

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

ISNANDIA ANDRÉA ALMEIDA DA SILVA

PERFIL DE FENÓLICOS E PROPRIEDADES BIOATIVAS
DOS MÉIS DE ABELHAS SEM FERRÃO (*Melipona seminigra*
merrillae) PRODUZIDOS NO ESTADO DO AMAZONAS

JOÃO PESSOA - PB

2013

Isnandia Andréa Almeida da Silva

Perfil de fenólicos e propriedades bioativas dos méis de abelhas
sem ferrão (*Melipona seminigra merrillae*) produzidos no Estado do
Amazonas

João Pessoa - PB

2013

Isnandia Andréa Almeida da Silva

Perfil de fenólicos e propriedades bioativas dos méis de abelhas
sem ferrão (*Melipona seminigra merrillae*) produzidos no Estado do
Amazonas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Gouveia de Souza
Coorientadora: Prof^a Dra. Antônia Lúcia de Souza

João Pessoa - PB

2013

ISNANDIA ANDRÉA ALMEIDA DA SILVA

PERFIL DE FENÓLICOS E PROPRIEDADES BIOATIVAS
DOS MÉIS DE ABELHAS SEM FERRÃO (*Melipona seminigra*
merrillae) PRODUZIDOS NO ESTADO DO AMAZONAS

Tese _____/_____/_____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Antonio Gouveia de Souza
Universidade Federal da Paraíba - Departamento de Química

Prof^a. Dra. Neide Queiroz
Universidade Federal da Paraíba - Departamento de Química

Prof^a. Dra. Rita de Cássia R. Queiroga
Universidade Federal da Paraíba - Departamento de Nutrição

Prof^a. Dra. Marta Suely Madruga
Universidade Federal da Paraíba - Departamento de Tecnologia de
Alimentos

Dra. Nataly Alburquerque dos Santos
Mistério de Ciência e Tecnologia- CETENE

JOÃO PESSOA - PB

2013

DEDICATÓRIA

Pai,

Em minha memória, uma eterna saudade.

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre presente em minha vida.

Ao Prof. Dr. Antonio Gouveia de Souza pela oportunidade de ingressar em seu grupo de pesquisa e pela orientação na realização deste trabalho.

À Prof^a Dra. Antônia Lúcia pela co-orientação.

À Prof^a Dra. Neide Queiroz pela colaboração.

À Prof^a Dra. Tânia Maria Sarmento da Silva (UFRPE) pela colaboração nas análises de atividade antioxidante e cromatográficas.

À Prof^a Edeltudres pela viabilização das análises antimicrobiana.

Aos professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal da Paraíba pela amizade e compartilhamento de informações.

Aos colegas do laboratório BIOFITO da UFRPE, em especial Girliane e Paulo pelo acolhimento e conhecimentos compartilhados.

A toda minha família, pelo amor, carinho e apoio.

À Angela Tribuzy pela sua amizade, atenção e colaboração.

À Gerlânia pela ajuda nas análises físico-químicas.

À Josi Faraco pela amizade, incentivo e as orações, sobretudo nos momentos mais difíceis.

Ao Instituto Federal do Amazonas pelo apoio.

À Rosângela pela amizade e companhia.

À agência financiadora Fundação de Apoio à Pesquisa do Amazonas (FAPEAM) pelo suporte financeiro.

Desde já, agradeço à banca examinadora pelas críticas, sugestões e correções sugeridas a este trabalho.

Enfim, gostaria de agradecer a todos que contribuíram direta e indiretamente para a concretização deste trabalho.

"Deixem a trilha conhecida de vez em quando e entrem pela floresta, certamente encontrarão alguma coisa que nunca viram."

Alexandre Graham Bell

RESUMO

Melipona semingra merrillae é uma espécie de abelha sem ferrão, nativa da Região do Amazonas, melífera, cujas propriedades do mel ainda são pouco conhecidas. Neste estudo foram analisadas amostras de mel produzido por *Melipona seminigra merrillae* em sete municípios do Estado do Amazonas: Boca do Acre (BAJ), Pauni (PAU), Manaus (MAO), Rio Preto da Eva (RP), Lábrea (LAB), Maués (ME) e Coari (CO), quanto à origem botânica, características físico-químicas (umidade, pH, acidez, cinzas, proteínas, hidroximetilfurfural, e açúcares redutores), perfil de degradação térmica, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana, conteúdo e perfil de compostos fenólicos. No estudo das propriedades antioxidantes foram preparados extratos metanólicos e frações acetato de etila dos méis, nos quais foram aplicados testes para avaliação da atividade antioxidante (DPPH, ABTS, HO, sistema β -caroteno/ácido linoléico e FRAP). Os dados da análise melissopalinológica caracterizaram quatro dos sete méis analisados como monoflorais. Com relação às análises físico-químicas a maioria dos parâmetros investigados apresentou valores médios adequados para o consumo humano, com exceção para os teores de umidade e açúcares redutores. Os dados das análises termogravimétricas por sua vez indicaram que todas as amostras de méis têm o perfil de degradação térmica semelhante. Quanto à atividade antimicrobiana as frações acetato de etila das amostras LAB, ME, e CO apresentaram melhores resultados com concentração inibitória mínima (CIM) variando de 256 a 512 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os resultados promissores da atividade antioxidante encontrados nos méis, extratos e frações pode ser justificado pela presença dos compostos fenólicos: ácido gálico, 3,4-di-hidroxibenzóico, 4-hidroxibenzóico, trans-trans-abscísico, cis-trans-abscísico, ácido vanílico, ácido siríngico, ácido salicílico, ácido cumárico, ácido cinâmico, e os flavonóides taxifolina, naringenina, luteolina e o catecol, cuja ocorrência em méis brasileiros é relatada pela primeira vez. A taxifolina foi identificada em todas as amostras com teores variando de 3,87 mg/100g a 67,2 mg/100g de mel, sugerindo ser um indicador fenólico dos méis produzidos pela espécie. Os teores de conteúdos de fenólicos totais foram expressivo para todas as amostras avaliadas, o que poderia fundamentar o consumo destes méis como alimento funcional.

Palavras-chaves: Abelhas sem ferrão, *Melipona seminigra merrillae*, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana, compostos fenólicos.

ABSTRACT

Melipona semingra merrillae is a honey producing stingless bee species, whose honey properties are native to the Amazon Region, honey, honey whose properties are still poorly known. In the present study honey samples produced by *Melipona seminigra merrillae* in seven counties from Amazonas state Brazil, namely: Boca do Acre (BAJ), Pauni (PAU), Manaus (MAO), Rio Preto da Eva (RP), Lábrea (LAB), Maués (ME) and Coari (CO) were investigated. The study was performed studying the physic-chemical characteristics (pH, acidity, ash, proteins, hydroxymethylfurfural, and reducing sugars), thermal degradation profile, antioxidant activity, antimicrobial activity and profile of phenolic compounds. In the study of the antioxidant properties were prepared methanol extracts and ethyl acetate fractions of the honeys, in which samples were performed tests for the evaluation of the antioxidant activity (DPPH, ABTS, HO, β -carotene/linoleic acid system and FRAP). The data of the melissopalynological analysis characterized four of the seven honeys and monoflorals. In relation to the physic-chemical analyses, most of the parameters analyzed showed average values adequate for the human consumption, with the exception of moisture and reducing sugars. The thermogravimetric data showed that all the honey samples displayed a similar thermal degradation profile. As for the antimicrobial activities, the ethyl acetate fractions of the samples LAB, ME and CO presented the best results with minimal inhibitory concentration (MIC) varying from 256 to 512 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. The promising results of antioxidant activity found in honey, extracts and fractions can be explained by the presence of phenolic compounds: gallic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid, 4-hydroxybenzoic acid, trans-trans abscisic acid, cis-trans abscisic acid, vanillic acid, syringic acid, coumaric acid, cinnamic acid and the flavonoids taxifolin, naringenin, luteolin and catechol, whose presence in Brazilian honeys is reported for the first time. Taxifolin was identified in all the samples, in contents ranging from 3.87 to 67.2 mg/100g of honey, suggesting that it is a phenolic indicator for the honeys produced by the species. The total phenolic contents were expressive for the evaluated samples, what could support the consumption of these honeys as a functional food.

Keywords: Stingless bees, *Melipona seminigra merrillae*, antioxidant activity, antimicrobial activity, phenolic compounds.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Abelha <i>Melipona seminigra merrillae</i>	17
FIGURA 2 - Operárias de <i>Melipona seminigra merrillae</i> alimentando-se nos potes de mel	19
FIGURA 3 - Estruturas químicas de alguns ácidos benzóicos encontrados em mel	27
FIGURA 4 - Estruturas químicas de alguns ácidos cinâmicos encontrados em mel	28
FIGURA 5 - Estruturas químicas de alguns flavonóides encontrados em mel	29
FIGURA 6 - Esquema de reação entre o Radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH•) e um antioxidante	31
FIGURA 7 - Redução do complexo TPTZ com Fe ³⁺	32
FIGURA 8 - Localização geográfica dos municípios onde foram coletadas as amostras de mel – Estado do Amazonas	34

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS - Ácido 2,2'-azinobis- [3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico]

ABTS^{•+} - Cátion Radical do Ácido 2,2'-azinobis- [3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico]

AcOEt - Acetato de etila

CE - Concentração efetiva

CIM - Concentração inibitória mínima

DTA - Análise Térmica Diferencial

DTG - Termogravimetria Derivada

DPPH[•] - 1,1- difenil-2-picril-hidrazila

EAG- Equivalente do ácido gálico

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EOt - Etanol

FRAP- Poder de redução do ferro

HMF - Hidroximetilfurfural

TOLOX - Ácido 6- hidroxil- 2,5,7,8 – tetrametilcroman-2-carboxílico

TG - Termogravimetria

MeOH - Metanol

XAD-2 - Resina Amberlite

TPTZ - 2, 4, 6 – Tri (2-piridil) – 1, 3, 5 - triazina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 ABELHAS	16
2.2 MEL DE ABELHAS	19
2.2.1 Classificação botânica do mel	20
2.2.2 Composição do mel e parâmetros de qualidade	21
2.3 PROPRIEDADES BIOATIVAS DO MEL	24
2.3.1 Atividade Antioxidante	24
2.3.1.1 Compostos fenólicos como antioxidantes	26
2.3.1.2 Métodos para avaliar atividade antioxidante	29
2.3.2 Atividade antimicrobiana	32
3 MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1 LOCAL DE EXECUÇÃO E AMOSTRAGEM	34
3.2 OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES ACETATO DE ETILA E EXTRATOS METANÓLICOS	36
3.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	36
3.4 ANÁLISES MELISSOPALINOLÓGICA	37
3.5 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE FENÓLICOS	38
3.6 TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS	38
3.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	39
3.7.1 Atividade Sequestradora do radical livre DPPH [•]	39
3.7.2 Sequestro do cátion radical ABTS ^{• +}	40
3.7.3 Atividade Antioxidante pelo Sistema β -caroteno/ácido linoléico	41

3.7.4 Sequestro do radical hidroxila (HO [•])	41
3.7.5 Capacidade antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP)	42
3.8 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO MEL	43
3.9 ANÁLISES TÉRMICA	44
3.10 ANÁLISES ESTATÍSTICA	44
REFERÊNCIAS	45
4 RESULTADOS	53
ARTIGO I: Thermal degradation of honeys and evaluation of physicochemical properties	54
ARTIGO II: Phenolic profile and antioxidant activity of stingless bees honey from Amazon (Brazilian State)	60
ARTIGO III: Determination of total phenolic content and evaluation of the antioxidant activity of honeys from Amazon	81
CONCLUSÃO	102
APÊNDICE	104

1 INTRODUÇÃO

O mel é um produto natural, produzido por abelhas, consumido mundialmente e apreciado pelo seu sabor e considerável valor nutritivo. É utilizado como adoçante, na conservação de alimentos e na medicina popular, além de ser empregado nas indústrias de fármacos e cosméticos, pelas suas conhecidas ações terapêuticas. Caracteriza-se pela composição complexa que varia com a origem da matéria prima, espécie de abelha, condições edafoclimáticas, fonte floral disponível e condições de armazenamento (MEDA et al., 2005; KÜÇÜK et al., 2007). É constituído principalmente por glicose e frutose, e pequenas concentrações de aminoácidos, compostos fenólicos, ácidos orgânicos, vitaminas, minerais, lipídios, enzimas e outros fitoquímicos (BALTRUŠAITYTE et al., 2007).

As abelhas produtoras do mel são as melíferas dotadas ou não de ferrão. Produzem mel a partir do néctar das flores ou de secreções de partes vivas das plantas que combinam com substâncias específicas, desidratam e armazenam nos favos ou potes da colmeia até o amadurecimento (CODEX, 2001).

Nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, são encontradas diversas espécies de abelhas sociais nativas produtoras de mel, conhecidas como abelhas indígenas, sem ferrão ou meliponíneos. O Estado do Amazonas possui uma das maiores reservas ambientais do mundo, concentrando aproximadamente 60% de todas as espécies de animais e vegetais do planeta, onde são encontradas aproximadamente 300 espécies de abelhas. Dentre as diversas espécies já identificadas, destaca-se a *Melipona seminigra merrillae*, que é endêmica da Amazônia Central e importante polinizadora da Floresta Amazônica (MOURE et al., 2007).

O crescente interesse pelo mel produzido por abelhas decorre de sua composição diferenciada e de suas propriedades antissépticas, antimicrobianas, anticancerígenas, anti-inflamatórias e cicatrizantes (VIT; TOMÁS-BARBERÁN, 1998; SILVA et al., 2006; MUÑOZ; COPAJA, 2007; SILVA et al. 2012). Centenas de substâncias bioativas já foram identificadas em méis de variadas origens (GHELDOLF; ENGESETH, 2002; BERTONCELJ et al., 2007; ALVAREZ-SUARES et al., 2012). Dentre estas propriedades, a capacidade antioxidante tem merecido atenção especial e está associada principalmente à presença de ácidos fenólicos, flavonóides e das enzimas glicose oxidase e catalase (ALJADI; YUSOFF, 2003). Os compostos fenólicos presentes no mel estão diretamente relacionados aos recursos botânicos como pólen, néctar, resina e óleo fornecidos para as abelhas, fazendo com o que os

méis de diferentes origens florais possam apresentar propriedades bioativas distintas (GHELDOLF; ENGESETH, 2002).

A maioria das pesquisas sobre as propriedades bioativas do mel está associada ao mel da espécie *Apis mellifera*, no entanto, não existe registro na literatura quanto aos compostos bioativos do mel produzidos pelas abelhas da espécie *Melipona seminigra merrillae*, apesar de ser utilizado largamente pelos indígenas locais com fins terapêuticos.

Os padrões de identidade e qualidade para comercialização do mel, regulamentados pelo Ministério da Agricultura e do Abastecimento (MAPA), atendem as características do mel das abelhas *Apis mellifera*. Sendo assim, tornam-se necessárias realizações de pesquisas que auxiliem na definição de padrões que atendam também a qualidade do mel produzido por abelhas sem ferrão. Considerando esses aspectos, o presente estudo traz uma abordagem sobre o mel produzido pela espécie *Melipona seminigra merrillae* coletados em sete municípios do Estado do Amazonas. Espera-se ainda, que este trabalho incentive a criação das abelhas *Melipona seminigra merrillae* e a valorização do mel produzido por estas abelhas, pois as mesmas contribuem para a revitalização da floresta e para o equilíbrio ambiental da Região Amazônica.

1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as propriedades bioativas de méis produzidos por abelhas sem ferrão da espécie *Melipona seminigra merillae*, nativas do Estado do Amazonas.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Determinar a fonte floral das amostras de mel através do estudo melissopalinológico;
- ✓ Determinar as características físico-químicas das amostras de mel;

- ✓ Quantificar o teor de fenólicos totais das amostras de mel, dos seus extratos metanólicos e das frações acetato de etila;
- ✓ Avaliar o potencial antioxidante das amostras de mel, dos seus extratos metanólicos e das frações acetato de etila;
- ✓ Identificar e quantificar os principais compostos fenólicos das frações acetato de etila das amostras de mel;
- ✓ Avaliar o perfil térmico das amostras de mel;
- ✓ Determinar a atividade antimicrobiana das frações acetato de etila das amostras de mel.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ABELHAS

A abelha é um inseto que pertence à ordem dos Hyimenópteros e à família dos Apideos ou Apidae. Das milhares de espécies existentes, são conhecidas cerca de vinte mil, mas acredita-se que existam aproximadamente quarenta mil espécies não identificadas. São descendentes das vespas e durante o processo de evolução, substituíram os insetos da sua alimentação por pólen das plantas (PEREIRA et al., 2002).

Por serem alados, esses insetos se movem de uma flor para outra com extrema agilidade. Além disso, as abelhas possuem pilosidade abundante e corbículas que lhes permitem carregar grandes quantidades de pólen (PESSON; LOUVEAUX, 1984).

As abelhas vivem em sociedade, são extremamente organizadas e produtivas. Além de produtoras de mel são também os principais agentes polinizadores de diversas espécies de plantas, aumentando a produção de frutos e sementes, contribuindo assim para o equilíbrio das populações que vivem em ecossistemas naturais (KERR et al., 2001).

A família Apidae, possui duas subfamílias: A Meliponinae, sem ferrão e a Apinae, com ferrão. A primeira, é também denominada de abelhas indígenas, possuem três tribos: *Lestrimellitini*, *Trigonini* e *Meliponini*. Vivem em regiões subtropicais e tropicais e são encontradas nas Américas do Sul e Central, na Ásia, nas Ilhas do Pacífico, na Austrália, em Nova Guiné e na África. Já a subfamília Apinae se apresenta com os gêneros *Apis* e *Bombu*, onde o gênero *Apis* tem quatro espécies, entre elas a *Apis mellifera*, a mais conhecida no mundo (MICHENER, 2007).

As abelhas brasileiras ou indígenas conhecidas como meliponíneos eram as únicas produtoras de mel e cera utilizada na confecção de velas, assim como as principais polinizadoras da flora nativa até 1838. Após este período, ocorreu a introdução da espécie *Apis mellifera* pelos portugueses e hoje está presente em todo o Brasil, porém, sua presença é nitidamente menos intensa em ambientes bem preservados e em florestas úmidas fechadas, como na Amazônia (OLIVEIRA; CUNHA, 2005).

Os povos indígenas foram os primeiros a cultivar as abelhas sem ferrão desde o período pré-colombiano. Estas abelhas, além do mel, produzem também a própolis e o geoprópolis. A própolis é formada a partir de materiais resinosos das plantas e de ceras de

origens diversas. O geoprópolis apresenta composição similar a da própolis, acrescida de barro e terra (ALVES, 2005). Os índios Kaiapós conhecedores das espécies de flores medicinais, consumiam méis de boa qualidade produzidos a partir do néctar dessas plantas (NOGUEIRA-NETO, 1997).

Os meliponíneos ocorrem em todo Brasil, mas a grande maioria vive na Amazônia, onde muitas espécies e subespécies ainda não foram identificadas. A *Melipona seminigra merrillae* Figura 1, conhecida como jandaíra-da-amazônia ou uruçú-boca-de-renda e a *Melipona interrupta manaosensis*, comumente chamada jandaira-preta-da-Amazônia ou jupará são espécies encontradas em abundância em toda a Amazônia Central (KERR et al., 2001; MOURE et al., 2007; MICHENER, 2007).

Figura 1 – Abelha *Melipona seminigra merrillae*



Fonte: Discoverlife (2013)

Todas as espécies de meliponíneos vivem em colônias ou ninhos constituídos de fêmeas operárias e a rainha. A quantidade de operárias depende da espécie, podendo ser centenas ou milhares e têm como função a manutenção da estrutura física da colônia, a coleta e processamento dos alimentos. A rainha é responsável pela postura de ovos e em algumas espécies podem ser encontradas até cinco rainhas na colônia. Em certas épocas do ano, os machos são produzidos em grande quantidade e podem realizar, esporadicamente, algumas tarefas dentro da colônia, além de fecundar as rainhas durante o voo nupcial. Após o término do desenvolvimento, a abelha emerge, saindo da célula de cria, e em seguida os machos são expulsos das colônias denominadas de meliponários (MICHENER, 2007).

As meliponas são vulneráveis a ação destruidora do homem, no momento da coleta do mel nos ninhos e na ocasião da exploração da madeira. O desmatamento, as queimadas e o não cumprimento da legislação ambiental vêm contribuindo para dizimar a população de abelhas nativas, pois a grande maioria das abelhas sem ferrão constrói seus ninhos em ocos de árvores. A ausência dessas abelhas acelera a extinção de espécies vegetais importantes no ecossistema e promovem um ciclo de desequilíbrio ecológico entre as espécies (CAMARGO; PEDRO, 1992; KERR et al., 1996).

Na Amazônia, 60 % das árvores são bissexuais e dependem de polinizadores para a sua reprodução (KERR et al., 2001; MOURE et al., 2007). Várias espécies de abelhas meliponas são utilizadas em programas de polinização de plantas da Amazônia, tais como: cupuaçu *Theobroma grandiflorum* Schum (cupuaçu), *Bixa orellana* L. (urucum), *Euterpea oleracea* Mart (açaí) e *Paullinia cupana* Kunth (guaraná) (CASTRO et al., 2006)

O crescente interesse pelo mel produzido por abelhas sem ferrão decorre das características de sua composição, as quais têm sido associadas às propriedades antissépticas, antimicrobianas, anticancerígenas, anti-inflamatórias e cicatrizantes (VIT; TOMÁS-BARBERÁN, 1998; SILVA et al., 2006; MUÑOZ; COPAJA, 2007; SILVA et al., 2012). Embora produzam mel em menor quantidade, os meliponíneos são importantes por fornecerem um produto de qualidade diferenciada do mel da *Apis mellifera*, principalmente na doçura inigualável, no sabor peculiar e por ser mais aromático. Tais características proporcionam aos méis das abelhas nativas preços mais elevados (ALVES, 2005).

2.2 MEL DE ABELHAS

Considerado como o produto apícola mais fácil de ser explorado, o mel vem sendo também o mais conhecido e com maiores possibilidades de comercialização. Além de ser um alimento, é também utilizado em indústrias farmacêuticas e cosméticas, pelas suas conhecidas ações terapêuticas (FREITAS et al., 2008).

O mel é produzido pelas abelhas a partir do néctar das flores e de secreções provenientes de partes vivas de certas plantas ou de secreções de insetos sugadores de plantas. De acordo com Kerr et al. (1996), a abelha melipona coleta o néctar através da sua língua sugadora e envia para o papo de mel ou estômago de néctar, onde permanece até chegar à colmeia. O néctar coletado é entregue às abelhas operárias que o armazenam em potes de mel (Figura 2).

Figura 2 - Operárias de *Melipona seminigra merrillae* alimentando-se nos potes de mel



Fonte: Barbosa- Costa (2007)

Para formação do mel, ocorrem duas modificações no néctar. A primeira é física, que corresponde à desidratação, onde a água contida no néctar sofre evaporação, resultando na concentração aproximada de 70% de açúcar. A segunda modificação é uma reação química, onde há conversão enzimática da sacarose, por meio da enzima invertase, em glicose e frutose. Em menor escala, ocorrem mais duas reações químicas: a transformação do amido em maltose pela ação da enzima amilase e a conversão da glicose em ácido glucônico, através da enzima glicose-oxidase (AZEREDO et al., 2003).

2.2.1 Classificação botânica do mel

Quanto à origem botânica, o mel pode ser classificado em mel de flores e melato. Os méis florais se subdividem em dois tipos: uniflorais ou monoflorais quando produzidos a partir do néctar de uma única espécie floral, como por exemplo, o mel de eucalipto e de laranjeira e os multiflorais, poliflorais ou heteroflorais quando produzidos a partir do néctar coletado de diversas flores, como por exemplo, o mel silvestre. Os méis de melatos são obtidos a partir de secreções das partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas encontradas sobre elas (CODEX, 2001).

Os méis multiflorais ocorrem com mais frequência, enquanto que os méis monoflorais são mais raros, pois apresentam aromas altamente característicos, indicando a origem do néctar. Segundo Léon-ruiz et al. (2011), há um crescente interesse por méis monoflorais devido as suas propriedades terapêuticas.

A identificação das plantas visitadas pelas abelhas é de fundamental importância para indicar aos apicultores as fontes adequadas de alimento, utilizadas para a coleta de néctar e pólen pelas abelhas. A análise polínica do mel tem como objetivo identificar a sua origem botânica, e em alguns casos, a sua origem geográfica, pois o mel nunca tem origem apenas de uma única fonte floral. Geralmente, o mel para ser considerado monofloral tem que possuir pelo menos 45% do pólen de uma fonte floral (ANKLAN, 1998).

2.2.2 Composição do mel e parâmetros de qualidade

O mel é constituído principalmente por açúcares e água. A glicose e a frutose estão presentes em maior quantidade, mas também podem ser encontrados dissacarídeos como sacarose e açúcares mais complexos. Substâncias voláteis, responsáveis pelo seu *flavor*, constituintes fenólicos, vitaminas e enzimas são encontrados em menores proporções (OLAITAN et al., 2007; FINOLA et al., 2007; FREITAS et al., 2008; CASTRO-VAZQUEZ et al., 2009).

Os açúcares são constituintes determinantes de algumas características físico-químicas do mel como viscosidade, higroscopicidade, granulação e pelo alto valor energético do mel (OUCHEMOUKH et al., 2010). Um elevado percentual de glicose, juntamente com alguns fatores como: agitação, quantidades de grãos de pólen, transporte e armazenamento podem favorecer a granulação do mel e induzir a formação de precipitados, assim como podem causar o aumento da acidez do mel devido à ação da enzima glucose-oxidase. (MOREIRA; DE MARIA, 2001), mas a acidez do mel também pode ser influenciada pela origem floral, devido à presença de ácidos orgânicos, particularmente ácido glucônico, pirúvico, málico e cítrico (ANKLAM, 1998). A sacarose revela dados fundamentais sobre o mel, pois níveis acima de 6% podem indicar coleta prematura e ou possível indício de adulteração do mel (SODRÉ et al., 2007; KUCUK et al., 2007).

Com relação à água, segundo componente majoritário do mel, sua presença está relacionada a fatores como época de colheita, grau de maturação alcançado na colmeia e fatores climáticos. Este parâmetro pode influenciar uma das propriedades físicas do mel, a viscosidade. De acordo com o Regulamento Técnico, estabelecidos pela Instrução Normativa nº 11 de 20 de outubro de 2000 (BRASIL, 2000), o limite máximo de água no mel de flores é 20%. A presença de água em excesso pode comprometer a estabilidade do mel, favorecendo assim a fermentação e granulação durante o armazenamento e com isso prejudicar sua conservação (OLAITAN et al., 2007; KÜÇÜK et al., 2007). Essa fermentação tem como consequência a produção de álcool etílico e dióxido de carbono, ocasionando a oxidação do álcool formado em ácido acético, que confere um gosto amargo no mel (SAXENA; GAUTAM; SHARMA, 2010).

De acordo com Lachman et al. (2007), os méis possuem uma variedade de micronutrientes e a quantidade absoluta destes varia entre 0,02 a 1,0%. Dentre os minerais contidos, o potássio é o mais expressivo, presente na proporção de um terço do conteúdo total

de minerais. Além disso, esse alimento contém outros minerais e elementos traços como: cálcio, magnésio, sódio, cobre, ferro, manganês, enxofre, cromo, chumbo, zinco, cádmio, níquel, fósforo e nitrogênio (BOGDANOV et al., 2007), sendo o teor de nitrogênio associado às enzimas originárias das secreções salivares das abelhas (OLAITAN et al., 2007).

A cor do mel pode variar desde branco-pálido até marrom-escuro, sendo resultante de uma combinação de diversos fatores, como o conteúdo de carotenóides e flavonóides, conteúdo de minerais, presença de contaminantes específicos decorrentes da manipulação, processamento e estocagem. Assim como, também, a ocorrência de reações químicas durante a maturação e armazenamento do mel, exemplo: as reações de Maillard (ALVAREZ-SUAREZ et al., 2011; ALMEIDA-SILVA et al., 2011).

O hidroximetilfurfural (HMF) presente no mel é um composto químico formado pela reação dos açúcares com ácidos. Esse processo é acelerado com o aumento da temperatura, por isso o HMF passou a ser usado como indicador de aquecimento e processamento inadequado servindo como indicador de qualidade para o mel, pois quanto mais elevado for o teor hidroximetilfurfural menor será o valor nutricional do mel em razão da destruição, por meio de aquecimento de determinadas vitaminas e enzimas.

A qualidade do mel é determinada pelas suas propriedades sensoriais, físicas e químicas, avaliadas através de parâmetros estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) através da Instrução Normativa Nº11, de 20 de outubro de 2000 (BRASIL, 2000). Essa regulamentação estabelece parâmetros relacionados à maturidade, pureza e deterioração do mel incluindo valores de pH, teores de umidade, açúcares redutores, sacarose, materiais insolúveis na água, minerais, cinzas, hidroximetilfurfural, condutividade elétrica, acidez e índice diastásico, conforme Quadro 1. Segundo Azeredo et al. (2003), essas propriedades dependem da fonte floral, do néctar, do pólen, da cor, do aroma, da umidade e do conteúdo em proteínas e açúcares presente no mel.

Quadro 1- Parâmetros físico-químicos para o mel, estabelecidos pela Instrução Normativa nº 11 de 20 de outubro de 2000 (BRASIL, 2000) e Parâmetros físico-químico do mel de meliponíneos (HOLANDA et al., 2012; SILVA et al., 2012).

Parâmetros	Valores estabelecidos pela Instrução Normativa para méis florais	Parâmetros físico-químico do mel de meliponíneos
Açúcares Redutores	Mínimo 65%	57,67%
Umidade	Máximo 20%	23,80%
Sacarose Aparente	Máximo 6%	2,65%
Sólidos Insolúveis em água	Máximo 0,1%	0,02%
Minerais (Cinzas)	Máximo 0,6%	0,06%
Nitrogênio	-	0,19%
Acidez	Máximo 50 meq. kg ⁻¹	41,57 meq. kg ⁻¹
Hidroximetilfurfural	Máximo 60 meq. kg ⁻¹	13,67 meq. kg ⁻¹
Atividade Diastásica	Mínimo 8 na escala Gothe	1,43 escala Gothe

O mel é um produto natural que apresenta uma flora microbiótica própria. Nesta pode ser encontradas cepas de leveduras e bactérias formadoras de esporos, podendo ser encontrados ainda microrganismos relacionados a fatores sanitários como os coliformes e as leveduras (SNOWDON; CLIVER, 1996).

Os bolores, as leveduras e as bactérias na forma esporulada são os principais microrganismos encontrados em mel. Os bolores pertencentes aos gêneros *Penicillium*, *Mucor* e *Aspergillus* podem apenas sobreviver, mas não se reproduzem no mel, por isso contagens elevadas de cepas de *Bettsya alvei*, *Ascosphaera apis* e *Ascosphaera major* podem indicar uma contaminação recente pelo ambiente da coleta, da colmeia ou do processamento (SNOWDON; CLIVER, 1996; FINOLA et al., 2007).

Vários gêneros de leveduras já foram encontrados em mel, no entanto as pertencentes ao gênero *Saccharomyces spp* são as mais presentes. As leveduras podem crescer em condições de pH baixo, utilizam os açúcares do mel, produzindo ácido, gás e outros produtos. Por esse motivo, os méis com uma contagem elevada de leveduras, devido à ocorrência de fermentações, não devem ser comercializados (SNOWDON; CLIVER, 1996).

As formas vegetativas de bactérias patogênicas ainda não foram detectadas no mel, e como as bactérias não se reproduzem no mel, uma contagem elevada de bactérias vegetativas é indicadora de uma contaminação recente. Os esporos bacterianos, particularmente os pertencentes aos gêneros *Bacillus* e *Clostridium* são comuns em méis (FINOLA et al., 2007). Desta forma, o consumo de mel contaminado com *C. botulinum* é especialmente perigoso para crianças, sendo a causa do botulismo infantil.

2.3 PROPRIEDADES BIOATIVAS DO MEL

O mel tem sido utilizado com fins terapêuticos desde o início da humanidade, uma vez que contém uma variedade de substâncias com propriedades funcionais. As substâncias específicas das próprias abelhas e a fonte floral (pólen, néctar, resina e óleo) influenciam as propriedades bioativas do mel, principalmente a partir dos compostos secundários do néctar. (BASUALDO et al., 2007; KÜÇÜK et al., 2007).

2.3.1 Atividade Antioxidante

Todos os seres vivos que em seu metabolismo utilizam o oxigênio para geração de energia liberam radicais livres no organismo. Para Pietta (2000), a oxidação é um processo essencial para a vida, faz parte da produção de energia na mitocôndria, organela que produz toda a energia necessária para atividade celular.

A produção exacerbada de substâncias altamente reativas denominadas de ERMOS (Espécies Reativas do Metabolismo do Oxigênio) quando não neutralizadas, podem ser altamente nocivas aos organismos vivos. O excesso das ERMOS produzidas *in vivo* é prejudicial às proteínas, ao DNA, ao lipídeos e a outras moléculas, tendo um papel crucial na patogênese de diversas doenças como câncer, doenças hepáticas, neurodegenerativas, pulmonares e artrite reumatóide. Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das ERMOS, porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares. Conseqüentemente, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de

organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos (como o malonaldeído), culminando com a morte celular (HALLIWELL, 1995).

O superóxido ($O_2^{\bullet-}$), a peroxila ($ROO^{\bullet}$), a alcooxila ($RO^{\bullet}$), a hidroxila ($HO^{\bullet}$) e o óxido nítrico ($NO^{\bullet}$) são exemplos de ERMOS. Desses, os radicais hidroxila e alcooxila são os mais reativos e rapidamente atacam moléculas em células próximas (RECI-EVANS et al., 1995). Para combater o excesso de radicais livres os organismos vivos produzem substâncias que são capazes de regenerar ou prevenir os danos oxidativos, exercendo seu papel como antioxidante. Estas substâncias com habilidade de sequestrar radicais livres também podem ser obtidas por fonte externas como alimentos e bebidas.

Os antioxidantes podem neutralizar as ERMOS, prevenindo o início ou a propagação das oxidações (HALLIWELL, 1995). Estes representam uma classe de substâncias químicas com estruturas variadas e são classificados de acordo com o seu mecanismo de ação em primários e secundários. Os antioxidantes primários agem inibindo a ação dos radicais livres, convertendo-os em produtos estáveis pela doação de hidrogênio ou elétrons. A sua eficiência é determinada pela presença de grupos hidroxila, pelo tamanho dos substituintes e pela posição destes grupos no anel aromático. Estes fatores influenciam nas formas de ressonância que estabilizam o radical fenóxido formado (CARPES et al., 2008). São exemplos os compostos fenólicos polihidroxilados, os ésteres de ácido gálico, os flavonóides e os fenóis com impedimento estrutural. O fenol é inativo como antioxidante, porém os compostos *orto* e *para*-difenílicos possuem atividade antioxidante, a qual é aumentada com a substituição de seus átomos de hidrogênio por grupos etila ou butila. Os ácidos cinâmicos são mais efetivos que os ácidos benzóicos (SÁNCHEZ-MORENO, 2002).

Os antioxidantes secundários por sua vez atuam retardando o início da auto-oxidação inativando agentes pró-oxidantes, como por exemplo, através da formação de complexo com metais, sequestro do oxigênio livre, decomposição de hidroperóxido em espécies não radicalares, absorção da radiação ultravioleta e desativação do oxigênio singleto. Agem também como sinergista regenerando antioxidantes primários (MORAES et al., 2006). São exemplo desta classe de antioxidantes o ácido cítrico e o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA).

Com relação à origem os antioxidantes podem ser classificados em naturais e sintéticos. Na indústria de alimentos, os sintéticos são mais utilizados, entretanto com fortes restrições, pois existem relatos que associam a ingestão destes com a incidência de tumores no organismo. Estudos em ratos comprovam o desenvolvimento de algum tipo de câncer, como os da mama, próstata e estômago (WURTZEN, 1990). Muitos estudos têm sido realizados

com substâncias naturais, com o intuito de utilizá-las como fontes de antioxidantes potencialmente seguros em substituição aos sintéticos. Estes estudos apontaram que estas substâncias podem ter um custo de obtenção mais baixo e uma alta eficiência em relação aos antioxidantes que são empregados na indústria de alimentos (MOURE et al., 2001).

Os vegetais são fontes importantes de uma ampla variedade de fitoquímicos, com propriedades antioxidantes tais como: compostos fenólicos, ácido ascórbico e carotenóides, que são transferidos ao mel através do néctar das flores e agem por diferentes mecanismos, conferindo um sistema de defesa efetivo contra o ataque de radicais livres no organismo.

2.3.1.1 Compostos fenólicos como antioxidantes

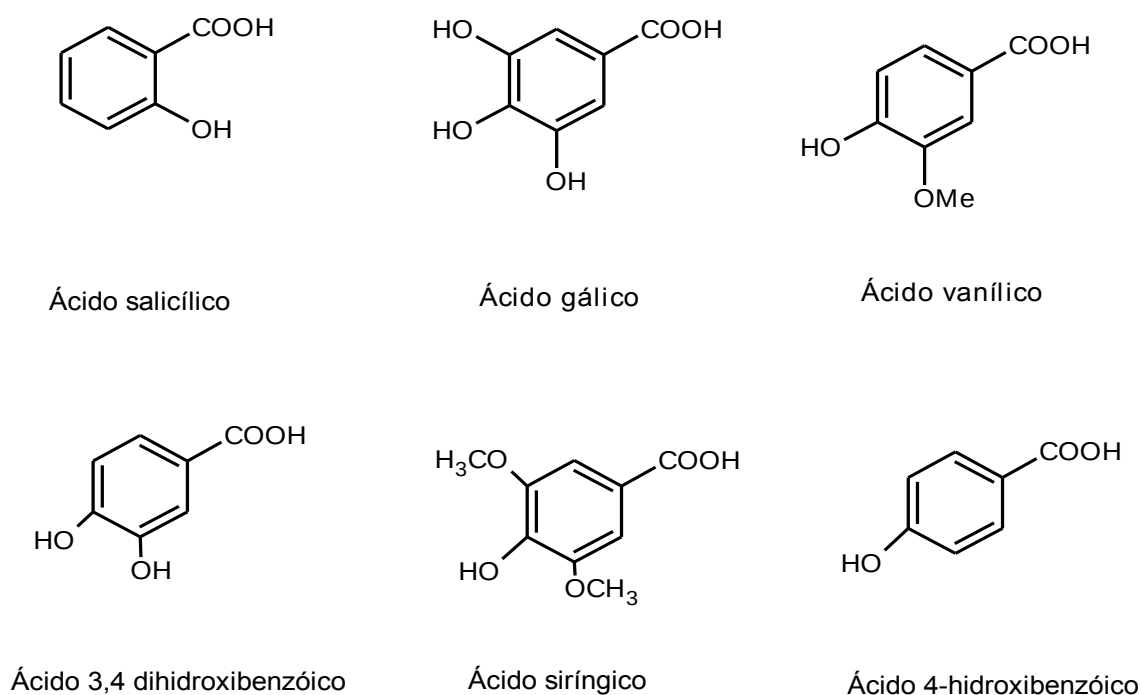
Os compostos fenólicos possuem grande quantidade de propriedades fisiológicas, como antialérgica, antiarteriogênica, anti-inflamatória, antimicrobiana, antitrombótica, cardioprotetora e vasodilatadora, porém, o principal efeito desses compostos tem sido atribuído à sua ação antioxidante em alimentos (SILVA et al., 2006).

Estas substâncias compõem a grande classe de fitoquímicos alimentares e contribuem para as propriedades sensoriais referentes à cor, aroma, adstringência de frutas, mel, bebidas e vegetais. São formadas no metabolismo secundário dos vegetais e possuem funções de defesa contra a radiação UV ou agressão por patógenos (GIADA; MANCINI-FILHO, 2006). São classificadas em dois grandes grupos flavonóides e não flavonóides. Os flavonóides são formados por dois anéis aromáticos unidos por um anel heterocíclico oxigenado. Encontram-se geralmente ligados a açúcares, formando glicosídeos. Os não-flavonóides incluem grupos de compostos mais diversificados, encontrados em grande quantidade e em diversas formas químicas, incluindo os fenóis simples, fenóis ácidos, cumarinas, estilbenos, lignanas e taninos (ANGELO; JORGE, 2007).

A presença de compostos fenólicos em mel confere propriedades antioxidantes que atuam como coadjuvante na prevenção de várias doenças degenerativas causada por radicais livres no organismo como desenvolvimento de câncer, Alzheimer, Parkinson, esclerose múltipla (GHELDOLF; ENGESETH, 2002; ALJADI; KAMARUDDIN, 2004; FINOLA et al., 2007; ALVARZ-SUARES et al., 2012; SILVA et al., 2012). Entretanto, a eficiência destes compostos como antioxidantes depende, em grande parte, de sua estrutura química (SÁNCHEZ-MORENO, 2002).

De acordo com Alvarez-Suárez et al. (2012), além dos flavonóides são encontrados no mel os ácidos benzóicos, cinâmicos e seus ésteres. Pesquisadores de diferentes partes do mundo encontraram em amostra de mel os seguintes ácidos fenólicos: ácidos gálico, *p*-cumárico, os ácidos cafeíco, ferúlico, elágico e clorogênico, sirínico, vanílico, cinâmico e *p*-hidroxibenzoico, ácido fenilacético. Foram identificados também os flavonoides: naringenina, apigenina, miricetina, tricetina, quercetina, hesperatina, luteolina, campeferol, pinocembrina, crisina, pinobanksina, genkvanina e galangina (BANKOVA et al., 1982; AMIOT et al., 1989; FERRERES et al., 1992; SABATIER et al., 1999; TOMÁS-BARBERÁN et al., 1993; ANDRADE et al., 1997; BALTRUŠAITYT et al., 2007; BERTONCELJ et al., 2007; ESTEVINHO et al., 2008). As estruturas químicas de alguns compostos fenólicos presente em mel são mostradas nas Figuras 3, 4 e 5.

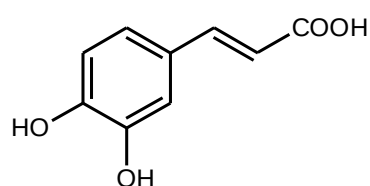
Figura 3 – Estruturas químicas de alguns ácidos benzóicos encontrados em mel



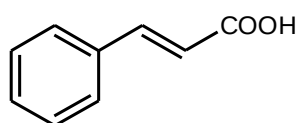
Oliveira et al. (2012) estudando perfil de fenólicos de mel do Estado do Pará obtidos através da extração em cartucho Stracta-X, Phenomenex (SPE) encontrou a quercetina, os ácidos *o*-cumárico, gálico, *m*-cumárico e vanílico. A fração acetato de etila do extrato

metanólico do mel da *Melipona subnitida* obtida no Estado da Paraíba foi avaliado por Silva et al. (2012), onde foram identificados os ácidos 3,4-dihidróxibenzóico, gálico, vanílico além dos isômeros trans-trans-abscísico, cis-trans-abscísico.

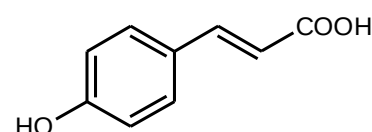
Figura 4 – Estruturas químicas de alguns ácidos cinâmicos encontrados em mel



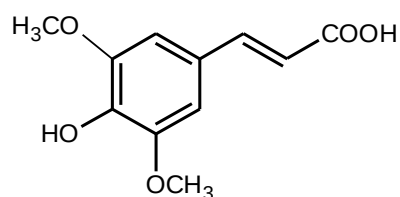
Ácido caféico



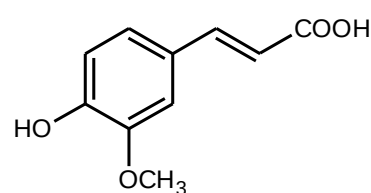
Ácido cinâmico



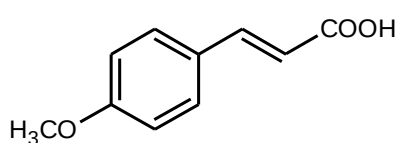
Ácido p-cumárico



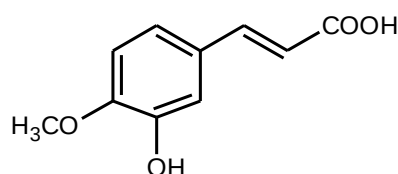
Ácido sinápico



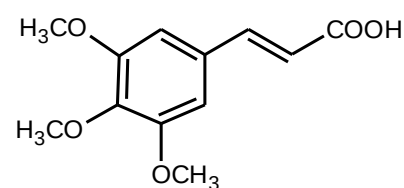
Ácido ferúlico



Ácido 4-metoxicinâmico

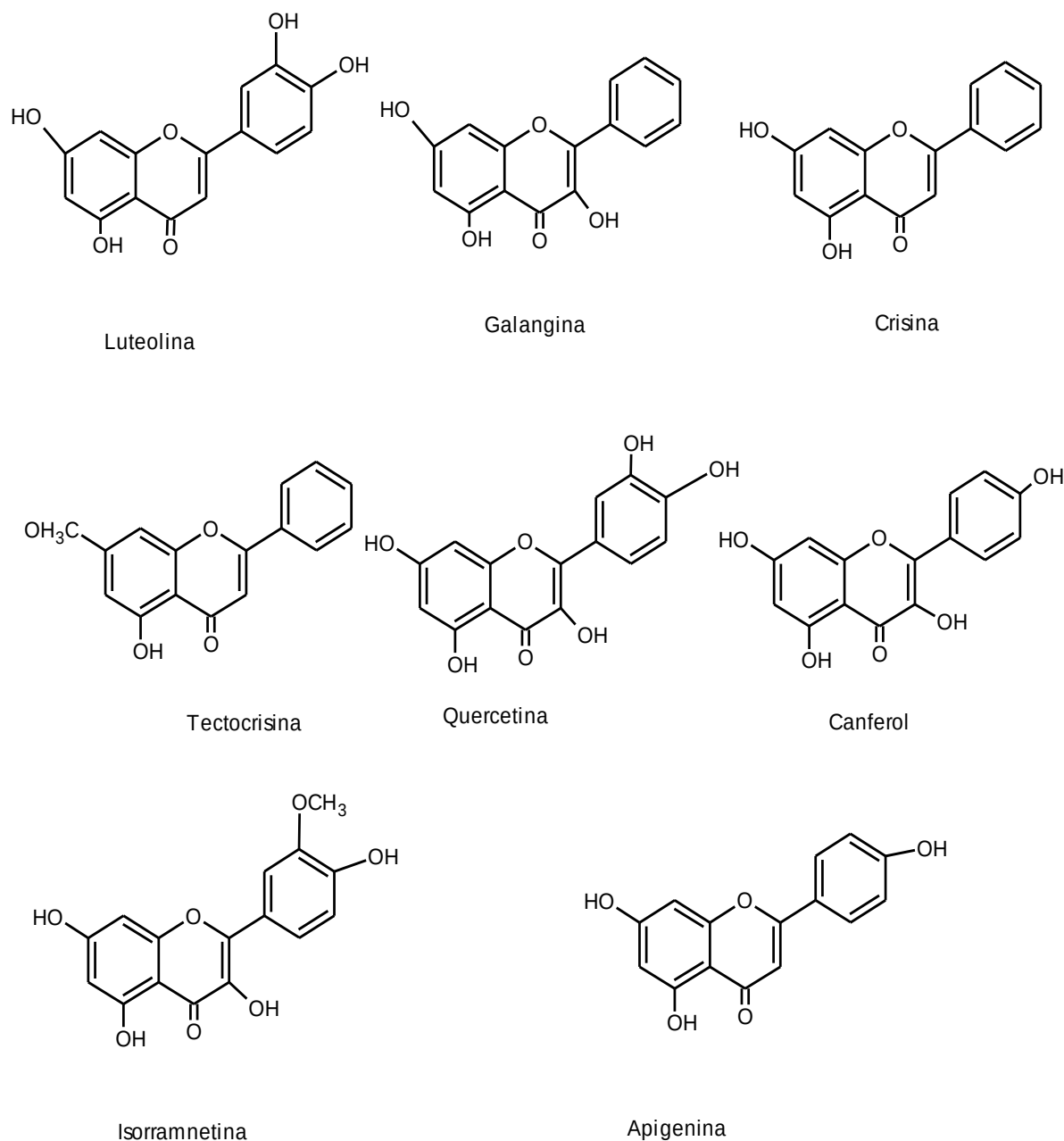


Ácido 3-hidroxi-4-metoxicinâmico



Ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico

Figura 5 – Estruturas químicas de alguns flavonóides encontrados em mel



2.3.1.2 Métodos para avaliar a atividade antioxidante

Os diferentes tipos de radicais livres e as suas diferentes formas de atuação nos organismos vivos têm motivado a investigação de métodos rápidos e eficientes para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de produtos naturais. Considerando a falta de um método

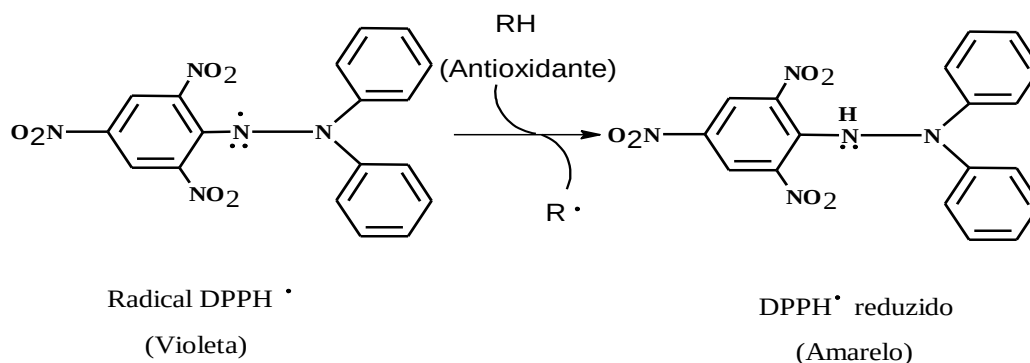
simples e universal, torna-se necessária uma combinação de testes para uma melhor compreensão da atividade antioxidante da substância.

Os testes antioxidantes em alimentos e sistemas biológicos podem ser classificados em dois grupos: os ensaios para avaliar peroxidação lipídica, no qual um lipídio ou substrato lipoproteico, sob condições padrão é usado para medir o grau de inibição da oxidação, e os ensaios usados para mensurar a habilidade de sequestro de radicais livres.

Muitas pesquisas têm se limitado em estudar os componentes do mel e do pólen (POPEK, 2002; KÜÇÜK et al., 2007), e embora estudos sobre a atividade antioxidante dos méis estão sendo desenvolvidas, se faz necessária uma maior avaliação desta atividade (BERTONCELJ; DOBERŠEK; JAMNIK; GOLOB, 2007; BERETTA et al, 2005; BLASSA et al., 2006). Alguns métodos já vêm sendo empregados para avaliar a atividade antioxidante do mel como a captura do hidrogênio pelo radical livre 2,2-difenil -1-picril -hidrazil (DPPH[•]), ou o sequestro do radical 2,2-azinobis (3- etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), redução do ferro Fe³⁺ a Fe²⁺ (FRAP), quimioluminescência baseada nos reagentes da reação de fenton, além do método que inibe a oxidação, através da captura do radical peroxila (ORAC) (GHELDOLF; ENGESETH, 2002; BERETTA et al.,2005; KÜÇÜK et al., 2007).

O método do DPPH[•] é preciso, reprodutível e de fácil execução, sendo bastante utilizado na determinação da atividade antioxidante de extratos vegetais e de substâncias puras (ALVES et al., 2010). O radical DPPH[•] é um cromóforo estável que apresenta um pico de absorção a 520 nm, em solução etanólica, com coloração violeta intensa (ARNAO, 2000, ALVES et al., 2010). Quando na presença de um antioxidante, ocorre redução do radical DPPH[•], levando a formação do DPPH-H reduzido, de coloração amarela, com decréscimo da absorbância a 520 nm (HUANG et al., 2005). Um dos fatores determinante da atividade sequestradora de um antioxidante frente ao radical DPPH[•] é o tamanho da sua molécula, visto que a reação é sensível ao impedimento estérico (ALVES et al., 2010). A figura 6 mostra o mecanismo de redução do radical DPPH[•] frente a uma substância antioxidante.

Figura 6 - Esquema de reação entre o Radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH[•]) e um antioxidante



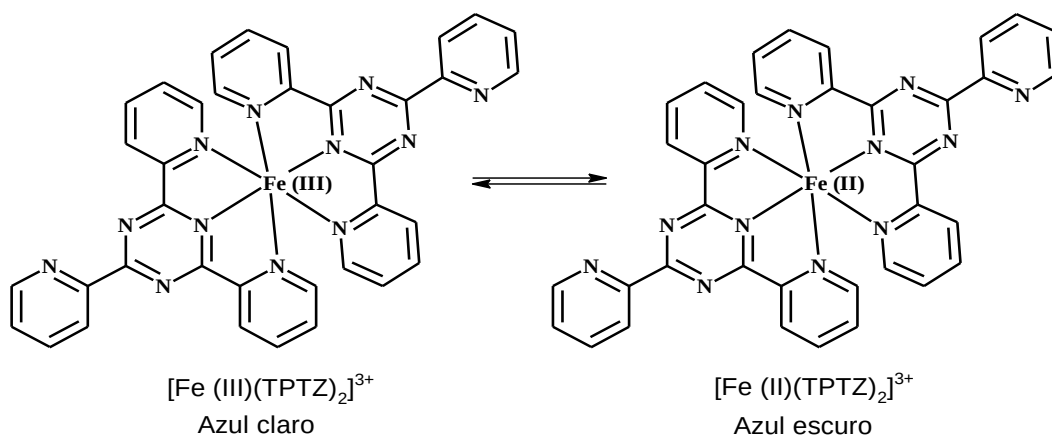
O ensaio do ABTS é um dos métodos mais utilizado para se medir a atividade antioxidante, pois apresenta excelente estabilidade em determinadas condições de análises. É solúvel tanto em água como em solventes orgânicos permitindo análise de amostra hidrossolúveis e lipossolúveis (ARNO, 2000). Baseia-se em monitorar a diminuição da concentração do radical ABTS^{•+} produzido pela oxidação do ácido 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazilina-6-sulfônico) pela adição de uma amostra contendo substância fenólica, (RE et al., 1999). A mudança da coloração do meio reacional é monitorada espectrofotometricamente a 734 nm.

Segundo Von Gadew (1997), o método da co-oxidação utilizando o sistema β -caroteno/ácido linoléico é um teste simples e sensível tem sido amplamente utilizado para avaliar atividade antioxidante tanto de substâncias isoladas como de extratos vegetais e bebidas. Permite avaliar a capacidade de uma substância em prevenir a oxidação do β -caroteno, protegendo os radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoléico, em emulsão aquosa saturada em oxigênio. A adição de uma amostra com poder antioxidante contribui para retardar a queda de absorvância do β -caroteno, que é monitorada a 470 nm em intervalo de 20 em 20 minutos, durante 2 horas (BROINIZE et al., 2007).

FRAP é um método simples, rápido e preciso que foi desenvolvido para medir o poder antioxidante total de fluidos biológicos. Está baseado na capacidade dos fenóis em reduzir o Fe^{3+} a Fe^{2+} . Quando isto ocorre, na presença de 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ), a redução é acompanhada pela formação de um complexo colorido com o Fe^{2+} .

(Figura 7), sendo monitorado por espectrofotometria na região do visível (595 nm) (SURVESWARAN et al., 2007).

Figura 7 – Redução do complexo TPTZ com Fe^{3+}



Um dos métodos específicos para determinar o sequestro do radical hidroxila é o ensaio empregando-se a 2-deoxirribose. Neste ensaio, $\text{HO}^\bullet$ é gerado pela reação do cloreto férrico (FeCl_3) com o ácido etileno-diamino-tetracético (EDTA) na presença de ascorbato, com formação do complexo Ferro(II)-EDTA juntamente com o ascorbato oxidado. Na sequência ocorre a reação deste complexo com peróxido de hidrogênio formando Ferro (III)-EDTA, com liberação do radical $\text{HO}^\bullet$, reação de Fenton. O radical formado pode então reagir com a 2-deoxirribose para formar produtos que, sob aquecimento com ácido tiobarbitúrico em pH ácido, apresentam coloração rosada. A reação é monitorada por espectrofotometria na região do visível (532 nm) (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 1988).

2.3.2 Atividade antimicrobiana

O mel de abelha também tem mostrado resultados promissores no que refere à atividade antibacteriana e facilitador da cicatrização, pois atua como importante barreira viscosa, impedindo a entrada de substâncias e a perda de fluídos para o meio externo. Ainda é utilizado nas aplicações em feridas da pele, infecções da garganta, estômago e queimaduras.

Popularmente, ao mel ainda se atribuem outras propriedades como antianêmica, emoliente, antiputrefante, digestiva, laxativa e diurética (VISAVADIA, 2006).

A atividade antimicrobiana do mel é atribuída a sua elevada osmolaridade, acidez e a presença de substâncias como: peróxido de hidrogênio, compostos voláteis, ácidos orgânicos. O peróxido de hidrogênio é o principal agente antibacteriano. É produzido pela ação da enzima glicose oxidase que tem origem nas glândulas hipofaríngeas das abelhas (OLAITAN et al., 2007).

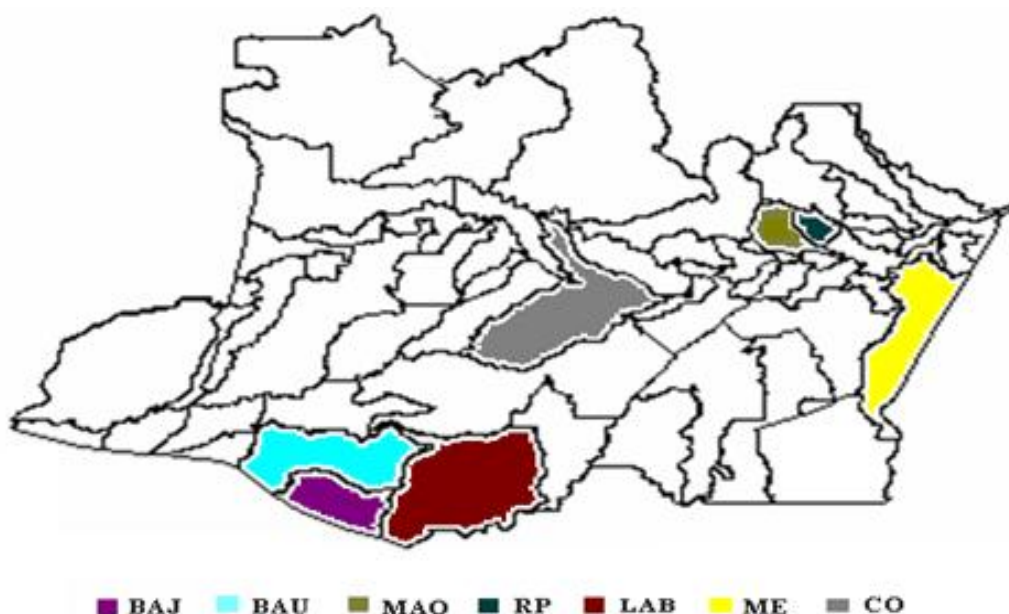
Pesquisas sobre a atividade antimicrobiana (TAORMINA et al., 2001; BASUALDO et al., 2007) utilizando o mel puro foram desenvolvidos por muitos pesquisadores. As bactérias exibiram diferente sensibilidade ao mel. Algumas bactérias como, *Staphylococcus aureus* (ESTEVINHO et al., 2008), *Staphylococcus epidermidis* (BASUALDO et al., 2007), *Bacillus stearothermophilus* (MUNDO et al., 2004) são extremamente sensíveis, enquanto, *Staphylococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* (BASUALDO et al., 2007), *Bacillus cereus* (TAORMINA et al., 2001), *Alcaligenes faecalis*, *Lactobacillus acidophilus* (MUNDO et al., 2004), *Helicobacter pylori*, *Bacillus subtilis* (KÜÇÜK et al., 2007) apenas são moderadamente sensíveis. Por outro lado, o crescimento de *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis* (BASUALDO et al., 2007) e *Pseudomonas aeruginosa* (ESTEVINHO et al., 2008) parece não ser afetada pelo mel. Outros estudos tem mostrado que os compostos fenólicos individuais presente no mel tem inibição no crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (DAVIDSON et al., 2005).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DE EXECUÇÃO E AMOSTRAGEM

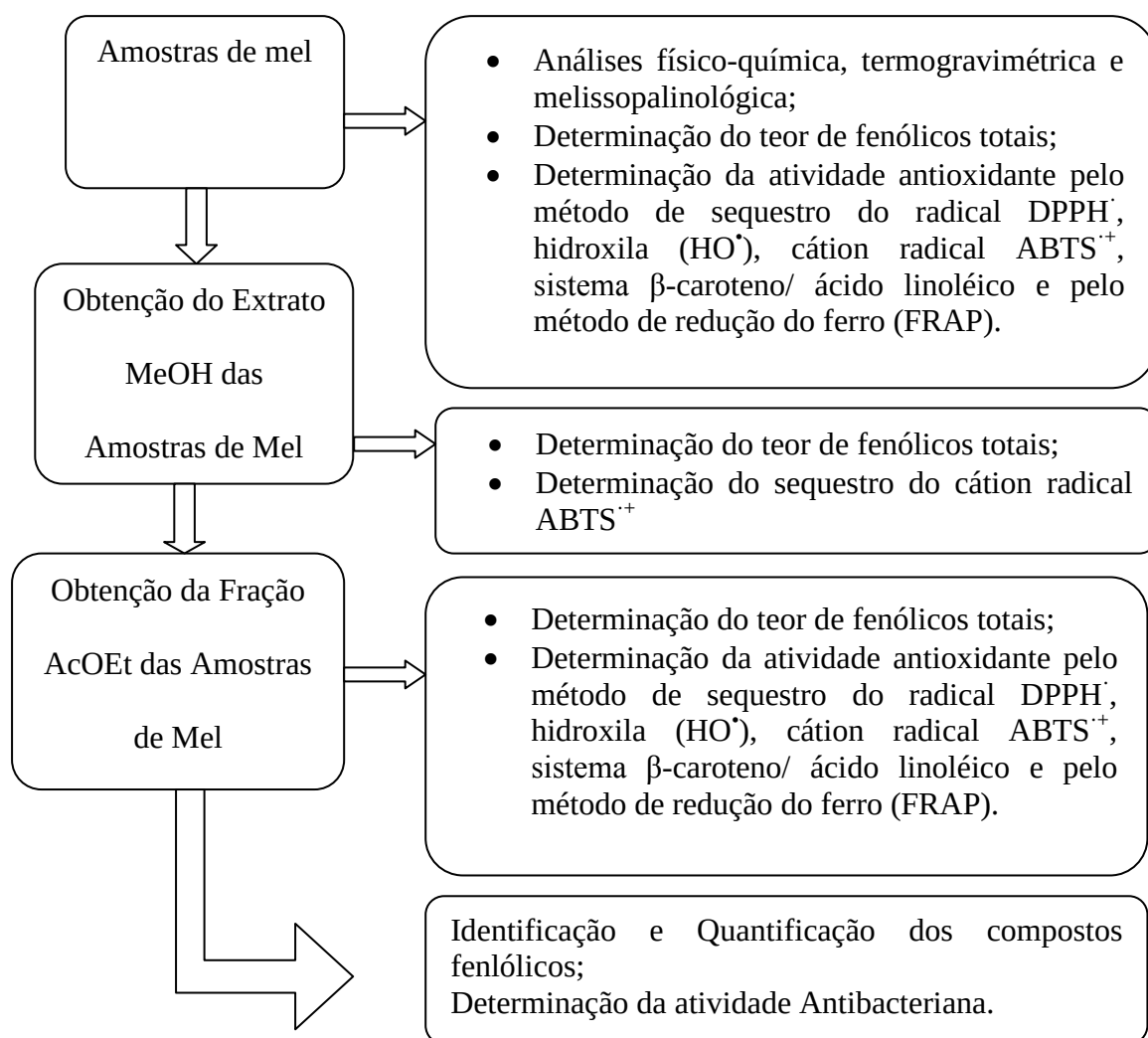
Tendo em vista que o Estado do Amazonas possui a maior área territorial do Brasil e algumas cidades são extremamente isoladas e com baixo índice de densidade demográfica, as amostras de mel da abelha *Melipona seminigra merrillae* foram coletadas em colmeias de meliponários distribuídas em municípios de fácil acesso do Estado do Amazonas, tais como: Manaus (MAO), Boca do Acre (BAJ), Pauini (BAU), Lábrea (LAB), Rio Preto da Eva (RP), Coari (CO) e Maués (ME). Distribuídos conforme a Figura 8. As amostras foram coletadas em 2009 e 2010, no período de chuva, durante o mês de novembro. O mel foi coletado com seringas estéreis de 20 mL, transferido para garrafas de polietileno de 600 mL, e armazenado a 8 °C até a realização das análises.

Figura 8 - Localização geográfica dos municípios do Estado do Amazonas onde foram adquiridas as amostras de mel



Os ensaios das análises melissopalínológicas foram realizados no laboratório de Micromorfologia Vegetal da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS-Bahia). As análises físico-químicas foram determinadas no laboratório Central de Saúde Pública Dra. Telma Lobo (LACEN) do Estado da Paraíba. Os estudos do potencial e da capacidade antioxidante foram feitos na central de apoio a pesquisa (CENAPESQ) da universidade da Universidade Rural de Pernambuco (UFRPE) e as análises termogravimétricas no laboratório de Combustível e Materiais (LACOM) na Universidade Federal da Paraíba (UFPB). O Fluxograma 1, apresenta as etapas das análises realizadas neste estudo.

Fluxograma 1- Etapas de realização das análises



3.2 OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES ACETATO DE ETILA DOS EXTRATOS METANÓLICOS

Com a finalidade de evitar a interferência dos elevados teores de açúcares normalmente presente no mel durante a avaliação da atividade antioxidante e nas análises cromatográficas foram obtidos extratos metanólicos dos méis e a partir destes, frações acetato de etila, de acordo com a metodologia descrita previamente na literatura (ANDRADE et al., 1997; FERRERES et al., 1994). De cada amostra de mel foi preparada uma mistura formada por 50 g de mel, 250 ml de água acidificada (pH 2,0) e 100 g de resina amberlite XAD-2. Esta mistura foi homogeneizada em agitador magnético durante 30 minutos, em seguida foi transferida para uma coluna de vidro (42 x 3.2 cm), lavada com 250 mL de água acidificada (pH 2) e 300 mL de água destilada. A mistura foi eluída com 300 mL de metanol, obtendo-se o extrato metanólico diluído. O solvente foi removido a pressão reduzida para obter o extrato concentrado.

A fração de acetato de etila (EtOAc) de cada extrato metanólico BAJfa, BAUfa, MAOfa, RPfa, LABfa, MEfa e COfa foi obtida partindo-se de 1 g do extrato metanólico adicionado de 5 mL de água destilada e 5 mL de acetato de etila. A mistura resultante foi homogeneizada em banho ultrasônico por 10 minutos. Após este período foi transferida para um funil de separação, a fase superior contendo a fração acetato foi recolhida e concentrada a 40 °C à pressão reduzida.

3.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

As análises físico-químicas foram realizadas em triplicata obedecendo à Instrução Normativa nº 11 de 20 de outubro de 2000 (BRASIL, 2000), seguindo a metodologia da *Association of Official Analytical Chemists- AOAC* (1998). As amostras de mel foram analisadas quanto ao teor de umidade: determinado por refratometria empregando o refratômetro digital modelo DR201-97, da marca Krüss (método 969,38); teor de cinzas: determinando pelo método CAC/ vol. III, suplemento 2. 1990, 7,5; acidez livre: segundo o método 962.19; Hidroximetilfurfural (HMF): analisado por espectroscopia utilizando um UV-vis da Shimadzu, modelo UV-2550, seguindo o método 980.23. As análises de açúcares

redutores foram determinadas conforme o “Codex Alimentarius” (CAC -1990 - item 7.1 e 7.2).

Para obter um melhor controle das carterísticas físico-química as amostras de mel foram analisadas quanto à atividade de água (A_w): determinada utilizando o medidor AQUALAB (modelo CX-2), após equilíbrio da amostra com o ambiente e na temperatura média de 25 °C; teor de proteínas: encontrou-se o teor de nitrogênio total pelo método de Kjeldahl, utilizando o fator 6,25 para o cálculo de proteína total (método 920.152); pH: determinado através do método 962.18, utilizando um pH digital de bancada da Instrutemp, modelo ITPH-2300.

3.4 ANÁLISES MELISSOPALINOLÓGICA

Para cada amostra de mel, 10 gramas foram submetidos ao método da acetólise com anidrido acético e ácido sulfúrico (9:1) em sucessivas centrifugações. (SILVA et al., 2012). Após o processo acetolítico, foram preparadas lâminas contendo gelatina glicerina para montagem dos grãos de pólen, os quais foram posteriormente observados e identificados através de microscopia óptica. As classes de frequência foram estabelecidas a partir da contagem de pelo menos 300 grãos de pólen por amostra de mel (LOUVEAUX; ABED, 1984).

A classificação foi baseada nos seguintes critérios: pólen dominante (PD, >45%), pólen acessório (PA, 16 - 45%), pólen isolado importante (PII, 3 - 15%) e pólen isolado ocasional (PIO, <3%). A identificação dos tipos polínicos encontrados em cada amostras foi baseada em catálogos polínicos (ROUBIK; MORENO, 1990; CARREIRA et al., 1996) e comparação com laminários das palinotecas da Universidade Federal do Oeste do Pará (PUFOPA) e da Universidade Estadual de Feira de Santana (PUEFS).

3.5 DETERMINAÇÃO DO PERFIL FENÓLICO EMPREGANDO A CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

O trabalho foi conduzido em cromatógrafo líquido de alta eficiência da Shimadzu, equipado com injetor automático Rheodyne 7125i com um loop de 20 μL . O sistema de detecção utilizado foi detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD). A análise foi conduzida utilizando uma coluna Shimadzu LC-18 (25 cm x 4,6 mm da Supelco, Bellefonte, USA) e a Rexchrom LC-18 (15 cm x 4,6 mm Supelco, Bellefonte, USA) e pré-coluna C-18 ODS SHIMADZU. Para filtração das amostras e solvente foram usados cartuchos com membrana Millipore com poros de 0,45 μm de diâmetro (SUPELCO, USA).

Na análise dos ácidos fenólicos foi utilizado o seguinte sistema de eluição: Ácido fórmico (5%, solvente A) e MeOH (solvente B) nos seguintes gradientes: (0.01-15 min 20 - 30 % de B), (15-20 min 30% de B), (20-30 min 30-40% de B), (40-50 min de 100% de B) com fluxo de 1,0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Para o monitoramento foram utilizados os comprimentos de onda de 254 e 290 nm.

Para a determinação dos flavonóides foi utilizado o seguinte sistema de eluição: Ácido fórmico 1% (solvente A) e MeOH (solvente B) como fase móvel e gradientes de (0.01-3 min. 40% de B), (5-15 min 45% de B), (17-25 min 50% de B), (27-35 min 55% de B) e (40 min 40% de B). Para o monitoramento foi utilizado o comprimento de onda de 320 nm. O fluxo da fase móvel foi de 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e a temperatura do forno da coluna foi fixada em 35 °C. A identificação dos compostos fenólicos foi baseada nos tempos de retenção e na comparação cromatográfica dos espectros de UV-vis de marcadores autênticos (Silva et al., 2012).

3.6 TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS

A determinação do teor de fenólicos totais presentes nas amostras de méis e nas frações AcOEt foi realizada pelo método colorimétrico Folin-Ciocalteu (SLINKARD; SINGLETON, 1977; GULCIN et al., 2004) com modificações. Inicialmente, uma alíquota de 300 μL do mel (100 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em MeOH e água 1:1) e da fração acetato (1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em MeOH) foi transferida para um tubo de ensaio, adicionado 60 μL do reagente de Folin-Ciocalteu e 2,460 μL de água destilada. A mistura foi agitada durante 1 min. Em seguida,

180 μL da solução de Na_2CO_3 (15%) foram acrescentados a mistura e agitados por 30 segundos, resultando na concentração final de 10 mg.mL^{-1} para o mel e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para a fração acetato. Após repousar por 2h na ausência da luz, a absorbância das amostras foi lida em um espectrofotômetro UV-vis da Shimadzu, modelo UV-2550 a 760 nm. As análises foram realizadas em triplicata. O teor de fenólicos totais (FT) foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico (1 a $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em EtOH) e expresso como miligramas equivalente do ácido gálico por grama de mel puro e miligramas equivalente do ácido gálico por grama de fração acetato.

3.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

3.7.1 Atividade sequestradora do radical livre DPPH[•]

O ensaio DPPH foi realizado seguindo a metodologia descrita por Brand-Williams et al. (1995) com pequenas modificações. Cada solução estoque da fração acetato foi preparada na concentração de $2,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ em MeOH. Alíquotas de 2,7 mL da solução de DPPH[•] ($23,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em EtOH) foram adicionadas às amostras afim de obter concentrações finais com variação de 10 a $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

As medidas da absorbância de cada concentração foram feitas em triplicatas. Após 30 minutos de agitação em aparelho de ultrassom, a quantidade de radicais DPPH foi registrada em espectrofotômetro UV-vis da Shimadzu, modelo UV-2550 em comprimento de onda de 517 nm. Como controle positivo foi empregado o ácido ascórbico. A percentagem de atividade sequestradora (% AS) foi calculada pela equação 1:

$$\%AS = 100 \times \left(\frac{A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}} \right) \quad (1)$$

Onde A_{controle} é a absorbância do controle, contendo apenas a solução etanólica do radical DPPH, e A_{amostra} é a absorbância do radical na presença da amostra. Os resultados

foram expressos através da $CE_{50} \pm D.P.$, que representa a concentração da amostra necessária para obter metade da atividade sequestradora dos radicais DPPH.

3.7.2 Sequestro do cátion radical ABTS^{•+}

O ensaio ABTS foi realizado seguindo a metodologia descrita por Re et al. (1999). O cátion radical ABTS^{•+} foi preparado pela reação de 7 mM de solução de ABTS com uma solução de 2,45 mM de persulfato de potássio. O produto reacional contendo o cátion radical permaneceu em repouso e na ausência de luz, à temperatura de aproximadamente 23 °C durante 16 h. Após este período o ABTS^{•+} foi diluído com etanol até uma absorbância (A) de 0,7 no comprimento de onda de 734 nm, em um UV-Visível.

As soluções estoques para a realização do ensaio foram de 100 mg.mL⁻¹ (em MeOH e água 1:1) para os méis e 2,0 mg.mL⁻¹ em MeOH para as frações acetato de etila. Aliquotas de 2,7 mL da solução recém preparada de ABTS^{•+} foram adicionados às amostras a fim de obter concentrações finais que variaram de 5 a 30 mg.mL⁻¹ para os méis e 10 a 200 µg.mL⁻¹ para as frações acetato. As soluções foram agitadas e, após 10 minutos, a absorbância das amostras e do controle foram medidas em um espectrofotômetro UV-vis da Shimadzu, modelo UV-2550 em comprimento de onda de 734 nm. A percentagem de atividade sequestradora (% AS) foi calculada pela equação 2:

$$\%AS = 100 \times \left(\frac{A_{controle} - A_{amostra}}{A_{controle}} \right) \quad (2)$$

Onde $A_{controle}$ é a absorbância do controle, contendo apenas a solução alcoólica do radical ABTS^{•+}, e $A_{amostra}$ é a absorbância do radical na presença da amostra. Os resultados foram expressos através da $CE_{50} \pm D.P.$, que representa a concentração da amostra necessária para obter metade da atividade sequestradora dos radicais ABTS^{•+}.

3.7. 3 Atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ ácido linoléico

Este experimento foi realizado através da metodologia descrita por Emmons et al. (1999) com algumas modificações. A solução do sistema β -caroteno/ácido linoléico foi preparada adicionando-se uma alíquota de 150 μ L da solução de β -caroteno (20 mg.mL^{-1} em clorofórmio) em um erlenmeyer de 250 mL contendo 160 μ L de ácido linoléico e 660 μ L de Tween 20 (monopalmitato de polioxietilenosorbitan). Posteriormente, adicionou-se 90 mL de água destilada (previamente submetida a tratamento em atmosfera de oxigênio, durante 30 minutos). A absorbância da emulsão foi ajustada entre 0,6 a 0,7 nm a comprimento de onda de 470 nm. Alíquotas de 2,7 mL da emulsão ácido linoléico/ β caroteno foram misturadas com 300 μ L das amostras (100 mg.mL^{-1} em MeOH e água 1:1 para os méis e 2 mg.mL^{-1} para as frações acetato de etila) e incubadas em banho Maria a 40 °C. A oxidação da emulsão foi monitorada após um período de 60 minutos em um espectrofotômetro de UV-vis da Shimadzu, modelo UV-2550 no comprimento de onda de 470nm. A atividade antioxidante foi expressa em porcentagem de inibição relativa ao controle após 60 minutos de incubação utilizando a seguinte equação 3:

$$AA\% = 100 \times \left(\frac{DRC - DRS}{DRC} \right) \quad (3)$$

Onde a AA é a atividade antioxidante, DRC é a taxa de degradação na presença do controle (= Absi - Absf), DRS é a taxa de degradação na presença da amostra (=Absi - Absf), Absi é a absorbância inicial no tempo 0 e Abf é a absorbância no tempo de 20, 40, 60 e 80 min. Foi utilizado como controle positivo trolox na concentração de 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

3.7.4 Sequestro do radical hidroxila ($\text{HO}^\bullet$)

O ensaio foi realizado conforme Halliwell e Gutteridge, 1981, com algumas modificações. Inicialmente alíquotas de 200 μ L do mel, variando nas concentrações de (100-15000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), foram adicionadas a uma mistura contendo 200 μ L deoxiribose (DR, 2,8mM), 400 μ L de uma composição contendo cloreto de ferro III (20 μM), EDTA (100 μM),

200 μL de H_2O_2 (200 μM em uma solução tampão de fosfato de potássio pH 7,4) e 200 μL de tampão fosfato, sob agitação. A esta mistura reacional adicionou-se ascorbato (300 μM) e incubou-se por 30 minutos a 37 °C. Após este tratamento 1,4 mL de ácido tiobarbitúrico (50 mM em NaOH 1%) e 1,4 mL de ácido tricloro acético (TCA 2,8%) foram adicionados à mistura e esta aquecida até a temperatura de ebulição durante 15 minutos em banho termostatizado. Para as frações acetato de etila empregou-se o mesmo procedimento utilizando 200 μL de amostra (10-250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). As quantidades de cromógenos produzidos foram medidas em 532 nm em um UV-vis, da Shimadzu, modelo UV-2550. O cálculo da atividade antioxidante foi feito utilizando a seguinte equação 4:

$$\% A A = 100 - \left(\frac{100 \times A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}} \right) \quad (4)$$

Onde A_{controle} é a absorbância do controle, contendo apenas os reagentes, e A_{amostra} é a absorbância do radical na presença da amostra. Os resultados foram expressos através da $\text{CE}_{50} \pm \text{D.P.}$, que representa a concentração da amostra necessária para obter metade da atividade sequestradora dos radicais ($\text{HO}^\bullet$).

3.7.5 Capacidade antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP)

O ensaio do poder antioxidante de redução do ferro foi realizado de acordo com Benzie e Strain (1996), com algumas modificações. A solução FRAP foi obtida a partir da combinação da solução tampão acetato 0,3 M, solução de TPTZ 10 mM e solução aquosa de cloreto férrico 20 mM. Alíquotas de 90 μL de cada amostra em três concentrações diferentes foram homogeneizadas com 2,7 mL do reagente FRAP (recém-preparado) e 270 μL de água destilada. As soluções foram agitadas em banho termostatizado a 37 °C por 30 minutos. A absorbância das amostras e do FRAP foram medidas em um espectrofotômetro UV-vis da Shimadzu, modelo UV-2550 a 595 nm.

Concentrações de 250-2000 μM de sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) foram utilizadas para a determinação da curva-padrão e os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio-padrão de μM de sulfato ferroso. g^{-1} da fração acetato de mel e μM de sulfato ferroso. g^{-1} de mel.

3.8 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

3.8.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Devido ao uso popular do mel em doenças da pele foram selecionadas cepas de *Staphylococcus aureus*: ATCC 25923, e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 foram mantidas em agar Müller Hinton (bactérias) a 4 ° C e de *Candida albicans*- ATCC 6645, *C. tropicalis* ATCC- 13803 , *C. krusei* LM 13 em Agar Sabouraud Dextrose a 35 °C. Todas as cepas foram procedentes do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, SP, Brasil.

Para a avaliação da atividade antimicrobiana as frações EtOAct foram testadas em concentrações de 32 até 1024 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO) a 10 %. Para cada microrganismo foi preparada uma suspensão a 10^6 UFC.mL⁻¹ (0.5 da Escala McFarland (NCCLS 2000), sendo utilizado caldo Nutriente para as bactérias e Sabouraud dextrose para leveduras. A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada pela técnica de microdiluição em caldo (CLSI, 2006) sendo as microplacas seladas e incubadas a 35°C por 24 – 72 h. A CIM foi definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento dos microrganismos. O resultado foi expresso como a média dos valores de três ensaios distintos (SOUZA et al., 2007).

A atividade antibacteriana e antifúngica foi interpretada conforme os seguintes parâmetros: sem crescimento até 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ = atividade excelente/ótima; sem crescimento de microrganismo até 600-1500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ = atividade moderada; e sem crescimento acima de 1600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ = atividade baixa (ALLIGIANAIS et al 2001; HOLETZ et al 2002; HOUGHTON et al., 2007).

Para o controle negativo foram utilizados Cloranfenicol (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e nistatina (100 UI.mL⁻¹) e para o controle positivo foi realizada a inoculação utilizando apenas o DMSO.

3.9 ANÁLISES TÉRMICAS

3.9.1 Termogravimetria (TG/ DTA/ DTG)

As curvas termogravimétricas dos méis foram obtidas em um analisador Térmico Simultâneo TG-DTA Shimadzu, modelo DTG-60H, utilizando atmosfera de ar sintético com fluxo de $50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, na razão de aquecimento de $20 \text{ }^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$. A massa de amostra utilizada foi de aproximadamente 10 mg em uma faixa de temperatura de 25-800 $^{\circ}\text{C}$.

3.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. Para análise estatística dos resultados, utilizou-se análise de variância (ANOVA), o teste de Tukey para identificar diferenças significativas entre as médias ($p > 0.50$). Foi calculado o coeficiente correlação de Pearson entre os fenólicos totais e os métodos de análises da atividade antioxidante. Os dados foram tratados no programa Action 2.4 (ESTATCAMP, 2012).

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA-SILVA, M.; CANHA, N.; GALINHA, C.; DUNG, H. M.; FREITAS, M. C.; SITO, T. Trace elements in wild and orchard honeys. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 69, p. 1592-1595, 2011.
- ANKLAM, E. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. **Food Chemistry**, v. 63, p. 549-562, 1998.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, p. 232-240, 2007.
- AZEREDO, L. C.; AZEREDO, M. A. A.; SOUZA, S. R.; DUTRA, V. M. L. Protein contents and physicochemical properties in honey samples of *Apis mellifera* of different floral origins. **Food Chemistry**, v. 80, p. 249-254, 2003.
- ALLIGIANAIS, N.; KALPOTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINO, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 4168-4170, 2001.
- ALVAREZ-SUAREZ, J. M.; TULIPANI, S.; DÍAZ, D.; ESTEVEZ, Y.; ROMANDINI, S.; GIAMPIERI, F.; DAMIANI, E.; ASTOLFI, P.; BOMPADRE, S.; BATTINO, M. Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. **Food Chemistry Toxicology**, v. 48, p. 2490-2499, 2010.
- ALVAREZ-SUAREZ, J. M.; GIAMPIERI, F.; GONZALEZ-PARAMAS, A. M.; DAMIANI, E.; ASTOLFI, P.; MARTINEZ-SANCHEZ, G.; BOMPADRE, S.; QUILES, J. L.; SANTOS-BUELGA, C.; BATTINO, M. Phenolics from monofloral honeys protect human erythrocyte membranes against oxidative damage, **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 1508-1516, 2012.
- ALVES, R. M. O.; CARVALHO, C. A. L.; SOUZA, B. A.; SODRÉ, G. S.; MARCHINI, L. C. Características físico-químicas de amostras de mel de *Melipona mandacai* Smith (Hymenoptera: Apidae). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, p. 644-650, 2005.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, P. J.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, p. 2202-2210, 2010.
- ALJADI, A. M.; YUSOFF, K. M. Isolation and identification of phenolic acids in Malaysian honey with antibacterial properties. **Turkish Journal of Medicine and Sciences**, v. 33, p. 229-236, 2003.
- AMIOT, M. J.; AUBERT, S.; GONNET, M.; TACCHINI, M. The phenolic compounds in honeys: preliminary study upon identification and family quantification. **Apidologie**, v. 20, p. 115-125, 1989.

ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, p. 419-421, 2000.

ANDRADE, P.; FERRERES, F. E.; AMARAL, M. T. Analysis of Honey phenolic acids by HPLC, its application to honey botanical characterization. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 20, p. 2281-2288, 1997.

AOAC. ASSOCIATION OF ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of analysis**. 15th. Supl 2, Ed. 1998.

BOGDANOV, S.; RUOFF, K.; ODDO, L. P. Physico-chemical methods for the characterization of unifloral honeys: A review. **Apidologie**, v. 35, p. 4-17, 2004.

BANKOVA, V. S.; POPOV, S.S.; MAREKOV, N. L. High-performance liquid chromatographic analysis of flavonoids from propolis. **Journal of Chromatography**, v. 242, p. 135-143, 1982.

BALTRUŠAITYTE, V.; VENSKUTONIS, P. R.; ČEKŠTERYT, V. Antibacterial activity of honey and Bee bread of different origin against *S. aureus* and *S. epidermidis*. **Food Technology Biotechnology**, v. 45, p. 201-208, 2007.

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

BERTONCELJ J.; DOBERŠEK U.; JAMNIK M.; E GOLOB T. Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. **Food Chemistry**, v. 105, p. 822–828, 2007.

BENZIE, I. F.; AND STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70-76, 1996.

BERA, A.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Propriedades físico-químicas de amostras comerciais de mel com própolis do estado de São Paulo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 49-52, 2007.

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

BLASSA, M.; CANDRACCI, M.; ACCORSI A.; PIACENTINI, M. P.; ALBERTINI, M. C.; PIATTI, E. Raw *millefiori* honey is packed full of antioxidants. **Food Chemistry**, v. 97, p. 217-222, 2006.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Instrução Normativa nº11 de 20 de outubro de 2000. Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade do mel. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**,

Brasília, DF, 23 out, 2000. Disponível em: <www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 20 de set. 2012.

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

BROINIZI, P. R. B.; ANDRADE-WARTHA, E. R. S.; SILVA, A. M. O.; NOVOA, A. J. V.; TORRES, R. P.; AZEREDO, H. M. C.; ALVES, R. E.; MANCINI, J. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 902-908, 2007.

CARREIRA, L. M. M.; LOPES, J. R. C.; SILVA, M. F.; NASCIMENTO, L. A. S. 1996. **Catálogo de pólen das leguminosas da Amazônia brasileira**. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi.

CARPES, S. T.; PRADO, A.; MORENO, I. A. M.; MOURÃO, G. B.; ALENCAR, S. M. Avaliação do potencial antioxidante do pólen apícola produzido na região Sul do Brasil. **Química Nova**, v. 31, p. 1660-1664, 2008.

CAMARGO, J. M. F.; PEDRO S. R. M. Systematics, phylogeny and biogeography of the Meliponinae (Hymenoptera, Apidae): a mini-review. **Apidologie**, v. 23, p. 1-32, 1992.

CASTRO-VÁZQUEZ, L.; DÍAZ-MAROTO, M. C.; GONZÁLEZ-VIÑAS, M. A.; PÉREZCOELLO, M. S. Differentiation of Monofloral Citrus, Rosemary, Eucalyptus, Lavender, Thyme and Heather Honeys Based on Volatile Composition and Sensory Descriptive Analysis. **Food Chemistry**, v. 112, p. 1022-1030, 2009.

CAC. CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Official methods of analysis**. Codex Alimentarius, Rome, v. 3, supl. 2, p. 1-390, 1990.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, sixteenth informational supplement**, document M100-S16. Wayne, PA, USA: CLSI, 2006.

CRANE, E. The past and present status of beekeeping with stingless bees. **Bee World**, v. 73, n. 1, p. 29- 43, 1992.

DAVIDSON, P. M.; SOFOS, J. N.; BRENEM, A. L. Antimicrobials in Foods. Third ed. Marcel Dekker Inc., New York. p. 291-306, 2005.

ESTEVINHO, L. M.; PEREIRA, A. P.; MOREIRA, L.; DIAS, L. G.; PEREIRA, L. Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 3774-3779, 2008.

EMMONS, C. L.; PETERSON, D. M.; PAUL, G. L. Antioxidant capacity of oat (*Avena sativa* L.) extracts. 2. In vitro antioxidant activity and contents of phenolic and tocol antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 4894-4898, 1999.

ERDTMAN, G. The acetolysis method - a revised description. **Svensk Botanisk Tidskrift**, v. 54, p. 561-564, 1960.

- FERRERES, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; GINER, J. M. A comparative study of hesperetin and methyl anthranilate as markers of the floral origin of citrus honey. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 65, p. 371-372, 1994.
- FREITAS, M. O.; PONTE, F. A. F.; LIMA, M. A.; SILVEIRA, E. R. Flavonoids and Triterpenes from the Nest of the Stingless Bee *Trigona spinipes*. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 19, p. 532-535, 2008.
- FINOLA, M. S.; LASAGNO, M. C.; MARIOLI, J. M. Microbiological and chemical characterizations of honey from central Argentina. **Food Chemistry**, v. 100, p.1649-1653, 2007.
- GIADA, M. L.; MARCINI-FILHO, J. The in vitro antioxidant activity of food phenolic compounds. **Nutrire**, v. 28, p. 21-107, 2004.
- GULCIN, I.; SAT, I. G.; BEYDEMIR, S.; ELMASTAS, M., E.; KUFREVIOGLU, O. I. Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.). **Food Chemistry**, v. 87, p. 393-400, 2004.
- GUTTERIDGE, J. M. C.; HALLIWELL, B. The deoxyribose assay: An assay both for 'free' hydroxyl radical and for site-specific hydroxyl radical production. **Biochem Journal**, v. 253, p. 932-933, 1988.
- GHELDOLF, N.; ENGESETH, N. J. Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum sample. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 10, p. 3050-3055, 2002.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; ARUOMA, O. E. I. The deoxyribose method: A simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radical **Analytical. Biochemistry**, v. 165, p. 215-219, 1987.
- HALLIWELL, B. Antioxidant characterization methodology and mechanism. **Biochemical and Pharmacology**, v. 49, p. 1341-1348, 1995.
- HOLETZ, F. B.; HOWES, M. J.; LEE, C. C.; STEVENTON, G. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.
- HOLANDA C. A.; OLIVEIRA, A. R.; COSTA, M. C. P.; RIBEIRO, M. N. S.; SOUZA, J. L.; ARAÚJO, M. J. A. Qualidade dos méis produzidos por *Melipona fasciculata* smith da região do cerrado maranhense, **Química Nova**, v. 35, p. 55-58, 2012.
- HOUGHTON, P. J.; HOWES, M. J.; LEE, C. C.; STEVENTON, G. Uses and abuses of *in vitro* tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. **Journal of Etnopharmacology**, v. 110, p. 391-400, 2007.
- HUANG, D. J.; OU, B. X.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

IURLINA, M.O.; FRITZ, R. Characterization of microorganisms in Argentinean honeys from different sources. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105, p. 297-304, 2005.

KERR, W. E.; CARVALHO, G. A.; NASCIMENTO, V. A. **Abelha Uruçu: Biologia, Manejo e Conservação**. Belo Horizonte– MG, Ed. Fundação Acangaú, 144p., 1996.

KERR, W.E.; PETRERE J. R.; DINIZ-FILHO, J. A. F. Informações biológicas e estimativa do tamanho ideal da colméia para a abelha tiúba do Maranhão (*Melipona compressipes fasciculata* Smith – Hymenoptera, Apidae), **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 18, p. 45-52, 2001.

KERR, W. E.; POSEY, D. A. Informações adicionais sobre agricultura dos Kayapós. **Interciência**, v. 9, p. 392-400, 1984.

KÜÇÜK, M.; KOLAILI, S.; KARAOĞLU, S.; ULUSOY, E., BALTACI, C.; CANDAN, F. Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. **Food Chemistry**, v. 100, p. 526-534, 2007.

LÉON-RUIZ, V. et al. Vitamin C and sugar levels as simples markers for discriminating Spanish honey sources. **Journal of Food Science**, v. 76, p. 356-361, 2011.

LACHMAN, J.; ORSÁK, M.; HEJTMÁNKOVÁ, A.; KOVÁŘOVÁ, E. Evaluation of antioxidant activity and total phenolic of selected Czech honeys. **LWT – Food Science and Technology**, v. 43, p. 52-58, 2010.

LOUVEAUX J.; ABED L. Les miels d’Afrique du Nord et leur spectre pollinique. **Apidologie**, v. 15, n. 2, p. 145-170, 1984.

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

MICHENER C. D. **The Bees of the World**. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, 953 p., 2007.

MORAIS, S. M.; CATUNDA JÚNIO, F. E. A.; SILVA, A. R. A.; MARTINS NETO, J. R.; RONDINA, D.; CARDOSO. J. H. L. Atividade Antioxidante de óleos essenciais de espécies de croton do Nordeste do Brasil. **Química Nova**, v. 29, p. 907-910, 2006.

MOURE, J. S.; URBAN, D.; MELO, G. A. R. **Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region**. Sociedade Brasileira de Entomologia, 1058 p. 2007.

MOURE, A.; CRUZ, J. M.; FRANCO, D.; DOMINGUEZ, J. M.; SINEIRO, J.; OMINGUEZ, H.; NUNEZ, M. J.; PARAJO, J. C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, v. 72, p. 145-171, 2001.

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

MUNDO, M. A.; PADILLA-ZAKOUR, O. I.; WOROBO, R. W. Growth inhibition of foodborne pathogens and food spoilage organisms by select raw honeys. **International Journal of Food Microbiology**, v. 97, p. 1-8, 2004.

MUÑOZ, O.; COPAJA, S. Contenido de flavonoides y compuestos fenólicos de mieles chilenas e índice antioxidante. **Química Nova**, v. 30, p. 848-851, 2007.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS-NCCLS. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. 7 ed. Villanova. PA: NCCLS, 2000.

NOGUEIRA-NETO P. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. Editora Nogueirapis, São Paulo, SP, 446 p., 1997.

OLAITAN, P. B.; ADELEKE, O. E.; OLA, I. O. Honey a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. **African Health Sciences**, v. 7, p. 159-165, 2007.

OLIVEIRA, M. L.; CUNHA, J. A. Abelhas africanizadas *Apis mellifera scutellata* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Apidae: Apinae) exploram recursos na floresta amazônica. **Acta Amazonica**, v. 35, p. 389-394, 2005.

OLIVEIRA, P. S.; MÜLLER, R. C. S.; DANTAS, K. G. F.; ALVES, N. C.; VASCONCELOS, M. A. M.; VENTURIERI, G. C. Ácidos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante em méis de *melipona fasciculata*, *m. flavolineata* (apidae, meliponini) e *Apis mellifera* (apidae, apini) da amazônia. **Química Nova**, v. 15, p. 200-205, 2012.

OUCHEMOUKH, S.; SCHWEITZER, P.; BACHIR BEY M.; DJOUDAD-KADJI, H. HPLC sugar profiles of Algerian honeys. **Food Chemistry**, v. 121, p. 561-568, 2010.

PESSON, P.; J. LOUVEAUX. **Pollinisation et productions végétales**. Paris, INRA, 663p., 1984.

PEREIRA, A. A.; SEIXAS, F. R. M.; NETO, F. R. A. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectiva futuras. **Química Nova**, v. 25, p. 321-326, 2002.

PIETTA, M. J. C. Flavonóides as antioxidante. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

POPEK, S. A. Procedure to identify a honey type, **Food Chemistry**, v. 79, p. 401–406, 2002.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying na improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p.1231-1237, 1999.

ROUBIK, D. W.; MORENO P. J. E. 1991. **Pollen and spores of Barro Colorado Island**. St. Louis: Missouri Botanical Garden. (Monographs in Systematic Botany).

SAXENA, S.; GAUTAM, S.; SHARMA, A. Physical, biochemical and antioxidant properties of some Indian honeys. **Food Chemistry**, v. 118, p. 391-397, 2010.

SABATIER, S.; AMIOT, M. J.; TACCHINI, M.; AUBERT, S. Identification of flavonoids in sunflower honey. **Journal of Food Science**, v. 57, p. 773-777, 1992.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Compuestos polifenólicos: efectos fisiológicos. Actividad antioxidante. **Alimentaria**, v. 1, p. 29-40, 2002.

SURVESWARAN, S.; CAI, Y. Z.; CORKE, H.; SUN, M. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from Indian medicinal plants. **Food Chemistry**, v. 102, p. 938-953, 2007.

SNOWDON, J. A.; CLIVER, D. O. Microorganisms in honey. **International Journal of Food Microbiology**, v. 31, p. 1-26, 1996.

SLINKARD, K.; SINGLETON, V.L. Total phenol analyses: Automation and comparison with manual methods. **American Journal Enology and Viticulture**, v. 28, p. 49-55, 1977.

SILVA, T. M. S.; CAMARA, C. A.; LINS, A. C. S.; BARBOSA, J. M.; SILVA, E. M. S., FREITAS, B. M.; SANTOS, F. A. R. Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 507-511, 2006.

SILVA, T. M. S.; SANTOS, F. P.; RODRIGUES, A. E.; SILVA, E. M. S.; SILVA, G. S. S.; NOVAIS, J. S.; SANTOS, F. A. R.; CAMARA, C. A. Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaira (*Melipona subnitida*) honey. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 14, p. 678-684, 2012.

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

SODRÉ, G. S.; MARCHINI, L. C.; ZUCCHI, O. L. A. D.; NASCIMENTO FILHO, V. F.; OTSUK, I. P.; MORETI, A. C. C. C. Determination of chemical elements in africanized *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) honey samples from the State of Piauí, Brazil. **Química Nova**, v. 30, p. 920-924, 2007.

SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; LIMA, E. O.; TRAJANO, V. N. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 409-413, 2007.

TAORMINA, P. J.; NIEMIRA, B. A.; BEUCHAT, L. R. Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. **International Journal of Food Microbiology**, v. 69, p. 217-225, 2001.

TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; FERRERES, F.; BLÁZQUEZ, A.; GARCÍA-VIGUERA, C.; TOMÁS-LORENTE, F. High-performance liquid chromatography of honey flavonoids. **Journal of Chromatography**, v. 634, p. 41-46, 1993.

WÜRTZEN, G. Shortcomings of current strategy for toxicity testing of food chemicals: antioxidants. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 28, n. 11, p. 743-745, 1990.

VISAVADIA B. G.; HONEYSETT J.; DANFORD M. H. Manuka honey dressing: an effective treatment for chronic wound infections. **British Journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 46, p. 55-56, 2008.

VIT, P.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Flavonoids in meliponinae honeys from Venezuela related to their botanical, geographical and entomological origin to assess their putative anticataract activity. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung**, v. 206, p. 288-293, 1998.

VON GADEW, A.; JOUBERT, E.; HANSMANN, C. F. Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*), α -tocopherol, BHT and BHA. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 632-638, 1997.

4 RESULTADOS

Os resultados obtidos com este trabalho permitiram a elaboração de três artigos, discriminados a seguir:

- Artigo 1, intitulado “*Thermal degradation of honeys and evaluation of physicochemical properties*”, publicado no periódico Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, Qualis B1. DOI: 10.1007/s10973-012-2926-x;
- Artigo 2, intitulado “*Phenolic profile and antioxidant activity of stingless bees honey from Amazonas (Brazilian State)*”, submetido ao periodico Food Chemistry, Qualis A1, sob revisão;
- Artigo 3, intitulado “*Determination of total phenolic content and evaluation of the antioxidant activity of honeys from Amazon*”, submetido ao periódico Industrial Crops and Products, Qualis A2, sob revisão.

4.1 ARTIGO 1

J Therm Anal Calorim
DOI 10.1007/s10973-012-2926-x

Thermal degradation of honeys and evaluation of physicochemical properties

I. A. A. Silva · A. L. Souza · A. M. T. M. Cordeiro ·
L. E. B. Soledade · N. Queiroz · A. G. Souza

Received: 25 September 2012 / Accepted: 20 December 2012
© Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungary 2013

Abstract The physicochemical characterization and thermal profile of honeys produced by stingless bees are poorly known, mainly due to the high diversity of flora mellifera and to the low production that is inherent of these species. The objective of this study was to determine the physicochemical characteristics of five samples of honey from bees from the species *Melipona seminigra merrillae* of Amazonas State, Brazil. The thermal degradation profile of these honey samples was evaluated by thermogravimetry in order to contribute with the establishment of a quality standard of honeys produced from Brazilian stingless bees. Thus, the following analyses were performed: reducing sugars, moisture, hydroxymethylfurfural, protein, ash, pH, and acidity. The results showed that the current legislation concerning the honey of *Apis mellifera* is not an appropriate standard for all the properties analyzed, reinforcing the need for a honey standard including the honeys of all Brazilian bees. The honey samples displayed similar thermal degradation profiles, with the thermal process starting at room temperature and ending at a temperature next to 600 °C.

Keywords Honey · *Melipona seminigra merrillae* · Physicochemical characteristics · Thermogravimetric analysis

Introduction

Honey is a viscous fluid, of characteristic aroma and sweet, prepared by bees from nectars and/or exudates of plants, mainly of floral origin [1]. Honey is a very complex mixture, in which the main components are the monosaccharides glucose and fructose. Nevertheless, substances like enzymes, amino acids, vitamins, and mineral salts take also part in its composition, but at smaller quantities [2, 3].

Among the products provided by bees, honey is certainly the best known. All ancient civilizations used honey as food and as a therapeutic agent. Honey has been object of several studies by its relevant applications in clinical cases, of which success was attributed mainly to the antioxidant and antimicrobial properties [2].

The constituents of honey are variable and depend on the floral source of nectar, environmental and seasonal conditions, stage of maturation the honey, bee species, physiological state of the colony, time of collection and processing [2–6]. These variations of the chemical composition make honey a rich source of research.

In Brazil, the standard of honey for commercial purposes is the Normative Instruction number 11 of October 20, 2000 [1]. This regulation, based on a European standard, is too much severe in terms of the honey physicochemical properties of stingless bees. One of these characteristics is the moisture content, which is very high, as Brazilian honey bees are less dense than the one from Africanized honey bees [7]. However, even though the honey from stingless bees does not meet these legislation parameters, it is proper for the human consumption.

I. A. A. Silva (✉) · A. M. T. M. Cordeiro
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de
Alimentos, CT, Universidade Federal da Paraíba, Campus I,
João Pessoa, PB, Brazil
e-mail: andreaulbra@hotmail.com

A. L. Souza · N. Queiroz · A. G. Souza
Laboratório de Combustíveis e Materiais (LACOM),
Departamento de Química, CCEN, Universidade Federal da
Paraíba, Campus I, João Pessoa, PB, Brazil

L. E. B. Soledade
Universidade Federal do Maranhão, Campus de Pinheiro,
Pinheiro, MA, Brazil

Published online: 17 January 2013

 Springer

The state of Amazonas, Brazil, has a great potential for the production and exportation of honey from stingless bees, supported by political initiatives for the sustainable development of forests [8]. According to Marques-Souza et al. [9], in the municipality of Manaus and adjacent regions, two bee species stand out as pollinators of various plant species and their mellifero potential: *Melipona seminigra merrillae* and *Melipona compressipes manaoense*.

Therefore, this study aimed at evaluating the physicochemical properties of honey from Amazon bees (*Melipona seminigra merrillae*) and comparing these properties with the standards established for honeys produced by Africanized honeybees. This study also evaluates the potential of the thermogravimetric (TG) analysis technique to determine the moisture content and ash of honey.

Experimental

Honey bees native to the Amazon

The samples of honey from native honeybees (*Melipona seminigra merrillae*) were obtained from honey producers located in cities from Amazonas State, Brazil. Figure 1 shows the geographical location of the cities Manaus (MAO), Boca do Acre (BAJ), Pauini (BAU), Lábrea (LAB), and Rio Preto da Eva (RP), in which the honey samples were collected. The samples were stored in plastic bottles at a temperature of $\sim 8^{\circ}\text{C}$ until the moment of analysis.

Chemical reagents

All reagents and solvents used in this study were of analytical grade and supplied by Vetec Fine Chemicals Ltd. (Rio de Janeiro, Brazil).

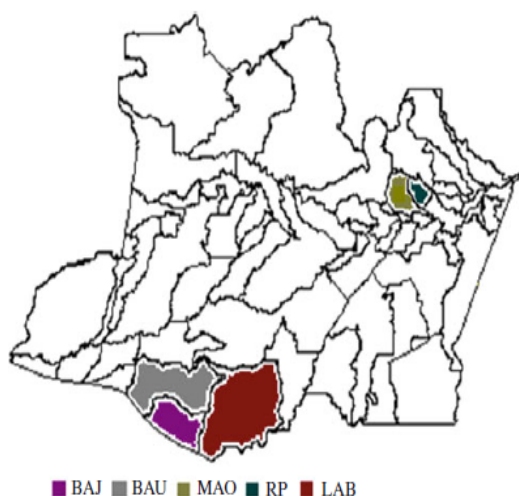


Fig. 1 Geographical location of the municipalities of the State of Amazonas, in which the honey samples were collected

Methods

Physicochemical characterization

The following physicochemical analyses were performed: moisture, ash, free acidity, pH, reducing sugars, hydroxymethylfurfural (HMF), and proteins. The results were expressed as mean values, with an estimate of the standard deviation from the experiments carried out in triplicate, in agreement with AOAC [10].

Moisture

The principle of this method consists in determining the refractive index of the honey at 20°C , which is converted to moisture content by means of a Chataway reference table, which reports the moisture content as a function of refractive index.

pH

For the pH determination, blends containing 10 g of honey and 75 mL of distilled water were prepared. The pH values of the blends were directly determined by means of a pH meter.

Free acidity

For the determination of free acidity, a volumetric titration was performed with the aid of pH meter for the pH measurement. In this procedure, 10 g of honey was dissolved in 75 mL of distilled water. The resulting solution was titrated with 0.05 N sodium hydroxide (NaOH) solution up to pH 8.5. The results were presented in milliequivalents acid per 1,000 g of honey. For the calculation of the free acidity, Eq. 1 was employed

$$\text{Free acidity} = (V - V_1) \times 50 \quad (1)$$

in which V is the milliliter of 0.05 N NaOH solution and V_1 is the milliliter of blank test.

Ash and proteins

The ash content was determined by the difference between the masses of the samples before and after calcinations in a muffle furnace at 550°C for 6 h.

The proteins present in the honey samples were determined using the Kjeldahl method.

Hydroxymethylfurfural (HMF)

The determination of HMF in honey samples was carried out by the determination of the absorbance, at the wavelengths

of 284 and 336 nm, in a UV–Vis spectrophotometer model 1700 from Metrolab.

Reducing sugars

The reducing sugar content was determined based on the capacity of sugars present in honey, such as glucose and fructose, to reduce copper in the alkaline solution of copper salt (Fehling). In this test, Cu^{2+} is reduced to Cu^+ with the sugars being oxidized to organic acids.

Thermal analysis

The thermogravimetric/differential thermogravimetric analysis (TG/DTG) curves were obtained in a model DTG-60H simultaneous thermal analyzer from Shimadzu. The runs were carried out using about 10 mg samples in an alumina pan and synthetic air atmosphere, air flow of 50 mL min^{-1} , heating rate of $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ and 25–800 $^\circ\text{C}$ temperature range.

Results and discussion

The physicochemical data of the honey samples listed in Table 1 are in agreement with the Brazilian legislation, except for the specifications of moisture and reducing sugars. However, even though the values of moisture and reducing sugars do not meet these parameters, they are in accordance with other studies of honeys from Brazilian native bees [11–15].

The moisture values for the five honey samples analyzed varied from 23.38 to 33.12 %. It was observed that the samples collected in neighbor municipalities (BAJ, BAU, and LAB) and also (MAO and RP) (Fig. 1) presented similar moisture levels. These results can probably be attributed to the floral source and environmental conditions, which affect the physicochemical properties of honey [3].

The moisture content is a determining factor in the honey stability. When it is too high, it may cause loss of flavor, grain, and cause the proliferation of *osmophilic*

microorganisms. These microorganisms, when present in large quantities, may cause fermentation processes in honey, leading to its degradation [16], rendering it improper for consumption.

In this study, the values of acidity and pH varied from 44.57 to 49.97 meq kg^{-1} and from 3.14 to 4.28, respectively. The Brazilian legislation does not specify a pH limit value for honey, but it is an important physicochemical property of honey. The low pH of honey, for example, inhibits the presence and growth of microorganisms and makes it compatible with various foods. The pH value also influences the shelf life of honey [17].

The maximum limit for acidity is 50 meq kg^{-1} . According to the data obtained, the honeys analyzed meet the requirements established by the legislation. This fact shows the good conditions of these honeys for consumption, although they presented high moisture contents, once, according to Finola [18, 19], acidity levels below the established limit point out the absence of undesirable fermentations.

The ash values ranged from 0.02 to 0.50 %. It can be noticed that the neighbor municipalities (RP and MAO), as well as (BAU and LAB), presented similar values.

According to the literature, the ash content is directly associated to the soil type and to the climatic conditions in the honey origin region [20, 21]. In this study, it should be stressed that the region comprising the municipalities BAJ, BAU, and LAB is much bigger than the region of localization of the municipalities MAO and RP. Thus, this may be one of the reasons for the high difference between the ash contents of the samples BAJ, BAU, and LAB.

The honey samples showed protein levels below 1 %, corroborating the results from Anacleto [11]. Similar values were also found by Souza et al. [12], who reported that the protein contents in honeys of the Brazilian bees ranged from 0.04 to 1.21 %. The Brazilian legislation does not establish parameters for this constituent [1].

HMF found in the samples varied from 2.66 to 38.66 mg kg^{-1} . All the honey samples meet the requirements of the Brazilian standards [1]. The literature shows that honey from Brazilian native bees display HMF values

Table 1 Physicochemical data from samples of the honeys analyzed

Sample	Moisture/%	pH	Free acidity/ meq kg^{-1}	Ash/%	Protein/%	HMF/ mg kg^{-1}	Reducing sugars/%
BAJ	33.12 ± 0.3	3.71 ± 0.2	49.53 ± 0.7	0.50 ± 0.02	0.11 ± 0.07	2.68 ± 0.4	43.22 ± 0.8
BAU	30.58 ± 0.5	3.61 ± 0.1	49.97 ± 0.4	0.02 ± 0.01	0.08 ± 0.03	2.66 ± 0.2	59.74 ± 0.4
MAO	23.38 ± 0.3	3.14 ± 0.2	44.57 ± 0.5	0.27 ± 0.01	0.30 ± 0.09	4.82 ± 0.1	68.19 ± 0.5
RP	24.26 ± 0.8	4.28 ± 0.2	48.94 ± 0.6	0.26 ± 0.01	0.27 ± 0.05	5.60 ± 0.1	74.08 ± 0.3
LAB	29.84 ± 0.6	3.71 ± 0.3	48.54 ± 0.3	0.06 ± 0.01	0.13 ± 0.03	38.66 ± 0.3	68.92 ± 0.2
I.N	Maximum 20	–	Maximum 50	Maximum 0.6	–	Maximum 60	Minimum 65

I.N specifications from normative instruction number 11 of October 20, 2000

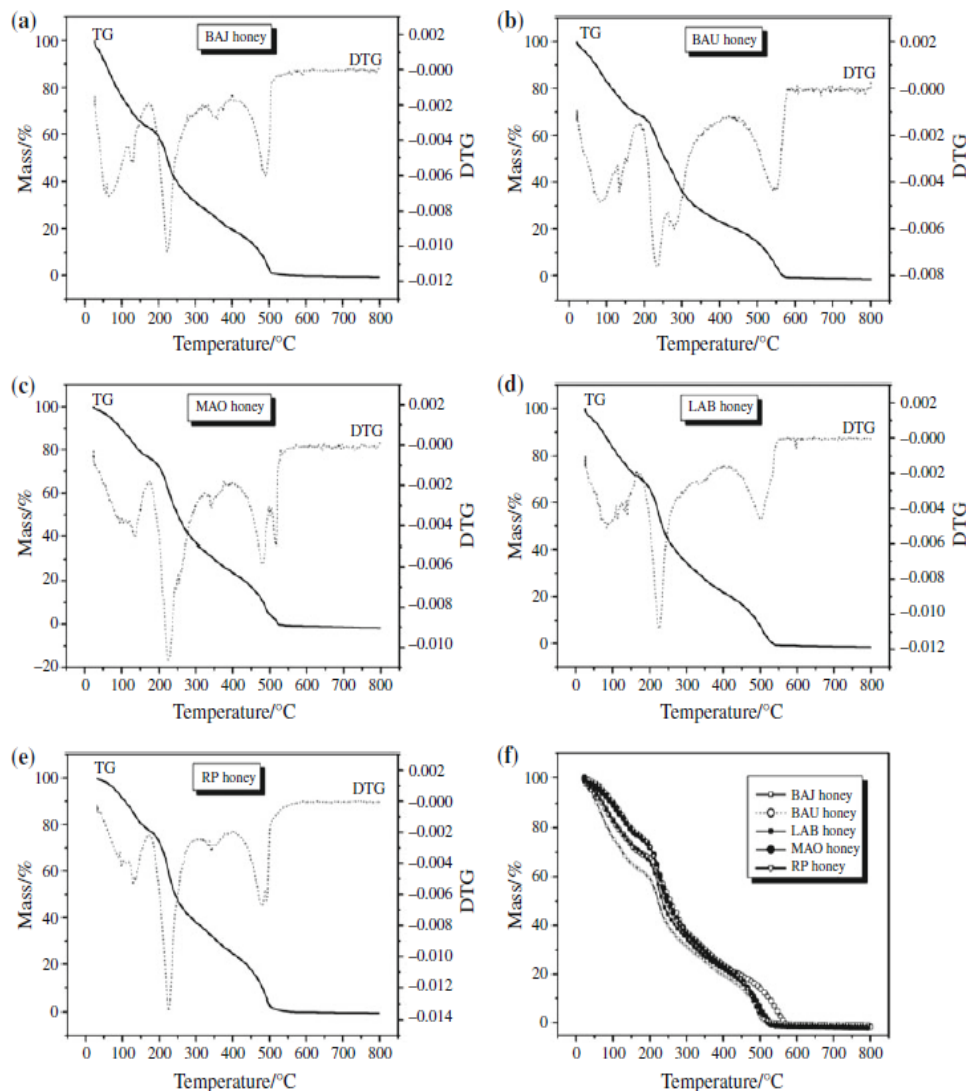


Fig. 2 TG/DTG curves of the following honey samples: a BAJ, b BAU, c MAO, d LAB, e RP, f all the samples

in a wide range, from 0.4 to 78.5 mg kg⁻¹ [11, 13, 14]. In fresh honeys, the HMF content is very low; however, when the product is heated, stored in improper conditions or adulterated with invert sugar syrup, this value increases.

The level of reducing sugars ranged from 43.22 to 74.08 %. This pronounced variation was observed in studies with honey from Brazilian native bees [11, 13, 14]. The minimum content adopted by the Brazilian legislation is 65 %. According to the results from Table 1, the BAU and BAJ samples do not meet the established standards.

The honey samples analyzed were shown to be fluid. The fructose/glucose ratio supplies information on the state of crystallization of the honey, which is fluid when the fructose content is higher than the glucose content [19].

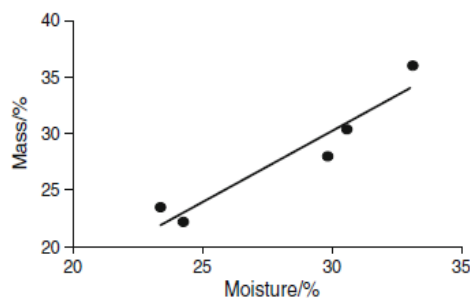
According to Cortopassi-Laurino and Guelli [20], the honeys of *Meliponidae* present lower sugar content, higher acidity, and lower content of soluble solids when compared to the honey of *Apis mellifera*, showing that the Brazilian legislation cannot adopt European standards for honeys from all bees, especially for the native.

The TG/DTG curves of honey samples, Fig. 2a–e showed that the decomposition of honeys occurred in consecutive events, involving various stages. These stages start at room temperature and end up next to 600 °C. The results are summarized in Table 2 and Fig. 2f, showing that the honeys analyzed are quite similar.

The first and the second thermal decomposition steps took place between room temperature and about 170 °C and they can be attributed to the loss of water and volatile

Table 2 Thermogravimetric data of the honey from *Melipona seminigra merrillae*

Samples	Step	Temperature/°C	Δ mass/%	Ash/%
BAJ	1st	27–116	26.3	1
	2nd	116–173	9.7	
	3rd	173–324	34.5	
	4th	324–399	8.9	
	5th	399–581	20.12	
BAU	1st	23–125	21.4	0.10
	2nd	125–185	9.0	
	3rd	185–260	20.2	
	4th	260–425	27.3	
	5th	425–590	22.0	
MAO	1st	24–119	14.0	0.04
	2nd	119–175	9.5	
	3rd	175–325	43.0	
	4th	325–398	9.5	
	5th	398–499	19.5	
	6th	499–599	5.4	
LAB	1st	26–123	20.4	0.8
	2nd	123–169	7.6	
	3rd	169–318	39.0	
	4th	318–402	10.2	
	5th	402–560	22.8	
RP	1st	32–113	11.2	0.06
	2nd	113–171	11.00	
	3rd	171–301	40.00	
	4th	301–379	11.0	
	5th	379–486	19.4	
	6th	486–592	8.4	

**Fig. 3** Pearson correlation between the moisture and mass loss accumulating the first and the second steps of the thermogravimetric analysis of honeys

constituents of honey. Figure 3 showed the high correlation ($r = 0.954$, $p = 0.0116$) between the moisture content of the honey and mass loss accumulating the first and the second steps. This indicates that the TG analysis technique can be also applied to assess the honey moisture.

The next thermal events, occurring between 170 and 600 °C, can be attributed to the thermal decomposition of sugars and carbonaceous materials formed therefrom, since it was observed that samples with higher levels of reducing sugars were the ones that displayed the higher mass losses. The percentage of residue at a temperature of 570 °C corresponds to the content of mineral salts of each sample. The ash content values found in the physicochemical analysis were different from the residues data obtained from the TG analyses. However, this fact was expected since in the physicochemical analysis there are many variables that can affect the final result of the experiment, and in the TG analysis this random error is minimized, once it is a one-step procedure.

Studies of the thermal behavior and adulteration detection of food has been investigated by researchers [22, 23]. Thermoanalytical methods, such as TG/DTG are used for the ash determination in foods, like coffee, milk powder, starches, flours, and oil seeds. This alternative presents some advantages in relation to the conventional gravimetric method: shorter analysis time, smaller mass sample, besides it does not need a pre-treatment, in which there may be loss of material compromising the result of the analysis [24, 25].

Conclusions

The physicochemical parameters of honey from stingless bees displayed values which are compatible with those established for stinging bee honeys, with the exception of the contents of moisture and reducing sugars. The inadequacies for these two specification items reinforce the need to work on a proper standard for the honeys of Meliponine bees, in order to avoid frauds and to enable their formal marketing.

The thermogravimetry technique was helpful for the determination of the moisture content of the honey samples, showing the high correlation with the data obtained by the refraction index. The same was not observed upon the application of thermal analysis to the determination of ash.

Acknowledgments The authors acknowledge the Brazilian agencies FAPEAM—Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas, MCT, and FINEP for the financial support.

References

1. Specifications from Normative Instruction number 11 of October 20, 2000. Brazil. Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply; Normative Instruction number 11 of October 20, 2000, Diário Oficial da União, October 23, 2000.
2. AL-Mamary M, Al-Meer A, Al-Habori M. Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. Nutr Res. 2002;22:1041–47.

3. Küçük M, Kolaili S, Karaoğlu S, Ulusoy E, Baltacı C, Candan F. Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chem.* 2007;100:526–34.
4. Arráz-Román D, Gómez-Caravaca AM, Gómez-Romero M, Segura-Carratero A, Fernández-Gutiérrez A. Identification of phenolic compounds in rosemary honey using solid-phase extraction by capillary electrophoresis–electrospray ionization–mass spectrometry. *J Pharm Biom Anal.* 2006;41:1648–56.
5. Baltrušaitytė V, Venskutonis PR, Čeksterytė V. Radical scavenging activity of different floral origin honey and bee bread phenolic extracts. *Food Chem.* 2007;10:502–14.
6. Acquarone C, Buera P, Elizalde B. Pattern of pH and electrical conductivity upon honey dilution as a complementary tool for discriminating geographical origin of honeys. *Food Chem.* 2007;101:63–695.
7. Azeredo LC, Azeredo MAA, Souza ASR, Dutra VML. Protein contents and physicochemical properties in honey samples of *Apis mellifera* of different floral origins. *Food Chem.* 2003;80:249–54.
8. Vit P, Medina M, Enriquez ME. Quality standards for medicinal uses of Meliponinae honey in Guatemala, Mexico and Venezuela. *Bee World.* 2004;85:2–5.
9. Marques-Souza AC, Absy ML, Kerr WE, Peralta FJA. Pollen collected by two Meliponini species (Hymenoptera, Apidae) from Amazonas State, Brazil. *Rev Bras Biol.* 1995;55:855–64.
10. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Official methods of analysis, suppl. 2. 15th ed. Washington, DC: AOAC; 1990.
11. Anacleto DA, Souza BA, Marchini LC, Moreti ACCC. Composition of the honey of samples originated from Jataí bees (*Tetragonisca angustula* latreille, 1811). *Cienc Tecnol Aliment.* 2009;29:535–41.
12. Souza RCS, Yuyama LKO, Aguiar JPL. Nutritional value of honey and pollen of stingless bees of the Amazonian region. *Acta Amaz.* 2004;34:333–6.
13. Souza BA, Marchini LC, Oda-Souza M, Carvalho CAL, Alves RGO. Characterization of honey produced by species of *Melipona* Illiger, 1806 (Apidae: Meliponini) from the northeast area of Brazil: 1. Physico-chemical characteristics. *Quim Nova.* 2009;32:303–8.
14. Alves RMO, Carvalho CAL, Souza BA, Sodré GS, Marchini LC. Physico-chemical characteristics of honey samples of stingless bee *Melipona mandacaia* Smith (Hymenoptera: Apidae). *Cienc Tecnol Aliment.* 2005;25:644–50.
15. Codex Alimentarius Commission. Codex standards for sugars (honey). FAO: Rome; 1989.
16. White JW, Subers MH, Schepartz I. The identification of inhibine the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose–oxidase system. *Am Bee J.* 1963;73:430–1.
17. Terrab A, Recamales AF, Hernanz D, Heredia FJ. Characterisation of Spanish thyme honeys by their physicochemical characteristics and mineral contents. *Food Chem.* 2004;88:537–42.
18. Finola MS, Lasagno MC, Marioli JM. Microbiological and chemical characterization of honeys from central Argentina. *Food Chem.* 2007;100:1649–53.
19. De Rodríguez GO, Ferrer BS, Ferrer A, Rodríguez B. Characterization of honey produced in Venezuela. *Food Chem.* 2004;84:499–502.
20. Cortopassi-Laurino M, Gelli DS. Analyse pollinique, propriétés physico-chimiques et action antibactérienne des miels d'abeilles africanisées *Apis mellifera* et de *Meliponinés* du Brésil. *Apidologie.* 1991;22:61–73.
21. Anklam E. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chem.* 1998;63:549–62.
22. Cordella C, Faucon JP, Cabrol-Bass D, Shirrazuoli N. Application of DSC as a tool for honey floral species characterization and adulteration detection. *J Therm Anal Calorim.* 2003;71:279–90.
23. Schäffer B, Keller B, Szakály Z, Lőrinczy D. Examination of a coffee product enriched with calcium by the isoperibolic method. *J Therm Anal Calorim.* 2012;108:171–5.
24. Tomassetti M, Campanella L, Aureli T. Thermogravimetric analysis of some spices and commercial food products: comparison with other analytical methods for moisture content determination. *Thermochim Acta.* 1989;143:15–23.
25. Macêdo RO, Moura OM, Souza AG, Macêdo AMC. Comparative studies on some analytical methods: thermal decomposition of powder milk. *J Therm Anal Calorim.* 1997;49:857–62.

4.2 ARTIGO 2

Phenolic profile and antioxidant activity of stingless bees honey from Amazonas (Brazilian State)

Isnandia Andréa Almeida da Silva¹, Tania Maria Sarmiento da Silva², Celso Amorim Camara², Neide Queiroz³, Marciane Magnani¹, Jaílson Santos de Novais⁴, Luiz Edmundo Bastos Soledade⁵, Edeltrudes de Oliveira Lima⁶, Antonia Lucia de Souza³, Antonio Gouveia de Souza³

¹*Departamento de Engenharia de Alimentos, Centro de Tecnologia (CT), Universidade Federal da Paraíba (UFPB), 58051-970, Campus I, João Pessoa - Paraíba, Brazil.*

²*Laboratório de Bioprospecção Fitoquímica (BIOFITO), Departamento de Ciências Moleculares, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), 52171-900 – Recife-PE, Brazil.*

³*Laboratório de Combustíveis e Materiais (LACOM), Departamento de Química, CCEN, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), 58059-900, Campus I, João Pessoa - Paraíba, Brazil.*

⁴*Centro de Formação Interdisciplinar, Universidade Federal do Oeste do Pará, CEP 68135-110, Pará, Brazil.*

⁵*Campus de Pinheiro, Universidade Federal do Maranhão, CEP 65.200-000, Pinheiro, Maranhão, Brazil.*

⁶*Laboratório de Micologia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), 58051-970, Campus I, João Pessoa - Paraíba, Brazil.*

*Corresponding author: Tel.: +55 83 9964 4199 fax: +55 83- 8163- 1220.
E-mail: andreaulbra@hotmail(IAA Silva)

ABSTRACT

In the present study honey samples produced by *Melipona seminigra merrillae*, collected in seven counties distributed in the central and southern region of Amazonas state in Brazil, were analyzed as for the origin, content and profile of the phenolic compounds, antioxidant and antimicrobial activities. The results of the total phenolic content ranged from 17 mg GAE/g to 66 mg GAE/g of extract, in which the highest contents were found in the monofloral honeys. The antioxidant activity was higher in the samples that presented the higher amounts of phenolic compounds. In relation to the antibacterial activity, the samples CO (Coari), ME (Maués) and LAB (Lábrea) presented the best results. The determination of the phenolic profile revealed the presence of 14 phenolic compounds. Among them, the flavonoid taxifolin was identified in the samples, suggesting that it is a phenolic indicator of the honeys produced by the species.

Keywords: Honey from Amazonas state, *Melipona seminigra merrillae*, stingless bees, phenolic compounds

1. Introduction

Honey is characterized by its complex composition, which varies with the origin of the raw material (néctar or honeydew), bee species, edafoclimatic conditions, available floral source and storage conditions (Küçük et al., 2007). It is mainly constituted by glucose and fructose, but also contains aminoacids, phenolic compounds, organic acids, vitamins, minerals, lipids, enzymes and other phytochemicals (Baltrušaityte, Venskutonis & Čeksteryte, 2007).

In Northern and Northeastern regions of Brazil several native honey producing stingless bee species can be found, known as indigenous bees, stingless or meliponini. In the state of Amazonas, among the several species already identified, attention should be given to *Melipona seminigra merrillae*, which is endemic to Central Amazonia and important pollinator of the Amazon rainforest.

The growing interest by the honey produced by stingless bees ensues from its differentiated composition, which has associated to antiseptic, antimicrobial, anticancer, anti-inflammatory and wound healing properties (Silva et al., 2006; Silva et al. 2012).

Hundreds of bioactive substances have already been found in honeys of diverse origins (Gheldof & Engeseth, 2002; Bertoncelj, Doberšek, Jamnik & Golob, 2007; Alvarez-Suares et al., 2012). Among them, the ones that display antioxidant capacity, such as phenolic acids, flavonoids and the enzymes glucose oxidase and catalase have received special attention of research groups, due to their role in prevention of diseases associated to oxidative stress (Aljadi & Kamaruddin, 2004). On the other hand, phenolic compounds present in honey are directly related to botanical resources such as pollens, nectars, resins and oils supplied to bees, and consequently, honeys from different floral origins can present distinct bioactive properties (Gheldof & Engeseth, 2002).

Taking into account all these features, the present work was undertaken with the purpose of determining the botanical origin and phenolic compound profile of honeys produced by the species *Melipona seminigra merrillae* in seven counties of Amazonas state, in the Northern region of Brazil. Besides, the honeys were also evaluated regarding the antioxidant and antimicrobial activities.

2. Materials and Methods

2.1 Standards and Reagents

The reagents Folin-Ciocalteu, potassium persulfate, Trolox (6-hydroxy-2, 5, 7, 8 – tetramethylchroman-2-carboxylic acid 97%), ascorbic acid, gallic acid, ABTS (2, 2'-azinobis-[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid] and also the phenolic standards were supplied by Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). The solvents ethyl acetate, methanol, ethanol and DMSO were supplied by Cinética e Tédia (Brazil), while the Mueller-Hinton agar and the Sabouraud Dextrose agar by Difco Laboratories (Detroit, USA).

2.2 Honey samples

The samples of honey from the species *Melipona seminigra merrillae* were collected from beehive meliponaries in seven counties from Amazonas state, Brazil in November 2009 and 2010. The counties from Central region of Amazonas state (Manaus (MAO), Rio Preto da Eva (RP), Coari (CO) and Maués (ME)) and the counties of the Southern region of Amazonas (Boca do Acre (BAJ), Pauini (BAU) and Lábrea (LAB)). The collect was performed with 20 mL sterile syringes and the honey was transferred to 600 mL polyethylene bottles, stored at 8 °C until the moment of the analysis.

2.3 Honey extracts

2.3.1 Methanol extracts and ethyl acetate fractions of the honeys

The methanol extracts and the ethyl acetate fractions of the honey samples were prepared following the methodology previously described by Andrade, Ferreres & Amaral (1997). Initially 50 g of honey, 250 mL of water acidified with hydrochloric acid (pH 2) and 100 g of Amberlite XAD-2 resin were mixed. After homogeneization in a magnetic stirrer for 30 minutes, the mix was transferred to a glass column (42 cm x 3.2 cm), washed with 250 mL of acidified water (pH 2), followed by 300 mL of distilled water. The elution was performed with 300 mL methanol. In order to obtain the extract, the solvent was removed at 40 °C under reduced pressure in a rotary evaporator.

The fractioning with ethyl acetate for the removal of sugars was performed utilizing 1 g of the methanol extract, to which were added 5 mL of distilled water and 5 mL of ethyl acetate. The contents were transferred to a separation funnel and the acetate fraction was collected and later concentrated at 40 °C under reduced pressure in a rotary evaporator.

2.4 Melissopalynological analysis

Ten grams of each honey sample were taken and submitted to the acetolysis method with acetic anhydride and sulfuric acid (9:1) in successive centrifugations (Silva et al., 2012). After the acetolysis process, slides containing glycerinated gelatin were prepared for the mounting of the pollen grains, which were later observed and identified by optical microscopy. The frequency classes were established from the counting of at least 300 pollen grains for each honey sample (Louveaux, Maurizio & Vorwohl, 1978). The classification was based upon the following criteria: dominant pollen type (DP, >45%), secondary pollen type (SP, 16 – 45%), important minor pollen (IMP, 3 - 15%) and minor pollen (MP, <3%). The

identification of pollen types found in each sample was based on pollen catalogues and comparison with the slide collection of the pollen libraries from Universidade Federal do Oeste do Pará (PUFOPA) and Universidade Estadual de Feira de Santana (PUEFS).

2.5 Phenolic amounts

The determination of total phenolic content of the honey samples and in the ethyl acetate fractions (EtOAct) was carried out by the colorimetric Folin-Ciocalteu method (Slinkard & Singleton 1977). A 300 μL aliquot of methanol extract (5 mg.mL^{-1} in MeOH) was transferred to a test tube containing 60 μL of the Folin-Ciocalteu reagent and 2.460 μL of distilled water. The mixture was stirred for 1 min and subsequently 180 μL de Na_2CO_3 (15%) were added, being the contents stirred for more 0.30 min, in order to obtain a final extract concentration of $200 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$. The samples were kept in the dark for 2 h, prior to be measured in a UV- vis spectrophotometer Shimadzu, model UV-2550 at 760 nm. The total phenolic content (TFC) was determined by interpolation of sample absorbance against a calibration curve built with gallic acid standards (1 to $15 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ in ethanol) and expressed as milligrams of gallic acid equivalent per gram of extract (mg GAE /g). All the analyses were carried out in triplicate.

2.6 Evaluation of the antioxidant activity

2.6.1 ABTS $\bullet^+$ cation radical scavenging

The ABTS test was performed according to the methodology reported by Re et al. (Re et al., 1999). The cation radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ was synthesized by the reaction of a 7 mM ABTS solution with a 2.45 mM potassium persulfate solution. The mixture was kept at 23°C in the dark for 16 h. Afterwards the $\text{ABTS}^{\bullet+}$ solution was diluted with ethanol until reaching an absorbance (A) of 0.7 at 734 nm, in a UV-vis spectrophotometer Shimadzu, model UV-2550.

Aliquots of 2.7 mL from the ABTS^{•+} solution were added, immediately after being prepared, to the sample solutions diluted in methanol (MeOH) in order to reach final concentrations between 100 and 500 µg.mL⁻¹. After 10 min, the percentage inhibition of absorbance at 734 nm was calculated for each concentration, which was relative to the blank absorbance (ethanol). The capability of scavenging the ABTS^{•+} radical was calculated using the following equation:

$$\% AS = 100 \times \left(\frac{A_{control} - A_{sample}}{A_{control}} \right)$$

In which $A_{control}$ is the control absorbance, obtained from the ABTS^{•+} radical alcoholic solution and A_{sample} is the radical absorbance in the presence of the sample or the trolox standard. The results were expressed as $CE_{50} \pm sd$, in which CE_{50} represents the sample concentration required to obtain half of ABTS^{•+} radical scavenging activity and sd the calculated standard deviation.

2.7 HPLC Analysis of phenolic acids and flavonoids

The chromatographic analyses were carried out in a Shimadzu high performance liquid chromatograph (HPLC). The chromatograph was equipped with an automatic Rheodyne 7125i injector with a 20 µL loop and diode array detector. The columns used were the Shimadzu LC-18 column (25 cm x 4.6 mm from Supelco, Bellefonte, USA), the Rexchrom LC-18 column (15 cm x 4.6 mm Supelco, Bellefonte, USA) and the pre-column C-18 ODS Shimadzu. For the analysis of the phenolic acids, the elution system composed by 5% formic acid (solvent A) and MeOH (solvent B). The elution conditions were: 0.01-15 min. 20 - 30 % B, 15-20 min. 30% B, 20-30 min. 30-40% B, 40-50 min. 100% B, with a flow rate of 1.0 mL/min. For the monitoring, the wavelengths of 254 nm and 290 nm were employed.

For the determination of flavonoids, the elution system employed was: 1% formic acid (solvent A) and MeOH (solvent B) as the mobile phase at the conditions of 0.01-3 min. 40% B, 5-15 min. 45% B, 17-25 min 50% B, 27-35 min. 55% B and 40 min. 40% B. For the monitoring, the wavelength of 320 nm was utilized. The flow rate of the mobile phase was 1 mL.min⁻¹ and the oven temperature of the column was fixed at 35 °C. The identification of phenolics was based on the retention times, UV-spectra and chromatographic comparison (co-injection) with authentic markers (Silva et al., 2012).

2.8 Determination of the antibacterial and antifungal activities

The strains of *Staphylococcus aureus*: ATCC 25923 and *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 were kept in Müller Hinton agar (bacteria) at 4 °C and strains of *Candida albicans*- ATCC 6645, *C. tropicalis* ATCC- 13803 and *C. krusei* LM 13 in Sabouraud Dextrose agar at 35 °C. All the strains originate in the Department of Pharmaceutical Sciences from Universidade de São Paulo, Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, Brazil.

For the evaluation of the antimicrobial activity, the EtOAc fractions, solubilized in 10% dimethyl sulfoxide (DMSO), were tested at concentrations ranging from 32 to 1024 µg.mL⁻¹. For each microorganism a suspension at 10⁶ UFC.mL⁻¹ (0.5 da Escala McFarland), was prepared. Nutrient broth was used for the bacteria and Sabouraud dextrose agar for yeasts. The determination of the minimal inhibitory concentration (MIC) was carried out by the technique of broth microdilution, with the microplates sealed and the microplate was sealed and incubated at 35 °C for 24 - 72 h. The MIC was defined as the smallest concentration able to inhibit the growth of microorganisms. The result was expressed as the average of three distinct tests (Souza, Stamford, Lima & Trajano, 2007).

The antibacterial and antifungal activities were interpreted in agreement with the following parameters: from no growth to 500 µg.mL⁻¹ = excellent/optimal activit; from no growth to 600-1500 µg.mL⁻¹ = moderate activity; from no growth to over 1600 µg.mL⁻¹ = low

activity (Holetz, Howes, Lee & Steventon, 2002; Houghton, Howes, Lee & 2007). For the negative control, chloramphenicol ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and nystatin (100 UI.mL^{-1}) were utilized and for the positive control the inoculation was carried out using only DMSO.

2.9 Statistical analysis

All samples were analyzed in triplicate unless stated otherwise and the results were expressed as average $\pm$ standard deviation. All statistical analyses were performed using the Microsoft Excel 2007 software package (Microsoft Corp., Redmond, WA).

3 Results e discussion

3.1 Melissopalynological analyses of honeys

A total of 22 pollen types, belonging to 16 different botanical families were identified in the honey samples analyzed (Table 1). The high pollen diversity found in the honeys reflects the flora diversity of Amazonas state, a feature that favors the production of honeys with differentiated characteristics.

The pollen type *Clidemia* from the Melastomataceae family was identified in six of the seven samples analyzed. It is present in both state regions in which the honey samples were collected, with the smallest occurrence (1.34%) in the sample CO and the biggest (90.96%) in the sample ME (Table 1). These data point out that the bees *Melipona seminigra merrillae* collect material in species of the Melastomaceae family for the honey production. This family is typically found in vegetable formation of the Amazon rain forest. Its flowers show poricidal anthers and, therefore, they are visited primarily by bees able to vibrate the anthers, in a phenomenon known as buzz pollination, which may be a characteristic of stingless bees (Renner, 1989).

Table 1 – Pollen types found in the samples of honeys produced by bees from the species *Melipona seminigra merrillae* collected in seven counties of Amazonas state.

Family	Pollen Type	BAJ	BAU	LAB	MAO	RP	CO	ME
Anacardiaceae	<i>Tapirira guianensis</i>						SP	
Araliaceae	<i>Schefflera morototoni</i>	-	MP		MP	-	SP	
Arecaceae	<i>Maximiliana maripa</i>	-	-		MP	-		
Arecaceae	<i>Euterpe</i>						SP	MP
Burseraceae	<i>Protium</i>	-	-	MP	-	IMP		MP
Bignoniaceae	<i>Tabebuia</i>			MP			IMP	
Dilleniaceae	<i>Tetracera</i>			MP				
Euphorbiaceae	<i>Alchornea triplinervia</i>						MP	
Fabaceae/ Caesalpinioideae	<i>Mora paraensis</i>	IMP	-		-	-	SP	
Fabaceae/ Caesalpinioideae	<i>Senna</i>	-	MP		-	IMP		
Fabaceae/ Mimosoideae	<i>Mimosa pudica</i>	-	MP		SP	-		
Fabaceae/ Mimosoideae	<i>Stryphnodendron pulcherrimum</i>	-	IMP		-	-	MP	
Fabaceae	<i>Chamaecrista</i>			IMP				
Fabaceae	<i>Zornia echinocarpa</i>			MP				
Malpighiaceae	<i>Byrsonima</i>						IMP	
Melastomataceae	<i>Clidemia</i>	DP	SP		SP	DP	MP	DP
Moraceae	<i>Brosimum</i>	MP	-		-	IMP		
Myrtaceae	<i>Myrcia</i>	-	IMP	DP	-	MP		
Sapindaceae	<i>Serjania</i>	MP	DP		IMP	-		
Sapotaceae	<i>Pouteria</i>						IMP	
Solanaceae	<i>Solanum paniculatum</i>	MP	-	IMP	-	MP		
Urticaceae	<i>Cecropia</i>	-	IMP		-	-		

Dominant pollen (DP); secondary pollen (SP); important minor pollen (IMP); minor pollen (MP)

Boca do Acre = BAJ; Pauini = BAU; Lábrea= LAB, Manaus = MAO; Rio Preto da Eva = RP; Coari = CO; Maués = ME.

The honey samples collected in BAJ, RP and ME, representing the two state regions analyzed presented *Clidemia* pollen in amounts higher than 45% of the overall identified pollen. This evidences the wide distribution of this pollen in Amazonas state. In the analyzed honey samples, no secondary pollen types were found and the percentages of important minor pollen and minor pollen were low, thus leading to the classification of honeys of monofloral origin. On the other hand, although with an important identification to the understanding of the botanical distribution over the geographical region, in the sample CO the *Clidemia* pollen type was identified only as minor pollen and in the samples BAU and MAO as secondary pollen (Table 1). These results may be associated to features that limit the bee access to flowers of this genus, or its incidence may not be prevalent in these counties. In spite of presenting the *Serjania* (Sapindaceae) as the dominant pollen type, the sample BAU displayed *Clidemia* as a secondary pollen, but corresponding to 33.81%, thus being classified as a heterofloral honey.

In the honey collected in LAB the *Myrcia*, Myrtaceae family, pollen type was identified with 77.6 % occurrence, thus being classified as monofloral. The *Clidemia* pollen type was not found, but the place of collection is away for urban areas, located in the Ituxi-Lábrea indian extractive reserve, which display a characteristic native vegetation. The samples MAO and CO were classified as heterofloral, showing two and four secondary pollen types, respectively (Table 1).

3.2 Total phenolic content and antioxidant activity

The total phenolic content of the methanol extracts of the honey samples ranged from 17 to 66 mg GAE /g of extract (Table 2). These figures are supposed to be related to honey floral source, as the phenolic compounds are related to the botanical origin of the nectar and to the species of the honey producing bees (Gheldof & Engeseth, 2002). The samples

classified as monofloral ME, LAB and RP presented the highest amounts of total phenolic contents and the lowest total phenolic contents were observed for the honeys BAU and BAJ.

Table 2. Total phenolic content (TFC) and ABTS•+ radical scavenging activity of the methanol extract of the samples of honey produced by bees from the species *Melipona seminigra merrillae* from Amazonas state.

Methanol Extract	TFC	ABTS•+
	(mg GAE /g *)	(CE ₅₀) µg/mL
BAJ	26.5 ± 1.21	314.5 ± 3.84
BAU	17 ± 0.9	336.8 ± 3.17
LAB	64 ± 2.84	220.3 ± 1.32
MAO	34 ± 1.54	281.3 ± 5.54
RP	43 ± 2.12	266.3 ± 0.48
CO	36 ± 1.71	275.2 ± 1.30
ME	66 ± 2.10	209.2 ± 0.25

*miligrams of gallic acid equivalent per gram of extract

Boca do Acre = BAJ; Pauini = BAU; Lábrea = LAB; Manaus = MAO; Rio Preto da Eva = RP; Coari = CO; Maués = ME.

CE₅₀ = sample concentration required to obtain half of the "ABTS•+ radical scavenging activity.

In relation to the ABTS•+ cation radical scavenging activity, it was noticed that the methanol extracts of the honeys showed activities in which CE₅₀ varied from 209.59 ± 0.25 to 336.8 ± 3.17 mg.mL⁻¹ (Table 2). Among the honeys analyzed, the samples collected at ME, LAB and RP showed the higher antioxidant capacity, probably as a consequence of their higher total phenolic content, when compared with the remaining samples. According to Küçük and co-workers (Küçük et al., 2007), the antioxidant activity can be potentialized by the synergetic interaction between the compounds that display the capacity of scavenging free radicals, like between distinct phenolic compounds.

The samples BAJ and BAU that showed the smallest total phenolic contents also displayed the smallest antioxidant activities. The results of the present paper agree with previous works that report the correlation between total phenolic contents and antioxidant activity (samples displaying smaller total phenolic contents also showed the smaller

antioxidant responses) (Aljadi & Kamaruddin, 2004; Alvarez-Suarez et al., 2012; Bertoncelj, Doberšek, Jamnik & Golob, 2007).

3.3 Phenolic profile

The chromatography data showed the presence of 14 different phenolic compounds in the EtOAct fraction of the studied honeys (Table 3).

Table 3 Phenolic compounds present in EtOAct fraction of the samples of honey produced by bees of the species *Melipona seminigra merrillae* in Amazonas state.

Phenolic Compounds	BAJ	BAU	LAB	MAO	RP	CO	ME
	µg/100g	µg/100g	µg/100g	µg/100g	µg/100g	µg/100g	µg/100g
Gallic acid	18.35	18.16	46.28	92.66	63.59	56.7	34.56
3,4 Dihydroxybenzoic acid	29.41	14.03	nd	205.91	12.89	nd	nd
4-hydroxybenzoic acid	41.97	191.84	nd	423.1	155.82	63.12	160.16
Vanillic acid	29.67	nd	105.79	240.46	nd	nd	nd
Salicylic acid	21.42	nd	nd	168.96	56.49	nd	77.67
Syringic acid	nd	nd	nd	1507.81	nd	294.24	403.91
Coumaric acid	nd	nd	nd	154.85	nd	41.85	145.35
Cinnamic acid	nd	nd	nd	116.35	nd	24.60	nd
Catechol	212.23	138.75	8761.06	132	112.41	nd	171.3
Trans-trans abscisic acid	676.58	576.61	713.99	1592.57	1057.48	nd	756.28
Cis-trans abscisic acid	400.67	296	407.3	1587.36	897.78	nd	181.21
Taxifolin	15.43 x 10 ³	11.60x10 ³	54.07x10 ³	54x10 ³	67.2x10 ³	3.87x10 ³	58.23x10 ³
Naringenin	nd	nd	13x10 ²	nd	nd	nd	nd
Luteolin	nd	nd	2.26x10 ³	nd	nd	nd	nd

*nd- not detected

Boca do Acre = BAJ; Pauini = BAU; Lábrea= LAB; Manaus = MAO; Rio Preto da Eva = RP; Coari = CO; Maués = ME.

The phenolic compounds present in honey may come forth from the nectar of flowers, pollen and propolis and are usually benzoic acid, cinnamic acid and their esters and some flavonoids (Estevinho, Pereira, Moreira, Dias & Pereira, 2008; Silva et al., 2012). In the samples BAJ, BAU, RP and MAO, gallic acid, 3,4 dihydroxybenzoic acid, 4-hydroxybenzoic acid, catechol and the isomers trans-trans abscisic acid and cis-trans abscisic acid were identified. In these same samples the dominant pollen type was the same (*Clidemia*) stressing that the floral source is a factor that may define the phenolic profile in honeys.

The isomers trans-trans abscisic acid and cis-trans abscisic acid were found in high amounts in all the honey samples analyzed, with the exception of the one collected at the county CO. These two isomers of floral origin (Ferrerres, Andrade & Tomás-Barberán, 1996) were already described for honeys collected in New Zealand and Australia (Yao et al., 2003), in Slovenia (Bertoncelj, Polak, Kropf, Korošec & Golob, 2011) and in Northeastern Brazil (Silva et al., 2012). Taking into account that abscisic acid has the function of regulating aspects related to the plant physiology, in response to water stress (Jiang and Hartung, 2008), its presence in the studied honeys is probably a consequence of water stress suffered by botanic species in the Amazon region, which possess an equatorial climate with elevated temperature. The absence of the isomers trans-trans abscisic acid and cis-trans abscisic acid in the CO honey sample may be due to the botanical origin of the region, as the resources to be utilized by the bees depend on their availability in the collect area (Bertoncelj, Polak, Kropf, Korošec & Golob, 2011).

The occurrence of 1, 2-dihydroxybenzene, also known as catechol, in the honey samples was similar to that of the abscisic acid isomers. Besides, it is, to our best knowledge, the first report of the presence of this compound in honeys. Catechol and its derivatives have been reported as being active against the human immunodeficiency virus (HIV) (Melo, Bruni, & Ferreira, 2006).

The flavonoid taxifolin was found in all the analyzed honeys, independently of the dominant pollen type or geographical localization, suggesting that it is a phenolic marker for the honey produced by the species *Melipona seminigra merrillae*, once phenolic compounds may be considered in determining the origin and authenticity of honey (Tomás-Barberán, Martos, Ferreres, Radovic & Anklam, 2001; Alvarez-Suarez et al., 2012). Taxifolin is a flavonoid that is characterized by presenting several hydroxyls what confers it a high antioxidant power. Nonetheless, other biological activities have been ascribed to this flavonoid (Sendra, Sentandreu & Navarro, 2007).

Gallic acid was also found in all the honey samples, in amounts ranging from 18.16 to 92.66 µg/100g. Indeed, its presence is reported in honeys from different countries, as Portugal (Andrade, Ferreres & Amaral, 1997), New Zealand (Yao et al., 2002), Australia (Yao, Jiang, Singanusong, Datta & Rayment, 2005) and Brazil (Silva et al., 2012).

3.4 - Antibacterial and antifungal activities

The results of the antimicrobial activity of the honey samples BAJ, BAU, LAB, MAO, RP, CO and ME are presented in Table 4. Among these studied samples, the acetate fractions corresponding to ME, LAB and CO were active against *S. aureus* and *S. epidermidis*, *C. krusei*, *C. tropicalis* and *C. albicans* with the MIC (Minimal inhibitory concentration) ranging from 256 to 512 µg.mL⁻¹.

Table 4 - Minimal inhibitory concentration (MIC $\mu\text{g.mL}^{-1}$) of the acetate fraction of the honeys produced by bees of the species *Melipona seminigra merrillae* in Amazonas state.

Samples	MIC $\mu\text{g.mL}^{-1}$				
	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermides</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. albicans</i>
	ATCC-25923	ATCC-12228	ATCC-13803	LM-13	ATCC-6645
BAJ	+	+	+	+	+
BAU	+	+	+	+	+
LAB	256	256	512	512	512
MAO	+	+	+	+	+
RP	+	+	+	+	+
CO	512	256	512	512	512
ME	256	256	512	512	512
NC	+	+	+	+	+
PC	-	-	-	-	-

+ = microorganism growth; - = no growth of microorganism

NC = negative control

PC = positive control (Chloramphenicol for bacteria and Nystatin for fungi)

The samples that showed the best antimicrobial activities correspond to the ones that had the highest total phenolic contents. The antimicrobial activity of phenolic compounds is reported by several research groups in studies on Gram+ and Gram – bacteria, as well as yeasts (Estevinho, Pereira, Moreira, Dias & Pereira 2008; Kačániová et al., 2011).

The antimicrobial activity observed in the EtOAc fractions of the honey samples CO, ME and LAB was higher than the one reported for phenolic compounds extracted olives (Pereira et al., 2004), mushrooms (Barros et al., 2007), grape juice and wine (Mato, Suárez-luque & Huidobro et al., 2007). However, other factors like the presence of hydrogen

peroxide, catalase and glucose oxidase, known to be present in honeys of diverse origins (Weston, 2000) may have contributed to the antimicrobial activity of the studied honeys.

4 Conclusions

The honeys RP, ME and LAB, classified as monoflorals together with CO showed the highest total phenolic contents. In the evaluation of the antioxidant activity the highest ABTS•+ cation radical scavenging capacity was observed for the samples that displayed the highest total phenolic contents. In the antimicrobial activity tests, the best results were ascribed to the samples ME, LAB and CO. The flavonoid taxifolin was identified in all the analyzed samples, suggesting that it is a phenolic marker for the species *Melipona seminigra merrillae*. This is the first report on the identification of catechol in Brazilian honey samples.

Acknowledgements

The authors acknowledge the Brazilian agencies FAPEAM – Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas for the financial support.

References

- Alvarez-Suarez, J. M., Giampieri, F., Gonzalez-Paramas, A. M., Damiani, E., Astolfi, P., Martinez-Sanchez, G., Bompadre, S., Quiles, J.L., Santos-Buelga, C., & Battino, M. (2012). Phenolics from monofloral honeys protect human erythrocyte membranes against oxidative damage. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 1508-1516.
- Andrade, P., Ferreres, F. E., & Amaral, M.T. (1997). Analysis of Honey phenolic acids by HPLC, its application to honey botanical characterization. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 20, 2281-2288.

- Aljadi, A. M., & Kamaruddin, M. Y. (2004). Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. *Food Chemistry*, 85, 513–518.
- Barros, L. Calhelha, R. C. Vaz, J. A. Ferreira, I. C. F. R. Baptista, P., & Estevinho, L. M. (2007). Antimicrobial activity and bioactive of Portuguese wild edible mushrooms methanolic extracts. In *European Food Research and Technology*, 225, 151-156.
- Bertoncelj, J., Doberšek U., Jamnik M. E., & Golob, T. (2007). Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chemistry*, 105, 822–828.
- Bertoncelj, J., Polak, T., Kropf, U., Korošec, M., & Golob, T. (2011). LC-DAD-ESI/MS analysis of flavonoids and abscisic acid with chemometric approach for the classification of Slovenian honey. *Food chemistry*, 127, 296-302.
- Baltrušaityte, V., Venskutonis, P. R., & Čeksteryt, V. (2007). Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts. *Food Chemistry*, 101, 502-514.
- Estevinho, L. M., Pereira, A. P., Moreira, L., Dias, L. G., & Pereira, L. (2008). Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 3774-3779.
- Ferreres, F., Andrade, P., & Tomás-Barberán, F. A. (1996). Natural occurrence of abscisic acid in heather honey and floral nectar. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 2053-2056.
- Gheldof, N., & Engeseth, N. J. (2002). Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition

of in vitro lipoprotein oxidation in human serum sample. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3050-3055.

Holetz, F. B., Howes, M. J., Lee, C. C., & Steventon, G. (2002). Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97, 1027-1031.

Houghton, P. J., Howes, M. J., Lee, C. C., & Steventon, G. (2007). Uses and abuses of *in vitro* tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. *Journal of Ethnopharmacology*, 110, 391-400.

Kačániová, M., Vukovic, N., Bobková, A., Fikselová, M., Rovná, K., Haščík, P., Čuboň, J., Hleba, L., & Bobko, M. (2011). Antimicrobial and antiradical activity of Slovakian honeydew honey samples. In *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 1, 354-36.

Küçük, M., Kolaili, S., Karaoğlu, S., Ulusoy, E., Baltacı, C., & Candan, F. (2007). Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chemistry*, 100, 526-534.

Jiang, F., & Hartung, W. (2008). Long-distance signalling of abscisic acid (ABA): the factors regulating the intensity of the ABA signal. *Journal of Experimental Botany*, 59, 37-43.

Louveaux, J., Maurizio, A., & Vorwohl, G. (1978). Methods of melissopalynology. *Bee World*, 59, 139–157.

Mato, I., Suárez-Luque, S., & Huidobro, J. F. (2007). Simple determination of main organic-acids in grape juice and wine by using capillary zone electrophoresis with direct UV detection. In *Food Chemistry*, 102, 104-112.

- Melo, E. B., Bruni, A. T., & Ferreira, M. M. (2006). HIV integrase inhibitors: potential pharmacological approach for the treatment of AIDS. *Quim. Nova*, 29, 555-562.
- Pereira, J. A., Pereira, A. P. G., Ferreira, I. C. F. R., Valentão, P., Andrade, P. B. Seabra, R. Estevinho, L. & Bento, A. (2006). Table olives from Portugal: compounds, antioxidant potential, and antimicrobial activity. In *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 54, 8425-8431.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.
- Renner, S. S. (1989). A survey of reproductive biology in Neotropical Melastomataceae and Memecylaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 76, 496-518.
- Sendra, J. M., Sentandreu, E., Navarro, J. L. (2007). Kinetic model for the antiradical activity of the isolated p-catechol group in flavanone type structures using the free stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl as the antiradical probe. *J. Agric. Food. Chem.* 55, 5512.
- Souza, E. L., Stamford, T. L. M., Lima, E. O., & Trajano, V. N. (2007). Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. *Food Control*, 18, 409-413.
- Slinkard, K., & Singleton, V.L. (1977). Total phenol analyses: Automation and comparison with manual methods. *American Journal Enology and Viticulture*, 28, 49–55.
- Silva, T. M. S., Santos, F. P., Rodrigues, A. E., Silva, E. M. S., Silva, G. S. S., Novais, J. S., C. A., SANTOS, F. A. R., & Camara, C. A. (2006). Chemical composition and free

radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 507-511.

Silva, T. M. S., Santos, F. P., Rodrigues, A. E., Silva, E. M. S., Silva, G.S.S; Novais, J.S., C. A., Santos, F. A. R., & Camara, C.A . (2012). Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaira (*Melipona subnitida*) honey *Journal of Food Composition and Analysis*, 14, 678-684.

Tomás-Barberán, F. A., Martos, I., Ferreres, F., Radovic, B.S., & Ankam, E. (2001) HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 485-496.

Weston, R. J., Brocklebank, K. L., & Lu, Y. (2000). *Identification and quantitative levels of antibacterial components of some New Zealand honeys*. *Food Chemistry*, 70, 427-35.

Yao, L., Datta, N., Tomas-Barberan, F. A., Ferreres, F., Martos, I., & Singanusong, R. (2003). Flavonoids, phenolic acids and abscisic acid in Australian and New Zealand *Leptospermum* honeys. *Food Chemistry*, 81, 159-168.

Yao, L. H., Jiang, J. M., Singanusong, R., Datta, N., & Rayment, K. (2004). Phenolic acids and abscisic acid in Australian *Eucalyptus* honeys and their potential for floral authentication. *Food Chemistry*, 86, 169–177.

5.3 ARTIGO 3

Determination of total phenolic content and evaluation of the antioxidant activity of honeys from Amazon

Isnandia Andréa Almeida da Silva^{1}, Tania Maria Sarmento da Silva², Celso Amorim Camara², Antonia Lúcia de Souza³, Antonio Gouveia de Souza^{1,4}*

¹*Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia dos Alimentos, CT, Universidade Federal da Paraíba, 58051-970, Campus I, João Pessoa - Paraíba, Brasil.*

²*Departamento de Ciências Moleculares, Universidade Federal Rural de Pernambuco, CEP 52171-900, Pernambuco, Brasil.*

^{3,4}*Laboratório de combustíveis e de Materiais (LACOM), Departamento de Química, CCEN, Universidade Federal da Paraíba, 58059-970, Campus I, João Pessoa - Paraíba, Brasil.*

*Corresponding author: Tel.: +55 83 9964-4199 fax: +55 83- 8163- 1220.
E-mail: andreaulbra@hotmail(IAA Silva)

ABSTRACT

The total phenolic content was determined by Folin-Ciocalteu methodology of honeys and the ethyl acetate fraction of the methanol extract of honeys, from seven municipalities of Amazonas State: Boca do Acre (BAJ), Pauini (BAU), Manaus (MAO), Rio Preto da Eva (RP), Lábrea (LAB), Maués (ME) and Coari (CO). It was also evaluated the antioxidant activity of the samples by scavenging ABTS^{•+}, β -carotene/linoleic acid system, ferric reducing antioxidant power (FRAP) and radical scavenging hydroxyl. Efficiency in radical sequestration DPPH[•] was also determined for the ethyl acetate fractions. The results indicated good antioxidant activity for the honeys and the fractions in all applied tests. It was also observed a strong correlation between the phenolic content and the results of tests of antioxidant activity, exception for β -carotene/linoleic acid system. It was not observed influence from the proximities of the collection locations and the antioxidant activity of the samples.

Keywords: antioxidant activity, honey, Amazonas bees, ethyl acetate fraction

1. Introduction

The phenolic compounds present in the honey, can be considered potential markers of the floral origin (Alvarez-Suarez et al., 2012) and together with ascorbic acid, alpha tocopherol, carotenoids, amino acids, proteins, organic acids and enzymes catalase, glucose oxidase and peroxidase, by acting in synergy, can be responsible for many of the biological and therapeutics properties (Hermosín et al., 2003; Baltrusaityte et al., 2007; Erejuwa et al., 2012).

Many research have been limited in study the components of honey, such as amino acids, proteins, trace elements, sugars, volatile and pollen (Popek, 2002, Hermosín et al., 2003, Finola et al., 2007, Küçük et al, 2007), though studies on the antioxidant activity of honeys has increased, it is necessary a better evaluation of this activity (Beretta et al., 2005; Blasa et al., 2006, Bertoncelj et al., 2007). Some methods have already been employed to evaluate the antioxidant activity of honey such as the capture of hydrogen by free radical 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH), or capture the radical 2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6 sulfonic acid) (ABTS), Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP), chemoluminescence, based on the Fenton reaction in addition to the method that inhibits the oxidation, through capture the radical peroxy (ORAC) (Gheldof and Engeseth, 2002, Beretta et al, 2005, Küçük et al, 2007).

The State of Amazonas – Brazil has a diversified fauna and flora in this biome can be found more than 300 species of stingless bees. The honey produced by native bees of Amazon is largely used by the local natives with therapeutic purposes, but there are few studies that prove these properties.

The aim of this study was to evaluate the antioxidant activity of honey bee *Melipona semingra merillae* collected in November 2009 and 2010 in the municipality of Boca do Acre (BAJ), Pauini (BAU), Manaus (MAO), Rio Preto da Eva (RP), Lábrea (LAB), Maués (ME)

and Coari (CO) of the State of Amazonas, Brazil, through tests of DPPH, ABTS, FRAP, Kidnapping of hydroxyl radical ($\text{HO}\cdot$), system β -carotene/linoleic acid.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and standards

The Folin-Ciocalteu reagent, *trans*- β -carotene-type 1 synthetic, DPPH (2,2'-diphenyl-1-picryl-hydrazyl), (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chromane-2-carboxylic acid 97%) Trolox, Thiobartituric acid (TBA), ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA), deoxyribose, trichloroacetic acid (TCA), potassium persulphate, sodium acetate, ferric chloride hexahydrate, ferrous sulphate heptahydrate, 2,4,6 tri (2-pyridyl)-S-triazine (TPTZ), ascorbic acid and tween 40 were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Gallic acid, ABTS (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt, linoleic acid were purchased from Fluka (Buchs, Switzerland). Solvents used were purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

2.2. Samples

The honey samples were collected directly from beekeepers in the state of Amazonas, in November 2009 and 2010 in the cities of Manaus (MAO), Boca do Acre (BAJ), Pauini (BAU), Lábrea (LAB), Rio Preto da Eva (RP), Coari (CO) and Maués (ME). The collect was performed with 20 mL sterile syringes and the honey was transferred to 600 mL polyethylene bottles, stored at 8 °C until the moment of the analysis.

2.3. Preparations of methanolic extracts and fractions of ethyl acetate (EtOAc)

The phenolic substances of the honey were determined according to methodology previously described in the literature (Andrade et al., 1997). 50 g of honey were measured and added to 250 mL of acidified water (pH 2) and 100 g of Amberlite XAD-2 resin (Supelco, Bellefonte, PA, 146 USA, pore size 9 nm, particle size 0.3-1.2 mm). This mixture was homogenized on a magnetic stirrer for 30 minutes.

The amberlite resin particles were the packed on a glass column (42 x 3.2 cm), washed with acidified water (pH 2 with 250 mL HCl) and subsequently rinsed with distilled water (300 mL). The phenolic compounds were extracted with 300 mL of methanol and the solvent removed at 40 °C under reduced pressure.

5 mL of distilled water and 5 mL of ethyl acetate were added to 1 g of the methanol extract to obtain the fractions of ethyl acetate (EtOAc) BAJfa, BAUfa, MAOfa, RPfa, LABfa, MEfa and COfa. The resulting solution was homogenized in an ultrasonic bath for 10 minutes and transferred to a separatory funnel. The upper phase containing the ethyl acetate fraction was collected and concentrated at 40 °C under reduced pressure.

2.4. Determination of total phenolic content

The determination of total phenolic content present in the honeys samples and the AcOEt fractions was determined by modified Folin-Ciocalteu colorimetric method (Slinkard and Singleton, 1977). An aliquot of 300 μ L of acetate fraction (1 mg/mL) and pure honey (100 mg/mL) were transferred to a test tube. 60 μ L of reagent Folin-Ciocalteu and 2.460 μ L of distilled water were added and stirred for 1 min. 180 μ L of Na₂CO₃ (15%) were added to the mixture and agitated for 30 seconds, resulting in a final concentration of 100 μ g/mL for acetate fraction and 10 mg/mL for the honey. After two hours, the absorbance of samples was measured in a spectrophotometer UV-vis Shimadzu, model UV-2550 at 760 nm. Analyses

were performed in triplicate. The total phenolic content (FT) was determined by interpolating the absorbance of the samples against a calibration curve constructed from standards of gallic acid (1-15 µg/mL) and expressed as milligrams equivalent to gallic acid per gram of extract (mg EAG/g).

2.5. Antioxidant activity

2.5.1. Free radical-scavenging activity on 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

The DPPH assay was performed following the methodology described by Brand-Williams et al. (1995) and Silva et al. (2006) with minor modifications. Each acetate fraction solution was prepared at 2.0 µg/mL. Aliquots 2.7 mL of the solution of DPPH[•] (23.6 µg/mL in EtOH) were added to samples in order to obtain final concentrations ranged from 10 to 300 µg/mL.

The absorbance measurements were carried out in triplicate. After 30 minutes of agitation at ultrasound apparatus, the amount of DPPH radical was recorded UV-vis Spectrophotometer Shimadzu, model UV-2550 at a wavelength of 517 nm. Ascorbic acid was used as positive control. The percentage of scavenging activity (% AS) was calculated by equation:

$$\% AS = 100 \times \left(\frac{A_{control} - A_{sample}}{A_{control}} \right)$$

Where $A_{control}$ is the absorbance of control, the ethanol solution containing only of the radical DPPH[•] and A_{sample} is the absorbance of the radical in presence the sample. The results were expressed as $CE_{50} \pm SD$, which represents the concentration of sample required to obtain half of radical scavenging activity DPPH[•].

2.5.2. Antioxidant activity by the ABTS^{•+} assay

The ABTS assay was conducted following the methodology described by Re et al. (1999). The ABTS^{•+} radical cation was prepared by reacting 7 mM ABTS solution with 2.45 mM potassium persulphate. This solution was incubated at 23 °C temperature in the dark for a period of 16 h. The ABTS^{•+} was diluted in ethanol until an absorbance (A) of 0.7 at a wavelength of 734 nm in the UV- vis spectrophotometer Shimadzu, model UV-2550. Each fraction acetate stock solution was prepared at 2.0 mg/mL and for honey the stock was 100 mg/mL. Aliquots 2.7 mL of the recently prepared solution of ABTS^{•+} were added to the samples in order to obtain 10 to 200 µL/mL final concentration of fraction acetate and 5 to 30 mg/mL for honey. The solution was agitated for 10 minutes. The absorbance of samples and control were measured on a UV-Visible Spectrophotometer at a wavelength of 734 nm. The percentage of scavenging activity (%AS) was calculated by equation:

$$\% AS = 100 \times \left(\frac{A_{control} - A_{sample}}{A_{control}} \right)$$

Where $A_{control}$ is the absorbance of the control, containing only the alcohol solution of the radical ABTS^{•+}, and A_{sample} is the absorbance of the radical in presence the sample. The results were expressed as $CE_{50} \pm D.P.$, which represents the sample concentration required to obtain half of the radical scavenging activity of ABTS^{•+}.

2.5.3 Antioxidant activity in β -carotene/linoleic acid system

This experiment was conducted using the method of Emmons et al. (1999). The solution of β -carotene/linoleic acid was prepared by adding 50 µL of β -carotene solution (20 mg/mL in chloroform) in a Erlenmeyer of 250 mL with 80 µL of linoleic acid and 660 µL of tween 20 (polyoxyethylene sorbitan monopalmitate). 90 mL of distilled water (pretreated

under oxygen atmosphere for 30 minutes). The absorbance of the emulsion was adjusted from 0.6 to 0.7 nm to 470 nm in the UV- vis spectrophotometer Shimadzu, model UV-2550. Aliquots of 2.7 mL of the carotene/linoleic acid emulsion were mixed with the honey samples (20 mg/mL honey pure, and 200 µg/mL EtOAc fraction) and incubated in a water bath at 40 °C. The oxidation was monitored spectrometrically by measuring the absorbance at 470 nm over a period of 60 min. The control sample used was solvent in place of the extract. The antioxidant activity was expressed as the percentage of inhibition relative to the control after a 60 min incubation period using the following equation:

$$AA = 100 \times \left(\frac{DR_C - DR_S}{DR_C} \right)$$

Where AA is the antioxidant activity, DR_C is the degradation rate in the presence of the control (=Absi-Absf), DR_S is the degradation rate in the presence of the sample (=Absi-Absf), Absi is the initial absorbance at time 0 and Absf is the absorbance at 20, 40, 60 and 80 min. Trolox (a water-soluble Vitamin E analog) at a concentration of 16 µg/mL was used as the reference antioxidant.

2.5.4 Hydroxyl ($HO\cdot$) radical-scavenging activity

The experiment was performed as described in Halliwell et al. (1987), with modifications. 200 µL of pure honey (100-15000 µg/mL) and 200 µL of acetate fraction (10-250 µg/mL) were added to a reaction mixture containing 200 µL deoxyribose (DR, 2.8 mM), 400 µL of the mixing ferric III chloride (20 µM) and EDTA (100 µM), 200 µL H_2O_2 (200 µM in a buffer solution of potassium phosphate pH 7.4) and 200 µL of phosphate buffer, then the tubes were stirred. The reaction was initiated by addition of ascorbate (300 µM) and subsequent incubation of the mixture for 30 minutes at 37 °C. After this 1.4 mL of

thiobarbituric acid (50 mM NaOH in 1%) and 1.4 mL of trichloroacetic acid (TCA, 2.8%) were added and the mixture was heated for 15 minutes in a water bath. The amounts of chromogens produced were measured at 532 nm in the UV- vis spectrophotometer Shimadzu, model UV-2550. The positive control was added 200 μ L of distilled water. The calculation of the antioxidant activity was done using the following equation.

$$AA = 100 - \left(\frac{100 \times A_{sample}}{A_{control\ positive}} \right)$$

Where AA is the antioxidant activity, *A_{sample}* is the absorbance of the radical in presence the sample and *A_{control positive}* is the absorbance of the control, containing only the reagents. The results were expressed as CE₅₀ $\pm$ D.P., which represents the sample concentration required to obtain half of the radical scavenging activity of *Hydroxyl (HO $\cdot$)*

2.5.5 Ferric-reducing antioxidant Power (FRAP) assay

This experiment was performed according to Benzie and Strain (1996) with some modifications. The FRAP solution was obtained from the combination of acetate buffer solution 0.3 M, 10 mM TPTZ solution and aqueous solution of iron chloride 20 mM. Aliquots of 90 μ L of each sample at three different concentrations were homogenized with 2.7 mL of FRAP reagent (freshly prepared) and 270 μ L of distilled water.

The solutions were stirred in water bath at 37 °C for 30 minutes. The absorbance of samples and FRAP were measured on a UV- vis spectrophotometer Shimadzu, model UV-2550 at 595 nm. 250-2000 μ M of ferrous sulfate (FeSO₄.7H₂O) were used for g the calibration curve and results were expressed as mean $\pm$ standard deviation μ M ferrous sulfate/g ethyl acetate fraction of honey and μ M ferrous sulfate/g of honey.

2.6 Statistical analysis

The results were expressed as means $\pm$ SD (standard derivation). Analyzed in the Action 2.4 (ESTATCAMP, 2012) using ANOVA, tukey tests, considering $p < 0.05$. The correlation (r) was calculated among total phenolic and methods of analysis of antioxidant activity.

3. Results and discussion

3.1. Total phenolic content (TPC)

The results present in Table 1, show that the total phenolic content varied broadly in the samples of honey and the fractions. Higher value of total phenolic content found in honey ME and in LAB and the lowest in BAJ and CO. The same result was not observed in acetate fractions of these honeys, these samples showed levels of phenolic in the following order: MEfa > LABfa > RPfa > COfa > MAOfa > BAJfa > BAUfa. These variations in the levels of phenolic samples can be attributed to the floral source because the phenolic content is strongly correlated with the source of nectar and with the bee species (Beretta et al., 2005).

A variation of phenolic was also observed in studies by Beretta et al. (2005) and Al-Mamary et al. (2002) by analyzing 14 samples of commercial honeys of different geographical origins, and searching for samples of honey from different countries, respectively. Bertonseljet et al. (2007), studying the Slovenian honeys found phenolic levels ranging from 4.48 to 24.14 mg GAE/100 g, these values being much lower than those found in this study.

Table 1 – Total phenolic content expressed in mg GAE/100 g in the pure honey and mg GAE/ by gram of fraction.

Honey	TPC	Fraction AcOEt	TPC
BAJ	42.54 ± 0.36 ^d	BAJfa	50.41 ± 0.71 ^f
BAU	52.17 ± 1.01 ^e	BAUfa	44.92 ± 0.60 ^g
MAO	62.21 ± 0.42 ^b	MAOfa	67.19 ± 0.62 ^b
RP	59.07 ± 0.05 ^c	RPfa	82.84 ± 0.73 ^c
LAB	78.25 ± 0.48 ^a	LABfa	120.4 ± 0.97 ^e
ME	79.26 ± 0.34 ^a	MEfa	132.03 ± 0.30 ^a
CO	43.73 ± 0.42 ^e	COfa	77.82 ± 0.68 ^d

Values are mean ± standard deviation, n =3. Mean followed by different letters in the same column differs significantly (p < 0.05).

Boca do Acre = BAJ; Pauini = BAU; Manaus = MAO; Rio Preto da Eva = RP; Coari = CO; Maués = ME; Lábrea= LAB.

3.2 Free radical-scavenging activity on DPPH·

According to Table 2, the acetate fractions honeys presented free radical scavenging activity with EC₅₀ varying from 30.59 ± 0.25 to 244.83 ± 3.17 mg/mL in the following order of free radical scavenging activity: MEfa>LABfa>COfa>RPfa>MAOfa>BAJfa>BAUfa.

Table 2. Free radical-scavenging activity on DPPH· of the acetate fractions of methanolic extracts of honey. The results were expressed as CE₅₀, which represents concentration of sample necessary to obtain half of the scavenging activity DPPH radical.

Samples	DPPH· (CE ₅₀) µg/mL
BAJfa	156 ± 8.84 ^b
BAUfa	244.83 ± 3.17 ^a
MAOfa	128.36 ± 5.54 ^c
RPfa	101.35 ± 1.30 ^d
LABfa	62.09 ± 1.32 ^e
MEfa	30.59 ± 0.25 ^f
COfa	98.91 ± 0.48 ^d
ascorbic acid	2.31 ± 0.05 ^g

Values are mean ± standard deviation, n = 3. Mean followed by different letters in the same column differs significantly (p < 0.05).

Boca do Acre = BAJ; Pauini = BAU; Manaus = MAO; Rio Preto da Eva = RP; Coari = CO; Maués = ME; Lábrea = LAB.

According to Campos et al. (2003) extracts are active when present values of activity CE₅₀ < 500 µg/mL. This indicates that the honey evaluated in the study can be considered as potential source of natural antioxidants, seeing that the values CE₅₀ and the fractions ethyl acetate are well below this value. A high correlation was found (r = 0.90) between the total phenolic compounds and the CE₅₀ fractions acetate honeys, indicating that phenolic compounds are components responsible for antiradical effects of the honey but, obviously, other factors are involved.

3.3 Antioxidant activity by the ABTS^{•+} assay

According to Table 3, the honey showed scavenging activity of the free radical with CE₅₀ ranging from 6.52 ± 0.07 to 22.49 ± 0.34 mg/mL. Presenting the following order ME > MAO, LAB > RP > BAJ > BAU > CO. To analyze the correlation between the values CE₅₀

and the contents phenolic of honey was used the correlation coefficient ($r^2 = 0.89$) indicating the importance of phenolic on scavenging activity front of the $ABTS^{\cdot+}$ radical cation.

The honey fractions AcOEt have submitted scavenging activity of the free radical with CE_{50} ranging from 23.10 ± 0.44 to 104.23 ± 3.78 $\mu\text{g/mL}$. Presenting the following order MEfa, LABfa>COfa>RPfa, MAOfa>BAJfa>BAUfa. A high correlation ($r = 0.96$) was found between the total phenolic content of honey and CE_{50} values ($ABTS^{\cdot+}$) of acetates fractions, this correlation being superior to the honey. Similar results of correlation were also obtained by Gheldof and Engeseth (2002) determined the antioxidant activity of extracts purified of the honey. This fact can be attributed to the use of the pure honey, which contains more than 200 substances, which may interact with each other, and being responsible for the antioxidant power of pure honey (Muñoz and Copaja, 2007).

Table 3 – Antioxidant activity by the $ABTS^{\cdot+}$ assay. The results were expressed as CE_{50} , which represents the concentration of sample required to obtain half the radical scavenging activity of $ABTS^{\cdot+}$.

Honey	$ABTS^{\cdot+}$ $CE_{50}\text{mg/mL}$	AcOEt Fractions	$ABTS^{\cdot+}$ $CE_{50}\mu\text{g/mL}$
BAJ	18.07 ± 0.55^c	BAJfa	88.68 ± 6.8^b
BAU	19.55 ± 0.28^b	BAUfa	104.23 ± 3.78^a
MAO	8.40 ± 0.29^e	MAOfa	66.44 ± 0.93^c
RP	16.09 ± 0.47^d	RPfa	58.79 ± 0.81^c
LAB	8.90 ± 0.34^e	LABfa	28.57 ± 0.21^e
ME	6.52 ± 0.07^f	MEfa	23.10 ± 0.44^e
CO	22.49 ± 0.34^a	COfa	50 ± 1.44^d
Trolox	2.79 ± 0.04^g	Trolox	2.82 ± 0.05^f

Values are mean $\pm$ standard deviation, $n = 3$. Mean followed by different letters in the same column differs significantly ($p < 0.05$).

Boca do Acre = BAJ; Pauini = BAU; Manaus = MAO; Rio Preto da Eva = RP; Coari = CO; Maués = ME; Lábrea = LAB.

It was still observed that the radical scavenging activity was more effective using the ABTS^{•+} method. This can be attributed to the fact that it possess the same high sensitivity, which can evaluate the antioxidant activity of compounds of hydrophilic nature and lipophilic while the DPPH[•] only evaluates activity of compounds of hydrophilic nature (ARNOA, 2000). The correlation between antirradicalares tests (DPPH[•] and ABTS^{•+}) in acetate extract was also analyzed, the correlation coefficient $r = 0.96$ indicates a strong correlation between the two tests, Figure 2.

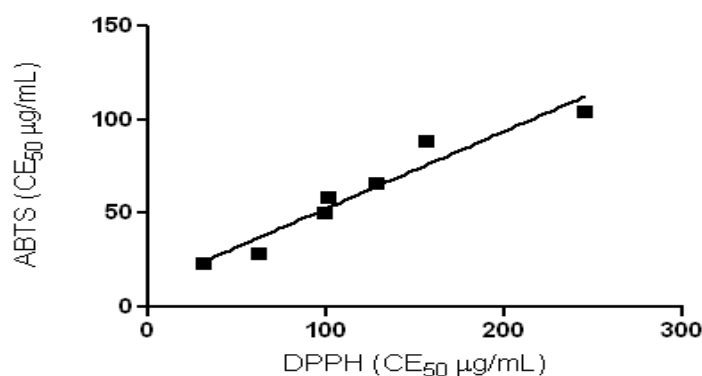


Figure 2- Correlation between the values CE₅₀ of the tests radical ABTS^{•+} and DPPH[•] of the acetate fraction of honey.

3.4 Antioxidant activity in β -carotene/linoleic acid system

According Von Gadew et al., (1997) the method of co-oxidation using the β -carotene/linoleic acid system is simple and sensitive. This method permit to evaluate the capacity of a substance to prevent the oxidation of β -carotene, protecting the free radicals generated during peroxidation of linoleic acid. The addition of an antioxidant sample contributes to slowing decrease in absorbance of β -carotene which is monitored at 470 nm.

The antioxidant activity of honey and fractions AcOEt in model β -carotene/linoleic acid in the inhibition time 60 minutes is represented in Table 4. The honey presented inhibitory activity ranging from $40.79 \pm 1.51\%$ to $63.7 \pm 0.27\%$. Among the honey, ME

presented better activity, followed by MAO, LAB, CO, RP, BAU and BAJ. In the acetate fractions, the activity varied from $37.83 \pm 0.86\%$ to $63.93 \pm 0.50\%$ and MAOfa presented higher antioxidant activity followed by MEfa, LABfa, RPfa, COfa, BAUfa and BAJfa.

Table 4. % Oxidation Inhibition (OI%) by the method of β -carotene in the time of 60 minutes. Concentration of 200 $\mu\text{g/mL}$ of the fraction acetate, 10 mg/mL pure honey and 200 $\mu\text{g/mL}$, positive control.

Honey	β -Carotene bleaching (% O.I) (% I em T = 60 min) 10mg/mL	AcOEt fractions	β -Carotene bleaching (% O.I) (% I em T = 60 min) 100 $\mu\text{g/mL}$
BAJ	40.79 ± 1.51^f	BAJfa	37.83 ± 0.86^f
BAU	48.16 ± 0.31^e	BAUfa	47.00 ± 0.80^e
MAO	61.75 ± 1.39^{ab}	MAOfa	63.93 ± 0.50^a
RP	53.17 ± 0.15^d	RPfa	50.31 ± 0.99^{cd}
LAB	60.24 ± 0.56^b	LABfa	52.33 ± 0.89^{bc}
ME	63.70 ± 0.27^a	MEfa	54.18 ± 1.32^b
CO	57.17 ± 0.72^c	COfa	48.69 ± 0.88^{de}
Trolox	77.40 ± 1.84^g	trolox	76.40 ± 1.12^g

Values are mean $\pm$ standard deviation, n =3. Mean followed by different letters in the same column differs significantly (p < 0.05).

Boca do Acre = BAJ; Pauini = BAU; Manaus = MAO; Rio Preto da Eva = RP; Coari = CO; Maués = ME; Lábrea= LAB.

The percentage inhibition of the antioxidant activity of samples MAOfa, LABfa, MEfa and RPfa were higher than 50% protection, which makes these samples a good antioxidant activity and may be applied as tools in the inhibition of lipid oxidation in foods. There was no correlation between the total phenolic content and antioxidant activity of honey (0.54) and acetate fraction (0.37) by β -carotene/linoleic acid system, collaborating with studies Mariod, et al., (2006). Who reported no correlation between the amount of phenolic and degradation of β -carotene.

3.5 Ferric-reducing antioxidant power (FRAP) assay

This is a fast and accurate method to measure the total antioxidant power of biological fluids. It is based on the ability of phenol to reduce Fe^{3+} to Fe^{2+} . When this occurs in the presence of 2,4,6-tri(2-pyridyl-1,3,5-triazine (TPZ), the reduction is accompanied by the formation of a colored complex with Fe^{2+} , being monitored by spectrophotometer in the visible region (595 nm) (Surveswaran et al., 2007). The honey samples and the fractions AcOEt showed antioxidant capacity varying from 118.12 ± 0.96 to 51.53 ± 0.963 μMol of Fe^{2+}/g and 39.42 ± 1.34 to 16.71 ± 1.23 mMol of Fe^{2+}/g respectively. The honey sample LAB showed antioxidant capacity in order followed by $\text{ME} > \text{RP}$, $\text{MAO} > \text{BAJ} > \text{BAU} > \text{CO}$. In the fractions, MEfa and LABfa also showed better antioxidant activity, but responses were observed in the different fractions in the order $\text{LABfa} > \text{RPfa} > \text{MEfa} > \text{COfa}$, $\text{MAOfa} > \text{BAUfa} > \text{BAJfa}$ as compared with their respective honeys. The values are represented in Table 5.

Table 5. Antioxidant capacity determined by method FRAP and expressed in μMol Fe^{2+}/g honey and mMol Fe^{2+}/g of AcOEt fraction.

Honey	μMol Fe^{2+}/g Honey	AcOEt fraction	mMol Fe^{2+}/g AcOEt
BAJ	$91 \pm 0.25^{\text{d}}$	BAJfa	$16.71 \pm 0.24^{\text{g}}$
BAU	$68.99 \pm 0.58^{\text{e}}$	BAUfa	$17.62 \pm 0.04^{\text{f}}$
MAO	$105.13 \pm 0.63^{\text{c}}$	MAOfa	$22.30 \pm 0.17^{\text{ed}}$
RP	$105.18 \pm 0.156^{\text{c}}$	RPfa	$34.50 \pm 0.14^{\text{b}}$
LAB	$118.12 \pm 0.96^{\text{a}}$	LABfa	$39.42 \pm 0.08^{\text{a}}$
ME	$109.61 \pm 0.60^{\text{b}}$	MEfa	$30.70 \pm 0.33^{\text{c}}$
CO	$51.53 \pm 1.02^{\text{f}}$	COfa	$22.98 \pm 0.18^{\text{d}}$

Values are mean $\pm$ standard deviation, $n = 3$. Mean followed by different letters in the same column differs significantly ($p < 0.05$).

Boca do Acre = BAJ; Pauini = BAU; Manaus = MAO; Rio Preto da Eva = RP; Coari = CO; Maués = ME; Lábrea = LAB.

The correlation coefficients between the content of total phenolic and the capacity values antioxidant of the samples in the assay FRAP have been ($r = 0.86$) for honey and ($r = 0.82$) for acetate fraction.

3.6 Hydroxyl ($\text{HO}\cdot$) radical scavenging assay

One of the specific methods to determine the sequestration of the hydroxyl radical is attempted by testing 2-deoxyribose. In this assay, $\text{HO}\cdot$ is generated by reaction of the ferric chloride (FeCl_3) with ethylenediamine tetra-acetic acid (EDTA) in the presence of ascorbate. Initially, the formation of the complex Fe (II)-EDTA with ascorbate oxidized. Then the H_2O_2 reacts with Fe (II)-EDTA forming the Fe (III)-EDTA and the radical $\text{HO}\cdot$ through the Fenton reaction. The radical formed can then react with 2-deoxyribose to form products which, under heating with thiobarbituric acid at low pH presented pink color. The reaction products are detected in the visible region (532 nm). Substances exhibiting antioxidant properties compete with the 2-deoxyribose radical, producing a decrease in the intensity of staining (Halliwell and Gutteridge, 1981).

The honey samples and AcOEt fractions presented sequestration of hydroxyl radical ($\text{HO}\cdot$) ranging from 0.41 to 2.92 $\mu\text{g/mL}$ and 142.33 to 230.86 mg/mL respectively. The honey sample LAB showed higher capacity to sequestration followed by MAO, ME, RP, CO, BAJ and BAU. About to the fraction, LABfa also was the one presenting the best result, followed by MEfa, RPfa, COfa, MAOfa, BAJfa and BAUfa (Figures 3 and 4).

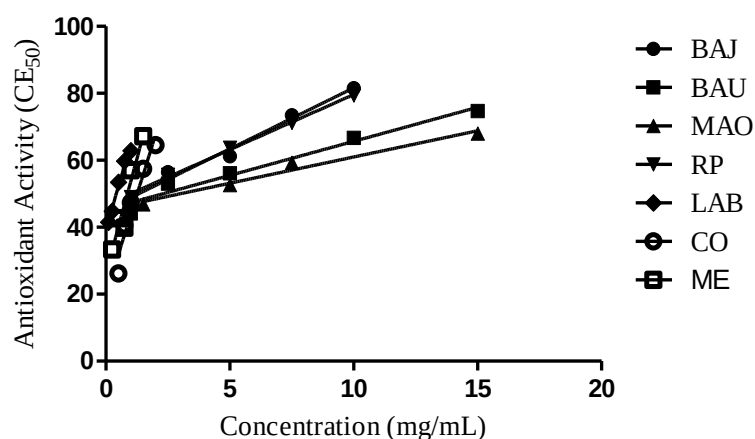


Figure 3-Hydroxyl ($\text{HO}\cdot$) radical-scavenging activity of honey

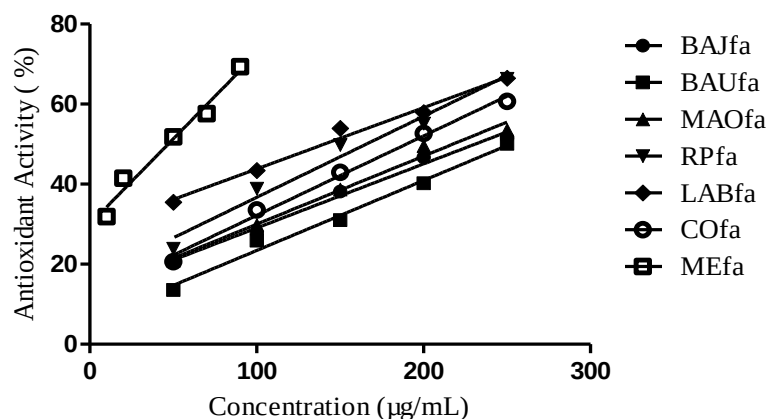


Figure 4. Hydroxyl (HO•) radical-scavenging activity of AcOEt fractions.

The correlation coefficient ($r = 0.93$) indicates a correlation between the values of total phenolic of the honeys and the CE_{50} of assay Hydroxyl (HO•) acetate fraction of the honeys. There was no correlation between CE_{50} of the honeys and total phenolic content ($r = 0.51$).

4. Conclusion

The honey samples evaluated in this study, even as to their respective ethyl acetate fractions presented a promising antioxidant activity in all assays (ABTS^{•+}, DPPH•, Hydroxyl (HO•) radical scavenging, β -carotene/linoleic acid system and FRAP). It was not observed a relationship between the antioxidant capacity and proximity of collection locations of the honey, as the samples ME and LAB, geographically distant, presented the contents of phenolic more elevated and greater antioxidant activity in all methods applied in this work. With respect to methods evaluation of the antioxidant activity applied, observed a correlation between them and total phenolic contents of the honey samples and fractions of ethyl acetate, with the exception of β -carotene/linoleic acid system.

Acknowledgements

The authors acknowledge the Brazilian agencies FAPEAM – Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas for the financial support.

References

- Andrade, P., Ferreres, F. E., Amaral, M.T. (1997). Analysis of Honey phenolic acids by HPLC, its application to honey botanical characterization. *J. of Liq. Chromatogra. R. T.*, 20, 2281-2288.
- Alvarez-Suarez, J.M., Giampieri, F., Gonzalez-Paramas, A.M., Damiani, E., Astolfi, P., Martinez-Sanchez, G., Bompadre, S., Quiles, J.L., Santos-Buelga, C., Battino, M. (2012). Phenolics from monofloral honeys protect human erythrocyte membranes against oxidative damage, *Food and Chem.Toxicol.*, 50, 1508-1516.
- Al-Mamary, M., Al-Meer, A., Al-Habori, M. (2002). Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutr. Res.*, 22, 1041-1047.
- Arnao, M. B. (2000). Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends Food Sci. Technol.*, 11, 419-421.
- Baltrusaityte, V., Venskutonis, P.R., Ceksteryte, V. (2007). Antibacterial activity of honey and Bee bread of different origin against *S. aureus* and *S. epidermidis*. *Food Tech. Biotechnol.*, 45, 201-208.
- Bertoncelj, J., Doberšek, U., Jamnik, M., Golob, T. (2007). Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chem.*, 105, 822-828.
- Benzie, I. F., Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal. Biochem.*, 239, 70-76.
- Beretta, G., Granata, P., Ferrero, M., Orioli, M., Maffei, F.R. (2005). Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Anal. Chim. Acta*, 533, 185-191.

- Brand-williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci. Technol.*, 28, 25-30.
- Blassa, M., Candracchi, M., Accorsi A., Piacentini, M.P., Albertini, M.C., Piatti, E. (2006). Raw *millefiori* honey is packed full of antioxidants. *Food Chem.*, 97, 217-222.
- Campos, M. G., Webby, R F., Markham, K.R., Mitchell, K.A., Da Cunha, A. P. (2003). Age-induced diminution of free radical scavenging capacity in bee pollens and the contribution of constituent flavonoids. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 742-745.
- Emmons, C.L., Peterson, D.M., Paul, G.L. (1999). Antioxidant capacity of oat (*Avena sativa* L.) extracts. 2. In vitro antioxidant activity and contents of phenolic and tocol antioxidants. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 4894-4898.
- Erejuwa, O.O., Sulaiman, S.A., Wahab, M.S.A. (2012). Honey: A novel antioxidant. *Molecules*, 17, 4400-4423.
- Finola, M.S., Lasangno M.C., Marioli, J.M. (2007). Microbiological and chemical characterization of honeys from central Argentina. *Food Chem.*, 100, 1649-53.
- Gheldof, N., Engeseth, N.J. (2002): Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of *in vitro* lipoprotein oxidation in human serum samples. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 3050–3055.
- Hermosín, I., Chicon, R.M., Cabezudo, D. (2003). Free amino acids and botanical origin of honey. *Food Chem.*, 83, 263-268.
- Halliwel, B., Gutteridge, J.M.C. Aruoma, O.I. (1987). The deoxyribose method: a simple test tube assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal. Biochem.*, 165, 215-219.
- Mariod, A.A., Matthus, B., Eichner K., Hussein, I.H. (2006). Antioxidant activity of extracts from *Sclerocarya birrea* kernel oil cake. *Grasas y Aceites*, 57, 361-366.
- Muñoz, O., Copaja, S. (2007). Contenido de flavonoides y compuestos fenólicos de mieles chilenas e índice antioxidante. *Quim. Nova*, 30, 848-851.

- Popek, S. (2002). A procedure to identify a honey type, *Food Chem.*, 79, 401-406.
- Re, R., Pelegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical Biol. Med.*, 26, 1231-1237.
- Slinkard, K., Singleton, V.L. (1977). Total phenol analyses: Automation and comparison with manual methods. *Am. J. Enol.Vitic.*, 28, 49-55.
- Silva, T. M. S., Camara, C.A., Lins, A. C.S.,Barbosa, J. M., Silva, E. M. S., Freitas, B. M., Santos, F.A.R. (2006). Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. *J. Food Comp. Anal.*, 19, 507-511.
- Surveswaran, S., Cai, Y.Z., Corke, H., Sun, M. (2007). Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chem.*, 102, 938–953.
- Von Gadew, A., Joubert, E., Hansmann, C. F. (1997). Comparison of the Antioxidant Activity of Aspalathin with That of Other Plant Phenols of Rooibos Tea (*Aspalathuslinearis*), α -Tocopherol, BHT, and BHA . *J. Agric. Food Chem.*, 45, 632-638.
- Küçük, M., Kolaili, S., Karaoğlu, S., Ulusoy, E., Baltaci, C., Candan, F. (2007). Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chem.*, 100, 526-34.

5 CONCLUSÃO

As amostras de méis provenientes das regiões BAJ, RP, ME e LAB foram classificadas como monoflorais e o tipo polínico *clidemia* foi predominante, não havendo influência direta entre a flora local e os lugares de coleta, visto que BAJ e ME tiveram classificação semelhante, mesmo estando geograficamente distantes, considerando a vasta área que abrange o Estado do Amazonas.

Com relação às análises físico-químicas observou-se que as amostras de mel atenderam a maioria dos requisitos estabelecidos pela regulamentação brasileira para o mel, com exceção para os teores de umidade e açúcares redutores. A inadequação desses dois requisitos reforça a necessidade de se criar padrões de qualidades específicos para o mel de *Meliponínios*, a fim de evitar fraudes e permitir a sua comercialização.

As curvas termogravimétricas indicaram perfil de degradação térmica semelhante para todas as amostras de méis analisadas. A termogravimetria indicou ser adequada para a análise do teor de umidade e de cinzas das amostras de mel de forma mais rápida e precisa que os métodos clássicos, podendo ser utilizada como ferramenta na análise de adulteração de méis.

Os méis, extratos e frações apresentaram atividade antioxidante promissora em todos os ensaios de atividade antioxidante, entretanto, as amostras provenientes das regiões ME e LAB apresentaram melhores resultados em todos os testes, possivelmente, devido aos teores de fenólicos totais maiores do que as demais.

Nos ensaios de atividade antimicrobiana os melhores resultados foram para as amostras das regiões ME, CO e LAB. Este estudo mostrou que o mel de *Melipona seminigra merrillae* é uma fonte efetiva de antioxidantes naturais. O flavonóide taxifolina foi identificado em todas as amostras analisadas sugerindo ser um marcador fenólico da espécie *Melipona seminigra merrillae*. Este é o primeiro relato de identificação de catecol em amostra de mel brasileiro.

Este trabalho contribuiu para o conhecimento preliminar das propriedades físico-químicas, análises melissopalínológica e potencial bioativo de méis da *Melipona seminigra merrillae*, abelha sem ferrão nativa do estado do Amazonas, fundamentando um estudo posterior mais detalhado sobre o mel desta espécie. Estes estudos poderão levar em consideração pesquisas que envolvam outras atividades bioativas, como atividade anti-

inflamatória e anticarcinogênicas, inerentes a outros méis, bem como um estudo detalhado da própolis produzidos por esta espécie.

Considerando o potencial antioxidante dos méis analisados, é de fundamental importância o desenvolvimento de pesquisas verificando a aplicação destes como antioxidante em sistemas lipídicos/aquoso visto a polaridade elevada dos flavonóides presentes nestes méis.

APÊNDICE

Figura 9 - Cromatograma da amostra de mel (BAJ) obtido por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

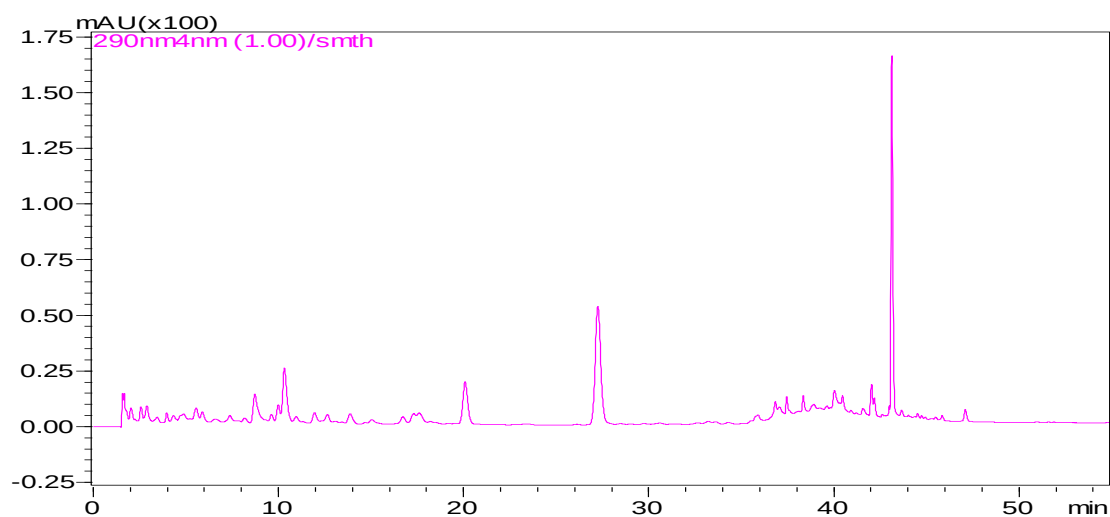


Figura 10 - Cromatograma da amostra de mel (BAU) obtido por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

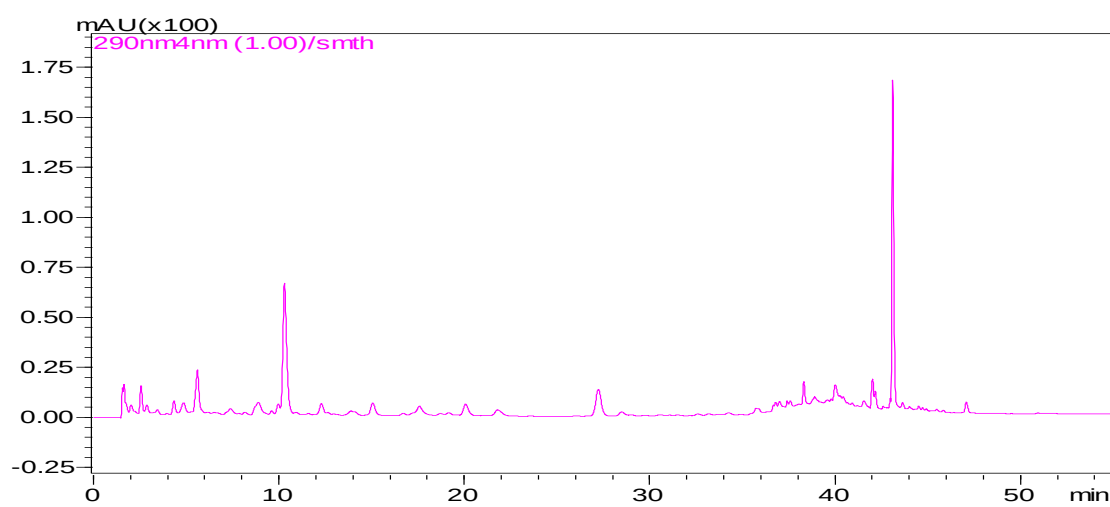


Figura11 - Cromatograma da amostra de mel (MAO) obtido por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

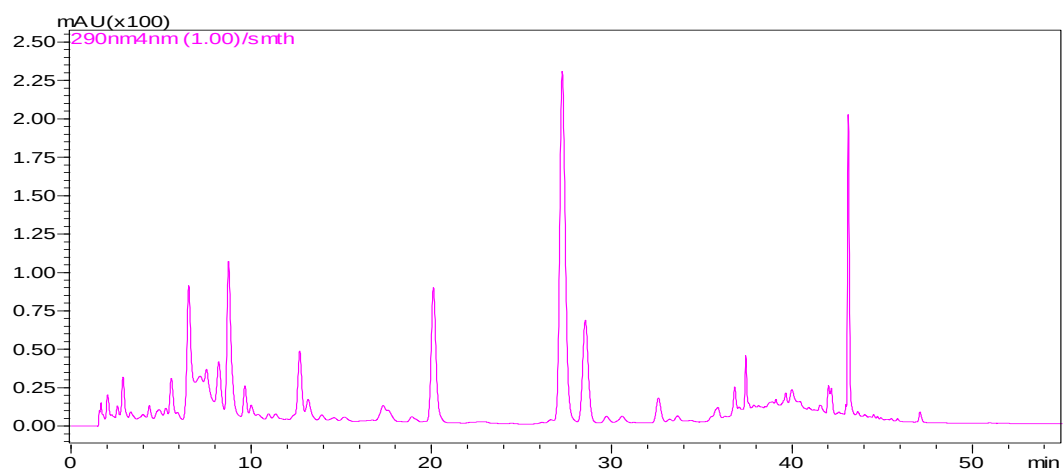


Figura12 - Cromatograma da amostra de mel (RP) obtido por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

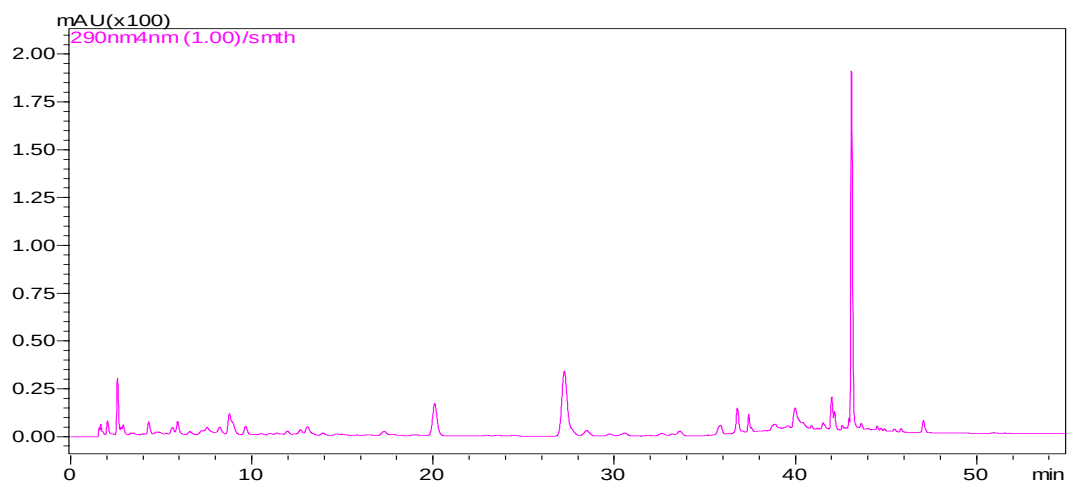


Figura13 - Cromatograma da amostra de mel (LAB) obtido por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

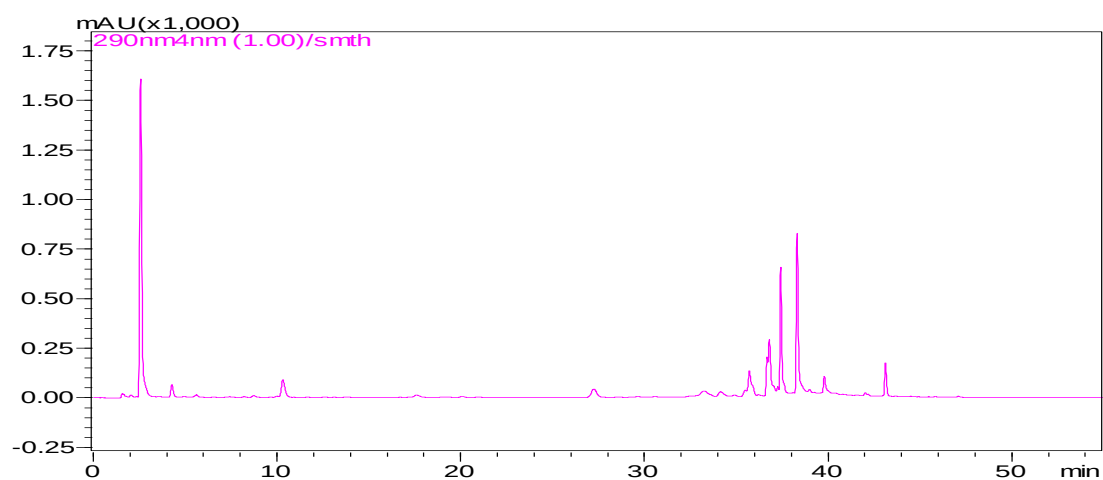


Figura 14 - Cromatograma da amostra de mel (ME) obtido por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

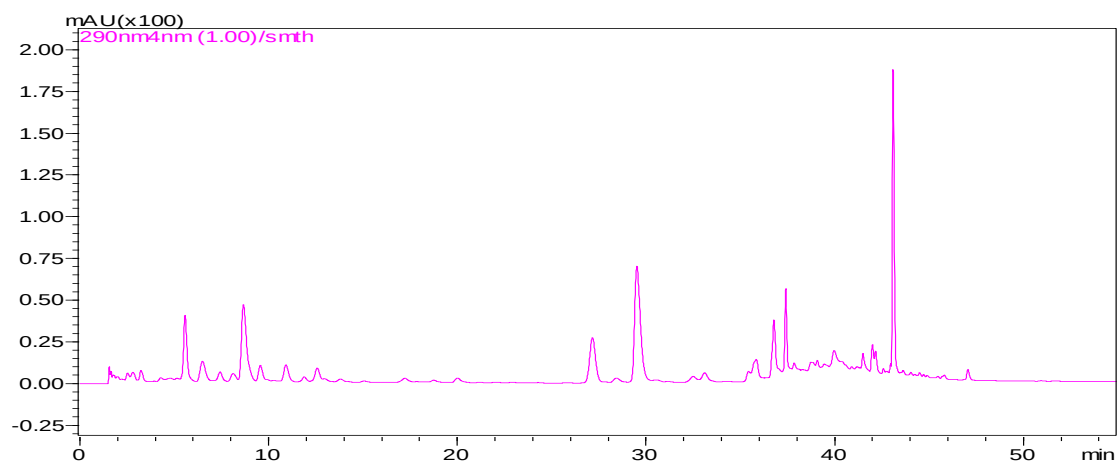


Figura 15 - Cromatograma da amostra de mel (CO) obtido por obtido por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

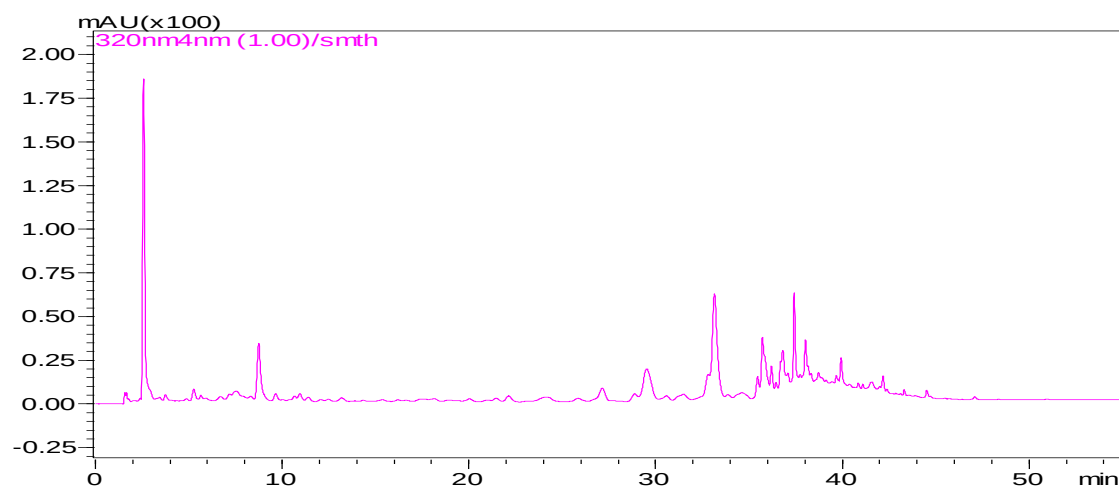


Figura 16 - Estrutura química do flavonóide taxifolina

