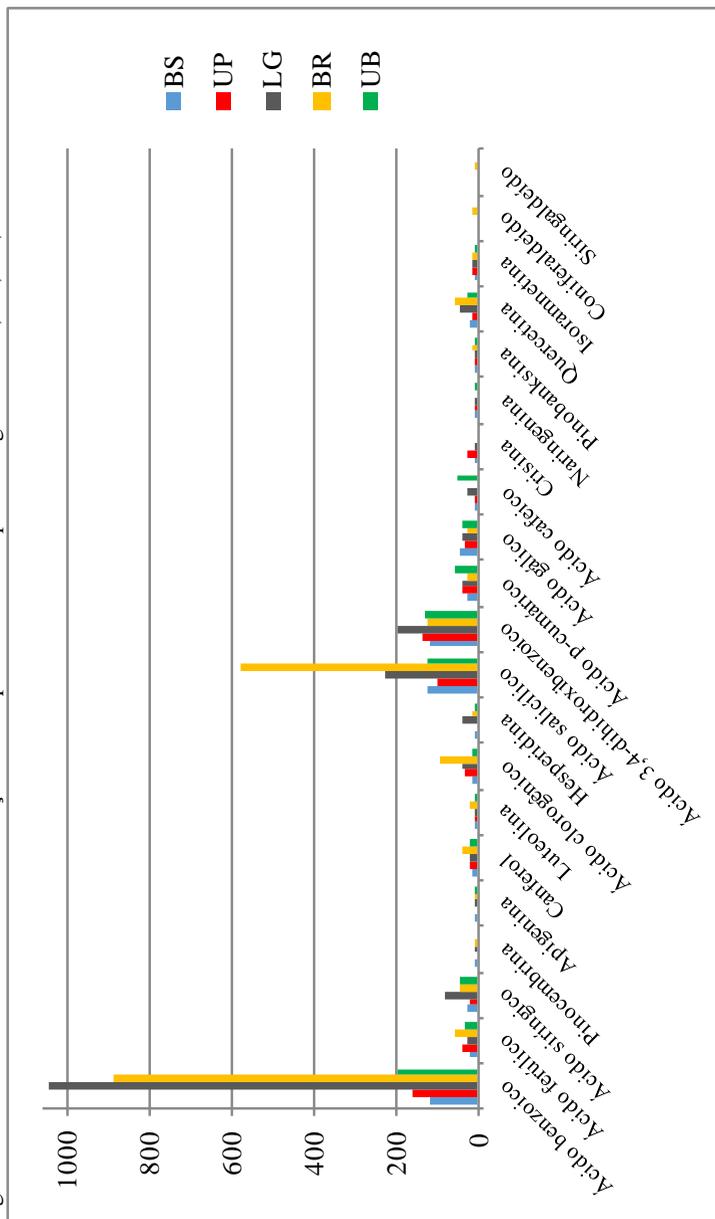
Tabela 15: Concentração ( $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ) de compostos fenólicos em mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) das regiões de Bom Retiro e Urubici (SC).

Composto	BR3	UB1	UB2	UB3
4-metilumbeliferona	< LD	< LD	< LD	< LD
Ácido	3,4- 118 ± 9,55	102 ± 2,89	156 ± 30,5	125 ± 1,55
dihidroxibenzoico				
Ácido benzoico	606 ± 91,8	230 ± 40,3	226 ± 19,9	125 ± 16,9
Ácido cafeico	< LQ	< LQ	84,5 ± 7,76	71,2 ± 2,26
Ácido clorogênico	66,2 ± 2,98	9,98 ± 0,52	17,5 ± 3,22	19,4 ± 1,19
Ácido ferúlico	81,1 ± 2,25	10,2 ± 0,03	39,6 ± 5,70	38,7 ± 0,29
Ácido gálico	30,0 ± 0,96	35,6 ± 1,09	30,6 ± 3,20	37,5
Ácido <i>p</i> -aminobenzoico	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Ácido <i>p</i> -cumárico	31,2 ± 1,24	36,9 ± 1,34	48,9 ± 2,44	85,7 ± 6,08
Ácido salicílico	308 ± 12,1	111 ± 7,47	123 ± 19,2	126 ± 1,74
Ácido sinápico	< LD	< LD	< LD	< LD
Ácido siríngico	33,5 ± 4,18	31,8 ± 0,58	47,3 ± 1,28	44,4 ± 3,63
Ácido vanílico	< LD	< LD	< LD	< LD
Apigenina	2,92 ± 0,46	3,05 ± 0,46	< LQ	< LQ
Canferol	33,4 ± 1,00	6,94 ± 0,33	12,5 ± 2,00	31,5 ± 0,51
Catequina	< LD	< LD	< LD	< LD
Coniferaldeído	12,4 ± 0,35	< LQ	< LQ	< LD
Crisina	< LD	< LD	< LD	< LD
Epicatequina	< LD	< LD	< LD	< LD
Galangina	< LD	< LD	< LD	< LD
Galato	de	< LD	< LD	< LD
epigalocatequina				
Hesperidina	8,36 ± 0,69	< LD	5,36 ± 0,82	< LD
Isoramnetina	11,4 ± 0,31	4,44 ± 0,21	8,67 ± 0,53	10,9 ± 0,10
Luteolina	10,9 ± 0,79	4,31 ± 0,43	7,15 ± 0,23	9,05 ± 0,11
Naringenina	6,19 ± 0,27	1,86 ± 0,06	6,44 ± 0,39	5,54 ± 0,08
Naringina	< LD	< LD	< LD	< LD
Pinobanksina	7,04 ± 0,32	2,30 ± 0,15	8,07 ± 0,10	6,73 ± 0,23
Pinocembrina	0,84 ± 0,11	< LD	< LD	< LD
Quercetina	68,3 ± 1,13	6,83 ± 1,01	34,7 ± 1,44	33,0 ± 1,67
Sinalpaldeído	< LD	< LD	< LD	< LD
Siringaldeído	4,32 ± 0,30	< LQ	< LQ	< LQ

BR (Bom Retiro); UB (Urubici); 1, 2 e 3: diferentes apiários; LD (Limite de detecção,  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e LQ (Limite de quantificação,  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) de acordo com a legenda da Tabela 13.

De acordo com as Tabelas 13, 14 e 15, os resultados de compostos fenólicos ( $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ) quantificados em MMB foram de 2,51 a 6,91 para apigenina, de 46,7 a 1520 para ácido benzoico, de 10,4 a 84,5 para o ácido cafeico, de 3,42 a 6,59 para crisina, de 5,98 a 13,9 para coniferaldeído, de 17,9 a 85,7 para ácido *p*-cumárico, de 96,7 a 228 para ácido 3,4-dihidroxibenzoico, de 16,0 a 43,6 para ácido gálico, de 1,91 a 91,2 para hesperidina, de 4,16 a 15,8 para isoramnetina, de 6,94 a 35,8 para canferol, de 2,96 a 21,4 para luteolina, de 0,46 a 15,7 para naringenina, de 1,59 a 19,5 para pinobanksina, de 0,82 a 7,40 para pinocembrina, de 6,83 a 71,4 para quercetina, de 75,7 a 830 para ácido salicílico, de 3,92 a 7,06 para siringaldeído, e de 14,9 a 133 para ácido siríngico. Estas concentrações para cada analito podem ser melhor visualizadas na Figura 18 para as cinco regiões analisadas (BS, UP, LG, BR e UB).

Figura 18: Resultados obtidos na determinação de compostos fenólicos para as regiões de BS, UP, LG, BR e UB.



Na Figura 18 podem ser observadas maiores concentrações de ácidos benzoico, salicílico e 3,4-dihidroxibenzoico nas cinco regiões analisadas, e especificamente, ácido salicílico foi o composto majoritário na região de BS e ácido benzoico nas regiões de UP, LG, BR e UB. Seguidamente, maiores resultados de ácido gálico e naringenina foram observados na região de BS; crisina e isoramnetina em UP; ácidos siríngico e 3,4-dihidroxibenzoico e hesperidina na região de LG; ácidos ferúlico, clorogênico e salicílico, apigenina, canferol, luteolina, pinobanksina, quercetina, coniferaldeído e siringaldeído em BR; e ácidos *p*-cumárico e cafeico na região de UB.

A Tabela 16 ilustra uma comparação dos resultados obtidos neste estudo para quantificação de compostos fenólicos com outros méis de melato de diferentes espécies e origens.

Tabela 16: Compostos fenólicos quantificados por outros autores em méis de melato de outras espécies ( $\mu\text{g } 100\text{g}^{-1}$ ).

Compostos	Cam et al. (2015)	Daher e Gulaçar (2008)	Esriche et al. (2014)	Haroun et al. (2012)	Lachman et al. (2010)	Silici, Sarioglu e Karaman (2013)	Socha et al. (2011)	Tuberoso et al. (2011)	Neste estudo
2-metoxicristina	-	7,40 a 66,3	-	-	-	-	-	-	-
2-metoxi-vinilfenol	-	23,0 a 32,7	-	-	-	-	-	-	-
Acetina	-	-	-	4,54	-	-	-	-	-
Acetina/Galangina	-	58,1 a 254	-	-	-	-	-	-	-
Ácido benzoico	-	117 a 306	-	-	-	-	-	-	46,7 a 1520
Ácido cafeico	1880	-	1600	2,61 a 256	-	5,0 a 21,0	46,4	-	<LQ a 84,5
Ácido clorogénico	-	-	-	-	-	8,0 a 250	7,12	-	5,21 a 110
Ácido elágico	-	-	-	337	-	-	-	-	-
Ácido ferúlico	419	17,3 a 21,8	-	8,92 a 57,2	50,0 a 820	12,0 a 24,0	18,3	-	7,64 a 81,1
Ácido gálico	8250	-	-	-	-	11,0 a 295	136	-	16,2 a 43,6
Ácido <i>p</i> -cumárico	466 a 1590	-	31400	3,90 a 68,2	-	50,0 a 367	534	-	17,9 a 85,7
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	5020 a 5530	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	924 a 74500	-	-	164 a 599	-	-	-	-	96,8 a 228
Ácido salicílico	-	-	-	-	-	-	-	1380	75,7 a 830
Ácido sinápico	-	-	-	-	-	-	4,22	-	<LD
Ácido síringico	1030	-	-	ND a 303	-	-	50,1	-	14,9 a 133
Ácido vanílico	880 a 2670	-	-	-	-	-	-	-	<LD
Apigenina	3480	-	-	14,4 a 16,7	-	-	-	-	<LD a 6,91
Canferol	-	-	400	-	-	-	-	-	6,94 a 35,8
Catequina	-	-	-	-	-	119 a 845	-	-	<LD

Legenda: LD (Limite de deteção,  $\mu\text{g } \text{L}^{-1}$ ) e LQ (Limite de quantificação,  $\mu\text{g } \text{L}^{-1}$ ) de acordo com a Tabela 13.

Tabela 16: Compostos fenólicos quantificados por outros autores em méis de melato de outras espécies ( $\mu\text{g } 100\text{g}^{-1}$ ) (Continuação).

Compostos	Can et al. (2015)	Daher e Gulaçar (2008)	Esriche et al. (2014)	Haroun et al. (2012)	Lachman et al. (2010)	Silici, Sarioğlu e Karaman (2013)	Socha et al. (2011)	Tuberoso et al. (2011)	Neste estudo
Chalcona de pinobanksina	-	52,4 a 81,2	-	-	-	-	-	-	-
Crisina	-	142 a 471	1900	2,69 a 77,0	10 a 40	-	-	-	< LD a 6,59
Epicatequina	-	-	1400	-	-	84,0 a 238	-	-	< LD
Galangina	-	-	-	-	-	-	-	-	< LD a 4,67
Isorramnetina	-	-	-	-	-	-	-	-	4,16 a 15,9
Luteolina	-	-	-	-	-	-	-	-	2,96 a 21,4
Miricetina	-	-	2600	-	-	-	-	-	-
Naringenina	-	-	1800	-	-	-	-	-	0,46 a 15,7
Pinocembrina	-	355 a 764	1900	4,48 a 86,8	-	-	-	-	< LD a 4,67
Quercetina	-	-	900	ND a 65,7	-	-	-	-	6,83 a 71,4
Rutina	53900	-	-	-	-	-	-	-	-
Siringato de metila	-	-	-	ND a 2687	-	-	-	-	-
<b>Demais compostos pesquisados neste estudo</b>									
4-metilumbeliferona	-	-	-	-	-	-	-	-	< LD
Ácido <i>p</i> - aminobenzoico	-	-	-	-	-	-	-	-	< LQ
Coniferaldeído	-	-	-	-	-	-	-	-	< LD a 13,9

Legenda: LD (Limite de detecção,  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) – Ácido sinápico, ácido vanílico, ácido vanílico, apigenina (0,20), catequina (0,40) LQ (Limite de quantificação,  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) – Ácido cafeico (1,60); ND (Não detectado).

Tabela 16: Compostos fenólicos quantificados por outros autores em méis de melato de outras espécies ( $\mu\text{g } 100\text{g}^{-1}$ ) (Conclusão).

Compostos	Can et al. (2015)	Daher e Gulaçar (2008)	Escriche et al. (2014)	Haroun et al. (2012)	Lachman et al. (2010)	Sifici, Sarioglu e Karaman (2013)	Socha et al. (2011)	Tuberoso et al. (2011)	Neste estudo
<b>Demais compostos pesquisados neste estudo</b>									
Galato	-	-	-	-	-	-	-	-	< LD
epigallocatequina	-	-	-	-	-	-	-	-	< LD a 91,2
Hesperidina	-	-	-	-	-	-	-	-	< LD
Naringina	-	-	-	-	-	-	-	-	< LQ a 19,5
Pinobanksina	-	-	-	-	-	-	-	-	< LD
Sinapaldeído	-	-	-	-	-	-	-	-	< LQ a 7,06
Siringaldeído	-	-	-	-	-	-	-	-	
Espécie	<i>Quercus robur</i> L. e <i>Tilia platyphyllos</i>	<i>Abies alba</i> Miller	END	Carvalho e pinheiro	END	END	END	<i>Salix</i> spp.	<i>Mimosa scabrella</i> B.
Origem	Turquia	França e Itália	Espanha	Turquia	República Tcheca	Turquia	Polónia	Croácia	Brasil

Legenda: LD (Limite de detecção,  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) – Ácido sinápico, ácido vanílico, apigenina (0,20), catequina (0,40) ; LQ (Limite de quantificação,  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) - Ácido cafeico (1,60); ND (Não detectado); END (espécie não definida).

De acordo com a Tabela 16, quando comparado aos méis de melato de outras origens, o MMB apresentou maiores concentrações de ácido benzoico, ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido ferúlico, ácido cumárico, ácido siríngico e quercetina quando comparado com os estudos de Daher e Gulaçar (2008); Haroun et al. (2012); Silici, Sarioglu e Karaman (2013) e Socha et al. (2011), porém, menores concentrações de ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido *p*-cumárico, ácido salicílico, ácido sinápico, ácido siríngico, ácido vanílico, apigenina, catequina, crisina, epicatequina, canferol, naringenina, pinocembrina e quercetina conforme outros estudos (CAN et al., 2015; DAHER; GULAÇAR, 2008; ESCRICHE et al., 2014; HAROUN et al., 2012; LACHMAN et al., 2010; SILICI; SARIOGLU; KARAMAN, 2013; SOCHA et al., 2011; TUBEROSO et al., 2011). Os compostos ácidos elágico e *p*-hidroxibenzoico, chalcona de pinobanksina, miricetina, siringato de metila, acetina, 2-metoxicrisina e 2-metoxi-vinilfenol foram os compostos encontrados em outros méis de melato (CAN et al., 2015; DAHER; GULAÇAR, 2008; ESCRICHE et al., 2014; HAROUN et al., 2012) e não observados neste estudo, enquanto coniferaldeído, hesperidina, isoramnetina e pinobaksina foram os compostos determinados pela primeira vez neste estudo, não quantificados ou detectados em outras espécies e origens de méis de melato. Apesar da espécie avaliada neste trabalho apresentar menores concentrações de alguns compostos fenólicos quando comparado à diferentes espécies e origens geográficas, apresentou maiores concentrações em outros, além de maior número, diversidade e diferentes compostos majoritários.

### 3.3 DETERMINAÇÃO DE MINERAIS POR CZE-DAD

A determinação de minerais foi realizada visando elucidar acerca desta classe de compostos presentes em amostras de MMB, uma vez que a presença de elementos essenciais como cálcio, potássio, sódio e magnésio pode conferir valor nutricional ao produto (POHL et al., 2012; FERMO et al., 2013), ademais, méis de melato têm apresentado maiores concentrações de minerais quando comparado aos méis florais (LACHMAN et al., 2007). Uma vez que o método de Rizelio et al. (2012) utilizado neste estudo foi adaptado com relação à extremidade de injeção de amostra (injeção realizada pelo *inlet*), alguns parâmetros da performance analítica do método foram avaliados.

### 3.3.1 Desempenho analítico e conformidade do sistema

A Tabela 17 apresenta os resultados obtidos para a avaliação da performance analítica do método de Rizelio et al. (2012) adaptado.

Tabela 17: Avaliação da performance analítica de minerais por CZE-DAD

Parâmetros	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Mn <sup>2+</sup>
Linearidade (mmol L <sup>-1</sup> )	3,0 a 15,0	0,05 a 1,50	0,05 a 1,50	0,05 a 0,75	0,01 a 0,10
R <sup>2</sup>	0,9922	0,9972	0,9975	0,9956	0,9894
LD (mg L <sup>-1</sup> )	0,78	0,18	0,16	0,10	0,11
LQ (mg L <sup>-1</sup> )	2,35	0,46	0,60	0,27	4,50
Precisão instrumental					
Área do pico corrigida (DPR, %)	1,32	1,37	2,67	2,84	5,59
Tempo de migração corrigido (DPR, %)	0,11	0,13	0,14	0,14	0,15
Precisão <i>Intraday</i> (DPR, %)	≤ 4,38	≤ 3,85	≤ 3,58	≤ 3,50	≤ 6,25
Precisão <i>Interday</i> (DPR, %)	≤ 5,94	≤ 5,48	≤ 5,56	≤ 7,36	≤ 7,38
Reprodutibilidade parcial (DPR, %)	≤ 5,38	≤ 6,96	≤ 4,76	≤ 4,27	≤ 6,49
Exatidão (%)	108 a 109	99 a 107	97 a 107	103 a 105	101 a 108

Legenda: R<sup>2</sup>: coeficiente de determinação; LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação.

Através da avaliação da regressão linear foi possível observar alto grau de significância ( $p < 0,001$ ) enquanto a falta de ajuste não foi observada ( $p > 0,05$ ) e não foram detectados *outliers* após a aplicação do teste de Grubs (BURKE, 2001). A linearidade foi evidenciada com resultados obtidos para coeficientes de determinação ( $R^2$ )  $\geq 0,9894$ , distribuição normal ( $p > 0,05$  pelo teste de Shapiro-Wilk), variâncias homogêneas ( $p > 0,05$  pelo teste de Bartlett) e independência de resíduos pelo teste de Durbin-Watson (SHAPIRO; WILK, 1965; BURKE, 2001; SNEDECOR; COCHRAN, 1989; DURBIN; WATSON, 1950) para todos os analitos nas curvas aquosa e matriz, indicando que o método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) foi aplicado adequadamente. O DPR para a precisão instrumental foi  $\leq 5,59\%$  para área de pico corrigido e  $\leq 0,15\%$  para tempo de migração, demonstrando que o sistema instrumental estava adequado para o uso. O DPR para precisão *intraday* e *interday* e reprodutibilidade parcial para a área de pico corrigida foi  $\leq 6,25$ ,  $7,38$  e  $6,96\%$ , respectivamente, para os seis níveis da curva de calibração, apresentando concordância com o critério de aceitabilidade de 10%. A exatidão variou de 97,6 a 109%, aderindo

ao critério de aceitabilidade de 80 a 110% (EUROPEAN COMISSION, 2002). Não foram detectados efeitos de matriz na faixa de concentração avaliada, visto que falta de ajuste não foi evidenciado ( $p > 0,05$ ) quando comparados os coeficientes angulares das curvas de calibração aquosa e matriz mediante aplicação de teste  $t$ , uma vez que as variâncias foram consideradas homogêneas mediante aplicação do teste  $F$  ( $p > 0,05$ ).

### **3.3.2 Confirmação da identificação de minerais por ICP-MS**

Uma vez que Rizelio et al. (2012) demonstraram a concordância entre os resultados obtidos de cátions por CE e ICP-MS para méis florais, evidenciando que os macroelementos analisados encontravam-se em sua forma livre na matriz mel, neste estudo a identificação dos macroelementos majoritários de MMB foi confirmada por meio da determinação semiquantitativa de minerais por ICP-MS na amostra LG2, o qual  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Na^+$  e  $Mn^{2+}$  apresentaram ordem decrescente de concentração, respectivamente, apresentando concordância com os resultados observados por CE nesta amostra.

### **3.3.3 Análise de amostras**

Na Tabela 18 são apresentados os resultados encontrados para a determinação de macroelementos em MMB.

Tabela 18: Concentração (mg kg<sup>-1</sup>) de cátions por CZE-DAD em mel de melato de bracinga (*Mimosa scabrella* Bentham).

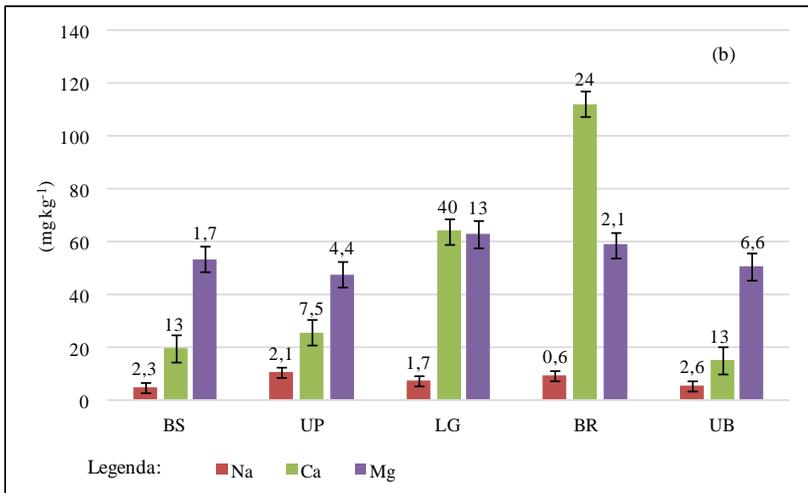
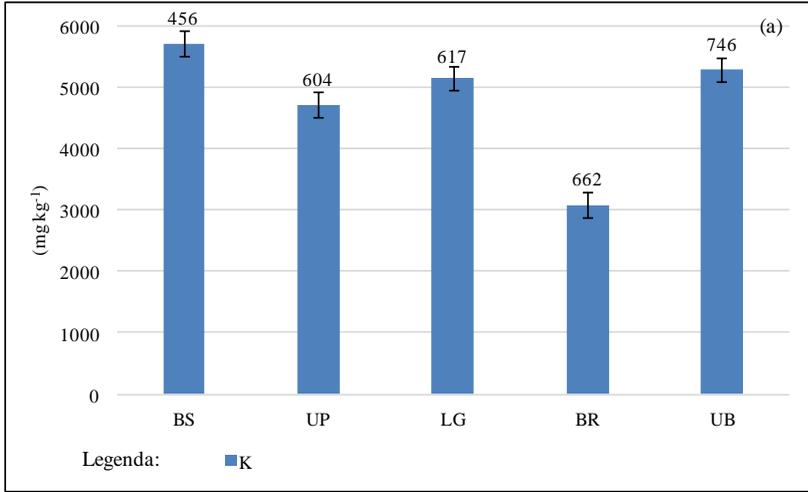
Região	K <sup>+</sup>	Na <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Mn <sup>2+</sup>
BS1	5891 ± 50,1	2,42 ± 0,21	9,05 ± 1,12	53,6 ± 5,29	< LD
BS2	6332 ± 125	3,41 ± 0,42	4,80 ± 0,49	55,4 ± 2,38	< LD
BS3	5831 ± 10,7	5,37 ± 0,03	28,49 ± 0,08	54,2 ± 1,81	< LD
BS4	5400 ± 110	4,37 ± 0,68	20,9 ± 2,67	53,6 ± 1,99	< LD
BS5	5159 ± 96,7	8,44 ± 0,28	34,7 ± 3,09	50,9 ± 2,72	< LD
Média ± DP	5723 ± 456 <sup>b</sup>	4,80 ± 2,31 <sup>a</sup>	19,6 ± 12,6 <sup>a,b</sup>	53,5 ± 1,66 <sup>a,b</sup>	< LD
UP1	4814 ± 144	13,3 ± 0,87	19,3 ± 1,66	49,1 ± 2,42	< LD
UP2	3789 ± 17,4	9,98 ± 1,19	26,4 ± 2,77	40,4 ± 2,51	< LD
UP3	4532 ± 38,2	8,68 ± 0,40	20,2 ± 1,15	47,4 ± 2,67	< LD
UP4	5253 ± 29,0	12,1 ± 0,67	38,0 ± 0,70	49,0 ± 0,44	< LD
UP5	5236 ± 16,0	8,62 ± 0,99	24,2 ± 1,26	52,3 ± 1,22	< LD
Média ± DP	4725 ± 604 <sup>a,b</sup>	10,5 ± 2,09 <sup>b</sup>	25,6 ± 7,51 <sup>a,b</sup>	47,6 ± 4,44 <sup>a</sup>	< LD
LG1	4958 ± 85,3	4,69 ± 0,62	46,7 ± 1,04	57,1 ± 3,56	< LD
LG2	4632 ± 102	8,78 ± 0,62	125 ± 1,74	80,7 ± 5,15	< LD
LG3	6048 ± 11,6	7,18 ± 0,83	43,3 ± 3,34	64,8 ± 3,85	< LD
LG4	4972 ± 41,7	7,79 ± 1,05	41,6 ± 2,35	49,6 ± 3,74	< LD
Média ± DP	5153 ± 617 <sup>a,b</sup>	7,11 ± 1,74 <sup>a,b</sup>	64,1 ± 40,5 <sup>a,b</sup>	63,0 ± 13,3 <sup>a,b</sup>	< LD
BR1	3529 ± 28,0	9,03 ± 0,08	99,5 ± 4,57	60,1 ± 4,28	< LD
BR2	2324 ± 69,2	9,87 ± 0,85	140 ± 5,95	60,0 ± 3,00	< LD
BR3	3401 ± 165	8,71 ± 0,07	97,9 ± 4,77	56,4 ± 2,60	< LD
Média ± DP	3085 ± 662 <sup>a</sup>	9,20 ± 0,60 <sup>a,b</sup>	112 ± 23,6 <sup>b</sup>	58,8 ± 2,08 <sup>b</sup>	< LD
UB1	5249 ± 98,6	8,13 ± 0,35	6,24 ± 1,58	53,3 ± 1,89	< LD
UB2	4582 ± 25,5	5,09 ± 0,55	29,7 ± 2,40	43,3 ± 1,99	< LD
UB3	6072 ± 114	2,89 ± 0,16	9,54 ± 1,04	55,8 ± 4,59	< LD
Média ± DP	5301 ± 746 <sup>a,b</sup>	5,37 ± 2,63 <sup>a,b</sup>	15,7 ± 12,7 <sup>a</sup>	50,8 ± 6,59 <sup>a,b</sup>	< LD
<sup>c</sup> p valor S-W	0,16	0,54	<0,01	0,02	-
<sup>c</sup> p valor K-W	0,03	0,01	0,01	0,01	-

Legenda: BS (Bocaina do Sul); UP (Urupema); LG (Lages); BR (Bom Retiro); UB (Urbici); 1, 2, 3, 4 e 5 (diferentes apiários); <sup>a,b</sup>resultados médios com letras diferentes em mesma coluna indicam diferença significativa entre as regiões pelo teste de Kruskal-Wallis (K-W) ( $p < 0,05$ ); <sup>c</sup>valor de  $p$  (nível de significância de 5%); S-W (teste de normalidade de Shapiro-Wilk).

De acordo com a Tabela 18 os resultados obtidos para os cátions analisados variaram de 2324 a 6332 mg kg<sup>-1</sup> para K<sup>+</sup>, 2,42 a 13,3 mg kg<sup>-1</sup> para Na<sup>+</sup>, 4,80 a 140 mg kg<sup>-1</sup> para Ca<sup>2+</sup> e de 40,4 a 80,7 mg kg<sup>-1</sup> para Mg<sup>2+</sup>, demonstrando K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> como componentes majoritários de um modo geral. Como pode ser observado ainda, através do teste de Shapiro-Wilk, os resultados obtidos para Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> não apresentaram distribuição normal ( $p < 0,05$ ), logo, o teste não paramétrico Kruskal-Wallis foi utilizado para verificação de diferença significativa entre as regiões analisadas e constatou-se que, ao nível de significância de 5%, K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> apresentaram diferença significativa entre as regiões de BS e BR, BS e UP, UB e BR e entre UP e BR, respectivamente.

Na Figura 19 são apresentados os gráficos de colunas (a) para a determinação de  $K^+$ , e (b) para  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$  para cada região.

Figura 19: Resultados obtidos para cátions (média  $\pm$  DP) para as regiões de BS, LG, BR e UB de  $K^+$  (a),  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$  (b).



Em função das altas concentrações observadas para  $K^+$ , este foi apresentado separadamente dos demais.

A partir da análise da Figura 19(a) foi possível verificar a menor faixa de concentração obtida para a região de BR responsável pela diferenciação da região de BS. E através da Figura 19(b) foi possível visualizar amplas faixas de concentrações observadas para  $Ca^{2+}$ , especialmente a maior concentração observada na região de BR, quando comparado com as faixas obtidas para as concentrações de  $Na^+$  e  $Mg^{2+}$ .

A Tabela 19 apresenta os resultados de cátions observados por outros autores em méis de melato de outras espécie e origens.

Tabela 19: Cátions observados por outros autores em méis de melato (mg kg<sup>-1</sup>).

<b>Autores</b>	<b>Mel de melato</b>	<b>Origem</b>	<b>K<sup>+</sup></b>	<b>Na<sup>+</sup></b>	<b>Ca<sup>2+</sup></b>	<b>Mg<sup>2+</sup></b>
Mądeczyk e Baralkiewicz (2008)	Espécie não definida	Polónia	1744 a 3659	10,3 a 88,4	3,30 a 53,7	1,48 a 6,60
Sergiel e Pohl (2010)	Espécie não definida	Polónia	NI	NI	25,3 ± 0,17	31,3 ± 0,11
Chudzinska e Baralkiewicz (2010)	Espécie não definida	Polónia	1744 a 4222	10,3 a 88,4	< LD a 62,9	1,48 a 64,7
Grambecka & Szefer (2013)	Espécie não definida	Polónia	525 a 661	6,80 a 36,8	22,7 a 71,1	27,0 a 66,1
Fermo et al. (2013)	Espécie não definida	Itália	1820	25,3	68,1	55,8
Chua et al. (2012)	Espécie não definida	Malásia	1420 a 1766	284 a 316	ND	87,1 a 89,5
Neste estudo	<i>Mimosa scabrellia</i> Bentham	Brasil	2323 a 6332	2,42 a 13,3	4,80 a 140	40,4 a 80,7

Legenda: NI: não informado; LD: limite de detecção; ND: não detectado.

De acordo com a Tabela 19, os valores obtidos neste estudo foram maiores para  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$  e menores para  $Na^+$  quando comparados aos resultados encontrados em méis de melato de outras espécies (CHUA et al., 2012; CHUDZINSKA; BARALKIEWICZ, 2010; FERMO et al., 2013; GREMBECKA; SZEFER, 2013; MADEJCZYK; BARALKIEWICZ, 2008; SERGIEL; POHL, 2010). Além disso, de modo geral, apresentou maiores resultados para  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$  e menores resultados para  $Na^+$  com relação aos valores obtidos para méis florais nestes mesmos estudos. Estes resultados estão em concordância com estudos prévios que demonstraram que méis de melato normalmente apresentam maiores concentrações de minerais quando comparado aos méis florais (LACHMAN et al., 2007; MADEJCZYK e BARALKIEWICZ, 2008; CHUA et al., 2012), e especialmente neste caso, MMB apresentaram maiores concentrações de macroelementos analisados quando comparados aos demais méis de melato.

### 3.4 MATRIZ DE CORRELAÇÃO DE PEARSON

A Tabela 20 apresenta os valores de correlação ( $r$ ) obtidos entre as avaliações de capacidade antioxidante (DPPH e FRAP), TCP, compostos fenólicos e minerais, com objetivo de investigar a possibilidade de contribuição das classes de compostos analisadas neste estudo na capacidade antioxidante *in vitro* de MMB, o qual uma correlação positiva significativa, a um nível de significância de 5%, evidencia uma possível contribuição da classe avaliada na capacidade antioxidante deste tipo de mel. A Tabela foi elaborada a partir das concentrações obtidas para cada apiário utilizado no presente estudo e, para as determinações de macroelementos e compostos fenólicos, foi utilizado o somatório das concentrações obtidas individualmente destas determinações para cada apiário.

Tabela 20: Valores de correlações ( $r$ ) obtidos entre as determinações de compostos fenólicos ( $\mu\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ ), minerais ( $\text{mg kg}^{-1}$ ), TPC ( $\text{mg GAE } 100\text{g}^{-1}$ ), DPPH ( $\text{mg AAE } 100\text{g}^{-1}$ ) e FRAP ( $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O } 100\text{g}^{-1}$ ).

	TPC	DPPH	FRAP	Compostos fenólicos	Minerais
TPC	1	-	-	-	-
DPPH	<b>*0,71</b>	1	-	-	-
FRAP	<b>*0,81</b>	<b>*0,87</b>	1	-	-
Compostos fenólicos	0,10	-0,29	-0,14	1	-
Minerais	0,46	<b>*0,84</b>	<b>*0,69</b>	<b>*-0,47</b>	1

\*Correlações significativas a um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ )  $n=18$ .

A partir da avaliação dos resultados apresentados na Tabela 20, embora isoladamente os métodos de capacidade antioxidante não possam refletir todas as fontes radicalares ou antioxidantes constituintes de um sistema, as determinações utilizadas neste estudo (DPPH e FRAP) demonstraram correlação positiva significativa (0,87), além disto, podem ser verificadas correlações positivas significativas de TPC com DPPH e FRAP (0,71 e 0,81, respectivamente), indicando que as classes de compostos envolvidas na transferência de elétrons ao reagente Folin-Ciocalteu em meio alcalino podem contribuir na capacidade antioxidante pelos mecanismos avaliados, apresentando concordância com resultados obtidos por outros autores para esta correlação em méis de melato (Al et al., 2016; CAN et al., 2015; CHIS et al., 2016; ESCUREDADO et al., 2013). No entanto, não houve correlação significativa entre a soma dos compostos fenólicos determinados individualmente com TPC, DPPH e FRAP (0,10, -0,29 e -0,14, respectivamente), sugerindo que a influência destes compostos não se encontra correlacionada individualmente aos mecanismos antioxidantes utilizados. Estudos que envolvem avaliação de compostos fenólicos individualmente em méis de melato têm correlacionado capacidades antioxidantes aos compostos fenólicos totais ou parâmetros físico-químicos (CAN et al., 2015; ESCRICHE et al., 2014; SOCHA et al., 2011) ou entre os próprios compostos fenólicos avaliados individualmente (SILICI; SARIOGLU; KARAMAN, 2013). Socha et al. (2010) encontraram correlação significativa entre concentração total de ácidos fenólicos quantificados individualmente e determinações antioxidantes, porém, a correlação envolveu seis amostras de méis florais e apenas uma amostra de mel de melato.

Quando complexados aos compostos fenólicos, os minerais podem apresentar considerável sinergismo na capacidade antioxidante, uma vez que muitos metais podem comportar-se como doadores de elétrons, tendo

suas cargas facilmente estabilizadas por estruturas fenólicas (ESCUREDO et al., 2013; SANT'ANA et al., 2012). Neste estudo foram observadas correlações positivas significativas de minerais com DPPH e FRAP (0,84 e 0,69, respectivamente), sugerindo que os macroelementos determinados podem influenciar sinergicamente na capacidade antioxidante através destes mecanismos. Este resultado apresenta concordância com alguns estudos em méis de melato que demonstraram correlação significativa entre mecanismos de capacidade antioxidante e minerais (ESCUREDO et al. 2013; KAYGUSUZ et al., 2016). Porém, pode ser observada uma correlação negativa significativa entre as determinações de compostos fenólicos determinados individualmente e minerais, indicando comportamento inversamente proporcional (enquanto uma das determinações aumenta a outra diminui), podendo-se sugerir possível interação entre estas classes de compostos. Destaca-se ainda que a matriz de correlação também foi realizada utilizando as concentrações obtidas de compostos fenólicos e minerais individualmente, o qual também evidenciou correlação negativa significativa entre os analitos destas classes.

Tendo em vista os macroelementos K, Ca e Mg e a diversidade de compostos fenólicos encontrados em MMB, quando comparado com outros méis de melato, é possível prever acerca do potencial sinergismo destes macroelementos influenciando diretamente nas capacidades antioxidante *in vitro* avaliadas (DPPH e FRAP); esses fatores, aliados às diversas ações funcionais avaliadas *in vivo* de méis, incluindo mel de melato, citadas neste estudo, pode-se sugerir a inserção de mel, em especial, MMB, em dietas convencionais com alegação de propriedade funcional, uma vez que este apresenta compostos fisiologicamente ativos que fornecem benefícios à saúde. A Tabela 21 apresenta a faixa de concentração de carboidratos, minerais e compostos fenólicos determinados em MMB, obtidos nas regiões avaliadas (consultar Seção 2.1), as recomendações da ingestão dietética de referência (DRI, do inglês *Dietary reference intakes*) de acordo com o Instituto de Medicina da Academia Nacional de Ciências dos E.U.A. (IOM, do inglês *Institute of Medicine*), que estabelece indicadores nutricionais de consumo, usualmente utilizado pelo Brasil, devido à falta de dados que permitam o estabelecimento de recomendações de nutrientes para a população brasileira (COZZOLINO, 2009); bem como os valores de ingestão diária recomendada (IDR) pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Tabela 21: Faixas de teores de carboidratos, macromelementos e compostos fenólicos obtidos em mel de melato de bracatinga (*Mimosa scabrella* Bentham) na mesorregião do planalto serrano de SC, valores de ingestão dietética de referência (DRI) e ingestão diária recomendada (IDR).

Nutriente	Resultados obtidos em	DRI	IDR
	MMB	(IOM, 2006)	(BRASIL, 2003, 2005)
Carboidratos	60 a 77 g 100 g <sup>-1</sup>	130 g dia <sup>-1</sup>	300 g
K	2324 a 6332 mg kg <sup>-1</sup>	4700 mg dia <sup>-1</sup>	NI
Na	2,42 a 13,3 mg kg <sup>-1</sup>	1500 mg dia <sup>-1</sup>	2400 mg
Ca	4,80 a 140 mg kg <sup>-1</sup>	1000 mg dia <sup>-1</sup>	1000 mg
Mg	40,4 a 80,7 mg kg <sup>-1</sup>	420 mg dia <sup>-1</sup>	260 mg
Compostos fenólicos	441 a 2393 µg 100 g <sup>-1</sup>	NI	NI

Legenda: MMB - Mel de melato de bracatinga; NI - Não informado.

As representações que sugeriram a relação entre o consumo do alimento e a saúde podem ser veiculadas quando atendidas as diretrizes básicas para comprovação de propriedades funcionais ou de saúde, (BRASIL, 1999a), devendo este ser registrado na categoria de alimentos com alegações de propriedades funcionais ou de saúde (BRASIL, 1999b), mesmo os produtos de origem animal de competência do MAPA, como o mel.

A partir dos dados apresentados na Tabela 21, ao considerar o percentual de 25% (32,5 g) de máximo de açúcares adicionados sobre a DRI de 130 g dia<sup>-1</sup> de carboidratos (IOM, 2006), e o consumo da porção diária de 37,5 g de mel (110 kcal de açúcares e doces para um valor energético total de 2000 kcal) indicado pelo Guia alimentar para população brasileira (BRASIL, 2008), pode-se sugerir a alegação de propriedade funcional do MMB na manutenção geral à saúde e redução do risco de doenças, podendo ser inserido na dieta convencional a porção de 37,5 g para indivíduos sem restrição à ingestão de carboidratos, que pode suprir de 17,3 a 22,2% de carboidratos, de 1,85 a 5,05% de K, de 0,01 a 0,03% de Na, de 0,02 a 0,53% de Ca e de 0,36 a 0,72% de Mg da DRI (IOM, 2006); e de 7,50 a 9,63% de carboidratos, de zero a 0,02% de Na, de 0,02 a 0,53% de Ca, e de 0,58 a 1,16% de Mg da IDR (BRASIL, 2003, 2005), bem como maximizar a ingestão de compostos fenólicos em ambos os casos.

## 4 CONCLUSÃO

Neste estudo, a determinação de classes de compostos com potenciais ações antioxidantes, fenólicos e minerais, e suas correlações com determinações de capacidade antioxidante *in vitro* (DPPH e FRAP) e determinação de compostos fenólicos totais (TPC) foram investigados com o objetivo de evidenciar a qualidade do mel de melato de bracinga (*Mimosa scabrella* Bentham) com relação à potencialidade antioxidante característica de alimentos funcionais. Quando comparado aos demais méis de melato, as amostras de MMB apresentaram concordância com resultados já obtidos na literatura para as determinações de capacidade antioxidante pelos mecanismos de captura de radical (DPPH) e de redução férrica (FRAP), porém apresentou maiores resultados com relação à determinação de TPC, que pode evidenciar a contribuição de agentes não fenólicos nestes mecanismos. Além disso, o MMB apresentou maiores concentrações de compostos fenólicos como quercetina e ácidos benzoico, cafeico, clorogênico, ferúlico, cumárico e siríngico, maior número e diversidade de compostos fenólicos, bem como compostos majoritários diferenciados e compostos quantificados ainda não reportados em méis de melato como coniferaldeído, hesperidina, pinobanksina e isoramnetina. Os macroelementos observados no MMB foram  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$ , o qual  $K^+$  apresentou maior concentração neste mel; além destes apresentarem resultados maiores quando comparado com demais méis de melato, bem como menores resultados de  $Na^+$ . Estes macroelementos apresentaram potencial sinergismo influenciando diretamente nas capacidades antioxidante *in vitro* avaliadas (DPPH e FRAP).

Através do exposto, associado às diversas ações funcionais avaliadas *in vivo* de méis, incluindo mel de melato, citadas neste estudo, destacam-se as características benéficas potenciais de propriedades funcionais deste produto, podendo-se inferir acerca da inserção de 37,5 g de MMB em dietas convencionais com alegação de propriedade funcional na manutenção geral à saúde e redução do risco de doenças, para indivíduos sem restrições com relação à ingestão de carboidratos.



## REFERÊNCIAS

- ABDUL-SALAM, A. et al. Effect of palestinian honey on spermatogenesis in rats. **Journal of Medicinal Food**, v. 11, n. 4, p. 799-802, 2008.
- AJIBOLA, A.; CHAMUNORWA, J.; ERLWANGER, K. H. Nutraceutical values of natural honey and its contribution to human health and wealth. **Nutrition & Metabolism**, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2012.
- AL, M. L. et al. Physico-chemical and bioactive properties of different floral origin honeys from Romania. **Food Chemistry**, v. 112, p. 863-867, 2009.
- ALQARNI, A. S. et al. Mineral content and physical properties of local and imported honeys in Saudi Arabia. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 18, p. 618-625, 2014.
- 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, 2010.
- AL-WAILI, N. S. Effects of daily consumption of honey solution on hematological indices and blood levels of minerals and enzymes in normal individuals. **Journal of Medicinal Food**, v. 6, n.2, p. 135-140, 2003.
- ARABMOAZZEN, S. et al. Antidiabetic effect of honey feeding in noise induced hyperglycemic rat: involvement of oxidative stress. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 18, n. 8, p. 745-751, 2015.
- BARONI, M. V. et al. Composition of honey from Córdoba (Argentina): assessment of North/South provenance by chemometrics. **Food Chemistry**, v. 114, p. 727-733, 2009.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of Antioxidant Power: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70-76, 1996.

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

BETTAR, I. et al. Characterisation of Moroccan Spurge (*Euphorbia*) honeys by their physicochemical characteristics, mineral contents and colour. **Arabian Journal of Chemistry**, 2015. *Article in press*.

BIESAGA, M.; PYRZYNSKA, K. Stability of bioactive polyphenols from honey during different extraction methods. **Food Chemistry**, v. 136, p. 46-54, 2013.

BLASA, M. et al. Honey flavonoids as protection agents against oxidative damage to human red blood cells. **Food chemistry**, v. 104, p. 1635-1640, 2007.

BOGDANOV, S. et al. Honey for nutrition and health: a review. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 27, n. 6, p. 677-689, (2008).

BONTEMPO, L. et al. Isotopic and elemental composition of selected types of Italian honey. **Measurement**, 2015. *Article in press*.

BORSATO, D. M. et al. Topical Anti-inflammatory activity of a monofloral honey of *Mimosa scabrella* provided by *Melipona marginata* during winter in southern Brazil. **Journal of Medicinal Food**, v. 17, n. 7, p. 817-825, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução n. 18, de 30 de abril de 1999**. Aprova o Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. ANVISA, Brasília, 1999a.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução n. 19, de 30 de abril de 1999**. Aprova o Regulamento Técnico de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem. ANVISA, Brasília, 1999b.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução n. 360, de 23 de dezembro de 2003**. Aprova o Regulamento Técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados. ANVISA, Brasília, 2003.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução n. 269, de 22 de setembro de 2005**. Aprova o Regulamento Técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. ANVISA, Brasília, 2005.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Guia alimentar para a população brasileira: promovendo a alimentação saudável**. Ministério da Saúde, Brasília, 2008.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

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

BURKE, S. Missing values, outliers, robust statistics and non-parametric methods, statistics and data analysis. **LCGC Europe**, online Supplement, 19-24, 2001.

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

CHIS et al. Comparative antioxidant content and antioxidant activity of selected romanian and polish honeydew honey. **Revista de Chimie**, v. 67, n. 2, p. 214-218, 2016.

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

CHUDZINSKA, M.; BARALKIEWICZ, D. Estimation of honey authenticity by multielements characteristics using inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) combined with chemometrics. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 284-290, 2010.

\_\_\_\_\_. Application of ICP-MS method of determination of 15 elements in honey with chemometric approach for the verification of their authenticity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 2741-2749, 2011.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSIOIN. **General standard for contaminants and toxins in food and feed**. FAO/WHO, 1995.

COZZOLINO, S. M. F. **Recomendações de Nutrientes**. International Life Sciences Institute (ILSI Brasil), São Paulo: 2009.

DAHER, S.; GULAÇAR, F. O. Analysis of phenolic and other aromatic compounds in honeys by solid-phase microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 5775-5780, 2008.

DOLINSKY, M. **Nutrição Funcional**. São Paulo: Roca, 2009.

DUARTE, L. J. V. **Alimentos funcionais**. Porto alegre: Artes e Ofícios, 2006.

DURBIN, J.; WATSON, G. S. Testing for serial correlation in least squares regression I. **Biometrika**, v. 37, p. 409-428, 1950.

ESCRICHE, I. et al. Suitability of antioxidant capacity, flavonoids and phenolic acids for floral authentication of honey. Impact of industrial thermal treatment. **Food Chemistry**, n. 142, p. 135-143, 2014.

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

EURACHEM. **The fitness for purpose of analytical methods, a laboratory guide to method validation and related topics**. 2<sup>a</sup> ed., 2014. Disponível em: < <https://www.eurachem.org/> > Acesso em: 15 mar. 2015.

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

EUROPEAN COMMISSION. **Council Directive 2002/657/EC**, Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Official Journal of the European Communities, p. 8-36, 2002.

EUROPEAN COMMISSION. **1881/2006, setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs**. Official Journal of the European Communities, p. 1-35, 2006.

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

FERMO, P. et al. Ionic profile of honey as a potential indicator of botanical origin and global environmental pollution. **Environmental Pollution**, v. 178, p. 173-181, 2013.

FRANCHINI, R. A. A. et al. Rapid determination of hydrogen peroxide using peroxidase immobilized on Amberlite IRA-743 and minerals in honey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 6885-6890, 2007.

GASIC, U. et al. Phenolic profile and antioxidant activity of Serbian polyfloral honeys. **Food Chemistry**, v. 145, p. 599-607, 2014.

\_\_\_\_\_. Chemical markers for the authentication of unifloral *Salvia officinalis* L. honey. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 44, p. 128-138, 2015.

GOMEZ-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, 2006.

GREMBEKA, M.; SZEFER, P. Evaluation of honeys and bee products quality based on their mineral composition using multivariate techniques. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 185, p. 4033-4047.

GHELDOLF, N.; WANG, X.; ENGESETH, N. Buckwheat honey increases serum antioxidant capacity in humans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 1500-1505, 2003.

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

Harborne JB, Baxter H, Moss GP, editores. **Phytochemical dictionary: handbook of bioactive compounds from plants**. 2nd ed. London: Taylor & Francis; 1999.

HAROUN, M. I. et al. Phenolic acids and flavonoids profiles of some turkish honeydew and floral honeys. **Journal of Food Technology**, v. 10, n. 2, p. 39-45, 2012.

IOM - Institute of Medicine. **Dietary reference intakes: the essential guide to nutrient requirements**. Washington (DC): National Academy Press; 2006.

ISLA, M. I. et al. Physico chemical and bioactive properties of honeys from Northwestern Argentina. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, p. 1922-1930, 2011.

JAGANATHAN, S. K. et al. Apoptotic effect of eugenol in human colon cancer cell lines. **Cell Biology International**, v. 35, p. 607-615, 2011.

JERKOVIC, I. et al. Headspace, volatile and semi-volatile organic compounds diversity and radical scavenging activity of ultrasonic solvent extracts from *Amorpha fruticosa* honey samples. **Molecules**, v. 14, p. 2717-2728, 2009.

KAYGUSUZ, H. et al. Characterization of Anatolian honeys based on minerals, bioactive components and principal component analysis. **LWT - Food Science and Technology**, v. 68, p. 273-279, 2016.

KECKES, S. et al. The determination of phenolic profiles of Serbian unifloral honeys using ultra-high-performance liquid chromatography/high resolution accurate mass spectrometry. **Food Chemistry**, v.138, p. 32-40, 2013.

KIM, D. et al. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolics phytochemicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3713-3717, 2002.

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

KUS, P. M. et al. Cornflower (*Centaurea cyanus* L.) honey quality parameters: chromatographic fingerprints, chemical biomarkers, antioxidant capacity and others. **Food Chemistry**, v. 142, p. 12-18, 2014.

KWAKMAN, P. H. S. et al. How honey kills bacteria. **FASEB Journal**, v.24, ed. 7, p. 2576-2582, 2010.

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

\_\_\_\_\_. Evaluation of antioxidant activity and total phenolics of selected Czech honeys. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, p. 52-58, 2010.

LIU, J. et al. Effect of floral sources on the antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory activities of honeys in Taiwan. **Food Chemistry**, v. 139, p. 938-943, 2013.

LUKASIEWICZ, M. KOWALSKI, S.; MAKAREWICA, M. Antimicrobial and antioxidant activity of selected Polish herb honeys. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, p. 547-553, 2015.

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

MAJTAN, J. et al. Fir honeydew honey flavonoids inhibit TNF- $\alpha$ -induced MMP-9 expression in human keratinocytes: a new action of honey in wound healing. **Archives of Dermatological Research**, v. 305, p. 619-627, 2013.

MAYER, A. et al. Treatment of non-healing leg ulcers with honeydew honey. **Journal of Tissue Viability**, v. 23, p. 94-97, 2014.

McLOONE, P.; WARNOCK, M.; FYFE, L. Honey: A realistic antimicrobial for disorders of the skin. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 49, p. 161-167, 2016.

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

MELLEN, M. et al. Antioxidant effect of natural honeys affected by their source and origin. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 65, n. 2, p. 81-85, 2015.

MONIRUZZAMAN, M. et al. Determination of mineral, trace element, and pesticide levels in honey samples originating from different regions of Malaysia compared to Manuka honey. **BioMed Research International**, p. 1-10, 2014.

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

NAYIK, G. A. et al. Discrimination of high altitude Indian honey by chemometric approach according to their antioxidant properties and macro minerals. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, 2016. *Article in press.*

NOONAN, W. P.; NOONAN, C. Legal requirements for “functional food” claims. **Toxicology Letters**, v. 150, p. 19-24, 2004.

NOOR, N. et al. Antitumour and antioxidant potential of some selected Pakistani honeys. **Food Chemistry**, v. 143, p. 362-366, 2014

OELSCHLAEGEL, S. et al. Classification and characterization of Manuka honeys based on phenolic compounds and methylglyoxal. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 7229-7237, 2012.

ORYAN, A.; ALEMZADEH, E.; MOSHIRI, A. Biological properties and therapeutic activities of honey in wound healing: A narrative review and meta-analysis. **Journal of Tissue Viability**, v. 25, p. 98-118, 2016.

PASINI, F. et al. Buckwheat honeys: Screening of composition and properties. **Food Chemistry**, v. 141, p. 2802-2811, 2013.

PASQUINI, B. et al. Geographical characterisation of honeys according to their mineral content and antioxidant activity using a chemometric approach. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 49, p. 1351-1359, 2014.

POHL, P. et al. Different aspects of the elemental analysis of honey by flame atomic absorption and emission spectrometry: a review. **Food Analytical Methods**, v. 5, p. 737-751, 2012.

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

RODIL, R. et al. Determination of synthetic phenolic antioxidants and their metabolites in water samples by downscaled solid-phase extraction, silylation and gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 6428-6435, 2010.

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. C135-C140, 2012.

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

SERGIEL, I.; POHL, P. Determination of the total content of calcium and magnesium and their bioavailability in ripened bee honeys. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, p.7497-7501, 2010.

SERGIEL, I.; POHL, P.; BIESAGA, M. Characterisation of honeys according to their content of phenolic compounds using high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 145, p. 404-408, 2014.

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

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, v. 52, p. 591-611, 1965.

SILICI, S.; SARIOGLU, K.; KARAMAN, K. Determination of polyphenols of some Turkish honeydew and nectar honeys using HPLC-DAD. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 36, p. 2330-2341, 2013.

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

SIMÕES, C. M. O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento.3. ed. rev. Florianópolis: UFSC, 2001.

SIMOVA, S. et al. A rapid differentiation between oak honeydew honey and nectar and other honeydew honeys by NMR spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 134, p. 1706-1710, 2012.

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

SNEDECOR, G. W.; COCHRAN, W. G. **Statistical Methods**. 8. ed. Iowa: State University Press, 1989.

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

STRINGUETA, P. C. et al. Políticas de saúde e alegações de propriedades funcionais e de saúde para alimentos no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p. 181-194, 2007.

SUAREZ-LUQUE, S. et al. Capillary zone electrophoresis method for the simultaneous determination of cations in honey. **Journal of Chromatography A**, v. 1083, p. 193-198, 2005.

TUBEROSO, C. I. G. et al. Biodiversity of *Salix* spp. honeydew and nectar honeys determined by RP-HPLC and evaluation of their antioxidant capacity. **Chemistry & Biodiversity**, v. 8, p. 872-879, 2011.

TURKMEN, N. et al. Effects of prolonged heating on antioxidant activity and colour. **Food Chemistry**, n. 95, p. 653-657, 2006.

TUZEN, M.; SOYLAK, M. Trace heavy metal levels in microwave digested honey samples from Middle Anatolia, Turkey. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 13, n. 4, p. 343-347, 2005.

VANHANEN, L. P.; EMMERTZ, A.; SAVAGE, G. P. Mineral analysis of mono-floral New Zealand honey. **Food Chemistry**, v. 128, p. 236-240, 2011.

WATANABE, K. et al. Anti-influenza viral effects of honey *in vitro*: potent high activity of Manuka honey. **Archives of Medical Research**, v. 45, p. 359-365, 2014.

WILCZYNSKA, A. Phenolic content and antioxidant activity of different types of polish honey – a short report. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 60, n. 4, p. 309-313, 2010.

WILDMAN, R. E. C. **Handbook of nutraceutical and functional foods**. 2<sup>a</sup> ed. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2007.

WONG, A. Y.; LAI, J. M. C.; CHAN, A. W. Regulation of Functional Food for functional food products in the United States. *Journal of Functional Foods*, v. 17, p. 540-551, 2015.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo apresentou uma avaliação inédita em MMB com relação à composição de aminoácidos livres, proteínas, compostos fenólicos e minerais.

Através da determinação de aminoácidos livres por GC-MS foi possível evidenciar que prolina é um aminoácido fornecido exclusivamente pela abelha. Este tipo de mel pôde ser discriminado de acordo com sua origem geográfica, com distribuição similar ao mapa geográfico dos municípios analisados, através das ferramentas estatísticas multivariadas CA e PCA, apresentando-se como uma estratégia analítica para autenticação destes méis e com maiores resultados quando comparado à méis florais e de melato de outros trabalhos.

O uso do perfil de proteoma associado à PCA permitiu a discriminação entre mel floral e de melato oriundos de mesma espécie botânica *Mimosa scabrella* Bentham, utilizando somente o Vol % de *spots* proteicos comuns, apresentando-se como uma ferramenta eficiente para discriminação entre tipos de méis, apesar de não ser realizada identificação de proteínas específicas; além de evidenciar maior número de *spots* proteicos em MMB quando comparado ao MFB.

Através das classes de compostos comumente citadas em méis como antioxidantes (compostos fenólicos) e o potencial sinergismo de classes com importantes funções biológicas (minerais), investigou-se acerca da contribuição para esta atividade, relacionando com ações biológicas e funcionais de méis já evidenciadas cientificamente. Por meio das determinações de TPC, DPPH, FRAP, compostos fenólicos individuais e minerais foi possível evidenciar maiores concentrações de TPC, minerais e de alguns compostos fenólicos individuais, bem como compostos fenólicos de maiores concentrações diferenciados e inéditos quando comparados aos outros méis de melato; a possível contribuição de compostos não fenólicos e o potencial sinergismo dos macroelementos nas capacidades antioxidante *in vitro* avaliadas (DPPH e FRAP). Estes fatores, aliados às diversas ações funcionais avaliadas *in vivo* de méis, incluindo mel de melato, destaca este produto acerca dos princípios bioativos que corroboram para as características benéficas potenciais de propriedades funcionais, podendo-se inferir acerca da inserção de MMB em dietas convencionais com alegação de propriedade funcional na manutenção geral à saúde e redução do risco de doenças, para indivíduos sem restrições com relação à ingestão de carboidratos.

Visando destacar os benefícios específicos de mel de melato de bracatinga e continuar a promover o conhecimento acerca deste importante produto apícola de Santa Catarina em ascensão no mercado brasileiro e internacional, como perspectivas para continuidade deste estudo, sugere-se a identificação de classes de compostos utilizados na discriminação deste tipo de mel e associados às funções biológicas específicas, tais como oligossacarídeos e proteínas, bem como evidenciar cientificamente benefícios relacionados à saúde a partir de testes, especialmente *in vivo*, relacionados à capacidade antioxidante.

## **APÊNDICES**



Apêndice A: Tabela resultados (resultado  $\pm$  desvio padrão) de parâmetros de identidade e qualidade em mel de melato de bracinga.

Amostras	Umidade (%)	Frutose (%)	Glicose (%)	Razão F/G	AR (%)	Condutividade (mS cm <sup>-1</sup> )	RMF (%)
BS1	16,4 $\pm$ 0,03	35,6 $\pm$ 0,87	25,9 $\pm$ 0,68	1,37	61,5 $\pm$ 0,52	1,74 $\pm$ 0,05	QAI
BS2	16,5 $\pm$ 0,23	37,2 $\pm$ 0,67	27,1 $\pm$ 0,35	1,37	64,3 $\pm$ 0,92	1,64 $\pm$ 0,05	QAI
BS3	18,4 $\pm$ 0,02	46,2 $\pm$ 4,25	31,7 $\pm$ 0,10	1,46	77,9 $\pm$ 4,32	1,55 $\pm$ 0,02	1.32 $\pm$ 0.08 <sup>a,b</sup>
BS4	19,2 $\pm$ 0,01	37,5 $\pm$ 2,15	25,4 $\pm$ 1,02	1,47	62,9 $\pm$ 1,19	1,54 $\pm$ 0,02	QAI
BS5	18,0 $\pm$ 0,01	35,1 $\pm$ 2,16	24,6 $\pm$ 3,29	1,43	59,7 $\pm$ 1,86	1,48 $\pm$ 0,01	QAI
Média	17,7 $\pm$ 1,22 <sup>a</sup>	38,3 $\pm$ 4,52 <sup>a</sup>	26,9 $\pm$ 2,81 <sup>a</sup>	1,42 $\pm$ 0,05	65,3 $\pm$ 7,27 <sup>a</sup>	1,59 $\pm$ 0,10 <sup>b</sup>	-
BR1	17,4 $\pm$ 0,03	35,1 $\pm$ 1,41	25,9 $\pm$ 0,87	1,35	61,0 $\pm$ 0,82	1,02 $\pm$ 0,01	QAI
BR2	18,9 $\pm$ 0,02	38,7 $\pm$ 1,30	29,6 $\pm$ 0,83	1,31	68,2 $\pm$ 2,13	0,79 $\pm$ 0,02	QAI
BR3	16,6 $\pm$ 0,25	36,2 $\pm$ 2,63	26,6 $\pm$ 3,18	1,36	62,8 $\pm$ 2,90	0,88 $\pm$ 0,00	0.77 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>
Média	17,6 $\pm$ 1,17 <sup>a</sup>	36,7 $\pm$ 1,84 <sup>a</sup>	27,4 $\pm$ 1,96 <sup>a</sup>	1,34 $\pm$ 0,03	64,0 $\pm$ 3,75 <sup>a</sup>	0,90 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	-
LG1	16,4 $\pm$ 0,19	37,1 $\pm$ 3,30	25,3 $\pm$ 2,69	1,47	62,4 $\pm$ 2,06	1,34 $\pm$ 0,01	QAI
LG2	16,9 $\pm$ 0,01	47,4 $\pm$ 1,02	30,7 $\pm$ 0,91	1,54	78,1 $\pm$ 1,92	1,44 $\pm$ 0,01	QAI
LG3	15,0 $\pm$ 0,02	46,4 $\pm$ 0,50	27,9 $\pm$ 0,35	1,66	74,3 $\pm$ 0,86	1,71 $\pm$ 0,02	1.35 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>
LG4	15,4 $\pm$ 0,02	52,2 $\pm$ 0,53	29,8 $\pm$ 0,70	1,75	82,1 $\pm$ 1,24	1,64 $\pm$ 0,05	QAI
Média	15,9 $\pm$ 0,88 <sup>a</sup>	45,8 $\pm$ 6,31 <sup>a</sup>	28,4 $\pm$ 2,39 <sup>a</sup>	1,60 $\pm$ 0,12	74,2 $\pm$ 8,50 <sup>a</sup>	1,53 $\pm$ 0,17 <sup>a,b</sup>	-
UB1	15,7 $\pm$ 0,02	40,0 $\pm$ 0,24	27,3 $\pm$ 0,19	1,46	67,3 $\pm$ 0,29	1,41 $\pm$ 0,01	QAI
UB2	18,1 $\pm$ 0,02	38,3 $\pm$ 3,55	27,1 $\pm$ 3,56	1,41	65,4 $\pm$ 2,59	1,29 $\pm$ 0,01	QAI
UB3	16,6 $\pm$ 0,01	36,6 $\pm$ 2,41	23,7 $\pm$ 2,50	1,54	60,3 $\pm$ 1,67	1,37 $\pm$ 0,01	1.27 $\pm$ 0.10 <sup>a,b</sup>
Média	16,8 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>	38,3 $\pm$ 1,70 <sup>a</sup>	26,0 $\pm$ 2,02 <sup>a</sup>	1,47 $\pm$ 0,06	64,3 $\pm$ 3,62 <sup>a</sup>	1,36 $\pm$ 0,06 <sup>a,b</sup>	-

Legenda: BS (Bocaina do Sul); BR (Bom Retiro); LG (Lages); UB (Urubici); F/G (razão frutose/glicose); AR (açúcares redutores); RMF (resíduo mineral fixo); 1 a 5 (diferentes apiários); QAI (quantidade insuficiente de amostra); < LQ (< limite de quantificação do método: 0,07 mg L<sup>-1</sup>); <sup>a,b</sup> letras diferentes em mesma coluna: diferença estatística a um nível de significância de 5% de acordo com teste Kruskal-Wallis.

Apêndice A: Tabela de resultados (resultado  $\pm$  desvio padrão) de parâmetros de identidade e qualidade em mel de melato de bracatinga (Conclusão).

Amostras	Umidade (%)	Frutose (%)	Glicose (%)	Razão F/G	AR (%)	Condutividade (mS cm <sup>-1</sup> )	RMF (%)
UP1	18,6 $\pm$ 0,01	33,1 $\pm$ 1,98	24,2 $\pm$ 1,99	1,37	57,4 $\pm$ 3,02	1,47 $\pm$ 0,02	1,06 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>
UP2	16,6 $\pm$ 0,03	37,5 $\pm$ 0,49	28,0 $\pm$ 1,03	1,34	65,6 $\pm$ 0,88	1,29 $\pm$ 0,20	QAI
UP3	16,0 $\pm$ 0,20	36,3 $\pm$ 4,58	27,5 $\pm$ 3,65	1,32	63,8 $\pm$ 4,11	1,40 $\pm$ 0,02	QAI
UP4	18,5 $\pm$ 0,03	44,8 $\pm$ 0,56	32,2 $\pm$ 0,14	1,39	77,0 $\pm$ 0,42	1,40 $\pm$ 0,01	QAI
Média	17,4 $\pm$ 1,32 <sup>a</sup>	37,9 $\pm$ 4,94 <sup>a</sup>	27,9 $\pm$ 3,28 <sup>a</sup>	1,35 $\pm$ 0,03	65,9 $\pm$ 8,16 <sup>a</sup>	1,39 $\pm$ 0,07 <sup>a,b</sup>	-
<sup>c</sup> p S-W	0,49	< 0,05	0,33	1,32	< 0,05	< 0,05	0,19
<sup>c</sup> p K-W	0,19	0,31	0,75	1,39	0,64	< 0,05	< 0,05

Legenda: UP (Urupema); RR (Rio Rufino); 1 a 4 (diferentes apiários); F/G (razão frutose/glicose); AR (açúcares redutores); RMF (resíduo mineral fixo); QAI (quantidade insuficiente de amostra); < LQ (< limite de quantificação do método: 0,07 mg L<sup>-1</sup>); <sup>a,b</sup> letras diferentes em mesma coluna; diferença estatística a um nível de significância de 5% de acordo com teste K-W; <sup>c</sup>p -valor; S-W (Shapiro-Wilk); K-W (Kruskal-Wallis).

Apêndice B: Tabela de resultados (resultado  $\pm$  desvio padrão) de parâmetros de identidade e qualidade em mel de melato de bracatinga.

Amostras	HMF (mg kg <sup>-1</sup> )	Atividade Diastásica (unidades Göethe)	Acidez Livre (mEq kg <sup>-1</sup> )	pH	Cor		
					L*	a*	b*
BS1	< LD	32,4 $\pm$ 1,87	57,0 $\pm$ 0,76	5,25 $\pm$ 0,02	33,1 $\pm$ 0,04	17,1 $\pm$ 0,76	29,6 $\pm$ 1,53
BS2	< LD	41,4 $\pm$ 1,40	58,7 $\pm$ 0,46	5,07 $\pm$ 0,03	28,9 $\pm$ 0,06	15,0 $\pm$ 0,17	21,9 $\pm$ 0,56
BS3	< LD	21,1 $\pm$ 2,18	56,5 $\pm$ 2,32	4,82 $\pm$ 0,11	22,3 $\pm$ 0,13	12,4 $\pm$ 0,01	10,4 $\pm$ 0,25
BS4	< LD	21,3 $\pm$ 1,29	56,3 $\pm$ 3,07	4,84 $\pm$ 0,03	22,2 $\pm$ 0,39	11,6 $\pm$ 0,18	10,3 $\pm$ 0,74
BS5	< LD	25,5 $\pm$ 0,91	61,9 $\pm$ 1,84	4,70 $\pm$ 0,03	24,1 $\pm$ 0,06	15,5 $\pm$ 0,06	13,9 $\pm$ 0,04
Média	< LD	28,3 $\pm$ 8,62 <sup>a</sup>	58,1 $\pm$ 2,33 <sup>ab</sup>	4,94 $\pm$ 0,22 <sup>b</sup>	26,1 $\pm$ 4,76 <sup>a</sup>	14,3 $\pm$ 2,27 <sup>a</sup>	17,2 $\pm$ 8,37 <sup>a</sup>
BR1	< LD	22,5 $\pm$ 3,32	60,7 $\pm$ 1,81	4,26 $\pm$ 0,04	30,6 $\pm$ 0,15	15,5 $\pm$ 0,11	24,3 $\pm$ 0,26
BR2	< LD	28,1 $\pm$ 1,26	57,9 $\pm$ 0,59	4,02 $\pm$ 0,06	33,1 $\pm$ 0,04	17,1 $\pm$ 0,76	29,6 $\pm$ 1,53
BR3	< LD	20,9 $\pm$ 0,80	57,5 $\pm$ 1,03	4,14 $\pm$ 0,06	33,4 $\pm$ 0,05	14,6 $\pm$ 0,04	28,6 $\pm$ 0,33
Média	< LD	23,8 $\pm$ 3,78 <sup>a</sup>	58,7 $\pm$ 1,74 <sup>ab</sup>	4,14 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>	32,4 $\pm$ 1,54 <sup>a</sup>	15,7 $\pm$ 1,27 <sup>ab</sup>	27,5 $\pm$ 2,82 <sup>a</sup>
LG1	< LD	40,4 $\pm$ 5,37	63,8 $\pm$ 1,29	4,48 $\pm$ 0,02	24,9 $\pm$ 0,42	15,5 $\pm$ 0,11	14,0 $\pm$ 0,70
LG2	< LD	25,7 $\pm$ 2,49	50,4 $\pm$ 1,68	4,79 $\pm$ 0,01	29,3 $\pm$ 0,12	19,6 $\pm$ 0,03	22,4 $\pm$ 0,11
LG3	< LD	27,5 $\pm$ 0,59	50,8 $\pm$ 0,30	4,90 $\pm$ 0,01	25,5 $\pm$ 0,05	17,2 $\pm$ 0,06	16,1 $\pm$ 0,10
LG4	< LD	31,9 $\pm$ 0,50	52,9 $\pm$ 1,38	4,94 $\pm$ 0,11	25,9 $\pm$ 0,19	17,5 $\pm$ 0,10	17,2 $\pm$ 0,08
Média	< LD	31,4 $\pm$ 6,55 <sup>a</sup>	54,5 $\pm$ 6,31 <sup>ab</sup>	4,78 $\pm$ 0,21 <sup>ab</sup>	26,4 $\pm$ 1,98 <sup>a</sup>	17,4 $\pm$ 1,68 <sup>ab</sup>	17,4 $\pm$ 3,57 <sup>a</sup>
UB1	< LD	15,5 $\pm$ 0,28	55,2 $\pm$ 2,47	4,96 $\pm$ 0,06	28,7 $\pm$ 0,10	18,4 $\pm$ 0,03	21,6 $\pm$ 0,60
UB2	< LD	23,7 $\pm$ 1,45	55,4 $\pm$ 2,88	4,62 $\pm$ 0,05	27,6 $\pm$ 0,02	17,7 $\pm$ 0,13	21,6 $\pm$ 1,35
UB3	< LD	25,6 $\pm$ 1,95	55,8 $\pm$ 5,45	4,75 $\pm$ 0,17	27,6 $\pm$ 0,02	18,1 $\pm$ 0,05	19,5 $\pm$ 0,01
Média	< LD	21,6 $\pm$ 5,37 <sup>a</sup>	54,6 $\pm$ 1,80 <sup>a</sup>	4,78 $\pm$ 0,17 <sup>ab</sup>	27,9 $\pm$ 0,63 <sup>a</sup>	18,1 $\pm$ 0,35 <sup>ab</sup>	20,9 $\pm$ 1,21 <sup>a</sup>

Legenda: BS (Bocaina do Sul); BR (Bom Retiro); LG (Lages); UB (Urubici); 1 a 5 (diferentes apiários); 5-HMF (5-hidroxiacetilfurfural); L\*: luminosidade; a\*: coordenada vermelho/verde (+ a indica vermelho e - a indica verde); b\*: coordenada amarelo/azul (+ b indica amarelo e - b indica azul); < LD (< limite de detecção do método: 0,09 mg L<sup>-1</sup>); <sup>a,b</sup> letras diferentes em mesma coluna: diferentes estatisticamente a um nível de significância de 5% de acordo com teste Kruskal-Wallis.

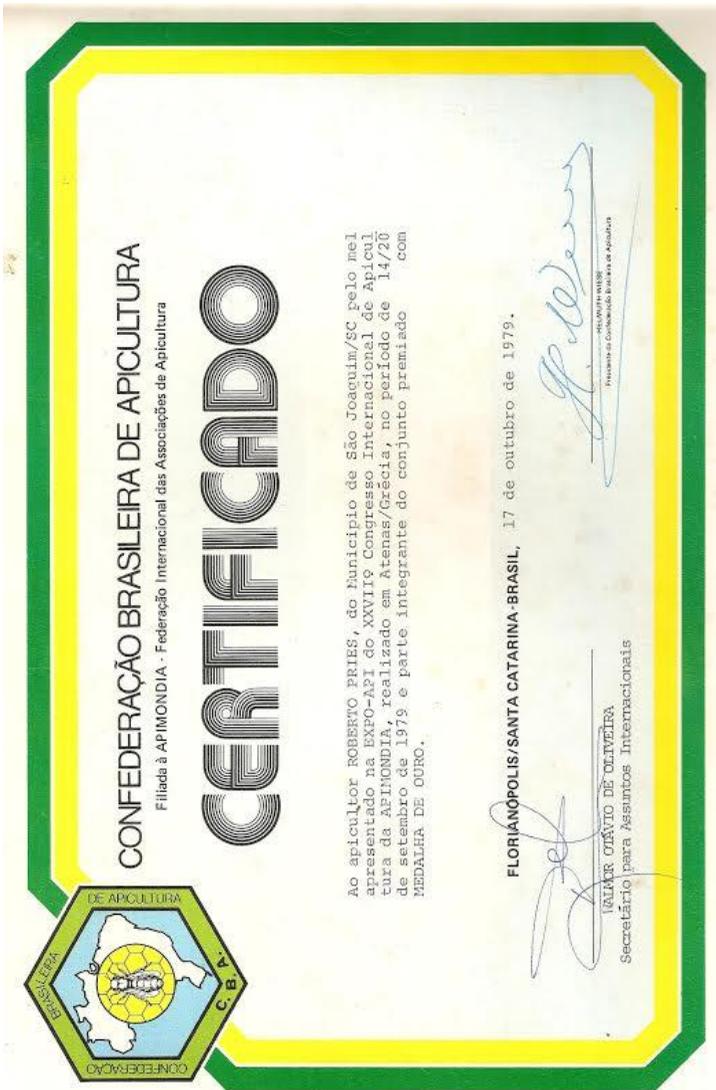
Apêndice B: Tabela de resultados (resultado  $\pm$  desvio padrão) de parâmetros de identidade e qualidade em mel de melato de bractatinga (Conclusão).

Amostras	5-HMF (mg kg <sup>-1</sup> )	Atividade Diastásica (unidades Göethe)	Acidez Livre (mEq kg <sup>-1</sup> )	pH	Cor		
					L*	a* b*	
UPI	< LD	23,2 $\pm$ 1,66	70,1 $\pm$ 2,15	4,58 $\pm$ 0,01	29,3 $\pm$ 0,03	19,6 $\pm$ 0,18	23,1 $\pm$ 0,21
UP2	< LD	37,9 $\pm$ 0,93	64,3 $\pm$ 1,06	4,55 $\pm$ 0,03	29,3 $\pm$ 0,42	19,1 $\pm$ 0,17	22,4 $\pm$ 0,70
UP3	< LD	30,4 $\pm$ 1,70	64,5 $\pm$ 1,24	4,83 $\pm$ 0,01	28,9 $\pm$ 0,09	19,0 $\pm$ 0,13	22,3 $\pm$ 0,11
UP4	< LD	28,9 $\pm$ 0,78	60,0 $\pm$ 0,72	4,27 $\pm$ 0,01	25,9 $\pm$ 0,11	17,3 $\pm$ 0,19	16,3 $\pm$ 0,16
Média	< LD	30,1 $\pm$ 6,05 <sup>a</sup>	64,7 $\pm$ 4,14 <sup>b</sup>	4,56 $\pm$ 0,23 <sup>a,b</sup>	28,3 $\pm$ 1,64 <sup>a</sup>	18,7 $\pm$ 1,00 <sup>b</sup>	21,0 $\pm$ 3,17 <sup>a</sup>
<sup>c</sup> p S-W	-	0,27	0,78	0,70	0,39	0,16	< 0,05
<sup>c</sup> p K-W	-	0,33	< 0,05	< 0,05	0,10	< 0,05	0,11

Legenda: UP (Urupema); RR (Rio Rufino); 1 a 4 (diferentes apiários); 5-HMF (5-hidroxiacetilfurfural); L\*: luminosidade; a\*: coordenada vermelho/verde (+ a indica vermelho e - a indica verde); b\*: coordenada amarelo/azul (+ b indica amarelo e - b indica azul); < LD (< limite de detecção do método: 0,09 mg L<sup>-1</sup>); <sup>a,b</sup> letras diferentes em mesma coluna: diferentes estatisticamente a um nível de significância de 5% de acordo com teste K-W; <sup>c</sup>p-valor; S-W (Shapiro-Wilk); K-W (Kruskal-Wallis).

## **ANEXOS**

Anexo A: Certificado da Confederação Brasileira de Apicultura pelo prêmio "Melhor mel do mundo" ao município de São Joaquim: Atenas, 1979.



Anexo B: Prêmio "Melhor mel do mundo" ao município de São Joaquim: Atenas, 1979.

