

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
Pró-Reitoria de Pesquisa e de Pós-graduação
Programa de Pós-graduação *Strictu senso*
Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos

DÉBORA MARIA BORSATO

**AVALIAÇÃO DE MÉIS COM INDICAÇÃO MONOFLORAL,
COMERCIALIZADOS NA REGIÃO DOS CAMPOS GERAIS – PR**

PONTA GROSSA
2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
Pró-Reitoria de Pesquisa e de Pós-graduação
Programa de Pós-graduação *Strictu sensu*
Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos

DÉBORA MARIA BORSATO

**AVALIAÇÃO DE MÉIS COM INDICAÇÃO MONOFLORAL,
COMERCIALIZADOS NA REGIÃO DOS CAMPOS GERAIS – PR**

Dissertação apresentada à banca examinadora, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, no Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mareci Mendes de Almeida

PONTA GROSSA
2008

Ficha Catalográfica Elaborada pelo Setor de Processos Técnicos BICEN/UEPG

B738a Borsato, Débora Maria
Avaliação de méis com indicação monofloral, comercializados na região dos Campos Gerais – PR. Ponta Grossa, 2008. 125f.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Orientadora: Profa. Dra. Mareci Mendes de Almeida.

1. Mel. 2. Análise polínica. 3. Atividade antioxidante. 4. Atividade antimicrobiana. I. Almeida, Mareci Mendes de. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. III. T.

CDD : 638.1

TERMO DE APROVAÇÃO

DÉBORA MARIA BORSATO

AVALIAÇÃO DE MÉIS COM INDICAÇÃO MONOFLORAL, COMERCIALIZADOS NA REGIÃO DOS CAMPOS GERAIS – PR

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, no Curso de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

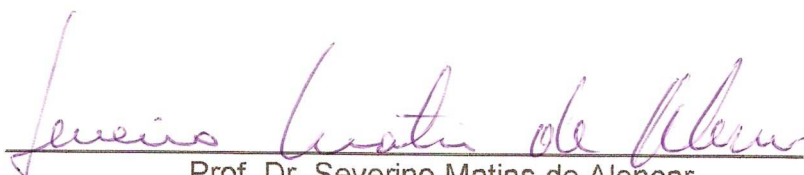
Ponta Grossa, 30 de abril de 2008.



Prof. Dra. Mareci Mendes de Almeida
UEPG/PR



Prof. Dr. Paulo Vitor Farago
UEPG/PR



Prof. Dr. Severino Matias de Alencar
ESALQ/USP

Aos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização da presente pesquisa.

AGRADECIMENTOS

A Deus, amor infinito, que me acompanha em todos os meus passos.

A minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Mareci Mendes de Almeida, que conduziu o presente trabalho com muita competência e serenidade, demonstrando muita sabedoria em suas palavras e em suas atitudes.

Aos meus pais, Tânia e César, por tudo o que fizeram e ainda fazem por mim.

Ao meu irmão, Aurélio, por ser meu melhor amigo.

Ao meu namorado, Luiz, pelo amor, apoio, companheirismo e compreensão em todos os momentos.

A minha conselheira, Ignês, que me incentivou a nunca desistir, com seu exemplo de fé, coragem, dedicação, força, superação, persistência e amor.

As minhas preciosas amigas Ana Mery, Cleoci (Kika), Cristiane, Danianni, Lúcia, Leila, Marina e Samanta, que enriqueceram a minha vida.

Às estagiárias, Juliana, Laís e Michele, pelo amor com que se dedicaram a me ajudar.

Ao Prof. Dr. Paulo Vitor Farago, professor brilhante e ser humano admirável, que muito contribuiu para a concretização da presente pesquisa.

Ao Prof. Dr. Severino Matias de Alencar e a toda a equipe do Laboratório de Bioquímica e Análise Instrumental da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo, que prontamente nos auxiliaram durante a execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Alessandro Nogueira, pelas informações que ajudaram no desenvolvimento do presente estudo.

À Prof^a. Dr^a. Eliana Beleski Borba Carneiro, pelas sugestões que contribuíram para a elaboração do presente trabalho.

Ao Prof. Dr. Gilvan Wosiacki, por seu exemplo de amor à profissão.

Aos demais professores, que colaboraram indiretamente com a presente pesquisa.

Aos apicultores, que gentilmente cederam as amostras de mel.

À Denise e à Danianni, pelo apoio durante todo o mestrado.

À Rita, pelo modo carinhoso com que se dedica ao seu trabalho nos laboratórios.

A José Raul Tavares, pelo apoio e compreensão.

A todos os alunos e colaboradores do Grupo de Estudos Pré-vestibular São José, pela oportunidade de ensinar, aprendendo.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa de estudo.

As abelhas são a alma do verão, o relógio dos momentos de abundância, a asa ligeira dos perfumes que se difundem, a inteligência das irradiações que pairam, o murmúrio das claridades que estremecem, o canto da atmosfera que se estira tranqüilamente; e o seu vôo é o sinal visível, a nota convicta e musical das pequeninas e inumeráveis alegrias, que nascem do calor e vivem na luz. Fazem compreender a voz mais íntima das boas horas da natureza. A quem as tem conhecido, a quem as tem amado, um verão sem abelhas parece tão desgraçado e tão imperfeito como se não tivesse aves nem flores.

(Maurice Maeterlinck)

RESUMO

O mel é um alimento muito apreciado, em função do seu sabor característico e do seu considerável valor nutritivo. Sua qualidade nutricional, devida à presença de vitaminas e minerais, seu valor energético elevado, suas propriedades medicinais, como a ação antioxidante e a atividade anti-séptica, e suas propriedades sensoriais têm atraído inúmeros consumidores. O preço e a qualidade do mel estão, normalmente, relacionados com a sua origem botânica ou floral e com a sua composição química. O objetivo deste trabalho foi analisar a origem floral e avaliar a atividade antioxidante e a ação antimicrobiana de méis (n=13) declarados como monoflorais, comercializados na região dos Campos Gerais do Paraná. Oito das amostras analisadas atenderam às especificações físico-químicas estabelecidas pela legislação brasileira e cinco amostras apresentaram, para o índice de diastase, valores inferiores aos exigidos. A origem botânica foi determinada pela análise polínica, classificando seis amostras como mel monofloral, uma amostra como bifloral e seis amostras como heteroflorais. Em todas as amostras de méis estudadas foram encontrados teores de fenólicos totais, em mg CE.100 g⁻¹ de mel, variando de 30,40 (± 0,74) a 176,07 (± 2,53). A atividade antioxidante, determinada nos extratos de fenólicos do mel, diluídos a 10 % (V/V), variou de 31,66 (± 1,11) a 75,23 % (± 0,76). Foi encontrada uma correlação de 0,7021 entre esses dois parâmetros. A atividade antimicrobiana revelou um comportamento variável, tanto no que se refere à sensibilidade dos microrganismos (*Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*), quanto ao poder antimicrobiano das amostras testadas.

Palavras-chave: mel, análise polínica, atividade antioxidante e atividade antimicrobiana

ABSTRACT

Honey is a very traditional food. In addition, several customers have been daily using a large number of honeys due to their particular nutritional quality (e.g. vitamins and minerals), high energy values, their medicinal uses (as antioxidant and antiseptic properties) and their sensorial features. Moreover some aspects of the commercially available honeys as price and quality are usually related to their botanical origin or chemical compositions. The aim of this work was to perform the botanical authentication and to investigate the antioxidant and antimicrobial activities of samples (n=13) labeled as monofloral honeys from the region of Campos Gerais, Paraná, Brazil. Eight samples analyzed were according to the Brazilian regulation and five achieved low values for the required diastase index. The botanical origin was reported by the pollen analysis. Six samples were regarded as monofloral honeys. The other honey samples were of bifloral (n=1) or heterofloral (n=6) origin. All analyzed honeys presented total phenolic in mg EC.100g⁻¹ of honey, varying between 30,40 (± 0,74) and 176,07 (± 2,53). The antioxidant activity in phenolic extract (10%) varied between 31,66 (± 1,11) and 75,23 % (± 0,76), with a correlation of 0.7021 between these parameters. When sensibility of the microorganisms (*Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*) and antimicrobial activity were studied, an unrelated behavior was verified.

Keywords: honey, pollen analysis, antioxidant activity and antimicrobial activity

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fluxograma de processamento do mel.....	21
Figura 2 - Redução do 1,1-difenil-2-picril-hidrazila na presença de um antioxidante	40
Figura 3 - Estrutura química dos flavonóides	43
Figura 4 - Núcleo básico hidroxifenilpropenóico dos ácidos fenólicos.....	45
Figura 5 - Estrutura química do hidroximetilfurfural	76
Figura 6 - Microscopia ótica das amostras 1 a 6	89
Figura 7 - Microscopia ótica das amostras 7 a 13	90
Figura 8 - Correlação entre o conteúdo de fenólicos totais e a atividade antioxidante das 13 amostras de mel com indicação monofloral, comercializadas na região dos Campos Gerais – PR	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Especificações físico-químicas estabelecidas pela legislação brasileira para a análise de méis	23
Tabela 2 - Métodos para a determinação da origem botânica do mel	36
Tabela 3 - Métodos utilizados para a determinação dos parâmetros físico-químicos em méis	57
Tabela 4 - Resultados das análises de umidade, açúcares redutores, sacarose aparente, cinzas e pH, para as 13 amostras de mel com indicação monofloral, comercializadas na região dos Campos Gerais – PR	63
Tabela 5 - Resultados das análises de acidez, índice de diastase, HMF, cor e classificação de origem, segundo Kirkwood, para as 13 amostras de mel com indicação monofloral, comercializadas na região dos Campos Gerais – PR.....	64
Tabela 6 - Padrões internacionais para açúcares redutores e sacarose aparente em méis	67
Tabela 7 - Espectro polínico das 13 amostras de mel com indicação monofloral, comercializadas na região dos Campos Gerais – PR	82
Tabela 8 - Origem botânica das amostras de mel analisadas, conforme declaração dos produtores e resultados da análise polínica.....	91
Tabela 9 - Resultados do teor de fenólicos totais (mg CE.100 g ⁻¹ de mel), para as 13 amostras de mel com indicação monofloral, comercializadas na região dos Campos Gerais – PR	94
Tabela 10 - Resultados da análise da atividade antioxidante (AA), em porcentagem, para as 13 amostras de mel com indicação monofloral, comercializadas na região dos Campos Gerais – PR	95

Tabela 11 - Potencial antimicrobiano das 13 amostras de mel, com indicação monofloral, comercializadas na região dos Campos Gerais – PR	100
--	-----

LISTA DE SIGLAS

AA	Atividade antioxidante
ADEA	Análise da diluição de extrato de aroma
A _w	Atividade de água
BHA	Butil-hidroxianisol
BHT	Butil-hidroxitolueno
CE	Catequina equivalente
CG	Cromatografia gasosa
CG/DIC	Cromatografia gasosa com detector de ionização em chama
CG-O	Cromatografia gasosa com acessório de <i>sniffing</i>
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DPPH	1,1-difenil-2-picril-hidrazila
ELISA	Imunoensaio enzimático
EM	Espectrometria de massas
EFM	Extrato de fenólicos do mel
GAE	Ácido gálico equivalente
HMF	Hidroximetilfurfural
IC ₅₀	Concentração que causa 50 % da inibição
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> metilicina-resistente
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> metilicina-sensível
PEG	Polietilenoglicol
PVP	Polivinilpirrolidona
SOD	Superóxido desmutase
<i>t</i> -BHQ	<i>t</i> -butil-hidroquinona
SD	Estimativa do desvio padrão

UFC

Unidades formadoras de colônias

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	O MEL	19
2.1.2	Qualidade físico-química e microbiológica do mel.....	22
2.2	ANÁLISE POLÍNICA.....	25
2.2.1	Flora apícola da região dos Campos Gerais – PR.....	26
2.2.2	Melissopalinologia.....	27
2.2.2.1	Métodos alternativos à melissopalinologia.....	35
2.3	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	38
2.4	ANTIOXIDANTES NATURAIS.....	41
2.4.1	Compostos fenólicos.....	42
2.4.1.1	Flavonóides.....	43
2.4.1.2	Ácidos Fenólicos.....	45
2.4.1.3	Tocoferóis.....	46
2.4.2	Identificação e quantificação de compostos fenólicos em méis.....	47
2.5	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	49
3	OBJETIVOS.....	55
3.1	OBJETIVO GERAL	55
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	55
4	MATERIAL E MÉTODOS	56
4.1	MATERIAL.....	56
4.2	MÉTODOS	56
4.2.1	Análises físico-químicas	57

4.2.2	Análise polínica	57
4.2.3	Fenólicos totais e atividade antioxidante	58
4.2.3.1	Método de extração	58
4.2.3.2	Polifênois totais	59
4.2.3.3	Avaliação da atividade sequestrante do radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazila (DPPH)	59
4.2.4	Atividade antimicrobiana	60
4.2.4.1	Preparo do inóculo	60
4.2.4.2	Preparo do meio contendo o mel	61
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.1	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	63
5.1.1	Umidade	64
5.1.2	Açúcares redutores e sacarose aparente	66
5.1.3	Cinzas	69
5.1.4	Acidez	70
5.1.5	pH	71
5.1.6	Índice de diastase	73
5.1.7	Hidroximetilfurfural	76
5.1.8	Cor	78
5.1.9	Classificação em mel floral ou mel de melato	79
5.2	ANÁLISE POLÍNICA	80
5.3	FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	94
5.4	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	99
6	CONCLUSÃO	105
	REFERÊNCIAS	106

1 INTRODUÇÃO

A apicultura destaca-se como uma atividade de benefícios sociais, econômicos e ecológicos. No Brasil, essa atividade está em grande expansão, deixando de ser artesanal e de estar voltada apenas para o mercado interno. Este crescimento se deve, principalmente, às características da abelha africanizada, à localização do Brasil (em região predominantemente tropical) e aos investimentos nos setores de pesquisa, tecnologia e manejo. Em todo o país, milhares de empregos são gerados nos serviços de manejo das abelhas, de fabricação e de comércio de equipamentos, bem como no beneficiamento dos produtos e na polinização de culturas agrícolas.

O mel é um alimento muito apreciado, em função do seu sabor característico e do seu considerável valor nutritivo. Sua qualidade nutricional, devida à presença de vitaminas e minerais, seu valor energético elevado, suas propriedades medicinais, como a ação antioxidante e a atividade anti-séptica, e suas propriedades sensoriais têm atraído vários consumidores. O seu preço e a sua qualidade estão, normalmente, relacionados com sua origem botânica ou floral e sua composição química.

As propriedades medicinais do mel são reconhecidas desde os primórdios da civilização. Referências sobre sua utilização foram encontradas em papiros egípcios, textos gregos e romanos, como também, na Bíblia e no Al-Corão. Os registros, que mencionam a utilização desse produto como medicinal, incluem o tratamento de anemias, úlceras gástricas, ferimentos e queimaduras.

O objetivo deste trabalho foi determinar a origem floral de amostras de méis, investigando se há concordância com a florada declarada pelo produtor, avaliar os parâmetros físico-químicos, a atividade antioxidante e a ação antimicrobiana dessas amostras, provenientes da região dos Campos Gerais – PR. Também, visou divulgar ao setor produtivo

e ao setor acadêmico os resultados encontrados, considerando a ampla utilização e comercialização do mel.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O MEL

O mel é um produto viscoso, adocicado e, geralmente, de aroma agradável. Apreciado desde a Grécia antiga, foi utilizado pelo homem como alimento, medicamento e oferenda aos deuses. Existem relatos da utilização do mel como medicamento em papiros egípcios, de cerca de 1500 a.C., onde o mel estava na composição de centenas de prescrições para uso externo e interno. Na Babilônia e na Grécia antiga, o mel foi ainda empregado para conservar os corpos de reis e generais mortos em batalha, até que fossem transportados para o funeral. No Egito antigo, foi usado como oferenda em cerimônias religiosas, sendo que os israelitas destinavam o mel de suas primeiras colheitas para presentear a Deus (CRANE, 1996; MOLAN, 1996; O MEL..., 2003; SATO; MIYATA, 2000).

Durante muito tempo, o mel foi o único edulcorante utilizado pelo homem, até ser substituído, gradualmente, por açúcares refinados e manufaturados, como os extraídos da cana-de-açúcar e da beterraba (COUTO; COUTO, 1996; O MEL...,2003; PEREIRA et al., 2006).

Há diversos tipos de méis, produzidos, principalmente, pelas abelhas do gênero *Apis*. A *Apis mellifera* é encontrada na Europa, África e Oriente Médio; a *Apis cerana* é uma abelha de colméias nativas do sul da Ásia; a *Apis dorsata* e a *Apis florea* são espécies nativas dos trópicos da Ásia e caracterizam-se por ter como ninho um favo único ao ar livre. Mas, existem outras espécies que produzem diferentes tipos de méis, como as abelhas sem ferrão (meliponídeos, presentes nos trópicos de todos os continentes), que somam cerca de 500 taxa ao todo. Há também, espécies de vespas, na América do Sul tropical, e formigas, em algumas áreas secas da Austrália e da América do Norte, que produzem mel, mas não produzem cera (CRANE, 1983, 1996, 2004).

O mel é produzido, pelas abelhas melíferas, a partir do néctar das flores ou das secreções procedentes de partes vivas de plantas ou ainda, de secreções de insetos sugadores de plantas que permanecem sobre as partes vivas desses vegetais. As abelhas recolhem, transformam, combinando esses materiais com substâncias específicas próprias, armazenam e deixam maturar nos favos da colméia (BRASIL, 2000; CRANE, 1983; SATO; MIYATA, 2000).

A partir do néctar, as abelhas produzem os méis florais, os quais são os mais apreciados e alcançam os maiores preços no mercado. O mel pode ser classificado, a partir da sua origem floral, em monofloral, quando a maior parte do néctar é coletada de uma única espécie vegetal; polifloral, quando mais de uma espécie botânica contribui com o néctar; e silvestre, se produzido a partir de espécies nativas. Os méis florais são caracterizados por meio da análise microscópica, que possibilita a identificação e a quantificação dos grãos de pólen (ANDRADE E SILVA, 2003; COUTO; COUTO, 1996; MOREIRA; DE MARIA, 2001).

O mel extrafloral é produzido a partir de exsudatos de plantas ou de resíduos de frutas ou ainda, de outras fontes de matéria-prima (MOREIRA; DE MARIA, 2001). O mel de melato é obtido a partir de secreções provenientes das partes vivas das plantas ou de secreções de insetos sugadores de plantas (BRASIL, 2000). Os méis de melato são classificados em 2 tipos: aqueles com alto teor de erlose, que não sofrem granulação, e os de alto teor de melezitose, que são sujeitos à granulação (COUTO; COUTO, 1996; CRANE, 1983; MOREIRA; DE MARIA, 2001).

Na composição do mel são encontradas, no mínimo, 181 substâncias (LOUVEAUX, 1985; SATO; MIYATA, 2000), entre as quais: açúcares, com predominância de glucose e frutose, água, uma mistura complexa de outros carboidratos, enzimas, aminoácidos, ácidos orgânicos, minerais, substâncias aromáticas, pigmentos e grãos de pólen. Adicionalmente, o

mel pode conter cera de abelhas procedente do processo de extração (BRASIL, 2000). Sua composição pode ser variável, dependendo da origem floral, da região geográfica, das condições climáticas e do processamento (ARRÁEZ-ROMÁN et al., 2006).

2.1.1 Processamento do mel

O mel é um produto sazonal, sendo sua colheita realizada no período compreendido entre agosto e dezembro. Seu processamento (Figura 1) planejado possibilita que o produto seja armazenado e comercializado durante o ano inteiro. Ele deve ser colhido quando se apresentar maduro, ou seja, com 18 % de umidade e quando os favos estiverem bem operculados (com os alvéolos fechados), pois nessas condições não haverá fermentação (BARANCELLI, [198-]; INSTITUTO..., 2004).

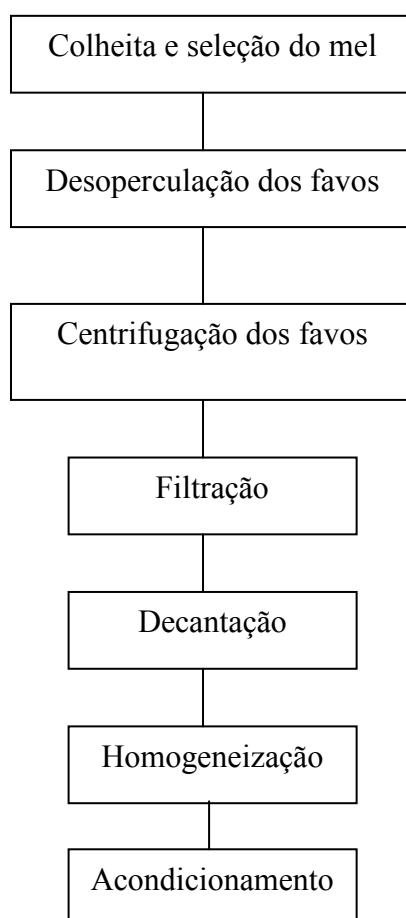


Figura 1 - Fluxograma de processamento do mel

Antes de iniciar a extração do mel, há a necessidade de que todas as abelhas das melgueiras sejam retiradas. Com o auxílio do garfo ou da faca desoperculadora, faz-se a desoperculação dos favos. Nessa etapa retiram-se os opérculos, cuidando para não danificar os favos. Esse trabalho é desenvolvido sobre uma mesa desoperculadora, para aproveitamento da cera e de parte do mel. Em seguida, procede-se a centrifugação, onde o mel, que está armazenado nos alvéolos, é extraído, sem a destruição dos favos. Depois, através da filtração, retira-se parte das impurezas do mel. O processo prossegue com a decantação, efetuada em depósitos verticais ou horizontais, onde o mel recém-centrifugado deve descansar por um período de 24 a 48 h para a completa separação das impurezas presentes no produto. Após, realiza-se a homogeneização. Finalmente, acondiciona-se o mel em potes, bisnagas e garrafas, por meio de uma envasadora acoplada ao tanque de envase (tanque homogeneizador) (ALZUGARAY; ALZUGARAY, 1986; BARANCELLI, [198-]; INSTITUTO..., 2004).

2.1.2 Qualidade físico-química e microbiológica do mel

Os requisitos de qualidade físico-química do mel foram estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, na Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000, a qual constitui o Regulamento de Identidade e Qualidade do Mel (Tabela 1). Esse regulamento impede a adição de açúcares e/ou outras substâncias que alterem a composição original do mel. Quanto às características sensoriais, o mel pode ter cor variável, de quase incolor a pardo-escura; deve ter sabor e aroma característicos conforme a sua origem e, de acordo como o seu estado físico; pode apresentar consistência variável. Quanto às características físico-químicas, para o critério de maturidade, os parâmetros a serem avaliados se referem às análises de açúcares redutores, umidade e sacarose aparente; para satisfazer a condição de pureza, os méis devem apresentar grãos de pólen e precisam atender às

especificações para os teores de sólidos insolúveis em água e minerais (cinzas). Além disso, para avaliar suas condições de deterioração, é necessário averiguar os teores de acidez livre, hidroximetilfurfural (HMF) e atividade diastásica. O mel não deve ter indícios de fermentação e deve ser acondicionado em embalagem adequada para alimentos, que mantenha as condições previstas para o armazenamento e que confira uma proteção elevada contra a contaminação. O mel em favos e o mel com pedaços de favos só devem ser acondicionados nas embalagens destinadas para sua venda direta ao público (BRASIL, 2000).

Tabela 1 - Especificações físico-químicas estabelecidas pela legislação brasileira para a análise de méis

Parâmetro	Especificações	
	Mel Floral	Mel de Melato
Umidade (%)	Máximo 20	Máximo 20
Açúcares redutores (%)	Mínimo 65	Mínimo 60
Sacarose aparente (%)	Máximo 6	Máximo 15
Sólidos insolúveis (%)	Máximo 0,1	Máximo 0,1
Minerais (%)	Máximo 0,6	Máximo 1,2
Acidez (mEq.kg ⁻¹)	Máximo 50	Máximo 50
Hidroximetilfurfural (mg.kg ⁻¹)	Máximo 60	Máximo 60
Índice de diastase (escala Göthe)	Mínimo 8 ou 3, se HMF inferior a 15	

Fonte: Brasil, 2000

O teor de umidade é o critério de qualidade que determina a capacidade do mel de se manter estável e livre de fermentação. Quanto maior a umidade, maior a probabilidade de fermentação do mel durante o seu armazenamento (BOGDANOV et al., 1999; BOGDANOV; MARTIN; LÜLLMANN, 1997; CRANE, 1983). Todo mel com umidade superior a 18 % está sujeito à fermentação (NORONHA, 1997).

A colheita prematura do mel, momento em que a sacarose do néctar ainda não foi totalmente convertida em glucose e frutose, pode resultar em teores de sacarose acima do limite estabelecido pela legislação. Entretanto, alguns méis podem não indicar teores elevados de sacarose aparente, mesmo quando colhidos prematuramente, pois néctares de origens

florais diferentes possuem diferenças em sua composição química de carboidratos (VARGAS, 2006).

A porcentagem de cinzas presente no mel expressa a presença quantitativa do material mineral e se constitui em um parâmetro amplamente utilizado nas determinações que visam verificar a qualidade do mel (MARCHINI, MORETI; OTSUK, 2005). O conteúdo de cinzas no mel é, geralmente, pequeno e depende da composição do néctar das plantas que contribuem para a formação do mel. A quantidade dos minerais existentes nas cinzas também é influenciada pelo tipo de solo em que a planta nectarífera tem seu crescimento (FELSNER et al., 2004).

A acidez do mel se origina dos ácidos orgânicos, provenientes de diferentes fontes de néctar, da ação da enzima glucose-oxidase, que forma o ácido glucônico, da ação de bactérias, durante a maturação do produto e, ainda, pode estar relacionada às quantidades de minerais presentes no mel (HORN et al., 1997).

O hidroximetilfurfural (HMF) pode estar presente naturalmente no mel, mas seu nível elevado é um indicativo de superaquecimento, longa estocagem ou falsificação (BOGDANOV et al., 1999; FALLICO et al., 2004; WHITE JÚNIOR, 1994).

A atividade diastásica decresce com o armazenamento e com o aquecimento do mel (BOGDANOV; RUOFF; PERSANO-ODDO, 2004), sendo um parâmetro importante na avaliação da qualidade do produto. O aquecimento diminui o número de substâncias termolábeis e aromáticas presentes no mel. Essa perda é proporcional à temperatura e ao tempo de aquecimento (BOGDANOV; MARTIN; LÜLLMANN, 1997).

A legislação brasileira também estabelece que a cor dos méis pode variar de quase incolor a pardo-escuro (BRASIL, 2000), sendo este um parâmetro comercialmente importante, pois em países com grande consumo de mel, prefere-se méis de cores mais claras (CRANE, 1983).

Nas legislações nacionais e internacionais vigentes, não há a exigência da realização de análises microbiológicas para o mel. São estabelecidas, apenas, práticas de higiene na manipulação do produto (BRASIL, 2000, 2001; CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2001; MERCOSUL, 1999).

2.2 ANÁLISE POLÍNICA

Desde a antigüidade, o pólen foi conhecido e utilizado pelo homem. Os assírios estabeleceram sua relação com a reprodução e empregavam técnicas de polinização em seus rituais religiosos (MIRANDA; ANDRADE, 1990).

A palavra pólen foi usada por Linné como termo botânico (do latim *pollen*, que significa pó muito fino). Entretanto, apenas em 1944, Hide e Williams definiram palinologia como “estudo do pólen e outros esporos, sua dispersão e aplicações” (MIRANDA; ANDRADE, 1990).

Os fundamentos da palinologia estão baseados em quatro características dos grãos de pólen e esporos: sua grande resistência à degradação, o que facilita a fossilização; o pequeno tamanho (geralmente menor que 200 μm), que favorece o transporte e o depósito em partículas sedimentares; a complexidade morfológica, que permite sua caracterização; e a produção em grande número, que permite levantamentos estatísticos válidos. Quando o estudo do pólen é realizado em méis, utiliza-se o termo melissopalinologia (MIRANDA; ANDRADE, 1990).

A análise polínica é de grande importância para o controle da qualidade de méis, que podem incluir numerosos grãos de pólen e elementos de mel de melato, os quais, conjuntamente, podem fornecer uma “impressão digital” do ambiente do qual o mel é proveniente (VON DER OHE; PERSANO-ODDO; PIANA, 2004).

2.2.1 Flora apícola da região dos Campos Gerais – PR

A região dos Campos Gerais situa-se sobre o segundo planalto paranaense. Sua paisagem natural é formada por campos limpos, matas de galerias e capões isolados de floresta ombrófila mista, onde se encontra a presença dominante da *Araucaria angustifolia* (Bertol.) O. Kuntze, vulgarmente conhecida como pinheiro-araucária (DICIONÁRIO..., 2006; MELO, 2003).

A flora dos Campos Gerais é abundante e diversificada. As plantas apícolas que se destacam nessa região, dentre muitas outras, são as seguintes: *Senecio brasiliensis* (Spreng.) Less. (maria-mole), *Baccharis* spp. (carqueja, vassoura) e *Vernonia* sp. (assa-peixe), nos campos secos; *Erythrina crista-galli* L. (corticeira-do-banhado), nos campos úmidos; *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (barbatimão), *Austroplenkia populnea* (Reissek) Lundell (marmeleiro-do-campo) e *Caryocar brasiliense* Cambess. (pequi), nos cerrados (municípios de Jaguariaíva e Sengés e no Parque Estadual do Guartelá); *Lithrea molleoides* (Vell.) Engl. (aroeira) e *Schinus terebinthifolia* Raddi (aroeira-vermelha), nos capões; *Luehea divaricata* Mart. (açoita-cavalo), *Piptadenia communis* Benth. (angico-branco), *Inga uruguensis* Hook. & Arn. (ingá), *Actinostemon concolor* (Spreng.) Müll. Arg. (laranjeira-do-mato), *S. terebinthifolia* (aroeira-vermelha), *Myrcia multiflora* (Lam.) DC. e *Myrcia arborescens* O. Berg (cambuí), nas matas de galeria; *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. (erva-mate), *Mimosa scabrella* Benth. (bracatinga) e *Ocotea puberula* (Rich.) Nees (canela-guaiacá), nos bosques mistos de araucárias (ALZUGARAY; ALZUGARAI, 1986; MELO, 2003; PLANTAS..., 2006).

As espécies de eucalipto, *Eucalyptus alba* Reinw. ex Blume, *Eucalyptus botryoides* Sm., *Eucalyptus citriodora* Hook., *Eucalyptus eugenioides* Sieber ex Spreng., *Eucalyptus globulus* Labill., *Eucalyptus gummifera* (Gaertn.) Hochr., *Eucalyptus laophila* L.A.S. Johnson

& Blaxell, *Eucalyptus viminalis* Labill., *Eucalyptus robusta* Sm., *Eucalyptus rostrata* Cav., *Eucalyptus saligna* Sm. e *Eucalyptus tereticornis* Sm., amplamente cultivadas no Brasil a partir do início do século XX, são citadas por Barth (1989) como boas produtoras de néctar e pólen. Essas espécies podem ser encontradas em áreas de reflorestamento na região dos Campos Gerais.

A identificação das plantas visitadas pelas abelhas é de fundamental importância para os apicultores, por indicar as fontes de alimento utilizadas para a coleta do néctar e do pólen, visando maximizar o aproveitamento dos recursos tróficos, principalmente em áreas de vegetação natural (HOWER, 1953). Um dos métodos de caracterizar a flora visitada pelas abelhas é por meio dos tipos polínicos encontrados nos méis (DURKEE, 1971; SEIJO et al., 1992).

2.2.2 Melissopalínologia

Para que seja feita a identificação botânica e geográfica do mel, é necessário o conhecimento do seu espectro polínico, através da contagem de grãos de pólen contidos no mel diluído em água destilada. O pólen dominante (acima de 45 %) representa a origem botânica do mel; o acessório (de 15 a 45 %) indica outras plantas visitadas; e o isolado (menor que 15 %) fornece a procedência geográfica da amostra (MIRANDA; ANDRADE, 1990).

A melissopalínologia pode ser útil para determinar e controlar a origem geográfica e botânica do mel. Porém, para uma correta diagnose da sua origem botânica, são necessárias as análises físico-químicas e sensorial (VON DER OHE; PERSANO-ODDO; PIANA, 2004). Além disso, a análise polínica fornece algumas informações importantes sobre a extração e a filtração do mel, sobre a fermentação (RUSSMAN, 1998), sobre alguns tipos de adulteração (KERKVLiet et al., 1995) e sobre aspectos higiênicos, como contaminações

com pó mineral, fuligem ou grãos de amido (LOUVEAUX; MAURIZIO; VORWOHL, 1970).

Como mencionado anteriormente, o termo “mel unifloral” é usado para descrever méis em que a maior parte do néctar tenha sido derivada de uma única espécie de planta. Usualmente, o mel é considerado unifloral, se a frequência do pólen de uma planta é maior do que 45 % (MAURIZIO, 1975). Porém, um mínimo de 10 % de pólen de *Citrus* sp. é suficiente para considerar um mel como monofloral (TERRAB; DIEZ; HEREDIA, 2003). Já o mel de castanha, para ser considerado monofloral, requer um mínimo de 90 % de pólen de *Castanea* Mill., em função da baixa produção de néctar (ANKLAM, 1998). Não existe, portanto, uma relação fixa e constante entre a quantidade de néctar e a de grãos de pólen produzidos pelas plantas, de modo que cada espécie deve ser considerada individualmente (BARTH, 1989).

O levantamento palinológico quantitativo e qualitativo de uma amostra de mel, obtido pela análise polínica, constitui o seu espectro polínico. Esse espectro diz respeito às plantas produtoras de néctar, às não produtoras, e ainda a falsificações, contaminações e misturas. Quanto à avaliação nectarífera da amostra, ou seja, das espécies vegetais que realmente contribuem para a formação do mel, deve-se levar em conta a presença de pólen de plantas nectaríferas (sub-representadas), poliníferas (super-representadas) e anemófilas nos espectros polínicos (BARTH, 1989).

As plantas nectaríferas, sub-representadas nos espectros polínicos, fornecem muito néctar, mas pouco pólen. Assim, poucos grãos são indicativos de grande quantidade de néctar. Nos méis puros dessa categoria, aparecem poucos grãos de pólen e sedimento. Como exemplo, entre as espécies sub-representadas mais frequentes na região Sul-Sudeste, estão as Rutaceae produtoras de frutas cítricas (*Citrus* spp.), Lamiaceae (*Salvia* spp., *Hyptis* spp. e

espécies cultivadas para temperos culinários) e algumas Mimosaceae (*Acacia* spp.) (BARTH, 1989, 2005).

Plantas poliníferas aparecem super-representadas nos espectros polínicos, fornecendo pouco néctar, mas muito pólen. A ocorrência do pólen em grande quantidade indica teor bem menor de néctar. Quando uma amostra de mel contém mais de 98 % de pólen de uma planta polinífera, o mel derivado dessa espécie deve ser considerado monofloral. Entre os taxa super-representados que ocorrem na região Sul-Sudeste, encontram-se principalmente as espécies do gênero *Mimosa* L. (BARTH, 1989, 2005).

As espécies de *Eucalyptus* L'Hér. têm produção variável de pólen, de modo que ora se enquadram como nectaríferas, ora como poliníferas (BARTH, 2005). Dentre as espécies botânicas fornecedoras de alimento para as abelhas, o eucalipto é considerado um dos melhores e mais abundantes (MARCHINI; MORETI; SILVEIRA NETO, 2003). Segundo Nogueira Neto (1953), o néctar das flores de eucalipto pode produzir méis de diferentes qualidades, como, por exemplo, o de *E. robusta*, que é escuro, perfumado e agradável. Já o néctar de *Eucalyptus ficifolia* F. Muell. é claro e saboroso e o de *E. globulus* é escuro e de baixa qualidade. No Brasil, a cultura de eucalipto é importante para a produção de celulose, madeira e energia e as espécies mais cultivadas são *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh., *E. citriodora*, *Eucalyptus cloeziana* F. Muell., *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden, *Eucalyptus maidenii* F. Muell., *Eucalyptus paniculata* Sm., *E. saligna*, *E. tereticornis*, *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake (KEER; AMARAL, 1960; MARCHINI; MORETI; SILVEIRA NETO, 2003).

Há ainda as plantas anemófilas, que não produzem néctar. O pólen anemófilo é seco e leve, sendo disperso pelo vento; pode entrar, ocasionalmente, na composição do espectro polínico de méis monoflorais, pois é coletado e armazenado nos alvéolos das colméias, separadamente do néctar, como fonte de proteínas. A presença desse tipo de pólen no mel

pode ser, às vezes, em quantidade considerável, devido ao processo de extração, ou mesmo, por falsificações. Entretanto, por intermédio desses grãos de pólen, pode-se identificar a região geográfica onde foi coletado o mel. Na região Sul-Sudeste, entre as plantas anemófilas, que ocorrem com maior frequência, estão as espécies de *Cecropia* Loefl. e de Poaceae, entre as quais o milho (BARTH, 1989, 2005).

A alta frequência de grãos de pólen de plantas anemófilas, aliada à presença de elementos figurados, como algas, esporos de fungos (fumaginas), partículas de fuligem e massa granulosa, caracterizam o mel de melato (BARTH, 1989).

Entretanto, Barth (2005) salienta que a avaliação dos dados obtidos pela contagem polínica ainda necessita aprimoramento. Não basta realizar uma simples repartição dos tipos de grãos de pólen encontrados nas amostras de mel em classes de frequência. Na interpretação das informações, para alcançar uma diagnose final da amostra, é de grande importância conhecer a relação pólen-néctar das espécies apícolas encontradas no mel (BARTH, 1989). O conhecimento sobre as plantas que produzem maior ou menor quantidade de néctar, maior ou menor quantidade de pólen, bem como sobre as plantas que são de maior ou menor interesse para as abelhas é, em parte, até empírico. Esse interesse pode variar de região para região. Como exemplo, pode-se citar a espécie apícola *Dombeya wallichii* (Lindl.) K. Schum. (astrapéia), que é muito procurada pelas abelhas do Rio de Janeiro. No entanto, em Santa Catarina, ela se torna desinteressante para esses insetos, devido ao elevado teor de água presente no néctar proveniente dessa região (BARTH, 2005).

Barth (2005) sugere, então, um modelo de avaliação quantitativa do mel, através dos espectros polínicos obtidos a partir das amostras analisadas. Do total de grãos de pólen contado por amostra (mais que 300 grãos), subtrai-se o número de grãos de pólen de plantas anemófilas e poliníferas, obtendo somente o pólen nectarífero. Sobre esse total de pólen nectarífero, são calculados os respectivos percentuais para cada táxon nectarífero, levando em

consideração as particularidades das espécies nectaríferas em avaliação. Caso haja alta incidência de uma espécie polínifera, acima de 98 % do total de grãos de pólen contados, a produção de néctar dessa planta classifica o mel como monofloral.

A análise polínica qualitativa de méis, provenientes de diferentes regiões geográficas e florísticas, pode fornecer importantes dados, tanto para a caracterização dos méis com relação a sua origem botânica e regional e de sua época de coleta, quanto para a avaliação do mel de origem desconhecida ou duvidosa (BARTH, 1989).

A primeira análise polínica de méis brasileiros foi feita por Santos (1961) e consta de uma relação de espécies, cujos grãos de pólen foram encontrados em uma série de amostras, removidas por meses sucessivos, de colméias do município de Piracicaba – SP. Posteriormente, as análises melissopalínológicas foram realizadas por Maurizio (1964), Barth (1969), Absy et al. (1984) e Carreira et al. (1986).

A análise polínica, exclusivamente de méis monoflorais colhidos no Brasil, foi desenvolvida por Barth (1990 e 1996), Barth e Core-Guedes (1999) e Barth et al. (2005). Neste último trabalho, foi demonstrado que cerca de 57 % das 31 amostras produzidas e comercializadas na região Sudeste do Brasil puderam ser classificadas como monoflorais. Dos méis identificados como monoflorais, segundo os tipos polínicos encontrados, nove amostras corresponderam a mel de eucalipto (tipo *Eucalyptus*, Myrtaceae), duas a mel de aroeira (tipo *Schinus*, Anacardiaceae), duas a mel de assa-peixe (tipo *Vernonia*, Asteraceae), duas a mel de laranjeira (tipo *Citrus*, Rutaceae), uma a mel de cambará (tipo *Gochnatia*, Asteraceae) e uma a mel de capixingui (tipo *Croton*, Euphorbiaceae).

Barth (2004), em uma extensa revisão feita sobre a melissopalínologia no Brasil, relata que referências sobre a análise polínica de méis do Sul do Brasil não são freqüentes. Os méis que caracterizam essa região são, geralmente, provenientes de Asteraceae e de Anacardiaceae, em especial de *S. brasiliensis* (maria-mole) e *Lithrea* sp. (aroeira),

respectivamente (BARTH, 1990). Os diversos taxa de Asteraceae, *Eucalyptus*, Myrtaceae e *M. scabrella* ocorrem freqüentemente na região Sul (BARTH, 1989; BARTH et al., 1999).

Segundo Ramalho et al. (1991), as plantas que conferem as freqüências mais altas de grãos de pólen nas 256 amostras de méis analisadas, provenientes de São Paulo e do Paraná, foram *Eucalyptus* spp., *Baccharis* spp., *Citrus* spp., *M. scabrella*, *Campomanesia guazumifolia* (Cambess.) O. Berg., *Serjania* spp., *S. terebenthifolia*, *Mimosa velloziana* Mart., *Matayba elaeagnoides* Radlk., *Cecropia adenopus* Mart. ex Miq., *Eupatorium* spp., *I. paraguariensis*, *Syagrus romanzoffiana* (Cham.) Glassman, *Vernonia* spp., *Casearia* spp., *Allophylus* spp. e *S. brasiliensis*.

Sodré et al. (2007a) identificaram os tipos polínicos presentes em 58 amostras de méis produzidos em dois estados da região Nordeste do Brasil, Piauí (38 amostras) e Ceará (20 amostras), verificando o potencial das plantas apícolas durante os meses de fevereiro a agosto. Foram constatados, como pólen dominante no estado do Ceará, *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth., *Mimosa verrucosa* Benth., *Borreria verticillata* (L.) G. Mey., *Serjania* sp. e um tipo polínico Fabaceae e, para o estado do Piauí, *Piptadenia* sp., *M. caesalpiniaefolia*, *M. verrucosa*, *Croton urucurana* Baill. e *Tibouchina* sp. Espécies como *M. verrucosa*, *M. scabrella*, *Serjania* sp., *C. urucurana* e duas espécies do gênero *Borreria* G. Mey., foram observadas em ambos os estados estudados e têm potencial como plantas melíferas durante certas estações do ano.

No estudo do espectro polínico de méis, realizado por Moreti et al. (2000), na Bahia, foram encontrados 43 tipos de pólen, sendo considerados como dominantes os grãos de pólen das espécies de *Eucalyptus* sp. (Myrtaceae), *M. verrucosa* (Mimosaceae), *M. scabrella* (Mimosaceae) e *Bauhinia* sp. (Caesalpinaceae). Os tipos acessórios foram *Alternanthera ficoidea* (L.) P. Beauv. (Amarantaceae), tipo Compositae (Asteraceae) e *Cecropia* sp. (Moraceae). Foi destacada ainda, a participação de *Mimosa* sp. (Mimosaceae) e de outras

espécies silvestres na composição dos méis, provenientes dos municípios considerados. A espécie *Eucalyptus* sp. foi registrada como uma das principais fontes de alimento das abelhas da região estudada.

No Ceará, em um estudo sobre a caracterização palinológica de algumas amostras de mel, foi investigada a identidade das espécies vegetais que mais contribuem para a apicultura nessa região. As espécies vegetais mais freqüentes foram *M. caesalpinifolia*, *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir., *B. verticillata*, *Croton sonderianus* Müll. Arg. e *Hyptis suaveolens* (L.) Poit.. Algumas espécies nativas, como *Alternanthera tenella* Cola e *Piptadenia moniliformis* Benth., apresentaram importância localizada. Espécies exóticas cultivadas, como *Aloysia virgata* (Ruiz & Pav.) Pers., *Cocos nucifera* L. e *Eucalyptus* sp. também mostraram potencial para a produção de mel. Os méis foram classificados, predominantemente, como heteroflorais, formados a partir de combinações variadas de néctares das espécies identificadas (AIRES; FREITAS, 2001).

Considerando as análises polínicas provenientes de outros países, Ouchemoukh, Louaileche e Schweitzer (2007) analisaram 11 amostras de mel da Argélia. As famílias botânicas encontradas, freqüentemente, foram Myrtaceae, Apiaceae e Ericaceae. O tipo polínico *Eucalyptus* foi encontrado como pólen dominante ou acessório em 5 amostras.

Andrade et al. (1999) investigaram o espectro polínico de méis da Serra da Lousa em Portugal, considerando monoflorais aqueles que apresentavam pólen dominante de 45 %. Das 60 amostras estudadas, 70 % foram classificados como monoflorais de *Erica* sp., 17 % como monoflorais de Ericaceae (*Erica* sp. e *Calluna vulgaris* (L.) Hull) e 13 % como méis multiflorais, com alta porcentagem de *Erica* sp.

Na Espanha, foram estudados 19 méis uniflorais sendo, pela análise polínica, tipificados como provenientes de *Salix* sp. (4), *Onobrychis viciifolia* Scop. (4), *Hypocoum* sp. (2), *Brassica* sp. (2), *Prunus* sp. (2), *Thymus* sp. (1), *Echium* sp. (1), *Lavandula latifolia*

Medik. (1), *Lavandula stoechas* L. (1) e *Vicia sativa* L. (1). Os méis foram denominados monoflorais quando o espectro polínico apresentava pólen dominante acima de 45 % do total de grãos de pólen, exceto os de *L. latifolia* e *L. stoechas* e *Thymus* sp., nos quais um mínimo de 15 % dos tipos polínicos correspondentes foi suficiente para determiná-los como monoflorais (PÉREZ-ARQUILLUÉ et al., 1995).

Al-Khalifa e Al-Arify (1999) classificaram 10 amostras de méis da Arábia Saudita, de acordo com a origem floral, em *Ziziphus spina-christi* (L.) Desf. (2), *Acacia* spp. (2), *Acacia etbaica* Schweinf. (1), *Hypericum perforatum* L. (1), *Lavandula dentata* L. (1), *Ocimum* sp. (1), *Helianthemum chamaecistus* Mill. (1) e *Chenopodium* spp. (1). Os méis foram considerados monoflorais quando o espectro polínico continha pólen dominante, em quantidade maior do que 40 % do total de grãos de pólen contados.

Assim, a análise polínica tem sido um método tradicional para a determinação da origem floral do mel, mas esse método tem algumas limitações (HERMOSIN; CHICON; CABEZUDO, 2003; VON DER OHE, 1994). Diversos problemas têm sido relacionados à melissopalínologia: diferentes espécies de plantas produzem diferentes proporções de pólen, a quantidade de pólen pode variar entre as estações do ano, o néctar produzido pode ser diferente em flores masculinas e femininas, as abelhas podem carregar pólen sem coletar o néctar, as abelhas podem coletar néctar sem desalojar o pólen das anteras de algumas flores e os processos de extração e filtragem do mel podem gerar um resultado não condizente a sua provável composição, pelo estudo microscópico (MOLAN, 1998). Outra limitação desse método, no que diz respeito à prova de autenticidade, está relacionada ao fato de que o pólen pode ser adicionado de forma fraudulenta ao mel (ANKLAM, 1998).

Dessa forma, o uso de critérios físico-químicos como análises da condutividade elétrica e pH têm sido sugeridos para complementar a análise polínica na caracterização de méis monoflorais (MATEO; BOSCH-REIG, 1998).

2.2.2.1 Métodos alternativos à melissopalínologia

A condutividade elétrica, a rotação específica, o conteúdo de cinzas e o pH são amplamente utilizados para a discriminação entre méis florais e méis de melato. Mel floral e misturas de mel floral e mel de melato mostraram valores de condutividade menores que $0,8 \text{ mS.cm}^{-1}$, enquanto que mel de melato e mel de castanheiras revelaram valores maiores que $0,8 \text{ mS.cm}^{-1}$ (MATEO; BOSCH-REIG, 1998; OUCHEMOUKH; LOUAILECHE; SCHWEITZER, 2007). A medida da rotação específica é, freqüentemente, utilizada na Grécia, Itália e Reino Unido para distinguir méis florais e de melato; a maioria dos méis de melato tem valores positivos para rotação específica, entretanto méis obtidos a partir do néctar têm valores negativos, sendo isso uma consequência da preponderância da frutose no mel floral, a qual mostra rotação específica negativa (BOGDANOV et al., 1999).

Bogdanov; Ruoff, Persano-Oddo (2004), em uma revisão sobre os métodos físico-químicos para a caracterização de méis monoflorais, relatam a utilização de análises físico-químicas clássicas e de outros métodos de autenticação da origem botânica, os quais estão sumarizados na Tabela 2. Esses métodos são validados e amplamente empregados como análises de rotina ao controle da qualidade do mel. Entretanto, esses métodos clássicos apresentam diversas etapas e dependem de pessoal altamente especializado. Dessa forma, as tentativas de se usar um único método analítico para determinar a origem botânica têm sido freqüentes. Métodos como espectroscopia na região do infravermelho, especialmente quando associado a ferramentas de calibração multivariada, e análise de compostos voláteis do mel são muito promissores, podendo ser futuramente desenvolvidos e avaliados com um número suficiente de amostras de méis monoflorais e multiflorais, para permitir a utilização de rotina.

Tabela 2 - Métodos para a determinação da origem botânica do mel

MÉTODOS, PARÂMETROS	OBSERVAÇÕES
Métodos clássicos	
Determinação de parâmetros físico-químicos de rotina (condutividade elétrica, açúcares, razão glucose/frutose, atividade enzimática, prolina, cor, rotação óptica, pH e acidez)	Usados conjuntamente com as análises polínica e sensorial; os métodos de condutividade elétrica e razão glucose/frutose são os mais úteis. A análise quimiométrica é promissora. Os parâmetros de rotina também podem ser determinados por espectroscopia na região do infravermelho.
Outros métodos	
Determinação de fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	Mostra resultados adequados, mas não se aplica em testes de rotina, por ser muito trabalhoso.
Determinação de compostos voláteis por <i>headspace</i> dinâmico ou microextração em fase sólida, seguida por cromatografia gasosa (CG) acoplada à espectrometria de massa (EM) ou “narizes eletrônicos”	Métodos promissores que podem ser futuramente aperfeiçoados e desenvolvidos para análise quantitativa de voláteis. “Narizes eletrônicos” são também promissores, mas não estão comumente disponíveis em laboratórios de análise de alimentos.
Aminoácidos	Têm algum poder de discriminação, mas dependem também da origem geográfica.
Ensaio <i>immunoblot</i> de proteínas do mel, de origem polínica	Método suplementar à clássica melissopalínologia.
Traços de elementos	Expressa algum poder de discriminação, mas também depende da origem geográfica e climática.
Ácidos carboxílicos alifáticos	Possui poder de discriminação limitado; a maioria dos ácidos orgânicos é adicionada ao mel pelas abelhas.
Espectroscopia na região do infravermelho	Método promissor; caracteristicamente rápido, que pode ser desenvolvido futuramente.
Espectroscopia de massa	Método promissor, mas depende de instrumentação de alto custo.

Fonte: BOGDANOV; RUOFF; PERSANO-ODDO, 2004.

O estudo de compostos voláteis presentes em méis monoflorais é um tema que tem despertado muito interesse, notadamente nas pesquisas que visam definir “marcadores químicos”, ou seja, substâncias presentes no mel capazes de definir a sua florada de origem (BOUSETA; COLLIN; DUFOUR, 1992; BOUSETA; SCHEIRMAN; COLLIN, 1996; D’ARCY et al., 1997).

Bastos et al. (2002) analisaram compostos voláteis em amostras de mel de eucalipto e laranjeira, colhidas nos estados de São Paulo e de Minas Gerais. Nesse trabalho, o isolamento dos compostos voláteis foi realizado por *headspace* dinâmico, a separação foi efetuada por cromatografia gasosa e a identificação por espectrometria de massa. Foram identificados no mel de laranjeira o benzaldeído, o óxido *cis* de linalol, *n*-heptanal, 6-metil-5-hepten-2-ona, octanal e fenilacetaldéido, e em mel de eucalipto, o nonanal, 2-heptanona, 2-heptanol, octanol e nonanol. A caracterização sensorial desses méis foi obtida por análise descritiva quantitativa e a aplicação de análise dos componentes principais aos dados revelou que os descritores "queimado" e "sabor residual" caracterizam o mel de eucalipto, enquanto "floral" e "cera" foram relacionados ao mel de laranjeira. Entre os compostos identificados, o nonanal e o nonanol apresentaram contribuição sensorial importante ao mel de eucalipto, enquanto o fenilacetaldéido e o benzaldeído foram estabelecidos como os principais descritores do mel de laranja.

De Maria e Moreira (2005) investigaram os compostos aromáticos do mel de Cambará [*Gochnatia velutina* (Bong.) Cabrera], comumente encontrado no bioma da floresta Atlântica. Esse mel monofloral tem um aroma agradável, um paladar delicado e característico. Foi estudada a fração volátil do mel de cambará usando cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (CG/DIC), CG com espectrômetro de massas (EM), CG com acessório de *sniffing* (CG-O), para percepção odorífera dos compostos voláteis separados na CG, e CG-O/ADEA (análise da diluição de extrato de aroma) que permitiu a avaliação da potência odorífera dos compostos voláteis. Os autores concluíram que a primeira impressão odorífera do mel de cambará foi atribuída, principalmente, à presença de benzaldeído, benzonitrila e 2-feniletanol. Ainda, a 1-fenil-1,2-propanodiona, o ácido benzóico e o ácido fenilacético apresentaram, possivelmente, uma grande importância para o sabor do mel de cambará.

Como método alternativo à melissopalinologia, Baroni et al. (2004) relataram o desenvolvimento de um imunoenensaio enzimático (ELISA) rápido, específico e sensível para avaliação de pólen de girassol no mel. Esse método utilizou, como antígenos, proteínas identificadas como características do pólen de girassol; apresentou um limite de detecção de 10 %, revelando resposta linear entre 10 e 90 %; forneceu baixa reatividade com méis de outras origens florais, evidenciando uma adequada seletividade. Os autores verificaram uma correlação significativa ($r = 0,975$; $p < 0,001$) quando o método proposto foi comparado à melissopalinologia. Portanto, concluíram que essa é uma valiosa e possível alternativa para a autenticação de méis de girassol.

2.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O interesse pelos antioxidantes tem crescido pela evidência do seu importante papel na saúde humana, sendo relevantes os efeitos preventivos contra diferentes doenças como câncer, alterações coronárias, desordens inflamatórias e degenerações neurológicas (MADHAVI, DESPANDE; SALUNKHE, 1996). Muitas pesquisas comprovam que os flavonóides e, em geral, os compostos fenólicos, desempenham um efeito antioxidante/seqüestrante de radicais livres no corpo humano e podem atuar prevenindo e curando algumas patologias (PATHAK; PATHAK; SINGLA, 1991, apud CAMPOS; CUNHA; MARKHAM, 1996).

Radical livre é uma estrutura neutra ou carregada que possui um elétron desemparelhado e é representado pelo símbolo $R^{\cdot}$. Nosso organismo gera formas ativas de oxigênio e radicais livres de oxigênio no curso normal do metabolismo, os quais são muito reativos, produzindo radicais livres secundários, interações inter e intramoleculares, oxidações, halogenações e fragmentações moleculares (CAMPOS; CUNHA; MARKHAM, 1996).

Os lipídeos da membrana celular são vulneráveis à ação dos radicais livres; a peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados gera muitos derivados, que são indicativos da intensidade do fenômeno de oxidação celular, como, por exemplo, hidroperóxidos lipídicos, aldeídos, dialdeídos conjugados, hidrocarbonetos e conjugados fluorescentes (lipofuscinas). Alguns desses derivados apresentam atividades biológicas, com ação quimiostática e efeito sobre a divisão celular. Entretanto, efeitos deletérios podem ocorrer devido à ação dos radicais livres em polissacarídeos (polimerização do ácido hialurônico), proteínas (fragmentação da cadeia peptídica, modificações químicas nos aminoácidos essenciais para a atividade enzimática) e ácidos nucléicos (alterações cromossômicas) (CAMPOS; CUNHA; MARKHAM, 1996). Esses radicais livres são, usualmente, removidos ou inativados *in vivo* por enzimas antioxidantes endógenas, como superóxido desmutase (SOD), peroxidase e compostos de baixa massa molar, como tocoferol, ácido ascórbico e fenólicos (NAGAI et al., 2001).

De qualquer forma, essas espécies reativas se tornam danosas, quando são produzidas em excesso, sob certas condições especiais, como inflamação, isquemia e na presença de íons catalíticos (ex. Fe^{2+}). Sob essas situações, os antioxidantes endógenos, como a glutathione reduzida, podem ser insuficientes para conter a formação dessas substâncias reativas (RUSSO; LONGO; VANELLA, 2002).

Os compostos fenólicos estão entre os compostos fitoquímicos que podem apresentar seus efeitos antioxidantes, diminuindo o estresse oxidativo e suas consequências (SHAHIDI, 2004). O efeito antioxidante dos compostos fenólicos (SHAHIDI, 1997) é devido, diretamente, à ação seqüestrante de radicais livres (SHAHIDI, 2000, WETTASINGHE; SHAHIDI 1999a,b) e, indiretamente à quelação de íons metálicos pró-oxidantes. A quelação do íon metálico exige, geralmente, a *orto*-hidroxilação do anel fenil nos ácidos fenólicos e

flavonóides ou a presença do grupo 3- ou 5-hidroxila nos flavonóides (WETTASINGHE; SHAHIDI, 2002).

Os antioxidantes presentes no mel incluem enzimas (catalase, glucose oxidase e peroxidase) e substâncias não enzimáticas (ácidos orgânicos, produtos da Reação de Maillard, aminoácidos, proteínas, flavonóides, fenólicos, α -tocoferol, flavonóis, catequinas, ácido ascórbico e carotenóides) (THE NATIONAL HONEY BOARD, 2003, apud MEDA et al., 2005).

Muitos métodos têm sido usados para determinar a atividade antioxidante no mel, baseados na habilidade de sequestrar os radicais que compõem espécies reativas de oxigênio (ânion superóxido, radicais peroxila e hidroxila) (GHEDOLF; ENGESETH, 2002) e radical livre 1,1-difenil-2-picril-hidrazila (DPPH) (CHEN et al., 2000). Além de medidas enzimáticas e não enzimáticas de inibição da peroxidação lipídica (CHEN et al., 2000; NAGAI et al., 2001). A atividade antioxidante de vários alimentos tem sido determinada pelo método do DPPH, que pode ser usado em amostras líquidas e sólidas e que não apresenta especificidade para nenhum antioxidante em particular, além de ser rápido e preciso (MEDA et al., 2005). O DPPH é um radical livre estável que é capaz de aceitar um radical hidrogênio para se tornar uma molécula diamagnética estável e, dessa forma, sofrer redução na presença do antioxidante (Figura 2).

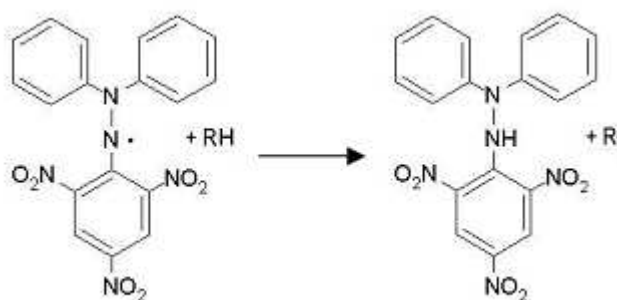


Figura 2 - Redução do 1,1-difenil-2-picril-hidrazila (DPPH) na presença de um antioxidante
(Fonte: ADELMANN, 2005)

Rosenblat et al. (1996) avaliaram o efeito antioxidante de cinco tipos de mel: mel comercial, mel chinês e três outros méis, denominados, Laringomel, Broncomel e Dermomel. Esses três últimos méis foram produzidos por abelhas alimentadas por uma mistura de vários extratos aquosos médico-herbais contendo mel. Todas as amostras de méis demonstraram prevenção da degradação do β -caroteno em emulsão de ácido linoléico e, também, inibiram a geração de radicais superóxidos pelo sistema xantina/xantina oxidase. Laringomel e Broncomel foram particularmente efetivos no seqüestro de espécies de oxigênio reativo a uma concentração da ordem de $7\text{-}50\ \mu\text{g.mL}^{-1}$.

A dose do mel natural que é recomendada para uso medicinal, corresponde a uma colher de chá (aproximadamente 7 g) e contém uma quantia de antioxidantes que é equivalente a 50-250 μg do potente antioxidante butil-hidroxianisol (BHA) (ROSENBLAT et al., 1996).

Nagai et al. (2006) usaram um modelo de sistema de peroxidação lipídica para avaliar o efeito antioxidante de alguns méis e produtos relacionados. As maiores capacidades de seqüestro de superóxidos foram encontradas na própolis e na geléia real; porém, os méis testados também apresentaram, em menor grau, essa atividade. Algumas amostras de mel demonstraram maior habilidade em seqüestrar o radical DPPH, quando comparadas à geléia real e própolis. A capacidade de seqüestro do radical hidroxila foi muito alta em todos os méis analisados (acima de 77 % de inibição).

2.4 ANTIOXIDANTES NATURAIS

Diante da comprovação de efeitos deletérios sobre o fígado e da marcada proliferação do retículo endoplasmático, entre outras alterações causadas por doses elevadas dos antioxidantes sintéticos, como o BHA, butil-hidroxitolueno (BHT) e *t*-butil hidroquinona

(*t*-BHQ), ocorreu o aumento do interesse por antioxidantes naturais (DURÁN; PADILLA, 1993). Como consequência, foi dada ênfase à identificação e à purificação de novos compostos com atividade antioxidante, provenientes de fontes naturais.

2.4.1 Compostos fenólicos

Compostos fenólicos formam um dos mais importantes grupos de substâncias vegetais, onde são amplamente distribuídos, compreendendo pelo menos 8.000 estruturas conhecidas (BRAVO, 1998). Esses compostos são responsáveis por exibir atividades anticarcinogênica, antiinflamatória, antiaterogênica, antitrombótica, além de promover a modulação imune e ter ação analgésica, exercendo essas funções como antioxidantes (CATAPANO, 1997; LOKU, 1995; SALAH et al., 1995; SERAFÍNI; GHISELLI; FERRO-LUZI, 1996; VINSON, et al., 1998, apud GÓMEZ-CARAVACA et al., 2006).

As evidências científicas permitem afirmar que a propriedade antioxidante das especiarias e de outros vegetais está relacionada, principalmente, com os seus compostos fenólicos. A maioria dos antioxidantes naturais é composta de fenólicos contendo grupos funcionais ativos na posição *orto*, com exceção dos tocoferóis, enquanto que nos antioxidantes sintéticos, com exceção dos galatos, esses grupos encontram-se na posição *para* (MADSEN; BERTELSEN; SKIBSTED, 1997; NAMIKI, 1990; POKORNÝ, 1991).

O termo “composto fenólico” inclui um amplo número de compostos minoritários das plantas, que diferem na estrutura química e reatividade. Esses fitoquímicos apresentam em sua estrutura um anel aromático com uma ou mais hidroxilas e são multifuncionais, podendo atuar como agentes redutores de radicais livres e quelantes de metais. Dentre eles, destacam-se os flavonóides, os ácidos fenólicos e o tocoferol, como os mais comuns antioxidantes fenólicos de origem natural (ESKIN; PRZYBYLSKI, 2000; MELO; GUERRA, 2002; SHAHIDI; NACZK, 1995).

Os antioxidantes naturais, especialmente os flavonóides, exibem grandes efeitos biológicos, incluindo as atividades antibacterianas, antiinflamatórias, antialérgicas, antitrombóticas e com ação vasodilatadora (COOK; SAMMON, 1996).

2.4.1.1 Flavonóides

Os flavonóides estão presentes em folhas, frutos, sementes e em outras partes dos vegetais, na forma de glicosídeos ou agliconas. Esses compostos, em geral, possuem estrutura fenilbenzopirona (C6-C3-C6), onde as duas partes da molécula com seis carbonos são anéis aromáticos, denominados anel A e B, unidos por três carbonos que formam um anel γ -pirano, denominado de anel C (Figura 3). De acordo com as características químicas e biossintéticas, os flavonóides são separados em diversas classes: flavonas, flavonóis, diidroflavonóides (flavanonas e flavanonóis), antocianidinas, isoflavonóides, auronas, neoflavonóides, biflavonóides, catequinas e seus precursores metabólicos, conhecidos como chalconas (HAVSTEEN, 1983).

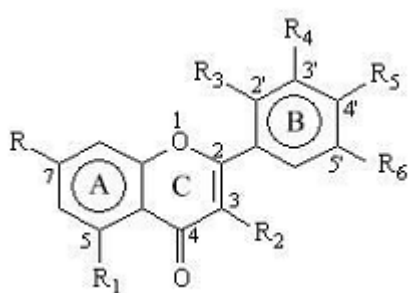


Figura 3 - Estrutura química geral dos flavonóides

(Fonte: ADELMANN, 2005)

A diferenciação dos flavonóides é dada, principalmente, pelo número e posição de metoxilas e hidroxilas presentes nos dois anéis aromáticos. As duas principais classes presentes na natureza são as flavonas e os flavonóis. Dentre as flavonas, encontram-se mais facilmente nos vegetais a apigenina, a luteolina e a tricetina. Os flavonóis mais comuns são as

agliconas campferol, quercetina, rutina e miricetina (BOBBIO; BOBBIO, 1992; HARBONE, 1973). Apigenina e luteonina são comuns em Magnoliophyta, enquanto a tricina está presente em Poaceae (GALLIARD; PHILIPS, 1976).

No vegetal, os flavonóides apresentam-se principalmente sob a forma de glicosídeos, onde uma ou mais hidroxilas da aglicona encontram-se unidas por uma ligação hemi-acetalica a um açúcar, normalmente a glucose. Podem ocorrer também, alguns flavonóides acilados, sendo que os grupamentos ácido-carboxílicos podem ser alifáticos ou aromáticos e estarem esterificados ao açúcar. A ligação glicosídica confere solubilidade em água ao flavonóide e a acilação torna a molécula lipofílica (MELO; GUERRA, 2002).

Os flavonóides atuam como antioxidantes primários, a exemplo dos flavonóis. A posição e o número de hidroxilas presentes na molécula são responsáveis pela atividade antioxidante desses compostos, sendo que a hidroxilação do anel B é um fator importante para essa atividade (SHAHIDI; JANITHA; WANASUNDARA, 1992). A ação quelante dos flavonóis deve-se à presença de uma hidroxila no carbono 3 e de um grupo carbonila no carbono 4 do anel pirano (DURÁN; PADILLA, 1993; PRATT; HUDSON, 1990; SIX, 1994). Hidroxilas nas posições 3 e 5, juntamente com o grupo carbonila, potencializam a atuação dos flavonóides como seqüestrantes de radicais livres (SHI; NIKI, 1998). A quercetina, a rametina, o campferol, a rutina e a quercetrina, que possuem hidroxilas no carbono 3 e ligação dupla entre os carbonos 2 e 3, têm sido reconhecidos como os mais efetivos antioxidantes dentre os flavonóides (SCHULER, 1990).

Os flavonóides, por serem pigmentos presentes em todas as células fotossintetizadoras, são encontrados em espécies medicinais, legumes, frutos, mel e, por consequência, em outros produtos do consumo cotidiano (HAVSTEEN, 1983; HAVSTEEN, 2002; LOPES et al., 2000). Porém, as flavanonas ocorrem, predominantemente, em frutas cítricas; as flavonas, em plantas utilizadas para condimentos; os isoflavonóides, em legumes;

as antocianinas e catequinas, em frutas; e os flavonóis, em todas as frutas e vegetais (PETERSON; DWYER, 1998). Os nutricionistas estimam que a ingestão média de flavonóides, a partir de uma dieta normal, é de 1-2 g por dia (HAVSTEEN, 2002) e, por serem consumidos em grandes proporções dentro de uma dieta regular, esses compostos desempenham um importante papel na saúde humana.

2.4.1.2 Ácidos Fenólicos

Os ácidos fenólicos são constituídos por um núcleo básico hidroxifenilpropenóico (Figura 4), comumente encontrados nas plantas, podendo ser derivados do ácido hidroxicinâmico ou do ácido hidroxibenzóico. Os derivados do ácido hidroxicinâmico ocorrem, usualmente, sob a forma de ésteres, como o ácido clorogênico, éster do ácido quínico, cuja molécula é constituída pelo ácido quínico esterificado ao ácido caféico. Também são encontrados na forma de glicosídeos ou ligados a proteínas e a outros polímeros da parede celular, sendo, raramente, isolados como ácidos livres (MELO; GUERRA, 2002).

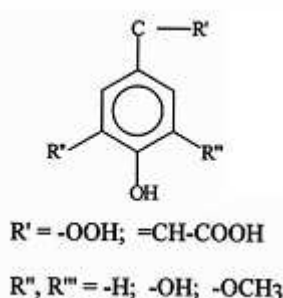


Figura 4 - Núcleo básico hidroxifenilpropenóico dos ácidos fenólicos

(Fonte: ADELMANN, 2005)

Os derivados do ácido hidroxicinâmico possuem um anel aromático com uma cadeia carbônica, constituída por três carbonos ligados ao anel. Os ácidos *p*-cumárico, ferúlico, caféico e sináptico são os hidroxicinâmicos mais comuns na natureza. No grupo dos ácidos

hidroxibenzóicos, compostos que possuem grupo carboxílico ligado ao anel aromático, destacam-se os ácidos protocatecuico, vanílico, siríngico, gentísico, salicílico, elágico e gálico (MELO; GUERRA, 2002). Esses dois grupos de ácidos fenólicos têm apresentado propriedades antioxidantes (HARBONE, 1973).

A atividade antioxidante dos ácidos fenólicos é determinada, geralmente, pelo número de hidroxilas presentes na molécula, embora outras características também contribuam para essa atividade (RAJALAKSHMI; NARASIMHAN, 1995). A ligação dupla presente na molécula dos derivados do ácido cinâmico ($-\text{HC}=\text{CH}-\text{COOH}$) participa da estabilidade do radical por ressonância do deslocamento do elétron desemparelhado. Essa característica permite que os derivados do ácido cinâmico, como os ácidos sináptico, ferúlico e *p*-cumárico sejam antioxidantes mais ativos do que os derivados do ácido benzóico, como os ácidos procatecuico, siríngico e vanílico (WANASUNDARA; AMAROWICZ; SHAHID, 1994).

2.4.1.3 Tocoferóis

Os tocoferóis ocorrem amplamente na natureza e são compostos monofenólicos, que ajudam a estabilizar a maioria dos óleos vegetais, exibindo atividade antioxidante e de vitamina E. Essa classe de compostos fenólicos compreende oito diferentes estruturas, pertencentes a duas famílias, denominadas tocóis e tocotrienóis. Os compostos da família tocóis possuem cadeia saturada ligada ao anel e são denominados tocoferóis, enquanto que os tocotrienóis possuem cadeia insaturada (SHAHIDI; JANITHA; WANASUNDARA, 1992). A nomenclatura desses compostos recebe o prefixo α , β , γ e δ , dependendo do número e posição do grupo metila ligado ao anel aromático. Considerando a atividade de vitamina E, o α -tocoferol é o composto mais potente. Os tocoferóis atuam como antioxidantes primários,

sendo que essa atividade decresce do composto δ para o α -tocoferol (SIX, 1994; DZIEZAK, 1986).

A ação desses compostos ocorre por seqüestro de radicais livres (SCHULER, 1990). A atividade antioxidante dos tocoferóis depende do tipo de alimento a que foi adicionado, da concentração usada, da disponibilidade de oxigênio no sistema, da presença de metais e de compostos sinérgicos. Os tocoferóis podem atuar como pró-oxidantes quando em condições de elevada concentração e na presença de traços de ferro e de sais de cobre. Quando se utiliza tocoferol juntamente com o ácido ascórbico, o ácido cítrico, alguns aminoácidos, agentes quelantes ou antioxidantes sintéticos, consegue-se uma atividade antioxidante adequada (MELO; GUERRA, 2002).

2.4.2 Identificação e quantificação de compostos fenólicos em méis

Nos estudos realizados sobre compostos fenólicos em mel, tem sido identificada a presença de flavonóides como: miricetina, hesperetina, quercetina, luteolina, 8- metoxicanferol, canferol, apigenina, isorramnentina, pinocembrina, pinobanksina, crisina, galangina, tectocrisina, entre outros (FERRERES et al., 1994a; SOLER et al., 1995).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é o método de escolha para análises de flavonóides. O maior problema na análise de flavonóides do mel é o alto conteúdo de açúcar, que dificulta a extração desses metabólitos e a preparação da amostra para ser analisada por CLAE. Partições líquido-líquido produzem interfaces inconvenientes que não permitem a completa recuperação dos flavonóides, sendo esse problema solucionado pelo uso da resina polimérica não-iônica Amberlite[®] XAD-2 (FERRERES et al., 1991; TOMÁS-BARBERÁN et al., 1992).

Ferreres et al. (1994a) descreveram uma simples técnica para análises de rotina de flavonóides de mel, utilizando a resina de filtração Amberlite[®] XAD 2, a extração com éter

etílico e a identificação por CLAE. Essa técnica foi aplicada nas análises de flavonóides de 27 amostras de méis da região de La Acarria, na Espanha. Um total de 18 diferentes flavonóides foi detectado nas amostras analisadas, sendo que os flavonóides majoritários encontrados foram as flavanonas pinocembrina e pinobanksina e a flavona crisina.

Blasa et al. (2006) pesquisaram o total de fenólicos, de flavonóides e a atividade antioxidante de amostras de méis de duas das mais comuns variedades italianas, *millefiori* e *Acacia* Mill. O conteúdo de fenólicos, expressado como ácido caféico equivalentes, variou entre 12,5 a 17,5 mg.100 g⁻¹ no mel *millefiori* e de 3 a 11 mg.100 g⁻¹ no mel de *Acacia*. Todas as amostras de mel *millefiori* exibiram as maiores concentrações de flavonóides, variando entre 1,23 e 2,93 mg de catequina equivalentes (CE).100 g⁻¹ de mel. Porém, nas amostras de mel *Acacia*, o conteúdo de flavonóides foi menor e variou de 0,45 a 1,01 mg CE.100 g⁻¹ de mel. No ensaio da atividade antioxidante, usando ferro redutor para avaliar o poder antioxidante, o mel de *Acacia* teve uma atividade antioxidante menor do que o *millefiori*. Portanto, o mel *millefiori* demonstrou ser uma fonte rica, em quantidade e variedade, de substâncias antioxidantes.

A identificação química pode ser mais exata e de fácil realização para a caracterização da origem floral do mel, quando comparada à análise polínica (TAN et al. 1989). A análise dos compostos fenólicos presentes no mel, incluindo flavonóides, pode ser útil para o estudo da sua origem botânica e da sua origem geográfica (AMOIT et al., 1989).

Soler et al. (1995) analisaram, por CLAE, o perfil de flavonóides de 12 diferentes amostras de méis monoflorais da França, para avaliar se essas substâncias poderiam ser utilizadas como marcadores da origem floral dos méis. Todas as amostras analisadas revelaram um perfil de flavonóides comum, consistindo de agliconas de flavonóides polihidroxilados, incluindo 8-metoxicanferol, canferol, quercetina, isoramnentina, luteolina e apigenina. Entretanto, algumas amostras mostraram a presença de potenciais marcadores

florais. Assim, o mel de urze foi caracterizado pela presença de miricetina, o mel de *Calluna* Salisb., pela presença do ácido elágico e o mel de *Citrus* L., pela flavona hesperetina. Em outras amostras, a quantidade relativa de um flavonóide individual estava relacionada à origem floral, como no mel de girassol, em que foi detectada uma importante quantidade relativa de quercetina. Assim, a análise de flavonóides e compostos fenólicos pode ser uma valiosa técnica bioquímica complementar na determinação da origem floral de algumas amostras de méis.

Na análise dos compostos fenólicos, a flavonona hesperetina tem sido usada como um marcador do mel de *Citrus* L. (FERRERES et al., 1993; FERRERES et al., 1994a) e o flavonol canferol para o mel *rosemary* (FERRERES et al., 1994b; FERRERES et al., 1998). Alguns ácidos fenólicos, como o ácido elágico no mel de urze, têm sido usados como marcadores florais (CHERCHI et al., 1994; FERRERES; ANDRADE; TOMÁS-BARBERÁN, 1996), e os hidroxycinamatos (ácido caféico, ácido *p*-cumárico e ácido ferúlico) em méis de castanha (CHERCHI et al., 1994). Outros possíveis marcadores podem ser encontrados, como o ácido abscísico no mel de urze (FERRERES; ANDRADE; TOMÁS-BARBERÁN, 1996). Um estudo do conteúdo de fenólicos no mel pode fornecer uma relação entre a sua composição química e a sua atividade antimicrobiana (SNOW; MANLEY-HARRIS, 2004).

2.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O mel tem sido usado com propósito medicinal desde tempos antigos, sendo que há relatos da sua utilização tópica, pela medicina Aiurvédica, que datam de 2500 a.C. Hipócrates prescreveu o uso do mel para várias indicações, incluindo o tratamento de feridas e gastrites; suas propriedades de cicatrização de ferimentos foram mencionadas no Alcorão e na Bíblia. O

mel faz parte da medicina tradicional há séculos, mas somente há algumas décadas foi submetido a investigações clínicas e laboratoriais (EMSEN, 2007).

O mel pode manter-se imune à deterioração por longos períodos de tempos. Essa sua característica intrínseca se deve a sua atividade antimicrobiana, que pode variar de acordo com a sua origem floral (SATO; MIYATA, 2000).

Existem vários fatores que podem contribuir com a propriedade antimicrobiana do mel, dentre os quais: baixa atividade de água (A_w), alta pressão osmótica, baixo valor de pH, sistema glucose-oxidase, com a formação de peróxido de hidrogênio, alta taxa carbono/nitrogênio, baixo potencial redox, relacionado ao alto conteúdo de açúcares redutores, baixo conteúdo de proteínas, presença de agentes químicos e substâncias voláteis (HOOPER, 1976; MOLAN, 1996; NATIONAL HONEY BOARD, 2006; WESTON, 2000; WHITE, 1979).

A atividade antimicrobiana do mel é devida, principalmente, ao peróxido de hidrogênio produzido enzimaticamente. No entanto, no mel não diluído, a acidez também é um significativo fator antimicrobiano. O pH, variando de 3,2 a 4,5, é baixo o suficiente para a inibição do desenvolvimento de patógenos, cujos valores de pH ótimos variam entre 7,2 e 7,4 (HOOPER, 1976; MOLAN, 1996; NATIONAL HONEY BOARD, 2006; SATO; MIYATA, 2000). Quando aplicado em áreas afetadas de tecidos, a acidez, o efeito osmótico e a maioria dos fatores fitoquímicos decrescem com a diluição; entretanto, a atividade do peróxido de hidrogênio aumenta de 2,5 a 50 vezes. Nesses valores, o peróxido atua como anti-séptico, sem causar danos celulares (POSTMES; BOOGAARD, VAN DEN HAZEN, 1993; WAHDAN, 1998).

O nível absoluto de peróxido de hidrogênio de qualquer mel é determinado por seus níveis de glucose-oxidase e catalase; quanto maior a quantidade de glucose-oxidase e menor a de catalase, maior será o teor de peróxido de hidrogênio (WHITE; SUBERS; SCHEPARTZ,

1963). O peróxido de hidrogênio pode ser destruído por componentes do mel, na reação com ácido ascórbico e íons metálicos, e pela ação da enzima catalase, originária do pólen e do néctar. Por meio de testes, com a degradação do peróxido de hidrogênio pela catalase, foi possível evidenciar a presença de outros fatores antimicrobianos no mel (MOLAN, 1996).

Allen; Molan e Reid (1991), em uma análise de méis uniflorais da Nova Zelândia, detectaram que várias amostras exibiam alta atividade antibacteriana devida a compostos não-peróxidos. A mais elevada atividade foi observada no mel de *manuka*, árvore nativa da Nova Zelândia (*Leptospermum scoparium* J. R. Forst. et. G. Forst. – Myrtaceae). Entretanto, nem todos os méis exibiram atividade antibacteriana não-peróxida, mas somente aqueles que pertenciam a localidades específicas, particularmente na região norte do país (MOLAN, 1995). Weston; Brocklebank e Lu (2000) realizaram a análise do perfil cromatográfico da fração fenólica de 19 amostras de mel de *manuka*; algumas, com alto nível de atividade antibacteriana não relacionada ao peróxido de hidrogênio, e outras, que não apresentaram essa atividade. Os resultados demonstraram que não houve diferenças nos cromatogramas das amostras, indicando que os compostos fenólicos não são os responsáveis pela ausência ou pela presença da atividade antibacteriana nos méis de *manuka*. Similarmente, pelos dados obtidos, os autores puderam evidenciar que a região geográfica não influencia na composição fenólica dos méis de *manuka* da Nova Zelândia.

Weston (2000) relata que os compostos voláteis que compõe o mel são, geralmente, provenientes do néctar e, alguns, são característicos de uma fonte floral específica. Embora se apresentem em grande variedade, devido a sua pequena concentração, esses compostos não fornecem significativa ação antimicrobiana, pelo menos em seu nível de ocorrência no mel.

A resistência bacteriana aos antibióticos continua sendo uma preocupação na área da saúde por todo o mundo. Desde que a utilização de antibióticos foi amplamente difundida, há 50 anos, as bactérias têm progressivamente desenvolvido resistência (HSUEH; CHEN; LUH,

2005). Com isso, estudos têm sido realizados com o objetivo de desenvolver novos compostos que possam ser usados, além da terapia antibiótica convencional. Shin e Ustunol (2005) relataram que a composição dos açúcares de méis, de diferentes origens florais, inibe o desenvolvimento de várias bactérias intestinais. Todos os fatores químicos e físicos fazem com que as propriedades terapêuticas do mel sejam únicas: rápida diminuição de infecções, rápida cicatrização de feridas, rápida supressão da inflamação, minimização de escaras, estimulação da angiogênese, bem como desenvolvimento dos tecidos epitelial e granular (MOLAN, 2002). O mel acelera a cicatrização de ferimentos quando aplicado topicamente ou por administração sistêmica (SUGUNA; CHANDRAKASAN; THOMAS JOSEPH, 1992).

Para que o mel seja utilizado com finalidade medicinal tópica, ele precisa atender a certos critérios, como estar livre de resíduos herbicidas, pesticidas, metais pesados e elementos radioativos; e ser esterilizado para prevenir infecções secundárias. Além disso, a glucose-oxidase deve ser preservada durante o processamento, para manter o potencial de prevenção de infecções, sem trazer danos aos tecidos lesionados (EMSEN, 2007).

O mel ocasionalmente contém esporos de *Clostridium botulinum*, havendo um grande risco de introdução desse patógeno em feridas, quando tratadas com mel (HUHTANEN; KNOX; SHIMANUKI, 1981). Esse risco é removido, se o mel passar pelo processo de esterilização. Entretanto, a glucose-oxidase, que gera o peróxido de hidrogênio, apresenta sensibilidade ao calor e não resiste à autoclave (MOLAN, 1992). Assim, a irradiação gama, utilizada para esterilizar itens médicos, como luvas cirúrgicas e curativos poliméricos, foi sugerida por Molan e Allen (1996) como uma possível alternativa para a esterilização do mel com finalidade terapêutica. Os resultados desse estudo demonstraram que não houve perda significativa de ambas as atividades antibacterianas (peróxida e não-peróxida), quando as amostras de mel foram submetidas à irradiação gama. Yusof et al. (2007) testaram a esterilização gama em amostras de méis Gelam da Malásia e observaram

que não houve modificações nos valores de pH e nas propriedades antibacterianas frente ao *Staphylococcus aureus*; entretanto, a viscosidade diminuiu significativamente.

Diferentes bactérias são responsáveis pela contaminação de ferimentos, pela colonização de feridas ou por infecções clínicas. Microrganismos, como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Streptococcus uberis*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* são freqüentemente isoladas de lesões de pele, em humanos e animais (BASUALDO et al., 2007). *S. aureus* metilicina-resistente (MRSA) ou *S. aureus* metilicina-sensível (MSSA) são as principais bactérias envolvidas em infecções de pele e tecidos (HALCÓN; MILKUS, 2004). Em pacientes que sofreram queimaduras, uma das mais sérias complicações é a infecção por *P. aeruginosa*, seguido por *K. pneumoniae*, *E. coli*, *S. aureus* e outros microrganismos patogênicos (NASSER; MABROUK; MAHER, 2003). As infecções por *S. epidermidis* são comumente adquiridas em hospitais, como consequência da contaminação de incisões cirúrgicas com microrganismos dos próprios pacientes ou da equipe de funcionários do hospital (VUONG; OTTO, 2002).

Diferente da maioria dos tratamentos convencionais tópicos, o mel não conduz ao desenvolvimento da resistência bacteriana a antibióticos e pode ser usado continuamente. Embora exista um interesse pela aplicação do mel para o tratamento de feridas, os profissionais médicos hesitam em usá-lo, devido à falta de praticidade na aplicação (BERGMAN et al., 1983; MOLAN, 1996). Estudos têm sido desenvolvidos para facilitar a utilização tópica do mel. Yusof et al. (2007) desenvolveram um sistema funcional de curativo incorporando mel *Gelam*, proveniente da Malásia, a uma formulação de hidrogel. Diferentes concentrações de mel (6 %, 8 %, 10 % e 15 %) foram adicionadas a uma mistura de polivinil pirrolidina (PVP), solução de proteína e polietilenoglicol (PEG). O hidrogel com 6 % de mel *Gelam* foi selecionado, baseado na aparência física. Os resultados revelaram que o mel pode

ter uma ação positiva na modulação da cicatrização de ferimentos quando incorporado a um hidrogel.

Emsen (2007) testou o uso tópico do mel esterilizado, com a finalidade de fixação rápida de enxertos de pele. Onze pacientes com lesões de diferentes etiologias foram submetidos ao tratamento. O mel demonstrou ser um efetivo agente na fixação dos enxertos, devido às suas propriedades terapêuticas. Não foram observadas complicações, como infecções, perda ou rejeição do enxerto. As maiores vantagens desse procedimento são a recuperação rápida do paciente, a fácil aplicação e o baixo custo da terapia.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a origem floral, a atividade antioxidante e a atividade antimicrobiana de méis com indicação monofloral, comercializados na região dos Campos Gerais do Paraná.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A partir de amostras de méis declarados como monoflorais, comercializados na região dos Campos Gerais do Paraná, foram estabelecidos como objetivos específicos:

- Avaliar a qualidade desses méis, por meio dos parâmetros físico-químicos;
- Identificar os tipos polínicos que compõem essas amostras de mel;
- Estabelecer a origem botânica dos méis, considerando os resultados da análise polínica;
- Analisar o conteúdo de fenólicos totais nas amostras de mel;
- Pesquisar a atividade antioxidante dessas amostras de mel;
- Verificar a atividade antibacteriana das amostras de mel, frente aos microrganismos *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

As análises das amostras de mel, produzido por *Apis mellifera*, foram realizadas nos laboratórios do CTA – Centro de Tecnologia de Alimentos do Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa e no Laboratório de Bioquímica e Análise Instrumental da ESALQ/USP – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo.

4.1 MATERIAL

Para a realização das análises, as amostras de mel foram obtidas por doação dos produtores dos municípios de Ponta Grossa, Castro e Ortigueira, pertencentes à Região dos Campos Gerais, e imediatamente armazenadas sob refrigeração. Foram utilizados reagentes de grau analítico, a palinoteca da Universidade Estadual de Ponta Grossa – PR e a literatura especializada em mel e análise polínica.

Foram coletadas 13 amostras de mel, declarados como monoflorais por seus produtores, conforme segue: três amostras de eucalipto, uma de flor-de-laranjeira, duas de vassoura, duas de capixingui, uma de gorocaia, uma de bracatinga, uma de aroeira, uma de assa-peixe branco e uma de caraguatá.

4.2 MÉTODOS

Em cada amostra de mel, foram realizadas as análises físico-químicas, a avaliação polínica e a determinação da atividade antioxidante e da atividade antimicrobiana.

4.2.1 Análises físico-químicas

Os parâmetros físico-químicos avaliados compreenderam a umidade, o teor de açúcares redutores, a concentração de sacarose aparente, as cinzas, o pH, a acidez, o índice de diastase, a concentração de hidroximetilfulfural (HMF) e a cor, a partir dos métodos citados na Tabela 3. A classificação em mel floral ou em mel de melato foi obtida pela Equação de Kirkwood, que relaciona os valores de pH, cinzas e açúcares redutores na matéria seca (KIRKWOOD; MITCHELL; SMITH, 1960, 1961).

Tabela 3 - Métodos utilizados para a determinação dos parâmetros físico-químicos em méis

Parâmetro Analisado	Método	Referência
Umidade	Refratometria	AOAC, 2000
Açúcares redutores	Titulometria de Lane-Eynon	BOGDANOV; MARTIN; LÜLLMANN, 1997
Sacarose aparente	Titulometria de Lane-Eynon	BOGDANOV; MARTIN; LÜLLMANN, 1997
Cinzas	Gravimetria	VARGAS, 2006
pH e acidez	pHmetria e Titulometria	BOGDANOV; MARTIN; LÜLLMANN, 1997; KOMATSU, 1996
Índice de diastase	Método de Malaspina	SANTOS; MALASPINA; PALMA, 2003
Hidroximetilfulfural (HMF)	Espectrofotometria	AOAC, 2000
Cor	Método de Bianchi	BIANCHI, 1981
Classificação em mel floral ou mel de melato	Equação de Kirkwood	KIRKWOOD; MITCHELL; SMITH, 1960, 1961

Os resultados foram expressos sob a forma de valor médio, com estimativa do desvio padrão, a partir dos ensaios realizados em triplicata.

4.2.2 Análise polínica

Para cada amostra de mel, foi retirada uma alíquota de 10 mL, sendo diluída em 20 mL de água destilada e centrifugada durante 10 min a 2000 g. O sobrenadante foi retirado e o sedimento foi disperso em 10 mL de água destilada, sendo novamente centrifugado por 5 min. O sobrenadante foi desprezado e, por meio de um cubo de gelatina glicerizada fixado na extremidade de um estilete, foi coletado o sedimento presente no fundo do tubo.

Três lâminas de cada amostra foram montadas contendo o material polínico (LOUVEAUX, MAURIZIO; VORWOHL, 1970).

A identificação dos tipos polínicos presentes em cada lâmina foi realizada por microscopia, com o auxílio da palinoteca da Universidade Estadual de Ponta Grossa e da literatura especializada (BARTH, 1989; MELHEN et al., 2003; TAKEDA et al., 2000, 2001, 2002a, 2002b).

A análise quantitativa foi realizada por meio da contagem sequencial de 100 grãos de pólen/repetição/amostra, determinando-se as porcentagens e as classes de ocorrência que, segundo Louveaux, Maurizio e Vorwohl (1970), são as seguintes: pólen dominante ($> 45 \%$ do total de grãos), pólen acessório (de 16 a 45 %), pólen isolado importante (de 3 a 15 %) e pólen isolado ocasional ($< 3 \%$).

A interpretação dos espectros polínicos, segundo as propriedades das espécies melíferas que os compõem, foi realizada de acordo com Barth (1989).

Os registros fotográficos foram obtidos em fotomicroscópio Olympus[®] BX 41, sendo que as escalas micrométricas foram fotografadas e ampliadas nas mesmas condições óticas.

4.2.3 Fenólicos totais e atividade antioxidante

4.2.3.1 Método de extração

O método de extração foi realizado de acordo com Ferreres et al. (1991), com modificações. De cada amostra de mel, 80 g foram completamente misturados com 5 partes de água, sendo o pH corrigido a 2,0 com HCl e, então, filtrados para a remoção de partículas sólidas. O filtrado foi transferido para um béquer contendo 80 g de resina Amberlite[®] XAD-2 (Fluka Chemie; poro: 9 nm, partícula: 0,3-1,2 mm), permanecendo sob agitação por 15 minutos. O filtrado e a resina foram transferidos para uma coluna (25x2 cm). Dessa forma, os compostos fenólicos ficaram retidos na resina, enquanto os açúcares e os outros compostos

polares foram eluídos com solvente aquoso. A coluna foi lavada com 100 mL de água acidificada e, em seguida, com 300 mL de água destilada. Toda a fração fenólica foi, então, eluída com aproximadamente 300 mL de metanol, até que desaparecesse a coloração da eluição, e concentrada sob pressão reduzida à temperatura de 60 °C (FERRERES et al., 1991), obtendo-se o extrato de fenólicos do mel (EFM).

4.2.3.2 Fenólicos totais

O conteúdo total de fenólicos no EFM foi determinado pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA, 1999). Esse método envolve a oxidação de fenólicos por um reagente amarelo heteropoliácido de fosfomolibdato e fosfotungstênio (reagente de Folin-Ciocalteu), com a medida colorimétrica do complexo azul Mo-W que se forma na reação em meio alcalino. Para a determinação de fenólicos totais, foram misturados 0,5 mL de EFM com 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu, diluído a 1:10, e com 2,0 mL de Na₂CO₃ a 4 %. A absorvância foi medida a 740 nm depois de 2 h de incubação no escuro à temperatura ambiente. A quantidade total de fenólicos foi expressa como mg de catequina equivalente (CE) por 100 g de mel.

4.2.3.3 Avaliação da atividade sequestrante do radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazila (DPPH)

A medida da atividade sequestrante do radical DPPH foi realizada de acordo com o método descrito por Yen e Wu (1999) e Chen et al. (2003). DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazila) é um radical livre estável que é capaz de aceitar um radical hidrogênio para tornar-se uma molécula diamagnética estável e, dessa forma, sofrer redução na presença de um antioxidante.

Para a avaliação da atividade antioxidante, o EFM reagiu com o radical estável DPPH em uma solução de etanol. Na forma de radical, o DPPH possui uma coloração violeta

intensa e uma absorção característica a 517 nm, a qual desaparece após a redução pelo hidrogênio retirado de um composto antioxidante. A mistura reacional foi constituída da adição de 0,5 mL do EFM, diluído a 10 % (V/V), de cada amostra, 3,0 mL de etanol e 0,3 mL da solução do radical DPPH, a 0,5 mmol.L⁻¹ em etanol. Adicionalmente, foi verificada a atividade antioxidante do padrão α -tocoferol, a 200 mg.L⁻¹, frente ao radical DPPH.

A atividade antioxidante (AA) foi determinada sob a forma de porcentagem, calculada através da taxa de declínio da absorvância da solução etanólica de DPPH-EFM, após 40 minutos de reação (fase estável), em relação à solução de referência (DPPH em etanol) de acordo com a Equação 1:

$$AA = \{[A(0) - A(t)] / A(0)\} \times 100 \text{ (Equação 1)}$$

onde:

A(0) = absorvância da solução referência de DPPH-etanol

A(t) = absorvância da solução DPPH-EFM

4.2.4 Atividade antimicrobiana

A determinação da atividade antimicrobiana das amostras de mel foi realizada por meio da prova de sensibilidade por diluição em Ágar (KONEMAN et al., 2001), sendo que os microrganismos utilizados foram: *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* e o meio de cultura foi o Ágar Müeller-Hinton.

4.2.4.1 Preparo do inóculo

Os microrganismos foram estriados em placas contendo o meio Agar Müeller-Hinton, preparado conforme as instruções do fabricante *Himedia Laboratories Pvt. Ltd.* As placas foram incubadas em estufa a 35 °C por 24 h, para posterior preparo do inóculo que

constou de colônias de bactérias em solução salina estéril (0,9 %) até obtenção de uma leve turvação, correspondente ao tubo nº 5 da escala McFarland.

Para padronização do inóculo, utilizou-se um controle de turbidez de BaSO₄, equivalente a solução padrão 0,5 de McFarland, sendo preparado da seguinte maneira: 0,5 mL de BaCl₂ 0,048 mol.L⁻¹ (1,175 % V/V de BaCl₂ . 2 H₂O) e 99,5 mL de H₂SO₄ 0,18 mol.L⁻¹ (1 % V/V), sendo homogeneizado constantemente para manter a suspensão. A densidade ótica correta do controle de turbidez foi verificada por colorimetria, sendo que a absorvância da solução padrão 0,5 de McFarland variou de 0,08 a 0,10, utilizando um comprimento de onda de 625 nm.

4.2.4.2 Preparo do meio contendo o mel

Foram utilizadas concentrações de mel de 10, 15, 20, 25 e 30 % para um volume constante de 20 mL do meio de cultura.

Todo o material utilizado foi esterilizado e o procedimento foi desenvolvido no interior da câmara de fluxo laminar, exceto a etapa de pesagem do mel, que foi realizada em um béquer estéril com uma espátula estéril, próximo à chama. Em um béquer, o mel foi incorporado ao meio de cultura Ágar Mueller-Hinton a uma temperatura de 45°C, sendo misturado com um bastão de vidro e, logo em seguida, vertido na placa. Com o Ágar já solidificado, foram espalhados 100 µL da suspensão bacteriana com a alça de Drigalski. As placas foram invertidas, identificadas e levadas à estufa a 35°C por 18-20 h. O crescimento bacteriano foi avaliado em UFC.mL⁻¹.

Como controles positivos, foram preparadas placas para cada microrganismo somente com o meio de cultura, sem a adição do mel, utilizando discos de antibióticos (ampicilina). Adicionalmente, foram preparadas placas contendo solução de glucose e frutose,

em iguais proporções, com diferentes concentrações (15, 20, 25 e 30 %), adicionadas a 20 mL de Ágar Müller-Hinton, sendo o volume das soluções de açúcares de 5 mL.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Os resultados, referentes aos parâmetros físico-químicos avaliados, estão sumarizados nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4 - Resultados das análises de umidade, açúcares redutores, sacarose aparente, cinzas e pH, para as 13 amostras de mel com indicação monofloral, comercializadas na região dos Campos Gerais – PR

Amostras	Umidade (%)	Açúcares redutores (%)	Sacarose aparente (%)	Cinzas (%)	pH
1	18,20	72,30 ($\pm 0,54$)	4,29 ($\pm 0,04$)	0,51 ($\pm 0,04$)	4,56 ($\pm 0,02$)
2	18,20	72,09 ($\pm 0,41$)	4,41 ($\pm 0,12$)	0,49 ($\pm 0,09$)	4,86 ($\pm 0,05$)
3	18,20	71,28 ($\pm 0,40$)	2,50 ($\pm 0,14$)	0,52 ($\pm 0,05$)	4,91 ($\pm 0,03$)
4	16,20	74,63 ($\pm 0,88$)	5,07 ($\pm 0,62$)	0,16 ($\pm 0,07$)	4,20 ($\pm 0,02$)
5	17,00	72,22 ($\pm 0,47$)	2,44 ($\pm 0,82$)	0,02 ($\pm 0,02$)	4,45 ($\pm 0,06$)
6	18,20	70,62 ($\pm 0,23$)	1,92 ($\pm 0,39$)	0,13 ($\pm 0,00$)	4,27 ($\pm 0,02$)
7	18,43	73,00 ($\pm 0,66$)	2,55 ($\pm 0,05$)	0,33 ($\pm 0,04$)	4,67 ($\pm 0,01$)
8	17,42	73,95 ($\pm 0,80$)	4,25 ($\pm 0,19$)	nd	4,04 ($\pm 0,03$)
9	18,12	71,87 ($\pm 0,48$)	3,33 ($\pm 0,21$)	0,27 ($\pm 0,03$)	4,61 ($\pm 0,01$)
10	17,46	69,97 ($\pm 0,23$)	2,27 ($\pm 0,39$)	0,28 ($\pm 0,03$)	4,45 ($\pm 0,02$)
11	17,47	70,10 ($\pm 0,39$)	1,25 ($\pm 0,15$)	0,26 ($\pm 0,09$)	4,51 ($\pm 0,01$)
12	15,10	71,55 ($\pm 1,01$)	4,21 ($\pm 0,34$)	0,17 ($\pm 0,06$)	4,03 ($\pm 0,00$)
13	15,27	70,88 ($\pm 0,79$)	3,28 ($\pm 0,27$)	0,11 ($\pm 0,02$)	3,91 ($\pm 0,01$)

Nota: nd = valores não detectados

Tabela 5 - Resultados das análises de acidez, índice de diastase, HMF, cor e classificação de origem, segundo Kirkwood, para as 13 amostras de mel com indicação monofloral, comercializadas na região dos Campos Gerais – PR

Amostras	Acidez (mEq.Kg ⁻¹)	Índice de diastase (Göthe)	HMF (mg.Kg ⁻¹)	Cor	Classificação de origem
1	19,17 (± 0,72)	7,15 (± 1,46)	0,80 (± 0,09)	Âmbar claro	Mel floral
2	18,75 (± 1,25)	13,57 (± 0,35)	14,47 (± 0,23)	Âmbar escuro	Mel floral
3	17,08 (± 0,72)	8,30 (± 0,25)	nd	Âmbar escuro	Mel floral
4	14,17 (± 0,72)	2,77 (± 0,04)	5,74 (± 0,09)	Âmbar claro	Mel floral
5	8,75 (± 0,00)	1,70 (± 0,15)	2,10 (± 0,00)	Âmbar extra-claro	Mel floral
6	10,42 (± 0,72)	3,63 (± 0,35)	3,49 (± 0,09)	Âmbar claro	Mel floral
7	22,08 (± 0,72)	10,97 (± 0,71)	0,35 (± 0,09)	Âmbar extra-claro	Mel floral
8	14,58 (± 0,72)	2,53 (± 0,16)	nd	Branco água	Mel floral
9	37,92 (± 1,91)	8,98 (± 0,63)	nd	Âmbar	Mel floral
10	17,5 (± 1,25)	3,83 (± 0,51)	0,50 (± 0,17)	Âmbar claro	Mel floral
11	18,33 (± 0,72)	5,37 (± 0,18)	2,35 (± 0,09)	Âmbar claro	Mel floral
12	12,50 (± 0,00)	2,56 (± 0,06)	1,60 (± 0,17)	Âmbar extra-claro	Mel floral
13	11,25 (± 0,00)	2,25 (± 0,43)	0,30 (± 0,00)	Âmbar claro	Mel floral

Nota: nd = valores não detectados

5.1.1 Umidade

O teor de umidade das amostras variou entre 15,10 e 18,43 %, respectivamente, para as amostras 12 e 7. Todas as amostras apresentaram valores de umidade inferior ao limite máximo (20 %) exigido pela legislação brasileira (BRASIL, 2000).

A legislação do Brasil é mais restritiva quanto ao teor de umidade do que a aplicada aos países europeus, que permite conteúdos de água até 21 % (BOGDANOV; MARTIN; LÜLLMANN, 1997). Essa restrição se deve, provavelmente, às condições climáticas do Brasil, pois em climas mais quentes, méis com teores de umidade acima de 20 % mostram-se susceptíveis à fermentação. Em muitas organizações europeias, como na Alemanha, Áustria, Bélgica, Espanha, Itália, e Suíça, são estabelecidos conteúdos máximos de umidade de 17,5 a 18,5 %, para classes especiais de mel (BOGDANOV et al., 1999). Assim como a legislação brasileira e os tratados do Mercosul, o *Codex Alimentarius* também estabelece um limite de

20 % de umidade para as amostras de méis (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2001; MERCOSUL, 1999).

A umidade do mel é influenciada pela origem botânica, por condições climáticas, pela época da colheita e pelo grau de maturação do mel, sendo um parâmetro de grande importância durante o armazenamento do produto (RODRÍGUEZ et al., 2004). O acondicionamento inadequado é outro fator que pode estar relacionado à alta umidade do mel. Por ser altamente higroscópico, o mel pode absorver água se for armazenado em locais úmidos ou em embalagens mal fechadas. Silva; Queiroz e Figueirêdo (2004) destacam, ainda, a possibilidade de méis, produzidos durante a época chuvosa, apresentarem maior umidade em função da saturação do ar e do grande fluxo de néctar mais diluído, que ocorrem logo após as chuvas.

Marchini; Moreti e Otsuk (2005) investigaram 121 amostras de mel de diferentes municípios de São Paulo, das quais 44 (36,40 %) revelaram umidade superior a 20 %. Sodré et al. (2007b) observaram valores de umidade acima da legislação em 10 % das 20 amostras analisadas, de diferentes municípios do estado do Ceará.

Silva, Queiroz e Figueirêdo (2004) analisaram méis produzidos no Piauí, a partir de floradas típicas da região semi-árida do Nordeste brasileiro (marmeleiro – *C. sonderianus*, jítirana – *H. suaveolens*, camaratuba - *Cratylia mollis* Mart. ex Benth, silvestre - *Serjania glabrata* Kunth e angico de bezerro *P. moniliformis*) e encontraram teores de umidade de 17,6 a 19,7 %. Vargas (2006) detectou, em méis de diversas origens botânicas da Região dos Campos Gerais do Paraná, valores de umidade situados entre 15,56 e 21,58 %, sendo que das 80 amostras analisadas, oito apresentaram teores de umidade acima de 20 %. Ouchemoukh; Louaileche e Schweitzer (2007) encontraram teores de umidade variando de 14,64 a 19,04 % em méis de diferentes origens florais da Argélia.

Dessa forma, os valores verificados no presente trabalho refletem uma adequação à legislação nacional e, comparativamente aos outros estudos, não revelou valores de umidade inadequados.

5.1.2 Açúcares redutores e sacarose aparente

Para a quantificação de açúcares redutores e sacarose aparente foi utilizado o procedimento de Lane-Eynon, método titulométrico recomendado pela legislação brasileira (BRASIL, 2000) e descrito pela *European Honey Commission* (BOGDANOV; MARTIN; LÜLLMANN, 1997). O teor de açúcares redutores variou de 69,97 ($\pm 0,23$) a 74,63 % ($\pm 0,88$), respectivamente, para as amostras 10 e 4. As estimativas do desvio padrão variaram de 0,23 a 1,01.

Na análise de sacarose aparente, os teores encontrados foram de 1,25 % ($\pm 0,15$) a 5,07 % ($\pm 0,62$) para as amostras 11 e 4, respectivamente. Foram calculados valores de estimativas do desvio padrão entre 0,04 e 0,82.

A legislação brasileira (BRASIL, 2000) estabelece dois diferentes limites para os teores de açúcares redutores e sacarose aparente, de acordo com a origem do mel: floral ou melato (Tabela 1). Para o mel floral, são indicados valores de 65 % e 6 %, respectivamente, como teor mínimo de açúcares redutores e como concentração máxima de sacarose aparente.

Descontando a margem de erro calculada pela estimativa de desvio padrão de cada amostra (+ ou $- S$, a partir do resultado obtido), todas as amostras analisadas atendem às especificações da legislação brasileira, tanto no que se refere ao teor de açúcares redutores quanto ao de sacarose aparente.

A legislação internacional, tomando como base diferentes referências, difere da brasileira em alguns aspectos, conforme apresentado na Tabela 6.

Tabela 6 - Padrões internacionais para açúcares redutores e sacarose aparente em méis

	<i>European Honey Commission</i> (BOGDANOV; MARTIN; LÜLLMANN, 1997)	<i>Codex Alimentarius</i> <i>Commission</i> (2001)	MERCOSUL (1999)
Açúcares redutores (mel floral)	mínimo 65 %	mínimo 60 %	mínimo 65 %
Açúcares redutores (mel de melato)	mínimo 60 %	mínimo 45 %	mínimo 60 %
Sacarose aparente (mel floral)	máximo 5 %	máximo 5 %	máximo 5 %
Sacarose aparente (mel de melato)	máximo 10 %	não especifica	máximo 15 %

Assim, de acordo com os padrões internacionais, apenas a amostra 4 apresentou teor de sacarose aparente acima do padrão exigido.

A *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) (2000) recomenda, para a análise de açúcares em mel, os métodos de Munson-Walker, cromatografia de coluna de carvão e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), além do método de Lane & Eynon. O *Codex Alimentarius Commission* (2001) recomenda a análise por CLAE, e a *European Honey Commission* indica os métodos de Lane & Eynon, CLAE e cromatografia gasosa (BOGDANOV; MARTIN; LÜLLMANN, 1997).

Altos teores de sacarose podem auxiliar na identificação de possíveis adulterações em méis, pela adição de xaropes de sacarose, parcialmente invertida. Porém, alguns adulterantes, como xaropes de glucose de milho, xaropes de alta frutose ou xaropes de sacarose totalmente invertida, não possuem sacarose, dificultando a identificação da adulteração, que poderá ser confirmada com análises de HMF e índice de diastase (VARGAS, 2006).

De acordo com os dados da Tabela 1, verifica-se que as amostras analisadas se encontram dentro dos padrões técnicos de identidade e qualidade de mel, estabelecidos pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2000), sendo o percentual máximo de sacarose aparente permitido de 6 % para méis florais. Entretanto, Sodré; Marchini e Carvalho (2001) afirmaram que a proporção de sacarose no mel deve ser em torno de 2-3 %

e, quando esse valor é muito alto, torna-se um indicativo do produto tratar-se de mel verde (de colheita prematura) ou adulterado.

Barth et al. (2005) encontraram méis provenientes do Sudeste do Brasil com teores de açúcares redutores de 67,40 a 83,20 %. Komatsu e Marchini (1996), analisando méis de flores silvestres produzidos por *Apis mellifera* no Estado de São Paulo, verificaram uma faixa de variação de 0,20 a 2,74 % e valor médio de 2,40 % de sacarose aparente.

Marchini; Moreti e Otsuk (2005), estudando méis de diferentes municípios do estado de São Paulo, obtiveram valores de açúcares redutores e sacarose aparente para méis de eucalipto variando de 67,70 a 77,10 % e 0,10 a 15,20 %, respectivamente. Já para méis silvestres, os valores de açúcares redutores e sacarose aparente variaram de 53,20 a 80,00 % e 0,20 a 27,40 %, respectivamente. Valores baixos de sacarose aparente, como 0,20 %, podem ser atribuídos à ação da invertase, que faz com que a quantidade de sacarose presente no mel decresça durante o armazenamento (ANKLAM, 1998). Cano et al. (1992) verificaram que 10,3 %, de um total de 173 amostras de méis comercializados em São Paulo, continham valores de sacarose aparente acima do limite estabelecido pela legislação.

Vargas (2006) encontrou valores de açúcares redutores e sacarose aparente variando de 58,75 a 82,37 % e de 0,00 a 14,70 %, respectivamente em méis da Região dos Campos Gerais – PR. Sodré et al. (2007b) detectaram, em amostras do Ceará, teores de açúcares redutores e sacarose aparente variando de 73,37 a 84,65 % e 0,16 a 7,63 %, respectivamente, sendo que de 20 amostras, 10 % apresentou valores acima do permitido pela legislação vigente.

Assim, verifica-se que os teores de açúcares redutores e de sacarose aparente das 13 amostras de mel analisadas, estão em conformidade com os limites estabelecidos pela legislação brasileira, mas diferem de parte dos valores encontrados por outros autores, anteriormente citados.

5.1.3 Cinzas

O teor de cinzas das amostras variou de 0,02 ($\pm 0,02$) a 0,52 % ($\pm 0,05$) para as amostras 5 e 3, respectivamente. O limite máximo, exigido pela legislação brasileira para mel floral, é de 0,6 % e, para mel de melato, é de 1,2 %. Esses limites são os mesmos estabelecidos pela *European Honey Commission* (BOGDANOV; MARTIN; LÜLLMANN, 1997) e pelo Mercosul (1999). A *Codex Alimentarius Commission* (2001) não estabelece limites para os teores de cinzas em mel. As estimativas de desvio padrão na análise de cinzas variaram de 0,00 a 0,10.

Descontando a margem de erro estabelecida pela estimativa de desvio padrão de cada amostra (+ ou $-S$, a partir do resultado obtido), nenhuma amostra ultrapassou o limite exigido pela legislação.

A porcentagem de cinzas presente no mel é um indicativo do conteúdo mineral e se constitui em um parâmetro amplamente utilizado para verificar a qualidade do mel (MARCHINI, MORETI; OTSUK, 2005). O conteúdo de cinzas no mel é geralmente pequeno e depende da sua origem botânica. O tipo de solo em que a planta fornecedora de néctar está localizada também influencia na quantidade dos minerais presentes nas cinzas (ANKLAM, 1998).

Felsner et al. (2004) obtiveram valores de cinzas em méis de eucalipto e de flor-de-laranjeira do estado de São Paulo variando de 0,32 a 0,42 % e de 0,08 a 0,13 %, respectivamente. Marchini; Moreti e Otsuk (2005) verificaram teores de cinzas em méis silvestres e de eucalipto, também no estado de São Paulo, de 0,03 a 0,92 % e de 0,07 a 0,32 %, respectivamente. Marchini; Moreti e Silveira Neto (2003) analisaram méis de cinco diferentes espécies de eucalipto e encontraram teores de cinzas compreendidos na faixa de 0,11 a 0,20 %. Vargas (2006) encontrou, para a análise de cinzas, teores variando de 0,01 a 1,68 % em méis da Região dos Campos Gerais - PR. Carvalho et al. (1998), trabalhando com

méis de seis municípios baianos, e Marchini e Moreti (2001), em méis provenientes de cinco espécies de eucalipto, detectaram que os teores de cinzas estavam dentro dos padrões estabelecidos pela legislação brasileira. Mendes et al. (1998) verificaram, em méis portugueses, teores de cinzas variando de 0,10 a 0,50 %.

Dessa forma, é possível indicar que os valores obtidos para as 13 amostras de méis florais se apresentam condizentes aos apontados pela literatura especializada.

5.1.4 Acidez

Os valores de acidez das amostras variaram entre 8,75 mEq.kg⁻¹ ($\pm 0,00$) e 37,92 mEq.kg⁻¹ ($\pm 1,91$) para as amostras 5 e 9, respectivamente. As estimativas de desvio padrão para acidez variaram de 0,00 a 1,91.

A legislação brasileira normatiza um limite máximo de 50 mEq.kg⁻¹ de acidez no mel (BRASIL, 2000). A *European Honey Commission* (BOGDANOV; MARTIN; LÜLLMANN, 1997) e o Mercosul (1999) são mais restritivos que a legislação brasileira e exigem um máximo de 40 mEq.kg⁻¹. A *Codex Alimentarius Commission* (2001) não estabelece limites para o teor de acidez no mel.

Descontando a margem de erro calculada pela estimativa de desvio padrão de cada amostra (+ ou - *S* a partir do resultado obtido), todas as amostras estão dentro dos limites exigidos pela legislação nacional e internacional.

A AOAC (2000) e a *European Honey Commission* (BOGDANOV; MARTIN; LÜLLMANN, 1997) descrevem três tipos de acidez: a acidez livre, a acidez lactônica e a acidez total, que é a soma das duas anteriores. O tipo de acidez a qual se refere à legislação é a acidez livre (BRASIL, 2000).

Um alto teor de acidez pode ajudar a identificar uma possível adulteração por xarope de sacarose ou amido invertido por hidrólise ácida. Porém, somente com a avaliação conjunta

de outros parâmetros como índice de diastase, teores de HMF, açúcares redutores e sacarose aparente é que se pode confirmar a adulteração. Um valor elevado de acidez no mel também pode indicar um estado de fermentação, principalmente se a umidade da amostra for superior a 20 % (VARGAS, 2006).

Faria (1993) obteve, para o mel de abelha elaborado a partir da florada de *Citrus* spp., um valor médio de $9,00 \text{ mEq.kg}^{-1}$ de mel. Silva, Queiroz e Figueirêdo (2004) encontraram que acidez livre do mel, expressa em termos de mEq.kg^{-1} , variou de 10,10 a 31,03. Marchini, Moreti e Otsuk (2005) obtiveram valores de 14,00 a 75,50 mEq.kg^{-1} para acidez em méis silvestres e de 12,50 a 55,00 mEq.kg^{-1} em méis de eucalipto, de diversos municípios do estado de São Paulo. Amostras de méis oriundas dos Campos Gerais – PR analisadas por Vargas (2006) apresentaram valores de acidez de 10,27 a 62,71 mEq.kg^{-1} . Sodré et al. (2007b) encontraram valores para a acidez em méis do Ceará situados na faixa de 10,00 a 42,00 mEq.kg^{-1} . Tosi et al. (2008) encontraram, em méis argentinos, valores de acidez entre 15,20 a 29,80 mEq.kg^{-1} .

Portanto, as amostras de mel em estudo revelaram uma adequação ao valor de acidez livre, quando comparadas às informações estabelecidas na literatura.

5.1.5 pH

As medidas de pH revelaram valores de 3,91 ($\pm 0,01$) a 4,91 ($\pm 0,03$), respectivamente, para as amostras 13 e 3. Não há limite estabelecido pelas legislações de caráter nacional e internacional para valores de pH no mel (BOGDANOV; MARTIN; LÜLLMANN, 1997; BRASIL, 2000; MERCOSUL, 1999). Valores muito altos de pH são detectados em caldas de sacarose, sem adição de ácido. Valores muito baixos podem ajudar a evidenciar adulteração por xarope de sacarose ou amido invertido, obtidos por hidrólise ácida.

Porém, para que seja confirmada a adulteração, devem ser avaliados outros parâmetros, principalmente o índice de diastase, o HMF, os açúcares redutores e a sacarose aparente.

Segundo Crane (1983), variações observadas no pH se devem, provavelmente, a particularidades da composição florística nas áreas de coleta, uma vez que o pH do mel pode ser influenciado pelo pH do néctar. Diferenças na composição do solo ou a associação de espécies vegetais para formar a composição final do mel, afirma Noronha (1997), podem também influenciar o pH desse produto.

Os valores médios de pH encontrados por Barth et al. (2005) oscilaram entre 3,30 e 4,60 em méis do Sudeste do Brasil. Ouchemoukh; Louaileche e Schweitzer (2007) detectaram, em méis da Argélia, valores de pH de 3,49 a 4,43. Vargas (2006) obteve valores variando de 3,60 a 5,35, em amostras provenientes da região dos Campos Gerais do Paraná. Sodré et al. (2007b) constataram valores de pH variando de 3,36 a 3,78, em amostras do Ceará. Os valores médios verificados em méis processados e não processados foi de 3,99 e 4,02, respectivamente, em amostras provenientes da Espanha (LOPÉZ et al, 1996).

Portanto, os valores verificados para o pH estão de acordo como os valores apontados por Vargas (2006), justamente para a região dos Campos Gerais. Enquanto que, os demais estudos estabelecem valores de pH ligeiramente inferiores a 4,60.

Não foi observada uma relação de proporcionalidade entre os valores de pH e de acidez (mEq.kg^{-1}) nas amostras investigadas no presente trabalho. Esse fato pode ser justificado em função do parâmetro pH ser relativo à concentração hidrogeniônica da solução, enquanto que a acidez depende da presença e das propriedades químicas como estrutura e grau de ionização de ácidos orgânicos e inorgânicos, como também do teor de aminoácidos existentes, encontrados tanto nas plantas utilizadas pelas abelhas, quanto na secreção produzida por elas (informação verbal)¹.

¹ Informação fornecida pelo Prof. Dr. Paulo Vitor Farago, do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Ponta Grossa, em abril de 2008.

5.1.6 Índice de diastase

O índice de diastase das amostras analisadas variou de 1,70 ($\pm 0,15$) a 13,57 ($\pm 0,35$) na escala Göthe, para as amostras 5 e 2, respectivamente. As estimativas do desvio padrão para a análise do índice de diastase variaram de 0,04 a 1,46.

A legislação exige um mínimo de diastase de 8 na escala Göthe ou 3, se o teor de HMF não ultrapassar 15 mg.kg⁻¹. Como todas as amostras revelaram valores de HMF abaixo de 15 mg.kg⁻¹, conforme o item 5.1.7, cinco amostras apresentaram índice de diastase abaixo do mínimo estabelecido pela legislação (3 na escala Göthe), considerando a margem de erro calculada pela estimativa de desvio padrão de cada amostra (+ ou - *S* a partir do resultado obtido).

A técnica utilizada no presente estudo, foi desenvolvida a partir de modificações no método original proposta pela *Codex Alimentarius Commission*, buscando reduzir as etapas de diluição, o tempo de ensaio e os valores de desvio-padrão, além de utilizar condições em que a resposta cinética da diastase apresentasse linearidade, conforme esperado para esse tipo de enzima (SANTOS; MALASPINA; PALMA, 1999).

A atividade diastásica é um parâmetro de qualidade do mel usado para determinar se o mel foi extensivamente aquecido durante o processamento (TOSI et al., 2008). O aquecimento diminui a quantidade de substâncias termolábeis e aromáticas presentes no mel. Essa perda é proporcional à temperatura e ao tempo de aquecimento. Problemas causados pelo aquecimento podem ser evidenciados pela avaliação de parâmetros, como o índice de diastase e o HMF (BOGDANOV; MARTIN; LÜLLMANN, 1997).

A adição de xaropes de açúcar invertido, preparados por aquecimento e inversão ácida da sacarose de cana-de-açúcar, pode reduzir o índice de diastase no mel, na mesma proporção da fraude, pois a diastase é uma enzima produzida pela abelha e transferida ao néctar, e que não está presente nesses xaropes (CRANE, 1983). O clima e as regiões de

produção podem fornecer méis com índices de diastase diferentes. Xaropes de alto teor de frutose, produzidos a partir de amido de milho, por ação de amilases e de isomerases, possuem atividade diastásica e podem ser usados na adulteração; no entanto, possuem também teores elevados de HMF. Dessa forma, a avaliação conjunta desses dois parâmetros se faz necessária, para definir a qualidade de uma amostra de mel (VARGAS, 2006). Ainda, para se detectar adulterações, é possível utilizar outras técnicas não citadas na legislação, como Fiehe e Lugol (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985; LANARA, 1981).

Persono-Oddo, Baldi e Accorti (1990), ao pesquisarem a presença de enzimas em méis uniflorais italianos de diversas origens botânicas, obtiveram valores de atividade diastásica muito diferentes dentro da mesma florada. Marchini, Moreti e Otsuk (2005), analisando méis de São Paulo, obtiveram valores referentes ao índice de diastase de 5,00 a 38,50 na escala Göthe para méis silvestres e de 5,00 a 23,80 na escala Göthe para méis de eucalipto. Vargas (2006) encontrou, para o índice de diastase, resultados que variaram de 1,19 a 47,14 na escala Göthe para méis produzidos na região dos Campos Gerais – PR. Sodré et al. (2007b) constataram que o índice de diastase variou de 5,30 a 43,39 em méis do Ceará, sendo que 35 %, de 20 amostras, encontravam-se com valores abaixo do permitido pela norma vigente. Silva; Queiroz e Figueirêdo (2004) detectaram índices variando de 10,08 a 20,83 na escala Göthe.

A fim de verificar o comportamento da atividade diastásica com o armazenamento, Azeredo; Azeredo e Damasceno (1999) testaram amostras de mel sob diferentes condições: 90, 180, 270 e 365 dias de armazenamento, em frascos de vidro à temperatura e luz ambiente, frascos de polipropileno à temperatura e luz ambiente e frascos de polipropileno ao abrigo da luz. Houve uma diminuição no valor da atividade diastásica com o passar do tempo, independente do tipo de recipiente e da forma de armazenamento. Em todos os casos, os

índices da enzima diminuíram após um ano de estocagem, mostrando a degradação da diastase sem, no entanto, alterar a qualidade dos méis.

Tosi et al. (2008) estudaram o efeito do aquecimento na atividade diastásica em duas etapas. Na primeira etapa, o aquecimento foi conduzido de maneira transitória, com temperaturas finais entre 60 a 100 °C e tempo padronizado de 14 s. Na segunda etapa, o tratamento foi isotérmico, as temperaturas foram mantidas entre 60 e 100 °C e os tempos de aquecimento entre 120 a 1200 s. Seis amostras com atividade diastásica inicial entre 25,8 a 11,2 na escala Göthe foram testadas. No aquecimento transitório, houve uma diminuição da atividade diastásica com o aumento da temperatura, em todos os ensaios; durante o aquecimento isotérmico, todas as amostras mostraram um decréscimo na atividade da enzima, em pequenos intervalos de tempo. Entretanto, ocorreu uma recuperação da atividade nos tratamentos com temperaturas médias durante longos períodos de tempo. A atividade chegou a zero em ambos os tratamentos à temperatura de 100 °C. Essas variações de comportamento fazem da atividade diastásica um parâmetro incerto para determinar se o mel foi submetido ao aquecimento.

Crane (1983) relata que méis de flor-de-laranjeira possuem baixos índices de diastase. Normalmente, méis de fluxos muito rápidos, quando as abelhas têm muito néctar acumulado para processar, possuem níveis enzimáticos mais baixos do que aqueles resultantes de fluxos menos abundantes. Da mesma forma, néctares com teor alto de açúcar, necessitam menos manipulação para serem convertidos em mel, do que néctares mais diluídos; sendo que esses méis, de néctares concentrados, tendem a ter níveis mais baixos de invertase e diastase. Geralmente, os fluxos densos são os mais comuns em países exportadores, do que em países importadores de mel.

De acordo com White Júnior (1992), os méis oriundos de regiões quentes e secas apresentam menores quantidades de enzimas do que aqueles provenientes de regiões quentes

e úmidas. White Júnior (1994) questiona a utilização do índice de diastase como parâmetro indicador da qualidade do mel, devido à grande variação da quantidade dessa enzima em méis recém-coletados e não aquecidos. Uma atenção especial por parte dos pesquisadores deve ser dada à interpretação desse parâmetro para verificar a possibilidade de adequar as normas às condições de produção de mel.

5.1.7 Hidroximetilfurfural (HMF)

As amostras apresentaram valores de HMF variando de 0,30 ($\pm 0,00$) a 14,47 ($\pm 0,23$) mg.kg^{-1} . Portanto, todas as amostras atenderam à especificação da legislação brasileira, que permite um teor máximo de HMF de 60 mg.kg^{-1} . As estimativas de desvio padrão para o HMF variaram de 0,00 a 0,23.

Para as normas internacionais, o conteúdo de HMF estabelecido é de no máximo 40 mg.kg^{-1} , algumas federações europeias exigem que os méis apresentem não mais que 15 mg.kg^{-1} de HMF (BOGDANOV et al., 1999).

O HMF (Figura 5) é considerado o mais importante produto de degradação do aquecimento do mel. É formado pela desidratação de hexoses, especialmente a pH 5,00 ou inferior, ou pela reação de Maillard (FENNEMA, 1996).

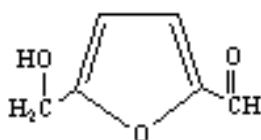


Figura 5 - Estrutura química do hidroximetilfurfural (HMF)
(Fonte: VARGAS, 2006)

Ele pode estar presente naturalmente no mel, mas seu nível elevado é um indicativo de superaquecimento, longa estocagem ou falsificação (BOGDANOV et al., 1999; FALLICO et al., 2004; WHITE JÚNIOR, 1994). Embora alguns autores relatem aumentos no teor de

HMF com o tempo de estocagem (DURAN et al., 1996) esses acréscimos apresentam pequena proporção, como observado em Faria (1993), que indica aumento de HMF em méis armazenados durante 450 d, com valor máximo de $3,50 \text{ mg.kg}^{-1}$. De acordo com White Júnior (1992), méis procedentes de países subtropicais, devido a altas temperaturas, podem apresentar, naturalmente, um alto conteúdo de HMF, sem que o mel tenha sido superaquecido ou adulterado.

A composição do mel tem um papel importante na cinética de formação do HMF (SINGH; BATH, 1997). Os teores de glucose e frutose, geralmente, correspondem de 85 a 95 % dos carboidratos presentes no mel e suas quantidades dependem da origem do produto; portanto, tanto a composição quanto as condições de armazenamento do mel interferem na cristalização e formação de HMF (CAVIA et al., 2002).

Esti et al. (1997) verificaram valores de HMF oscilando entre $0,80$ e $25,30 \text{ mg.kg}^{-1}$ em 55 amostra da região de Moisele, na Itália. Marchini; Moreti e Otsuk (2005) encontraram em méis de eucaliptos quantidades de HMF variando de $0,30$ a $207,20 \text{ mg.kg}^{-1}$; já para méis silvestres, os valores evidenciados foram de $1,00$ a $122,00 \text{ mg.kg}^{-1}$, sendo que 5,8 % do total de 121 amostras apresentaram valores acima do limite especificado pela legislação. Vargas (2006) obteve valores de HMF, para amostras dos Campos Gerais, variando de $0,37$ a $83,83 \text{ mg.kg}^{-1}$. Sodré et al. (2007b) detectaram valores de hidroximetilfurfural variando de $1,75$ a $126,50 \text{ mg.kg}^{-1}$, sendo que 20 % de um total de 20 amostras apresentaram valores acima do permitido pela norma vigente. Tosi et al. (2008) avaliaram méis florais provenientes da Argentina com valores de HMF variando de $5,80$ a $20,60 \text{ mg.kg}^{-1}$. Issa; De Jong e Horn. (1998) estudaram méis de *Apis*, jataí e melipona, provenientes do Brasil, Chile e Estados Unidos, observando que as amostras de coloração mais escura revelaram valores de HMF maiores, quando comparados às mais claras.

Dessa forma, os teores de HMF verificados no presente estudo refletem uma adequação às exigências estabelecidas pelas legislações nacional e internacionais e, comparativamente à literatura, revelou valores de HMF inferiores a 15 mg.kg^{-1} .

Turhan et al. (2007) determinaram o efeito do tratamento térmico no conteúdo de HMF em amostras de méis florais e de melato oriundas da Turquia, durante um processo isotérmico de aquecimento a temperaturas brandas. As amostras foram aquecidas a 75, 90 e 100°C por 15 a 90 min e analisadas por CLAE para a determinação do HMF. O aquecimento a 90°C por 90 min em méis florais e por 75 min em méis de melato não causou um significativo aumento do teor de HMF e não excedeu ao limite de 40 mg.kg^{-1} . Esses resultados demonstram que um excessivo conteúdo de HMF pode ser preferencialmente referente às condições primárias de estocagem do que ao superaquecimento.

5.1.8 Cor

As amostras apresentaram colorações variando do branco-água ao âmbar escuro. Portanto, todas as amostras analisadas enquadram-se aos critérios estabelecidos pela legislação (BRASIL, 2000). Uma porcentagem de 42,86 % das 13 amostras de méis analisadas foram classificadas como âmbar claro e 28,57 % como âmbar extra-claro, totalizando, aproximadamente, 72 % das amostras.

No mercado mundial, a cor do mel é um fator determinante. Países com tradição de consumo de mel, geralmente, preferem cores claras e sabor suave; conseqüentemente, os méis claros possuem maior valor comercial que os escuros (CRANE, 1983).

Para méis do Paraná, Marchini; Sodré e Sabadini (2004) verificaram que 55,60 % das amostras foram classificadas como âmbar claro. Anacleto e Marchini (2004), para amostras de mel de Pirassununga – SP, verificaram predominância de méis de cor âmbar-claro (28,00 %), seguido de branco-água (24,00 %). Para méis do Ceará, Sodré (2005) verificou que

40,00 % das amostras revelaram cor âmbar claro e 25,00 %, cor âmbar extra-claro. Vargas (2006), analisando amostras da região dos Campos Gerais – PR, também encontrou maior incidência das colorações âmbar claro e âmbar extra-claro. Ainda assim, os resultados do presente estudo estão de acordo com os indicados por Moreti et al. (2006) em méis de diferentes estados brasileiros. Das 346 amostras analisadas, um total de 44,52 % foi classificado como âmbar claro e 17,05 %, como âmbar extra-claro, o que constata que os méis brasileiros, em sua maioria, são méis de coloração clara.

A cor do mel depende de sua origem floral, processamento e armazenamento (SEEMANN; NEIRA, 1988). Além disso, está relacionada com fatores climáticos durante o fluxo de néctar e com a temperatura na qual o néctar é transformado em mel no interior da colméia (SMITH, 1967).

Alguns constituintes do mel são determinantes para seu escurecimento como: proporção de frutose/glucose, conteúdo de nitrogênio e aminoácidos livres, substâncias polifenólicas, conteúdo de minerais e instabilidade da frutose em solução ácida (BATH; SINGH, 1999; LYNN; ENGLIS; MILUM, 1936).

O mel parece ter cor mais clara depois que sofre o processo de cristalização. Isso se deve, principalmente, à transparência do mel líquido e à opacidade do mel cristalizado. A cor de qualquer amostra de mel cristalizada depende do tamanho do cristal, sendo que os cristais mais delgados conferem aparência mais clara (CRANE, 1983).

5.1.9 Classificação em mel floral ou mel de melato

A Equação de Kirkwood foi estabelecida para determinar a ocorrência de melato no mel. Kirkwood; Mitchell e Smith (1960, 1961) analisaram várias amostras de mel floral e de melato e, após identificarem os parâmetros que mais variaram, estabeleceram uma equação, baseada em estudos matemáticos, para ser aplicada na diferenciação desses dois tipos de mel.

Foram utilizados os resultados de pH, porcentagem de cinzas em matéria seca e porcentagem de açúcares redutores em matéria seca, a fim de obter uma função discriminativa X, sendo adotado o limite de 73,1, abaixo do qual o mel é classificado como mel de melato ou mistura de mel floral com mel de melato.

Aplicando a equação de Kirkwood, todas as amostras foram classificadas como mel floral. O valor de X, para cada amostra, variou de 75,99 a 94,52. Esses resultados permitem estabelecer, ainda, que a indicação dos fornecedores, com relação à procedência floral das amostras, foi correta e adequada.

Campos et al. (2003) compararam dois métodos de classificação em mel floral ou melato. Foram analisadas 25 amostras, sendo que os resultados foram utilizados para a classificação em mel floral ou mel de melato pela Equação de Kirkwood e pelo método de White, o qual se baseia na determinação da rotação óptica. Amostra de mel de melato, segundo White Júnior (1980), apresentam desvio maior que -2°S . Das 25 amostras analisadas, 11 foram classificadas como mel de melato, de acordo com Kirkwood e White. Apesar da divergência em 4 amostras, o teste exato de Fisher indicou que esses métodos são equivalentes e ambos podem ser usados para diferenciação de amostras de mel.

Vargas (2006) analisou 80 amostras de méis da região dos Campos Gerais – PR e classificou, segundo Kirkwood, 60 % como mel floral e 40 % como mel de melato, ou a mistura de mel de melato com mel floral. Porém, no presente estudo, não foi observada a presença de mel de melato nas amostras obtidas da região dos Campos Gerais.

5.2 ANÁLISE POLÍNICA

O espectro polínico das amostras analisadas está resumido na Tabela 7, sendo apresentadas as porcentagens médias dos diferentes tipos polínicos presentes nas amostras de méis avaliadas e sua classificação quanto à sua representatividade na amostra. Treze tipos

polínicos diferentes foram observados, dos quais oito foram considerados como pólen dominante ou acessório: *Eucalyptus* (Myrtaceae), *Mimosa scabrella* (Mimosaceae), *Citrus* (Rutaceae), *Acacia* (Mimosaceae), *Schinus* (Anacardiaceae), *Baccharis* (Asteraceae), *Ilex* (Aquifoliaceae) e *Vernonia* (Asteraceae).

Tabela 7 - Espectro polínico das 13 amostras de mel com indicação monofloral, comercializadas na região dos Campos Gerais – PR

Amostra	Pólen Dominante (>45%)	Pólen Acessório (16-45%)	Pólen Isolado Importante (3-15%)	Pólen Isolado Ocasional (<3%)
1	<i>Eucalyptus</i> (Myrtaceae) - 95,33			<i>Baccharis</i> (Asteraceae) - 2,67 <i>Ilex</i> (Aquifoliaceae) - 0,67 <i>Convolvulus</i> (Convolvulaceae) - 0,50 <i>Croton</i> (Euphorbiaceae) - 0,50 Palmae (Arecaceae) - 0,33
2	<i>Mimosa scabrella</i> (Mimosaceae) - 98,35			<i>Baccharis</i> (Asteraceae) - 0,33 <i>Eucalyptus</i> (Myrtaceae) - 0,33 <i>Vernonia</i> (Asteraceae) - 0,33 <i>Citrus</i> (Rutaceae) - 0,33 <i>Ilex</i> (Aquifoliaceae) - 0,33
3		<i>Schinus</i> (Anacardiaceae) - 39,33 <i>Ilex</i> (Aquifoliaceae) - 29,67 <i>Eucalyptus</i> (Myrtaceae) - 20,33	<i>Citrus</i> (Rutaceae) - 9,00	<i>Baccharis</i> (Asteraceae) - 0,67 <i>Vernonia</i> (Asteraceae) - 1,00
4		<i>Eucalyptus</i> (Myrtaceae) - 34,00 <i>Citrus</i> (Rutaceae) - 28,67 <i>Vernonia</i> (Asteraceae) - 17,67	<i>Schinus</i> (Anacardiaceae) - 6,67 <i>Acacia</i> (Mimosaceae) - 4,67 <i>Baccharis</i> (Asteraceae) - 4,67	Palmae (Arecaceae) - 1,67 <i>Ilex</i> (Aquifoliaceae) - 1,98
5	<i>Acacia</i> (Mimosaceae) - 78,33		<i>Citrus</i> (Rutaceae) - 5,33 <i>Eucalyptus</i> (Myrtaceae) - 7,33 <i>Schinus</i> (Anacardiaceae) - 4,67	Palmae (Arecaceae) - 0,67 <i>Ilex</i> (Aquifoliaceae) - 2,67 <i>Baccharis</i> (Asteraceae) - 1,00
6	<i>Eucalyptus</i> (Myrtaceae) - 47,33	<i>Citrus</i> (Rutaceae) - 27,67	<i>Acacia</i> (Mimosaceae) - 9,67 <i>Baccharis</i> (Asteraceae) - 8,00 Palmae (Arecaceae) - 5,33	<i>Vernonia</i> (Asteraceae) - 0,50 <i>Croton</i> (Euphorbiaceae) - 1,17 <i>Convolvulus</i> (Convolvulaceae) - 0,33
7	<i>Eucalyptus</i> (Myrtaceae) - 97,00			<i>Baccharis</i> (Asteraceae) - 0,33 <i>Citrus</i> (Rutaceae) - 0,33 <i>Ilex</i> (Aquifoliaceae) - 2,00 Poaceae - 0,34
8	<i>Citrus</i> (Rutaceae) - 82,00		<i>Baccharis</i> (Asteraceae) - 7,00 <i>Eucalyptus</i> (Myrtaceae) - 5,00 <i>Acacia</i> (Mimosaceae) - 3,00	<i>Vernonia</i> (Asteraceae) - 1,33 Palmae (Arecaceae) - 1,00 Rubiaceae - 0,67
9		<i>Ilex</i> (Aquifoliaceae) - 29,00 <i>Baccharis</i> (Asteraceae) - 21,00 <i>Eucalyptus</i> (Myrtaceae) - 20,00 <i>Citrus</i> (Rutaceae) - 19,66	<i>Acacia</i> (Mimosaceae) - 4,00 Palmae (Arecaceae) - 3,00	<i>Schinus</i> (Anacardiaceae) - 2,00 <i>Vernonia</i> (Asteraceae) - 0,67 <i>Convolvulus</i> (Convolvulaceae) - 0,67
10	<i>Citrus</i> (Rutaceae) - 59,00		<i>Baccharis</i> (Asteraceae) - 10,00 <i>Ilex</i> (Aquifoliaceae) - 14,00 <i>Eucalyptus</i> (Myrtaceae) - 6,67 <i>Acacia</i> (Mimosaceae) - 7,00	Palmae (Arecaceae) - 2,66 <i>Vernonia</i> (Asteraceae) - 0,67
11		<i>Citrus</i> (Rutaceae) - 24,33 <i>Baccharis</i> (Asteraceae) - 26,00 <i>Acacia</i> (Mimosaceae) - 25,00	<i>Ilex</i> (Aquifoliaceae) - 6,67 <i>Eucalyptus</i> (Myrtaceae) - 8,67 Palmae (Arecaceae) - 4,00 <i>Schinus</i> (Anacardiaceae) - 3,00	<i>Vernonia</i> (Asteraceae) - 2,33
12	<i>Acacia</i> (Mimosaceae) - 47,00	<i>Baccharis</i> (Asteraceae) - 17,00	<i>Citrus</i> (Rutaceae) - 14,00 <i>Vernonia</i> (Asteraceae) - 8,67 <i>Eucalyptus</i> (Myrtaceae) - 9,33	<i>Schinus</i> (Anacardiaceae) - 1,67 <i>Ilex</i> (Aquifoliaceae) - 1,33 Palmae (Arecaceae) - 1,00
13		<i>Citrus</i> (Rutaceae) - 22,33 <i>Schinus</i> (Anacardiaceae) - 20,33 <i>Eucalyptus</i> (Myrtaceae) - 21,67	<i>Acacia</i> (Mimosaceae) - 12,33 <i>Ilex</i> (Aquifoliaceae) - 11,33 <i>Baccharis</i> (Asteraceae) - 5,00 Palmae (Arecaceae) - 5,33	<i>Croton</i> (Euphorbiaceae) - 1,68

Para a análise polínica, além de realizar a separação dos tipos de grãos de pólen observados nas amostras de mel em classes de frequência, é necessário avaliar e ponderar essas categorias, relacionando-as às propriedades e características das plantas que os produziram (BARTH, 1989; BARTH et al., 2005). Dessa forma, a interpretação dos espectros polínicos das amostras foi realizada individualmente, segundo as características das espécies melíferas que nelas ocorreram.

Amostra 1 (Figura 6a) – A análise polínica desse mel foi caracterizada pela presença dominante do tipo polínico *Eucalyptus* (Myrtaceae), ausência de pólen acessório e pólen isolado importante e presença de cinco tipos polínicos enquadrados como pólen isolado ocasional: *Bacharis* (Asteraceae), *Ilex* (Aquifoliaceae), *Convolvulus* (Convolvulaceae), *Croton* (Euphorbiaceae) e Palmae (Arecaceae). Concluindo-se que a amostra em questão trata-se de mel de eucalipto (tipo *Eucalyptus*, Myrtaceae), pois a quantidade de néctar fornecida pelas espécies de pólen isolado não são significativas, sendo sua importância reservada à determinação da procedência geográfica da amostra.

Amostra 2 (Figura 6b) – O tipo polínico *Mimosa scabrella* (Mimosaceae) apresentou dominância no espectro polínico desse mel. Não foram encontradas espécies compondo as classes de pólen acessório e pólen isolado importante. Cinco tipos polínicos foram classificados como pólen isolado ocasional: *Bacharis* (Asteraceae), *Eucalyptus* (Myrtaceae), *Vernonia* (Asteraceae), *Citrus* (Rutaceae) e *Ilex* (Aquifoliaceae). Assim, a amostra foi identificada como mel de uma espécie do gênero *Mimosa*, provavelmente *M. scabrella* (bracatinga). Várias espécies do gênero *Mimosa* L. possuem grãos do tipo polínico *Mimosa scabrella*, tornando-se impossível a separação por espécies (BARTH, 1989). Entretanto, sabe-se que a bracatinga é uma espécie nativa de alto valor apícola e comumente encontrada na região dos Campos Gerais. As demais espécies (*Mimosa adenocarpa* Benth., *Mimosa calycina* Benth., *Mimosa eriocaulis* Benth., *Mimosa hypoglauca* Mart.,

Mimosa lanata Benth., *Mimosa meticulosa* Mart., *Mimosa monticola* Dusén, *Mimosa pudica* L., *Mimosa regnellii* Benth., *Mimosa sensitiva* L., *Mimosa somnians* Humb. & Bonpl. ex Willd. e *Mimosa vellosiella* Herter), que possuem as mesmas características morfológicas desse tipo polínico, possuem importância apícola desconhecida (BARTH, 1989). Os cinco tipos polínicos presentes nesse mel, como pólen isolado, podem contribuir para a caracterização da origem geográfica da amostra.

Amostra 3 (Figura 6c) – Nenhum tipo polínico apresentou frequência dominante nesse mel. Na amostra, foram encontrados três tipos polínicos, presentes como pólen acessório: *Schinus* (Anacardiaceae), *Ilex* (Aquifoliaceae) e *Eucalyptus* (Myrtaceae). O táxon *Citrus* (Rutaceae) apareceu como pólen isolado importante e *Baccharis* (Asteraceae) e *Vernonia* (Asteraceae) representaram a classe de pólen isolado ocasional. Foi concluído que essa amostra pode ser classificada como de mel de aroeira (tipo *Schinus*, Anacardiaceae) e erva-mate (tipo *Ilex*, Aquifoliaceae), acompanhado de néctar de laranjeiras (tipo *Citrus*, Rutaceae) e pequena quantidade de néctar de eucalipto (tipo *Eucalyptus*, Myrtaceae). Embora o tipo polínico *Citrus* tenha sido classificado como pólen isolado importante, deve-se considerar a sub-representação das espécies desse gênero no espectro polínico, de forma que a quantidade de néctar fornecido é maior do que a quantidade de grãos de pólen presentes no mel. No caso da presença do tipo *Eucalyptus*, embora classificado como pólen acessório, sua contribuição em néctar é pequena, devido à sua super-representação nos espectros polínicos (BARTH, 1989). Os tipos *Baccharis* e *Vernonia* podem ter importância somente quanto à procedência regional da amostra.

Amostra 4 (Figura 6d): A análise desse mel não revelou nenhum tipo polínico dominante. Três tipos polínicos foram classificados como pólen acessório: *Eucalyptus* (Myrtaceae), *Citrus* (Rutaceae) e *Vernonia* (Asteraceae). Composto as classes de pólen isolado, foram encontrados: *Schinus* (Anacardiaceae), *Acacia* (Mimosaceae), *Baccharis*

(Asteraceae), Palmae (Arecaceae) e *Ilex* (Aquifoliaceae). Dessa forma, é possível concluir que a amostra é de mel de laranjeiras (tipo *Citrus*, Rutaceae), acompanhado de néctar de assa-peixe (tipo *Vernonia*, Asteraceae) e pequena quantidade de néctar de eucalipto (tipo *Eucalyptus*, Myrtaceae). O tipo polínico *Eucalyptus*, encontrado como pólen acessório, contribui com uma pequena quantidade de néctar, devido à sua super-representação. Os grãos de pólen das demais espécies encontradas não têm influência sobre a quantidade de néctar, mas podem estar relacionadas quanto à procedência geográfica da amostra.

Amostra 5 (Figura 6e): O tipo polínico dominante no espectro polínico desse mel foi representado por *Acacia* (Mimosaceae). Caracterizou-se, também pela ausência de pólen acessório e pela presença de seis tipos diferentes de pólen isolado: *Citrus* (Rutaceae), *Eucalyptus* (Myrtaceae), *Schinus* (Anacardiaceae), Palmae (Arecaceae), *Ilex* (Aquifoliaceae) e *Baccharis* (Asteraceae). Assim, essa amostra trata-se de mel de uma Mimosaceae do tipo *Acacia*, planta sub-representada nos espectros polínicos. Diversos gêneros e várias espécies possuem grãos de pólen do tipo *Acacia*, como *Acacia*, *Piptadenia* Benth., *Pityrocarpa* (Benth.) Britton & Rose e *Newtonia* Baill., sendo que a determinação da espécie em geral não é possível (BARTH, 1989). As seis demais espécies não têm contribuição nectarífera, mas são importantes para poder caracterizar a amostra no que se refere à origem geográfica.

Amostra 6 (Figura 6f): Foi encontrado como pólen dominante, no espectro dessa amostra de mel, o tipo polínico *Eucalyptus* (Myrtaceae). Como pólen acessório foi verificada a presença de *Citrus* (Rutaceae) e, como pólen isolado, foram observadas as presenças de *Acacia* (Mimosaceae), *Baccharis* (Asteraceae), Palmae (Arecaceae), *Vernonia* (Asteraceae), *Croton* (Euphorbiaceae) e *Convolvulus* (Convolvulaceae). A amostra em questão foi identificada como mel de laranjeiras (tipo *Citrus*, Rutaceae) e eucalipto (tipo *Eucalyptus*, Myrtaceae). A maior contribuição nectarífera nesse mel é dada por *Citrus*, seguida por *Eucalyptus*, considerando as sub- e super-representação, desses tipos polínicos,

respectivamente. As espécies que constituem o pólen isolado podem contribuir para a elucidação da origem regional da amostra.

Amostra 7 (Figura 7a): O espectro polínico desse mel apresentou *Eucalyptus* (Myrtaceae) como tipo polínico dominante, ausência tanto de pólen acessório quanto de pólen isolado importante. Constituindo a classe de pólen isolado ocasional, estiveram presentes *Baccharis* (Asteraceae), *Citrus* (Rutaceae), *Ilex* (Aquifoliaceae) e Poaceae. Assim, a amostra foi identificada como mel de eucalipto (tipo *Eucalyptus*, Myrtaceae). A quantidade de néctar fornecida pelas espécies de pólen isolado não são significativas, sendo sua importância reservada à procedência geográfica da amostra.

Amostra 8 (Figura 7b): Esse mel apresentou pólen dominante tipo *Citrus* (Rutaceae), ausência de pólen acessório e seis tipos de pólen isolado: *Baccharis* (Asteraceae), *Eucalyptus* (Myrtaceae), *Acacia* (Mimosaceae), *Vernonia* (Asteraceae), Palmae (Arecaceae) e Rubiaceae. Dessa forma, é possível concluir que a amostra é de mel de laranjeiras (tipo *Citrus*, Rutaceae). As demais espécies presentes não influenciam na quantidade de néctar, mas podem contribuir para a elucidação da origem geográfica da amostra.

Amostra 9 (Figura 7c): O espectro polínico desse mel foi caracterizado pela ausência de pólen dominante e pela presença de quatro tipos de pólen acessório: *Ilex* (Aquifoliaceae), *Baccharis* (Asteraceae), *Eucalyptus* (Myrtaceae) e *Citrus* (Rutaceae). Composto as classes de pólen isolado foram encontrados: *Acacia* (Mimosaceae), Palmae (Arecaceae), *Schinus* (Anacardiaceae), *Vernonia* (Asteraceae) e *Convolvulus* (Convolvulaceae), sendo concluído que a amostra trata-se de mel de laranjeiras (tipo *Citrus*, Rutaceae) com contribuição de néctar de erva-mate (tipo *Ilex*, Aquifoliaceae), de uma Asteraceae do tipo *Baccharis* e de eucalipto (tipo *Eucalyptus*, Myrtaceae). A contribuição nectarífera de *Eucalyptus* é pequena devido à sua super-representação nos espectros polínicos.

As espécies que constituem o pólen isolado dessa amostra podem contribuir para a determinação de sua procedência geográfica.

Amostra 10 (Figura 7d): Esse mel apresentou dominância do tipo polínico *Citrus* (Rutaceae), ausência de pólen acessório e presença de seis tipos de pólen isolado: *Baccharis* (Asteraceae), *Ilex* (Aquifoliaceae), *Eucalyptus* (Myrtaceae), *Acacia* (Mimosaceae), *Palmae* (Arecaceae) e *Vernonia* (Asteraceae), concluindo-se que a amostra é de mel de laranjeiras (tipo *Citrus*, Rutaceae). A quantidade de néctar fornecida pelas espécies de pólen isolado não são significativas, sendo sua importância reservada à procedência geográfica da amostra.

Amostra 11 (Figura 7e): No espectro polínico desse mel foi observado ausência de pólen dominante, presença de três tipos de pólen acessório: *Citrus* (Rutaceae), *Baccharis* (Asteraceae), *Acacia* (Mimosaceae); e cinco tipos de pólen isolado: *Ilex* (Aquifoliaceae), *Eucalyptus* (Myrtaceae), *Palmae* (Arecaceae), *Schinus* (Anacardiaceae) e *Vernonia* (Asteraceae). Dessa forma, conclui-se que a amostra em questão é de mel de laranjeiras (tipo *Citrus*, Rutaceae) acompanhada de néctar de uma Mimosaceae do tipo *Acacia* e de uma Asteraceae do tipo *Baccharis*. Os constituintes do pólen isolados podem caracterizar a origem geográfica da amostra.

Amostra 12 (Figura 7f): O tipo polínico *Acacia* (Mimosaceae) apresentou dominância no espectro polínico. Como pólen acessório foi observada a presença de *Baccharis* (Asteraceae) e o pólen isolado foi constituído por seis tipos polínicos: *Citrus* (Rutaceae), *Vernonia* (Asteraceae), *Eucalyptus* (Myrtaceae), *Schinus* (Anacardiaceae), *Ilex* (Aquifoliaceae) e *Palmae* (Arecaceae). A amostra foi identificada como mel de uma Mimosaceae do tipo *Acacia* e laranjeiras (tipo *Citrus*, Rutaceae), acompanhado de néctar de uma Asteraceae do tipo *Baccharis*. Embora o tipo *Citrus* tenha sido classificado como pólen isolado importante, sua contribuição em néctar é maior em relação à quantidade de pólen fornecida. Os demais tipos polínicos que se apresentaram nesse espectro polínico,

pertencentes ao pólen isolado, podem contribuir para caracterização da origem geográfica da amostra.

Amostra 13 (Figura 7g): O espectro polínico desse mel foi caracterizado pela ausência de pólen dominante, presença de três tipos polínicos como pólen acessório: *Citrus* (Rutaceae), *Schinus* (Anacardiaceae) e *Eucalyptus* (Myrtaceae); e cinco tipos polínicos como pólen isolado: *Acacia* (Mimosaceae) *Ilex* (Aquifoliaceae), *Baccharis* (Asteraceae), *Palmae* (Arecaceae) e *Croton* (Euphorbiaceae). Assim, foi concluído que se trata de mel de laranjeiras (tipo *Citrus*, Rutaceae) acompanhado de néctar de aroeira (tipo *Schinus*, Anacardiaceae) e com pequenas contribuições de néctar de uma Mimosaceae do tipo *Acacia* e eucalipto (tipo *Eucalyptus*, Myrtaceae). O tipo *Acacia*, embora classificado como pólen isolado importante, tem uma contribuição nectarífera maior do que a quantidade de pólen fornecida, devido à sua sub-representação nos espectros polínicos. Já o tipo *Eucalyptus*, foi classificado como pólen acessório, entretanto, sua contribuição nectarífera é pequena em relação à quantidade de pólen fornecida. Os demais tipos polínicos presentes nesse espectro podem contribuir com a caracterização da origem regional da amostra.

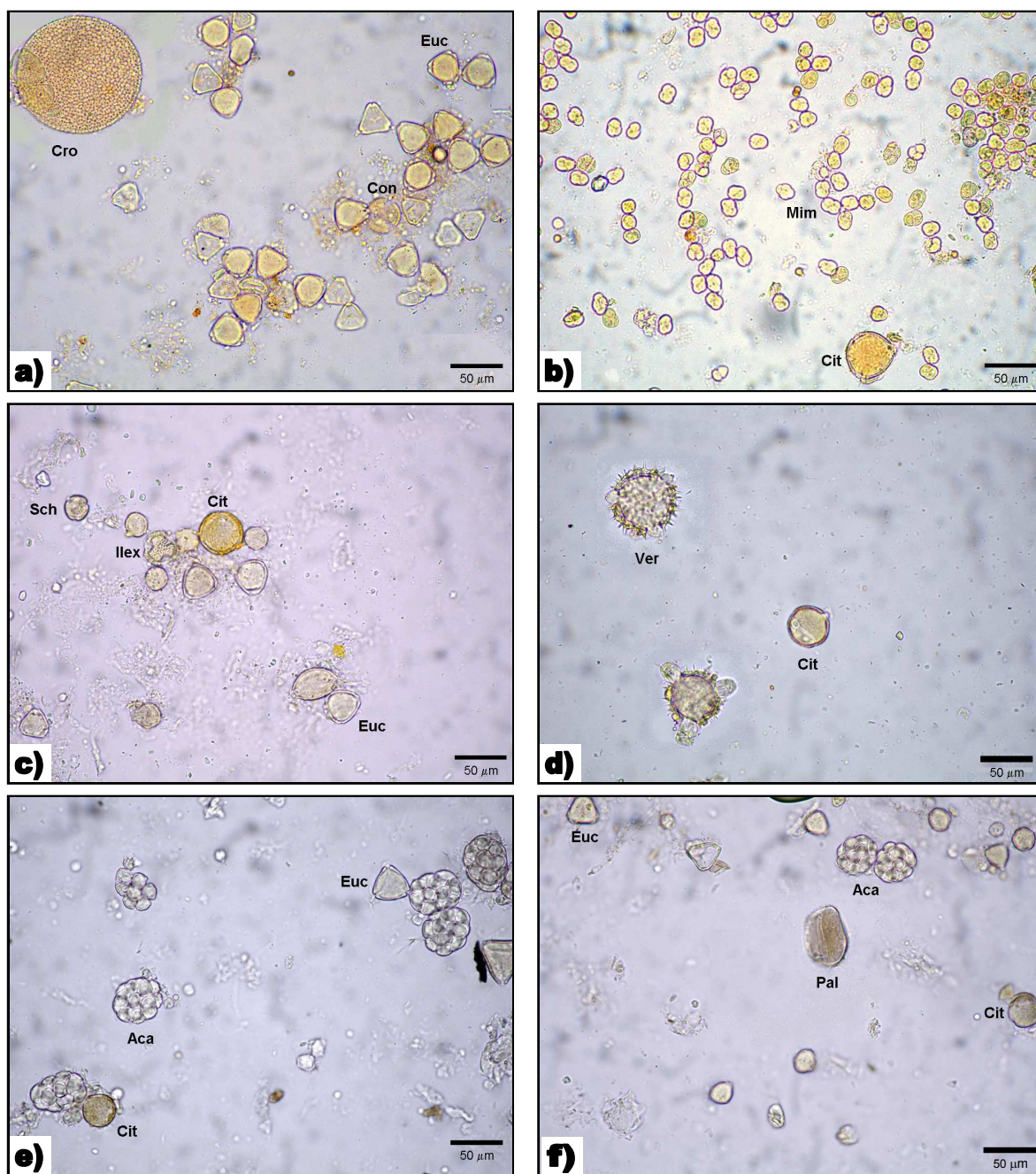


Figura 6 - Microscopia ótica das amostras 1 a 6 (aumento de 400X). Tipos polínicos: Aca – *Acacia*; Cit – *Citrus*; Con – *Convolvulus*; Cro – *Croton*; Euc – *Eucalyptus*; Ilex – *Ilex*; Mim – *Mimosa scabrella*; Pal – *Palmae*; Sch – *Schinus*; Ver – *Vernonia*

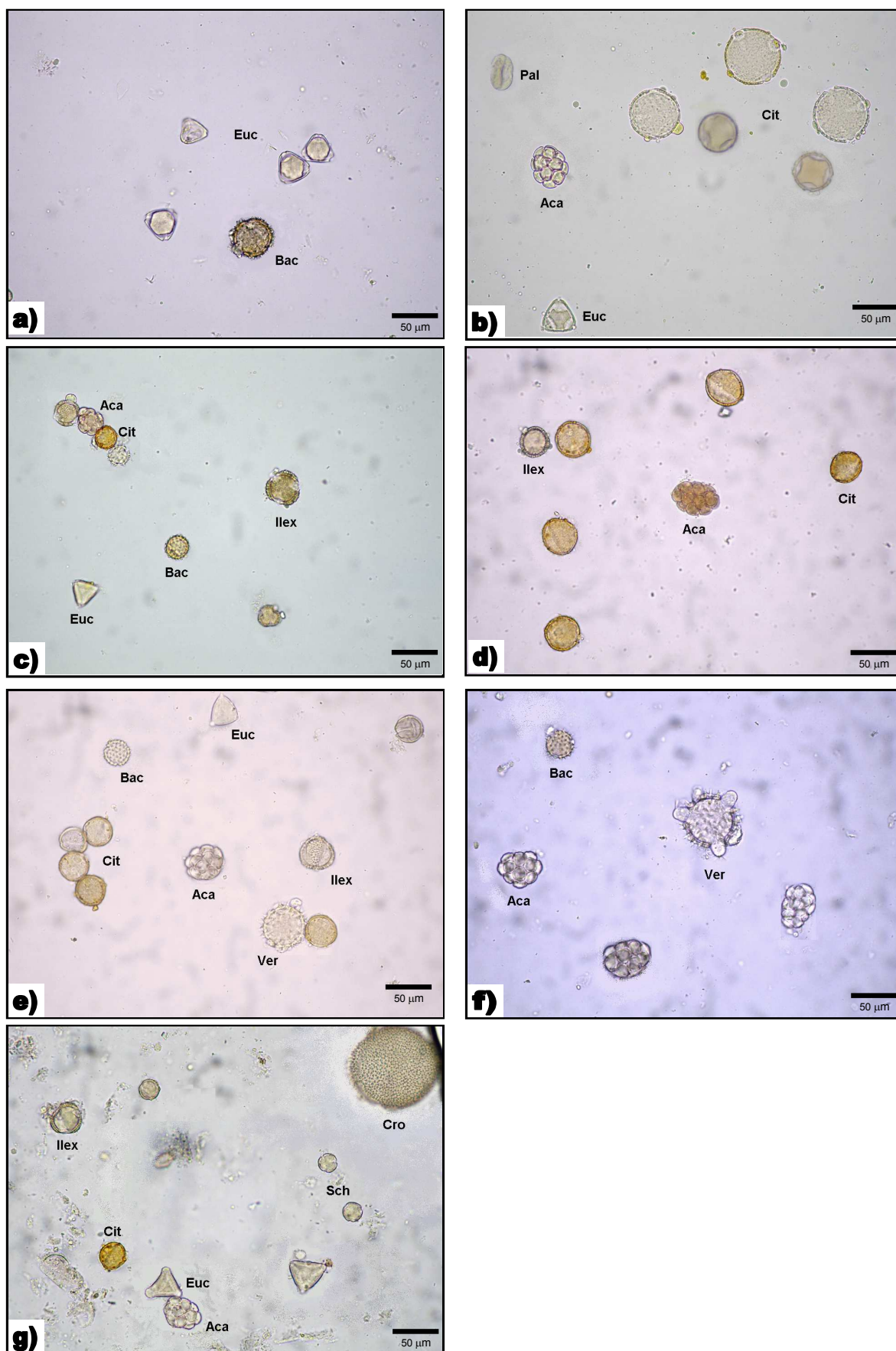


Figura 7 - Microscopia ótica das amostras 7 a 13 (aumento de 400X). Aca – *Acacia*; Bac – *Baccharis*; Cit – *Citrus*; Cro – *Croton*; Euc – *Eucalyptus*; Ilex – *Ilex*; Pal – *Palmae*; Sch – *Schinus*; Ver – *Vernonia*

Assim, de acordo com a interpretação do espectro polínico, seis amostras foram identificadas como mel monofloral, sendo duas de eucalipto (tipo *Eucalyptus*, Myrtaceae), duas de laranjeiras (tipo *Citrus*, Rutaceae), uma de Mimosaceae do tipo *Acacia* e uma do gênero *Mimosa* L. (bracatinga). Uma amostra foi caracterizada como sendo um mel bifloral, formado por laranjeiras e eucalipto, e seis apresentaram mais de dois taxa botânicos (Tabela 8).

Tabela 8 - Origem botânica das amostras de mel analisadas, conforme declaração dos produtores e resultados da análise polínica

Amostra	Município de origem	Origem botânica declarada pelo produtor/rótulo	Origem botânica determinada pela análise polínica
1	Ortigueira	eucalipto	eucalipto
2	Ortigueira	bracatinga	espécie do gênero <i>Mimosa</i> (bracatinga)
3	Ortigueira	aroeira	aroeira, erva-mate, laranjeiras e eucalipto
4	Ortigueira	assa-peixe	laranjeiras, assa-peixe e eucalipto
5	Ortigueira	caraguatá	Mimosaceae tipo <i>Acacia</i>
6	Ortigueira	capixingui	laranjeiras e eucalipto
7	Castro	eucalipto	eucalipto
8	Castro	laranjeiras	laranjeiras
9	Ponta Grossa	eucalipto	laranjeiras, erva-mate, Asteraceae tipo <i>Baccharis</i> e eucalipto
10	Ortigueira	vassoura	laranjeiras
11	Ortigueira	vassoura	laranjeiras, Mimosaceae tipo <i>Acacia</i> e Asteraceae tipo <i>Baccharis</i>
12	Ortigueira	gorocaio	Mimosaceae tipo <i>Acacia</i> , laranjeiras e Asteraceae tipo <i>Baccharis</i>
13	Ortigueira	capixingui	laranjeiras, aroeira, Mimosaceae tipo <i>Acacia</i> e eucalipto

Além disso, foi possível observar que, das seis amostras classificadas como monofloral, apenas quatro confirmaram a origem botânica declarada pelo produtor. Porém, as amostras 3, 4, 9 e 12, embora tenham sido identificadas como méis heteroflorais, foram

constituídas, parcialmente, pela contribuição nectarífera da planta indicada pelo apicultor. Em contrapartida, as amostras 5, 6, 10, 11 e 13, não apresentaram a participação nectarífera das espécies apontadas. Esses resultados demonstram que há certa falta de correspondência entre a origem botânica informada pelo comércio e a estabelecida cientificamente pela análise polínica, o que também foi verificado por Horn (1997) e Barth et al. (2005).

Não foram encontrados elementos figurados indicativos de mel de melato em nenhuma das amostras. Segundo Barth (1970), os méis brasileiros são pobres em melato. Aires e Freitas (2001) não encontraram contribuição significativa de melato no mel cearense. Barth et al. (2005) identificaram a presença de melato em uma das 31 amostras do Sudeste do Brasil. Entretanto, na região dos Campos Gerais – PR, Vargas (2006) classificou 40 % das 80 amostras analisadas como mel de melato ou a mistura de mel de melato com mel floral, segundo a Equação de Kirkwood.

Além das espécies nativas, algumas plantas exóticas também podem ter importância melífera, quando cultivadas em certas regiões. No presente trabalho, ficou evidente que *Eucalyptus* spp. e *Citrus* spp., embora não sejam plantas endêmicas da região dos Campos Gerais, possuem potencial para contribuir substancialmente na composição nectarífera dos méis dessa região. Aires e Freitas (2001), em um estudo no Ceará, também identificaram a importância de espécies exóticas, como *Eucalyptus* spp., *A. virgata* e *C. nucifera*, na produção dos méis desse estado. Bastos, Silveira e Soares (2003), analisando méis produzidos em áreas de cerrado de Minas Gerais, encontraram, em amostras do município de Cachoeira da Prata, a dominância de grãos de pólen de *Eucalyptus* sp. durante a estação seca, confirmando o potencial nectarífero e polinífero dessa espécie exótica, cultivada em áreas de reflorestamento ao redor dos apiários.

O mel de laranjeiras é muito apreciado pelos consumidores e sua procura estimula os apicultores a transportar suas colméias para regiões de plantação de laranjeiras, geralmente no

estado de São Paulo. Essa prática é responsável, em grande parte, pela contribuição nectarífera de *Citrus* spp. nos méis comercializados na região dos Campos Gerais – PR.

Os tipos polínicos encontrados por Ramalho et al. (1991) em amostras do estado do Paraná podem ser sumarizados em *Allophilus*, *Baccharis*, *Campomanesia*, *Cecropia*, *Ilex*, *Citrus*, *Eucalyptus*, *Matayba*, *Mimosa scabrella*, *Paspalum* e *Vernonia*, mas com maior ocorrência de *Eucalyptus*.

Azeredo et al. (2003) analisaram amostras de méis comercializados em vários estados do Brasil e as principais plantas apícolas, estabelecidas pela análise polínica, foram *Eupatorium* sp. (erva-de-santa-cruz), *Vernonia* sp. (assa-peixe), *Cassia* sp. (acácia), *M. scabrella* (sensitiva ou bracatinga), *M. verrucosa* (espinheiro), *Eucalyptus* sp. (eucalipto) *B. verticillata* (vassourinha) e *Citrus* sp. (laranjeira).

O preço e a qualidade do mel estão, normalmente, relacionados com sua origem botânica ou floral e sua composição química. De acordo com a origem floral, é possível encontrar, no comércio, a oferta de méis com diferentes preços. Na região dos Campos Gerais, por exemplo, os méis monoflorais de laranja e eucalipto atingem um valor comercial maior, quando comparados aos méis provenientes de florada silvestre. Isso se deve, geralmente, à preferência dos consumidores por esses méis monoflorais, que possuem características particulares desejáveis, como aroma e sabor. Dessa forma, a análise polínica é uma ferramenta analítica valiosa que, ao estabelecer a procedência botânica do mel, auxilia na definição do seu valor de mercado.

Diferente da literatura, que estabelece o método como trabalhoso, as análises foram consideradas de simples execução. Ainda assim, comparando com os métodos instrumentais analíticos, foram de baixo custo. Entretanto, é necessário destacar a importância do treinamento prévio do analista para o reconhecimento polínico e da utilização de catálogos polínicos para a correta identificação microscópica.

5.3 FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O conteúdo total de fenólicos no EFM foi determinado pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA, 1999) e os resultados encontram-se indicados na Tabela 9.

Tabela 9 - Resultados do teor de fenólicos totais (mg CE.100 g⁻¹ de mel), para as 13 amostras de mel com indicação monofloral, comercializadas na região dos Campos Gerais – PR

Amostras	Origem botânica	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 3	Média	SD
1	eucalipto	60,65	65,15	67,30	64,37	3,39
2	espécie do gênero <i>Mimosa</i> (bracatinga)	176,72	178,21	173,28	176,07	2,53
3	aroeira, erva-mate, laranjeiras e eucalipto	104,30	106,60	101,90	104,27	2,35
4	laranjeiras, assa-peixe e eucalipto	48,35	51,65	51,90	50,63	1,98
5	Mimosaceae tipo <i>Acacia</i>	40,30	42,90	41,95	41,72	1,32
6	laranjeiras e eucalipto	45,95	50,70	54,00	50,22	4,05
7	eucalipto	95,70	99,00	93,30	96,00	2,86
8	laranjeiras	29,60	31,05	30,55	30,40	0,74
9	laranjeiras, erva-mate, Asteraceae tipo <i>Baccharis</i> e eucalipto	119,90	119,00	118,00	118,97	0,95
10	laranjeiras	61,35	68,70	68,25	66,10	4,12
11	laranjeiras, Mimosaceae tipo <i>Acacia</i> Asteraceae tipo <i>Baccharis</i>	76,80	75,40	74,40	75,53	1,21
12	Mimosaceae tipo <i>Acacia</i> , laranjeiras e Asteraceae tipo <i>Baccharis</i>	43,10	44,10	42,20	43,13	0,95
13	laranjeiras, aroeira, Mimosaceae tipo <i>Acacia</i> e eucalipto	45,95	48,60	48,10	47,55	1,41

A quantidade total de fenólicos, expresso em mg CE.100 g⁻¹ de mel, variou de 30,40 ($\pm 0,74$) no mel de laranjeiras (amostra 8) a 176,07 ($\pm 2,53$) no mel de bracatinga (amostra 2). Altos teores também foram verificados nos méis heteroflorais (amostras 3 e 9) e no mel de eucalipto (amostra 7). As amostras 2, 3 e 9, que apresentaram as mais altas concentrações em fenólicos totais, foram classificadas como âmbar escuro, âmbar escuro e âmbar, respectivamente, sugerindo uma tendência da maior concentração desses compostos

em amostras de cor mais escura. Entretanto, a amostra 7 apresentou alto teor de compostos fenólicos e foi classificada como âmbar extra-claro. Serra (2007) encontrou, em méis portugueses, uma correlação entre o teor de compostos fenólicos, a cor e as características antioxidantes.

A medida da atividade seqüestrante do radical DPPH, em porcentagem, foi realizada de acordo com o método descrito por Yen e Wu (1999) e Chen et al. (2003) e os resultados obtidos estão sumarizados na Tabela 10.

Tabela 10 - Resultados da análise da atividade antioxidante (AA), em porcentagem, para as 13 amostras de mel com indicação monofloral, comercializadas na região dos Campos Gerais – PR

Amostras	Origem botânica	% AA	% AA	% AA	Média %AA	SD
1	eucalipto	41,57	43,57	50,20	45,11	4,52
2	espécie do gênero <i>Mimosa</i> (bracatinga)	74,70	74,90	76,10	75,23	0,76
3	aroeira, erva-mate, laranjeiras e eucalipto	54,02	57,23	59,64	56,96	2,82
4	laranjeiras, assa-peixe e eucalipto	36,35	38,55	38,76	37,88	1,34
5	Mimosaceae tipo <i>Acacia</i>	38,76	38,96	39,96	39,22	0,65
6	laranjeiras e eucalipto	33,94	37,55	38,15	36,55	2,28
7	eucalipto	70,28	72,29	75,50	72,69	2,63
8	laranjeiras	30,52	31,73	32,73	31,66	1,11
9	laranjeiras, erva-mate, Asteraceae tipo <i>Baccharis</i> e eucalipto	72,69	76,31	75,90	74,97	1,98
10	laranjeiras	58,63	59,64	57,63	58,63	1,00
11	laranjeiras, Mimosaceae tipo <i>Acacia</i> e Asteraceae tipo <i>Baccharis</i>	68,47	66,67	70,88	68,67	2,12
12	Mimosaceae tipo <i>Acacia</i> , laranjeiras e Asteraceae tipo <i>Baccharis</i>	44,38	47,19	46,39	45,98	1,99
13	laranjeiras, aroeira, Mimosaceae tipo <i>Acacia</i> e eucalipto	43,57	44,78	45,18	44,51	0,84

Para os extratos de fenólicos dos méis, diluídos a 10 % (V/V), a atividade antioxidante variou de 31,66 % ($\pm 1,11$) no mel de laranjeiras (amostra 8) a 75,23 % ($\pm 0,76$) no mel de bracatinga (amostra 2). As amostras monoflorais (2 e 7) e as amostras heteroflorais (9 e 11) apresentaram as maiores capacidades antioxidantes, quando comparadas às demais amostras investigadas no presente estudo. Como controle positivo, foi testada a atividade

antioxidante do α -tocoferol, a 200 mg.L^{-1} , sendo verificada uma capacidade antioxidante média de $91,51 \% (\pm 0,39)$ para esse antioxidante padrão. Dessa forma, esses resultados sugerem que os extratos das amostras 2, 7, 9 e 11, diluídos a $10 \% (\text{V/V})$, apresentam uma capacidade antioxidante considerável, comparativamente a 200 ppm do α -tocoferol.

O coeficiente de correlação calculado ($R^2 = 0,7021$) entre a quantidade de fenólicos e a porcentagem de atividade antioxidante, encontra-se ilustrado na Figura 8. Isso significa uma tendência de aumento da atividade antioxidante, conforme a concentração de fenólicos da amostra.

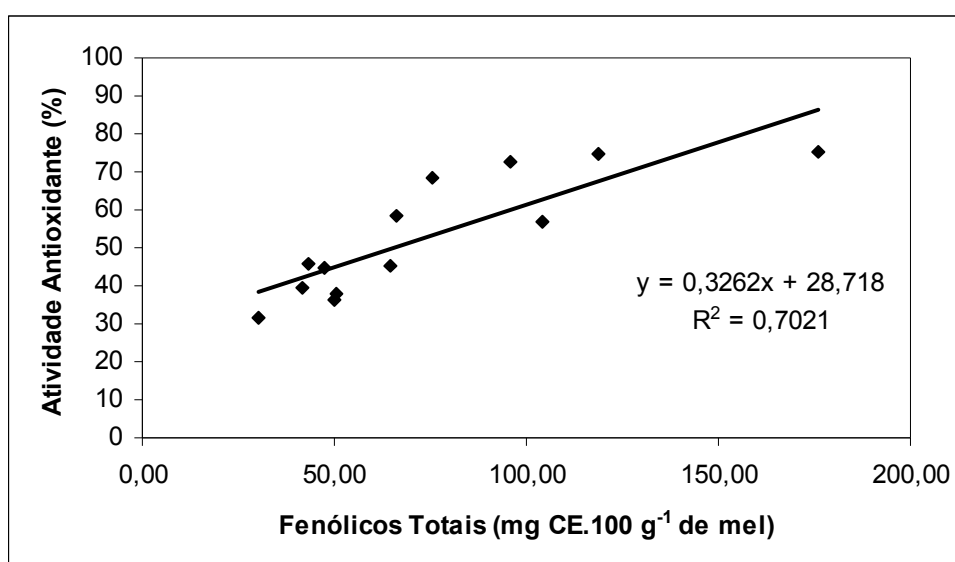


Figura 8 - Correlação entre o conteúdo de fenólicos totais e a atividade antioxidante das 13 amostras de mel com indicação monofloral, comercializadas na região dos Campos Gerais – PR

Serra (2007) estudou méis portugueses das regiões de Lousã, Góis e Figueiró dos Vinhos, fornecidas pela Lousãmel, sendo que a origem floral predominante foi a urze e a castanheira. Foram, também, analisados méis de trevo e de incenso dos Açores, eucalipto da Beira Litoral, laranjeira do Algarve e urze da Beira Baixa. Os resultados mostraram que o teor de compostos fenólicos variou significativamente com o tipo de mel avaliado, apresentando valores entre 48 e $207 \text{ mg ácido gálico.100 g}^{-1}$ de mel. Os méis da Lousãmel revelaram uma

elevada concentração em compostos fenólicos, embora inferior à determinada no mel de urze. Dos méis investigados, o mel de laranjeira foi o que apresentou uma menor concentração desses compostos. A capacidade de seqüestro de radicais livres, por parte dos diversos tipos de mel, expressa através do parâmetro IC_{50} (concentração que causa 50 % da inibição) indicou valores entre 0,1 e 1,5 mg mel.L⁻¹. Os méis da Lousâmel e o mel de urze revelaram uma elevada capacidade de inibição dos radicais de DPPH, ao contrário do mel de laranjeira que revelou ser o menos eficiente.

Meda et al. (2005) pesquisaram amostras, provenientes de diferentes origens botânicas de Burkina Faso. Entre elas, 18 foram classificados como multiflorais, 2 como mel de melato e 7 como méis monoflorais derivados de flores de Combretaceae, *Vitellaria* C. F. Gaertn., *Acacia* e *Lannea* A. Rich. A quantidade de fenólicos totais, expressa em mg de ácido gálico equivalentes (GAE).100 g⁻¹ de mel, variou consideravelmente entre as amostras, sendo que os maiores valores obtidos foram para méis de melato (113,05 e 114,75 mg GAE.100 g⁻¹). Para as amostras de mel multiflorais e monoflorais, houve uma variação de 32,59 a 93,66 mg GAE.100 g⁻¹ e 42,96 a 100,39 mg GAE.100g⁻¹, respectivamente. Os resultados da atividade seqüestrante do radical DPPH em IC_{50} variaram de 1,37 a 29,13 mg.mL⁻¹. Os maiores valores para a atividade seqüestrante, foram encontrados em méis de *Vitellaria* C. F. Gaertn. (1,37 a 2,43 mg.mL⁻¹), seguidos pelas amostras de mel de melato (4,37 e 4,93 mg.mL⁻¹); enquanto que as menores atividades seqüestrantes foram verificadas nos méis multiflorais (5,03 a 29,13 mg.mL⁻¹). A correlação encontrada entre compostos fenólicos totais e atividade seqüestrante do radical DPPH foi de 0,5.

Al-Mamary; Al-Meer e Al-Habori (2002) analisaram cinco méis de diferentes origens botânicas provenientes de Yemen (1 de *Acacia ehrenbergiana* Hayne, 1 de *Acacia edgeworthii* T. Anderson, 2 de *Z. spina-christi* e 1 de flores tropicais) e quatro tipos de méis importados (1 de flores tropicais – Estados Unidos – Nova Orleans, 1 de flor-de-laranjeira

Estados Unidos – Flórida, 1 de flores suíças e 1 de flores tropicais iranianas). O conteúdo de fenólicos totais, expresso em mg.100 g⁻¹ de mel como catequina equivalente (CE), foi maior nas amostras originárias de Yemen, variando de 75,13 mg CE.100 g⁻¹ de mel na amostra de flores tropicais a 246,21 mg CE.100 g⁻¹ de mel na amostra de *A. ehrenbergiana*. As amostras importadas (flores suíças: 68,59 mg CE.100 g⁻¹ de mel, flores tropicais iranianas: 56,32 mg CE.100 g⁻¹ de mel, flor-de laranjeira: 61,05 mg CE.100 g⁻¹ de mel) tiveram menores conteúdos quando comparadas às amostras de Yemen, exceto a amostra de flores tropicais americanas, que apresentou um conteúdo de 79,37 mg CE.100 g⁻¹ de mel.

Beretta et al. (2005) analisaram 14 amostras de méis comerciais de diferentes origens botânicas e geográficas, *Arbustus unedo* L., *Fagopyrum esculentum* Moench, *Castanea sativa* Mill., *Hedysarum coronarium* L., *Trifolium incarnatum* L., duas diferentes amostras de *Taraxacum officinale* F.H. Wigg. (1 e 2), *Cichorium intybus* L., *Robinia pseudoacacia* L., mel multifloral da montanha, mel de melato e três méis tropicais puros. O conteúdo de fenólicos totais variou de 52,5 mg de ácido gálico.kg⁻¹ de mel na amostra de *T. officinalis* (1) a 789,6 mg de ácido gálico.kg⁻¹ de mel na amostra de *A. unedo*. A atividade anti-radical DPPH foi estudada e os resultados, em IC₅₀, apresentaram variação de 47,62 mg.mL⁻¹ na amostra de *T. officinalis* (1) a 1,63 mg.mL⁻¹ na amostra de *A. unedo*. Uma alta correlação foi encontrada entre o conteúdo de fenólicos totais e a atividade anti-radical DPPH (0,918), mostrando que esses compostos determinam o poder anti-radical.

Dessa forma, é possível indicar que, para as 13 amostras avaliadas no presente estudo, foram encontrados teores de fenólicos totais correlacionados à atividade antioxidante, condizentes aos apontados pela literatura.

Turkmen et al. (2006) estudaram a atividade antioxidante frente ao radical DPPH e a formação de pigmentos marrons (FPM), em amostras de méis aquecidos sob diferentes temperaturas (50, 60 e 70°C), por um período total de 12 d. A atividade antioxidante e a FPM

aumentaram com a temperatura e com o tempo. Esses resultados foram justificados pela presença de produtos da reação de Maillard, que atuam como antioxidantes. Assim, a perda dos antioxidantes naturais durante o aquecimento foi minimizada ou compensada pela formação de produtos da reação de Maillard (MANZOCCO et al., 2001; NICOLI et al., 1997). Embora o aquecimento tenha conduzido ao aumento da atividade antioxidante, o escurecimento resultante foi estabelecido como um aspecto não desejável pelos consumidores. Os resultados demonstraram que houve uma correlação entre a atividade antioxidante e a formação de pigmentos marrons nas amostras estudadas.

O mel é usado como conservante em produtos alimentícios, prevenindo reações de oxidação que deterioram os alimentos, como a oxidação lipídica em carne e o escurecimento enzimático de frutas e vegetais (CHEN et al., 2000; MCKIBBEN; ENGESETH, 2002; OSZMIANSKI; LEE, 1990). Além disso, tem sido sugerido que um alimento pode ser considerado funcional, em função da presença de compostos antioxidantes que, quando ingeridos através da dieta, apresentam importante função na prevenção de doenças (BERG et al., 1999), como: doença cardíaca coronariana, artrite, *Diabetes*, doenças neurodegenerativas (Parkinson e Alzheimer), câncer e intoxicação por etanol (BENZIE, 1996; FÉHER, CSMÓS; VERECKEI, 1986; RUSSO; LONGO; VANELLA, 2002).

5.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os resultados relativos à atividade antimicrobiana das amostras de mel analisadas, diluídas a 10, 15, 20, 25 e 30 %, estão representados na Tabela 11.

Tabela 11 - Potencial antimicrobiano das 13 amostras de mel, com indicação monofloral, comercializadas na região dos Campos Gerais – PR, diluídas a 10, 15, 20, 25 e 30 %

Amostra	<i>Escherichia coli</i>					<i>Staphylococcus aureus</i>				
	10%	15%	20%	25%	30%	10%	15%	20%	25%	30%
1	> 300	275	-	-	-	> 300	-	-	-	-
2	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300
3	> 300	> 300	-	-	-	> 300	> 300	12	-	-
4	> 300	> 300	> 300	> 300	-	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300
5	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300
6	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300
7	> 300	-	-	-	-	1	-	-	-	-
8	> 300	> 300	282	-	-	113	17	-	-	-
9	> 300	-	-	-	-	48	-	-	-	-
10	> 300	-	-	-	-	142	-	-	-	-
11	> 300	-	-	-	-	> 300	16	11	9	-
12	> 300	> 300	> 300	20	5	> 300	> 300	> 300	20	1
13	> 300	> 300	15	7	-	> 300	12	9	4	3

Nota: (-) representa a ausência do crescimento bacteriano; valores de 1 a > 300 correspondem a UFC.mL⁻¹ (médias de duplicatas).

De acordo com os resultados demonstrados na Tabela 11, para a maioria das amostras, houve uma maior atividade antimicrobiana à medida que a concentração de mel utilizada foi elevada. As amostras 7 (mel de eucalipto), 9 (mel heterofloral) e 10 (mel de laranjeiras) inibiram por completo o crescimento de ambos os microrganismos testados, quando as concentrações utilizadas foram iguais ou superiores a 15 %. Entretanto, as amostras 2 (mel de bracatinga), 5 (mel de acácia) e 6 (mel de laranjeiras e eucalipto) não revelaram atividade antimicrobiana em nenhuma das concentrações estudadas. Esses resultados indicam que os microrganismos ensaiados são sensíveis ao poder antimicrobiano do mel nas concentrações avaliadas, mas não para todas as amostras. De acordo com Sato e Myiata (2000), a propriedade antimicrobiana pode variar de acordo com a origem floral do mel. Entretanto, ao analisar as amostras em investigação, verifica-se que os méis monoflorais contendo apenas eucalipto ou laranjeiras, tiveram um potencial antimicrobiano elevado. Porém, a amostra 6, contendo laranjeira e eucalipto, não apresentou potencial antimicrobiano,

nas concentrações estudadas. Dessa forma, outros parâmetros devem ser considerados, além da origem botânica, para relacionar a atividade antimicrobiana com a composição química do mel.

A amostra 11 (mel heterofloral) revelou um maior poder antimicrobiano frente a *E. coli*, quando comparado ao *S. aureus*, nas concentrações de 10 % a 25 %. Porém, quando a concentração de mel chegou a 30 %, os dois microrganismos estudados foram igualmente inibidos. A atividade antimicrobiana da amostra 12 (heterofloral) se comportou de modo muito semelhante frente ambas as bactérias. A amostra 7 (mel de eucalipto), por sua vez, na concentração de 10 %, apresentou uma inibição maior do crescimento de *S. aureus*. Os resultados obtidos demonstram que há um comportamento variável da atividade antimicrobiana, tanto no que se refere à sensibilidade dos microrganismos (*S. aureus* e *E. coli*), quanto no poder antimicrobiano dos diferentes tipos de amostras analisadas.

A variação na atividade antimicrobiana pode ser, aparentemente, devida a muitos fatores, como diferenças no solo e nas condições atmosféricas, bem como relacionados ao tipo e fisiologia de cada planta, que contribui indiretamente para a formação do mel. Pode também ser resultado de diferenças na composição química atribuída a diferentes origens florais e condições ambientais. Entretanto, foi encontrado que méis de diferentes origens florais variam na sua atividade antibacteriana devido exclusivamente aos níveis de peróxido de hidrogênio, sendo insignificante a contribuição da atividade de outras substâncias, como fenólicos derivados da própolis (WESTON, 2000). No entanto, no mel não diluído, a acidez também é um significativo fator antimicrobiano e o pH, variando de 3,2 a 4,5, é suficiente para inibir o crescimento de patógenos, cujos valores de pH ótimos variam entre 7,2 e 7,4 (HOOPER, 1976; MOLAN, 1996; NATIONAL HONEY BOARD, 2006; SATO; MIYATA, 2000). Porém, quando aplicado em áreas afetadas do tecido, a acidez, o efeito osmótico e a maioria dos fatores fitoquímicos decrescem com a diluição. Em contrapartida, o potencial

antimicrobiano do peróxido de hidrogênio aumenta cerca de 2,5 a 50 vezes (POSTMES; BOOGAARD; VAN DEN HAZEN, 1993; WAHDAN, 1998).

Ao comparar o teor de fenólicos totais com o potencial antimicrobiano dos méis analisados, no presente trabalho, é possível verificar que, nessas amostras, não há uma relação entre esses parâmetros. Isso pode ser observado, por exemplo, na amostra 2 (mel de bracinga) que, embora tenha apresentado o maior teor de fenólicos totais (176,07 mg CE.100 g⁻¹ de mel), não demonstrou atividade antimicrobiana, em nenhuma das concentrações testadas. Em contrapartida, a amostra 10 (mel de laranjeiras), que apresentou uma quantidade de fenólicos de 66,10 mg CE.100 g⁻¹ de mel, inibiu por completo o crescimento dos microrganismos testados, quando a concentração utilizada foi igual ou superior a 15%. Esse fato reforça a hipótese de que a composição química do mel, baseada em fatores não fitoquímicos, tem relevância no seu potencial antimicrobiano.

No presente estudo, para verificar se a alta concentração de açúcares presentes no mel é capaz, isoladamente, de promover a inibição do crescimento bacteriano, também foi investigada a atividade antimicrobiana de solução de açúcares contendo iguais proporções de glucose e frutose, em diferentes concentrações (15, 20, 25 e 30%). Para esses ensaios, os resultados demonstraram que a alta pressão osmótica, de modo isolado, não exerceu efeito inibidor do crescimento bacteriano.

Os halos de inibição formados nas placas controles foram compatíveis com os encontrados na literatura, assegurando que as suspensões bacterianas foram padronizadas corretamente (KONEMAN et al., 2001).

Todas as amostras analisadas por Vargas (2006), procedentes da região dos Campos Gerais do Paraná, apresentaram atividade antimicrobiana frente ao *S. aureus* e *E. coli*, porém encontrando comportamento diferenciado entre as amostras frente aos microrganismos.

Lusby, Coombes e Wikinson (2005) testaram diferentes méis, diluídos a 0,1, 1, 5, 10 e 20 % (m/V), contra a levedura *Candida albicans* e 13 bactérias patogênicas (*Alcaligenes faecalis*, *Citrobacterfreundii*, *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium phlei*, *Salmonella californica*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*). Foi observado que todos os méis testados desempenharam alguma ação antimicrobiana a partir de concentrações de 5 %; entretanto, a maior inibição foi percebida na concentração de 20 %. Dois microrganismos (*C. albicans* e *S. marcescens*) não sofreram inibição.

Basualdo et al. (2007) estudaram a atividade antimicrobiana de méis provenientes de apicultores e intermediadores, frente a microrganismos freqüentemente isolados de ferimentos de pele. A técnica utilizada foi a difusão em Ágar e as amostras foram testadas sem diluição e nas concentrações de 75, 50, 30 e 10 % (m/V). Os resultados obtidos revelaram que a maioria das amostras não diluídas inibiu o crescimento de *S. aureus* e *S. epidermidis*. Algumas amostras, provenientes de apicultores, também inibiram o crescimento de *S. aureus* até 50 % de diluição. Amostras de mel, não diluídas, também inibiram o crescimento de *S. uberis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, e *K. pneumoniae*, porém em menor extensão. Os halos de inibição formados pelas amostras provenientes dos apicultores foram maiores, quando comparados aos obtidos para as amostras procedentes dos intermediadores. Os autores sugerem que a explicação para essa diferença é o fato de que as amostras dos apicultores foram obtidas de um apiário, o que leva a pensar que as abelhas se utilizam de poucas espécies florais para produzir o mel. Por outro lado, as amostras dos intermediadores, foram provenientes de misturas de méis de diferentes fontes.

Em um estudo realizado por Shin e Ustunol (2005) sobre a influência de méis de diferentes origens florais no crescimento de *Bifidobacterium* spp. (*B. longum*, *B. adolescentis*, *B. breve*, *B. bifidum* e *B. infantis*) e de 4 microrganismos patogênicos (*Bacterioides*

thetaitaomicron, *Clostridium perfringens*, *Eubacterium aerofaciens* e *Enterococcus faecalis*), foi observado que os méis investigados promoveram um incremento do crescimento e da atividade das bactérias componentes da microbiota intestinal (*Bifidobacterium* spp.), e inibiram o crescimento dos patógenos *C. perfringens* e *E. aerofaciens*.

Nagai et al. (2006) avaliaram o efeito do mel diluído 5 % (V/V) durante o armazenamento da carne bovina, suína, de frango e de peixe. Os autores verificaram que houve inibição do crescimento bacteriano em todos os alimentos testados. Na carne bovina, por exemplo, sem a adição do mel, o total de microrganismos viáveis contados depois de 3 d a 10 °C, foi da ordem de $3,0 \cdot 10^3$ UFC.g⁻¹ e, ao final de 7 d, esse número passou a 10^4 UFC.g⁻¹. Entretanto, quando a carne foi tratada com alguns tipos de mel, o total de microrganismos viáveis foi $2,0 \cdot 10^3$ UFC.g⁻¹. Dessa forma, o mel pode ser considerado como um conservante de alimentos, quando utilizado em condições apropriadas.

Assim, os resultados obtidos no presente estudo, que evidenciam o potencial antimicrobiano do mel, estão de acordo aos apontados pela literatura.

O mel acelera a cicatrização de ferimentos, quando aplicado topicamente ou por administração sistêmica (SUGUNA; CHANDRAKASAN; THOMAS JOSEPH, 1992), promovendo a diminuição rápida de infecções, a supressão rápida da inflamação, a minimização de escaras, a estimulação da angiogênese, bem como o desenvolvimento do tecido epitelal e do tecido granular (MOLAN, 2002). Assim, é possível estabelecer a utilização do mel como um potencial e atóxico tratamento para feridas.

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos para as 13 amostras de mel com indicação monofloral, comercializadas na região dos Campos Gerais do Paraná, foi possível concluir que:

Oito amostras analisadas atenderam às especificações físico-químicas estabelecidas pela legislação brasileira e cinco amostras apresentaram, para o índice de diastase, valores inferiores aos exigidos.

Nas amostras avaliadas os tipos polínicos *Eucalyptus* (Myrtaceae), *Mimosa scabrella* (Mimosaceae), *Citrus* (Rutaceae), *Acacia* (Mimosaceae), *Schinus* (Anacardiaceae), *Baccharis* (Asteraceae), *Ilex* (Aquifoliaceae) e *Vernonia* (Asteraceae) foram encontrados como pólen dominante ou acessório nos espectros polínicos dos méis.

Com relação à origem botânica dos méis, por meio da análise polínica, seis amostras foram classificadas como mel monofloral, das quais quatro estavam em concordância com a declaração do produtor. Uma amostra foi classificada como bifloral e seis amostras como heteroflorais. Assim, embora todas as amostras tenham sido estabelecidas como florais, esses resultados permitem demonstrar que há certa falta de correspondência entre a origem botânica informada pelo comércio e a estabelecida cientificamente.

Em todas as amostras de méis estudadas, foram obtidos teores de compostos fenólicos e atividade antioxidante condizentes com a literatura, apresentando uma correlação entre os dois parâmetros.

A atividade antimicrobiana dos méis revelou um comportamento diverso, tanto no que se refere à sensibilidade dos microrganismos (*S. aureus* e *E. coli*), quanto no poder antimicrobiano dos diferentes tipos de amostras testadas.

REFERÊNCIAS

- ABSY, M. L.; CAMARGO, J. M. F.; KERR, W. E.; MIRANDA, I. P. de A. espécies de plantas visitadas por Meliponinae (Hymenoptera; Apidae), para coleta de pólen na região do Médio Amazonas. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 44, n. 2, p. 227-237, 1984.
- ADELMANN, J. **Própolis: variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana/antioxidante**. 2005, 186f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- AIRES, E. R. B.; FREITAS, B. M. Caracterização palinológica de algumas amostras de mel do estado do Ceará. **Ciência Agrônômica**, v. 32, n. 1/2, p. 22-27, 2001.
- AL-KHALIFA, A. S.; AL-ARIFY, I. A. Physicochemical characteristics and pollen spectrum of some Saudi Honeys. **Food Chemistry**, v. 67, p. 21-25, 1999.
- ALLEN, K. L.; MOLAN, P. C. REID, G. M. A survey of the anti-bacterial activity of some New Zealand honeys. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 43, p. 817 – 822, 1991.
- AL-MAMARY, M.; AL-MEERI, A.; AL-HABORI, M. Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. **Nutrition Research**, n. 22, p. 1041 – 1047, 2002.
- ALZUGARAY, D.; ALZUGARAY, C. **Aprenda a criar abelhas**. São Paulo: Três, 1986, 80p.
- AMOIT, M. J.; AUBERT, S.; GONNET, M.; TACHINI, M. Les composés phénoliques des miel: étude préliminaire sur l'identification et la quantification par familles. **Apidologie**, v. 20, n.2, p. 115-125, 1989.
- ANACLETO, D. de A.; MARCHINI, L.C. Composição físico-química de amostras de méis de *Apis mellifera* L. provenientes do Cerrado Paulista. **Boletim de Indústria Animal**, Nova Odessa, v.61, n.2, p. 161-172, 2004.
- ANDRADE E SILVA, R. C. P. de. **Apicultura** – Mundo, Brasil, Paraná. Curitiba: Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento, 2003. 38 p.
- ANDRADE, P. B.; AMARAL, M. T.; ISABEL, P.; CARVALHO, J. C. M. F.; SEABRA, R. M.; CUNHA, A. P. DA Physicochemical attributes and pollen spectrum of Portuguese heather honeys. **Food Chemistry**, v. 66, p. 503-510, 1999.

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.

ARRÁEZ-ROMÁN, D.; GÓMEZ-CARAVACA, A. M.; GÓMEZ-ROMERO, M.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUITÉRREZ, A. Identification of phenolic compounds in rosemary honey using solid-phase extraction by capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analyses**, v. 41, n. 5, p. 1648-1656, 2006.

AZEREDO, L. da C.; AZEREDO, M. A. A.; SOUZA, S. R. de; DUTRA, V. M. L. Protein contents and physicochemical properties in honey samples of *Apis mellifera* of different floral origins. **Food Chemistry**, v. 80, p. 249-254, 2003.

AZEREDO, M. A. A.; AZEREDO, L. da C.; DAMASCENO, J. G. Características físico-químicas dos méis do município de São Fidélis-RJ. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 19, n. 1, p.3-7, jan./abr. 1999.

AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International**, 17 ed. Horwitz, W.; Association of Official Analytical Chemists: Gaithersburg, MD, 2000. Chapter 44, p. 22 – 33.

BARONI, M. V.; CHIABRANDO, G. A.; COSTA, C.; FAGÚNDEZ, G. A.; WUNDERLIN, D. A. Development of a Competitive ELISA for the Evaluation of Sunflower Pollen in Honey Samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 7222-7226, 2004.

BARANCELLI, C. D. **Crie abelhas; é fácil e dá lucro**. 2. ed. Curitiba: ACARPA, [198-]. 52p.

BARTH, O. M. Pollenspektrum einiger brasilianischer Honige. **Zeitschrift für Bienenforschung**, v. 9, n. 9, p. 410-419, 1969.

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

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

BARTH, O. M. Pollen in monofloral honeys from Brazil. **Journal of Apicultural Research**, v. 28, p. 89-94, 1990.

BARTH, O. M. Monofloral and wild flower honey pollen spectra at Brazil. **Ciência e Cultura**, v. 48, p. 163-165, 1996.

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

BARTH, O. M. Análise polínica de mel: avaliação de dados e seu significado. **Mensagem Doce**. São Paulo, n. 81, maio, 2005

BARTH, O. M.; CORÉ-GUEDES, J. Caracterização de méis de laranjeiras procedentes dos estados do Rio de Janeiro e de São Paulo, por meio da análise polínica. **LECTA**, v. 17, p. 27-35, 1999.

BARTH, O. M.; MAIORINA, C.; BENATTI, A. P. T.; BASTOS, D. H. M. Determinação de parâmetros físico-químicos e da origem botânica de méis indicados monoflorais do sudeste do Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 2, p. 229-233, abr-jun. 2005.

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

BASTOS, E. M. A. F.; SILVEIRA, E. M; SOARES, A. E. E. Espectro polínico do mel produzido em áreas de cerrado do Estado de Minas Gerais (Brasil). **Brazilian Journal Biology**, v. 63, n. 4, p. 599-615, 2003.

BASUALDO, C.; SGROY, V.; FINOLA, M. S.; MARIOLI, J. M. Comparison of the antibacterial activity of honey from different provenance against bacteria usually isolated from skin wounds. **Veterinary Microbiology**, v. 124, p. 375-381, 2007.

BATH, P.K.; SINGH, N. A. A comparison between *Helianthus annuus* and *Eucalyptus lanceolatus* honey. **Food Chemistry**, v. 67, n.4, p.389-397, 1999.

BENZIE, I. F. F. E.; 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.

BERETTA, G.; GRANATA, P.; FERRERO, M.; ORIOLI, M.; FACINO, R. M. Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. **Analytica Chimica Acta**, v. 533, p. 185-191, 2005.

BERG, R. V. D.; HAENEN. G. R. M. M.; BERG, H. V. D.; BAST, A. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. **Food Chemistry**, v. 66, p. 511-517, 1999.

BERGMAN, A.; YANAI, J.; WEISS, J.; BELL, D.; DAVID, M. P. Acceleration of wound healing by topical application of honey: An animal model. **The American Journal of Surgery**, v.145, p.374–376, 1983.

BIANCHI, E. M. **La miel, características y composición – Análisis y Adulteraciones**. Santiago del Estero: UNSE – CEDIA, 1981.

BLASA, M.; CANDIRACCI, M.; ACCORSI, A.; PIANCENTINI, M. P.; ALBERTINI, M. C.; PIATTI, E. Raw Millefiori honey is packed full of antioxidants. **Food Chemistry**, v. 97, n. 2, p. 217-222, 2006.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Química do Processamento de Alimentos**. São Paulo: Varela, 1992. p. 39-50.

BOGDANOV, S.; LÜLLMANN, C.; MARTIN, P.; VON DER OHE, W.; RUSSMANN, H.; VORWOHL, G.; ODO, L. P.; SABATINI, A. G.; MARCAZZAN, G. L.; PIRO, R.; FLAMINI, C.; MORLOT, M.; LHERITIER, J.; BORNECK, R.; MARIOLEAS, P.; TSIGOURI, A.; KERKVLIT, J.; ORTIZ, A.; IVANOV, T.; D'ARCY, B.; MOSSEL, B.; VIT, P. Honey quality and international regulatory standards: review by the international honey comission. **Bee World**, v. 80, n. 2, p. 61-69, 1999.

BOGDANOV, S.; MARTIN, P. LÜLLMANN, C. Harminised methods of the European Honey Comission. **Apidologie**, Paris, Extra Issue, p. 1-59, 1997.

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

BOUSETA, A.; COLLIN, S. & DUFOUR, J. P. Characteristic aroma profiles of unifloral honeys obtained with a dynamic Headspace CG-MS system. **Journal of Apicultural Research**, v. 31, n. 2, p. 96-109, 1992.

BOUSETA, A.; SCHEIRMAN, V. & COLLIN, S. Flavor and free amino acid composition of lavender and eucalyptus honeys. **Journal of Food Science**, v. 61, n. 4, p. 683-687, 1996.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Resolução RDC 12, de 02 de janeiro de 2001**. Padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=144&word=>>>. Acesso em 21 jun. 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000.** Regulamento Técnico de identidade e qualidade do mel. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/consultasilegis/do/consultaLei?op=viewTextual&codigo=7797>>. Acesso em: 10 dez. 2007.

BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, 56, p. 317-333, 1998.

CAMPOS, G.; DELLA-MODESTA, R. C.; SILVA, T. J. P.; BAPTISTA, K. E.; GOMIDES, M. F.; GODOY, R. L. Classificação do mel em floral ou mel de melato. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 1, p. 1-5, jan-abr. 2003.

CAMPOS, M. G.; CUNHA, A.; MARKHAM, K. R. Bee Pollen. Composition, Properties and Applications. **Bee Products**. New York: Plenum Press, p.93-100, 1996.

CANO, C. B.; ZAMBONI, C. Q.; ALVES, H. I.; SPITERI, N.; ATUI, M. B.; SANTOS, M. C. dos, JORGE, L. I. F.; PEREIRA, U.; RODRIGUES, R. M. M. Mel: fraudes e condições sanitárias. **Revista do Instituto Adolf Lutz**, v. 52, p. 1-4, 1992.

CARREIRA, L. M. M.; JARDIM, M. A. G.; MOURA, C. de O.; PONTES, M. A. de O.; MARQUES, R. V. Análise polínica nos méis de alguns municípios do estado do Pará. I. **Anais do 1º Simpósio do Trópico Úmido, Belém, Pará**, v. 2, p. 79-84, 1986.

CARVALHO, C.A.L.; MARCHINI, L.C.; TEIXEIRA, G.M.; OLIVEIRA, P.C.F.; RUBIA, V.R. Características físico-químicas de amostras de méis da Bahia. In: Congresso Brasileiro de Apicultura, 12, 1998, Salvador. **Resumos...** Salvador: FAABA, 1998. p.200.

CAVIA, M. M.; FERNÁNDEZ-MUIÑO, M. A.; GÓMEZ-ALONSO, E.; MONTES-PÉREZ, M. J.; HUIDOBRO, J. F.; SANCHO, M. T. Evolution of fructose and glucose in honey over one year: Influence of induced granulation. **Food Chemistry**, v. 78, p. 157-161, 2002.

CHEN, C. N.; WU, C. L.; SHY, H. S.; LIN, J. K. Cytotoxic Prenylflavanones from Taiwanese Propolis. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 503-506, 2003.

CHEN, L.; MEHTA, A.; BERENBAUM, M.; ZANGER, A. R.; ENGESETH, N. J. Honeys from different floral sources as inhibitors of enzymatic browning in fruit and vegetable homogenates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 4997-5000, 2000.

CHERCHI, A.; SPANEDDA, C.; TUBEROSO, C.; CABRAS, P. Solid-phase extraction and high-performance liquid-chromatographic determination of organic-acids in honey. **Journal of Chromatography A**, v. 669, p. 59-64, 1994.

CODEx ALIMENTARIUS COMISSION. **Revised Codex Standard for Honey**. Codex Stan 12 – 1981, 2. Ver., 2001. 7p. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.net/web/standard_list.do?lang=em>. Acesso em 21 jun. 2006.

COOK, N. C.; SAMMON, S. Flavonoids - Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 7, p. 66-76, 1996.

COUTO, R. H. N.; COUTO, L., A. **Apicultura: manejo e produtos**. Jaboticabal: UNESP, 1996. 154 p.

CRANE, E. **O livro do mel**. São Paulo: Nobel, 1983. 226 p.

CRANE, E. The past and present importance of bee products to men. **Bee Products**. New York: Plenum Press, 1996. p. 1-13.

CRANE, E. A short history of knowledge about honey bees (*Apis*) up to 1800. **Bee World**, v. 85, n. 1, p. 6 – 11, mar. 2004.

D'ARCY, B.R.; RINTOUL, G.B.; ROWLATR, C.Y.; BLACKMAN, A.J. Composition of australian honey extractives. Norisoprenoids, monoterpenes, and other natural volatiles from blue gum (*Eucalyptus leucoxylon*) and yellow box (*Eucalyptus mellidora*) honeys. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, p. 1834-1843, 1997.

DE MARIA, A. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Investigação dos compostos do aroma do mel de cambará (*Gochnatia velutina*). **Mensagem doce**, n. 81, 2005.

DICIONÁRIO histórico e geográfico dos Campos Gerais. Disponível em: <http://www.uepg.br/dicion/campos_gerais.htm>. Acesso em 14 jun. 2006.

DURÁN, J.E.T.; CORTOPASSI-LAURINO, M.; ISSA, M.R.C.; TOLEDO, V.A.A.; BASTOS, E.; SOARES, A.E.E. Méis brasileiros: resultados de análises físico-químicas e palinológicas. In: Congresso Brasileiro de Apicultura, 11, Teresina, 1996. **Resumos...** Teresina: CBA, 1996. p 403-429.

DURÁN, R. M.; PADILLA, R. B. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. **Grasas y Aceites**, v. 44, n. 2, p.101-106, 1993.

DURKEE, L. H. A pollen profile from wooden bog in North-Central Iowa. **Ecology**, v. 52, n.5, p. 837-844, 1971.

DZIEZAK, J. D. Preservatives: Antioxidants. **Food Technology**, v. 40, n. 9, p. 94-136, 1986.

EMSEN, I. M. A different and safe method of split thickness skin graft fixation: Medical honey application. **Burns**, v. 33, p. 782-787, 2007.

ESKIN, N. A. M.; PRZYBYLSKI, R. Antioxidants and shelf life of foods. In: ESKIN, N. A. M.; ROBINSON, D. S. **Food Shelf Life Stability: chemical, biochemical, and microbiological changes**. New York: CRC Press, 2000. cap. 6. p. 175-322.

ESTI, M.; PANFILI, G.; MARCONI, E.; TRIVISONO, M. C. Valorization of the honeys from the Molise region through physico-chemical, organoleptic and nutritional assessment, **Food Chemistry**, v. 58, p. 125-128, 1997.

FALLICO, B.; ZAPPALÀ, M.; ARENA, E.; VERZERA, A. Effects of conditioning on HMF content in unifloral honeys. **Food Chemistry**, v. 85, p. 305 – 313, 2004.

FARIA, J. A. F. Shelf life testing of honey. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.13, n.1, p.58-66, 1993.

FÉHER, J.; CSMÓS; VERECKEI, A. Clinical importance of free radical reactions and their role in the pathogenesis of various human diseases. In: **Free Radical Reactions in Medicine**, 1986, p. 48-147.

FELSNER, M. L.; CANO, C. B.; BRUNS, R. E.; WATANABE, H. M.; ALMEIDA-MURADIN, L. B.; MATOS, J. R. Characterization of monofloral honeys by ash contents through a hierarchical design. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 17, p. 737-747, 2004.

FENNEMA, O. R. **Food Chemistry**. 3. ed. New York: Marcel Dekker, 1996, 1069p.

FERRERES, F.; ANDRADE, P.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 2053-2056, 1996.

FERRERES, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; GIL, M. I.; TOMÁS-LORENTE, F. An HPLC technique for flavonoid analysis in honey. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 56, p. 49-56, 1991.

FERRERES, F.; GARCIA-VIGUERA, C.; TOMÁS-LORENTE, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Hesperetin: a marker of the floral origin of citrus honey. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 61, p. 121-123, 1993.

FERRERES, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; SOLER, C.; GARCIA-VIGUERA, C.; ORTIZ, A.; TOMÁS-LORENTE, F. A simple extractive technique for honey flavonoid HPLC analysis. **Apidologie**, v. 25, p. 21-30, 1994a.

FERRERES, F.; BLÁZQUEZ, M. A.; GIL, M. I.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Separation of honey flavonoids by micellar electrokinetic capillary chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 669, p. 268-274, 1994b.

FERRERES, F.; JUAN, T.; PÉREZ-ARQUILUE, C.; HERRERA-MARTEACHE, A.; GARCIA-VIGUERA, C.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Evaluation of pollen as a source of kaempferol in rosemary honey. **Journal of the Science of Food and Agriculture** v. 77, p. 506-510, 1998.

GALLIARD, T.; PHILIPS, D. R. The enzymic cleavage of linoleic acid to C₉ carbonyl fragments in extracts of cucumber (*Cucumis sativus*) fruit and the possible role of lipooxygenase, **Biochimica et Biophysica Acta**, 431, 278, 1976.

GHELDOLF, N.; ENGESETH, N. J. Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of vitro lipoprotein oxidation in human serum samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3050-3055, 2002.

GOLDBERG, I. **Functional Foods**. Designer Foods, Pharmafood, Nutraceuticals, Chapman and Hall, London, UK, 1996.

GÓMEZ-CARAVACA, A. M.; GÓMEZ-ROMERO, M.; ARRÁEZ-ROMÁN, SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 1220-1234, 2006.

HALCÓN, L., MILKUS, K. Staphylococcus aureus and wounds: a review of tea tree oil as a promising antimicrobial. **American Journal of Infection Control**, v. 32, p. 402–408, 2004.

HARBONE, J. B. **Phytochemical Methods**. London: Chapman and Hall, 1973. p. 33-88.

HAVSTEEN, B. H. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. **Biochemical Pharmacology**, v. 32, p. 1141-1148, 1983.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, p. 67-202, 2002.

HERMOSIN, I.; CHICON, R. M.; CABEZUDO, M. D. Free aminoacid composition and botanical origin of honey. **Food Chemistry**, v. 83, p. 263-268, 2003.

HOOPER, T. **Guia do Apicultor**. [S.l.]: Publicações Europa-América, 1976, p. 223-266.

HORN, H. Méis brasileiros: resultados de análises físico-químicas e palinológicas. **Mensagem Doce**, São Paulo, v. 40, p. 10-16, 1997.

HOWER, F. N. **Plantas melíferas**. Barcelona: Reverte, 1953, 35 p.

HSUEH, P., CHEN, W., LUH, K. Relationships between anti-microbial use and antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria causing nosocomial infections from 1991–2003 at a university hospital in Taiwan. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, p. 463–472, 2005.

HUHTANEN, C. N.; KNOX, D.; SHIMANUKI, H. Incidence of Clostridium botulinum spores in honey. **Journal of Food Protection**, v. 44, p. 812-814, 1981.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 3. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1985, v.1, 533p.

INSTITUTO CENTRO DE ENSINO TECNOLÓGICO – CENTEC (CE). **Apicultura**. 2. ed. rev. Fortaleza: Edições Demócrito Rocha; Ministério da Ciência e Tecnologia, 2004. 56p.

ISSA, M.R.C.; DE JONG, D.; HORN, H. Determinação físico-química de amostras de méis normais, aquecidos e misturados. In: Congresso Brasileiro de Apicultura, 12, 1998, Salvador. **Resumos...** Salvador: FAABA, 1998. p.209.

KEER, W. E.; AMARAL, E. **Apicultura científica e prática**. São Paulo: Secretaria de Agricultura, 1960. 148 p.

KERKVLIT, J. D.; SHRESTHA, M. TULADHAR, K.; MANANDHAR, H. Microscopic detection of adulteration of honey with cane sugar and cane sugar products. **Apidologie**, v. 26, p. 131-139, 1995.

KIRKWOOD, K. C.; MITCHELL, T. J.; SMITH, D. Examination of the occurrence of honeydew in honey. **Analyst**, v. 85, p. 412-416, 1960.

KIRKWOOD, K. C.; MITCHELL, T. J.; SMITH, D. Examination of the occurrence of honeydew in honey. Part II. **Analyst**, v. 85, p. 164-165, 1961.

KOMATSU, S. S. **Caracterização físico-química de méis de *Apis mellifera* L. 1758 (Hymenoptera: Apidae) de diferentes municípios do estado de São Paulo.** 1996, 90 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

KOMATSU, S.S.; MARCHINI, L.C. Teores de açúcares redutores e sacarose de amostras de méis de flores silvestres produzidos por *Apis mellifera* no Estado de São Paulo. In: Congresso Brasileiro de Apicultura, 11, 1996, Teresina. **Resumos...** Teresina: CBA, 1996. p.344.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. A.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WIM, W. C. Jr. **Diagnóstico Microbiológico:** texto e atlas colorido. 5 ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001, p. 819-828.

LANARA. Laboratório Nacional de Referência Animal. **Métodos analíticos oficiais para controle de produção controle de produtos de origem animal e seus ingredientes.** II – Métodos físicos e químicos. Mel. Brasília: Ministério da Agricultura. 1981, v.2, cap. 25, p. 1-15.

LOPES, R. M., OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; PINTO, A. S. Flavonóides: farmacologia de flavonóides no controle hiperlipidêmico em animais experimentais. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 17, p. 18-22, 2000.

LOUVEAUX, J. Les produits du rucher. In: **Les abeilles et leur élevage.** OPIDA, 1985. p. 165-199.

LOUVEAUX, J.; MAURIZIO, A.; VORWOHL, G. Methods of melissopalynology. **Bee World**, n. 5, p. 125-138, 1970.

LUSBY, P. E.; COOMBES, A. L.; WILKINSON, J. M. Bacterial activity of different honeys against Pathogenic Bacteria. **Archives of Medical Research**, v. 36, p. 464 – 467, 2005.

LYNN, E. G.; ENGLIS, D. T.; MILUM, V. G. Effect of processing and storage on composition and color of honey. **Food Research**, v. 1, p. 23-27, 1936.

MADHAVI, D. V.; DESPANDE, S. S.; SALUNKHE, D. K. In: MADHAVI, D. L.; DESPANDE, S. S.; SALUNKHE, D. K. (Eds), **Food Antioxidants.** New York: Marcel Dekker, 1996.

MADSEN, H. L.; BERTELSEN, G.; SKIBSTED, L. H. Antioxidative activity of spices and spices extracts. In: RISCH, S. J.; HO, C. (Ed.) **Spices:** flavor chemistry and antioxidant properties, Washington: American Chemical Society, 1997. p. 176-187.

MARCHINI, L.C.; MORETI, A.C. de C.C. Características físico-químicas de amostras de mel de cinco diferentes espécies de eucaliptos. In: Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, 4, Campinas, 2001. **Resumos...** Campinas: SBCTA, 2001. p.42.

MARCHINI, L. C.; MORETI, A. C. de C. C.; OTSUK, I. P. Análise de agrupamento, com base na composição físico-química, de amostras de méis produzidos por *Apis mellifera* L. no estado de São Paulo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 25, n. 1, p. 8 – 17, jan./mar. 2005.

MARCHINI, L. C.; MORETI, A. C. de C. C.; SILVEIRA NETO, S. Características físico-químicas de amostras de mel e desenvolvimento de enxames de *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera, Apidae), em cinco diferentes espécies de eucalipto. **Boletim CEPPA**, v. 21, n. 1, 2003.

MARCHINI, L. C.; SODRÉ, G. da S.; SABADIN, J. Análises físico-químicas de méis de *Apis mellifera* provenientes de diferentes municípios do Estado do Paraná. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 15, 2004, Natal. **Anais...** Natal: CONBRAPI, 2004. (Compact-disc).

MATEO, R.; BOSCH-REIG, F. Classification of Spanish unifloral honeys by discriminant analysis of electrical conductivity, color, water content, sugars and pH. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 46, p. 393-400, 1998.

MAURIZIO, A. Mikroskopische und papierchromatographische untersuchungen in the honig von hummeln, meliponine und aderen zuckerhaltige saeft sammelnde Insekten. **Zeitschrift für Bienenforschung**, v. 7, n. 4, p. 98-110, 1964.

MAURIZIO, A. Microscopy of honey. In CRANE, E. **Honey a comprehensive survey**. London, UK: Heinemann, 1975, p. 240-257.

MANZOCCO, L.; CALLIGARIS, S.; MASTROCOLA, D.; NICOLI, M. C.; LERICI, C. R. Review of non-enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. **Trends in Food Science and Technology**, v. 11, p. 340-346, 2001.

MCKIBBEN, J.; ENGESETH, N. J. Honey as a protective agent against lipid oxidation in ground turkey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 50, p. 592-595, 2002.

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

MELHEN, T. S.; CRUZ-BARROS, M. A. V. da; CORRÊA, A. M. da S.; MAKINO-WATANABE, H.; SILVESTRE-CAPELATO, M. S. F.; ESTEVES, V. L. G. **Variabilidade Polínica em Plantas de Campos do Jordão (São Paulo, Brasil)**. Boletim do Instituto de Botânica: São Paulo, SP – Brasil, n. 16, 2003, 104 p.

MELO, E. de A.; GUERRA, N. B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Boletim SBCTA**, Campinas, vol. 36, n. 1, p. 1-11, jan.-jun. 2002.

MELO, M. S. de. **Caracterização do Patrimônio natural dos Campos Gerais do Paraná**. Relatório de Pesquisa. Ponta Grossa: UEPG, 2003.

MENDES, E.; BROJO PROENÇA, E.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; FERREIRA, M. A. Quality Evaluation of Portuguese Honey. **Carbohydrate Polymers**, v. 37, p. 219-223, 1998.

MERCOSUL. **Regulamento Técnico Mercosul “Identidade e Qualidade do Mel”**. Resolução GMC N° 15/94. Montevideu, 1999. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/consultasilegis/do/consultaLei?op=viewTextual&codigo=6020>>. Acesso em 14 jun.2006.

MIRANDA, M. M. B., ANDRADE, T. A. P. **Fundamentos de Palinologia**. Fortaleza: Imprensa Universitária da Universidade Federal do Ceará, 1990. 99p.

MOLAN, P. C. The antibacterial activity of honey. 2. Variation in the potency of the antibacterial activity. **Bee world**, v. 73, p. 59-76, 1992.

MOLAN, P. C. The antibacterial properties of honey. **Chemistry in New Zeland**, julho, p. 10-14, 1995.

MOLAN, P. C. Honey as an antimicrobial agent. **Bee Products**. New York: Plenum Press, p. 27-37, 1996.

MOLAN, P. C. The limitations of the methods of identifying the floral source of honeys. **Bee World**, v. 79, p. 59-68, 1998.

MOLAN, P. C. Not all honeys are the same for wound healing. **European Tissue Repair Society – Bulletin**, v. 9, p. 5–6, 2002.

MOLAN, P. C.; ALLEN, K. L. The Effect of Gamma-irradiation on the Antibacterial Activity of Honey. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 48, p. 1206-1209, 1996.

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

MORETI, A. C. de C. C.; CARVALHO, C. A. L.; OLIVEIRA, P. C. F.; MARCHINI, L. C. Botânica e fisiologia vegetal. Espectro Polínico de amostras de mel de *Apis mellifera* L. coletadas na Bahia. **Bragantia**, Campinas, v. 59, n. 1, p.1-6, 2000.

MORETI, A. C. de C. C.; SODRÉ, G. S.; MARCHINI, L. C., CARVALHO, C. A. L. Cor de amostras de méis de *Apis mellifera* L. de diferentes estados brasileiros. **Boletim de Indústria Animal**, Nova Odessa, v. 63, n. 3, p. 159-164, 2006.

NAGAI, T.; INOUE, R.; KANAMORI, N.; SUZUKI, N.; NAGASHIMA, T. Characterization of honey from different floral sources. Its functional properties and effects of honey species on storage of meat. **Food Chemistry**, v. 97, p.256-262, 2006.

NAGAI, T; SAKAI, M., INOUE, R.; INOUE, H; SUZUKI, N. Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly, and propolis. **Food Chemistry**, v. 75, p.237-240, 2001.

NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagens in food. **CRC-Critical Review in Food Science and Nutrition**, v. 29, p. 273-300, 1990.

NASSER, S., MABROUK, A., MAHER, A. Colonization of burn wounds in Ain Shams University burn unit. **Burns**, v. 29, p. 229–233, 2003.

NATIONAL HONEY BOARD. **Properties of honey**. Disponível em: <<http://www.nhb.org/properties/index.html>>. Acesso em 22 jun. 2006.

NICOLI, M. C.; ANESE, M.; PARPINEL, M. T.; FRANCESCHI, S.; LERICI, C. R. Loss and/or formation of antioxidants during food processing and storage. **Cancer Letters**, v. 114, p. 71-74, 1997.

NOGUEIRA NETO, P. **A criação de abelhas indígenas sem ferrão (Meloponinae)**. São Paulo: Chácaras e Quintais, 1953. 280 p.

NORONHA, P.R.G. **Caracterização de méis cearenses produzidos por abelhas africanizadas: parâmetros químicos, composição botânica e colorimetria**. 1997, 147f. Dissertação de Mestrado - UFC, Fortaleza, 1997.

O MEL e as abelhas. **Revista Brasileira de Agropecuária**, São Paulo, n. 15, p. 9-11, 2003.

OSZMIANSKI, J.; LEE, C. Y. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, p. 1892-1898, 1990.

OUCHEMOUKH, S.; LOUAILECHE, H.; SCHWEITZER, P. Physicochemical characteristics and pollen spectrum of some Algerian honeys. **Food Control**, v. 18, p. 52-58, 2007.

PEREIRA, F. De M.; LOPES, M. T. DO R.; CAMARGO, R. C. R. DE; VILELA, S. L. DE O. Produção de mel. **Embrapa Meio Norte**, Sistema de Produção, 3, versão eletrônica, jul. 2003. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mel/index.htm>>. Acesso em 14 jun. 2006.

PÉREZ-ARQUILLUÉ, C.; CONCHELO, P.; ARIÑO, A.; JUAN, T.; HERRERA, A. Physicochemical attributes and pollen spectrum of some unifloral Spanish honeys. **Food Chemistry**, v. 54, p. 167-172, 1995.

PERSONO-ODDO, P. L.; BALDI, E.; ACCORTI, M. Diastase activity in some unifloral honey. **Apidologie**, v. 21, p. 17-24, 1990.

PETERSON, J. E.; DWYER, J. Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**, v. 18 (12), p. 1995-2018, 1998.

PLANTAS do cerrado. Disponível em: <<http://www.hortomedicinal.hpg.com.br/plantascerrado.htm>>. Acesso em 14 jun. 2006.

POKORNÝ, J. Natural antioxidants for food use. **Trends in Food Science and Technology**, v. 2, n. 9, p. 223-227, 1991.

POSTMES, T.; BOOGAARD, A.E.; VAN DEN HAZEN, M. Honey for wounds, ulcers, and skin graft preservation. **Lancet**, v. 341, p. 756-763, 1993.

PRATT, D. E.; HUDSON, B. J. F. Natural antioxidants not exploited commercially. In: HUDSON, B. J. F. (Ed.) **Food Antioxidants**. London: Elsevier Applied Science, 1990. p. 171- 191.

RAJALAKSHMI, D.; NARASIMHAN, S. Food antioxidants: sources and methods of evaluation. In: MADHAVI, D. L.; DESHPANDE, S. S.; SALUNKHE, D. K. (Ed.) **Food antioxidants – technological, toxicological and health perspectives**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1995. p. 65-157.

RAMALHO, M.; GUIBU, L. S.; GIANNINI, T. C.; KLEINERT-GIOVANNINI, A.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Characterization of some southern Brazilian honey and bee plants through pollen analysis. **Journal of Apicultural Research**, v. 30, p. 81-86, 1991.

RODRÍGUEZ, G. O. DE; FERRER, B. S. DE; FERRER, A.; RODRÍGUEZ, B. Characterization of honey produced in Venezuela. **Food Chemistry**, v. 84, p. 499-502, 2004.

ROSENBLAT, G.; ANGONNET, S.; GOROSHIT, A.; TABAK, M.; NEEMAN, I. Antioxidant properties of honey produced by bees fed with medical plant extracts. **Bee Products**, p. 49-55, 1996.

RUSSMANN, H. Hefen und Glycerin in Blütenhonigen – Nachweis einer Gärung oder einer abgestoppten Gärung. **Lebensmittelchemie**, v. 52, p. 116-117, 1998.

RUSSO, A., LONGO, R. E. VANELLA, A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. **Fitoterapia**, v. 73, p. S21-S29, 2002.

SANTOS, C. F. de O. **Morfologia e Valor Taxonômico do Pólen das Principais Plantas Apícolas**. 1961, 92 f. Tese – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da USP, Piracicaba, 1961.

SANTOS, K. S.; MALASPINA, O.; PALMA, M.S. Cinética da diástase em méis de diferentes origens florais. Um novo protocolo experimental. **Mensagem Doce**. São Paulo, n. 70, p. 2 – 4, mar. 2003.

SATO, T.; MIYATA, G. The Nutraceutical Benefit, Part III: Honey. **Nutrition**, v. 16, n. 6, 2000.

SCHULER, P. Natural antioxidants exploited commercially. In: HUDSON, B. J. F. (Ed.) **Food Antioxidants**. London: Elsevier Applied Science, 1990. p. 99-169.

SEEMAN, P.; NEIRA, M. **Tecnología de la producción apícola**. Valdivia: Universidad Austral de Chile/ Facultad de Ciencias Agrarias Empaste, 1988. 202p.

SEIJO, M. C.; AIRA, M. J.; IGLESIAS, I.; JATO, M. V. Palynological characterization of honey from La Coruña province (NW Spain). **Journal of Apicultural Research**, v. 31, n. 3/4, p. 149-155, 1992.

SERRA, M. C. C. Avaliação do Potencial Antioxidante do Mel da Região da Lousa. In: 8º Fórum Nacional de Apicultura – Boticas Serra do Barroso, 2007, Portugal. **Resumos...** Portugal: FNAP, CAPOLIB, 2007.

SHAHIDI, F. Natural antioxidants: an overview. In: SHAHIDI, F. editor. **Natural antioxidants: Chemistry, health effects and applications**. Champaign, IL: AOCS Press, 1997. p. 1-7.

SHAHIDI, F. Antioxidants in food and food antioxidants. **Nahrung**, v. 44, p. 158-163, 2000.

SHAHIDI, F. Functional foods: their role in health promotion and disease prevention. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 5, p. 146-149, 2004.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P. K.; WANASUNDARA, P. D. Phenolic antioxidants. **CRC-Critical Review in Food Science and Nutrition**, v. 32, n. 1, p. 67-103, 1992.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Food Phenolics: sources, chemistry, effects and applications**. Lancaster: Technomic, 1995, 321 p.

SHI, H.; NIKI, E. Stoichiometric and Kinetic studies on ginkgo biloba extract and related antioxidants. **Lipids**, v. 33, n. 4, p. 365-369, 1998.

SHIN, H., USTUNOL, Z. Carbohydrate composition of honey from different floral sources and their influence on growth of selected intestinal bacteria. **Food Research International**, v. 38, p. 721-728, 2005.

SILVA, C. L. da; QUEIROZ, A. J. de M.; FIGUEIRÊDO, R. M. F. de. Caracterização físico-química de méis produzidos no Estado do Piauí para diferentes floradas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 8, n. 2 – 3, mai/dez. 2004.

SINGH, N.; BATH, P. K. Quality evaluation of different types of Indian honey. **Food Chemistry**, v. 58, p. 129-133, 1997.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods of Enzymology**, v.299, p. 152-178, 1999.

SIX, P. Current research in natural food antioxidants. **Food Technology**, v. 5, n. 6, p. 679-687, 1994.

SMITH, F. G. Deterioration of the color of honey. **Journal of Apicultural Research**, Bucharest, v. 6, n. 2, p. 95-98, 1967.

SNOW, M. J.; MANLEY-HARRIS, M. On the nature of non-peroxide antibacterial activity in New Zealand manuka honey. **Food Chemistry**, v. 84, p. 145-147, 2004.

SODRÉ, G. DA S. **Características físico-químicas, microbiológicas e polínicas de amostras de méis de Apis mellifera L., 1758 (Hymenoptera: Apidae) dos Estados do Ceará e Piauí**. 2005. 127p. Tese (Doutorado)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2005.

SODRÉ, G. da S.; MARCHINI, L. C.; CARVALHO, C. A. L. Açúcares totais, redutores e sacarose de amostras de Apis mellifera (Hymenoptera: apidae) provenientes da região litoral norte no estado da Bahia. In: Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, 4, Campinas. **Resumos...** Campinas: SBCTA, 2001. p.114.

SODRÉ, G. DA S.; MARCHINI, L. C.; CARVALHO, C. A. L. de; MORETI, A. C. de C. C. Pollen analysis in honey samples from the two main producing regions in the Brazilian northeast. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 79, n. 3, p. 381-388, 2007a.

SODRÉ, G. DA S.; MARCHINI, L. C.; MORETI, A. C. de C. C.; OTSUK, I. P. CARVALHO, C. A. L. de. Caracterização físico-química de amostras de méis de Apis mellifera L. (Hymenoptera: Apidae) do Estado do Ceará. **Ciencia Rural**, Santa Maria, v.37, n. 4, p. 1139-1144, jul-ago, 2007b.

SOLER, C.; GIL, M. I.; GARCÍA-VIGUERA, C.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Flavonoid patterns of French honeys with different floral origin. **Apidologie**, v. 26, p. 53-60, 1995.

SUGUNA, L.; CHANDRAKASAN, G.; THOMAS JOSEPH, K. Influence of honey on collagen metabolism during wound healing in rats. **Journal of Clinical Biochemistry & Nutrition**, v. 13, p. 7-12, 1992.

TAKEDA, I. J. M.; FARAGO, P. V.; SOUZA, M. K. F. de; GELINSKI, V. V. Catálogo polínico do Parque Estadual de Vila Velha, Paraná – 1ª Parte. **Publicatio UEPG – Biological and Health Sciences**, v. 6, n. 1, p. 61-73, 2000.

TAKEDA, I. J. M.; FARAGO, P. V.; SOUZA, M. K. F. de; GELINSKI, V. V. Catálogo polínico do Parque Estadual de Vila Velha, Paraná – 2ª Parte. **Publicatio UEPG – Biological and Health Sciences**, v. 7, n. 1, p. 7-18, 2001.

TAKEDA, I. J. M.; FARAGO, P. V.; SOUZA, M. K. F. de; GELINSKI, V. V. Catálogo polínico do Parque Estadual de Vila Velha, Paraná – 3ª Parte. **Arquivo de Ciências da Saúde da Unipar**, v. 6, n. 1, jan/abr, 2002a.

TAKEDA, I. J. M.; FARAGO, P. V.; SOUZA, M. K. F. de; GELINSKI, V. V. Catálogo polínico do Parque Estadual de Vila Velha, Paraná – 4ª Parte. **Arquivo de Ciências da Saúde da Unipar**, v. 6, n.3, set/dez, 2002b.

TAN, S. T.; WILKINS, A. L.; HOLLAND, P. T.; MCGUIE, T. K. Extractives from new-zealand unifloral honeys .2. Degraded carotenoids and other substances from heather honey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 37, p. 1217-1221, 1989.

TERRAB, A.; DIEZ, M. J.; HEREDIA, F. J. Palynological, physico-chemical and colour characterization of Moroccan honeys. II. Orange (*Citrus* sp.) honey. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 38, p. 387-394, 2003.

TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; BLAZQUEZ, M. A.; GARCÍA-VIGUERA, C.; FERRERES, F.; TOMÁS-LORENT, F. A comparative study of different Amberlite XAD resins in flavonoids analysis. **Phytochemistry Analysis**, v. 3, p. 178-181, 1992.

TOSI, E.; MARTINET, R.; ORTEGA, M.; LUCERO, H.; RÉ, E. Honey diastase activity modified by heating. **Food Chemistry**, v. 106, p. 883-887, 2008.

TURHAN, I.; TETIK, N.; KARHAN, M.; GUREL, F.; TAVUKCOUGLU, H. R. Quality of honeys influenced by thermal treatment. **LWT – Food Science and Technology**, v. 106, p. 883-887, 2007.

TURKMEN, N.; SARI, F.; POYRAZOGLU, E. S.; VELIOGLU, Y. S. Effects of prolonged heating on antioxidant activity and colour of honey. **Food Chemistry**, v. 95, p. 653 – 657, 2006.

VARGAS, T. **Caracterização da qualidade do mel produzido nos Campos Gerais**. 2006, 150f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2006.

VON DER OHE, W.; PERSANO-ODDO, L.; PIANA, M. L. Harmonized methods of melissopalynology. **Apidologie**, v. 35, p. S18-S25, 2004.

VON DER OHE, W. Unifloral honeys: chemical conversion and pollen reduction. **Grana**, 33, p. 292-294, 1994.

VUONG, C., OTTO, M. Staphylococcus epidermidis infections. **Microbiology and Infection**, v. 4, p. 481–489, 2002.

WAHDAN, H.A.L. Causes of the antimicrobial activity of honey. **Infection**, v.26, p. 26-31, 1998.

WANASUNDARA, U.; AMAROWICZ, R.; SHAHID, F. Isolation and identification of na Antioxidative component in canola. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 6, p. 1285-1290, 1994.

WESTON, R. J. The contribution of catalase and others natural products to the antibacterial activity of honey: a review. **Food Chemistry**, v. 71, p. 235-239, 2000.

WESTON, R. J.; BROCKLEBANK, L. K.; LU, Y. Identification and quantitative levels of antibacterial components of some New Zealand honeys. **Food Chemistry**, v. 70, p. 427-435, 2000.

WETTASINGHE, M.; SHAHID, F. Evening primrose meal: A source of natural antioxidants and scavengers of hydrogen peroxide and oxygen free radicals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p.1801-1812, 1999a.

WETTASINGHE, M.; SHAHID, F. Antioxidant and free radical scavenging properties of ethanolic extracts of defatted borage (*Borago borealis* L.) seeds. **Food Chemistry**, v. 67, p. 399-414, 1999b.

WETTASINGHE, M.; SHAHIDI, F. Iron (II) chelation activity of extracts of borage and evening primrose meals. **Food Research International**, v. 35, p. 65-71, 2002.

WHITE JUNIOR., J. W. Detection of Honey Adulteration By Carbohydrate Analysis. **Journal - Association of Official Analytical Chemists**, v. 63, n. 1, 1980.

WHITE JÚNIOR, J. W. Quality evaluation of honey: role of HMF and diastase assays. Part II. **American Bee Journal**, v. 32, n. 12, p. 792-794, 1992.

WHITE JÚNIOR, J. W. The role of HMF and diastase assays in honey quality evaluation. **Bee World**, v. 75, n. 3, p. 104 – 117, 1994.

WHITE, J. W. Composition of honey. In CRANE, E. **Honey. A comprehensive survey**. Londres: Heinemann, 1979. p. 157-207.

WHITE, J. W.; SUBERS, M. H.; SCHEPARTZ, A. I. The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose-oxidase system. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 73, p. 57 – 70, 1963.

YEN, G., WU, J. Antioxidant and radical scavenging properties of extracts from *Ganoderma tsugae*. **Food Chemistry**, v. 65, p. 375-379, 1999.

YUSOF, N.; HAFIZA, A. H. A.; ZOHDI, R. M.; BAKAR, M. Z. A. Development of honey hydrogel dressing for enhanced wound healing. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 76, p. 1767-1770, 2007.