

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**  
**ORGÂNICA**

**DISSERTAÇÃO**

**Investigação de Ácidos Fenólicos em Amostras de Mel  
por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e sua  
Aplicação na Caracterização da Origem Floral**

**Ricardo Figueira da Silva**

**Março 2004**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA**

**INVESTIGAÇÃO DE ÁCIDOS FENÓLICOS EM AMOSTRAS DE  
MEL POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E  
SUA APLICAÇÃO NA CARACTERIZAÇÃO DA ORIGEM FLORAL**

**RICARDO FIGUEIRA DA SILVA**

*Sob a Orientação da Professora*  
**Dra. Rosane Nora Castro**

Tese submetida como requisito  
parcial para obtenção do grau de  
Mestre em Ciência. Área de  
Concentração em Química de  
Produtos Naturais.

Seropédica, RJ  
Março de 2004

547.8432222  
S586i

T

Silva, Ricardo Figueira da, 1978

Investigação de ácidos fenólicos em amostras de mel por cromatografia líquida de alta eficiência e sua aplicação na caracterização da origem floral / Ricardo Figueira da Silva. – 2003.80f.: il., tab.

Orientadora: Dra. Rosane Nora Castro.  
Dissertação (mestrado)- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Exatas. Departamento de Química.  
Bibliografia: f.73-82.

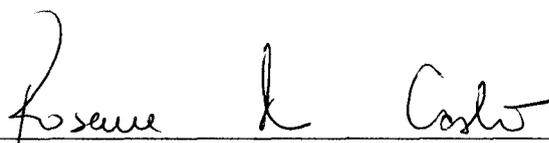
1. Ácido fenólico – Teses. 2. Mel – Teses. 3. Origem floral – Teses. 4. Cromatografia líquida de alta eficiência – Teses. I. Castro, Rosane Nora. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Instituto de Ciências Exatas. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA ORGÂNICA**

**RICARDO FIGUEIRA DA SILVA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química Orgânica, área de Concentração em Produtos Naturais, como requisito parcial para obtenção do grau de *Mestre em Ciência* Química Orgânica.

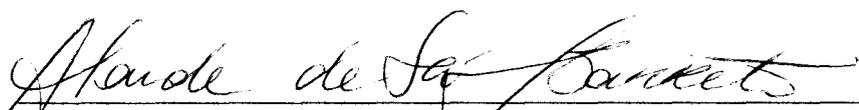
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 30/03/04



---

Dra. Rosane Nora Castro -UFRRJ -DEQUIM

(Presidente-Orientadora)



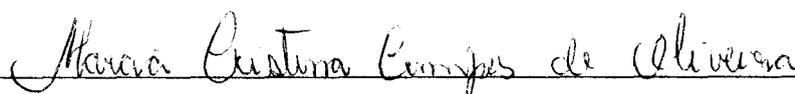
---

Dra. Alaíde de Sá Barreto (FIOCRUZ- FARMANQUINHOS)



---

Dr. Mário Geraldo de Carvalho (DEQUIM-ICE-UFRRJ)



---

Dra. Márcia Cristina Campos de Oliveira (IB-Depto Fitopatologia-UFRRJ)-Suplente

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por todas as muitas bênçãos derramadas ao longo de minha vida, que por mais que tenha feito ou possa fazer não serei capaz de dizer ser merecedor.

Aos meus queridos pais pelo apoio e carinho desprendido em todas as etapas de minha vida.

À minha muito amada esposa pela dedicação, amor e compreensão pelos momentos de ausência devido aos inúmeros dias de estudo na casa de colegas de curso.

As minhas tias Isaura e Neuza pelo carinho e por me inspirarem força nos momentos de fraqueza.

Aos meus sogros e a minha cunhada, pelo incentivo e apoio nos dias em que se despediam de mim ainda de madrugada quando tinha que estar de manhã bem cedo na universidade para iniciar mais um dia de estudo e trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-graduação por participarem de minha vida de maneira tão significativa, servindo-me como exemplo de bom profissional, demonstrando a todo o momento o interesse de ver surgir em mim o entendimento.

Aos meus colegas de pós-graduação pelos momentos de companheirismo que por mais atribuições que possa eu atravessar, nunca poderão ser esquecidos. Principalmente, aos colegas Cláudio, Rose, Tatiana, Aline, Marli e Júlio que demonstraram por muitas vezes serem mais que colegas perseguindo um mesmo ideal, e sim grandes amigos, e a este último acrescento um especial agradecimento pela paciência em auxiliar nos meus percalços no mundo da informática.

Às estagiárias de laboratório Alessandra e Débora pelo importante auxílio na parte experimental do meu trabalho de bancada.

Ao secretário da pós-graduação Osmar pelo desprendimento no auxílio.

Aos técnicos de laboratório Eli e Fábio pelo auxílio e atenção nas horas requisitadas.

E agradeço de maneira muito especial uma pessoa que demonstrou ser bem mais do que uma professora orientadora, uma pessoa que confiou em mim e soube entender minhas dificuldades, e teve competência e amizade para ajudar-me a ultrapassá-las. Agradeço a excelente professora Rosane Nora Castro.

“Bem aventurado aquele que teme ao Senhor e anda nos seus caminhos, pois comerás do trabalho das tuas mãos; feliz serás, e te irá bem.” (Salmo 128: 1)

“Louvai ao Senhor, porque ele é bom; porque a sua benignidade dura para sempre.”  
( Salmo 136: 1).

## SUMÁRIO

### ÍNDICE DE TABELAS

I

ÍNDICE DE FIGURAS	ii
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
<b>1 – INTRODUÇÃO</b>	
1.1. Um breve histórico sobre o mel	1
1.2. Introdução da <i>Apis mellifera</i> no Brasil	3
1.2.1. Classificação e generalidades sobre abelhas	4
1.2.2. Abelha africanizada	6
1.3. Plantas melíferas	7
1.4. O mel	9
1.4.1. Composição e características físicas do mel	11
1.4.2. Coloração do mel	18
1.4.3. A cristalização	19
1.5. Propriedades terapêuticas do mel	20
1.6. O uso do mel hoje	24
1.7. Produção de mel no Brasil e no mundo	26
<b>2. CARACTERIZAÇÃO DE MÉIS: ANÁLISE PALINOLÓGICA E MARACADORES QUÍMICOS</b>	<b>29</b>

<b>3. IDENTIFICAÇÃO DOS MÉIS PELOS COMPOSTOS FENÓLICOS</b>	<b>33</b>
<b>4. OBJETIVOS e JUSTIFICATIVAS</b>	<b>35</b>
<b>5. PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>36</b>
<b>5.1. Material e Métodos</b>	<b>36</b>
<b>5.2. Amostras de Méis</b>	<b>37</b>
<b>5.3. Padrões de derivados fenólicos</b>	<b>39</b>
<b>5.4. Análise por Cromatográfica Líquida de Alta Eficiência (CLAE)</b>	<b>40</b>
<b>5.5. Extração dos Compostos fenólicos da Amostra de Mel</b>	<b>40</b>
<b>5.6. Identificação e quantificação dos ácidos fenólicos</b>	<b>43</b>
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>43</b>
<b>6.1. Metodologia Extrativa e Analítica</b>	<b>44</b>
<b>6.2. Comportamento Cromatográfico e espectros de UV dos padrões</b>	<b>47</b>
<b>6.2.1. Análise dos Ácidos Fenólicos por Espectrofotometria no UV</b>	<b>50</b>
<b>6.3. Identificação dos Ácidos Fenólica nos Méis de Eucalipto e Silvestre</b>	<b>58</b>
<b>7. CONCLUSÕES</b>	<b>71</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>73</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Meses de floração do eucalipto	9
<b>Tabela 2:</b> Composição básica do mel	13
<b>Tabela 3:</b> Comparação de calorias do mel com outros alimentos	14
<b>Tabela 4:</b> Teor de minerais em mel claro e mel escuro	16
<b>Tabela 5:</b> Nutrientes presentes em méis em relação à necessidade diária humana	22
<b>Tabela 6.</b> Produção Mundial de mel em mil toneladas	27
<b>Tabela 7.</b> Produção de mel de abelhas no Brasil de 1998 a 2001, segundo a FAO	28
<b>Tabela 8</b> – Amostras de méis analisadas nesse estudo	38
<b>Tabela 9:</b> Análises físico-químicas dos méis de eucalipto e silvestre	39
<b>Tabela 10.</b> Tempo de retenção ( $t_R$ ) e comprimento de onda ( $\lambda_{max}$ ) dos ácidos fenólicos padrões ( <i>Mistura A</i> ) analisados por CLAE com detector de fotodiodo	48
<b>Tabela 11.</b> Tempo de retenção ( $t_R$ ) e comprimento de onda ( $\lambda_{max}$ ) dos ácidos fenólicos padrões ( <i>Mistura B</i> ) analisados por CLAE com detector de fotodiodo	48
<b>Tabela 12.</b> Derivados de ácidos benzóico e cinâmico	51
<b>Tabela 13:</b> Teor dos ácidos fenólicos (mg/100g de mel) encontrados nas amostras de méis analisadas	67

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Diferentes colorações de méis de origem unifloral e multifloral	<b>19</b>
<b>Figura 2:</b> Microscopia de grãos de pólen. <b>1.</b> Moraceae, Tipo <i>Cecropia</i> ; <b>2.</b> Compositae, Tipo <i>Baccharis</i> ; <b>3.</b> Gramineae, Tipo <i>Zea</i> ; <b>4.</b> Myrtaceae, Tipo <i>Eucalyptus</i> ; <b>5.</b> Compositae, Tipo <i>Vernonia</i> ; <b>6.</b> Compositae, Tipo <i>Eupatorium</i>	<b>30</b>
<b>Figura 3:</b> Fluxograma da preparação dos extratos de mel	<b>42</b>
<b>Figura 4:</b> Espectro de absorção no UV da quercetina em metanol	<b>45</b>
<b>Figura 5:</b> Espectro de absorção no UV da apigenina em metanol	<b>45</b>
<b>Figura 6:</b> Espectro de absorção do extrato metanólico de compostos fenólicos obtidos com amostra RF1 (mel eucalipto)	<b>46</b>
<b>Figura 7:</b> Espectro de absorção do extrato metanólico de compostos fenólicos obtidos com amostra RF10 (mel silvestre)	<b>46</b>
<b>Figura 8:</b> Separação de padrões de ácidos fenólicos ( <i>Mistura A</i> ) em coluna analítica C-18 (25cm x 4.6mmx 5µm) por CLAE	<b>49</b>
<b>Figura 9:</b> Separação de padrões de ácidos fenólicos ( <i>Mistura B</i> ) em coluna analítica C-18 (25cm x 4.6mmx 5µm) por CLAE	<b>49</b>
<b>Figura 10:</b> Espectro ultravioleta do ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico	<b>52</b>
<b>Figura 11:</b> Espectro ultravioleta do ácido cinâmico	<b>52</b>
<b>Figura 12:</b> Espectro de ultravioleta ácido gálico	<b>53</b>
<b>Figura 13:</b> Espectro de ultravioleta ácido siríngico	<b>53</b>
<b>Figura 14:</b> Espectro ultravioleta do ácido vanílico	<b>54</b>
<b>Figura 15:</b> Espectro ultravioleta do ácido protocatecuico	<b>54</b>
<b>Figura 16:</b> Espectro ultravioleta do ácido ferúlico	<b>55</b>
<b>Figura 17:</b> Espectro ultravioleta do ácido 2-metoxi-cinâmico	<b>55</b>
<b>Figura 18:</b> Espectro ultravioleta do ácido cafeico	<b>56</b>
<b>Figura 19:</b> Espectro ultravioleta do ácido sinápico	<b>56</b>
<b>Figura 20:</b> Espectro ultravioleta do ácido clorogênico	<b>57</b>
<b>Figura 21:</b> Espectro ultravioleta do ácido <i>para</i> -cumárico	<b>57</b>

<b>Figura 22:</b> Espectro ultravioleta do ácido <i>meta</i> -cumárico	<b>58</b>
<b>Figura 23:</b> Espectro ultravioleta do ácido <i>orto</i> -cumárico	<b>58</b>
<b>Figura 24:</b> Análise do mel de eucalipto (Amostra RF1) por CLAE em coluna analítica C-18 25cm x 4,6mm x 5 µm). NI picos não identificados	<b>61</b>
<b>Figura 25:</b> Análise do mel de eucalipto (Amostra RF4) por CLAE em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5 µm ). NI picos não identificados	<b>62</b>
<b>Figura 26:</b> Análise do mel de eucalipto (Amostra RF5) por CLAE em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5 µm ). NI picos não identificados	<b>62</b>
<b>Figura 27:</b> Análise do mel de eucalipto (Amostra RF6) por CLAE em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5 µm ). NI picos não identificados	<b>63</b>
<b>Figura 28:</b> Análise do mel de eucalipto (Amostra RF8) por CLAE em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5 µm). NI picos não identificados	<b>64</b>
<b>Figura 29:</b> Análise do mel de eucalipto (Amostra RF14) por CLAE em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5 µm ). NI picos não identificados	<b>65</b>
<b>Figura 30:</b> Análise do mel de eucalipto (Amostra RF15) por CLAE em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5 µm ). NI picos não identificados	<b>65</b>
<b>Figura 31:</b> Análise do mel de silvestre (Amostra RF10) por CLAE em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5 µm). NI picos não identificados	<b>66</b>
<b>Figura 32:</b> Análise do mel de silvestre (Amostra RF12) por CLAE em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5 µm ). NI picos não identificados	<b>68</b>
<b>Figura 33:</b> Análise do mel de silvestre (Amostra RF18) por CLAE em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5 µm ). NI picos não identificados	<b>69</b>

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>CCD</b>	- cromatografia de camada delgada
<b>CLAE</b>	- cromatografia líquida de alta eficiência
<b>UV</b>	-ultravioleta
<b>nm</b>	- nanômetro
<b>p.</b>	- página
<b>AcOEt</b>	- acetato de etila
<b>MeOH</b>	- metanol
<b>mL</b>	- mililitro
<b>min.</b>	- minutos
<b>µm</b>	- micrograma
<b>g</b>	- gramas
<b>kg</b>	- quilogramas
<b>ppm</b>	- parte por milhão
<b>seg.</b>	- segundos
<b>°C</b>	- graus Celsius
<b>t<sub>R</sub></b>	- tempo de retenção
<b>cal.</b>	- calorias
<b>lb</b>	- libras
<b>kcal</b>	- quilocalorias

## RESUMO

SILVA, Ricardo Figueira da. **Investigação de ácidos fenólicos em amostras de mel por cromatografia líquida de alta eficiência e sua aplicação na caracterização da origem floral.** Seropédica. UFRRJ, 2004. 82p. Dissertação de Mestrado em Química Orgânica, Química de Produtos Naturais.

Este trabalho descreve a investigação da presença de ácidos fenólicos em treze amostras de méis de eucalipto e seis amostras de méis silvestres obtidos de diferentes regiões geográficas. As amostras de méis foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de UV-visível e fotodiodo. A análise do perfil cromatográfico associado ao estudo dos espectros de ultravioleta obtidos pelo detector de fotodiodo dos méis de eucalipto permitiu identificar os ácidos gálico, vanílico, *para*-cumárico, ferulico e cinâmico, enquanto para os méis silvestres foram identificados os ácidos gálico, vanílico, clorogênico, *orto*-cumárico, cinâmico e 2-metoxicinâmico.

A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência mostrou-se eficiente, reprodutiva e de fácil manipulação para análise dos ácidos fenólicos nas dezenove amostras de méis estudados. Dada a sua reprodutibilidade e versatilidade poderá vir a ser usada na identificação da origem floral e no controle analítico dos méis comercializados, auxiliando assim a análise palinológica.

Os perfis cromatográficos dos ácidos fenólicos para os méis de uma mesma espécie floral, oriundo de diferentes regiões geográficas, não sofreram alterações qualitativas e quantitativas drásticas, sugerindo que os compostos fenólicos estudados podem servir como marcadores químicos para a caracterização botânica do mel e/ou geográfica.

Os méis silvestres foram estudados em menor número, sendo necessário um estudo mais aprofundado para a confirmação inequívoca da composição química deste mel. Um quantidade maior de amostras de méis de mesma origem floral, porém de diferentes origens geográficas deverão ser analisadas para corroborar na utilização desses ácidos fenólicos como marcadores químicos na origem botânica e/ou geográfica dos méis brasileiros.

Palavras chaves: Ácidos fenólicos, Mel, Cromatografia líquida de alta eficiência, Origem botânica.

## ABSTRACT

SILVA, Ricardo Figueira da. **Investigation of phenolic acids in honey by high-pressure liquid chromatography and its application for the characterization of the botanic origin.** Seropédica. UFRRJ, 2004. 82 p. Dissertação de Mestrado em Química Orgânica, Química de Produtos Naturais.

This work describes the investigation of phenolic acids in 13 samples of eucalyptus honey and 5 samples of wild honeys from different geographical regions. The samples were analyzed by high-pressure liquid chromatography with a diode array detector. The analysis of UV spectra obtained with the eucalyptus honeys showed the presence of gallic, vanillic, *p*-coumaric, ferulic and cinnamic acids while the wild honeys contain mainly gallic, vanillic, chlorogenic, *o*-coumaric, cinnamic and 2-methoxy cinnamic acids.

The HPLC technique has been shown to be effective and reproducible. Given this high reproducibility and versatility, this technique may become useful in the identification of the floral origin in the control of commercial honeys, thus analytical helping the palinological analysis.

The chromatographical profiles of the phenolic acids from honeys of the same species coming from different regions did not show any major qualitative or quantitative differences suggesting that these phenolic compounds may serve as chemical markers for the botanical or geographical characterization of honeys.

The number of wild honeys analyzed was small and a more thorough investigation must be carried out in order to unequivocally confirm their composition. A larger number of samples belonging to the same floral origin but coming from different regions showed be analyzed to corroborate their use chemical markers.

Key words: Phenolic acids, honey, HPLC, botanic origin.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Um breve histórico sobre o mel

Através dos tempos, o mel sempre foi considerado um produto especial, utilizado pelo homem. Evidências de seu uso pelo ser humano aparecem desde a Pré-história, com inúmeras referências em pinturas rupestres e em manuscritos, pinturas do antigo Egito, Grécia e Roma.

A utilização dos produtos da colméia no tratamento de doenças e infecções diversas parece ser, também, bastante antiga. De fato, alguns testemunhos credíveis falam do uso do pólen como estimulante sexual por sacerdotes assírios, 3000 A.C. Na Índia, no Zimbábue e no Antigo Egito também se podem encontrar exemplos desta utilização.

No início da era cristã, vários escritos gregos e romanos falavam sobre os poderes curativos e cicatrizantes da própolis. Os vários tratados médicos, do século XII ao século XV, mencionavam o uso medicinal do mel, da cera e da própolis. O mel tem uma longa e fascinante história, a partir do período Mioceno (10-20 milhões de anos atrás) quando as primeiras plantas com flor e abelhas sociais apareceram. O homem deixou registros de sua atividade de colheita do mel desde o fim da era glacial (10.000 anos atrás). O conhecimento de algumas fases iniciais enriqueceu-se com recentes pesquisas em Antropologia e Arqueologia, e até mesmo com o desenvolvimento das línguas (CRANE, 1985).

A maioria das civilizações antigas primitivas prezava muito o mel, e tanto o mel quanto às abelhas eram sagrados. As abelhas, realmente, faziam mel muito antes da existência do homem e muito, seguramente o homem desfrutava dele desde seu início; ele “caçava” o mel tanto quanto outros alimentos. Em muitas partes do mundo a caça ao mel foi substituída pela apicultura, um hábito que permaneceu quase inalterado por milhares de anos, até que houve um desenvolvimento explosivo na segunda metade do século passado, que abriu o caminho para o estabelecimento do mel como produto mundial. O mel, o alimento que as abelhas têm produzido há 20 milhões de anos, é agora manuseado por máquinas e transportado pelo mundo. O mel é produzido por quase todos os países do mundo, e é artigo de comércio interno do país, bem como freqüentemente, com outros países.

Apesar dos egípcios serem considerados os pioneiros na criação de abelhas, a palavra colméia vem do grego, pois os gregos colocavam seus enxames em recipientes com forma de sino feitos de palha trançada chamada de *colmo*.

Naquela época, as abelhas já assumiam tanta importância para o homem que eram consideradas sagradas para muitas civilizações. Com isso várias lendas e cultos surgiram a respeito desses insetos. Com o tempo, elas também passaram a assumir grande importância econômica e a ser consideradas um símbolo de poder para reis, rainhas, papas, cardeais, duques, condes e príncipes, fazendo parte de brasões, cetros, coroas, moedas, mantos reais, entre outros (CALDEIRA, 2002)

Na Idade Média, em algumas regiões da Europa, as árvores eram propriedade do governo, sendo proibido derrubá-las, pois elas poderiam servir de abrigo a um enxame no futuro. Os enxames eram registrados em cartório e deixados de herança por escrito, o roubo de abelhas era considerado um crime imperdoável, podendo ser punido com a morte (CRANE, 1985).

O mel, que é usado como alimento pelo homem desde a pré-história, por vários séculos foi retirado dos enxames de forma extrativista e predatória, muitas vezes causando danos ao meio ambiente, matando as abelhas. Entretanto com o tempo, o homem foi aprendendo a proteger seus enxames, instalá-los em colméias racionais e manejá-los de forma que houvesse maior produção de mel sem causar prejuízo para as abelhas. Nascia, assim, a apicultura. Essa atividade atravessou o tempo, ganhou o mundo e se tornou uma importante fonte de renda para várias famílias. Hoje, além do mel, é possível explorar, com a criação racional das abelhas, produtos como: pólen apícola, geléia real, rainhas, polinização, apitoxina (veneno da abelha) e cera.

O Brasil é, atualmente, o sexto maior produtor de mel (ficando atrás somente da China, Estados Unidos, Argentina, México e Canadá), entretanto ainda existe um grande potencial apícola (flora e clima) não explorado e grande possibilidade de se maximizar a produção, incrementando o agronegócio apícola. Para tanto, é necessário que o produtor possua conhecimentos sobre biologia das abelhas, técnicas de manejo e colheita do mel, praga e doenças dos enxames, importância econômica, mercado e comercialização.

As abelhas são descendentes das vespas que deixaram de se alimentar de pequenos insetos e aranhas para consumirem o pólen das flores quando esses surgiram, há cerca de 135 milhões de anos. Durante esse processo evolutivo, surgiram várias

espécies de abelhas. Hoje se conhecem mais de 20 mil espécies, mas acredita-se que existam umas 40 mil espécies ainda não-descobertas. Somente 2% das espécies de abelhas são sociais e produzem mel. Entre as espécies produtoras de mel, as do gênero *Apis* são as mais conhecidas e difundidas.

O fóssil mais antigo desse gênero que se conhece é da espécie já extinta *Apis ambruster* e data de 12 milhões de anos. Provavelmente esse gênero de abelha tenha surgido na África após a separação do continente americano, tendo posteriormente migrado para a Europa e Ásia, originando as espécies *Apis mellifera*, *Apis cerana*, *Apis florea*, *Apis korchevniskov*, *Apis andreniformis*, *Apis dorsata*, *Apis laboriosa*, *Apis nuluensis* e *Apis nigrocincta*.

As abelhas que permaneceram na África e Europa originaram várias subespécies de *Apis mellifera* adaptadas às diversas condições ambientais em que se desenvolveram. Embora hoje essa espécie seja criada no continente Americano e na Oceania, elas só foram introduzidas nessas regiões no período da colonização.

As abelhas melíferas, do gênero *Apis*, estavam entre as abelhas sociais que se desenvolveram por todo o mundo. Suas colônias nidificavam nas árvores ocas, em frestas nas rochas, em buracos no chão e, assim como elas fazem ainda hoje, coletavam e armazenavam o pólen, coletavam o néctar e faziam e armazenavam o mel.

## **1.2. Introdução da *Apis mellifera* no Brasil**

As abelhas da espécie *Apis mellifera* foram introduzidas no Brasil em 1840, oriundas da Espanha e Portugal, trazidas pelo Padre Antônio Carneiro. Provavelmente, as subespécies *Apis mellifera mellifera* (abelha preta ou alemã) e *Apis mellifera carnica* tenham sido as primeiras abelhas a chegar em nosso país.

Em 1845, imigrantes alemães introduziram no Sul do País a abelha *Apis mellifera mellifera*. Entre os anos de 1870 a 1880, as abelhas italianas, *Apis mellifera linguistica* foram introduzidas no Sul e na Bahia.

Não se tem registro preciso da introdução das abelhas no Norte e Nordeste do país, mas em 1845 Castelo Branco afirmava: "as abelhas do Piauí não têm ferrão".

Hoje, as abelhas chamadas de africanizadas, oriundas do acasalamento de abelhas rainhas italianas com zangões africanos, por terem herdado muitas características das abelhas africanas, são consideradas como as responsáveis pelo

desenvolvimento apícola do País, de modo que o Brasil, que era o 28º produtor mundial de mel (5 mil toneladas/ano), passou para o 6º (20 mil toneladas em 2001).

As muitas espécies de abelhas do mundo são o grupo de agentes mais importantes na polinização de flores; enquanto a influência dos demais insetos atinge 13% em relação às abelhas. Na agricultura, a abelha melífera (abelha doméstica) é especialmente importante para a polinização de cultura comercial, porque cada colônia fornece grande número de polinizadores potenciais. O processo de polinização é ligado à coleta de néctar e pólen e, por isso, à produção de mel (CRANE, 1985).

### **1.2.1. Classificação e generalidades sobre abelhas**

As abelhas são insetos sociais *Himenópteros*, isto é, tem quatro asas membranosas nuas. Suas principais características são a divisão e a especialização do trabalho. Pertencem à família *Apidae*, que por sua vez divide-se em vários gêneros. No gênero *Apis*, caracterizado pela presença do ferrão (ao contrário da *Melípona* e *Mombus*), destacam-se quatro espécies: *Apis dorsata*, *Apis florea*, *Apis indica* e *Apis mellifera*.

O habitat das abelhas *Apis mellifera* é bastante diversificado e inclui savana, florestas tropicais, deserto, regiões litorâneas e montanhosas. Essa grande variedade de clima e vegetação acabou originando diversas subespécies ou raças de abelhas, com diferentes características e adaptadas às diversas condições ambientais.

A diferenciação dessas raças não é um processo fácil, sendo realizado somente por pessoas especializadas, que podem usar medidas morfológicas ou análise de DNA.

A seguir, apresentam-se algumas características das raças de abelhas introduzidas no Brasil:

#### **a) *Apis mellifera mellifera* (abelha real, alemã, comum ou negra)**

- Originárias do Norte da Europa e Centro-oeste da Rússia, provavelmente, estendendo-se até a Península Ibérica.
- Abelhas grandes e escuras com poucas listras amarelas.
- Possuem língua curta (5,7 a 6,4 mm), o que dificulta o trabalho em flores profundas.
- Nervosas e irritadas tornam-se agressivas com facilidade caso o manejo seja inadequado.

- Produtivas e prolíferas, adaptam-se com facilidade a diferentes ambientes.
- Propolisam com abundância, principalmente em regiões úmidas.

**b) *Apis mellifera ligustica* (abelha italiana)**

- Originárias da Itália.
- Essas abelhas têm coloração amarela intensa; produtivas e muito mansas, são as abelhas mais populares entre apicultores de todo o mundo.
- Apesar de serem menores que as *Apis mellifera mellifera*, têm a língua mais comprida (6,3 a 6,6 mm).
- Possuem sentidos de orientação fracos, por isso, entram nas colmeias erradas freqüentemente.
- Constroem favos rapidamente e são mais propensas ao saque do que abelhas de outras raças européias.

**c) *Apis mellifera caucasica***

- Originárias do Vale do Cáucaso, na Rússia.
- Possuem coloração cinza-escuro, com um aspecto azulado, pêlos curtos e língua comprida (pode chegar a 7 mm).
- Considerada a raça mais mansa e bastante produtiva.
- Enxameiam com facilidade e usam muita própolis.

**d) *Apis mellifera carnica* (abelha carnica)**

- Originárias do Sudeste dos Alpes da Áustria, Nordeste da Iugoslávia e Vale do Danúbio.
- Assemelham-se muito com a abelha negra, tendo o abdome cinza ou marrom.
- Pouco propolisadoras, mansas, tolerantes a doenças e bastante produtivas.
- Coletam "honeydew" (melato) em abundância.
- São facilmente adaptadas a diferentes climas e possuem uma tendência maior a enxamearem.

**e) *Apis mellifera scutellata* (abelha africana)**

- Originárias do Leste da África são mais produtivas e muito mais agressivas.

- São menores e constroem alvéolos de operárias menores que as abelhas européias. Sendo assim, suas operárias possuem um ciclo de desenvolvimento precoce (18,5 a 19 dias) em relação às européias (21 dias), o que lhe confere vantagem na produção e na tolerância ao ácaro do gênero *Varroa*.
- Possuem visão mais aguçada, resposta mais rápida e eficaz ao feromônio de alarme. Os ataques são, geralmente, em massa, persistentes e sucessivos, podendo estimular a agressividade de operárias de colméias vizinhas.
- Ao contrário das européias que armazenam muito alimento, elas convertem o alimento rapidamente em cria, aumentando a população e liberando vários enxames reprodutivos.
- Migram facilmente se a competição for alta ou se as condições ambientais não forem favoráveis.
- Essas características têm uma variabilidade genética muito grande e são influenciadas por fatores ambientais internos e externos.

### **1.2.2. Abelha africanizada**

A abelha, no Brasil, é um híbrido das abelhas européias (*Apis mellifera mellifera*, *Apis mellifera ligustica*, *Apis mellifera caucasica* e *Apis mellifera carnica*) com a abelha africana *Apis mellifera scutellata*. É conhecida como abelha africanizada *Apis mellifera adansonii*.

A variabilidade genética dessas abelhas é muito grande, havendo uma predominância das características das abelhas européias no Sul do País, enquanto ao Norte predominam as características das abelhas africanas.

A abelha africanizada possui um comportamento muito semelhante ao da *Apis mellifera scutellata*, em razão da maior adaptabilidade dessa raça às condições climáticas do País. Muito agressivas, porém, menos que as africanas, a abelha do Brasil tem grande facilidade de enxamear, alta produtividade, tolerância a doenças e adapta-se a climas mais frios, continuando o trabalho em temperaturas baixas, enquanto as européias se recolhem nessas épocas.

Existem ainda várias raças de *Apis mellifera*, a saber: a *sicula*, a *syriaca*, a *caucásica*, a *fasciata*, a *acervorum*, a *unicolor*, a *intermixta*, a *frisei* e outras. Essas porém não nos interessam tanto e não tem a mesma importância que as raças

apresentadas anteriormente.

Encontra-se também na classificação das abelhas o termo *mellifica* para as espécies, em vez de *mellifera*. Refere-se ao primeiro quando se quer relacionar as abelhas como produtoras de mel (*Apis mellifera lingusticca*, *Apis mellifera adansonii*, etc). Outros autores preferem *mellifica*, pois entendem que são colhedoras de mel (na verdade, colhedoras de néctar, que é a substância essencial das flores para transformar em mel).

A estratégia das abelhas para explorar fontes de mel é um processo complexo e fascinante, no qual vários sentidos de cada abelha operam, sozinhas ou em conjunto, de acordo com a sua capacidade individual. A abelha *Apis* é um dos muitos animais que se pode orientar por uma grande variedade de indicações. Esta abelha exibe, também, um padrão de comportamento social do mais alto nível, para animais que agem instintivamente.

Os vários sentidos das abelhas, o olfato e a visão, desempenham os papéis de comunicação e atração durante o processo de coleta.

Uma abelha campeira voa aproximadamente 21-24 km/h, a uma altura que varia entre um e oito metros acima do chão. Geralmente, uma abelha visita entre 50 e 1000 flores numa viagem, e o número médio de viagens de coleta é de cerca de 7-13,5. O mel produzido numa colméia provém de uma área que varia de 500 m a 2 Km de extensão (DE LIMA, 1979).

### **1.3. Plantas melíferas**

O Brasil é um país privilegiado para a prática da apicultura. Mesmo nas regiões secas do Nordeste – sabe-se que regiões desse tipo são um obstáculo para o êxito do empreendimento – encontramos a “algarobeira”, um pasto para as abelhas que não pode ser desprezado (DE LIMA, 1979).

A flora brasileira é tão rica, que mesmo as plantas que passam despercebidas ou que não são reconhecidas como fontes de néctar e/ou pólen, contribuem para um aumento ponderável na produção de mel e/ou pólen.

É bom que o apicultor procure instalar o apiário onde existam plantas melíferas de valor reconhecido, pois sendo assim, poderá aproveitar as vantagens oferecidas e extrair mel em grandes quantidades.

Exemplos de boas plantas melíferas e/ou nectaríferas brasileiras são:

- Bananeiras – florescem o ano inteiro;
- Amor-Agarradinho – bela trepadeira que quase sempre está florida, boa fonte de néctar e pólen. Floresce em abril-maio;
- Onze-horas – planta comum nos jardins e que floresce fartamente durante o ano inteiro. Fornece, principalmente, pólen;
- Cinamomo – produz pólen e néctar (de baixa qualidade);
- Girassol – floresce o ano todo. É um grande produtor de pólen e néctar;
- Uva-do-Japão – Muito procurada pelas abelhas;
- Milho – apesar de ser carente de néctar, produz pólen em abundância;
- Grama – grande produtora de pólen;
- Laranjeiras – o mel dessas árvores é de sabor muito agradável e de grande cotação no mercado;
- Erva-Canudo – mel dourado, perfumado e saboroso;
- Cambará e Assa-Peixe – o mel que essas árvores proporcionam é muito denso, de perfume suave e muito saboroso. O asa-peixe é aconselhado para fortalecer os pulmões;
- Trigo sarraceno – mel escuro e pouco acre;
- Catuaba – produz uma espécie de mel de qualidade reconhecidamente afrodisíaca;
- Azálea – floresce no verão, e o mel obtido é muito apreciado;

Também muito procuradas pelas abelhas são: angico, jasmim, madressilva, tomate, trigo, etc. Todas as variedades de plantas cítricas são muito procuradas pelas abelhas. Importância especial deve ser dada aos eucaliptos, pois além de fornecerem mel de ótima qualidade, são facilmente reconhecidos pelos iniciantes e existem espalhados pelo país. Suas flores são muito ricas em pólen e néctar (DE LIMA, 1979).

Na Tabela 1 apresentamos os meses de floração de algumas espécies de eucalipto.

**Tabela 1:** -Meses de floração do eucalipto (DE LIMA, 1979).

ESPÉCIE	MESES											
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
<i>E. scabra</i>			X			X	X		X			
<i>E. paniculata</i>					X	X		X	X			
<i>E. tereticornis</i>					X	X	X	X	X			
<i>E. triantha</i>										X	X	
<i>E. citriodora</i>			X	X	X			X	X	X		
<i>E. maculata</i>						X			X			
<i>E. microcorys</i>					X	X	X	X	X			
<i>E. melliodora</i>				X		X	X	X	X			
<i>E. camaldulensis</i>							X				X	X
<i>E. alba</i>	X	X	X	X								
<i>E. ficifolia</i> (variedade <i>Alba</i> )			X	X	X		X	X	X			
<i>E.ficifolia</i> variedade <i>Coemina</i> )	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X
<i>E. resinifera</i>										X	X	X
<i>E. robusta</i>	X	X	X									

#### 1.4. O mel

A utilização do mel na nutrição humana não deveria limitar-se apenas a sua característica adoçante, como excelente substituto do açúcar, mas, principalmente, por ser um alimento de alta qualidade, rico em energia e inúmeras outras substâncias benéficas ao equilíbrio dos processos biológicos de nosso corpo.

O mel é a substância doce natural produzida pelas abelhas domésticas, a partir da coleta do néctar das flores ou de secreções de partes de plantas ou de excreções de

insetos que sugam partes das plantas, e que se transformam e combinam com as substâncias específicas de seus próprios organismos, ficando armazenados nos favos das colméias até o amadurecimento. Esta é a definição geral do mel no CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (1990) em que todas as características comercialmente requeridas do produto são descritas.

É o produto mais importante da abelha do ponto de vista quantitativo e econômico, e foi, também, o primeiro produto da abelha usado pelo homem em épocas antigas. A história do uso do mel está paralela a história do homem, e em cada cultura a evidência disto pode ser encontrada no seu uso como uma fonte de alimento e como um símbolo empregado em cerimônias religiosas, mágicas e terapêuticas (CARTLAND, 1970; CRANE, 1980; ZWAENEPREL, 1984).

O mel é basicamente uma mistura complexa de açúcares altamente concentrada. Sua composição química foi objeto de revisões bibliográficas como a realizada por CAMPOS (1997) e SERRANO *et al.*(1994), que sugeriram ser a composição do mel dependente de muitos fatores tais como: espécies colhidas, natureza do solo, raça de abelhas, estado fisiológico da colônia, estado de maturação do mel, condições meteorológicas, etc.

O sabor a cor e o aroma variam de acordo com sua origem botânica, clima, solo, umidade, altitude e até mesmo a manipulação pelo apicultor pode alterar as características do mel.

Como características gerais não são permitidas substâncias estranhas à sua composição, nem adição de corretivos de acidez. É proibidos a adição de corantes, aromatizantes, espessantes, conservadores e edulcorantes de qualquer natureza, sejam eles naturais ou sintéticos.

Quanto à origem floral, o mel pode ser classificado como:

a) Mel de flores, estes podem ser: a) méis uniflorais ou monoflorais - quando o mel é produzido a partir do néctar de uma única espécie floral, por exemplo o mel de laranjeiras, de eucaliptos, etc; b) méis multiflorais, poliflorais ou heteroflorais - quando o mel é produzido de néctar coletado de diversas flores de origens florais diferentes, por exemplo, silvestre; e

b) Méis de melato (conhecido como “honeydew”) que são méis obtidos, primordialmente, a partir de secreções das partes vivas das plantas ou secreções de insetos (cochonilhas), sugadores de plantas que se encontram sobre elas.

Para que o nome da planta apícola possa ser descrito no rótulo da embalagem do mel é necessário que tenha no mínimo 45% de dominância e seja colhido igualmente de uma região com predominância floral na área de visitação das abelhas do apiário (BARTH, 1989).

O mel e o pólen são dois produtos da colméia que resultam diretamente da atividade de coleta das abelhas. Um terceiro é a própolis, algumas vezes chamado cola de abelha, que é usado para impermeabilizar colméias ou cavidades do ninho.

Outros três produtos da colméia, comercialmente cultivados, não são materiais vegetais processados, mas secreções das próprias abelhas. São a cera de abelhas, produzidas nas glândulas abdominais e usadas para construção de favos; a geléia real ou leite de abelhas, produzidas nas glândulas da cabeça e usada para alimentar as larvas, e a apitoxina que é o veneno das abelhas operárias de *Apis mellifera* purificado. Considerando-se o peso, o mel é o menos dispendioso destes seis materiais para o apicultor produzir. Depois vem a cera de abelha, o pólen e, então, a própolis. A geléia real e a apitoxina - os mais dispendiosos de todos - são coletados em quantidades diminutas e sua produção envolve muito trabalho e cuidado.

Muitos dos méis distribuídos comercialmente tem sofrido algum grau de processamento físico, como filtração, centrifugação e decantação, com a finalidade de remover partes de insetos, grãos de pólen e partículas de cera. Fraudes podem ser praticadas durante o processamento no sentido de aumentar-lhe a quantidade. As adulterações mais comuns têm sido realizadas pela adição de xaropes de sacarose, méis artificiais ou água. WOOTON *et al* (1985) trabalharam no monitoramento de adulteração de inúmeros méis.

#### **1.4.1. Composição e características físicas do mel**

A composição química do mel depende de vários fatores, dos quais se salientam: a espécie de abelhas, tipo de solo e de flora e o estado fisiológico da colônia. De um modo geral podemos dizer que o mel é constituído por três componentes essenciais: água (17%), glicídios (80%) e substâncias diversas (3%), como aminoácidos, proteínas, enzimas, vitaminas, ácidos orgânicos e matérias minerais. Por detrás dessa aparente simplicidade, esconde-se um dos produtos biológicos mais complexos.

A cor do mel reflete a sua composição, sendo tanto mais escuro quanto maior é o

teor de substâncias minerais presentes.

Além dos açúcares em solução, o mel também contém ácidos orgânicos, enzimas, vitaminas, acetilcolina, flavonóides, minerais e uma extensa variedade de compostos orgânicos que contribuem para sua cor, odor e sabor, e que até agora ainda não são totalmente conhecidos. Todos estes compostos menores somados, representam em massa, uma pequena parcela do mel. Muitos dos méis distribuídos comercialmente tem sofrido algum grau de processamento físico, como filtração, centrifugação e decantação, com a finalidade de remover partes de insetos, grãos de pólen e partículas de cera.

Os principais componentes do mel são os açúcares, dos quais os monossacarídeos frutose e glicose, juntos, perfazem cerca de 70% do total; dissacarídeos, incluindo sacarose, somam talvez 10% e a água na qual os açúcares estão dissolvidos 17-20%. Contudo, muitas das características pelas quais o mel é bem conhecido – por exemplo, seu sabor, aroma e cor – são determinados não por esses componentes principais, mas por outros que estão presentes em pequenas quantidades.

A composição exata de qualquer mel depende, principalmente, das fontes vegetais das quais ele é derivado, mas também do tempo, solo, e de outros fatores e dois méis nunca são idênticos. A variedade infinita é, de fato, uma grande atração do mel, e pode ser uma fonte inesgotável de pesquisas e estudos.

A Tabela 2 expõe as porcentagens médias e extremas dos constituintes principais de algumas amostras de méis.

**Tabela 2:** Composição básica do mel (WHITE, 1975).

<b>Composição básica do mel</b>			
Componentes	Média	Desvio padrão	Variação
Água (%)	17,2	1,46	13,4 - 22,9
Frutose (%)	38,19	2,07	27,25 - 44,26
Glicose (%)	31,28	3,03	22,03 - 40,75
Sacarose (%)	1,31	0,95	0,25 - 7,57
Maltose (%)	7,31	2,09	2,74 - 15,98
Açúcares totais (%)	1,50	1,03	0,13 - 8,49
Outros (%)	3,1	1,97	0,0 - 13,2
pH	3,91	-	3,42 - 6,10
Acidez livre (meq/Kg)	22,03	8,22	6,75 - 47,19
Lactose (meq/Kg)	7,11	3,52	0,00 - 18,76
Acidez total (meq/Kg)	29,12	10,33	8,68 - 59,49
Lactose/Acidez livre	0,335	0,135	0,00 - 0,950
Cinzas (%)	0,169	0,15	0,020 - 1,028
Nitrogenio (%)	0,041	0,026	0,00 - 0,133
Diastase	20,8	9,76	2,1 - 61,2

Os açúcares representam 95 a 99% da matéria seca do mel. Geralmente, a frutose é mais abundante do que a glicose (Tabela 1), e esta predominância de açúcares simples, e particularmente a porcentagem elevada da frutose, é responsável pela maioria das características físicas e nutritivas do mel. Quantidades pequenas de outros açúcares também estão presentes, como dissacarídeos (sacarose, maltose e isomaltose) e alguns trissacarídeos e oligossacarídeos. Por se apresentarem em pequenas concentrações, sua presença em maiores quantidades pode ser indicativa de adulteração e qualquer variação de sua concentração pode ser útil na determinação da origem botânica do mel.

A alta concentração de diferentes tipos de açúcar é responsável pelas diversas propriedades físicas do mel, tais como: viscosidade, densidade, higroscopicidade, capacidade de granulação (cristalização) e valores calóricos (CAMPOS, 1987; Tabela 3).

**Tabela 3:** Comparação de calorias do mel com outros alimentos.

<b>Alimento</b>	<b>Quantidade de calorias/ kg</b>
Açúcar de Mesa	4.130
Mel de Abelha	3.395
Ovos	1.375
Aves	880
Leite	600

Além dos açúcares, a água presente no mel tem papel importante na sua qualidade e características. A água é o segundo componente em níveis quantitativos e o seu índice é crítico, pois afeta o armazenamento do mel. Somente os méis com menos que 18% de água, podem ser armazenados com o pouco ou nenhum risco da fermentação (STONOGA & FREITAS, 1991).

O índice de água final depende de um número de fatores ambientais durante a produção, tais como: o tempo e a umidade dentro da colméia, mas também das condições do néctar e do tratamento do mel durante a extração e o seu armazenamento.

O conteúdo de água no mel é uma das características mais importantes, influenciando diretamente na sua viscosidade, peso específico, maturidade, cristalização, sabor, conservação e paladar.

A água presente no mel apresenta forte interação com as moléculas dos açúcares, deixando poucas moléculas de água disponíveis para os microorganismos (VERÍSSIMO, 1987). O conteúdo de água do mel pode variar de 15% a 21%, sendo normalmente encontrados níveis de 17% (MENDES & COELHO, 1983). Apesar da legislação brasileira permitir um valor máximo de 20%, valores acima de 18% já podem comprometer sua qualidade final. Entretanto, níveis bem acima desses valores já foram encontrados por diversos pesquisadores em diferentes tipos de mel (CORTOPASSI-LAURINO & GELLY, 1991; AZEREDO & AZEREDO 1999; MARCHINI, 2001).

Em condições especiais de níveis elevados de umidade, o mel pode fermentar pela ação de leveduras osmofílicas (tolerantes ao açúcar) presentes também em sua composição. Segundo CRANE (1985), a maior possibilidade de fermentação do mel está ligada ao maior teor de umidade e leveduras.

O mel contém também ácidos orgânicos (o pH médio é de cerca de 3,9) que

representam menos que 0,5% dos sólidos, podendo ser responsáveis, em parte pela excelente estabilidade do mel frente a microorganismos, e também realçando o seu sabor. Na literatura, pelo menos 19 ácidos orgânicos do mel já foram citados (CRANE, 1990). Sabe-se que o ácido glicônico está presente em maior quantidade; ele é produzido pela ação da enzima glicose-oxidase, proveniente das glândulas hipofaríngeas das abelhas. Já em menor quantidade, podem-se encontrar outros ácidos de baixo peso molecular, tais como: fórmico, acético, benzóico, butírico, láctico, oxálico, málico, succínico, pirúvico, glicólico, cítrico, fenilacético, tartárico, maléico, piroglutâmico e valérico (STRISON *et al.*, 1960; WHITE, 1975; ANDRADE *et al.*, 1997; HUIDOBRO *et al.*, 2002).

TAN *et al.* (1988) constataram alguns ácidos aromáticos no mel unifloral de manuka (*Leptospermum scoparium*) que não estavam presentes no néctar de suas flores. Os méis de manuka e de viperina (*Echium vulgare*), apresentaram alta atividade antimicrobiana, podendo essa atividade estar relacionada com a presença de alguns tipos de ácido (WILKINS *et al.*, 1993).

Os derivados de ácidos fenólicos também devem ser destacados, visto que muitos deles mostraram ser importantes por conferir aroma e sabor para uma série de méis europeus. Segundo AMIOT *et al.* (1989) os compostos fenólicos de méis podem ser divididos em três grupos: ácidos benzóicos e seus ésteres; ácidos cinâmicos e seus ésteres e flavonóides agliconas. A proporção desses três grupos de substâncias pode variar enormemente nos méis conforme as origens florais.

Assim como os ácidos orgânicos, o mel contém também uma série de aminoácidos. WOOTTON *et al.* (1976) constataram em seis amostras de mel australianos os seguintes aminoácidos livres: leucina, isoleucina, histidina, metionina, alanina, fenilalanina, glicina, ácido aspártico, treonina, serina, ácido glutâmico, prolina, valina, cisteína, tirosina, lisina e arginina.

Dentre esses aminoácidos, a prolina, proveniente das secreções salivares das abelhas, é o que apresenta os maiores valores, variando entre 0,2% e 2,8%. Depois vem a lisina, o ácido glutâmico e o ácido aspártico. Juntamente com o conteúdo de água, sua concentração é usada como um parâmetro de identificação da "maturação" do mel (BOSI & BATTAGLINI, 1978).

Em geral, a maior importância dos aminoácidos é que eles podem fornecer "impressões digitais" que distinguem um tipo de mel de outros, e méis, por si, de

substâncias sintéticas disfarçadas em mel. Os aminoácidos são produtos da quebra de proteínas que existem também em quantidades mínimas em méis normais, provenientes das abelhas mais do que das plantas, e insignificantes do ponto de vista dietético.

O mel contém também quantidades mínimas de muitos minerais diferentes que se originam nas plantas e, por isso, variam em méis diferentes. O peso total dos elementos minerais (teor de cinza total) varia de 0,02% a valores próximos de 1%; e é comumente 0,1 a 0,3% (Tabela 2, p. 12; WHITE, 1975). Os minerais estão entre os muitos componentes que afetam a cor do mel. Méis de cor clara, freqüentemente, contêm pouca matéria mineral, e méis escuros podem conter muito mais, embora não necessariamente.

Méis escuros que têm conteúdos altos de minerais incluem os méis de melato (conhecido como “honeydew” ou falso mel), que são produtos elaborados pelas abelhas a partir das excreções açucaradas dos sugadores - homópteros, pulgões, e da seiva elaborada dos vegetais. O conteúdo muito alto (1,0%) é, de fato, provavelmente encontrado só neste tipo de mel, e pode então ser usado como indicador desses méis.

O mel contém muito mais potássio que qualquer outro mineral, 100 vezes a quantidade de ferro, por exemplo, (Tabela 4).

**Tabela 4:** Teor de minerais em mel claro e mel escuro (CRANE, 1985).

<b>Mineral</b>	<b>Mel claro (ppm)</b>	<b>Mel escuro (ppm)</b>
Potássio	205	1.678
Cloro	52	113
Enxofre	58	100
Cálcio	49	51
Sódio	18	76
Fósforo	35	47
Magnésio	19	35
Sílica	22	36
Ferro	2.8	9.4
Manganês	0.30	4.09
Cobre	0.29	0.56

Talvez o constituinte secundário do mel mais discutido seja o hidroximetilfurfural, comumente chamado HMF. Esta substância resulta da quebra de açúcares do tipo hexoses, tais como glicose e frutose, na presença de um ácido, e tem assumido importância no controle de qualidade do mel, porque sua quantidade numa amostra de mel é usada como indicador direto da qualidade (WHITE *et al*, 1979).

A quantidade de HMF certamente aumenta em méis submetidos a altas temperaturas. Assim, sua presença é um indicador de deterioração do mel. O limite superior recomendado pelos órgãos é de 40 ppm. Em climas tropicais, as temperaturas nas colméias podem ser altas e o mel que é deixado na colméia, pode desenvolver um nível alto de HMF.

Algumas vitaminas também foram identificadas no mel, até o momento: vitamina B1 (tiamina), complexo vitamínico B2 (riboflavina, ácido nicotínico –niacina), B6 (piridoxina), ácido pantotênico, e vitamina C (CASTRO *et al*, 2001). A presença dessas vitaminas no mel é interessante, embora as quantidades sejam muito pequenas para serem de importância nutricional ou mesmo na sua identificação floral.

Outros componentes menores do mel, como os materiais "flavorizantes" (aldeídos e álcoois), pigmentos, ácidos e minerais, influenciam consideravelmente nas diferenças entre tipos de mel. AMIOT *et al* (1992) detectaram alguns flavonóides presentes no mel de girassol (conhecidamente rico em flavonóides). Em maiores concentrações, foram encontrados os seguintes flavonóides: pinocembrina (5,7-diidroxiflavanona), pinobanksina (3,5,7-triidroxiflavanona), crisina (5,7-diidroxiflavona), galangina (3,5,7-triidroxiflavona) e quercetina (3,5,7,3',4'-pentaidroxiflavona). Em menores concentrações: tectocrisina (5-hidroxi-7-metoxiflavona) e canferol (3,5,7,4'-tetraidroxiflavona). BOGDANOV (1984) usando cromatografia líquida de alta eficiência constatou a presença de pinocembrina em quatro amostras de mel (duas de origem floral e duas de origem não-floral, o chamado "honeydew"). Outros trabalhos também foram relatados na literatura descrevendo os flavonóides como marcadores da origem floral (TOMÁS-BARBERÁN *et al* 1993a, 1993b; 1994; 2002; 2003)

O mel tem densidade mais alta que qualquer outro gênero alimentício – perto de 50% mais alta que a densidade da água. Mais precisamente, a densidade relativa do mel situa-se entre 1,40 e 1,44 a 20°C, dependendo do seu conteúdo de água. A medida da densidade relativa de uma amostra de mel fornece um modo fácil de avaliar o conteúdo

de água do mel.

Várias propriedades ópticas do mel são de importância prática. O índice de refração aumenta com o conteúdo de sólidos, isto é, decresce com conteúdos altos de água, e o uso de um refratômetro de bolso constitui um modo fácil de estimar o conteúdo de água do mel.

Uma outra propriedade importante é a rotação óptica. A glicose gira no sentido horário (+) e é chamada de dextrógira; o a frutose gira no sentido anti-horário (-) e é chamada de levógira. Desde que a maior parte dos méis de néctar contém mais frutose que glicose, eles têm uma rotação específica negativa. Méis de melato, com menos frutose, e também méis adulterados têm, geralmente, uma rotação específica positiva. Tal rotação óptica tem um valor diagnóstico. O mel também apresenta rotação variável – mudanças na rotação específica ligadas a mudanças do açúcar, mas não de uma maneira direta (CRANE, 1985).

Várias propriedades térmicas do mel têm também uma importância prática. O valor calorífico indica a energia produzida pelo seu metabolismo, e varia de acordo com a sua composição e o estado de cristalização. O valor calorífico do mel é geralmente estimado em 3,04 kcal/g (1380 kcal/lb). O calor específico do mel líquido é de cerca de 0,6 e o do mel granulado um pouco mais alto. A condutividade térmica do mel aumenta com a temperatura e decresce com o conteúdo de água, e varia de 118 a 143 x 10<sup>-5</sup> cal/cm.seg. °C.

A tensão superficial é baixa no mel, e faz com que ele seja um excelente umectante em produtos cosméticos. A tensão de superfície varia com a origem do mel e é, provavelmente, devido às substâncias coloidais. Junto com a viscosidade elevada, é responsável pelas características espumantes do mel (THE VIRTUAL BEEKEEPING GALLERY, 2003).

#### **1.4.2. Coloração do mel**

A cor do mel líquido pode, realmente, variar de branco-aquoso a ambarino ou preto escuro (Figura 1). A cor varia com a origem botânica, com a idade de armazenamento, mas a transparência ou a claridade depende da quantidade de partículas suspensas, tais como o pólen. As cores mais comuns do mel são: avermelhado (*Erica*), amarelo brilhante (castanha), acinzentado (*Eucalyptus*) e esverdeado (melato). Uma vez

cristalizado, o mel varia sua cor porque os cristais de glicose são brancos.

No mercado mundial, o mel é avaliado por sua cor e méis claros alcançam um preço mais alto que os escuros. O sabor e o aroma dos méis, como de qualquer outro gênero alimentício, são mais importantes que sua cor, mas são muito mais difíceis de serem avaliados quantitativamente que a cor. Os méis mais escuros são mais freqüentemente, para o uso industrial, enquanto os méis mais claros foram introduzidos no mercado para o consumo direto.

Em muitos países com um mercado grande de mel, as preferências do consumidor são determinadas pela cor do mel (como uma indicação de um sabor preferido) e assim, ao lado das determinações gerais da qualidade, a cor é o único fator o mais importante que determina a importação e preços por atacado.

Em alguns casos, a cor pode ser indicador seguro da qualidade do mel. O mel torna-se mais escuro durante o armazenamento, mais especialmente acelerado por temperaturas altas, e pela contaminação por metais.

O aparato comercial padrão para a medição e a classificação da cor do mel é o graduador de cor Pfund (em milímetros, AUBERT & GONNET, 1983; RODRIGUEZ LOPEZ, 1985) ou está de acordo com regulamentos de classificações da agricultura (WHITE, 1975 e CRANE, 1980).

As substâncias responsáveis pela cor do mel são, ainda, grandemente desconhecidas. Acredita-se que os minerais estejam entre os fatores responsáveis pela grande variação de cor, como foi mencionado anteriormente.



**Figura 1:** Diferentes colorações de méis de origem unifloral e multifloral.

### **1.4.3. A cristalização**

A cristalização (granulação) é uma outra característica importante para a comercialização do mel, entretanto não para a determinação do preço. Em climas temperados a maioria dos méis cristaliza em temperaturas normais de armazenamento. Isto é devido ao fato que o mel é uma solução supersaturada de açúcar, isto é, contém mais açúcar do que pode permanecer na solução. Muitos consumidores pensam que se o mel cristalizar foi devido a uma adulteração com açúcar.

O primeiro açúcar da solução a cristalizar é a glicose, e dos vários índices de tendência de granulação de diferentes méis, o mais útil é a proporção entre o conteúdo de glicose e o conteúdo de água de cada mel. Mais isto não leva em conta a quantidade de água no mel, na qual ambos os açúcares estão dissolvidos.

A temperatura é importante, desde que acima de 25°C e abaixo de 5°C virtualmente nenhuma cristalização ocorre. Em torno de 14°C é a temperatura melhor para a cristalização rápida, entretanto, a presença de partículas diminutas (por exemplo grãos do pólen, poeira, cera de abelha) e agitação resultam numa cristalização mais lenta. Geralmente, a cristalização lenta produz uns cristais maiores e mais irregulares. Durante a cristalização a água é liberada, e conseqüentemente, o índice de água contida na fase líquida aumenta e com ele o risco da fermentação. Assim, o mel parcialmente cristalizado pode apresentar problemas de preservação, por isso a cristalização controlada e completa é deliberadamente induzida freqüentemente. A cristalização rápida normalmente produz uma granulação fina, e isto fornece ao produto uma consistência e aparência mais agradável (VERÍSSIMO, 1987).

### **1.5. Propriedades terapêuticas do mel**

A utilização dos produtos das abelhas com fins terapêuticos é denominada APITERAPIA, que vem se desenvolvendo consideravelmente nos últimos anos, com a realização de inúmeros trabalhos científicos, cujos efeitos benéficos à saúde humana têm sido considerados por um número cada vez maior de profissionais da saúde. Países como a Alemanha já a adotaram como prática oficial na sua rede pública de saúde.(DONADIEU, 1983; HAFJEJEE & MOOSA, 1985, KANDIL *et al*, 1987).

Especificamente ao mel, atribuem-se várias propriedades medicinais, além de

sua qualidade como alimento. Apesar de o homem fazer uso do mel para fins terapêuticos desde tempos remotos, sua utilização como um alimento único, de características especiais, deveria ser o principal atrativo para o seu consumo. De acordo com evidências científicas seria melhor considerar o mel como um alimento do que como remédio. Na Tabela 5 apresentam-se os nutrientes do mel em relação aos requerimentos humanos.

Infelizmente, a população brasileira, de maneira geral, não o encara dessa forma, considerando-o mais como um medicamento do que como alimento, passando a consumi-lo apenas nas épocas mais frias do ano, quando ocorre um aumento de casos patológicos relacionados aos problemas respiratórios. No Brasil seu consumo como alimento ainda é muito baixo (aproximadamente 300 g/habitante/ano), principalmente, ao se comparar com países como os Estados Unidos e os da Comunidade Européia e África, que podem chegar a mais de 1kg/ano por habitante (Tabela 5).

**Tabela 5:** Nutrientes presentes em méis em relação à necessidade diária humana (CRANE, 1980).

<b>Nutriente</b>	<b>Unidade</b>	<b>Quantidade média em 100g de mel</b>	<b>Quantidade diária recomendada</b>
Equivalente energético	kcal	304	2800
<u>Vitaminas</u>			
A	I.U.	-	5000
B1 (Tiamina)	mg	0,004 – 0,006	1.5
B2 (Riboflavina)	mg	0,002- 0,06	1.7
Ácido nicotínico (Niacina)	mg	0,11- 0,36	20
B6 (Piridoxina)	mg	0,008 – 0,32	2.0
Ácido pantotéico	mg	0,02 – 0,11	10
Ácido fólico	mg	-	0.4
B12 (Cianocobalamina)	mg	-	6
C (Ácido Ascórbico)	<b>mg</b>	2,2 – 2,4	60
D	mg	-	400
E (Tocoferol)	I.U.	-	30
H (Biotina)	I.U.	-	0.3
<u>Minerais</u>			
Cálcio	mg	4 - 30	1000
Cloro	mg	2 - 20	
Cobre	mg	0,01 – 0,1	2.0
Iodo	mg	-	0.15
Ferro	mg	1,0- 3,4	18
Magnésio	mg	0,7 - 13	400
Fósforo	mg	2 - 60	1000
Potássio	mg	10 - 470	-
Sódio	mg	0,6 – 40	-
Zinco	mg	0,2 – 0,5	15

Dentre as inúmeras propriedades medicinais atribuídas ao mel pela medicina popular e que vêm sendo comprovadas por inúmeros trabalhos científicos, sua atividade antimicrobiana talvez seja seu efeito medicinal mais ativo estudados (SATO *et al.*, 2000; WESTON *et al.*, 1999 e 2000, ALLEN *et al.*, 1991, 1991a), sendo que não apenas um fator, mas vários fatores e suas interações são os responsáveis por tal atividade. Segundo ADCOCK (1962), MOLAN (1992) e WAHDAN (1998), os responsáveis por essa habilidade antibactericida são os fatores físicos, como sua alta osmolaridade e acidez, e os fatores químicos relacionados com a presença de substâncias inibidoras, como o peróxido de hidrogênio, e substâncias fenólicas, como os flavonóides e ácidos fenólicos (WESTON *et al.*, 1999; MOLAN & RUSSEL, 1988, MOLAN *et al.*, 1988).

Propriedades anti-sépticas, antibacterianas também são atribuídas ao mel, fazendo com que ele seja utilizado como coadjuvante na área terapêutica em diversos tratamentos profiláticos (STONOGA & FREITAS, 1991). Suas propriedades antibacterianas foram amplamente confirmadas em diversos trabalhos científicos (WHITE & SUBERS, 1963; WHITE *et al.*, 1966; DUSTMANN, 1979; MOLAN *et al.*, 1988; ALLEN *et al.*, 1991; CORTOPASSI-LAURINO & GELLY, 1991), como também sua ação fungicida (EFEM *et al.*, 1992), cicatrizante (BERGMAN *et al.*, 1983 e EFEM, 1988; GREEN, 1988) e promotora da epitelização das extremidades de feridas (EFEM, 1988).

Popularmente, ao mel ainda se atribuem outras propriedades como antianêmica, emoliente, antiputrefante, digestiva, laxativa e diurética (VERÍSSIMO, 1987).

Os méis de algumas espécies florais são relatados na literatura como tóxicos (WHITE, 1975c; KERKVLIT, 1981) por causa dos altos teores de ingredientes ativos nos néctares ou nos melatos que são nocivos ou tóxicos aos seres humanos. Embora estes méis não sejam muito comuns, podem ser de importância particular em algumas localidades. As famílias e os gêneros de algumas plantas foram relatados por produzirem méis tóxicos, tais como: *Ericaceae* (*rhododendron*, azalea, Andromeda, e Kalmia); *Solanaceae* (datura, *Hyoscyamus* e atropa), *Compositae* (*jacobaea*); *Lognonaceae* (Gelseminum); *Ranunculaceae* (*Aconitum*) (CRANE, 1990).

Apesar da medicina popular atribuir ao mel inúmeras propriedades curativas, sendo muitas delas já comprovadas por pesquisadores do mundo inteiro, a sua utilização para fins terapêuticos deve ser indicada e acompanhada por profissionais da saúde, não cabendo qualquer substituição de medicamentos sem o devido aval médico.

## 1.6. O uso do mel hoje

Geralmente o mel é consumido em seu estado bruto, isto é, líquido, cristalizado ou em favo. Ingerido como um alimento ou incorporado como um ingrediente em várias receitas, o mel, entretanto, é considerado um alimento somente em algumas sociedades, tais como aqueles países industrializados na Europa e na América do Norte, América Latina, África do Norte, e cada vez mais no Japão. Na maioria dos países da África é usado como cerveja de mel com pouquíssimo grau alcoólico e na Ásia é considerado, geralmente, como um remédio ou como um doce ocasional. A elevação do consumo percapito em nações industrializadas, não reflete o consumo de mel não processado por pessoa, mas inclui uma quantidade muito grande do mel usado na produção industrial de alimentos, isto é, como um ingrediente nos alimentos. A fim de aumentar o consumo e fazer os vários méis mais atrativos, uma variedade grande de produtos semiprocessados e puros do mel são introduzidos no mercado.

O uso tradicional do mel em preparações de alimentos tem sido substituído na maioria dos casos pelo açúcar e mais recentemente pelos vários xaropes de açúcar. Estes exibem a composição e características similares, mas com o custo reduzido. Ao mesmo tempo, como a parte da apreciação crescente de produtos mais naturais em muitos países, o mel "foi redescoberto" enquanto um alimento valioso e, conseqüentemente, também como um ingrediente, com um valor de mercado realçado. Além dos milhares receitas caseiras em cada tradição cultural, o mel é usado na confecção de doces, marmeladas, cereais, bebidas, produtos de leite e em muitos outros produtos.

Em particular, a indústria alimentícia e dos produtos biológicos usam abundantemente o mel, junto com açúcares não refinados na substituição da sacarose refinada (açúcar da cana e de beterraba). De fato, o mel pode substituir todo ou uma parte do açúcar normal na maioria dos produtos (THE VIRTUAL BEEKEEPING GALLERY, 2003).

Na indústria de tabaco é estimado usar, anualmente, mais de 2000 toneladas do mel para melhorar e preservar o aroma e a umidade do tabaco (NAHMIAS, 1981). O mel é misturado, também, nas soluções com outras substâncias, para atrair insetos para a polinização de algumas colheitas na agricultura. NAHMIAS (1981) menciona o uso do mel para tratar o papel da embalagem da carne nos EUA. A indústria de cosméticos usa

o mel como um hidratante para a pele em sabões, shampoos e batons. Por causa de sua viscosidade somente pode ser empregado em quantidades pequenas.

O controle de qualidade do mel tem duas finalidades a princípio, para verificar sua genuinidade, isto é, para revelar fraudes possíveis, tais como: os méis artificiais, adulterados etc., e para determinar sua qualidade com respeito às necessidades do processador e do mercado. Os limites da composição do produto natural são definidos internacionalmente pela comissão de alimentação do CODEX (CODEX ALIMENTARIUS, 1989 e 1994) que menciona também os métodos analíticos oficialmente aprovados. Os padrões de qualidade legais servem para proteger o consumidor, seja ele o processador ou o consumidor.

A maioria das adulterações simples do mel pode ser detectadas, se determinadas características excederem os padrões de qualidade legais, por exemplo, um índice elevado da sacarose (< 8%) se os açúcares simples da cana ou da beterraba forem adicionados, ou por valores elevados de HMF, se o xarope de milho hidrolisado for usado. O uso de técnicas especiais, como detecção dos isótopos de  $^{13}\text{C}$  (WHITE & DONER, 1978) ou a cromatografia (WHITE, *et al.*, 1979; CORDELLA *et al.*, 2003) muitas vezes são requeridos para avaliar uma adulteração. O método do isótopo pode detectar a adulteração com qualquer tipo de açúcar de cana ou do xarope de milho. Os métodos simples de campo, da detecção da adulteração sem equipamento de laboratório, são baseados no gosto, na viscosidade (a maioria dos méis adulterados são mais finos) ou na sua solubilidade em água fria. Se uma gota do mel derramar na água fria permanecendo junto sem se dissolver rapidamente, ele será muito provavelmente, um mel puro.

Os méis uniflorais representam uma parcela sensível e bem-paga do mercado nacional e internacional. Sua produção depende da gerência com relação à seleção de local e coleta seletiva. O conhecimento do consumidor e a apreciação crescente do mel estão desenvolvendo um nicho de mercado particular para o mel identificável por uma cor e por um sabor característicos, que são originários de uma ou poucas fontes de flores. As técnicas para produzir méis uniflorais são baseadas na possibilidade de separar um mel de um período floral de outros fluxos mais adiantados e mais atrasados do néctar em uma escala economicamente interessante. Mesmo se a produção de méis uniflorais não fosse possível ou economicamente praticável, as características organolépticas do mel (aparência, cor, sabor e gosto) seriam ainda os elementos que

mais contribuiriam para sua apelação pelo consumidor (THE VIRTUAL BEEKEEPING GALLERY, 2003).

### **1.7. Produção de mel no Brasil e no Mundo**

Estudos sobre a produção apícola no Brasil mostram dados contraditórios quanto ao número de apicultores e colméias, produção e produtividade. Os dados conflitantes refletem a dificuldade em se obterem informações precisas quanto à produção e comercialização no setor agropecuário, entretanto, conseguem passar a idéia da importância dessa atividade para o País.

Estima-se que a produção mundial de mel durante o ano de 2001 foi de, aproximadamente, 1.263.000 toneladas, sendo a China o maior produtor (256 mil toneladas). A Tabela 6 demonstra a produção de mel nos continentes e em alguns países nos últimos anos. Segundo os dados do IBGE, a produção de mel em 2000 no Brasil foi de 21.865.144 kg, gerando um faturamento de R\$ 84.640.339,00. E os maiores exportadores mundiais são: China, Argentina, México, Estados Unidos e Canadá. Juntos esses países comercializaram durante o ano de 2001 cerca de 242 mil toneladas, movimentando, aproximadamente, US\$ 238 milhões (Tabela 7, p. 28). Entre janeiro e julho de 2002, o Brasil exportou 10.615 toneladas de mel, mas estima-se que o mercado internacional conseguirá absorver 170 mil toneladas/ano de mel oriundo do Brasil. Os principais compradores de mel do País são: Alemanha, Espanha, Canadá, Estados Unidos, Porto Rico e México (SILVIO, 2003 <http://www.cpamn.embrapa.br/pesquisa>).

A produção mundial anual de mel é cerca de 1.200.000 toneladas, das quais mais da metade é produzido nos três maiores países apicultor: EUA, Rússia e China. (CRANE, 1985). Das 800.000 toneladas produzidas por ano, mais de 600.000 são consumidas no país de origem e 150.000 toneladas exportadas. O consumo mundial médio anual, por pessoa, é de cerca de 0,17 kg de mel, comparado com os 20kg de açúcar, mas existem amplas e interessantes variações do uso do mel em outros gêneros alimentícios.

**Tabela 6:** Produção Mundial de mel em mil toneladas.

<b>Continentes/País</b>	<b>1998</b>	<b>1999</b>	<b>2000</b>	<b>2001</b>
Ásia	401	435	457	465
China	211	236	252	256
América do Norte e Central	218	201	208	205
Canadá	46	37	31	32
Estados Unidos	100	94	100	100
México	55	55	59	56
América do Sul	109	133	141	131
Argentina	75	93	98	90
Brasil	18	19	22	20
Europa	291	293	286	288
União Européia	109	117	112	111
Oceania	31	29	29	29
Austrália	22	19	19	19
Total	1188	1232	1265	1263

A produção mundial de mel teve uma tendência crescente nos últimos 20 anos, apesar das flutuações, em regiões e países (industrializados e não-industrializados), atribuídos a um aumento no número de colméias e da produção por colônia. O consumo também aumentou durante os últimos anos, sendo atribuído ao aumento geral nos padrões de vida e também a um interesse maior em produtos naturais e saudáveis.

O mundo produz 1.200.000 toneladas de mel por ano. A Alemanha compra 50% do mel exportado no mundo e só produz 33.000 t/ano. A China foi o principal exportador de mel para a Alemanha até 1987. No Japão, 60% do mel consumido se destina a usos na indústria e 40% constitui mel de mesa. O Japão tem-se transformado num dos maiores importadores de mel, principalmente, devido à redução do número de apicultores, em decorrência da competição dos preços de importação e da diminuição de áreas melíferas. A Argentina, que produz cerca de 60.000t/ano, consome só 10.000 t/ano e possui uma área de apenas 2.776.700 km<sup>2</sup> (NOGUEIRA NETO, 1972).

No Brasil, as importações são maiores que as exportações. Praticamente tudo o que se produz é consumido no mercado interno. Os altos custos de produção e o bom preço do mercado interno, até 2001, desestimulavam a exportação, mas atualmente, ele está na rota do mercado mundial.

Segundo dados disseminados pelo Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior, denominado ALICE-Web, da Secretaria de Comércio Exterior (SECEX), do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (MDIC), as importações e exportações brasileiras de mel natural, de 1998 a 2001 (jan/dez), tiveram comportamentos inversos: enquanto as importações diminuíram, as exportações aumentaram. A produção de mel nesse mesmo período também apresentou tendência crescente em função do aumento do número de colméias e da produtividade (Tabela 6).

**Tabela 7:** Produção de mel de abelhas no Brasil de 1998 a 2001, segundo a FAO.

Produção de mel (Mt)	Ano			
	1998	1999	2000	2001
Brasil	18,308	19,751	21,865	20,000

Fonte: <http://apps.fao.org>

Nos países com um consumo bem desenvolvido do mel, a diversidade do produto está aumentando na base de qualidades e de características diferentes do produto. Além dos méis líquidos e cristalizados tradicionais de cores diferentes, a diversificação baseada no gosto, e na origem botânica ou geográfica estão aumentando lentamente. Os méis uniflorais cada vez mais são pedidos e apreciados, apesar de seus preços mais elevados. Os méis multiflorais de determinadas regiões geográficas são também, cada vez mais populares e apreciados por consumidores ou por turistas locais.

Se, para o uso industrial, a padronização se torna mais importante, isto é as mesmas características uniformes em cada grupo, misturar méis diferentes tornar-se-á inviáveis. Por isso se faz cada vez mais necessário, o estudo químico para se determinar às substâncias principais que possam ajudar na caracterização da origem floral do mel.

Nesse contexto, tem sido sugerido como auxílio na caracterização do mel, a possibilidade de correlacionar a presença de certos compostos orgânicos, que poderiam

funcionar como marcadores químicos, originários do néctar ou de alguma modificação biológica com a sua origem botânica. Com isso, trabalhos de pesquisas têm sido desenvolvidos para os méis europeus, no que diz respeito à identificação de compostos fenólicos por técnicas cromatográficas e sua associação com a origem botânica e geográfica, contudo, nenhum trabalho de caracterização de compostos fenólicos para os méis brasileiros ainda tinha sido feito, por isso o nosso interesse nesse estudo como ferramenta coadjuvante na determinação da origem floral.

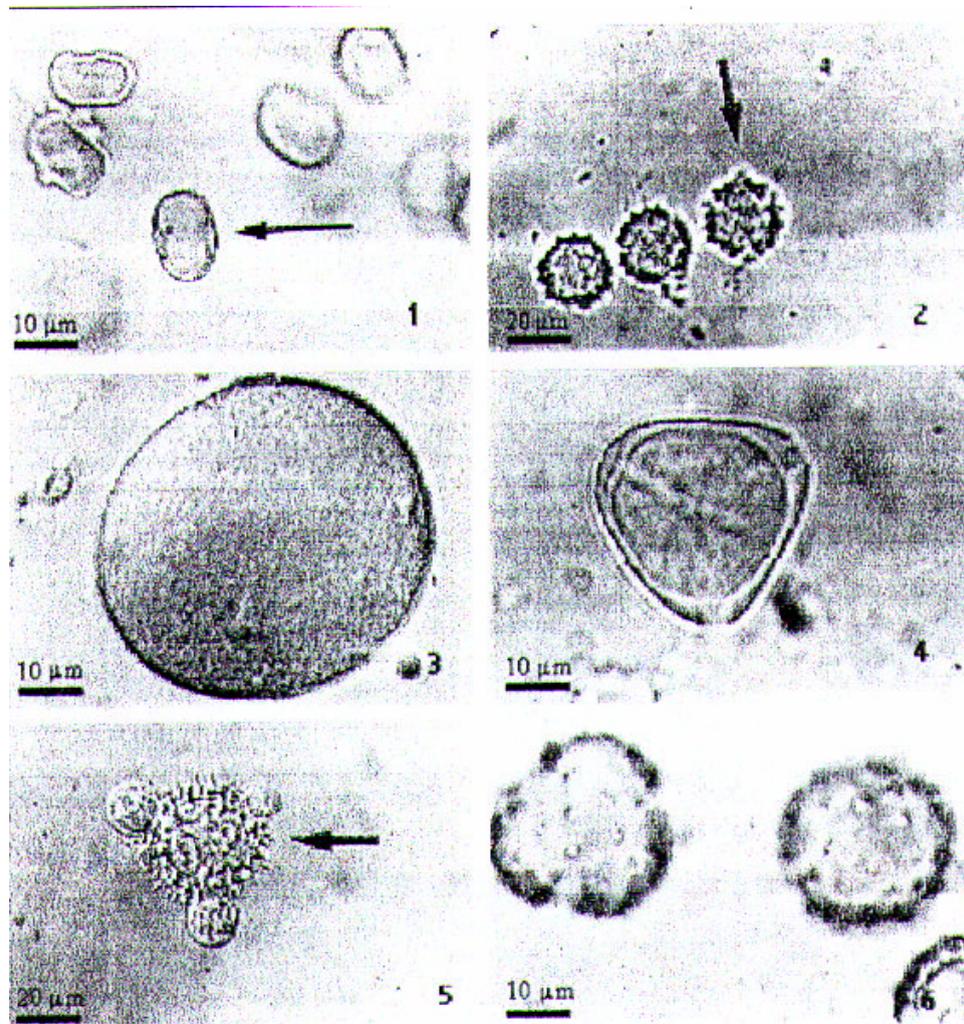
## **2. CARACTERIZAÇÃO DE MÉIS: ANÁLISE PALINOLÓGICA E MARACADORES QUÍMICOS.**

As abelhas coletam pólen, levando-o para as colméias, armazenando-o em alvéolos separadamente do néctar; este pólen vai servir para sua alimentação e da cria. Em virtude destes fatos, o pólen em parte é misturado com o néctar e aparece no mel, sendo importante demonstrativo de sua origem botânica. O espectro polínico de mel e bolotas é determinado pelas condições climáticas fitogeográficas, agrônômicas e florestais da região na qual esses produtos foram coletados.

Alguns méis podem ser identificados com mais ou menos certeza por seu aroma, cor, cristalização rápida, sabor ou por uma combinação dessas e de outras características. Alguns méis podem ser especificados porque são produzidos em colméias situadas dentro de grandes áreas com uma espécie de planta, durante o seu período de florescimento. Em áreas onde se pratica agricultura em grande escala e em formações geológicas de grande porte, com grandes áreas homogêneas de vegetação natural, pode existir pouca dúvida com relação à fonte de mel obtido. Isto é especialmente válido se o apicultor for um bom observador de abelhas e das plantas ao alcance de coleta delas.

Vários parâmetros físicos têm sido utilizados nas análises de méis, como uma das maneiras de identificá-los e classificá-los segundo sua origem botânica. As análises microscópicas, que visam principalmente o reconhecimento do grão de pólen, indicam as plantas que as abelhas visitaram, correlacionando assim a sua origem botânica. O pólen é coletado pelas abelhas e é transportado para a colméia nas suas patas traseiras.

Assim, o mel contém, geralmente, grãos de pólen de flores que contribuíram com seu néctar para a sua confecção. Grãos de pólen de diferentes plantas podem ser distinguidos sob um microscópio por seu tamanho e forma, e por seus padrões de superfície de sulco, poros, espinhos etc (Figura 2).



**Figura 2:** Microscopia de grãos de pólen. 1. Moraceae, Tipo *Cecropia*; 2. Compositae, Tipo *Baccharis*; 3. Gramineae, Tipo *Zea*; 4. Myrtaceae, Tipo *Eucalyptus*; 5. Compositae, Tipo *Vernonia*; 6. Compositae, Tipo *Eupatorium*.

A identificação de diferentes grãos de pólen está baseada em conhecimento prático e numa consulta constante a um grupo de laminas contendo grãos de pólen adequadamente preparados, coletados diretamente de espécies individuais de plantas. A análise dos grãos de pólen mostra a origem botânica e geográfica e fornece subsídios

para estudos de distribuição de recursos entre as comunidades de abelhas, reconhecimento de seu nicho trófico, além da sua capacidade de atuar como polinizadores dessas determinadas espécies de plantas.

As primeiras tentativas de análise palinológicas de amostras de mel do Brasil foram as de SANTOS (1961, 1974), posteriormente as de RICCIARDELLI D'ALBORE (1978), AZOUBEL (1986), CORTOPASSI-LAURINO & RAMALHO (1988), BARTH (1990,1994), RAMALHO *et al* (1991), MARQUEZ-SOUZA (1993) e BASTOS (1994) apresentaram trabalhos nessa linha de pesquisa.

O estudo de grãos de pólen é conhecido como palinologia e, por isso, o estudo de grãos de pólen no mel como melissopalinologia (PERSANO ODDO & RICCIARDELLI D'ALBORE, 1989; BARTH, 1989; BARTH *et al*, 2000; TERRAB *et al*, 2003). A análise polínica é uma técnica laboratorial que permite caracterizar a origem floral, ou não-floral, de amostras de mel. O pólen introduzido no mel pelas abelhas reflete a vegetação da área de coleta de néctar, bem como o seu potencial apícola. Havendo dominância de florada de determinada espécie apícola, o mel produzido possui qualidades organolépticas, aspecto e consistência constantes, repetidas ano por ano na ocasião dessa florada. Através do espectro polínico do sedimento de mel é possível identificar a espécie botânica apícola da qual foi obtido o mel e a proporção de participação de cada uma das espécies botânicas visitadas pelas abelhas durante a coleta de néctar. Esta análise constitui-se nas classes de frequência aceitas internacionalmente. Em resumo, o pólen é dominante (PD) quando representa mais de 45% do total de pólen contido numa amostra de mel. Quando ocorre na frequência entre 15 e 45% é chamado de pólen acessório (PA) e abaixo de 15% de pólen isolado (PI) (BARTH 1989, 1990, 1996). Os méis que apresentam o pólen de uma planta nectarífera em percentagem superior a 45% são chamados de monoflorais (uniflorais). São os méis nobres, que no mercado, em geral, alcançam preços superiores aos heteroflorais (pluriflorais), também chamados de silvestres.

Existem várias razões para se estudar os grãos de pólen: a palinologia básica, por exemplo, procura entender sua estrutura, associando os diferentes grãos de pólen aos diferentes grupos de plantas. A palinologia tem se mostrado uma fonte de informações para inúmeras outras ciências básicas e aplicadas. Ela tem aplicação médica, por exemplo, porque o pólen de várias plantas causa reações alérgicas nas pessoas. Em muitos locais, a identificação do pólen em suspensão no ar é uma atividade de rotina

que visa alertar as pessoas sensíveis sobre a presença de determinados tipos polínicos na atmosfera. Sendo assim, a análise polínica pode permitir:

- *Determinação da origem botânica do mel.* A presença de determinados tipos polínicos, em determinadas percentagens, indica a(s) planta(s) de onde o néctar foi coletado. Isto pode possibilitar um maior retorno econômico para o apicultor, a medida em que determinados méis têm mais valor no mercado pelo seu sabor, aroma, cor e outras propriedades físico-químicas. Além de permitir em alguns casos, que determinados méis (tóxicos ou de sabor desagradável, por exemplo) deixem de ser comercializados para o consumo *in natura*.

- *Determinação da origem geográfica do mel.* A flora apícola de cada região é caracterizada pela presença de determinadas plantas em diferentes proporções. Desta forma, o aparecimento de alguns tipos de grãos de pólen ou conjuntos de grãos de pólen pode possibilitar a identificação da origem geográfica do mel analisado, classificando-o segundo o maior percentual de pólen encontrado para uma mesma espécie de planta (SILVEIRA, 1996).

O mel de melato não contém grãos de pólen, mas seus componentes microscópicos (algas celulares) são igualmente indicadores da fonte vegetal do mel. Frequentemente, um especialista pode utilizar-se disto para identificar a planta na qual as abelhas coletaram o melato.

A qualidade do mel é julgada pela sua origem botânica e a sua composição química, e o seu preço está baseado na sua qualidade e, sendo assim, na sua origem floral. A origem botânica do mel, a qual influencia enormemente a preferência do consumidor, permanece ainda, difícil de ser determinada. Em alguns casos, contudo, a análise de pólen não é possível, como nos casos de méis de plantas estéreis.

Tradicionalmente, a fonte floral do mel tem sido identificada pela análise do pólen. Contudo, abordagens químicas têm sido sugeridas, onde a identificação de substâncias características do néctar de certos tipos de plantas, as quais podem ou não ter sido modificadas bioquimicamente pelas enzimas das abelhas, possam auxiliar na caracterização da fonte floral do mel (D'ARCY *et al*, 1997).

Nos últimos anos tem havido um interesse crescente em se desenvolver métodos analíticos que possam vir a complementar a análise do pólen na determinação da origem floral do mel. O uso de compostos voláteis (BONAGA & GIUMANINI, 1986; D'ARCY *et al*, 1997), flavonóides (SOLER *et al*, 1995; TOMÁS-BARBERÁN *et al*,

2001), compostos fenólicos (ANDRADE *et al*, 1997), ácidos aromáticos e seus ésteres (STEEG & MONTAG, 1988) e derivados de carotenóides (TAN *et al*, 1989) têm se mostrado adequado para a identificação da origem floral de inúmeros méis europeus.

Neste contexto, tem sido sugerido que a próxima etapa no auxílio da caracterização do mel, seria a possibilidade de correlacionar a presença de certos compostos orgânicos, que poderiam funcionar como marcadores químicos, originários seja do néctar ou de alguma modificação biológica promovida pelas abelhas, com a sua origem botânica.

### 3. IDENTIFICAÇÃO DOS MÉIS PELOS COMPOSTOS FENÓLICOS

A cromatografia líquida de alta eficiência tem sido muito usada nos últimos anos na determinação de compostos orgânicos presentes em diferentes produtos naturais. As colunas mais usadas são de octilsilano (C8) e octadecilsilano (C18), com um sistema de solventes que vai da água, metanol, acetonitrila e ácido fórmico até ao tetraidrofurano, tanto em sistema isocrático como em gradiente.

A adição de ácido acético à fase aquosa, que é freqüentemente utilizada, deve-se ao fato deste impedir a ionização dos grupos acídicos quando presentes na amostra, diminuir os tempos de retenção e influenciar a simetria dos picos (KARCH *et al.*, 1976).

O progresso na tecnologia de CLAE tem-se refletido no desenvolvimento contínuo de novas fases estacionárias, em melhoramento na instrumentação e a evolução das técnicas automatizadas (SAKAKIBARA *et al*, 2003). Efetivamente, o maior avanço verificou-se no aumento da seletividade e sensibilidade da detecção. Dentre os detectores, o de maior impacto na análise dos derivados fenólicos são os de ultravioleta e detector de fotodiodo (PDA).

Segundo os dados da literatura, análise de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência tem sido apontada como uma técnica muito promissora para estudar a origem floral e geográfica de méis europeus (AMIOT *et al*, 1989; FERRERES *et al*, 1992; SABATIER *et al*, 1992; TOMÁS-BARBERÁN *et al*, 1993). Nesses estudos, a flavanona hesperetina foi usada como marcador para caracterizar mel de *Citrus* (FERRERES *et al*, 1993, 1994); a flavona, canferol para mel

Rosemary (FERRERES *et al*, 1994a; 1998), e quercetina para mel de girassol (TOMÁS-BARBERÁN *et al*, 2001). Além dessas substâncias, alguns ácidos fenólicos, tais como, ácido elágico em méis monofloral e ácidos cafeico, *para*-cumárico e ferulico em méis de castanha (ANDRADE *et al*, 1997; FERRERES *et al*, 1996). Em algumas amostras de méis, tais como lavanda e acácia nenhum composto fenólico específico foi útil como marcador químico ( TOMÁS-BARBÉERAN *et al*, 2001).

Em todos esses estudos as análises dos ácidos fenólicos e flavonóides foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência, através da observação do perfil cromatográfico dessas substâncias com o uso de padrões. Os compostos fenólicos foram identificados e quantificados através da comparação dos seus tempos de retenção com os padrões autênticos, além da comparação de seus espectros de ultra-violeta (MARTOS *et al*, 1997; 2000; 2000a ; MERKEN & GARY, 2000; DATTA *et al*, 2003). Nesses trabalhos o perfil dos compostos fenólicos foi característico dos tipos florais estudados e, assim, as substâncias analisadas serviram como marcadores bioquímicos para autenticação botânica dos méis. O resultado mostrou que a análise por CLAE das substâncias não-voláteis pode servir como ferramenta coadjuvante na determinação floral dos méis.

Para os méis brasileiros, contudo, o único trabalho relatado na literatura, investigou os principais constituintes não-voláteis de amostras de mel genuíno derivadas de diferentes espécies de plantas encontradas em distintos estados brasileiros (DE MARIA *et al*, 1999). Os níveis de água, acidez total, prolina livre, atividade de diastase, HMF, frutose e glicose foram determinados em 74 diferentes tipos de méis de *Apis mellifera* de quatro regiões do Brasil, porém nenhum compostos fenólico foi investigado e relacionado a origem botânica.

Sendo assim, os estudos realizados até hoje no mel brasileiro, não incluem a análise de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência, embora esta técnica tem sido objeto de centenas de trabalhos aplicados com os mais variados fins (MERKEN & GARY, 2000). De qualquer modo, é freqüente que essa análise seja preferencial para esse tipo de substância, visto apresentar uma melhor separação para um número restrito de compostos que são quimicamente muito semelhantes.

A ênfase e a particular atenção que se dá às separações cromatográficas e, particularmente, á cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) justifica-se pela sua grande importância na investigação de polifenóis.

No caso da técnica que aqui será apresentada, trata-se de um método de controle analítico que visa à caracterização da origem botânica, a partir de marcadores químicos, a ser aplicada nas diversas origens florais de mel.

#### 4. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS

Apesar, de todos os resultados apresentados anteriormente para o controle e identificação da origem botânica do mel, pouca atenção tem sido dedicada ao desenvolvimento de métodos analíticos que avaliem o grau de qualidade dos méis brasileiros, no que diz respeito, principalmente, a sua origem floral, excetuando-se a palinologia.

No âmbito de uma linha de pesquisa que visa identificar a presença de metabólitos especiais presentes em produtos naturais, o objetivo da presente investigação é propor uma análise sistemática de méis brasileiros, baseada no perfil cromatográfico dos seus compostos fenólicos, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Este estudo visa identificar ácidos fenólicos e flavonóides por cromatografia líquida, e utilizá-los como potentes marcadores químicos na determinação da origem floral

Foram escolhidos os ácidos fenólicos e flavonóides do mel, porque já foram reconhecidos previamente como sendo potencialmente úteis como marcadores taxonômicos em méis europeus (TAN *et al*, 1989 e ANDRADE *et al*, 1997, DATTA *et al*, 2003), mas não nos méis brasileiros. Bem como, pelo fato, dessas substâncias apresentarem comprovadas atividades antioxidantes, anti-radicais e antibacterianas (MIORIN *et al*, 2003).

A identificação e possível quantificação desses derivados fenólicos poderão vir a auxiliar na caracterização da origem floral e geográfica de diferentes méis. Como o conteúdo dessas substâncias varia com o tipo floral, tem-se a possibilidade de utilizar tais derivados como marcadores biológicos do mel o que complementaria a sua análise microscópica (análise polínica).

Com efeito, para que uma determinada substância possa ter um papel importante como indicador químico deve obedecer a determinadas condições:

- não deve pertencer aos constituintes principais como açúcares, lipídeos, aminoácidos, etc.;
- reciprocamente, não deve ter uma estrutura muito complexa ou ser elaborada por um número de espécies particulares;
- deve acumular-se e por consequência intervir de maneira limitada nas reações metabólicas; e
- deve ser fácil de detectar.

Os ácidos fenólicos e flavonóides escolhidos parecem satisfazer as condições requeridas, podendo desempenhar um papel importante na classificação dos méis.

Investigaremos a presença dos ácidos gálico, cafeico, ferulico, *meta*-cumárico, *orto*-cumárico, *para*-cumárico, sinápico, siríngico, cinâmico, 2-metoxi-cinâmico, protocatecuico, vanílico e clorogênico e os flavonóides: quercetina, canferol, hesperidina e miricetina, em virtude de já terem sido reconhecidos, previamente, como possíveis marcadores químicos, e além do fato de já os possuímos no laboratório, podendo assim, servir como padrões puros de análise.

Embora os processos clássicos baseados em cromatografia de camada fina (CCF) e de coluna (CC) continuam a ser utilizadas para a separação e purificação de produtos naturais, ênfase e particular atenção serão dadas aqui à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) devido a sua grande versatilidade na investigação de compostos polifenólicos. A técnica espectrofotométrica de ultravioleta para identificação e quantificação de composto fenólicos, que foi pioneira nos anos 50, ainda é muito usada e aplicada a todas as classes de polifenóis, principalmente, quando acopladas as técnicas cromatográficas instrumentais, como a cromatografia líquida de alta eficiência.

## **5. PARTE EXPERIMENTAL**

### **5. Material e métodos**

Todos os solventes graus P.A e espectroscópicos foram obtidos comercialmente da Vetec e da Tédia e foram utilizados sem purificação prévia. A água utilizada na cromatografia líquida e nas purificações das amostras de méis foi de Milli-Q da

Millipore. O ácido acético glacial, grau espectroscópico, foi obtido da Merck e usado como modificador de pH da fase aquosa nas análises por cromatografia líquida de alta eficiência.

As análises utilizando cromatografia em camada fina (CCF) foram realizadas em cromatofolhas de alumínio com sílica gel 60 F254 (Merck, Darmstadt, Germany). As substâncias foram visualizadas através da irradiação com lâmpada ultravioleta no comprimento de onda de 254nm e 366nm e/ou pulverizadas com solução 1% de  $\text{AlCl}_3$  em etanol como revelador químico para a avaliação de flavonóides.

As separações cromatográficas foram efetuadas sobre Amberlite XAD-2 (poro 9nm e partícula 0.3 – 1.2 mm), obtido comercialmente da Supelco (Bellefonte, PA, EUA) e para cromatografia de exclusão foi utilizada Sephadex LH-20 obtido da Sigma Chemical Co. (Saint Louis, MO, EUA).

As amostras e solventes analisados por CLAE foram previamente filtradas em membranas de nylon de 0,45 $\mu\text{m}$  obtidas da Sartorius. As misturas dos solventes utilizados nos processos cromatográfico foram feitas em % v/v.

A eliminação dos solventes de extratos e frações de colunas cromatográficas foi feita sob pressão reduzida em evaporadores rotatórios FISATON, mantendo a temperatura de 40°C.

Os espectros na região do ultravioleta (UV) realizados para padrões foram obtidos em espectrofotômetro Shimadzu MINI 1240, utilizando como solvente metanol grau espectroscópico.

## **5.2. Amostras de méis**

As amostras de mel foram fornecidas pelos apicultores das seguintes regiões de origem: Seropédica, Paracambí, Petrópolis e Piraí no estado do Rio de Janeiro, Bananal no estado de São Paulo e Goiânia no estado de Goiás e algumas outras foram adquiridas dos comércios destas regiões (Tabela 8). Os méis estudados foram os monoflorais de eucalipto, isto é, cujo néctar apresenta a predominância de uma espécie botânica, e outros heteroflorais, um mel mais heterogêneo, demoninados de “mel silvestre” ou “mil flores”, cujo néctar apresenta um mistura de espécie botânica.

Para a determinação dos perfis cromatográficos foram estudadas 21 amostras de méis de diferentes regiões (Tabela 8) no período de 2000-2002 e todas foram estocadas

na geladeira à 4<sup>0</sup>C até o momento da análise, a fim de evitar qualquer tipo de alteração.

Uma análise prévia com relação à origem floral baseada na análise polínica (Tabela 8), e as propriedades físico-químicas, tais como pH, acidez, composição de açúcar, umidade, teor de hidroximetilfurfural (HMF), índice de diastase e coloração foram realizadas pela professora Vânia Maria Limeira Dutra e pelo professor Dr. Laerte da Cunha Azeredo do setor de química analítica da UFRRJ, respectivamente (Tabela 9).

**Tabela 8:** Amostras de méis analisadas nesse estudo.

<b>Amostra</b>	<b>Tipo de mel</b>	<b>Origem Floral</b>	<b>Data de Chegada</b>	<b>Origem Geográfica</b>
RF1	eucalipto	<i>Eucalyptus sp.</i>	24/01/2000	Seropédica
RF2	eucalipto	<i>Eucalyptus sp.</i>	31/01/2000	Seropédica
RF3	eucalipto	<i>Eucalyptus sp.</i>	19/02/2001	Seropédica
RF4	eucalipto	<i>Eucalyptus sp.</i>	20/02/2001	Seropédica
RF5	eucalipto	<i>Eucalyptus sp.</i>	28/06/2000	Banana-SP
RF6	eucalipto	<i>Eucalyptus sp.</i>	09/07/2001	Banana-SP
RF7	eucalipto	<i>Eucalyptus sp.</i>	09/08/2000	Paracambi-RJ
RF8	eucalipto	<i>Eucalyptus sp.</i>	14/08/2000	Paracambi-RJ
RF9	eucalipto	<i>Eucalyptus sp.</i>	13/08/2001	Paracambi-RJ
RF10	silvestre	Heterofloral	24/06/2000	Piraí-RJ
RF11	silvestre	Heterofloral	27/06/2001	Piraí-RJ
RF12	silvestre	Heterofloral	16/08/2000	Paracambi-RJ
RF13	silvestre	Heterofloral	15/08/2001	Paracambi-RJ
RF14	eucalipto	<i>Eucalyptus sp.</i>	23/08/2001	Petrópolis-RJ
RF15	eucalipto	<i>Eucalyptus sp.</i>	04/09/2002	Petrópolis-RJ
RF16	eucalipto	<i>Eucalyptus sp.</i>	21/02/2002	Piraí-RJ
RF17	eucalipto	<i>Eucalyptus sp.</i>	02/03/2002	Piraí-RJ
RF18	silvestre	Heterofloral	21/08/2002	Piraí-RJ
RF19	silvestre	Heterofloral	17/10/2002	Piraí-RJ

**Tabela 9:** Análises físico-químicas dos méis de eucalipto\* e silvestre\*

<b>Amostras</b>	<b>Índice de Umidade</b>	<b>pH</b>	<b>Acidez Total</b>	<b>Índice de Diastase</b>	<b>HMF</b>	<b>Açúcares Redutores Totais</b>	<b>Coloração</b>
Eucalipto (RF1 e RF3)	19.52	3.33	33.36	12.28	3.15	72.2	Âmbar
Silvestre (RF7 e RF10)	19.10	3.82	35.04	10.80	3.85	73.5	Âmbar

\* Valores médios para cinco repetições entre os méis selecionados

### 5.3. Padrões de derivados fenólicos

Os padrões utilizados nas análises cromatográficas foram sempre de grau de pureza elevado (~99%). Os ácidos cinâmico, cafeico, protocatecuico, *meta*-cumárico, *orto*-cumárico e *para*-cumárico foram obtidos comercialmente da Sigma Chemical Co. (Saint Louis, MO, EUA) e os ácidos gálico, siríngico, ferulico, sinápico, 2-metoxi-cinâmico, vanílico e clorogênico foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha), e estes foram utilizados, inicialmente, como padrões. Para otimizar as condições cromatográficas (CLAE) para a análise dos ácidos fenólicos no mel, uma solução na concentração de 0,25mg. mL<sup>-1</sup> em metanol (grau espectroscópico) dos ácidos gálico, siríngico, cafeico, *para*-cumárico, sinápico, ferulico, *meta*-cumárico, *orto*-cumárico, cinâmico e 2-metoxi-cinâmico foi preparada individualmente e como mistura (chamada *mistura A*) e outra solução na concentração de 0,25mg. mL<sup>-1</sup> em metanol (grau espectroscópico) dos ácidos protocatecuico, vanílico e clorogênico foi preparada individualmente e como mistura (chamada de *mistura B*). Os flavonóides quercetina e canferol foram obtidos comercialmente da Sigma Chemical Co. (Saint Louis, MO, EUA), enquanto a hesperidina e miricetina foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Soluções metanólicas na concentração de 0,2mg. mL<sup>-1</sup> foram utilizadas como padrão. Todas as soluções foram filtradas, previamente antes da análise por CLAE, através de membrana de nylon de 0,45µm.

#### 5.4. Análise por Cromatográfica Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Todas os padrões e as amostras dos méis foram analisados preliminarmente em um aparelho Shimadzu equipado com duas bombas modelo LC 10-AS, um detector de ultravioleta-visível com comprimento de onda variável (analisados a 270 e 340 nm), modelo SPD-10A, e integrador modelo CR-6A. As amostras foram injetadas através de injetor Rheodyne 7125i com *loop* de 20 $\mu$ L. A separação dos ácidos fenólicos foi realizada em coluna de fase reversa Lichrospher RP-18 (Merck, Darmstadt, Alemanha; 250 mm x 4,6 mm d.i. e 5 $\mu$ m de tamanho de partícula), usando como fase móvel água: ácido acético (99:1, solvente A) e água: acetonitrila : ácido acético (59:40:1, solvente B) em uma taxa constante de velocidade de fluxo de 0.9 mL.min<sup>-1</sup>.

O gradiente de eluição estabelecido foi: 35% do solvente B inicialmente, este foi aumentado para 75% em 21 minutos, 85% do solvente B em 25 minutos, 100% do solvente B em 30 minutos. Finalmente, com eluição isocrática com 100% do solvente B até 35 minutos. O método foi confirmado em outro cromatógrafo líquido da Waters Modelo 600E equipado com detector de arranjo de fotodiodos (PDA 2996), com controlador de temperatura ajustado para 30°C e injetor Rheodyne 7125i com *loop* de 20 $\mu$ L. O sistema de computador com o “*software*” Millennium<sup>32</sup> (Waters), possibilitou a aquisição dos espectros de UV dos componentes analisados para serem comparados aos espectros dos padrões autênticos, permitindo assim sua identificação. O volume de injeção para os padrões e amostras de méis foi de 20 $\mu$ l. O monitoramento dos cromatogramas foi realizado a 270 nm e 340 nm, visto que a maioria dos ácidos fenólicos e flavonóides encontrados nos méis, mostram suas absorções máximas no UV, próximos a esses comprimentos de onda (MARTOS *et al*, 1997).

#### 5.5. Extração dos compostos fenólicos da amostra de mel

Os ácidos fenólicos foram extraídos da matriz do mel segundo métodos descritos previamente na literatura (TOMÁS-BARBERÁN, *et al*, 1992, 1997, 2000, 2001, FERRERES *et al*, 1994 e MARTOS *et al*, 2000). A amostra de mel (cerca de 50 g) foi

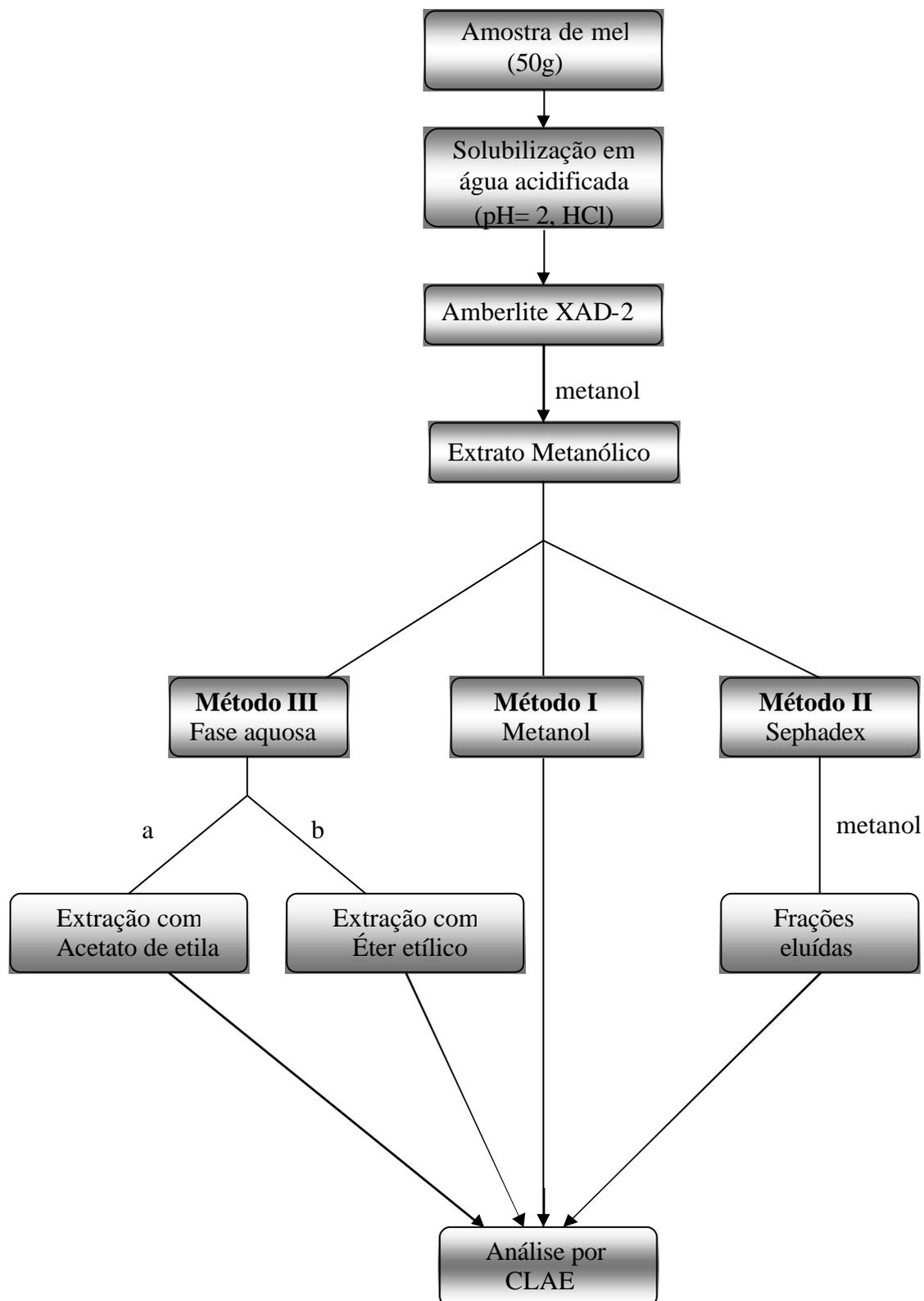
misturada com 250 ml de água destilada, ajustada a pH = 2 com ácido clorídrico concentrado e agitada com agitador magnético, a temperatura ambiente, até completa dissolução. A amostra fluida foi em seguida, filtrada através de algodão para eliminar partículas suspensas. O filtrado foi passado através de uma coluna de vidro (45 x 3.5 cm) empacotada com cerca de 100 g de Amberlite XAD-2 (poro 9nm e partícula 0.3 – 1.2 mm). A coluna foi então lavada primeiramente, com água acidificada (pH = 2 com HCl concentrado, 150mL), e subseqüentemente, com água destilada (cerca de 300ml) para remover todos os açúcares e outros constituintes polares do mel, enquanto as substâncias fenólicas presentes no mel permaneceram na coluna. A fração fenólica adsorvida na coluna, foi então eluída com metanol (cerca de 300mL). O extrato metanólico foi concentrado até à secura sob pressão reduzida em um evaporador rotatório a 40°C. Após esta etapa, três procedimentos diferentes foram testados com o objetivo de identificar maior número dos constituintes fenólicos:

- Método I: O extrato concentrado foi redissolvido em 5 mL de metanol grau espectroscópico, filtrado em membrana de nylon de 0,45 µm e analisado por CLAE;

- Método II: O extrato concentrado foi cromatografado através de coluna de Sephadex LH-20 (5 x 1 cm) e eluído com metanol, a fim de avaliar a presença de flavonóides. As frações metanólicas foram recolhidas, e após serem evaporadas a pressão reduzida no evaporador rotatório a 40°C, foram redissolvidas em metanol grau espectroscópico, filtradas em membranas 0,45µm e analisadas por CLAE (ANDRADE *et al*, 1997);

- Método III: Ao extrato concentrado foi adicionado 10 mL de H<sub>2</sub>O destilada ((FERRERES *et al*, 1991; 1992) e realizou-se partição com dois solventes diferentes: a) acetato de etila e b) éter etílico (TOMÁS-BARBERÁN *et al*, 2001). Após três extrações (5 x 20 ml), a fase orgânica foi reunida, seca com sulfato de sódio anidro, e concentrada até secura. O resíduo seco foi redissolvido em 5ml metanol grau espectroscópico, filtrado através de membrana de 0,45 µm e analisado por CLAE (Figura 3).

Em todos os casos as amostras foram estocadas sob atmosfera de N<sub>2</sub>, guardadas a 4°C até serem analisadas e analisadas em triplicatas.



**Figura 3** – Fluxograma da preparação dos extratos de mel.

## **5.6. Identificação e quantificação dos ácidos fenólicos**

A identificação dos picos nos cromatogramas dos méis foi feita numa primeira aproximação, pela comparação dos seus tempos de retenção com os tempos de retenção das amostras padrões e por co-injeção com padrões. Em seguida a sua identificação foi feita pela análise de seus espectros UV comparado aos padrões autênticos.

A determinação quantitativa dos derivados fenólicos foi realizada por sua absorbância nos cromatogramas obtidos na CLAE contra seus padrões a 270nm.

A linearidade da resposta do detector foi determinada em função dos padrões usados na quantificação, por injeção de quantidades conhecidas dos mesmos, comparando as áreas dos picos obtidos com a quantidade injetada. E o limite de detecção foi determinado a partir da menor quantidade injetada na maior sensibilidade do integrador.

## **6. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Ao iniciar este trabalho havia o propósito de analisar o perfil cromatográfico de amostras de méis de diferentes origens geográficas e florais existentes no Brasil a fim de se definir possíveis substâncias como marcadores químicos. Usaram-se os compostos fenólicos como marcadores químicos pelas razões que foram descritas nos objetivos.

Os diferentes ácidos fenólicos foram primeiramente analisados no aparelho Shimadzu (UFRRJ) onde foi feita uma prévia identificação por comparação cromatográfica (tempo de retenção) com amostras autênticas. Para posterior quantificação, as análises foram repetidas no aparelho da Waters (EMBRAPA) onde além do tempo de retenção, pode-se obter os respectivos espectros de UV através do detector de fotodiodo.

A técnica utilizada foi à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

acoplada a detector de ultravioleta e de fotodiodo, utilizando um sistema de gradiente linear com mecanismo de separação por fase reversa (coluna analítica octadesil-C18). O resultado final foi uma técnica qualitativa, precisa e rápida para a determinação do perfil dos componentes existente no mel.

Com os dados dos espectros de ultravioleta obtidos com o detector de fotodiodo foi possível estabelecer alguns parâmetros para identificar os ácidos fenólicos a partir da comparação com os padrões existentes. No entanto, alguns picos nos cromatogramas não foram identificados e as substâncias precisam ser isoladas e identificadas por técnicas espectroscópicas convencionais.

### **6.1. Metodologia extrativa e analítica**

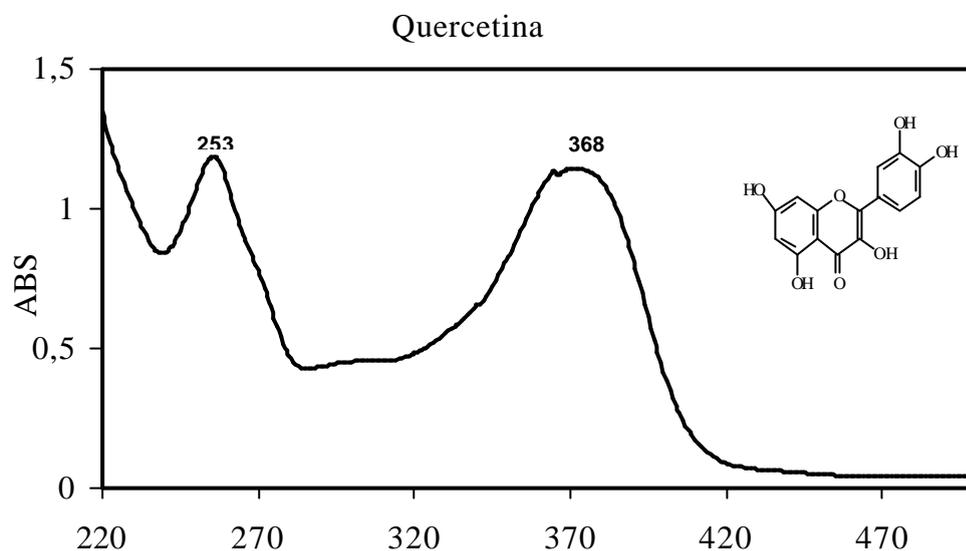
Dos métodos de extração descritos na literatura (TOMÁS-BARBERÁN, *et al*, 1992, 1997, 2000, 2001) selecionou-se aquele que pareceu o mais adequado para preparar as amostras de mel e foram analisados as várias etapas, de modo a obter uma maior reprodutibilidade e um maior número dos constituintes de interesse, diminuindo assim os interferentes da matrix do mel.

A análise dos derivados fenólicos presentes no mel serviu para mostrar que o extrato de acetato obtido pelo método IIIa era semelhante ao extrato etéreo IIIb, adotado na técnica cromatográfica de obtenção de perfis que pode ser utilizada como método de controle analítico.

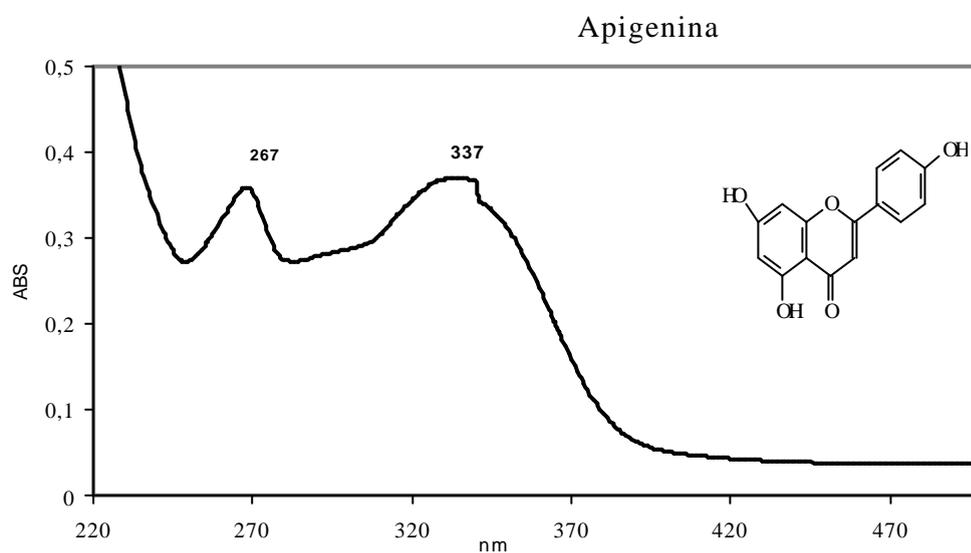
Verificou-se que no método I, avaliação direta do extrato metanólico sem fazer partição, apresentou interferentes que tornaram a análise cromatográfica muito ruidosa, não sendo assim utilizada.

O método II que consistiu no fracionamento através de coluna com Shepadex LH-20 para avaliar a presença de flavonóides, segundo relatos descritos na literatura para méis europeus (ANDRADE *et al*, 1997), para as amostras dos méis de eucalipto e silvestre analisadas, o perfil cromatográfico não indicou a presença de nenhum dos flavonóides a partir da comparação dos tempos de retenção com os padrões, bem como nenhuma absorção característica localizada na região do UV entre 250-400nm, como pode ser visto para os espectros, por exemplo da quercetina (flavonol) e da apigenina (flavona) usadas como padrões ( Figuras 4, 5). A análise dos espectros de ultravioleta do extrato bruto dos méis de eucalipto (amostra RF1) e silvestre (amostra RF10) revelou

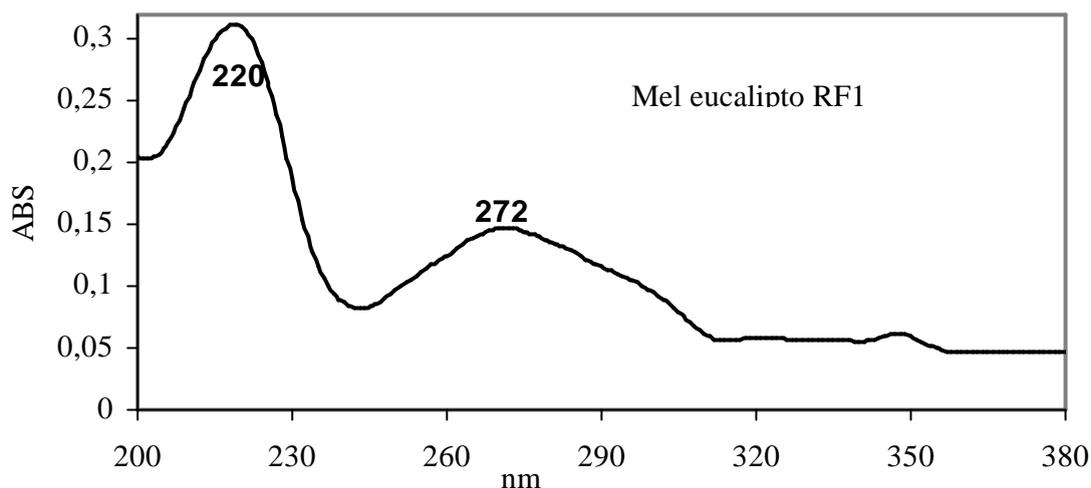
absorção na faixa de 210-270nm que corresponderam as absorções para os ácidos fenólicos e não para flavonóides (Figuras 6 e 7).



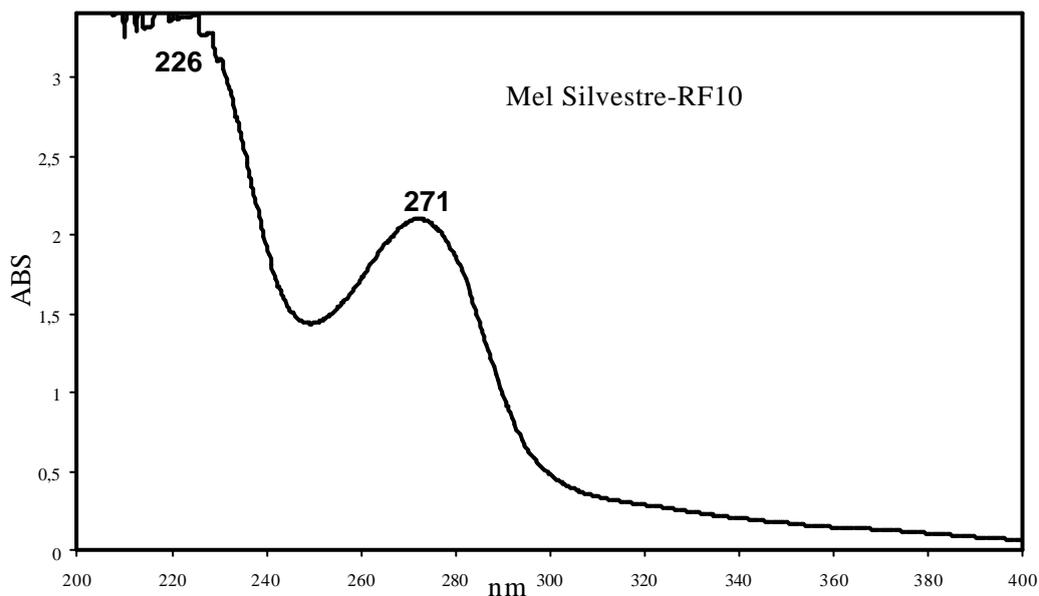
**Figura 4:** Espectro de absorção no UV da quercetina em metanol



**Figura 5:** Espectro de absorção no UV da apigenina em metanol



**Figura 6:** Espectro de absorção do extrato metanólico de compostos fenólicos obtidos com amostra RF1 (mel eucalipto).



**Figura 7:** Espectro de absorção do extrato metanólico de compostos fenólicos obtidos com amostra RF10 (mel silvestre)

A escolha do método IIIb para definir os perfis cromatográficos dos derivados fenólicos do mel se baseou na eficiência, repetitividade e reprodutibilidade observada quando das análises dos picos nos cromatogramas e suas respectivas áreas relativas, bem como o grau de recuperação do resíduo ( massa obtida de ~ 20mg) após extração de 50 g de amostra de mel, sendo as análises feitas sempre em triplicatas.

Em todas as amostras de méis analisadas, os perfis cromatográficos para os

ácidos fenólicos se mantiveram semelhantes quando amostras de mesma origem floral foram analisadas, embora oriundos de diferentes regiões. Isto assegurou a eficiência e reprodutibilidade do processo extrativo para os ácidos estudados.

Para a escolha dos parâmetros cromatográficos (comprimento de onda no UV, tamanho, dimensões e fase da coluna, escolha da fase móvel, velocidade de fluxo, etc) foram testados, inicialmente, quatro diferentes comprimentos de onda (230nm, 254nm, 270nm e 340nm), dois tipos diferentes de coluna de fase reversa (C8- octil e C18- octadecil) e concentrações diferentes de fase móvel com seis gradientes distintos. Aqui, porém estão apresentados somente os resultados que foram os mais adequados para as análises dos méis brasileiros.

## **6.2. Comportamento cromatográfico e espectros de UV dos padrões**

O estudo cromatográfico começou, inicialmente, analisando o comportamento dos padrões disponíveis por CLAE, relativamente a eluição na coluna C18 e ao seu espectro ultravioleta na fase móvel utilizada (mistura de acetonitrila: metanol: ácido acético). Embora o espectro obtido com este solvente não seja substancialmente diferente daquele resultante da análise dos padrões puro em metanol, quando foram analisados diretamente em espectrofotômetro.

O estudo dos espectros de ultravioleta obtidos pelo detector de fotiodo e acumulados em varredura de  $\lambda$  210-400nm permitiu que se fizessem algumas considerações relativas à estrutura dos compostos cromatografados. Este método permitiu obter espectros de padrões com elevado grau de pureza, onde todos sinais obtidos puderam ajudar na identificação posterior dos compostos cujas estruturas se pretendia determinar.

Reuniram-se os dados de tempo de retenção e comprimento de onda obtidos para os treze padrões estudados nas Tabelas 10 e 11, para facilitar a sua comparação com as amostras dos méis. Os tempos de retenção relatados foram obtidos com gradiente de eluição utilizado, já referido na metodologia, e todos os ácidos estudados saíram entre 3 a 30 minutos em coluna de fase reversa octadesil-C18 (Figuras 8 e 9). Os padrões foram divididos em amostras A e B para facilitar sua identificação na análise cromatográfica, pois inicialmente quando analisados por detector de UV com comprimento variável, os ácidos protocatecuico, vanílico e clorogênico co-eluíram com os ácidos sirínico, cafeico e ferulico, respectivamente.

**Tabela 10:** Tempo de retenção ( $t_R$ ) e comprimento de onda ( $\lambda_{max}$ ) dos ácidos fenólicos padrões (*Mistura A*) analisados por CLAE com detector de fotodiodo.

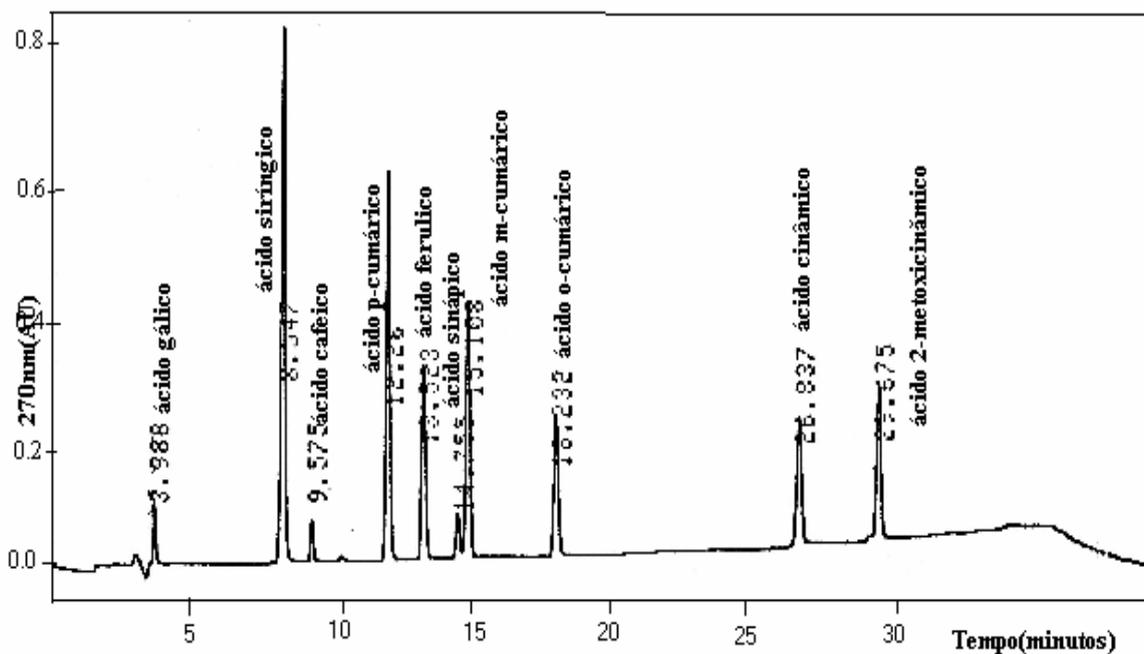
<b>Padrões de ácidos</b>	<b><math>t_R</math> (minutos)</b>	<b><math>\lambda_{max}</math> nm</b>
Ácido gálico	3,988	270
Ácido siríngeo	8,547	272
Ácido cafeico	9,575	216, 242 <i>om</i> , 292 <i>om</i> , 326
Ácido <i>para</i> -cumárico	12,260	226, 293 <i>om</i> , 306
Ácido ferulico	13,523	215, 232 <i>om</i> , 294 <i>om</i> , 321
Ácido sinápico	14,755	214, 234 <i>om</i> , 293 <i>om</i> , 320
Ácido <i>meta</i> -cumárico	15,108	232 <i>om</i> , 275, 320 <i>om</i>
Ácido <i>orto</i> -cumárico	18,232	272, 323
Ácido cinâmico	26,837	215, 270
Ácido-2-metoxicinâmico	29,575	206 <i>om</i> , 222, 308

*om* = ombro

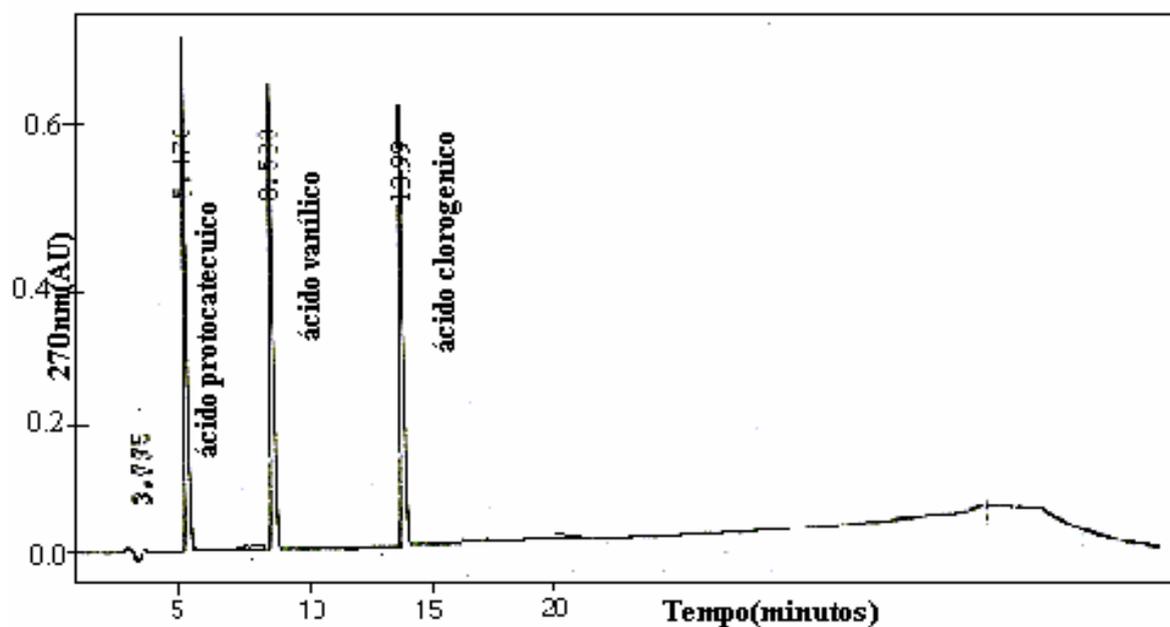
**Tabela 11:** Tempo de retenção ( $t_R$ ) e comprimento de onda ( $\lambda_{max}$ ) dos ácidos fenólicos padrões (*Mistura B*) analisados por CLAE com detector de fotodiodo.

<b>Padrões de ácidos</b>	<b><math>t_R</math> (minutos)</b>	<b><math>\lambda_{max}</math> nm</b>
Ácido protocatecuico	5,478	257, 293
Ácido vanílico	8,533	258, 290
Ácido clorogênico	13,99	256, 307 <i>om</i> , 358

*om* = ombro



**Figura 8:** Separação de padrões de ácidos fenólicos (*Mistura A*) em coluna analítica C-18 (25cm x 4.6mmx 5 $\mu$ m) por CLAE.



**Figura 9:** Separação de padrões de ácidos fenólicos (*Mistura B*) em coluna analítica C-18 (25cm x 4.6mmx 5 $\mu$ m) por CLAE .

Esta metodologia analítica, embora um pouco longa (cerca de 30 minutos de tempo de corrida), conseguiu numa só análise abranger os ácidos estudados e através dos dados acumulados de absorção espectroscópica no detector de fotodiodo, o tipo de composto fenólico pode ser imediatamente determinado na matriz do mel.

Numa análise rápida das tabelas anteriores (pg. 47), facilmente se verificou uma certa proximidade nos tempos de retenção dos ácidos padrões, o que não foi significativo, uma vez que os espectros de absorção no ultravioleta correspondentes foram completamente diferentes permitindo com uma certa facilidade sua identificação nas amostras de mel.

Esta técnica além de ser uma preciosa ferramenta na determinação estrutural dos ácidos fenólicos, complementando outras técnicas, permitiu verificar se durante o processo de extração dos componentes as características dos mesmos se mantiveram inalteradas, através da comparação do seu perfil cromatográfico ( $t_R$ ) e o seu espectro de absorção no UV. Embora os espectros obtidos, neste caso com a fase móvel (acetonitrila/metanol/água/ácido acético), tenham sido idênticos com os obtidos em metanol para os padrões puros, a nitidez dos pormenores observados, dadas às circunstâncias em que se trabalhou, permitiu uma análise, ainda assim, bastante confiável e precisa.

### **6.2.1. Análise dos ácidos fenólicos por espectrofotometria no UV**

Todos os trezes ácidos fenólicos estudados tiveram seus espectros de absorção no UV feitos em metanol, a fim de facilitar o seu monitoramento na análise cromatográfica quando do uso do detector de fotodiodo na CLAE.

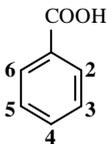
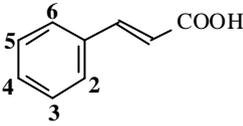
A análise das tabelas 9 e 10 (pg. 47) mostrou o fato de alguns padrões apresentarem tempos de retenção muito próximos, o que não foi significativo, uma vez que os seus espectros de absorção no ultravioleta foram completamente diferentes, permitindo com certa facilidade a sua identificação quando misturados numa mesma análise e até na matriz do mel.

A metodologia extrativa associada com a análise por CLAE com detector fotodiodo permitiu estudar os ácidos fenólicos quanto à sua absorção no ultravioleta sem que para isso fosse necessário o seu isolamento, e ainda com a garantia de que se trabalhou com elevado grau de pureza quando os ácidos foram identificados.

Pelos dados acumulados de absorção espectroscópica no detector de fotodiodo,

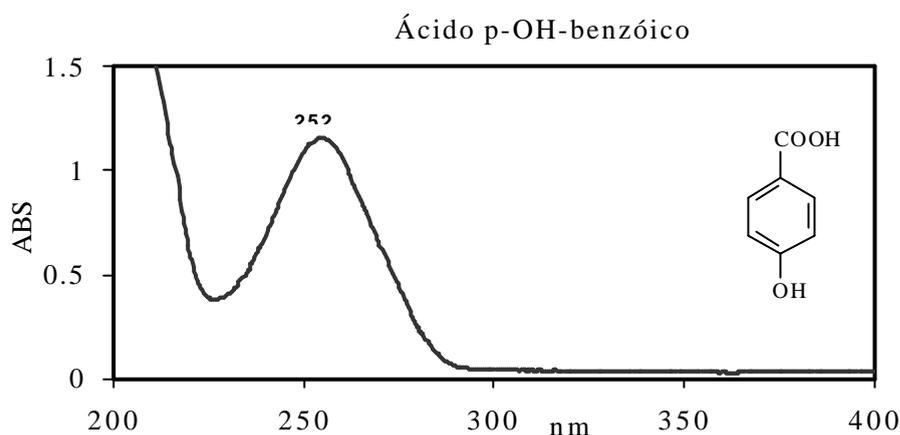
determinou-se imediatamente o tipo de composto fenólico em questão. Os ácidos fenólicos encontrados nas amostras dos méis estudadas foram os derivados de ácido benzóico (C6-C1) e os derivados de ácido cinâmico (C6-C3). Esta classificação facilitou a identificação pelo espectro de ultravioleta quanto ao esqueleto estrutural básico, onde os derivados de ácido benzóico estudados foram: ácido gálico, ácido vanílico, ácido siríngico; ácido protocatecuico, enquanto os derivados do ácido cinâmico foram: ácido ferulico, ácido clorogênico, sinápico, ácido cafeico, ácidos *orto*, *meta* e *para*-cumárico e ácido 2-metoxi-cinâmico (Tabela 12).

**Tabela 12:** Derivados de ácidos benzóico e cinâmico.

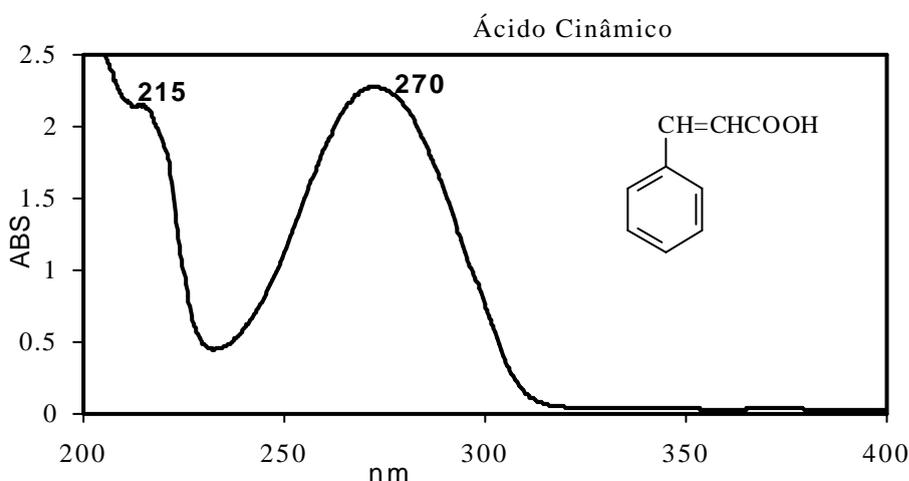
 <b>Ácido Benzóico</b>	 <b>Ácido Cinâmico</b>
Ácido 3,4,5-triidroxi-benzóico (ácido gálico)	Ácido 2-hidroxicinâmico (ácido <i>orto</i> -cumárico)
Ácido 4-hidroxi-3-metoxi benzóico (ácido vanílico)	Ácido 3-hidroxicinâmico (ácido <i>meta</i> -cumárico)
Ácido 3,4-diidroxi-benzóico (ácido protocatecuico)	Ácido 4-hidroxicinâmico (ácido <i>para</i> -cumárico)
Ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxi-benzóico (ácido siríngico)	Ácido 3,4-diidroxicinâmico (ácido cafeico)
	Ácido cafeoilquínico (ácido clorogênico)
	Ácido 4-hidroxi-3-metoxicinâmico (ácido ferulico)
	Ácido 2-metoxicinâmico
	Ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxicinâmico (ácido sinápico)

Os ácidos fenólicos que se encontraram nas amostras estudadas estavam todos substituídos, exceto o próprio ácido cinâmico, mas o espectro de absorção no ultravioleta permitiu observar tais variações estruturais.

Para efeito de discussão os espectros dos ácidos *para*-hidroxibenzóico e cinâmico foram utilizados como modelo para se discutir as modificações nas bandas de absorção, e todas as análises no espectrofotômetro foram feitas em metanol grau espectroscópico como solvente. Para o ácido *para*-hidroxibenzóico com apenas um grupo hidroxila no anel aromático, observou-se uma única banda de absorção de  $\lambda_{\max}$  a 253 nm (Figura 10). O ácido cinâmico não tem a hidroxila, mas manteve a mesma banda única de absorção máxima no ultravioleta de  $\lambda_{\max} = 270\text{nm}$ , porém agora com um desvio batocrômico de 17nm devido a extensão de conjugação do anel com a unidade C3 (Figura 11).

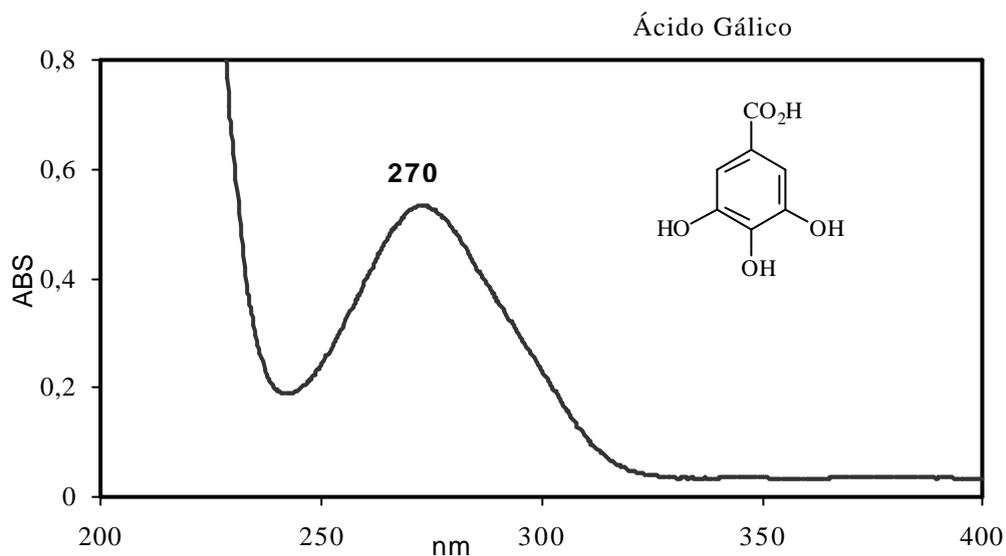


**Figura 10:** Espectro ultravioleta do ácido *p*-hidroxibenzóico

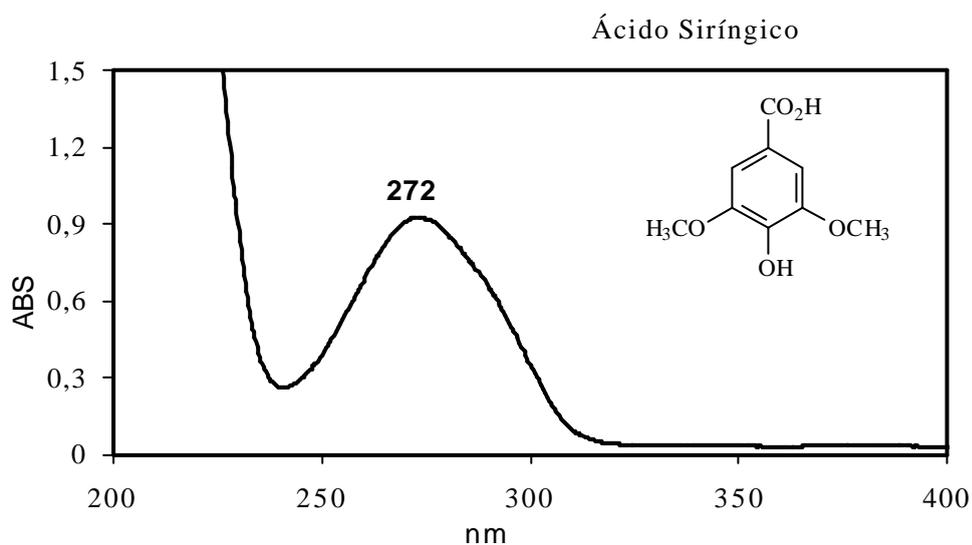


**Figura 11:** Espectro ultravioleta do ácido cinâmico

Para os derivados do ácido benzóico que apresentam três grupos hidroxila no anel aromático a alteração que se verifica é um desvio batocrômico de 17 nm quando comparados ao ácido p-hidroxibenzoico ( $\lambda_{\text{max}} = 253\text{nm}$ , PAVIA & LAMPMAN, 1979), independentemente do fato de estarem ou não substituído por metilas. Como exemplo, temos o ácido gálico e o ácido sirínico (Figuras 12 e 13).

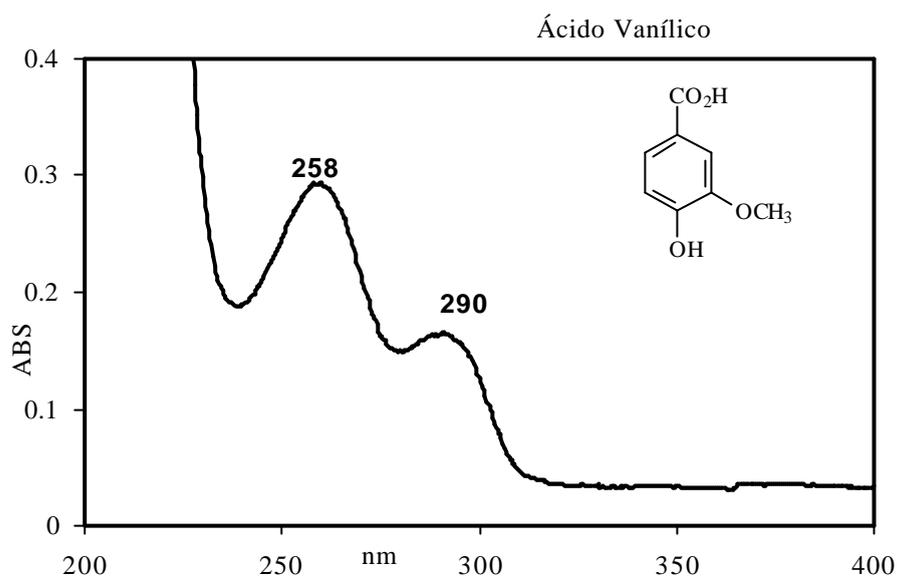


**Figura 12:** Espectro de ultravioleta ácido gálico.

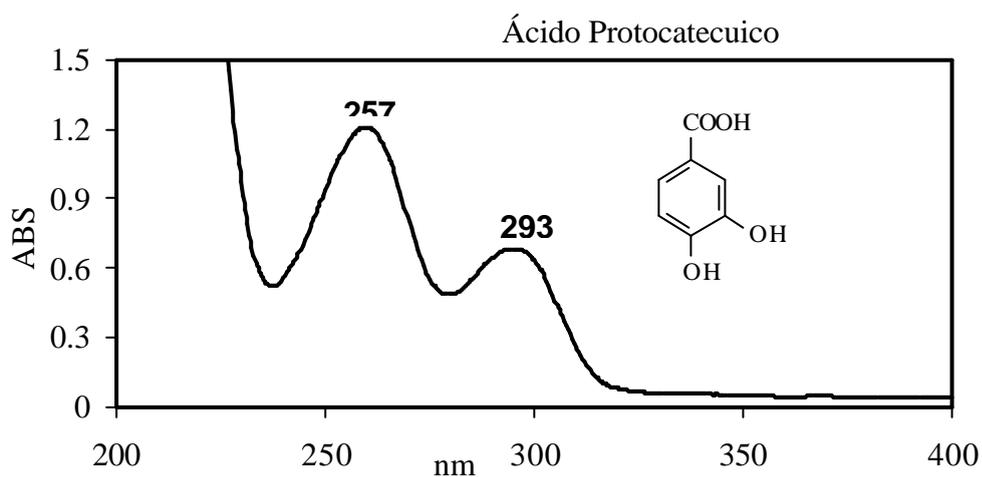


**Figura 13:** Espectro de ultravioleta ácido sirínico.

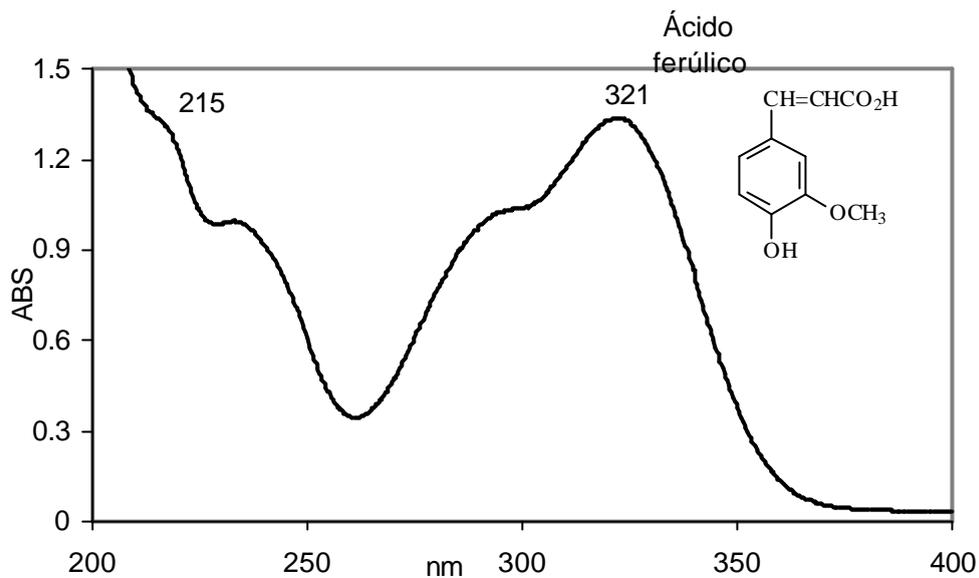
Nos ácidos fenólicos, quando estão *orto*-substituídos, aparecem duas bandas, verificando-se uma diferença nas absorções máximas consoante se está no esqueleto de derivados do ácido benzóico ou do ácido cinâmico. Como se pode observar nos espectros ultravioleta dos ácidos vanílico, protocatecuico, ferulico e 2-metoxicinâmico (Figuras 14, 15, 16 e 17).



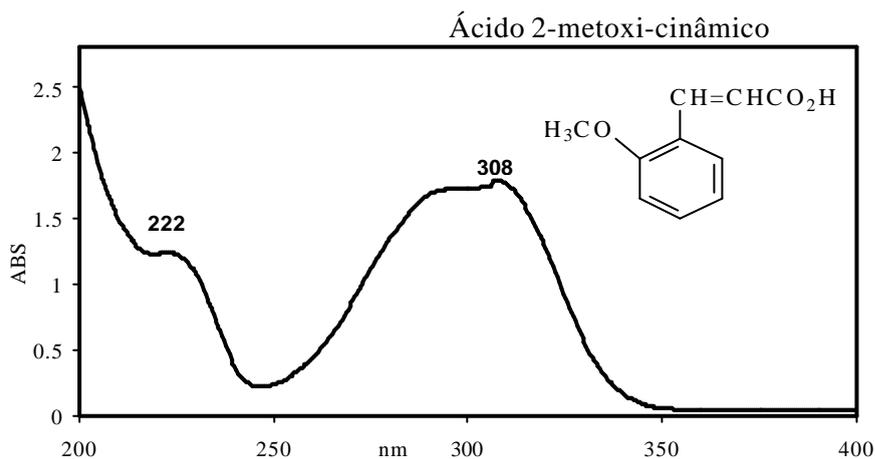
**Figura 14:** Espectro ultravioleta do ácido vanílico.



**Figura 15:** Espectro ultravioleta do ácido protocatecuico.

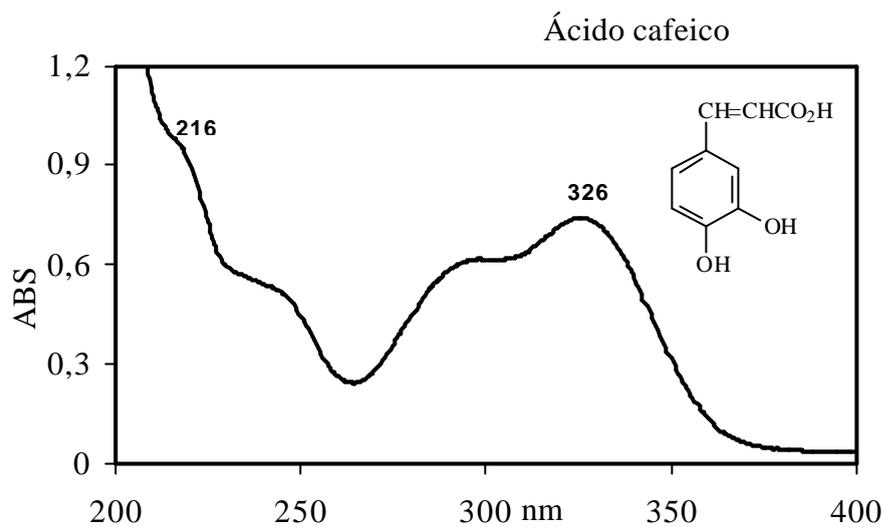


**Figura 16:** Espectro ultravioleta do ácido ferúlico.

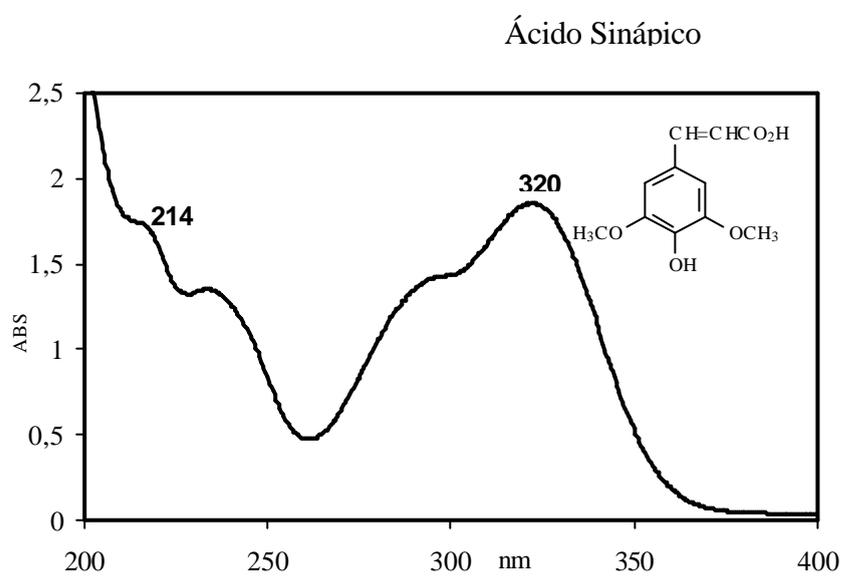


**Figura 17:** Espectro ultravioleta do ácido 2-metoxi-cinâmico.

Nos casos dos espectros ultravioletas dos ácidos cafeico, sinápico e clorogênico, foram observados comportamentos semelhantes ao do ácido ferúlico, um desvio batocrômico em relação ao ácido cinâmico e o aparecimento de duas bandas principais, quando duas hidroxilas ou duas metoxilas foram inseridas no anel aromático e quando o carbono carboxílico foi substituído por um glicosídeo (Figuras 18, 19 e 20).

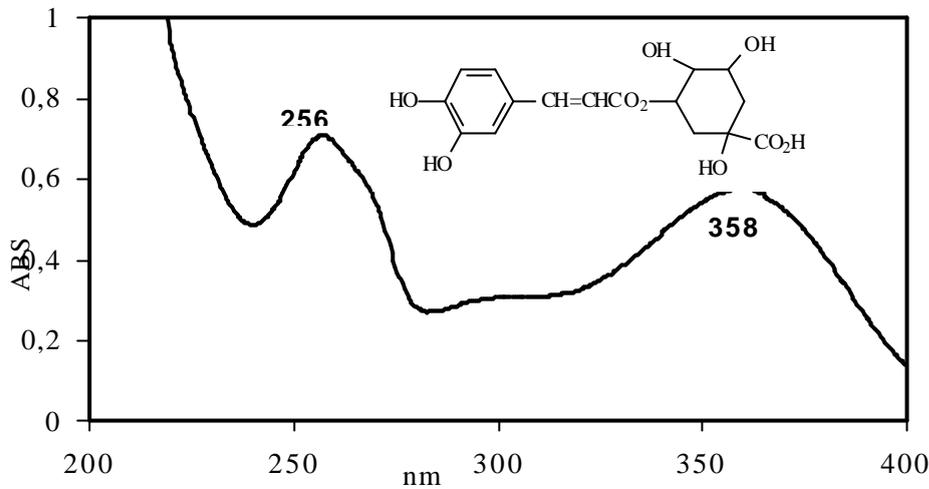


**Figura 18:** Espectro ultravioleta do ácido cafeico



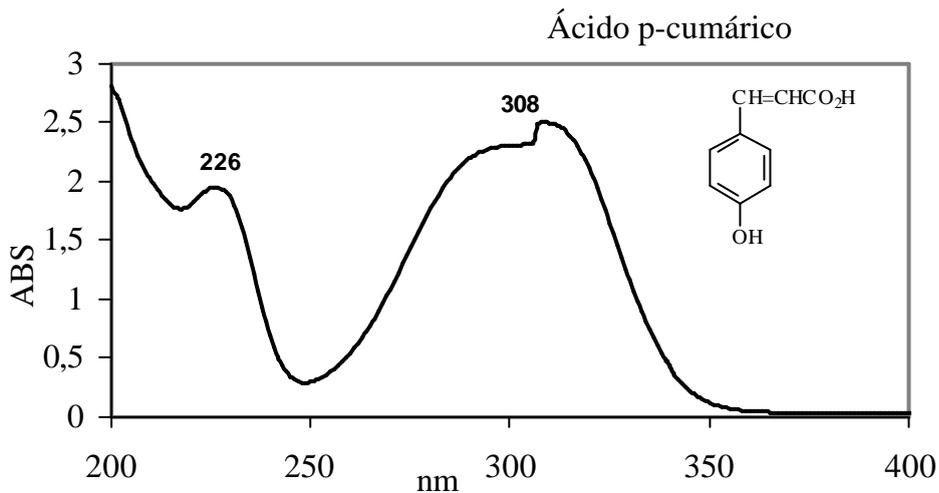
**Figura 19:** Espectro ultravioleta do ácido sinápico

## Ácido Clorogênico

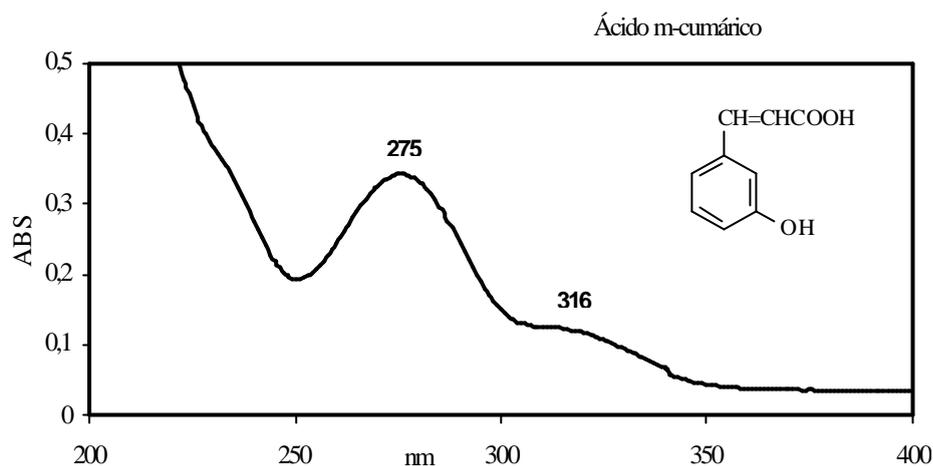


**Figura 20:** Espectro ultravioleta do ácido clorogênico.

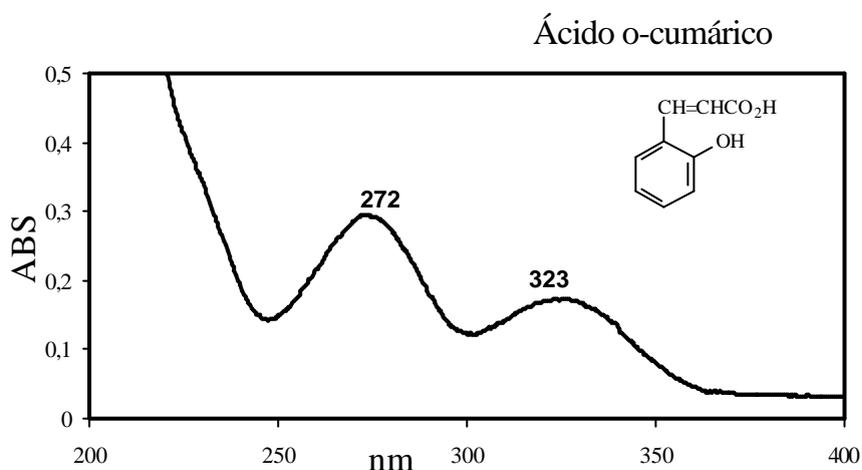
Para os ácido *orto*-, *meta*- e *para*- cumárico ocorre uma alteração com relação as duas bandas de absorção observados nos demais derivados. A existência de apenas uma hidroxila no anel aromático permite uma interação com a carbonila, alterando-se assim o espectro à medida que o grupamento hidroxila se aproxima da carboxila (no caso do derivado *orto*-substituído efeito pronunciado). Assim, o deslocamento do grupo hidroxila da posição *para*- para *meta*- fez aparecer uma segunda banda de absorção a 320 nm que se acentuou quando passou à posição *orto* (Figuras 21, 22 e 23).



**Figura 21:** Espectro ultravioleta do ácido *para*-cumárico



**Figura 22:** Espectro ultravioleta do ácido *meta*-cumárico



**Figura 23:** Espectro ultravioleta do ácido *orto*-cumárico

### 6.3. Identificação dos Ácidos Fenólicos nos Méis de Eucalipto e Silvestre

Investigou-se, previamente, utilizando-se cromatografia de camada fina (CCF) em sílica gel F254 tendo como fase móvel  $\text{CHCl}_3:\text{EtOH}$  (95:5, v/v), a existência de ácidos fenólicos e flavonóides nos extratos do mel, a partir da comparação dos  $R_f$  (fator de retenção) das amostras com os padrões autênticos (ANDRADE *et al*, 1997). Pode-se observar que alguns ácidos fenólicos estavam presentes quando observados a 254 nm, enquanto os flavonóides não foram observados em nenhum dos extratos quando revelados com solução 1% de  $\text{AlCl}_3$  em etanol e observados a 366 nm, quando comparados com os padrões, nem por sua absorção nos espectros de ultravioleta na região de 250-400 nm.(Figuras 6 e 7 pág. 46).

Após análise dos padrões dos ácidos fenólicos através dos seus perfis nos

cromatogramas e seus respectivos espectros de absorção no ultravioleta, passou-se a identificação daqueles ácidos que foram extraídos do mel de eucalipto e silvestre.

O estudo dos espectros ultravioleta obtido pelo detector de fotiodo e acumulados em varredura de  $\lambda$  220-400nm permitiu tirar algumas conclusões sobre as estruturas dos compostos cromatografados. Com este método os padrões foram analisados com alto grau de pureza, onde todos os sinais obtidos puderam ajudar na identificação da estrutura que se pretendia determinar. Assim, aplicando-se os conhecimentos adquiridos pelos estudos feitos sobre o comportamento no ultravioleta com os padrões, conjugados com seu comportamento cromatográfico puderam-se determinar a estrutura dos ácidos fenólicos encontrados no mel.

A identificação dos ácidos fenólicos foi baseada na análise ultravioleta dos padrões com o detector de fotiodo. Os tempos de retenção obtidos nos cromatogramas sempre que acompanhados dos respectivos espectros de ultravioleta constituíram um dado precioso na determinação inequívoca desses ácidos.

As análises executadas com os méis monofloral (eucalipto) quando comparadas as dos méis heterofloral (silvestre) mostraram que qualitativamente e quantitativamente os compostos fenólicos encontrados não foram os mesmos na sua totalidade. Quando se comparou o perfil cromatográfico para os méis de eucalipto comparados ao de silvestre, pode-se ver uma diferença bastante pronunciada, no que diz respeito à intensidade de alguns picos (área relativa), bem como a existência de picos distintos para cada tipo de mel analisado. No entanto, as análises realizadas para as treze amostras de mel de eucalipto quando comparadas entre si, bem como para as seis amostras do mel silvestre, apresentaram um perfil cromatográfico muito semelhante, independente da região geográfica e do período de recebimento.

Assim sendo, tudo indica que a semelhança do perfil cromatográfico do mel de mesma origem floral, no que diz respeito aos compostos fenólicos, porém de uma região geográfica diferente, poderá vir a auxiliar a identificação botânica do mel.

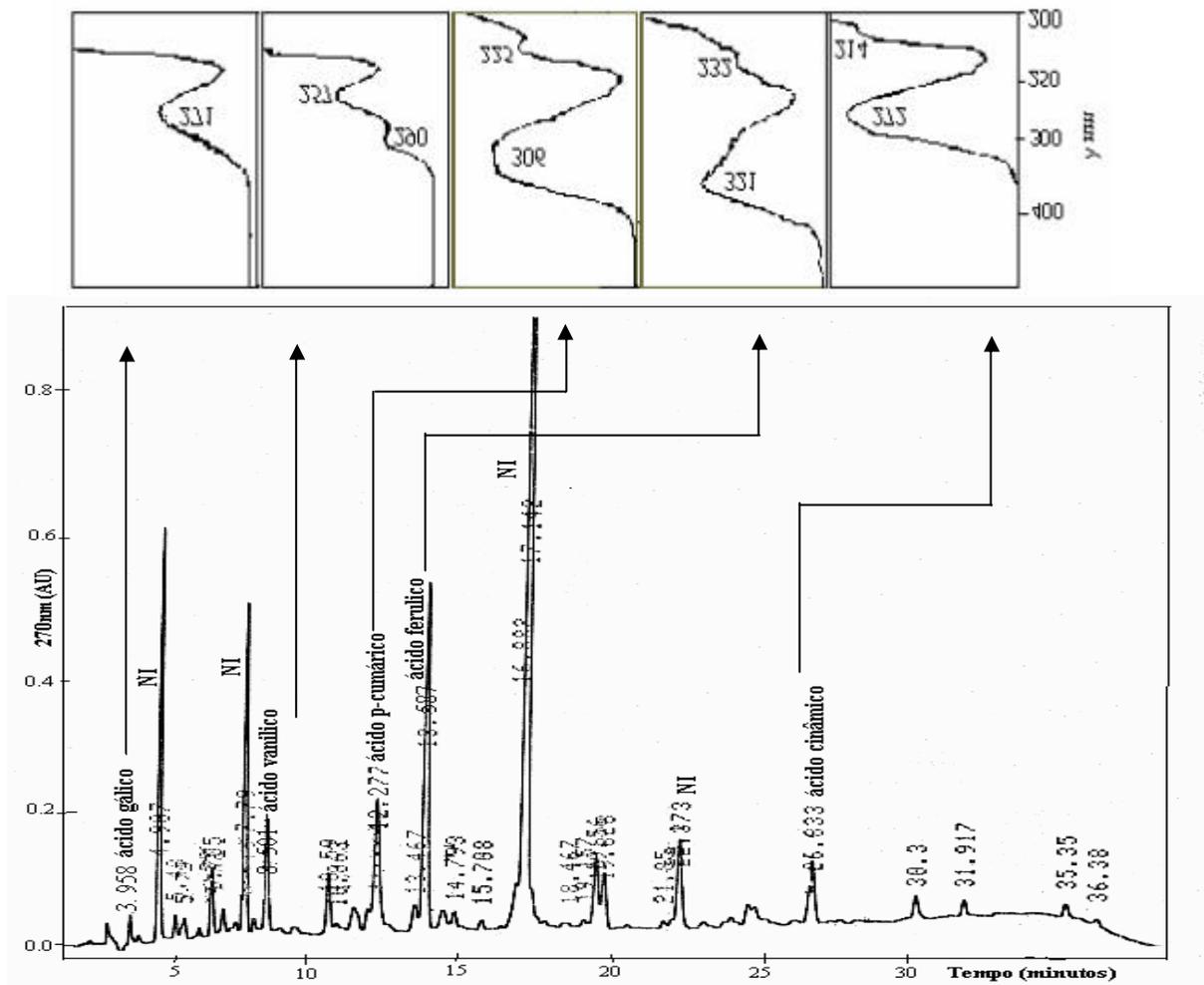
As análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) não mostraram, a presença dos flavonóides quercetina, canferol, hesperidina e miricetina (padrões investigados) quando os cromatogramas foram monitorados a 240 e 340nm. Isto vem corroborar com os dados da literatura que descrevem a existência de alguns flavonóides, tais como miricetina, luteolina, quercetina, canferol, em pequenas quantidades em méis

européus (YAO *et al*, 2003), e de serem praticamente inexistente nos méis tropicais. No entanto existem picos nos cromatogramas das amostras dos méis, os quais não foram identificados, mas que poderão ser avaliados no futuro a partir do isolamento das substâncias por cromatografia líquida semipreparativa, e posterior identificação por métodos espectrométricos (RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , espectrometria de massas, etc).

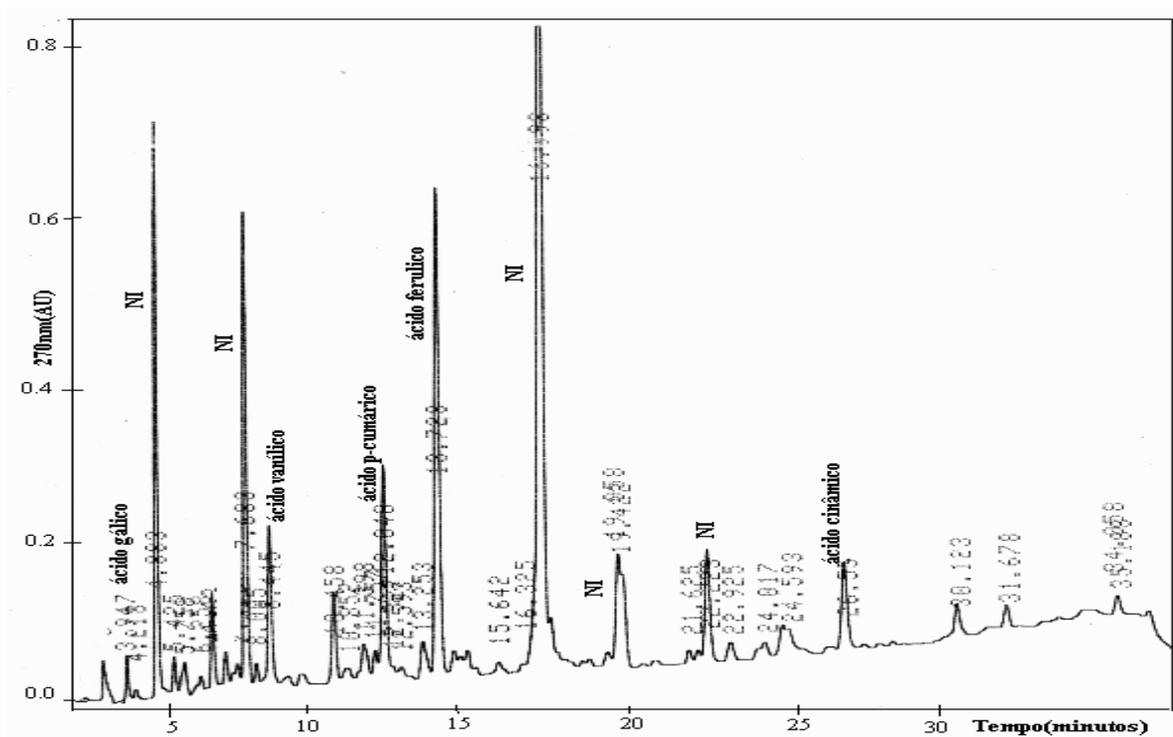
A análise do perfil cromatográfico para o mel de eucalipto (amostra RF1) permitiu identificar cinco os ácidos fenólicos predominantes, dentre eles: ácidos gálico, vanílico, *p*-cumárico, ferulico e cinâmico (Figura 24). No cromatograma desta amostra, assim como de outros méis de eucalipto oriundo de outras regiões (amostras RF4, RF5, RF6, RF8, por exemplo) observaram-se picos com tempo de retenção de 4,967; 7,790 e 16,882 minutos que não apresentaram nem espectros de ultravioleta nem tempo de retenção que puderam ser relacionados a alguns dos padrões estudados, porém os espectros de ultravioleta sugeriram serem outros derivados de ácido fenólicos, pois apresentaram bandas com máximo de absorções características para estas substâncias em 240 e 300nm.(Figuras 25-28, pg.61-64).

As análises dos cromatogramas também permitiram observar que a quantidade relativa para cada um desses ácidos varia dentro da amostra de mel, os ácidos vanílico, *para*-cumárico e ferulico foram identificados como principais, sendo o ferulico o ácido majoritário em quase todos os méis de eucalipto analisados. Uma exceção foi observada para a amostra RF8 (mel de eucalipto de Paracambi) que não mostrou a presença de ácido *para*-cumárico, mas apresentou ácido cafeico, que até então não havia sido identificado em nenhuma outra amostra de mel de eucalipto, além de apresentar como ácido majoritário o ácido vanílico e não o ácido ferulico (Figura 28 pg. 64).

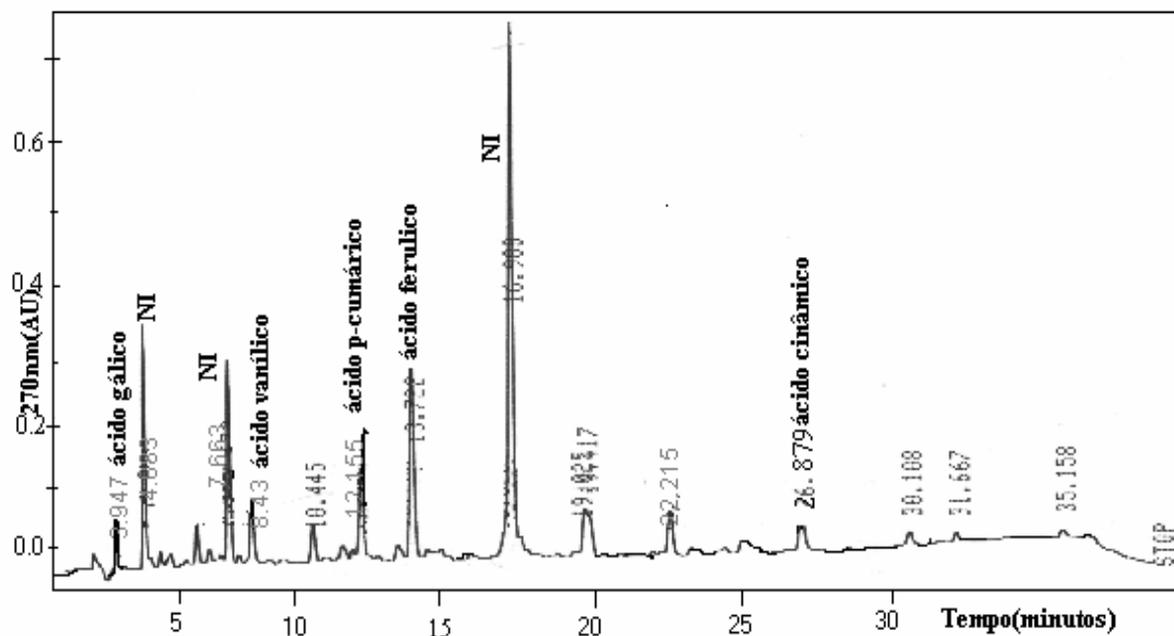
Estes resultados foram muito interessantes, pois diversos relatos da literatura descrevem a presença destes ácidos fenólicos e outros derivados polifenólicos em folhas de várias espécies de *Eucalyptus* (CHARPUIS-LARDY, 2002; CADAHIA *et al*, 1997).



**Figura 24** Análise do mel de eucalipto (Amostra RF1) por CLAE em coluna C-18 (25cm x 4,6mm x 5  $\mu$ m). NI picos não identificados.

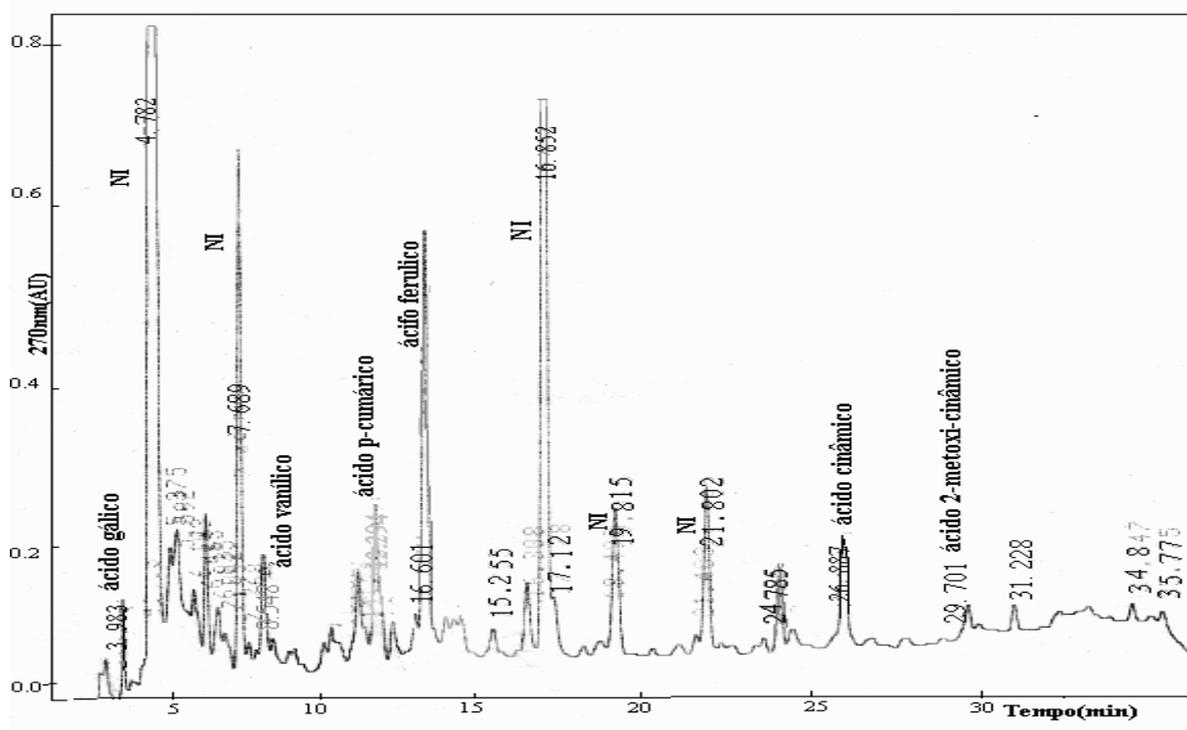


**Figura 25:** Análise do mel de eucalipto (Amostra RF4) por CLAE em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5 µm ). NI picos não identificados.

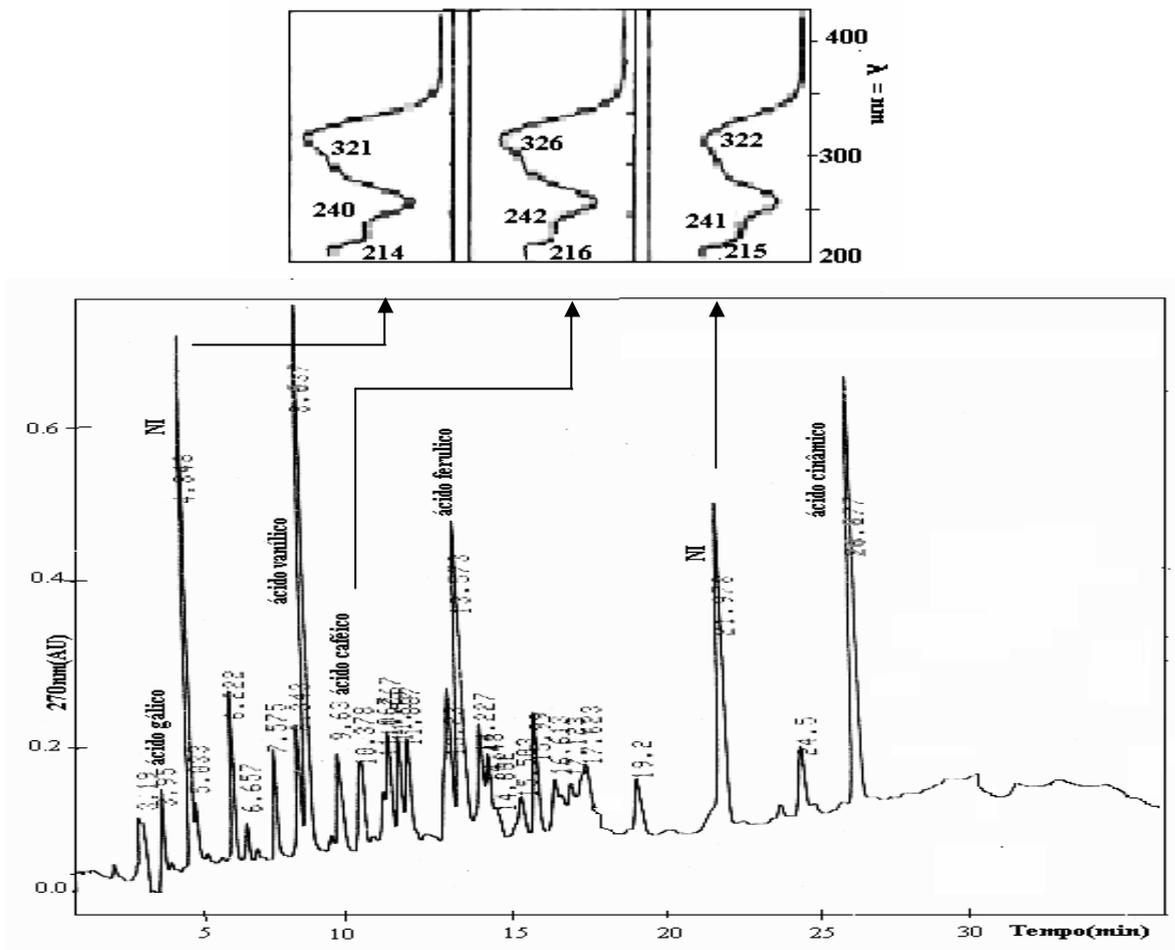


**Figura 26:** Análise do mel de eucalipto (Amostra RF5) por CLAE em coluna analítica

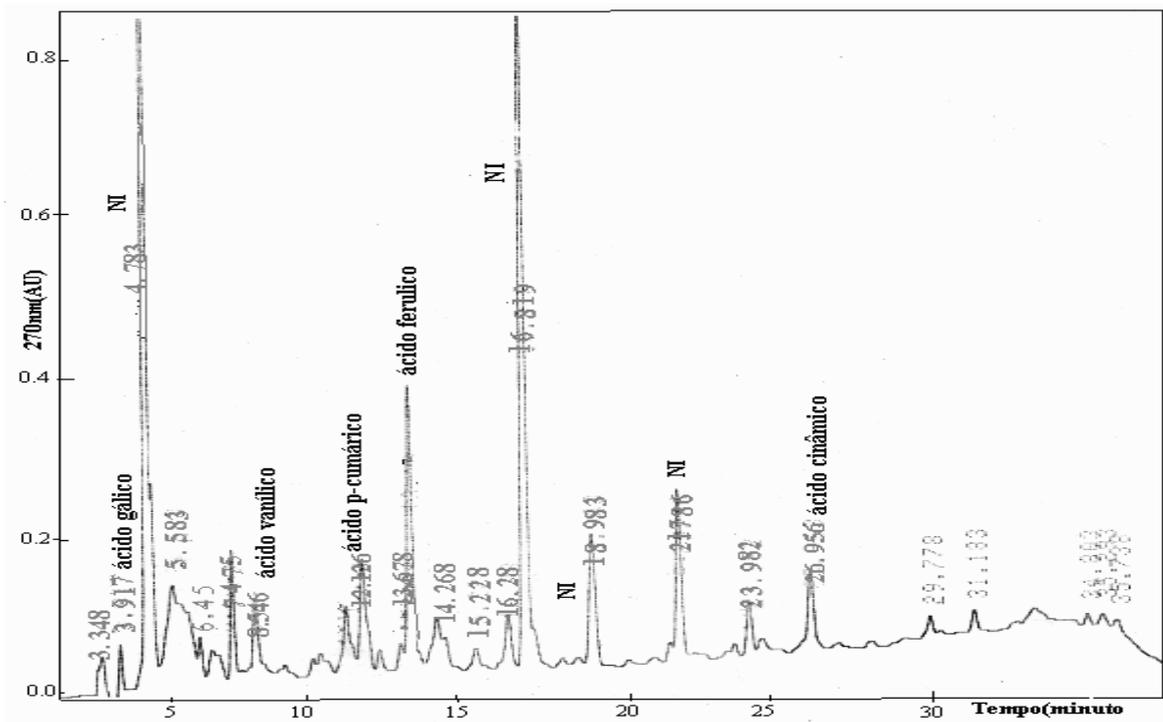
C-18 (25cm x 4,6mm x 5 µm). NI pico não identificado.



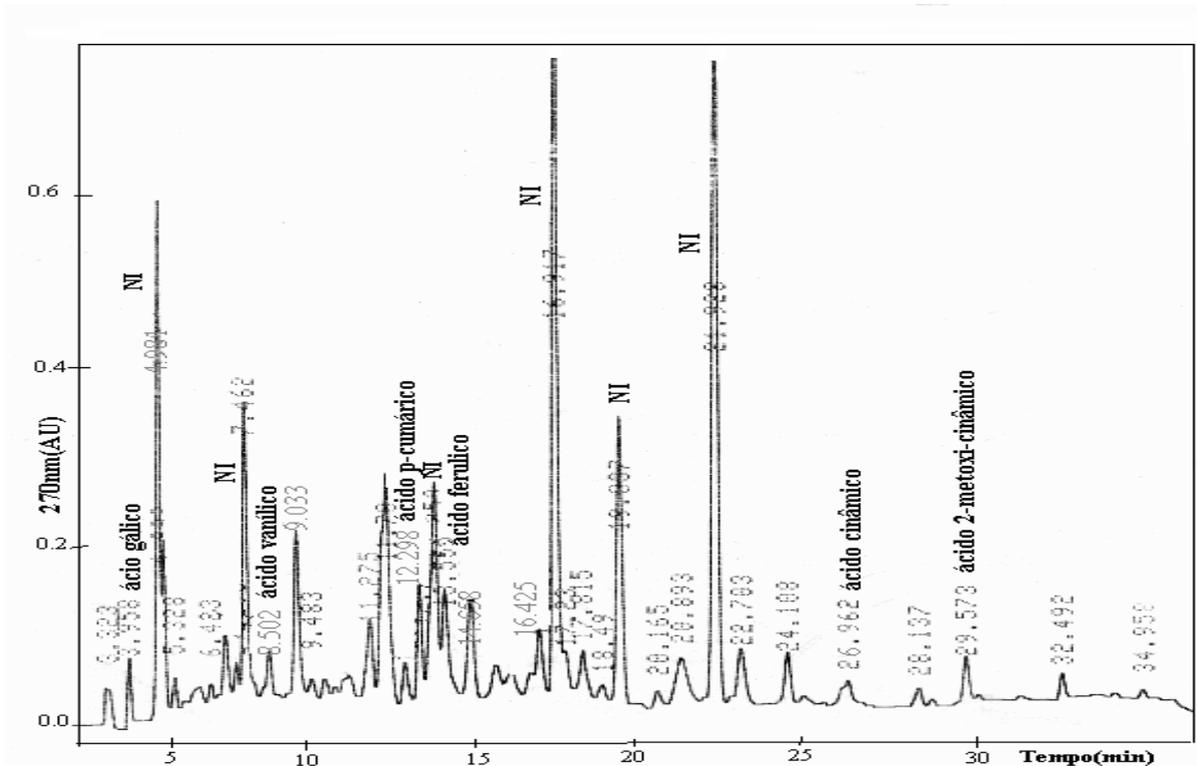
**Figura 27:** Análise do mel de eucalipto (Amostra RF6) por CLAE em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5 µm). NI picos não identificados.



**Figura 28:** Análise do mel de eucalipto (Amostra RF8) por CLAE em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5 µm). NI picos não identificados.



**Figura 29:** Análise do mel de eucalipto (Amostra RF14) por CLAE em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5 µm ). NI picos não identificados.



**Figura 30:** Análise do mel de eucalipto (Amostra RF15) por CLAE em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5 µm ). NI pico não identificados.



Os únicos ácidos que apareceram nos méis de eucalipto e silvestres foram os ácidos gálico, vanílico e cinâmico, porém em concentrações diferentes.

O limite de detecção para os ácidos no mel foi de 0,1µg/100g e foi determinado a partir da menor quantidade injetada na maior sensibilidade do integrador. A comparação do tempo de retenção e o espectro ultravioleta dos padrões com as substâncias contidas no mel de eucalipto e silvestre estão de acordo com a presença de alguns desses ácidos, porém em quantidades diferentes, fato que pode ser constatado a partir dos perfis cromatográficos obtidos. Os níveis quantitativos dos ácidos presentes em cada amostra de mel foram determinados dos espectros de absorção obtidos dos cromatogramas contra seus padrões a 270nm (Tabela 13).

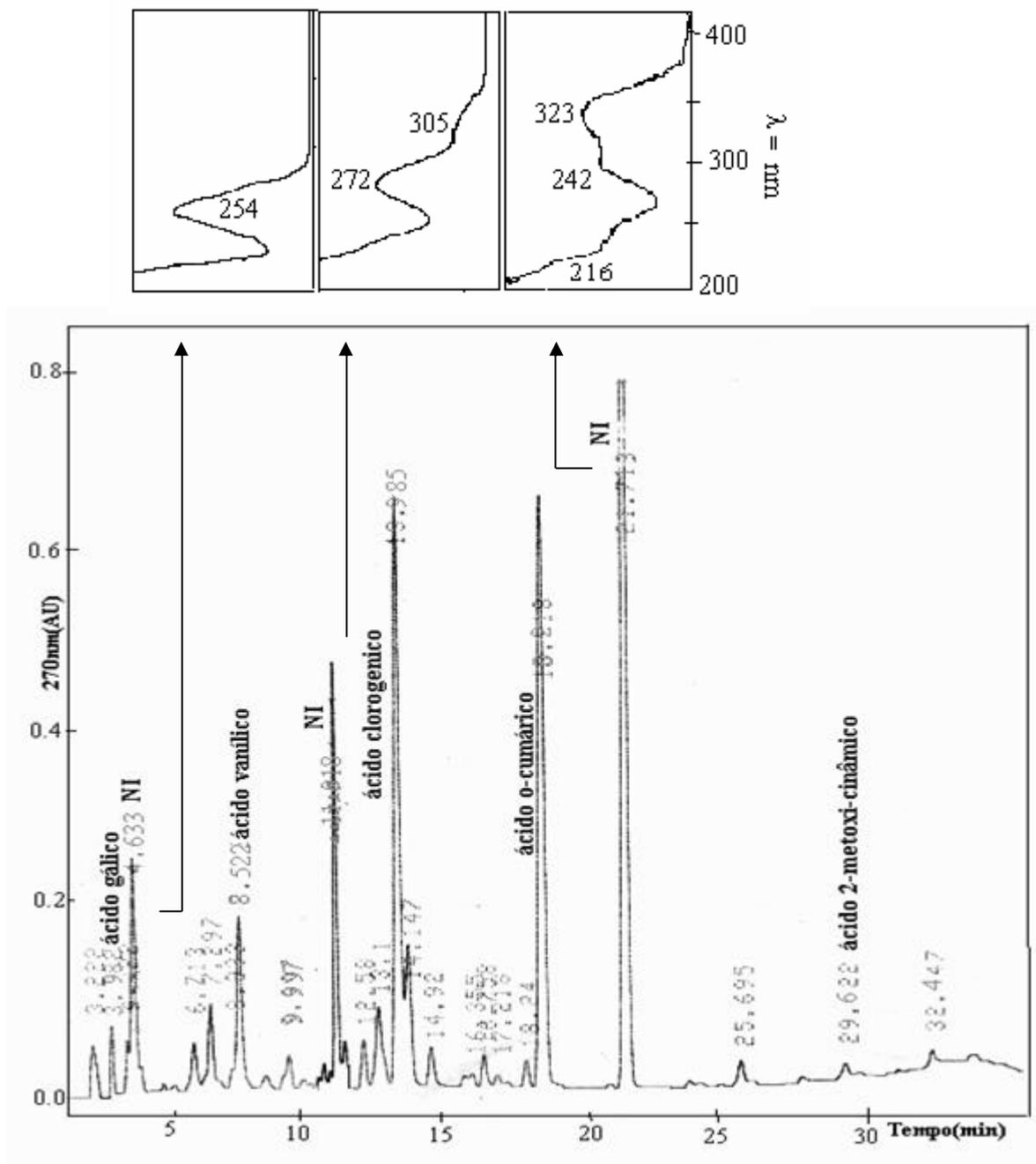
**Tabela 13:** Teor dos ácidos fenólicos (mg/100g de mel) encontrados nas amostras de méis analisadas.

Ácidos	t <sub>R</sub> (min)	Eucalipto <sup>*,a</sup>	Silvestre <sup>*,b</sup>
gálico	3,988	0,023±0,07	0,072±0,02
vanílico	8,533	0,082± 0,13	0,232±0,02
<i>p</i> -cumárico	12,260	0,115± 0,08	-
ferulico	13,523	0,252±0,12	-
clorogênico	13,991	-	0,186± 0,09
<i>o</i> -cumárico	18,232	-	0,029± 0,06
cinâmico	26,675	0,055± 0,11	0,159± 0,01
2-metoxicinâmico	29,675	-	0,092± 0,13

\* média e desvio padrão para três determinações (n=3) em diferentes amostras de méis

a . Análises para amostras de mel de eucalipto ( RF1 , RF3, RF4)

b. Análises para amostras de mel silvestre (RF7, RF8, RF9).



**Figura 32:** Análise do mel de silvestre (Amostra RF12) por CLAE em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5 μm ). NI picos não identificados.



As amostras de méis de eucalipto mostraram-se distintas das de silvestre por apresentarem maiores concentrações para os ácidos ferúlico e *para*-cumárico, enquanto os ácidos vanílico e clorogênico foram identificados em maiores concentrações no mel de silvestre. Assim, parece que a quantidade relativa de um ácido individual poderia estar relacionada à origem floral do mel, servindo como um possível marcador químico no controle geográfico e botânico.

Os resultados mostram que os ácidos gálico, vanílico, ferulico e cinâmico foram os que melhor definiram a origem floral, em termos de variação de concentração quando comparados os méis de eucalipto e silvestre. Este estudo sugere que a técnica é bastante versátil, pois permite a separação dos principais ácidos fenólicos, os quais poderão servir como marcadores na avaliação da origem botânica. Adicionalmente, um maior número de amostras de méis de diferentes origens geográficas poderão ser analisadas para comprovar a utilização desses ácidos como marcadores da origem floral.

A análise dos extratos brutos dos méis a partir dos seus perfis cromatográficos e os espectros de ultravioleta obtidos se torna uma preciosa ajuda na determinação estrutural, antes de se proceder ao isolamento dos compostos de interesse.

O isolamento de alguns ácidos que não foram identificados será necessário para confirmar se estes também poderão servir como potentes marcadores para os méis de origem monofloral e heterofloral.

## 7. CONCLUSÕES

A análise do perfil cromatográfico associado ao estudo dos espectros de ultravioleta obtidos pelo detector de fotodiodo dos méis de eucalipto permitiu identificar os ácidos: gálico, vanílico, *para*-cumárico, ferulico e cinâmico, enquanto para o mel de silvestre foram identificados os ácidos gálico, vanílico, clorogênico, *orto*-cumárico, cinâmico e 2-metoxicinâmico.

A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência mostrou-se eficiente, reprodutiva e de fácil manipulação para análise dos dezenove méis estudados. Dada a sua reprodutibilidade e versatilidade poderá vir a ser usada na identificação da origem floral e no controle analítico dos méis comercializados, auxiliando assim a palinologia.

Esta metodologia analítica, embora um pouco longa, conseguiu numa só análise abranger dois grupos de ácidos fenólicos: os derivados de ácido benzóico - ácido gálico e vanílico; e os derivados de ácido cinâmico - ácido ferúlico, ácido *para*-cumárico, ácido *orto*-cumárico, ácido clorogênico, ácido cinâmico e ácido 2-metoxicinâmico; que até então não havia sido utilizada em análises para os méis brasileiros.

A ocorrência de quantidades significativas dos ácidos vanílico, *para*-cumárico e ferulico nas treze amostras de méis de eucalipto, e dos ácidos vanílico, clorogênico e cinâmico nas seis amostras de méis de silvestre, indicou que estas substâncias poderiam ser usadas como marcadores químicos destas espécies de méis.

Os perfis cromatográficos dos ácidos fenólicos para os méis de uma mesma espécie floral, oriundos de diferentes regiões geográficas, não sofreram alterações qualitativas e quantitativas drásticas, sugerindo que os compostos fenólicos estudados podem servir como marcadores químicos na classificação botânica do mel, auxiliando a análise palinológica.

A investigação minuciosa de todos os picos que aparecerem nos cromatogramas das amostras de méis analisadas, e que não foram relacionados a nenhum dos nossos padrões, serão posteriormente avaliados, com a intenção de se isolar (cromatografia líquida semipreparativa) compostos presentes na matriz do mel e identificar novas substâncias e monitorar outros possíveis compostos fenólicos, tais como os flavonóides, que sabemos também estarem presentes na matriz do mel e que apresentam propriedades biológicas muito interessantes.

Os méis de silvestre foram estudados em menor número, sendo necessário um estudo mais aprofundado para a confirmação inequívoca da composição química deste mel. Um número maior de amostras de méis de mesma origem floral, porém de diferentes origens geográficas deverão ser analisadas para corroborar na utilização desses ácidos fenólicos como marcadores químicos da origem botânica e/ ou geográfica dos méis brasileiros.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADCOCK, D. 1962. **The effect of catalase on the inhibine and peroxide values of various' honeys.** *Journal of Apicultural Research*; 1, 38-40.
- ALLEN, K. L., MOLAN, P. C. & REID, G. M. 1991. **The variability of the antibacterial activity of honey.** *Apiacta*, 26, 114-21.
- ALLEN, K. L., MOLAN, P. C. & REID, G. M. 1991a. **A survey of the antibacterial activity of some New Zealand honeys.** *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 43, 817-22.
- AMIOT, M. J.; AUBERT, S.; GONNET, M. & TACCHINI, M. 1989. **The phenolic compounds in honeys: preliminary study upon identification and family quantification.** *Apidologie*, 20(2), 115-125.
- AMIOT, M.J.; SABATIER, S.; TACCHINI, M. e AUBERT,S. 1992. **Identification of Flavonoids in Sunflower Honey.** *J. Food Sci.*; 57(3), 773-777.
- ANDRADE, P.; FERRERES, F. E AMARAL, M.T.1997. **Analysis of Honey phenolic acids by HPLC, its application to honey botanical characterization.** *J.Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, 20 (14), 2281-2288.
- ARMON, P.J. 1980. **The use of honey in the treatment of infected wounds.** *Tropical Doctor*, 10: 91.
- AUBERT, S. & GONNET, M. 1983. **Mesure de la couleur des miels.** *Apidologie*, 14 (2): 105-118
- AURELI, P.; HATHEWAY, C.L.; FENICIA, L.; FERRINI, A.M. 1986. **Prime segnalazioni di casi di botulismo infantile in Italia.** *Ann. Ist. Super. Sanita'*, 22: 855-858
- AZEREDO, M.A.A. & AZEREDO, L.C. 1999. **Características físico-químicas dos méis do município de São Fidélis-RJ.** *Ciência e Tecnologia de Alimento*, 19(1),3-7.
- AZOUBEL, M.L. 1986. **Análise da Origem Floral de Méis do Nordeste.** *Resumos do VII Congresso Brasileiro de Apicultura*, Salvador, Bahia: 27.
- BARTH, O.M. 1989. **O Pólen no mel Brasileiro.** Rio de Janeiro. Luxor. 150p.
- BARTH, M.O.1990. **Pollen in monofloral honeys from Brazil.** *J.Apic. Research*, 29(2):89-94.
- BARTH, O.M.1996. **Monofloral and wild flower honey pollen spectra in Brazil.** *Ciência e Cultura*, 48, 163-165.

BARTH, O . M. 1994. **Monofloral and Wild Flower Honey Pollen Spectra in Brazil.** *Ciência e Cultura*, 48, 163-165.

BARTH, O. M. & DUTRA, V. M. L. 2000. **Concentração de Pólen em Amostras de Mel de Abelhas Monoflorais do Brasil.** *Revista da Universidade de Guarulhos – Geociências*. Número especial : 173-176.

BASTOS, D.H.M. **Análise de méis produzidos na Região Bragantina.** 1994, *LECTA-USF*. Bra.Pta.12:121-134.

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

BOGDANOV, S. 1984. **Characterisation of antibacterial substaces in honey.** *Lebensm. Wiss. Technol.*, 17, 74-76.

BONAGA, G. & GIUMANINI, A.G. 1986. **The volatile fraction of chestnut honey.** *Journal Apicultural Research*, 25, 113-120.

BOSI, G. & BATTAGLINI, A.G. 1978. **Gas Chromatography analysis of free and protein amino acids in some unifloral honeys.** *Journal Apicultural Research*, 17, 152-166.

BROMENSHENK, J.J.; *et al.* 1985. **Pollution Monitoring of Puget Sound with honeybees.** *Science*, NY, 227 : 632-634.

BURLANDO, F. 1978. **About the therapeutic action of honey on burn wounds.** *Minerva Dermatolog.* 113: 699-706.

CADAHIA, E.; CONDE, E. GARCIA-VALLEJO, M. C.; FERNÁNDEZ DE SIMÓN, B. 1997. **High pressure liquid chromatographic analysis of polyphenols in leaves of *Eucalyptus camaldulensis*, *E. globulus* and *E. rudis*: proanthocyanidins, ellagitannins and flavonol glycosides.** *Phytochem. Anal.*, 8, 78-83.

CALDEIRA, J. **John's beekeeping notebook - American beekeeping history: the bee hive.** Disponível em <http://outdoorplace.org/beekeeping/history1.htm> . Acesso em: 11/09/2002.

CAMPOS, R. G. M. 1987. **Contribuição para o estudo do mel, pólen, geléia real e própolis.** *Boletim da Faculdade de Farmacia de Coimbra*, v.11,n.2, p.17-47.

CARTLAND, B. 1970. *The magic of honey.* *Corgi Books, London, UK*, 160 pp.

CASTRO, R. N.; AZEREDO, L. C.; AZEREDO, M.A. A. e SAMPAIO, C.S.T. 2001. **HPLC assay for the determination of Ascorbic Acid in honey samples.** *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 7(24), 1015-1020.

CHAPUIS-LARDY, L.; CONTOUR-ANSEL, D. & BERNHARD-RECERSAT. 2002. **High-performance liquid chromatography of water-soluble phenolics in leaf litter of three *Eucalyptus* hybrids (Congo).** *Plant Science*, 163, 217-222.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. 1989. **Codex standards for sugars (honey). Supplement 2 to Codex Alimentarius Volume III.** *Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization*, Rome.

CODEX ALIMENTARIUS. 1994. **Honey. 2nd Edition**, FAO/WHO, v.11: 21-24.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. 1990. **Official methods of analysis. v.3, Supl 2.**

CODEX ALIMENTARIUS. 1995. **Standards for honey. 2nd Edition**, FAO/WHO v.13.

COHN, M.E. *et al.* 1986. **La qualite' des miels du commerce.** *Cah. Nut. Diet*, 21 (3): 219-222.

CORDELLA, C. B.; MILITÃO, J. S. L. T.; CLÉMENT, M.C.; e CABROL-BASS, D. 2003. **Honey Characterization and adulteration Detection by Pattern Recognition Applied on HPAEC-PAD Profiles. 1. Honey Floral Species Characterization.** *J. Agric. Food Chem.*; 51, 3234-3242.

CORTOPASSI-LAURINO, M. & GELLY, D. S. 1991. **Analyse pollinique, propriétés physico-chimiques et action antibactérienne des miels d'abeilles africanisées *Apis mellifera* et de Méliponinés du Brésil.** *Apidology*, 22, 61-73.

CORTOPASSI-LAURINO, M.; RAMALHO, M. 1988. **Pollen harvest by africanized *Apis mellifera* and *Trigona spinipes* in São Paulo. Botanical and Ecological Views.** *Apidologie*, 19(1): 1-24.

CRANE, E. 1975. **Honey: A comprehensive survey.** *Heinemann (in coop. with IBRA)*, London, U.K. 608 pp.

CRANE, E. 1979. **Honey in relation to infant botulism.** *Bee World*, 60(4): 152-154.

CRANE, E. 1980. **A book of honey.** Oxford University Press, Oxford, U.K., 198 p.

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

CRANE, E. 1990. **In: Bees and beekeeping: Science, Practice and World Resources.** Heinemann, Oxford, 400p, Chapter 13.

DAHARU, P.A. & SPORNS, P. 1984. **Phenol residue levels in honey.** *J. Apic. Res.*, 23 (2): 110-113.

- D'ARCY, B. RINTOUL,G.; ROWLAND, C.Y. E BLACKMAN, A.J.1997. **Composition of Australian honey extractives. 1. Nor-isoprenoids, monoterpenes, and other natural volatiles from Blue Gum ( *Eucalyptus leucoxylon*) and Yellow Box ( *Eucalyptus melliodora*) honeys.** *J. Agric. Food Chem.*, 45, 1834-1843.
- DATTA, N ; TOMÁS-BARBERÁN, F.A; MARTOS, I.; FERRERES, F.; YAO, L.. & SINGANUSONG, R. 2003. **Flavonoids, Phenolic acids and Abscisic acid in Australian and New Zealand *Leptospermum* honeys.** *Food Chemistry*. 81,159-168.
- DE LIMA, NELSON MELLO. **Abelhas e Mel, criação e extração** . Curso de apicultura. Ed. Tecnoprint S.A 1979.
- DE MARIA, C. A.B.; TRUGO, L. C.; COSTA, L. S. M.; ALBUQUERQUE, M. L. S.; QUINTEIRO, L.M.C. & BARTH, O. M. 1999. **Determination of non-volatile compounds of different botanical origin Brazilian honeys.** *Food Chemistry*, 65, 347-352.
- DONADIEU, Y. 1983. **Honey in natural therapeutics.** Paris:Maloine Editeur, S.A., 28, 2nd.
- DUSTMAN, J. H. 1979. **Antibacterial effect of honey.** *Apiacta*, 14(1), 7-11.
- EFEM, S. E. E. & UDOH, K. T. & IWARA, C. I.1992. **The antimicrobial spectrum of honey and its clinical significance.** *Infection*, 20(4), 227-229.
- EFEM, S.E.E. 1988. **Clinical observations on the wound healing properties of honey.** *British Journal of Surgery*, 75: 679-681.
- EISCHEN, F.A. & DIETZ, A. 1990. **Improved culture techniques for mass rearing *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae).** *Entomological News*, 101(2): 123-128.
- FERRERES, F.; ORTIZ, A.; SILVA, C.; GARCIA-VIGUERA, C.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A., & TOMÁS-LORENTE, F. 1992. **Flavonoids of “La Alcarria” honey – a study of their botanical origin.** *Zeitschrift-fuer Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 194, 139-143.
- FERRERES, F.; GARCIA-VIGUERA, C.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A., & TOMÁS-LORENTE, F.1993. **Hesperetin: amarker of the floral origin of citrus honey.** *Journal Scie. Food Agric.*, 61, 121-123.
- FERRERES, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; & GINER, J. M. ; 1994. **A comparative study of hesperetin and methyl anthranilate as markers of the floral origin of cutrus honey.** *Journal Scie. Food Agric.*, 65,371-372.
- FERRERES, F.; BLAZQUEZ, M.A.; GIL, M. I. & TOMÁS-BARBERÁN, F.A. 1994a.**Separation of honey flavonoids by micellar eletrokinetic capillary chromatography.** *Journal Chromatography A*, 669(1/2), 268-274.

FERRERES, F.; ANDRADE, P. & TOMÁS-BARBERÁN, F.A. 1996. **Natural occurrence of abscisic acid in heather honey and floral nectar.** *Journal Agric. Food Chem.*, 44(8), 2053-2056.

FERRERES, F.; JUAN, T.; PEREZ-ARQUILLUE, C.; HERRERA-MARTEACHE, A.; GARCIA-VIGUERA, C. & TOMÁS-BARBERÁN, F.A. 1998. **Evaluation of pollen as a source of kaempferol in rosemary honey.** *Journal Scie. Food Agric.*, 77, 506-510.

HAFFEJEE, I.E. & MOOSA, A. 1985. **Honey in the treatment of infantile gastroenteritis.** *Brit. Med. J.* 290:1866-1867.

HUIDOBRO, J. F.; SUÁREZ-LUQUE, S.; MATO,I.; SIMAL-LOZANO,J. e SANCHO, M.T. 2002. **Rapid determination of minority organic acids in honey by high-performance liquid chromatography.** *Journal Chromatography A*, 955, 207-214.

ITC, UNCTAD/GATT. 1977. **Major markets for honey: Openings for quality supplies from developing countries.** *ITC Publications*, Geneva, Switzerland, 120 pp.

KANDIL, A., EL-BANBY, M.; ABDEL-WAHED, K.; ABOU SEHLY, G.; EZZAT, N. 1987. **Healing effect of true floral and false nonfloral honey on medical wounds.** *J. of Drug Research (Egypt)*, 17 (1-2): 71-75.

KARCH *et al.* 1976. **Optimization of reverse-phases separation.** *J. Chromatography*, 61: 375-377.

KERKVLJET, J.D. 1981. **Analysis of a toxic rhododendron honey.** *J. Apic. Res.* 20(4): 249-253.

LÜCKE, H 1935. **Wundbehandlung mit Honig und Lebertran. (Wound treatment with honey and codliver oil.)** *Dtsch. Mediz. Wochenschrift*, 41:14-17.

MARCHINI, L.C. 2001. **Caracterização de amostras de méis de *Apis mellifera* . (*Hymenoptera-apidae*) do Estado de São Paulo, baseada em aspectos físico-químicos e biológicos.** Livre Docência, Piracicaba-SP, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

MARQUEZ - SOUZA, A.C.; ABSY, M.L.; CONDÉ, P.A.A. & COELHO, H.A. 1993. **Dados da obtenção do pólen por operárias de *Apis mellifera* no município de Ji-Paraná (RO), Brasil.** *Acta Amazonica*, , 23(1):59-76.

MARTOS, I.; COSENTINI, M.; FERRERES, F.; & TOMÁS-BARBERÁN, F. A . 1997. **Flavonoid composition of Tunisian honeys and propolis.** *Journal Agric. Food Chem.* 45(8), 2824-2829.

- MARTOS, I.; FERRERES, F.; & TOMÁS-BARBERÁN, F. A . 2000. **Identification of flavonoids markers for the botanical origin of *Eucalyptus* honey.** *Journal Agric. Food Chem.* 48, 1498-1502.
- MARTOS, I.; FERRERES, F.; YAO, L. H. ; D'ARCY, B. R.; CAFFIN, N. & TOMÁS-BARBERÁN, F. A . 2000a. **Flavonoids in monospecific *Eucalyptus* honeys from Australia.** *Journal Agric. Food Chem.* 48, 4744-4748.
- MAXWELL, H. 1987. **A small-scale honey drying system.** *Amer. Bee J.*, 127 (4): 284-286  
**Melampy, R.M. and Jones, D.B. (1939) Chemical composition and vitamin of royal jelly.** *Proc. Soc. Expt. Biol. Med.* 41: 382-388.
- MENDES, B. A. & COELHO, E. M. 1983. **Considerações sobre características de mel de abelhas – Análises e critérios de inspeção.** *Informe Agropecuario*, 9(106), 56-67.
- MERKEN, H. M. & GARY, R. B. 2000. **Measurement of Food Flavonoids by High-Performance Liquid Chromatography : a Review.** *Journal Agric. Food Chem.* 48(3), 577- 599.
- MIORIN, P. L.; LEVY JUNIOR, N. C.; CUSTODIO, A. R.; BRETZ, W. A. & MARCUCCI, M. C. 2003. **Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*.** *Journal of Applied Microbiology.* 95, 913-920.
- MOLAN, P.C.; SMITH, I.M.; REID, G.M. 1988. **A comparison of the antibacterial activity of some New Zealand honeys.** *J. Apic. Res.*, 27 (4): 252-256.
- MOLAN, P. C. & RUSSELL, K. M. 1988. **Non-peroxide antibacterial activity in some New Zealand honeys.** *Journal of Apicultural Research*, 27(1), 62-67.
- MOLAN, P. C. 1992. **The antibacterial activity of honey. The nature of the antibacterial activity.** *Bee World*, 73(1), 5-28.
- NAGY, E., PA'PAY, V., LITKEI, G. AND DINYA, Z. 1985. **Investigation of the chemical constituents, particularly the flavonoid components, of propolis and *populi gemma* by the GC/MS method.** *Studies in Organic Chemistry - Flavonoids and Bioflavonoids.* 23: 223-232.
- NAHMIAS, F. 1981. **Cure yourself with honey. Curatevi con il miele.** De Vecchi Editore, Milano, 125 pp.
- NOGUEIRA NETO, P. 1972. **Notas sobre a história da apicultura no Brasil.** In: Camargo, J.M.F. *Manual de apicultura.* São Paulo: CERES. 17-32.
- PAVIA, D. & LAMPMAN, K. G. 1979. **Ultraviolet spectroscopy. In: Introduction to spectroscopy – a guide for students of organic Chemistry.** Saunders College Publishing/Holt Rinehart and Winston. p.183-224.

PERSANO ODDO, L. & RICCIARDELLI D'ALBORE, G. 1989. **Nomenclatura melissopalínológica**. *Apicultura*. 5, 63-72.

PLATT, J.L. & ELLIS, J.R.B. 1985. **Removing water from honey at ambient pressure**. *US Patent*, 4,536,973: 6 pp.

RAMALHO, M.; GUIBU, L.S.; GIANINI, T.C.; KLEINER-GIOVANINI, A.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. 1991. **Characterization of some southern Brazilian honey and bee plants through pollen analysis**. *J.Apic. Research.*, 30(2): 81-86.

RICCIARDELLI D'ALBORE, G. 1978. **L'Apicoltura nello Stato di S.Catarina (Brasile): caratteristiche microscopiche e fisico-chimiche dei mieli che vi si producono**. *Rivista de Agricultura Subtropicale e tropicale*, 271-289.

RODRIGUEZ LOPEZ, C. 1985. **Determinacion espectro-fotométrica del color de las mieles**. *Vida Apic.*, 16: 24-29.

SABATIER, S. AMIOT, M.J. TACCHINI, M. & AUBERT, S. 1992. **Identification of flavonoids in sunflower honey**. *Journal Food Science*, 57(3), 733-734

SAKAKIBARA, H.; HONDA, Y.; NAKAGAWA, H. A. & KANAZAWA. 2003. **Simultaneous Determination of all Polyphenols in Vegetables, Fruits and Teas**. *J.Agric. Food Chem.* 51, 571-581.

SANTOS, C.F.O. 1961. **Principais Tipos de Pólen Encontrados em algumas Amostras de mel**. *Revista de Agricultura*, 36; 93-96.

SANTOS, A. 1974. **Análise polínica de Alguns Méis do Estado de São Paulo**. *Anais do III Congresso Brasileiro de Apicultura*, Piracicaba, São Paulo.

SATO, T. & MIYATA, G. 2000. **The nutraceutical benefit, Part III: Honey**. *Nutrition* 16:468-469.

SERRANO, R. B.; VILLANUEVA, M. T. O.; MARQUINA, A. D. 1994. **La miel. Edulcorante natural por excelência**. *Alimentaria*. 253, 25-35.

SILVEIRA, F.A. 1996. **A importância da palinologia nos estudos apícolas**. *Anais do XI Congresso Brasileiro de Apicultura*, Teresina, Piauí. 269-273.

SILVIO, L. 2003. **A história do mel**. <http://www.cpamn.embrapa.br/pesquisa>. Acesso em 02/09/2003.

SHAMBAUGH, P.; WORTHINGTON, V.; HERBERT, J.H. 1990. **Differential effects of honey, sucrose, and fructose on blood sugar levels**. *J. Manipul. Physiol. Therapeutics*, 13 (6): 322-325

SOLER, C.; GIL, M.I.; GARCIA-VIGUERA, C. e TOMÁS-BARBERÁN, F.A. 1995. **Flavonoids patterns of French honeys with different floral origen.** *Apidologie*,26, 53-60.

STEEG, E. & MONTAG, A. 1988. **Qiantitative determination of aromatic carboxylic acids in honey.** *Zeitschrift fuer Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 187, 115-120.

STONOGA, V.I., FREITAS, R.J.S.D.1991. **Conteúdo de água e açúcares em mel de abelhas.** *Bd. Ceppa*, Curitiba; 9 (1), 9-16.

STRINSON, E.E., SUBES, M.H., PETTY, J., WHITE, J.W., JR. 1960.**The composition of honey. V. Separation and identification of the organic acids.** *Arch. Biochemestry Biophys*, 89, 6-12.

SUBRAHMANYAM, V.M. 1993. **Storage of skin grafts in honey.** *Bee Well* 3(1): 6.

TAN, S. T., HOLLAND, P. T., WILKINS, A. L., & MOLAN, P. C. 1988. **Extractives from New Zealand Honeys. 1. White clover, manuka and kanuka unifloral honeys.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36, 453-460.

TAN, S.T.; WILKINS, A.L.; MOLAN, P.C.; HOLLAND, P.T. e REID, M. 1989. **A Chemical approach to the determination of floral sources of new Zealand honeys.** *Journal of Apicultural Research*,28, 212-222.

THE VIRTUAL BEEKEEPING GALLERY. Bee Products. [http://www.apiculture.com/menus\\_us/index.htm?menu.htm&0](http://www.apiculture.com/menus_us/index.htm?menu.htm&0). Acesso em: 06/06/. 2003.

TERRAB, A.; DFEZ, M. J. & HEREDIA, F.J. 2003. **Palynological, Physico-chemical and colour characterization of Moroccan honeys: I. River red gum (Eucalyptus camaldulensis Dehnh) honey.** *International Journal of Food Science and Technology*. 38, 379-386.

TOMÁS-BARBERÁN, F.A; FERRERES, F. & BLÁZQUEZ, M. A. ; 1993a. **High-performance liquid chromatography of honey flavonoids.** *Journal of Chromatography*, 634, 41-46.

TOMÁS-BARBERÁN, F.A; FERRERES, F.; GARCIA-VIGUERA, C.; & TOMÁS-LORENTE, F. 1993. **Flavonoids in honey of different geographical origin.** *Zeitschrift-fuer Lebensmittel Untersuchung und Forschung*. 196, 38-44.

TOMÁS-BARBERÁN, F.A; FERRERES, F. & GINER, J. M. 1994. **A comparative study of hesperetin and methyl anthranilate as markers of the floral origin of citrus honey.** *J. Sci. Agric.* 65, 371-372.

- TOMÁS-BARBERÁN, F.A; FERRERES, F. e TOMÁS-LORENTE , F. e GARCÍA-VIGUERA, C. 1993b. **Hesperetin: A marker of the floral origin of citrus honey.** *J. Sci. Food Agric.*; 61, 121-123.
- TOMÁS-BARBERÁN, F.A; MARTOS, I.; FERRERES, F.; RADOVIC, B. S. e ANKLAM, E. 2001. **HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys.** *J. Sci. Food Agric.*, 81, 485-496.
- TONG, S.S. C.; et al. 1975. **Elemental analysis of honey as an indicator of pollution: forty-seven elements in honeys produced near highway, industrial and mining areas.** *Archs Envir. Hith*, 30 (7): 329-332.
- TOTH, G.; LEMBERKOVICS, E. A; KUTASI-SZABO, J. 1987. **The volatile components of some Hungarian honeys and their antimicrobial effects.** *Amer. Bee J.*, 127 (7): 496-497.
- VERISSIMO, M.T.L. 1987. **Porque o mel cristaliza.** *Apicultura no Brasil*, 3(18), 14.
- WAHDAN, H.A.L. 1998. **Causes of the Antimicrobial Activity of Honey.** *Infection*, 26 (1), 26-31.
- WESTON, R. J.; MITCHELL, K. R.; e ALEEN, K. L. 1999. **Antibacterial phenolic components of New Zealand manuka honey.** *Food Chemistry*. 64, 295-301.
- WESTON, R. J.; BROCKLEBANK, L. K. e LU, Y. 2000. **Identification and quantitative levels of antibacterial components of some New Zealand honeys.** *Food Chemistry*; 70, 427-435.
- WHITE, J. W. & SUBERS, M.H. 1963. **Studies on honey inhibine. 3. Effect of heat.** *Journal of Apicultural Research*, 2(2), 93-100.
- WHITE, J. W. & SUBERS, M.H. & SHEPARTZ, A.I. 1966. **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*, 73, 57-70.
- WHITE, J. W. & KUSHINIR, I. 1967. **The enzymes of honey: examination by ion-exchange chromatography, gel filtration, and starch-gel electrophoresis.** *Journal of Apicultural Research*, 6(2); 69-89.
- WHITE, J.W. 1975. *Physical characteristics of honey.* In: CRANE, E. **Honey a comprehensive survey.** London: Heinemann, Cap.6, p.207-239.
- WHITE, J.W. 1975c. **Honey. In: The hive and the honeybee.** Dadant & Sons Inc., Hamilton Illinois, USA, 491-530.
- WHITE, J.W. & DONER, L.W. 1978. **The C<sup>13</sup>/C<sup>12</sup> ratio in honey.** *J. Apic. Res.*, 17, 94-99.

WHITE, J.W. & RUDYJ, O.N. 1978. **The protein content in honey.** *Journal of Apicultural Research*, 1784, 234-38.

WHITE, J.W. JR.; KUSHNIR, I.; DONER, L.W. 1979. **Charcoal column/thin layer chromatographic method for high fructose corn syrup in honey and spectrophotometric method for hydroxymethylfurfural in honey: collaborative study.** *J. Assn. Off. Anal. Chem.* 62(4): 921-927.

WHITE, J.W. & SICILIANO, J. 1980. **Hydroxymethylfurfural and honey adulteration.** *J. Ass. Off. Analyt. Chem.*, 63 (1): 7-10.

WHITE, J.W. 1980. **Hydroxymethylfurfural content of honey as an indicator of its adulteration with invert sugars.** *Bee World*, 61(1): 29-37.

WOOTON, M., EDWARDS, R.A. & FARAJI-HAREMI, R. 1976. **Effect of accelerated storage conditions on the chemical composition and properties of Australian honeys. 2. Changes in sugar and free amino acid contents.** *Journal of Apicultural Research*; 15(1), 29-34.

WOOTON, M. *et al.* 1985. **A comparison of Codex Alimentarius Commission and HPLC methods for 5-hydroxymethyl-2-furfaldehyde determination in honey.** *Journal of Apicultural Research*, 24(2), 120-124.

ZWAENEPREL, C. 1984. **Honey: facts and folklore.** Alberta Beekeepers' Association, Edmonton, Canada, 24 p.