



Universidade Federal da Paraíba  
Centro de Tecnologia  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

**TESE DE DOUTORADO**

**Aspectos de Qualidade, Atividade Antioxidante e Antimicrobiana de Méis  
Monoflorais Produzidos por *Melipona* ssp. no Semiárido Brasileiro**

Doutoranda: Janaína Maria Batista de Sousa

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Marciane Magnani

João Pessoa, Julho de 2015

**JANAÍNA MARIA BATISTA DE SOUSA**

**Aspectos de Qualidade, Atividade Antioxidante e Antimicrobiana de Méis  
Monoflorais Produzidos por *Melipona* ssp. no Semiárido Brasileiro**

Tese de Doutorado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e  
Tecnologia de Alimentos (PPGCTA), da  
Universidade Federal da Paraíba em  
cumprimento as exigências legais para  
obtenção do título de doutor em Ciência e  
Tecnologia de Alimentos.

**ORIENTADORA:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marciane Magnani

João Pessoa - PB, Julho de 2015

S725a Sousa, Janaína Maria Batista de.  
Aspectos de qualidade, atividade antioxidante e antimicrobiana de méis monoflorais produzidos por *Melipona* ssp. no semiárido brasileiro / Janaína Maria Batista de Sousa.- João Pessoa, 2015.  
107f.  
Orientadora: Marciane Magnani  
Tese (Doutorado) - UFPB/CT  
1. Tecnologia de alimentos. 2. *Ziziphus joazeiro* Mart.  
3. Sabor ácido. 4. Antioxidante. 5. Atividade antimicrobiana.

UFPB/BC

CDU: 664(043)

**JANAINA M<sup>a</sup> BATISTA DE SOUSA**

**Aspectos de Qualidade, Atividade Antioxidante e Antimicrobiana de Méis  
Monoflorais Produzidos por Melipona ssp. no Semiárido Brasileiro**

**Tese** \_\_\_\_\_ em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marciane Magnani \_ DEA/CT/UFPB  
Orientadora/Coordenadora da Banca Examinadora

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. Evandro Leite de Souza \_ DCN/CCS/UFPB  
Examinador Interno

---

Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>a</sup> \_Edeltrudes de Oliveira Lima \_ DCF/CCS/UFPB  
Examinador Externo

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Antonia Lucia de Souza \_ DQ/CCEN/UFPB  
Examinador Externo

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. Fábio Correia Sampaio \_ DCOS/CCS/UFPB  
Examinador Externo

João Pessoa - PB, Julho de 2015

*A Deus, presença constante em minha vida.*  
*Aos meus pais José Paulino de Sousa e M<sup>a</sup> Sônia Batista de Sousa pelos incentivos e*  
*amor.*  
*Aos meus irmãos, Jandir, José, Jaceny, Janduilio, e Joana Darc pelos incentivos e*  
*companheirismo.*

*Dedico*

***Lute com determinação, Abrace a vida  
com paixão, perca com classe e vença com  
ousadia, o mundo pertence a quem se  
atreve e a vida é muito para ser  
insignificante.***

***Carles Chapolin***

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por abençoar meus caminhos sempre nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais, pelos incentivos positivos, mesmo a distância.

À Universidade Federal da Paraíba (UFPB), pela oportunidade de realização do curso de doutorado, continuando minhas pesquisas e estudos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa durante o curso de doutorado, fortalecendo meus percursos investigativos.

À Universidade Católica Portuguesa e à Escola Superior de Biotecnologia, do Porto, em Portugal, pela oportunidade de realizar parte desta pesquisa em suas instalações.

Ao Programa Ciências Sem Fronteiras (Doutorado Sanduíche), pela concessão de bolsa e oportunidade de intercâmbio na Universidade Católica Portuguesa e Escola Superior de Biotecnologia, em Porto, Portugal.

À minha orientadora, professora Dra. Marciane Magnani, pela amizade, companheirismo, orientação, confiança e por todos os ensinamentos transmitidos.

Ao professor Dr. Evandro Leite de Souza, pela confiança, colaboração e importantes ensinamentos para a realização deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos que, durante todo o curso, mostraram o verdadeiro compromisso com o ensino e a pesquisa.

Aos técnicos e funcionários dos laboratórios e da secretaria do PPGCTA/UFPB, a saber: Gilvandro, Claudionor e Lindalva, pelo companheirismo diário durante o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao bolsista PIBIC, Gilmardes Nascimento Marques, pela amizade e companheirismo cotidiano durante o desenvolvimento desta investigação.

Às companheiras de curso, as amigas Bárbara, Quênia e Ilsa, pelo companheirismo e amizade constantes.

À professora Dra. Maria Manuela Estevez Pintado, pelo carinho, ensinamentos, confiança e comprometimento em me receber e orientar em Porto, Portugal.

A todos que, de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho.

**Muito Obrigado!**

## RESUMO

SOUSA, J. M. B. **Aspectos de qualidade, atividade antioxidante e antimicrobiana de méis monoflorais produzidos por *Melipona* spp. no Semiárido brasileiro.** João Pessoa, 2015. 107f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal da Paraíba.

Méis monoflorais produzidos por *Melipona* spp possuem aspectos de qualidade físico-química, sensorial e bioativa específicos, porém, ainda pouco estudados. O objetivo do presente estudo foi caracterizar os aspectos físico-químicos (umidade, proteínas, prolina, hidroximetil-furfural, cor, condutividade elétrica, pH, acidez livre, e perfil de açúcar) e sensoriais (cor, viscosidade e sabor) de méis monoflorais de *Ziziphus joazeiro* Mart. (juazeiro), *Mimosa quadrivalvis* L. (malícia), *Croton heliotropiifolius* Kunth (branco velame) e *Mimosa arenosa* Willd Poir (jurema branca) produzidos por *Melipona subnitida* Duke. (jandaíra) e *M. scutellaris* L. (uruçu) na região do semiárido brasileiro. Também foi avaliado o potencial antioxidante pelos métodos: DPPH (2, 2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate), ABTS<sup>•+</sup> [2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)] e ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*), bem como a atividade antibacteriana, e perfil de polifenólicos dos méis. As fontes botânicas (juazeiro, malícia, branco velame e jurema branca) influenciaram significativamente ( $p \leq 0,05$ ) na intensidade da cor, perfil de açúcares, acidez, cinzas e quantidade de prolina dos méis analisados. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) para estes parâmetros entre méis de mesma origem botânica, produzidos pelas diferentes espécies de abelhas estudadas. A análise de componentes principais revelou que a maior parte da variabilidade foi influenciada pelo teor de umidade, acidez total, glicose, sacarose e cor, bem como, pelo gosto ácido, sabor ácido, aroma de mel e sabor doce. Os méis de juazeiro e velame branco apresentaram maior atividade antioxidante e capacidade de eliminação dos radicais livres ( $p \leq 0,05$ ) nos métodos DPPH e ABTS<sup>•+</sup> respectivamente, por sua vez os méis de malícia apresentaram maior atividade ( $p \leq 0,05$ ) anti-radical peroxil no ensaio ORAC. Os méis de juazeiro apresentaram as maiores quantidades de ácidos fenólicos, em especial dos ácidos trans-cinâmico, p-cumárico, elágico e ferúlico e dos flavonoides catequina, rutina, hespertina e crisina quando comparado com os outros méis produzidos pela mesma espécie de abelha. Os méis de malícia apresentaram o maior teor de flavonoides totais quando comparados aos méis de velame branco e jurema branca, e também as maiores quantidades de miricetina, quercetina e kaempferol entre os demais méis estudados. Os diferentes méis monoflorais analisados apresentaram distintas atividades antimicrobianas contra as cepas bacterianas testadas, sendo os menores valores de concentração inibitória mínima (CIM) encontrados para os méis que apresentaram as maiores quantidades de compostos fenólicos totais. Os resultados mostraram a influência da fonte botânica nos aspectos físico-químicos e sensoriais, assim como no perfil de polifenólicos, atividade antioxidante e antimicrobiana dos méis monoflorais produzidos pelas abelhas *Melipona subnitida* Duke e *Melipona scutellaris* L. na região do Semiárido brasileiro.

**Palavras-Chave:** *Ziziphus joazeiro* Mart., sabor ácido, antioxidantes, atividade antimicrobiana.



## ABSTRACT

SOUSA, J. M. B. **Quality aspects, antioxidant and antimicrobial activity of monofloral honeys produced by *Melipona* spp. in the Brazilian semiarid.** João Pessoa, 2015. 107f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal da Paraíba.

Monofloral honeys produced by *Melipona* spp have aspects of physical and chemical quality, sensory and specific bioactive, however, still little studied. The aim of the present study was to characterize the physico-chemical (moisture, protein, proline, hydroxymethyl-furfural, color, electrical conductivity, pH, free acidity, and sugar profile) and sensory aspects (color, viscosity and flavor) of monofloral honeys from *Ziziphus joazeiro* Mart. (juazeiro), *Mimosa quadrivalvis* L. (malícia), *Croton heliotropiifolius* Kunth (velame branco) and *Mimosa arenosa* Willd Poir (jurema branca) produced by *Melipona subnitida* D. (jandaíra) and *M. scutellaris* L. (uruçu) in the Brazilian semiarid region. The antioxidant potential (DPPH, ABTS and ORAC) and the antibacterial activity, as well as the polyphenolics profile of each honey were also assessed. The floral source influenced ( $p \leq 0.05$ ) the color, acidity, sugar profile, ash and proline content in the honeys. No differences ( $p \geq 0.05$ ) were perceived for honeys from the same floral source produced by different bee species. Principal component analysis revealed that most of the variability was defined by the water content, total acidity, glucose, sucrose and color, as well as by acid taste, acid flavor, honey flavor and sweet taste. Juazeiro and velame branco honeys showed the greatest antioxidant activity and scavenging ability in assays with DPPH and ABTS<sup>•+</sup> radicals, respectively, while honeys from malícia presented the strongest ( $p \leq 0.05$ ) antiperoxyl radical activity in ORAC assay. Juazeiro honeys presented the highest quantities of phenolic acids, particularly of trans-cinnamic, p-coumaric, ellagic, and ferulic acids, and of the flavonoids catechin, rutin, hesperetin and chrysin, when compared with the other honeys produced by the same bee species. malícia honeys presented the highest total flavonoids content (TFC) than honeys from velame branco and jurema branca, with the greatest quantities of myricetin, quercetin and kaempferol amongst the honeys studied. The different meliponini honeys presented different antimicrobial effects against the bacterial strains tested, as measured by their minimum inhibitory concentrations (MICs). However, the lowest MICs were found for honeys that presented the highest TPC. The results showed the impact of the botanical source on the physico-chemical and sensory aspects, as well as on polyphenolic profile, antioxidant and antimicrobial of monofloral honey produced by bees *Melipona subnitida* D. and *Melipona scutellaris* L. in the Brazilian semiarid region.

**Key Words:** *Ziziphus joazeiro* Mart., taste acid, antioxidant, antimicrobial activity.

## LISTA DE TABELAS

### MATERIAL E MÉTODOS

|                                                                                                                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1:</b> Definições e referências para descrição das características de intensidade dos atributos sensoriais de méis monoflorais de abelhas sem ferrão produzidos na região do Semiárido do Nordeste brasileiro ..... | 23 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

### ARTIGO I

|                                                                                                                                                                                                                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Table 1.</b> Mean values ( $\pm$ standard deviation) of the physicochemical parameters and the sugar profiles of monofloral honeys produced by different stingless bees (jandaíra and urucu) in the Semiarid region of Northeastern Brazil from different floral sources ..... | 70 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

|                                                                                                                                                                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Table 2.</b> Intensity values of the sensory attributes (assessed by RDA) of monofloral honeys produced by different stingless bees (jandaíra and urucu) in the Semiarid region of Northeastern Brazil from different floral sources..... | 72 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

### ARTIGO II

|                                                                                                                                                                                                                                    |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Table 1.</b> Total phenolics and flavonoids content and antioxidant activity (DPPH, ABTS and ORAC) of monofloral honeys produced by meliponini species (jandaíra and urucu) in the Semiarid region of Northeastern Brazil ..... | 102 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

|                                                                                                                                                                                                                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Table 2.</b> Correlation matrix of antioxidant activity (ORAC, ABTS and DPPH), total phenolics and flavonoids content and RSA (%) of monofloral honeys produced by Meliponini species (jandaíra and urucu) in the semiarid region of northeastern Brazil ..... | 103 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

|                                                                                                                                                                            |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Table 3.</b> Phenolic acids and flavonoids of monofloral honeys produced by Meliponini species (jandaíra and urucu) in the Semiarid region of Northeastern Brazil ..... | 104 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

|                                                                                                                                                                                                                                    |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Table 4.</b> Minimum inhibitory concentration (MIC g/100mL) of monofloral honeys produced by Meliponini (jandaíra and urucu) in the Semiarid region of Brazilian Northeastern Brazil against pathogenic bacterial strains ..... | 105 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

## LISTA DE FIGURAS

### REFERENCIAL TEÓRICO

**Figura1.** Estrutura química de alguns flavonoides encontrados no mel.....13

### MATERIAL e MÉTODOS

**Figura 1.** Curva padrão de ácido gálico para análise do conteúdo de compostos fenólicos totais .....24

**Figura 2.** Curva padrão de quercetina para análise do conteúdo de flavonoides totais .25

**Figura 3.** Curva padrão de ácido ascórbico para análise da atividade antioxidante do radical DPPH .....26

**Figura 4.** Curva padrão de quercetina para análise da atividade antioxidante do radical DPPH .....27

**Figura 5.** Curva padrão de trolox para análise da atividade antioxidante do radical ABTS<sup>•+</sup> .....28

### ARTIGO I

**Figure 1.** (A) Principal Component Analysis (PCA) of the physicochemical (water content, total acidity, glucose, sucrose,) and sensory (acid flavor, acid taste, viscosity, sweet taste, bitter taste, honey flavor, color) aspects of monofloral honey; (B) distribution of samples according PCA: JJ (juazeiro/ jandaíra); UJ (juazeiro/uruçu); JA (malícia/ jandaíra); UA (malícia/uruçu); JJB (jurema branca/ jandaíra); UJB (jurema branca/uruçu); JVB (velame branco/jandaíra); UVB (velame branco/uruçu)..... 69

### ARTIGO II

**Figure 1.** Map of semiarid region of Brazilian Northeastern showing the distribution of honey samples studied and respective geographic coordinates. \* Seridó region, state of Rio Grande do Norte; \*\* Agreste region, state of Paraíba.....101

**Figure 2.** Chromatogram of the *Ziziphus joazeiro* (juazeiro) honey produced by jandaíra (*Melipona subnitida*) - honey sample JJ; peaks identified 1: 2.4-dihydroxybenzoic acid; 2: 3.4-hydroxybenzoic acid; 3: Ferulic acid; 4: Ellagic acid; 5: Trans-cinnamic acid; 6: P-coumaric acid; 7: Syringic acid; 8 Myricetin; 9: Quercetin; 10: Catechin; 11: Rutin; 12: Kaempferol; 13: Hesperetin; 14: Naringenin; 15: Chrysin .....101

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                                                                                                                                 |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                                                                                                                                                                      | <b>1</b>   |
| <b>2. OBJETIVOS .....</b>                                                                                                                                                                                                                                       | <b>3</b>   |
| 2.1 Objetivo Geral .....                                                                                                                                                                                                                                        | 3          |
| 2.2 Objetivos Específicos.....                                                                                                                                                                                                                                  | 3          |
| <b>3. REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>                                                                                                                                                                                                                             | <b>4</b>   |
| 3.1 Flora apícola do semiárido brasileiro .....                                                                                                                                                                                                                 | 4          |
| 3.2 Abelhas nativas sem ferrão .....                                                                                                                                                                                                                            | 7          |
| 3.3 Mel: Aspectos físico-químicos e sensoriais .....                                                                                                                                                                                                            | 8          |
| 3.3 Propriedades antioxidantes do mel .....                                                                                                                                                                                                                     | 12         |
| 3.4 Atividade antimicrobiana do mel .....                                                                                                                                                                                                                       | 16         |
| <b>4. MATERIAL e MÉTODOS .....</b>                                                                                                                                                                                                                              | <b>19</b>  |
| 4.1 Amostras de mel .....                                                                                                                                                                                                                                       | 19         |
| 4.2 Análise melissopalínológica .....                                                                                                                                                                                                                           | 19         |
| 4.3 Análises físico-químicas .....                                                                                                                                                                                                                              | 20         |
| 4.4 Análise sensorial: Análise Descritiva Qualitativa por Ordenação .....                                                                                                                                                                                       | 21         |
| 4.5 Análises de compostos fenólicos totais, flavonoides e prolina .....                                                                                                                                                                                         | 24         |
| 4.6 Análises do potencial antioxidante do mel .....                                                                                                                                                                                                             | 26         |
| 4.7 Perfil dos compostos fenólicos .....                                                                                                                                                                                                                        | 29         |
| 4.8 Análise de atividade antimicrobiana do mel .....                                                                                                                                                                                                            | 29         |
| 4.9 Análises dos dados .....                                                                                                                                                                                                                                    | 31         |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                                                                                                                                                                                                                         | <b>32</b>  |
| <b>5. RESULTADOS e DISCUSSÃO .....</b>                                                                                                                                                                                                                          | <b>44</b>  |
| <b>Artigo I:</b> Sugar profile, physicochemical and sensory aspects of monofloral honeys produced by different stingless bee species in Brazilian semiarid region .....                                                                                         | 44         |
| <b>Artigo II:</b> Polyphenolics profile, antioxidant and antibacterial activity of honeys from <i>Ziziphus joazeiro</i> Mart., <i>Croton heliotropiifolius</i> Kunth and <i>Mimosa</i> species produced by <i>Meliponini</i> in Brazilian semiarid region ..... | 73         |
| <b>6. CONCLUSÃO FINAL .....</b>                                                                                                                                                                                                                                 | <b>106</b> |
| <b>ANEXOS .....</b>                                                                                                                                                                                                                                             | <b>107</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

A atividade da meliponicultura no Brasil é bastante antiga, exercida pelos habitantes nativos antes mesmo da inclusão das abelhas *Apis mellifera* popularmente conhecidas como européias, italianas ou africanas. Repassada ao longo dos tempos para os descendentes nativos e a sociedade pós-colonização, a criação de abelhas sem ferrão no país se manteve particularmente na região do Semiárido Nordeste.

Nesta região, a diversidade da flora apícola, adaptada às condições climáticas típicas da estação chuvosa e estação de estiagem do Semiárido, favorece a produção de diferentes tipos de mel ao longo do ano. A região também abriga espécies endêmicas de abelhas sem ferrão, também conhecidas como meliponas (ou Meliponini), dentre as quais se destacam *Melipona subnitida* Ducke (Jandaíra) e *M. scutellaris* Latrelle (uruçu) (SOUSA et al., 2013). Portanto, nesta região são produzidos méis com características próprias, os quais possuem elevado valor comercial devido suas propriedades bioativas reconhecidas na medicina tradicional. Entretanto, méis produzidos por abelhas sem ferrão ainda não possuem parâmetros de qualidade relacionados aos seus aspectos físico-químicos e sensoriais, pois, os padrões de qualidade disponíveis atualmente para o mel são baseados nas características do mel de abelha *Apis* (SOUSA et al., 2009).

O mel pode ser definido como uma mistura complexa de açúcares, proteínas, minerais, vitaminas e compostos fenólicos definem suas características físico-químicas, sensoriais e funcionais (SILVA et al., 2013). Estas características podem variar principalmente com origem floral, embora a espécie de abelha produtora, as condições ambientais, o tempo e condições de armazenamento também são reconhecidos como fatores que influenciam as características do mel (ALVAREZ-SUAREZ et al., 2010). Méis polínicos produzidos majoritariamente a partir de uma única espécie botânica são designados como monoflorais e exibem características próprias (BELAY et al., 2015). Ainda, méis monoflorais podem apresentar em sua composição alguns compostos que os definem e que são marcadores específicos de determinados tipos de mel (SANT'ANA et al., 2010). Dessa forma, a autenticidade botânica do mel pode ser realizada pela análise do pólen que o compõe, ou pela determinação de compostos fenólicos vegetais que são encontrados somente em méis de uma determinada origem (SANT'ANA et al., 2010).

Diversas propriedades bioativas do mel têm sido atribuídas aos compostos fenólicos (ácidos fenólicos e flavonoides) presentes em sua composição (HABIB et al.,

2014b). Estes compostos possuem capacidade de estabilizar radicais livres, atuando como antioxidantes. Considerando que os compostos fenólicos presentes no mel são dependentes da fonte floral, a capacidade antioxidante de cada mel irá variar de acordo com sua origem botânica e, conseqüentemente, méis de diferentes origens botânicas (floral) possuem atividade antioxidante distinta (HABIB et al., 2014). Entretanto, estudos sobre a atividade antioxidante e o perfil de compostos fenólicos de méis de abelhas sem ferrão, em especial méis monoflorais oriundos da região do Semiárido do Nordeste brasileiro ainda são escassos.

Além da atividade antioxidante, méis têm sido descritos como substâncias antimicrobianas, capazes de inibir uma grande diversidade de micro-organismos. Esta atividade tem sido atribuída a enzimas, aminoácidos e peróxidos presentes no produto, entretanto tem sido relatado que os compostos fenólicos são os principais responsáveis pela atividade antimicrobiana de méis (KÜÇÜK et al., 2007). Estudos realizados com mel de *Apis* demonstraram que a atividade antimicrobiana pode variar entre méis de origem floral distinta, particularmente entre os méis monoflorais (ISLA et al., 2011, SILVA et al., 2013. HUSSAIN et al., 2015).

Considerando os aspectos de qualidade composicional e bioativa abordados anteriormente e a relação destes com a origem botânica e geográfica, somado ao potencial da flora apícola do Semiárido nordestino e a procura crescente do mel de abelha sem ferrão com fins alimentares e medicinais, bem como pela popularização das abelhas *Melipona subnitida* Ducke (Jandaíra) e *M. scutellaris* Latrelle (uruçu) é de grande importância a geração de conhecimentos relacionados aos aspectos de qualidade e propriedades bioativas destes méis. Este foi um estudo pioneiro na investigação dos aspectos de qualidade físico-química e sensorial, potencial antioxidante e antimicrobiano dos méis de abelhas sem ferrão produzidos no Semiárido nordestino, capaz de contribuir para a caracterização da identidade floral e geográfica de méis que são produzidos apenas nesta região e, especificamente em diferentes estações climáticas (chuvosa e estiagem).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

- Avaliar os aspectos físico-químicos e sensoriais, a atividade antioxidante e antibacteriana de méis monoflorais produzidos por diferentes espécies de abelhas sem ferrão na região do Semiárido brasileiro.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os aspectos físico-químicos, o perfil de açúcares e os aspectos sensoriais dos méis de *Ziziphus joazeiro* Mart. (juazeiro), *Mimosa quadrivalvis* L. (malícia), *Croton heliotropiifolius* Kunth (velame branco) e *Mimosa arenosa* Willd Poir (jurema branca), produzidos pelas abelhas sem ferrão *Melipona subnitida* Ducke (Jandaíra) e *M. scutellaris* Latrelle (uruçu);
- Quantificar e identificar o perfil de compostos fenólicos presentes nos méis de juazeiro, malícia, velame branco e jurema branca, produzidos pelas abelhas sem ferrão jandaíra e urucu;
- Avaliar a capacidade antioxidante dos méis de juazeiro, malícia, velame branco e jurema branca, produzidos pelas abelhas sem ferrão jandaíra e urucu em ensaios com diferentes radicais;
- Avaliar a atividade antibacteriana dos méis de juazeiro, malícia, velame branco e jurema branca, produzidos pelas abelhas sem ferrão jandaíra e urucu contra bactérias patogênicas de interesse em alimentos.



### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Flora apícola do Semiárido brasileiro

O Brasil apresenta destacável potencial apícola devido a sua flora diversificada e típica, que floresce a cada estação do ano; ampla extensão territorial e variabilidade climática, que possibilitam a produção de mel durante todo o ano. Estes aspectos conferem um diferencial em relação aos demais países onde, normalmente, a produção de mel ocorre apenas em determinado período do ano. Neste cenário, o Semiárido nordestino se destaca por possuir condições ambientais que favorecem a atividade apícola devido à existência de intensa floração natural. Nessa região, ocorre um bioma (caatinga) de vegetação característica da época chuvosa e outra da estiagem, que promovem um fluxo de néctar e pólen durante todo o ano, contribuindo para a manutenção das colônias de abelhas e para a diminuição da necessidade do uso de alimentação artificial (SANTOS, 2009).

A flora apícola do Semiárido brasileiro é caracterizada pela presença de três estratos vegetais: herbáceo, arbustivo e arbóreo. O estrato herbáceo é composto pelo conjunto de plantas rasteiras de pequeno porte, cuja floração é significativa nos períodos de chuvas e transição de período de chuva e de seca. Suas flores são bastante atraentes para as abelhas e insetos visitantes por oferecer néctar e pólen durante a ocorrência de chuvas independente da época do ano (MAIA-SILVA et al., 2012). São exemplos de herbáceas *Hyptis suaveolens* L. Poit, (bamburral), *Scoparia dulcis* L., (vassourinha) e *Jacquemontia gracillima*, Choisy (jetirana). Por sua vez, o estrato arbustivo refere-se ao conjunto de plantas de baixo porte do grupo das angiospermas (MAIA-SILVA et al., 2012; FREITAS, 1991). Os arbustos são caracterizados pela florescência rápida (duração máxima de 15 dias) em períodos de chuvas, porém, mesmo não sendo dependente do período pluviométrico, podem suspender a floração devido aos curtos períodos de estiagem. São exemplos típicos de arbustos: o *Croton heliotropiifolius* Kunth (velame branco) e *Croton sonderianus* Müll (marmeleiro).

*Mimosa quadrivalvis* L., popularmente conhecida pelo nome de malícia, refere-se a uma espécie encontrada com frequência em áreas abertas da caatinga. Semelhante à espécie *Mimosa modesta* Mart., a planta malícia também possui folhas sensitivas que se retraem ao serem tocadas. Suas inflorescências são formadas por flores pequenas, com filetes de cor rosa e anteras amarelas. O pólen e néctar de suas flores atraem muitos

visitantes (abelhas e vespas) florais e, principalmente, as abelhas nativas sem ferrão (MAIA-SILVA et al., 2012). Um arbusto imponente é o velame branco (*Croton heliotropiifolius* Kunth), típico e abundante na caatinga, possui cerca de 1m de altura e inflorescências alongadas na ponta dos ramos, trazem as flores masculinas acima e femininas abaixo, que produzem os frutos. Possui folhas grossas, ásperas e, quando maceradas, exalam um cheiro agradável devido ao óleo essencial presente. O néctar oferecido às abelhas proporciona a produção de mel claro e aromático. Na região do Semiárido do nordeste, esta planta é também utilizada no tratamento da tosse e gripe e contra infecções na pele, úlceras e sífilis (CASTRO, 2011).

*Mimosa arenosa* (willd.) Poir, conhecida pelo nome popular columbi ou jurema branca, também é uma arbustos de porte médio que ocorre, principalmente, em solos arenosos e em locais abertos do Semiárido. Possui característica física marcante em relação às demais, a exemplo do seu tronco acinzentado, ramos com espinhos esparsos e copa bem aberta, que durante a estação seca encontra-se completamente sem folhas. Suas inflorescências são reunidas em espigas, compostas por flores muito pequenas, brancas e suavemente perfumadas. Suas flores fornecem néctar e pólen para muitos insetos como moscas, besouros e, principalmente, abelhas (CASTRO, 2011; MAIA-SILVA et al., 2012).

Já o estrato arbóreo da caatinga refere-se às plantas de grande porte como *Zyziphus juazeiro* Mart. (juazeiro), *Anadenanthera colubrina* Vell. (angico), *Anacardium occidentale* L. (cajueiro) entre outras. As espécies arbóreas também são muito atrativas para alguns insetos e abelhas e são de grande importância para a manutenção das colônias de abelhas e a produção de mel, uma vez que fornecem néctar durante todo período seco e transição seca-chuva e pólen na época de chuva (FREITAS, 1991; CASTRO, 2011).

O juazeiro é uma árvore típica do nordeste do Brasil, encontrada em áreas secas do Semiárido. Adaptada ao clima de aridez, o juazeiro possui folhas persistentes capazes de resistir à escassa umidade do subsolo onde ocorre naturalmente. Essa espécie é bastante conhecida pelos seus frutos comestíveis e, também, devido às suas propriedades farmacológicas (MAIA-SILVA et al., 2012). Suas flores surgem nas axilas foliares, sendo compostas por muitas flores amarelas e pequenas, as quais fornecem néctar durante a estação seca aos visitantes florais, tais como as vespas e abelhas nativas (MAIA-SILVA et al., 2012). A floração do juazeiro ocorre em maior intensidade nos meses de outubro, novembro e dezembro (MARINHO et al., 2000). Por sua vez, o

angico é uma árvore também amplamente encontrada na caatinga. Possui uma copa aberta e a casca grossa, fendida e avermelhada, suas folhas são pequenas e muito divididas. Devido à riqueza de taninos presente em sua casca é utilizada na curtição de couros e como remédio anti-inflamatório, cicatrizante e no tratamento de problemas respiratórios. As flores são melíferas e as suas sementes têm propriedades narcóticas e alucinógenas (CASTRO, 2011).

A intensidade da ocorrência do tipo de pólen presente no mel está estreitamente correlacionada à sua oferta na região. Segundo Giorgini e Gusman, (1972) e Martin, (1979), a ocorrência significativa da flora apícola e das espécies de abelhas de uma determinada região pode ser explicada pela correlação mútua entre a abelha e as espécies vegetais. Esta correlação se baseia na dependência das abelhas pelo néctar e pólen para se alimentar bem como na necessidade de muitas espécies florísticas da polinização apícola para produzir frutos. Entretanto, o potencial da flora apícola do Semiárido brasileiro vem sendo revelado através de alguns estudos apibotânicos e ou palinológicos em amostras de méis produzidos em diferentes regiões do Nordeste.

Silva et al. (2014), em estudo realizado nos município de Catolé do Rocha, estado da Paraíba, catalogaram, devido a presença de seus pólenes em méis, as plantas apícolas *Bromelia* sp., *Malvaceae* sp., *Croton sonderianus* Müll. Arg. e *Croton* sp. Na região do Litoral e Brejo do estado da Paraíba, Silva et al. (2006) identificaram as diferentes espécies botânicas presentes em méis de *Apis mellifera*. No estudo, os pesquisadores identificaram 51 tipos polínicos, com predominância das espécies *Jaquemontia asarifolia* LB Smith, *Croton sonderianus* Muell, *Ziziphus joazeiro* Mart., *Ipomea bahiensis* Willd, *Prosopis juliflora* (SW) DC, *Pithecolobium dumosum* Benth, *Mimosa tenuiflora* Willd, *Machaerlum angustifolium* Mart., *Croton campestris* Mart. e *Spermacoce* ssp. Ainda, em regiões semiáridas do Nordeste, porém no estado do Ceará, Silva et al. (2004) relataram predominância do pólen de *Croton sonderianus* Müll. Arg. (marmeleiro), *Serjania glabrata* Kunth, *Piptadenia moniliformis* Benth, *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. e *Cratylia mollis* Mart. em méis de *Apis*.

Poucos estudos têm sido realizados com o objetivo de caracterizar a origem botânica dos méis de Meliponini, embora se tenha o conhecimento que determinadas espécies de abelha sem ferrão visitam, preferencialmente, algumas espécies florais. Em méis produzidos pelas abelhas sem ferrão *Melipona fasciculata* Smith (tiúba) e *M. quadrifasciata* Lep. (mandaçaia) colhidos nos estados do Maranhão e Bahia, Martins et al. (2011) e Carvalho et al. (2001, 2006) identificaram pólen de quatro espécies da

família Mimosaceae com predominância da espécie *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth. Silva et al. (2013) relataram predominância de plantas da família Fabaceae e Mimosoideae em méis de abelhas jandaíra produzidos em diferentes estados do Semiárido nordestino. Em outro estudo, com méis de jandaíra produzido no estado da Paraíba, os mesmos pesquisadores (Silva et al., 2014), encontraram predominância de pólen das famílias Euphorbiaceae e Leguminosae.

De acordo com Ramalho et al. (1990), as espécies vegetais do gênero *Mimosa*: *Mimosa scabrella* Benth, *M. bimucronata* (DC.) Kuntze e *M. invisa* Mart. são as principais fontes de pólen e néctar para abelhas *Apis* e para as espécies meliponini existentes na região do Semiárido do Nordeste do Brasil. A frequência do pólen das espécies da subfamília *Mimosaceae* pode ser explicada pela sua abundância na região, além da capacidade de muitas espécies de florescer durante todo o ano.

### **3.2 Abelhas nativas sem ferrão**

Devido à riqueza da flora apícola, há uma elevada distribuição de espécies de abelhas nativas sem ferrão na região Nordeste do Brasil. As abelhas sem ferrão são produtoras de mel, porém, sua produção é inferior quando comparada à produção das abelhas com ferrão (gênero *Apis*) (CARVALHO et al., 2005). Atualmente, devido a maior disponibilidade comercial do mel de abelhas com ferrão, o consumo do mel de abelhas sem ferrão é inferior ao de outros méis, porém, o interesse pela produção de mel de abelhas sem ferrão tem se mantido ao longo dos tempos, tomando como justificativa suas características organolépticas diferenciadas, suas propriedades terapêuticas, bem como os benefícios de caráter ecológico no que diz respeito à polinização das flores realizada pelas abelhas durante a sua produção (SOUZA et al., 2004). Estima-se que, no Brasil, existam aproximadamente 192 espécies de abelhas sem ferrão, algumas destas populares e criadas especialmente para produção de mel, com destaque para a região Nordeste (SILVEIRA et al., 2002). As abelhas sem ferrão são agrupadas em duas tribos: Meliponini (constituída por mais de 50 espécies) e Trigonini (constituída por aproximadamente 300 espécies) (AQUINO, 2006).

Na região Nordeste do Brasil é possível encontrar aproximadamente 23% das espécies de abelha do gênero *Melipona* Illiger (ALVES, 1996; ZANELLA, 2000), que inclui as espécies mais produtivas de mel, a citar *M. quadrifasciata* Lep. (mandaíca), *M. subnitida* Duke (jandaíra) e *M. scutellaris* Latrelle (uruçu) (PEREIRA, 2007). A

abelha jandaíra é a mais conhecida e encontrada no nordeste brasileiro, certificada como um Meliponini típico do sertão. Esta abelha possui tamanho de aproximadamente 9,2 mm e hábito de se alojar em troncos de árvores encontradas na caatinga, a exemplo de imburana, catingueira, favela e umbuzeiro (AQUINO, 2006). Seu ninho possui forma de disco, composto por potes de cerume onde o mel é armazenado, atingindo entre 3 a 5 cm de diâmetro conforme o estado da colônia. Por ser o Meliponini mais popular da região Nordeste e se adaptar as condições climáticas áridas, esta abelha é domesticada pelo homem para fins de produção de mel.

A abelha urucu é conhecida como uma abelha sem ferrão que habita no Nordeste do Brasil, a qual se diferencia das demais pelas ótimas características de qualidade do seu mel, pelo número de abelhas presentes na colmeia, pela produtividade de mel e elevado trabalho de polinização das plantas nativas entre outras características que as destacam das demais abelhas sem ferrão (EVANGELISTA-RODRIGUES et al., 2008).

O mel da abelha urucu é utilizado pelo homem como alimento e adoçante, bem como medicamento para tratamento de gripes, tosses, bronquites e pneumonias (AQUINO, 2006). Outras abelhas sem ferrão, domesticadas pelo homem para produção de mel, a exemplo da abelha mandaçaia, que habita outras regiões do Brasil de clima menos quente. Também se destacam por serem bastante dóceis, adaptáveis a diversos ambientes e ter boa produtividade de mel por ano a depender das condições adequadas de produção (ALVES et al., 2012).

As abelhas sem ferrão produzem um mel bastante valorizado em diferentes regiões do Brasil, devido suas propriedades medicinais. De acordo com Silva et al. (2013) e Biluca et al. (2014) há um crescente interesse por este produto no mercado em decorrência de suas ações cicatrizantes, antissépticas, antimicrobiana, anticancerígeno, anti-inflamatória, além de suas características próprias de gosto, aroma e textura.

### **3.3 Mel: Aspectos físico-químicos e sensoriais**

Define-se mel como uma substância natural, constituída essencialmente por açúcares, produzida pelas abelhas a partir do néctar de flores ou de secreções de partes de plantas ou de excreções de insectos sugadores de plantas que ficam sobre partes vivas de plantas, que as abelhas recolhem, transformam, combinam com substâncias próprias, depositam, desidratam, armazenam e deixam maturar nos favos de mel (*Codex Alimentarius*, 2001). O mel pode ser classificado em função da matéria prima usada

para a sua elaboração, como: mel floral ou de flores, quando obtido dos néctares das flores; ou mel de melato, quando formado a partir de secreções de partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas. Ainda pode ser classificado de acordo com o procedimento de extração do favo em: mel escorrido, mel prensado ou mel centrifugado; quanto a sua apresentação comercial, em: mel líquido, cristalizado ou semi-cristalizado, mel em favos, mel com pedaços de favo e mel filtrado (BRASIL, 2000; CODEX ALIMENTARIUS, 2001).

Os méis florais, classificados como unifloral ou monofloral, devem apresentar, no mínimo, 45% de pólen de flores de uma mesma espécie vegetal, possuindo características sensoriais, físico-químicas e microscópicas próprias, podendo, ainda, ser tipificado com o nome da planta ou da região em seu rótulo (BARTH, 1989; BRASIL, 2000). A identificação da origem botânica e geográfica do mel pode contribuir de forma significativa para o conhecimento da sua qualidade nutricional e organoléptica, considerando que as características físicas, químicas e sensoriais do produto estão relacionadas à origem da matéria-prima utilizada pelas abelhas durante a sua produção (SOUZA et al., 2009).

A composição do mel envolve uma mistura complexa de água, carboidratos, enzimas, ácidos, proteínas, minerais, substâncias aromáticas, vitaminas, pigmentos, ceras e grãos de pólen (SILVA et al., 2013). Os glicídios estão presentes em maior proporção e representam de 85 a 95% do total de açúcares a depender, principalmente, das origens botânicas e geográficas, bem como de fatores de menores influências, como o clima, o processamento e condições de armazenamento (OUCHEMOUKH et al., 2010; DOBRE et al., 2012).

Os níveis de monossacarídeos em amostras de méis estão estreitamente correlacionados as fontes florais dos néctares e espécies de abelhas produtoras (MANZANARES et al., 2014; SILVANO et al., 2014). Conforme a literatura, a frutose é o açúcar majoritário dos méis, com exceções verificadas nos méis monoflorais oriundos da *Brassica napus* L. (canola) e *Taraxacum officinale* L. (dente de leão), cuja presença de glicose é superior (ESCURETO et al., 2014; ODDO; PIRO, 2004). Valores de frutose superiores a 40% foram relatados por Escuredo et al., (2014) em méis monoflorais de acácia, enquanto os méis de espinheiro, castanha e eucalipto apresentaram média de 40% de frutose. Os mesmos autores também observaram valores médios de glicose correspondente a 37% em méis de girassol, amora e acácia. Em concordância com a normativa do *Codex Alimentarius* (2001), diversos autores tem

utilizado a soma dos percentuais de frutose e glicose (F + G) para diferenciar o mel de flores do mel melato. O mel de melato apresenta valores inferiores a 60% de F + G. (DOBRE et al., 2012; ESCURETO et al., 2014).

Além da capacidade de diferenciar o tipo de mel, os percentuais de frutose e glicose também têm sido utilizados como ferramenta para prever o processo de cristalização de méis, pois devido a menor solubilidade em água da glicose em relação à frutose, pode-se assumir que proporções de F / G inferiores a 1,1 resultam em cristalização a temperatura ambiente (LAOS et al., 2011; ESCURETO et al., 2014). Quanto aos níveis de açúcares não redutores, o nível de sacarose é utilizado como indicador de qualidade do mel. Valores de sacarose em quantidades superiores a 3% no mel indica uma colheita precoce do produto (KÜÇÜK et al., 2007).

A água é o segundo componente em maior quantidade no mel. Sua quantidade pode variar entre 15 e 21% do conteúdo total, para o mel de abelha *Apis mellifera* e de 20 a 45% para o mel de abelhas sem ferrão, podendo variar de acordo com o clima, origem floral, condições de coleta e armazenamento (SOUZA et al., 2009). Devido sua influência no processo de deterioração (fermentação) e nas definições das características de viscosidade, maturação, cristalização, sabor e conservação do mel, o teor de água é considerado um dos compostos mais importantes na avaliação de controle de qualidade do mel (BOGDANOV, 2007; SOUSA et al., 2013).

O hidroxi-metil-furfural (HMF) refere-se a um componente que surge da quebra de açúcares, como glicose e frutose, na presença de ácidos ou quando expostas a elevadas temperaturas. Esse processo ocorre durante o envelhecimento e o uso de aquecimento sobre os açúcares, os quais são clivados levando a produção de 5-hidróxi-3-metifurfuraldeído. Atualmente, o HMF é o principal indicador de qualidade do mel, sendo limitado pela legislação brasileira valor máximo de 40 mg/kg (BRASIL, 2000). Geralmente, o HMF está presente em quantidades muito baixas no mel recém-colhido e sua concentração tende a se elevar com o transcorrer do período de armazenamento (ZAPPALÀ et al., 2005).

Os índices de acidez e pH do mel devem-se aos tipos e quantidades dos ácidos orgânicos presentes, principalmente o ácido glucônico, em equilíbrio com as suas correspondentes lactonas ou ésteres internos, e íons inorgânicos, tais como fosfato, sulfato e cloreto, os quais variam de acordo com fonte floral, época de colheita e tipo de abelha produtora (HABIB et al., 2014a). O valor de pH no mel geralmente ocorre entre 3,5 a 5,5. Mesmo não havendo um limite para este parâmetro, valores inferiores a

4,0 são considerados ideais para a estabilidade do mel e inibição de micro-organismos deteriorantes (SOUZA et al., 2009). Em relação à acidez total, as normativas de controle de qualidades do mel, conforme a legislação brasileira (2000) e *Codex Alimentarius*, (2001), limitam um valor máximo de 50 mEq/kg<sup>-1</sup> para assegurar a não ocorrência de processos fermentativos. Entretanto, valores superiores a este limite (50 mEq/kg<sup>-1</sup>) já foram encontrados em méis produzidos por abelhas nativas sem ferrão (SOUZA et al., 2009; SOUSA et al., 2013).

O conteúdo mineral (ou cinzas totais) é encontrado nos méis geralmente em pequenas quantidades, com variação entre 0,04% para méis claros e 0,2% em méis escuros (HABIB et al., 2014a). Conforme Bogdanov (2007), o percentual de cinzas no mel está diretamente relacionado aos aspectos ambientais, origem geográfica e botânica da região onde foi produzido. Estudos recentes verificaram uma forte correlação do conteúdo total de cinzas com o índice de condutividade elétrica do mel, a qual tem sido usada de forma satisfatória como ferramenta para diferenciação de méis oriundos de fontes florais distintas (HABIB et al., 2014a). Os demais componentes do mel como proteínas, aminoácidos, ácidos e vitaminas também estão presentes em baixas quantidades, entretanto, são valorizados devido as suas propriedades benéficas ao organismo humano (HABIB et al., 2014b).

A cor do mel varia do branco pálido ao âmbar escuro (FERREIRA et al., 2009). A intensidade da cor do mel está diretamente correlacionada aos pigmentos (carotenoides e flavonoides) presentes, bem como ao seu conteúdo mineral (HABIB et al., 2014a; SILVANO et al., 2014). Outros fatores, como tempo de armazenamento, índice de HMF e tratamento térmico também estão envolvidos na definição da coloração do mel (BELAY et al., 2015; FERREIRA et al., 2009). De modo geral, a cor do mel define seu valor e destino comercial. Méis de cor escura são destinados a elaboração de produtos industrializados, enquanto os méis de cor clara são mais aceitos para o consumo direto (BELAY et al., 2015).

Sensorialmente, a qualidade do mel é definida pelo conjunto dos atributos sabor, aroma, consistência e cor. Estes atributos diferem entre diferentes tipos de méis, devido sua correlação direta com a composição química, a qual é caracterizada pela origem botânica do néctar e espécie de abelha produtora, condições edafoclimáticas e tempo de armazenamento (ANACLETO et al., 2007). As análises descritivas qualitativas seguidas de análises estatísticas multivariada são as técnicas mais aplicadas para determinar o perfil sensorial do mel. Lorente et al. (2008), aplicaram análise estatística



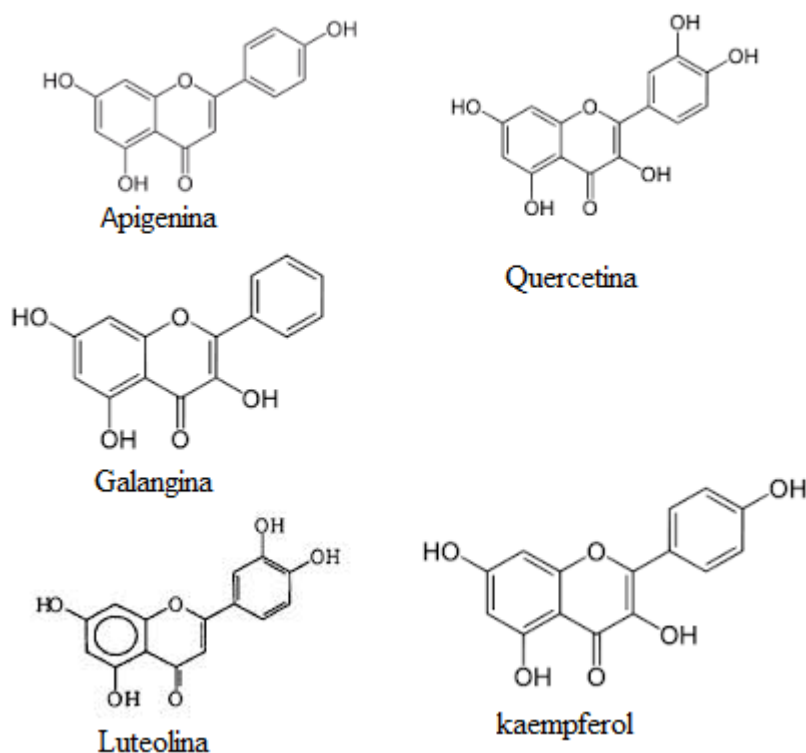
de correlação de Pearson aos resultados dos atributos sensoriais descritivos e os físico-químicos e verificaram correlação positiva da intensidade da cor de méis monoflorais e de melato com os parâmetros físico-químicos condutividade elétrica, acidez e cinzas. Em outro estudo Ferreira et al. (2009), utilizaram tratamento estatístico multivariado para distinguir méis produzidos por abelhas *Apis* e méis de abelhas sem ferrão, considerando os atributos mais utilizados para análise sensorial: cor, viscosidade e sabor.

### **3.4 Propriedades antioxidantes do mel**

O mel é a fonte natural mais antiga de compostos bioativos, particularmente de compostos antioxidantes, utilizada pelo homem. Os antioxidantes são considerados substâncias extras nutricionais presentes em baixas quantidades no mel, provenientes do néctar das plantas, que se consumidas com frequência reduzem o risco de doenças cardíacas, câncer e diminuição do sistema imunológico (ALVAREZ-SUAREZ et al., 2009). Entre os antioxidantes presentes no mel estão incluídos as enzimas catalase e glicose oxidase e as substâncias não enzimáticas como ácidos orgânicos, produtos da reacção de Maillard, aminoácidos, proteínas, flavonóides, polifenóis, tocoferol, flavonóis, catequinas, ácido ascórbico e carotenóides (MEDA et al., 2005; ALVAREZ-SUAREZ et al., 2010a). Os minerais e os oligoelementos presentes nos méis também têm sido associados a importantes atividades bioativas a exemplo do equilíbrio do stress oxidativo intracelular (SHOHAM; YODIM, 2000).

Os compostos de baixo peso molecular (fenóis e flavonóides) são considerados os componentes bioativos mais importantes do mel, sendo os compostos fenólicos apigenina, galangina, kaempferol, luteolina e quercetina os mais abundantes (HABIB et al., 2014b; ALVAREZ-SUAREZ et al., 2010a). Estes componentes são considerados antioxidantes ativos pela sua ação quelante em função da presença de uma hidroxila no carbono 3 e de um grupo carbonila no carbono 4 do anel pirano (DURAN; PADILA 1993). Hidroxilas nas posições 3 e 4, juntamente com o grupo carbonila, elevam a ação dos flavonóides como sequestrantes de radicais livres (SHI; NIKI, 1998). Alguns estudos definiram diferentes compostos como marcadores de suas fontes florais, como a hesperitina flavanona para mel de *Citrus* spp. e kaempferol para o mel de *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim), quercetina para o mel de *Helianthus annuus* L. (girassol), bem como alguns ácidos fenólicos, a exemplo do ácido elágico em mel de *Ericaceae* ssp.

(urze), cafeíco, p-cumárico e ácidos ferúlico para o mel de *Robinia pseudacacia* L. (acácia) e *Lavandula angustifolia* Mill (lavanda) (ALVAREZ-SUAREZ et al., 2009; TRUCHADO et al., 2009).



**Figura1:** Estrutura química de alguns flavonoides encontrados no mel

Fonte: <https://es.wikipedia.org/wiki/flavonoides/apigenina/quercetina/galangina/luteolina/kaempferol>

De acordo com seu modo de ação, os antioxidantes podem ser classificados em primários e secundários. Os antioxidantes primários atuam interrompendo a cadeia da reação através da doação de elétrons e/ou de um hidrogênio aos radicais livres, convertendo-os em produtos termodinamicamente estáveis e/ou reagindo com os radicais livres, formando o complexo lipídio-antioxidante que pode reagir com outro radical livre. Os antioxidantes secundários atuam retardando a etapa de iniciação da auto-oxidação por diferentes mecanismos que inclui a complexidade dos metais, do sequestro de oxigênio, decomposição de hidro peróxidos para a formação de espécie não radical, absorção da radiação ultravioleta ou desativação de oxigênio singlete (ADEGOKE et al., 1998).

Os compostos fenólicos estão incluídos na categoria de interruptores de radicais livres, os quais têm se mostrado eficientes na prevenção da autooxidação. Os antioxidantes fenólicos interagem, preferencialmente, com o radical peroxil, o qual é mais prevalente na etapa da autooxidação por possuir menor energia do que outros radicais, fato que favorece a abstração do seu hidrogênio. O radical fenoxil resultante, embora relativamente estável, pode interferir na reação de propagação ao reagir com um radical peroxil, via interação entre radicais. O composto formado, por ação da luz ultravioleta e temperaturas elevadas, poderá originar novos radicais, comprometendo a eficiência do antioxidante, que é determinada pelos grupos funcionais presentes e pela posição que ocupam no anel aromático, bem como pelo tamanho da cadeia desses grupos. O mecanismo de ação dos antioxidantes possui um papel importante na redução da oxidação lipídica em tecidos vegetais e animais, de modo que quando incorporado na alimentação humana não conserva apenas a qualidade do alimento, mas também reduz o risco de desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas, cardíacas, vasculares e neurológicas (ANGELO; JORGE, 2006).

Segundo Gheldof et al. (2002), os meis monoflorais podem exibir atividade antioxidante expressiva, semelhante a algumas frutas e hortaliças. Apenas as plantas possuem uma grande variedade de polifenólicos com estrutura de alta complexidade, os quais podem ser migrados para o mel durante o processo de colheita do néctar pelas abelhas (SILICI, et al., 2010). Em consequência, diversos estudos vêm sendo realizados com objetivo de definir a correlação dos ácidos fenólicos e flavonóides totais com a atividade antioxidante de méis provenientes de diferentes origens florais, geográficas e entomológicas (VIT, 2008; SILVANO et al., 2014; SILVA et al., 2013).

Análises multivariadas de dados da composição de méis de origens distintas tem mostrado correlação positiva de alguns compostos como flavonóides, minerais, proteínas e fenóis com a origem floral e o potencial antioxidante de méis (ESCUREDO et al., 2013; ALVAREZ-SUAREZ et al., 2012; FLORES et al., 2015). Nesse contexto, a atividade antioxidante de méis tem sido determinada por métodos colorimétricos, biológicos e eletroquímicos, sendo os métodos colorimétricos os mais aplicados. Os métodos colorimétricos são conhecidos por siglas, a exemplo do ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*), caracterizados pelas reações de transferência de átomos de hidrogênio e captura de oxigênio, DPPH (1,1-difenil-2- pictrazil), FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) e TEAC (*Equivalent Antioxidant Capacity*) ou ABTS<sup>•+</sup> [2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolína-6- ácido sulfônico)] pela transferência de elétrons

(HUANG; OU, 2005). Estes são chamados de ensaios de captação, devido à geração de um radical que reage com moléculas-alvos, para produzir cor, fluorescência, quimiluminescência, perda ou ganhos de sinais de ESR (*“Electron Spin Resonance”* ou Ressonância do Spin Eletrônico) ou outra mudança mensurável. A alteração nos sinais indica a presença de antioxidantes, o que permite sua quantificação (ALVAREZ-SUAREZ et al., 2009).

O método DPPH é um dos métodos mais utilizados para determinar a capacidade do mel em capturar radicais livres, por ser considerado prático, rápido e estável (ALVAREZ-SUAREZ et al., 2009). O DPPH é um radical livre estável devido à possibilidade de deslocamento de seus elétrons na molécula. Esse deslocamento confere uma intensa coloração púrpura, com comprimento de onda de absorção ao redor de 520 nm (SZABO et al., 2006). Normalmente, o mel é dissolvido em metanol para concentrações específicas, e cada amostra de mel é misturada com DPPH em solução de metanol, utilizada a amostra do branco com a mesma quantidade de metanol e DPPH. As misturas são deixadas em repouso na ausência de luz durante 15 minutos a 25 °C e a absorvância é medida a 517 nm. Geralmente, os resultados são relatados como a percentagem de inibição, isto é, a quantidade de antioxidante necessário para diminuir a concentração de DPPH inicial em 50%.

Outro método colorimétrico utilizado para avaliar a atividade antioxidante do mel é o ABTS<sup>•+</sup> [2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)]. A partir dessa metodologia, pode-se medir a atividade antioxidante de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica (KUSKOSKI et al., 2005). Este método baseia-se na geração do radical ABTS<sup>•+</sup> de cor azul esverdeado, formado pela reação de persulfato de potássio produzindo a oxidação do ABTS, medindo-se a redução do radical a uma absorvância de 734 nm (MEDA et al., 2005).

O método ORAC geralmente em mel é aplicado de acordo com procedimentos modificados por Gheldof; Engeseth (2002). Os radicais livres são produzidos por AAPH [L (+)-ascorbic acid, Epicatechin gallate, 2,2'-azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride] e o indicador fluorescente é a proteína phycoerthrin (β-PE). A perda da fluorescência indica a inibição por antioxidantes presentes nesta reação, a qual é monitorada a partir de microplaca com uso de fluorescência. Todos os reagentes são preparados em solução tampão de fosfato, pH 7,0, sendo o Trolox usado como padrão.

A aplicação de cada método de avaliação antioxidante difere entre si em relação ao mecanismo de reação, tipo de radical, condição de reação e na forma de apresentação

dos resultados (ALVAREZ-SUAREZ et al., 2009) ou seja, cada tipo método mensura uma determinada ação antioxidante da substância analisada.

### 3.5 Atividade antimicrobiana do mel

A ação antimicrobiana do mel é explorada na medicina tradicional particularmente no tratamento contra infecções tópicas e nas vias aéreas superiores. Diversos compostos presentes no mel, tem sido relatados como responsáveis pela sua atividade antimicrobiana, a qual foi primeiramente relacionada ao peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) presente. Entretanto, tem sido reportado que a lisozima, os ácidos fenólicos e flavonoides, derivados da fonte floral, também conferem atividade antimicrobiana ao mel (UTHURRY et al., 2011). Relatos recentes atribuem a atividade do mel contra microorganismos como um resultado da ação de seus constituintes (peróxidos e não peróxidos) e também de características intrínsecas deste produto, como o elevado teor de açúcares (KWAKMAN et al., 2010; ADAMS et al., 2008).

Estudos revelam uma ampla variação nos efeitos inibitórios de méis de origem distinta, particularmente quando se referem a méis monoflorais. O mel produzido por *Apis* a partir de *Leptospermum scoparium* L. (Manuka) tem demonstrando resultados promissores como antimicrobiano contra diversas bactérias de importância em alimentos, tais como *Staphylococcus Aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Sua atividade antimicrobiana tem sido associada aos teores de metilglioxal e a composição de fenólica característica deste tipo de mel, que é rico em flavonoides (galangina, pinocembrina e quercetina) e ácido cafeíco (Mavric et al., 2000; Adams et al., 2008; Atrott e Henle 2009). Por outro lado, a presença de ácidos aromáticos, ésteres e flavonoides é descrita por Kirnpal-Kaur et al. (2011) e Cushnie e Lamb (2005) como responsável pela atividade antimicrobiana do mel de Manuka. De acordo com estes pesquisadores, os flavonóides pinocembrina e galangina, juntamente com o ácido cafeíco, podem inibir enzimas bacterianas envolvidas na manutenção da membrana citoplasmática causando perda contínua de íons de potássio e extravasamento do material celular.

Outro mel que tem sido estudado quanto às propriedades antimicrobianas é o mel de acácia (*Robinia pseudacacia* L.), eucalipto (*Viminalis* Hook) e girassol (*Helianthus annuus* L.) produzido por *A. mellifera*. Para estes méis antimicrobianos, a atividade tem sido associada ao flavonóide quercetina, que é presente e elevadas quantidades em sua

composição. A quercetina interfere na permeabilidade da membrana citoplasmática, alterando o potencial elétrico e diminuição da síntese de ATP (KIRNPAL-KAUR et al., 2011).

De modo geral, é possível afirmar que o mel possui atividade contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, porém os fatores responsáveis pela atividade variam com a origem do mel e consequentemente seu poder inibitório. Em estudo realizado por Alvarez-Suarez et al. (2010b) micro-organismos Gram-positivo como *Bacillus subtilis* e *S. aureus* demonstram maior sensibilidade que Gram negativo como *Escherichia coli*, e *Pseudomonas aeruginosa* porém a resposta de cada bactéria também variaram para os tipos de mel avaliados (monofloral, multifloral e de melato). Essa variação na sensibilidade encontrada para bactérias específicas também é observada quando diferentes estudos são comparados. Por exemplo, *S. aureus* foi mais sensível que *B. subtilis*, *Candida tropicalis* e *Moraxella catarrhalis* nos ensaios com méis produzidos por abelhas Apis na Turquia ao ser estudo realizados por Küçük et al. (2007), diferente do observado por Temaru et al. (2010), que em estudo relatou *E. coli* e *P. aeruginosa* como mais sensíveis que *S. aureus* em ensaios com méis de abelhas sem ferrão. Ainda, conforme Basson;Grobler, (2008), *S. aureus* foi fracamente inibida por méis monoflorais das espécies botânicas *Leucospermum cordifolium* e *Erica* spp. produzidos por abelhas sem ferrão, mas fortemente inibida por méis monoflorais de *Calluna vulgaris* L. (Hull) produzidos por Apis em Portugal (Henriques et al., 2005) e méis monoflorais de *Prosopis nigra* e *Citrus lemon* também produzidos por Apis (Isla et al., 2011) produzidos na região Noroeste da Argentina.

Entre as bactérias Gram-negativas, *E. coli* tem sido frequentemente ensaiada em estudos que envolvem a avaliação das propriedades antibacterianas de méis. A concentração inibitória mínima de méis para esta bactéria varia de 6,25 a 50g/100g, considerando os resultados com méis produzidos na Espanha (Gallardo-Chacón et al., 2008), Cuba (Alvarez-Suárez et al., 2010b), Tailândia (Temaru et al., 2007; Srisayam e Chantawanakul, 2010), Paraguai (Vit et al., 2009) e Argentina (Basualdo et al., 2007; Vit et al., 2009).

Hussain et al. (2015) observaram um forte potencial inibidor de méis de Monuka produzidos por Apis e por abelhas sem ferrão frente *Salmonella typhi*. No estudo a atividade dos méis de Apis foi relacionada com o índice de peróxido de hidrogênio presente, porém esta relação não existiu para os méis de abelhas sem ferrão, indicando a atividade de outros compostos do mel. Conforme Brudzynski et al. (2012), apesar do

peróxido de hidrogênio ter sido considerado inicialmente responsável pela atividade antibacteriana do mel, este composto está presente em quantidades suficientes apenas para uma fraca atividade bacteriostática em méis maduros, sendo que a atividade antimicrobiana dos méis é o resultado de um conjunto de compostos ativos, particularmente de polifenóis,  $H_2O_2$  e metais (BRUDZYNSKI et al., 2012).

## **4. MATERIAL e MÉTODOS**

### **4.1 Aquisição das amostras de mel**

Para realização do estudo foram adquiridas amostras de mel em quatro meliponários distintos. Dois meliponários localizados na região do Seridó do estado do Rio Grande do Norte, e dois na região do Agreste do estado da Paraíba, – Brasil. Todas as regiões eram situadas na região do Semiárido nordestino. A colheita das amostras em cada meliponário foi realizada ao final de duas estações climáticas distintas. A primeira colheita foi realizada ao final da estação de estiagem (dezembro de 2012) e a segunda ao final do período chuvoso (agosto de 2013). Em cada meliponário para cada estação foram colhidas três amostras de mel oriundas de três cortiços distintos para cada espécie de abelha sem ferrão: *Meilipona subnitida* Ducke (jandaíra) e *Melipona scutellaris* Latrelle (uruçu), totalizando um total de 24 amostras distintas de mel. Ao final de cada colheita as amostras foram acondicionadas em potes de vidro âmbar devidamente esterilizados e identificados e armazenados em ambiente a temperatura de aproximadamente 7 °C até o momento das análises.

### **4.2 Análise melissopalínológica**

Para confirmação da classificação e origem monofloral das amostras de mel, foi realizada a análise melissopalínológica das amostras, conforme método descrito por Barth, (1989). Alíquotas de 10g de cada amostra foram dissolvidas em 20 mL de água destilada e centrifugadas a 4000 rpm durante 20 min. Após 1h de repouso o sobrenadante foi separado e os sedimentos concretados em glicerina e envelopados entre lâminas seladas por parafina. A caracterização polínica foi determinada pela contagem e identificação mínima de 500 grãos de pólen em 4 campos distintos da lâmina utilizando Microscópio ótico (400 x) em comparação a imagens de referências de pólen de plantas apícolas disponibilizadas pelo Laboratório de Insetos Úteis/Entomologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Universidade de São Paulo ESALQ/USP. Foram classificadas como méis monoflorais, as amostras com uma representação polínica de mesma origem superior a 45 % conforme Barth (1989). Todas as análises foram realizadas em triplicata para três amostras distintas de cada tipo de mel estudado, sendo analisadas um total de 72 lâminas.



### 4.3 Análises físico-químicas

Todas as análises físico-químicas foram feitas em triplicata, para calcular o valor médio para cada amostra. A determinação do conteúdo de água e do °Brix dos méis foi realizada pelo método refratométrico com medição do índice de refração nas amostras a temperatura de 20 °C conforme metodologia da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 1990). O teor de água foi determinado em conformidade à tabela de Chatway. O equipamento utilizado foi um refratômetro (Abbe de bancada \_ Modelo: Q767-B). Para determinação de cinzas foi adotado o método de incineração da amostra em mufla a 550 °C até peso constante conforme metodologia da AOAC (1990).

A acidez total foi determinada a partir da soma da acidez livre e acidez lactônica conforme a metodologia da *International Honey Commission* (IHC, 2002). A acidez livre foi medida a partir da titulação de uma solução de mel (10g) dissolvida em 75 mL de água com NaOH 0,05 N até o ponto de equivalência (pH). A acidez lactônica foi quantificada a partir da adição de 10 mL de NaOH e em seguida titulada com HCl a 0,05 N até pH 8,3. O pH foi mesurado a partir de um potenciômetro digital (UB-10 – Denver) devidamente calibrado.

Quanto ao conteúdo de proteínas foi determinado pelo método de micro-Kjeldahl, utilizando 6,25 como fator de conversão para transformação de nitrogênio total em percentual de proteínas conforme metodologia da AOAC, (1990) e da IHC, (2002). A condutividade elétrica foi quantificada a partir de leitura direta de uma solução de mel a 20% calculada a partir da base seca realizada em condutivímetro (Analyser, modelo: 600) conforme metodologia adotada pela IHC, (2002).

A cor foi classificada pelo método de Pfund. As amostras de mel foram diluídas em solução de 50% (v / v) em água purificada e lidas em espectrofotômetro a uma absorbância de 636 nm. As absorbâncias foram convertidas para as determinações de Pfund pela fórmula  $mmPfund = -38,7 + 371,39 \times Abs$  (ALMEIDA-MURADIAN et al., 2012). A intensidade da cor dos méis foi quantificada como a partir da absorbância líquida definida como a diferença entre as absorbâncias espectrofotométricas a 450 e 720 nm. Para este efeito, as amostras de mel foram preparadas em solução de concentração de 50 % (v / v) com água purificada em temperatura entre 45 e 50 °C, e sonicadas durante 5 minutos e em seguida filtradas em papel whatman (0,45 µm) para eliminar as partículas de grandes dimensões. Os resultados foram expressos como mAU (PILJAC-ŽEGARAC et al., 2009).

#### **4.4 Perfil de açúcares**

Aproximadamente 0,5g de mel foi pesado em tubos de polipropileno e misturado com 10 mL de água. Em seguida, um mililitro desta dissolução foi filtrado em membrana de acetato de celulose 0,20 µm antes da análise cromatográfica cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A determinação dos açúcares (sacarose, glicose, arabinose e frutose) foi realizada utilizando cromatógrafo série 1100 da Hewlett-Packard equipado com um detector de índice de refração operado a 50 °C, uma coluna (Transgenomic, Glasgow, Reino Unido) 300 × 7,8 milímetros CARBOsep CHO a temperatura de 80 °C. Foi utilizada água ultrapura como a fase móvel (taxa de fluxo de 0,4 mL / min). Os picos da amostra de CLAE foram identificados por comparação dos tempos de retenção obtidos a partir de padrões de açúcares. As amostras de mel também foram adicionadas com padrões (Sigma ®), a fim de verificar a identidade dos picos cromatográficos. Injeções foram realizadas em duplicata e as áreas médias de pico foram usadas para a quantificação (BELAY et al., 2013).

#### **4.5 Análise sensorial: Análise Descritiva Qualitativa por Ordenação \_ ADQO**

Para análise do perfil sensorial dos méis foi aplicado o método de Análise Descritiva Qualitativa por Ordenação (ADQO) conforme procedimentos descritos por Richter et al. (2010).

##### **4.5.1 Recrutamento e pré-seleção dos julgadores**

Foram recrutados 34 painelistas com conhecimentos prévios de análise sensorial descritiva e com base no interesse e disponibilidade em participar após terem sido informados sobre o tipo de produto a ser avaliado e procedimentos dos testes, conforme descrito no projeto cadastrado no Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CAAE: 06371012.8.0000.5188). Inicialmente os painelistas participaram de uma pré-seleção a partir de testes preliminares para avaliação do desempenho quanto ao reconhecimento de aromas, gostos básicos e discriminação de cor, doçura e viscosidade. Para o reconhecimento de aroma, o critério de avaliação aplicado foi de 70% o mínimo de respostas corretas. Na sequência os participantes aprovados foram submetidos a um teste de reconhecimento de gostos básicos (doce, salgado, ácido, amargo e umami),

sendo que neste teste considerou-se que, o avaliador que não identificasse pelo menos uma das soluções de base seria removido do painel (PENNA, 1980). Para avaliar a capacidade de discriminação da intensidade de cor, doçura e viscosidade foram aplicados testes de ordenação, conforme metodologias de Meilgaard et al. (1999). O critério de avaliação adotado foi de 100% de acertos.

Para o teste ordenação de intensidade de cor e doçura foram disponibilizadas amostras de preparado de refresco em pó sabor tangerina, oriundas de diferentes marcas comerciais (Mid, Glup e Fresh) selecionadas pela diferença entre si na cor. Para discriminação de doçura utilizou-se os mesmos preparados de refresco em pó, porém, adicionados de concentrações distintas de sacarose (concentrações: Fresh 1%, Mid 5%, Glup 8% e Fresh 12%). Quanto ao teste discriminativo da intensidade de viscosidade foram utilizadas amostras de geleia de goiaba a temperatura ambiente, selecionadas pela diferença entre si quanto ao ter de °Brix (amostras: A = 35, B = 45, C = 48 e D = 52 °brix). Todos os testes exceto o de reconhecimento de aromas foram aplicados em cabines individuais. No momento da prova foram disponibilizadas quatro amostras codificadas com três dígitos, um copo com água e uma fatia de maçã para limpeza do palato entre uma prova de uma amostra e outra (exceto para o teste de cor). Ao receber as amostras cada painelistas também recebeu uma ficha de avaliação do teste. Cada membro foi orientado a avaliar as amostras da esquerda para direita e em seguida ordenasse-as por intensidade crescente em relação ao atributo avaliado, ou seja, da amostra de menor intensidade para a de maior intensidade. Cada teste foi realizado em sessão individual com prova duplicada, em momentos diferentes. Ao final dos testes preliminares foram selecionados 19 painelistas uma vez que demonstraram capacidade de percepção requerida.

#### **4.5.2 Definição da terminologia descritiva**

O desenvolvimento da terminologia descritiva dos méis foi conduzido com 19 painelistas pré-selecionados, utilizando-se o Método Rede, descrito por Moskowitz, 1993 e Richter et al. (2010). Devido à quantidade de amostras para análise (oito amostras distintas) os julgadores decidiram a realização de quatro sessões de modo que as sessões ficaram divididas com as seguintes amostras de mel: juazeiro e malícia produzidos pelas abelhas jandaíra e uruçú, e em méis de jurema branca e velame branco produzido pelas abelhas jandaíra e uruçú. Em cada avaliação foi solicitado ao painelistas

que comparasse o par de amostras e descrevesse similaridades e diferenças entre as mesmas. Após cada painelista ter gerado suas percepções de similaridades e diferenças, foi conduzida uma sessão de discussão em grupo para selecionar os atributos e termos mais citados, agrupar os semelhantes e desenvolver uma lista de descritores consensual. Para compreensão da intensidade de cada atributo, foram realizadas duas sessões de treinamento qualitativo, usando amostras de referência para cada atributo como descrito na tabela 1 como propôs a equipe. Após as adequações de intensidade das amostras de referência em relação às amostras de mel estudadas, um protocolo foi produzido com instruções e descrição dos atributos avaliados, as definições de intensidade e as amostras de referência adequada à intensidade mínima e máxima de cada mel avaliado, para facilitar e padronizar a forma de manipular as amostras durante as avaliações.

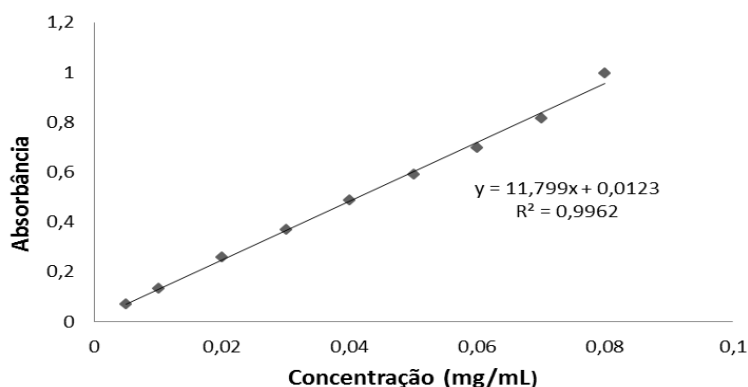
**Tabela 1.** Definições e referências para descrição das características de intensidade dos atributos sensoriais de méis monoflorais de abelhas sem ferrão produzidos na região do Semiárido do Nordeste brasileiro

| <b>Atributos<br/>Descritores</b> | <b>Definição</b>                           | <b>Amostras de Referência</b>                                                           |
|----------------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Cor âmbar</b>                 | Cor característica de mel                  | <b>Fraco:</b> Azeite de oliva (Gallo)*<br><b>Forte:</b> Mel de abelha (Apiflora)*       |
| <b>Aroma</b>                     | Intensidade do aroma característico de mel | <b>Fraco:</b> Água (Nenhum)<br><b>Forte:</b> Mel de abelha (Apiflora)*                  |
|                                  | Intensidade de aroma ácido                 | <b>Fraco:</b> Água (Nenhum)<br><b>Forte:</b> Vinagre de maçã (Vinhoto)*                 |
| <b>Textura</b>                   | Intensidade da viscosidade                 | <b>Fraco:</b> Azeite de oliva (Gallo)*<br><b>Forte:</b> Leite condensado (Cemil)*       |
| <b>Gosto</b>                     | Intensidade do sabor doce                  | <b>Fraco:</b> Solução de sacarose (5%)<br><b>Forte:</b> Solução de sacarose (70%)       |
|                                  | Intensidade do sabor amargo                | <b>Fraco:</b> Água (Nenhum)                                                             |
|                                  |                                            | <b>Forte:</b> Chocolate amargo _70% (Cacau Show)*                                       |
| <b>Gosto</b>                     | Intensidade do sabor ácido                 | <b>Fraco:</b> Água (Nenhum)<br><b>Forte:</b> Solução acidificada a 0,5% (Ácido cítrico) |

\*Marca comercial

#### 4.6 Análises de compostos fenólicos totais, flavonóides e prolina

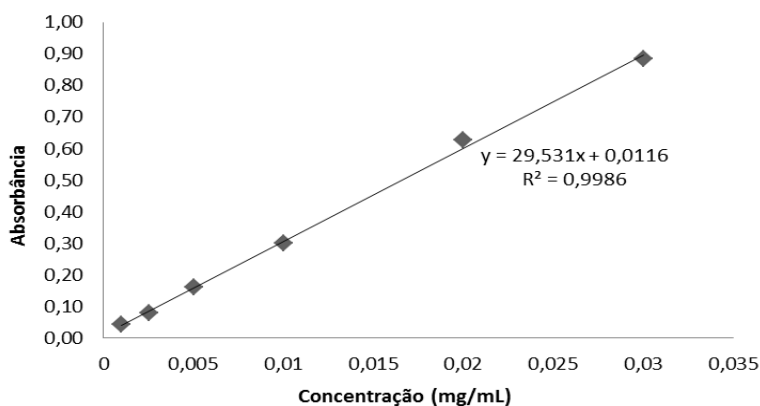
O método de Folin-Ciocalteu (Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventos, 1999) foi adotado para determinar o conteúdo total de compostos fenólicos. Para cada amostra de mel foi preparada uma solução com água destilada numa proporção de 1:10. Uma alíquota de 0,5 mL desta solução foi adicionada de 2,0 mL do reagente de Folin-Ciocalteu 0,2 N (Sigma - Aldrich Chemie, Steinheim, Alemanha). O material permaneceu em repouso e após 5 minutos foram adicionados 2,0 mL de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (Labosi, Paris, França) a 7,5%. Depois de decorridas 2h a temperatura ambiente e sem luz foi realizada a leitura das soluções em espectrofotômetro a absorvância de 760 nm contra um branco preparado com água em substituição a solução de mel. Para calibração da curva padrão foi utilizado ácido gálico (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemanha) nas concentrações de 0 - 0,050 mg/mL. A partir da média de três leituras foi quantificado o total de compostos fenólicos expresso em mg de ácido gálico por 100g de mel (MEDA et al., 2005).



**Figura 1.** Curva padrão de ácido gálico para análise do conteúdo de compostos fenólicos totais

Para quantificação de flavonoides totais foi adotado o método de Dowd com adaptações propostas por Meda et al. (2005). Inicialmente 5 mL de tricloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) (Labosi, Paris, França) a 2% em metanol (Fluka Chemie, Switerland), foi adicionado a 5 mL da solução aquosa de mel (1:10). Após 10 minutos de repouso em temperatura ambiente e na ausência de luz, as soluções foram lidas em espectrofotômetro a 415 nm, contra uma solução banco composta de 5 mL da solução

diluída de mel em 5 mL de metanol sem adição de  $\text{AlCl}_3$ . Para calibração da curva padrão (Figura 2.) foi utilizada quercetina (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemanha) nas concentrações 0 - 0,050 mg/mL. A partir da média de três leituras os resultados expressos em mg equivalentes de quercetina (QE) por 100g de mel.



**Figura 2.** Curva padrão de quercetina para análise do conteúdo de flavonoides totais

O teor de prolina foi quantificado usando o método de Ough adaptado por Bogdanov (1999). Para tanto, uma solução de 0,5 mL de mel foi misturada a 1 mL de ácido fórmico (Labogros, França) em concentração de 80% e 1 mL de ninidrina (3% em monometílico de etilenoglicol) (Labosi, Paris, França). Após agitação vigorosa durante 15 minutos em vortex esta solução foi mantida em banho maria durante 10 minutos a 70 °C. Ao final desta etapa foram adicionados 5 mL de 2-propanol (Fluka Chemie, Suíça) a 50% e após 45 minutos de repouso a temperatura ambiente as soluções foram lidas em espectrofotômetro a 510 nm de absorbância. Foi usada uma solução como branco preparada com 0,032 mg/mL de solução de prolina (Labosi, Paris, França). A concentração de prolina em mg/kg de mel foi quantificada a partir da média de três leituras obtidas no espectrofotômetro (UV mini \_ 1240\_ Shimadzu), a partir da seguinte equação:  $\text{Prolina (mg/kg)} = (\text{am/ap}) \times (\text{sp1/sp2}) \times 80$

**Onde:** am = absorvância da solução de mel

ap = a absorvância da solução padrão de prolina

sp1= mg de prolina usado para a solução padrão

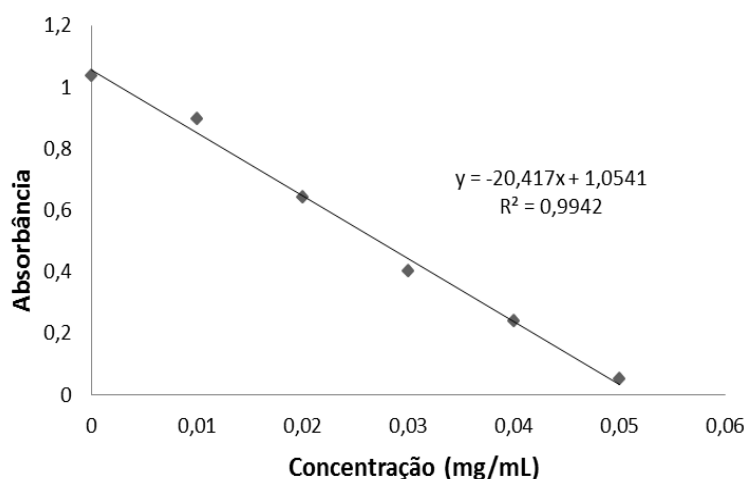
sp2 = peso de mel em gramas

80 = fator de diluição

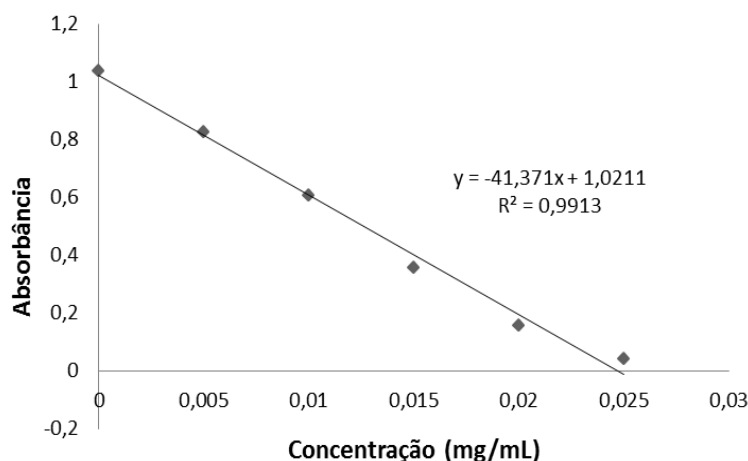
#### 4.7 Análises do potencial antioxidante

O método de DPPH, que se baseia na capacidade de reduzir o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila, foi realizado conforme metodologia descrita por Meda et al. (2005). Os méis foram dissolvidos em metanol em proporção de 1:10, em seguida 0,75 mL de cada solução metanólica foi adicionada em 1,5 mL de uma solução de DPPH (Fluka Chemie, Suíça) diluída na uma concentração de 170-2,65 µg/mL de metanol. As misturas foram deixadas em repouso por 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida ambas foram lidas em espectrofotômetro (UV mini \_ 1240\_ Shimadzu) a uma absorvância de 517 nm. Uma solução foi utilizada como branco preparada a partir de metanol na concentração de 10%. Para calibração da curva padrão (Figuras: 3 e 4) foi utilizado quercetina (0,01 - 0,050 mg/mL) e ácido ascórbico (Labosi, Paris, França) (0,01 - 0,050 mg/mL) ambos preparado com metanol. A média de três leituras foi utilizada para expressar o total da atividade antioxidante em mg de ácido ascórbico e quercetina por 100g de mel.

O percentual de inibição dos radicais livres foi determinado pelo decaimento da absorvância das amostras de mel (A) em relação ao decaimento da absorvância do branco (C) dividido pela absorvância do branco (C) e multiplicado por 100 conforme a seguinte equação:  $RSA \% = [(A - C) / C] \times 100$ .



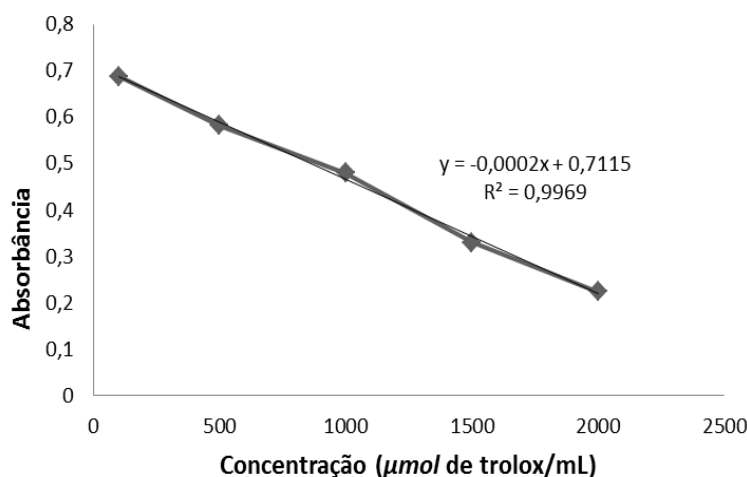
**Figura 3.** Curva padrão de ácido ascórbico para análise da atividade antioxidante do radical DPPH



**Figura 4.** Curva padrão de quercetina para análise da atividade antioxidante do radical DPPH

O método  $ABTS^{\cdot+}$  foi realizado de acordo a Sant'Ana et al., (2012). O radical  $ABTS^{\cdot+}$  foi preparado utilizando uma mistura (solução 1) de 5 mL de uma solução aquosa de  $ABTS^{\cdot+}$  [2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolína-6- ácido sulfônico)] 7 mM com 0,44 mL de uma solução aquosa de persulfato de potássio a 140 mM, o qual passou por um processo de homogeneização durante 16 h na ausência de luz. Para realização do ensaio  $ABTS^{\cdot+}$  foi preparada uma solução diluída em metanol (solução 2) a partir de 2 mL da solução de radical  $ABTS^{\cdot+}$  (solução 1) a qual foi ajustada até uma absorvância de  $0,700 \pm 0,005$  nm. O ensaio foi realizado a partir de uma líquua de 50  $\mu$ L da solução de mel preprada em metanol na proporção 1:10 com 5 mL da solução 2 do  $ABTS^{\cdot+}$  em tubos de ensaios de vidro. Após 6 minutos em repouso na ausência de luz, foi realizada a leitura da mistura em aparelho espectrofotômetro (UV mini \_ 1240\_ Shimadzu) a uma absorvância de 734 nm usando metanol como branco. Todo o ensaio foi conduzido em triplicata na ausência de luz. Os valores da absorvância foram traçada em uma curva padrão de  $\mu$ mol de trolox/mL (0-2000  $\mu$ mol de trolox/mL) (Sigma-Aldrich, Alemanha). As médias de três leituras foram processadas e os resultados apresentados em  $\mu$ mol de trolox por 100g de mel.





**Figura 5.** Curva padrão de trolox para análise da atividade antioxidante do radical ABTS<sup>•+</sup>

O ensaio do ORAC foi aplicado conforme Gorjanovic' et al. (2013), com adaptações. As amostras dos méis foram diluídas em uma solução da proporção 1:10 de tampão fosfato na proporção de 1 mg/mL. Desta solução foram realizadas seis diluições distintas que variaram entre 10 a 60 vezes. Em seguida, 25 µL de cada solução de mel foram adicionados em triplicata em uma microplaca de 96 poços contendo 200 µL da solução de ensaio e 150 µL de fluoresceína (2,7-diclorofluoresceína diacetato) (0,08 mM). As microplacas foram incubadas por 10 minutos a 37 °C, e em seguida foi adicionado 25 µL de AAPH [L (+)-ascorbic acid, Epicatechin gallate, 2,2'-azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride] (150 mM). Na sequência, as microplacas foram agitadas por 3 segundos, e a fluorescência foi medida leitor de microplacas Fluostar Optima (BMG Labtech Durham, NC, USA) após 2 minutos, bem como após 120 minutos, utilizando comprimentos de onda de 485 e 530 nm respectivamente. Os valores de ORAC foram calculados em função da área sob a curva de trolox. Os resultados foram expressos em micromoles de trolox equivalentes por 100 gramas de mel (µmol TE/100g de mel).

#### 4.8 Perfil de fenólicos do mel

Para determinação do perfil dos compostos fenólicos foi adotado o método utilizado por Álvarez- Suarez et al. (2010). Os extratos metanólicos do mel foram obtidos a partir de 50 g de mel diluídas em cinco partes de água acidificada (pH 2 com

HCl \_ 1M) para eluição dos compostos polares e açúcares. Após totalmente homogeneização esta fração foi filtrada em algodão para remoção das partículas sólidas. Em seguida a fração filtrada foi novamente filtrada em uma coluna de vidro (25 x 2 cm) composta de 300g de resina Amberlite XAD-2 (tamanho dos poros = 9 nm, tamanho de partículas = 0,3-1,2 mm) (Sigma Aldrich ®). Após este processo a coluna foi lavada com duas frações de 300 mL de água neutra. Então em seguida os compostos fenólicos aderidos na resina foram eluídos através de uma lavagem da coluna com 600 mL de metanol. Após a obtenção dos extratos de metanólicos de cada amostra de mel, os mesmos foram submetidos ao evaporador a vácuo rotativo a 40 °C para uma concentração de 10 ml de extrato.

Para a identificação dos compostos fenólicos, foi utilizado HPLC (Shimadzu proeminência LG2OAT HPLC) equipado com um detector de arranjo de diodos (SPDM20) e uma coluna de fase reversa (Shimpack CLCDS, 4,6 mm x 250 mm x 5 mm). Para a fase móvel (A) consistiu de uma mistura de 2% de ácido acético aquoso em água, para fase móvel (B) acetonitrilo: metanol (2: 1), a uma taxa de fluxo de 1 mL / min. Um gradiente de eluição foi utilizado, começando com 20% de B até 15 min, 30% de B em 20 min, 40% de B em 30 min e isocrática a 40% de B até 45 min. Os flavonóides foram separados utilizando uma fase móvel que consiste em 1% de ácido acético aquoso (A) e metanol (B) a uma taxa de fluxo de 1 mL / min. A fase móvel foi administrada utilizando o seguinte gradiente de solvente: 0 - 3 min 40% de B, 5 - 15 min 45% B, 17 - 25 min 50% de B, 27 - 35 min 55% de B e de 35-40 min 70% de B . O volume de injeção foi de 10 µL. A identificação de compostos fenólicos foi baseada nos tempos de retenção, no espectro de UV e comparação cromatográfica de padrões puros (Sigma Aldrich ®) (SILVA et al., 2013).

## **4.8 Análises da atividade antimicrobiana do mel**

### **4.8.1 Cepas teste**

As cepas *Listeria monocytogenes* 3375, *Staphylococcus aureus* 18N, *Escherichia coli* CINF1, *Salmonella* spp. CINF2, *Pseudomonas aeruginosa* CINF3 isoladas de amostras de alimentos foram obtidas da Coleção do Centro de Inovação e Apoio Tecnológico (CINATE, Porto, Portugal). As cepas estoque de todas as bactérias ensaiadas foram mantidas em criotubos contendo 15% de glicerol (p / v) a -80 °C.

A padronização do inóculo bacteriano foi realizada de acordo com os procedimentos descritos por Wiegand, Hilpert e Hancock (2008) e McMahon et al. (2008). Para tanto, as cepas bacterianas foram inicialmente cultivadas em placas contendo ágar Mueller-Hinton (MH, Himedia, Índia) e incubadas *overnight* a 37 °C (18 - 24 h). Em seguida, uma única colônia foi cultivada em 5 mL de caldo MH e cultivadas *overnight* a 37 °C com agitação (250 rpm). A massa celular obtida foi colhida por centrifugação (4500 g, 15 min, 4 °C), lavada duas vezes em solução salina (NaCl 0,85% p / v) estéril e re-suspensa em CBHI estéril. As suspensões bacterianas obtidas foram submetidas a diluições seriadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ ) em caldo MH. A densidade óptica a 600 nm (DO600) da cultura bacteriana de cada diluição foi determinada em espectrofotômetro.

Para a determinação do número de unidades formadoras de colônias (UFC) de cada diluição, um volume de 0,1 mL da suspensão de micro-organismos foi inoculado na superfície de placas de Petri contendo MH, e espalhado com auxílio de alça Drigalsky estéril. Posteriormente, as placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas, e, em seguida, a contagem do número de células viáveis foi determinada e expressa em UFC/mL. Com o número de colônias obtido, sendo corrigido pela respectiva diluição, foi determinado o número de células contidas no tubo onde foi encontrado valor de DO600 de 0,1 para correspondendo a, aproximadamente, 8 log UFC/mL (McMAHON et al., 2008).

#### **4.8.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

A CIM das amostras de mel foi determinada pelo ensaio de microdiluição em caldo de acordo com os procedimentos descritos pelo Clinical and Laboratory Standards Institute, documento M07-A9 (2012). Os méis foram preparados em concentrações de 10 a 50 g/100 mL em caldo MH e esterilizados por filtração em membrana 0,22 µm (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belgium).

Aproximadamente 50 µL do inóculo (6 log CFU/mL) foi adicionado a cada poço contendo 50 µL de caldo MH adicionado de diferentes concentrações de mel. Simultaneamente, foi preparado o controle de crescimento (positivo) e de esterilidade (negativo). O sistema foi agitado e incubado a 37 °C por 24 horas, envolto com filme plástico para evitar a desidratação microbiana e garantir que não houvesse a volatilização do mel. A CIM foi definida como a menor concentração de mel capaz de inibir o crescimento visível das cepas.

#### **4.9 Análises dos dados**

As análises estatísticas foram realizadas utilizando Software Statistica 7.2. Para identificação de diferença entre as médias dos diferentes tipos de méis estudados foi realizada a análise de variância (Anova) e aplicado o teste de Tukey considerando 5% significância.

Para avaliação dos resultados da análise sensorial foi aplicado o teste Friedman (Newell e MacFarlane, 1987), para identificação de diferença significativa ao nível de 5% de significância entre os méis monoflorais estudados, considerando para o teste quatro amostras distintas de mel, 19 painelistas e valor crítico 21.

Análise de correlação de Pearson ( $r$ ) e análise de componente principal (PCA) também foram aplicadas. Os dados referentes à CIM foram expressos em valores modais considerando a ausência de variação entre as repetições.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS C. J.; BOULT, C. H.; DEADMAN, B. J.; FARR, J. M.; GRAINGER, M. N.; MANLEY-HARRIS, M.; SNOW M. J. Isolation by HPLC and characterisation of the bioactive fraction of New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. **Carbohydrate Research**, v. 343, p.651-659.

ADEGOKE, G. O.; KUMAR, M. N.; GOPALAKRISHNA, A. G.; VARDARAJ, M. C.; SAMBAIAH, K.; LOKESH, B. R. Antioxidants and lipid oxidation in food - a critical appraisal. **Journal of Food Science & Technology**, v. 35, p.283-98, 1998.

ALMEIDA-MURADIAN, L. B.; LUGINBÜHL, W.; BADERTSCHER, R.; GALLMANN, P. Generalizability of PLS calibrations with FT-IR ATR spectrometry for the prediction of some physicochemical measurands of honey. **Agroscope Liebefeld-Posieux Science**, p.541, 2012.

ALVAREZ-SUAREZ, J. M.; GONZALEZ-PARAMA, A. M.; SANTOS-BUELGA, C.; BATTINO, M. Antioxidant characterization of native monofloral Cuban honeys. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 9817-9824, 2010.

ALVAREZ-SUAREZ, J. M.; TULIPANI, S.; DÍAZ, D.; ESTEVEZ, Y.; ROMANDINI, E.; GIAMPIERI, F.; DAMIANI, E.; ASTOLFI, P.; BOMPADRE, S.; BATTINO, B. Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 2490-2499. 2010.

ALVAREZ-SUAREZ, J. M.; TULIPANI, S.; ROMANDINI, S.; VIDAL, A.; ATTINO, M. Methodological aspects about determination of phenolic compounds and in vitro evaluation of antioxidant capacity in the honey: a review. **Current Analytical Chemistry**, v. 5, 292-303, 2009.

ALVES, M. L. T. M. F. N. Produção de pólen. **Revista Doce Mel**, v. 41, p.20-21. 1996.

ALVES, R. M. O; CARVALHO, C. A. L.; FAQUINELLO, P.; LEDO, C. A. S.; FIGUEIREDO, L. Parâmetros biométricos e produtivos de colônias de *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae) em diferentes gerações. **Magistra**, v. 24, p.105- 111, dez. 2012.

ANACLETO, DANIELI, A. et. al. Composição de amostras de mel de abelha Jataí (*Tetragonisca angustula latreille*, 1811). **Revista Ciência e Tecnologia em Alimentos**, v.29, p. 535-541, 2009.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, p. 232-240, 2006.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists) (1990). Official methods of the analysis of official analytical chemists. (15th ed.) Vol. II, USA: Virginia.

AQUINO, I. S. **Abelhas Nativas da Paraíba**. João Pessoa: Editora Universitária /UEPB. 2006. 91p.

ATTROT, J.; HENLE, T. Methylglyoxal in Manuka honey-Correlation with antibacterial properties. **Czech Journal of Food Science**, v. 27, p. 163-165. 2009.

BARTH, O. M. **O Pólen no Mel Brasileiro**. Rio de Janeiro: Luxor. 1989. 150p.

BASSON, J. N.; GROBLER, R. S. Antimicrobial activity of two South African honeys produced from indigenous *Leucospermum cordifolium* and *Erica* species on selected micro-organisms. **Complementary and Alternative Medicine**, v. 8, p. 4 2008.

BASUALDO, C.; SGROY, V. N.; 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. 12, p. 375-8, 2007.

BELAY, A.; SOLOMON, W. K.; BULTOSSA. G.; NURU ADGABA, N.; MELAKU, S. Botanical origin, colour, granulation, and sensory properties of the Hareenna forest honey, Bale, Ethiopia. **Food Chemistry**, v. 167, p. 213-219. 2015.

BILUCA, F. C.; BETTA, F. B.; OLIVEIRA, G. P.; PEREIRA, L. M.; GONZAGA, L. V., COSTA, A. C. O.; FETT, R. 5-HMF and carbohydrates content in stingless bee honey by CE before and after thermal treatment. **Food Chemistry**, v. 159, p.244–249. 2014.

BOGDANOV, S. Honey for Nutrition and Health: A Review. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 27, 6. 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução de 20 de outubro de 2000. Regulamento técnico de identidade e qualidade do mel. **Diário Oficial da União**, Brasília, nº 204, 23 de outubro de 2000. Seção 1. P. 16. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/dispoa>. Acesso: 20 de agosto de 2014.

BRUDZYNSKI, K.; LANNIGAN, R. Mechanism of honey bacteriostatic action against MRSA and VRE involves hydroxyl radicals generated from honey's hydrogen peroxide. **Frontiers in Microbiology**, v. 3 p. 36. 2012.

CARVALHO, C. A. L.; MORETI A. C. C. C.; MARCHINI, L. C.; ALVES, R. M. O.; OLIVEIRA, P. C. F. Pollen spectrum of honey of “uruçu” bee (*Melipona scutellaris* Latreille, 1811). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 61, p.63-67. 2001.

CARVALHO, C. A. L.; NASCIMENTO, A. S.; PEREIRA, L. L.; MACHADO, C. M.; CLARTON, L. Nectar and pollen plants used by *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae) in Recôncavo Baiano region, Brazil. **Magistra**, v. 18, p.249-256. 2006.

CARVALHO, C. A. L.; SODRÉ, G. S.; FONSECA, A. A. O.; SILVA, S. M. P. C.; OLIVEIRA, G. A.; CLARTON, L. Perfil sensorial de amostras de méis de espécies de abelhas sem ferrão do Estado da Bahia. **Revista Magistra**, v. 18, p.265-269, 2005.

CASTRO, S. A. & CAVALCANTE, A. **Flores da caatinga** Campina Grande: Bilingue. 2011. 116p.

CODEX ALIMENTARIUS. Commission Standards. Official methods of analysis. CODEX STAN. 12–1981, Rev. 1 1987, Rev. 2. 2001.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Detection of galangin-induced cytoplasmic membrane damage in *Staphylococcus aureus* by measuring potassium loss. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, p. 243-248. 2005.

DOBRE, I.; GEORGESCU, L. A.; ALEXE, P. ESCUREDO, O.; SEIJO, M. C. Rheological behavior of different honey types from Romania. **Food Research International**, v. 49, p. 126-132. 2012.

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

ESCUREDO, O.; DOBRE, I.; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M.; SEIJO, M. C. Contribution of botanical origin and sugar composition of honeys on the crystallization phenomenon. **Food Chemistry**, v. 149, p. 84-90. 2014.

EVANGELISTA-RODRIGUES, A., GÓIS, G. C., SILVA, C. M., SOUZA, D. L., SOUZA, D. N., SILVA, P. C. C., ALVES, E. L., RODRIGUES, M. L. Desenvolvimento produtivo de colmeias de abelhas *Melipona scutellaris*. **Biotemas**, v. 21, p. 59-64, 2008.

FERREIRA, I. C. F. R.; AIRES, E.; BARREIRA, J. C. M.; ESTEVINHO, L. M. Antioxidant activity of portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract. **Food Chemistry**, v. 114, p.1438-1443. 2009.

FLORES, M. S.; ESCUREDO, O.; SEIJO, M. C. Assessment of physicochemical and antioxidant characteristics of *Quercus pyrenaica* honeydew honeys. **Food Chemistry**, v. 166, p. 101–106. 2015.



FREITAS, B. M. Potencial da caatinga para a produção de pólen e néctar para a exploração apícola. 1991. 140 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 1991.

GALLARDO-CHACON, J. J; CASELLES, M; IZQUIERDO-PULIDO, M.; RIUS, N. (2008) Inhibitory activity of monofloral and multifloral honeys against bacterial pathogens. **Journal of Apicultural Research**, v. 47, p. 131-136. 2008.

GIORGINI, J. F. e GUSMAN, A. B. A importância das abelhas na polinização. In: CAMARGO, J. M. F. Manual de apicultura. **Agronômica Ceres**, p. 33-57. 1972.

HABIB H. M.; AL MEQBALI, F. T.; KAMAL, H.; SOUKA, U. D.; Ibrahim, W. H. Physicochemical and biochemical properties of honeys from arid regions. **Food Chemistry**, v. 153, 35-43. 2014a.

HABIB, M. H.; MEQBALI, F. T. A. KAMAL, H.; D. USAMA. SOUKA, IBRAHIM, W. S. H. Bioactive components, antioxidant and DNA damage inhibitory activities of honeys from arid regions. **Food Chemistry**, v. 153, p.28-34. 2014b.

HENRIQUES, A.; JACKSON, S.; COOPER, R.; BURTON, N. Free radical production and quenching in honeys with wound healing potential. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, 773-777. 2006.

HUANG, D.; OU, P.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 53, p.1841-56. 2005.

HUSSAIN, M. B.; HANNAN, H.; AKHTAR, N.; FAYYAZ, Q. G.; IMRAN, M.; SALEEM, S.; URESHI, A. I. Evaluation of the antibacterial activity of selected Pakistani honeys against multi-drug resistant *Salmonella typhi*. **Complementary and Alternative Medicine**, v.15, p. 2-9. 2015.

IHC. International Honey Commission. Harmonised Methods of the International Honey Commission. IHC, FAN, Liebefeld, CH-3003 Bern, 2002.

ISLA, I. M.; CRAIG, A.; ORDOÑEZ, R.; ZAMPINI, C.; SAYAGO, J.; BEDASCARRASBURE, E.; ALVAREZ, A.; SALOMÓN, V.; MALDONADO, L. Physico chemical and bioactive properties of honeys from Northwestern Argentina. **Food Science and Technology**, v. 44, p. 1922-1930. 2011.

JÚNIOR, D. A. O.; SILVA, R. A.; ARAÚJO, L. L. S.; JÚNIOR, R. J. S.; ARNAUD, A. F. Caracterização fenológica das plantas apícolas herbáceas e arbustivas da microrregião de catolé do Rocha – PB – Brasil. **Revista Verde**, v. 3, p. 86-99. 2008.

KIRNPAL-KAUR, B. S.; TAN H. T.; BOUKRAA L.; GAN S. H. Different solid phase extraction fractions of Tualang (*Koompassia excelsa*) honey demonstrated diverse antibacterial properties against wound and enteric bacteria. **Journal of Api Product and Api Medical Science**, v.3, p. 59-65. 2011.

KÜÇÜK, M., KOLAYL, S., KARAO\_GLU, S., ULUSOY, E., BALTAC, C., CANDAN, F. Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. **Food Chemistry**, v. 100, p. 526-534. 2007.

KWAKMAN, P. H.; TE VELDE, A. A.; DE BOER, L.; SPEIJER, D.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M.; ZAAT, S. A. How honey kills bacteria. **Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 24, p. 2576-2582. 2010.

KUSKOSKI, M. E.; ASUERO, G. A.; TRONCOSO, M. A.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, p. 726-732. 2005.

LAOS, K.; KIRS, E.; PALL, R.; MARTVERK, K.. The crystallization behaviour of Estonian honeys [Special Issue II]. **Agronomy Research**, v.9, p. 427-432. 2011.

LORENTE, M. G.; CARRETERO, C. L.; MARTÍN, R. A. P. Atributos sensoriais e a capacidade antioxidante de mel espanhol. **Journal of Sensory Studies**, v. 23, p. 293-302. 2008.

MAIA-SILVA, C.; SILVA, C. I.; HRNCIR, M.; QUEIROZ, T. Q.; FONSECA, V. L. I. Guia de plantas visitadas por abelhas na caatinga. Fortaleza, CE: Fundação Brasil Cidadão, 192p. 2012.

MANZANARES, A. B.; GARCÍA, Z. H. B.; GALDÓN, R.; RODRÍGUEZ, E. R.; ROMERO, C. D. Physicochemical characteristics of minor monofloral honeys from Tenerife, Spain. **LWT- Food Science and Technology**, v. 55, p. 572-578. 2014.

MARINHO, I. V.; FREITAS, M. F.; ZANELLA, F. S. V; CALDA, A. L.. Espécies vegetais da caatinga utilizadas pelas abelhas indígenas sem ferrão como fonte de recursos e local de nidificação. In: ENCONTRO DE PARAIBANO EDUCAÇÃO AMBIENTAL, 1. 2006. João Pessoa. **Anais...** EPEA. João Pessoa, PB. 2000.

MARTIN, E. C. The use of bees crop pollination. In: THE HIVE and the honeybee. 4<sup>a</sup> ed. Hamilton, Dadant. p.579-614. 1979.

MARTINS, A. C. L.; RÊGO, M. M. C.; CARREIRA, L. M. M.; ALBUQUERQUE, P. M. C. Espectro polínico de mel de tiúba (*Melipona fasciculata* Smith, 1854, Hymenoptera, Apidae). **Acta Amazônica**, v. 41, p. 183-190. 2011.

MAVRIC, E.; WITTMANN, S.; BARTH, G. HENLE, T. Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of Manuka (*Leptospermum scoparium*) honeys from New Zealand. **Molecular Nutrition and Food Research**. v. 52, p. 483-489. 2008.

McMAHON, M. A. S., TUNNEY, M. M., MOORE, J. E., BLAIR, I. S., GILPIN, D. F. CHANGES IN antibiotic susceptibility in staphylococci habituated to sub-lethal concentrations of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*). **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, p. 263-268, 2008.

MEDA, A.; LAMIEN, C. E.; ROMITO, M.; MILLOGO, J.; NACOUлма, 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.

MEILGAARD, M. C., CIVILLE, G. V., & CARR, B. T. Sensory evaluation techniques. Boca Raton: CRC Press. 1999.

MOSKOWITZ, H. R. Product testing and sensory evaluation of foods - marketing and R & D approaches. Westport: **Food & Nutrition Press**, Wageningen. 1993.

NEWELL, G. J.; MACFARLANE, J. D. Expanded tables for multiple comparison procedures in the analysis of ranked data. **Journal of Food Science**, v. 52, p. 1721-1725. 1987.

ODDO, P. L. & PIRO, R. Main European unifloral honeys: descriptive sheets, **Apidologie**, v. 35, p.38-81. 2004.

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

PENNA, E. W.. Evaluacion sensorial: una metodologia actual para tecnología de alimentos. Santiago: Universidade do Chile. 1980.

PILJAC-ŽEGARAC<sup>1</sup>, J.; T. STIPČEVIĆ, T.; BELŠČAK, A. Antioxidant properties and phenolic content of different floral origin honeys. **Journal of ApiProduct and Api Medical Science**, v. 1. p. 43-50. 2009.

PEREIRA, F. M. Abelhas sem ferrão, a importância da preservação. 2007. EMBRAPA disponível em: <http://www.cpamn.embrapa.br/apicultura/abelhasSemFerrao>. Acesso em: 26 de janeiro de 2012.

RAMALHO, M.; SILVA, M. D.; CARVALHO, C. A. L. Harvesting Dynamics of Pollen Sources by *Melipona scutellaris* Latreille (Hymenoptera: Apidae): a Comparative Analysis with *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) in the Atlantic Forest Domain. **Neotropical Entomology**, v. 36, p. 38-45.

RICHTER, V. B.; AVANCINI, T. C.; PRUDENCIO, S. H.; BENASSI, M. T. Proposing a ranking descriptive sensory method. **Food Quality and Preference**, Barking. v. 21. p. 611-620. 2010.

SANT'ANA, L. D. O. SOUSA, J. P. L. M., SALGUEIRO, F. B. F. B., LORENZON, M. C. A., CASTRO, R. N. Characterization of monofloral honeys with multivariate analysis of their chemical profile and antioxidant activity. **Journal of Food Science**, v. 71, p.135-140. 2010.

SHI, H.; NIKI, E. Stoichiometric and kinetic studies on *Ginkgo biloba* extract and related antioxidants. **Lipids**, v. 33, p. 365-370, 1998.

SHOHAM, S. YODIM, M. B. Iron involvement in neural damage and microgliosis in models of neurodegenerative diseases. **Cellular and Molecular Biology**, v. 46, p. 743-760. 2000.

SILICI, S.; SAGDIC, O.; ERIK, L. Total phenolic content, antiradical, antioxidant and antimicrobial activities of Rhododendron honeys. **Food Chemistry**, v. 121, p. 238-243. 2010.

SILVA, T. M. G., SILVA, P. R., CAMARA, C. A., SILVA, G. S., SANTOS, F. A. R. SILVA, T. M. S. Chemical Analysis and Antioxidant Potential of Angico Honey Collected by Stingless Bee Jandaíra. **Journal of Chemistry**, v. 5, p. 1370-1379. 2014.

SILVA, T. M. S.; SANTOS, F. P.; EVANGELISTA-RODRIGUES, A.; SILVA, E. M. S., SILVA, G. S.; NOVAIS, J. S.; SANTOS, F. D. A. R.; CAMARA, C. A. Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaíra (*Melipona subnitida*) honey. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 29, p. 10-18. 2013.

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, J. M. C.; TABARELLI, M.; FONSECA, M. T.; LINS, L. V. (org). Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação. Brasília (DF): MMA/UFPE/Conservation International - Biodiversitas - Embrapa Semiárido, p. 382. 2004.

SILVA, L. A. C.; SILVA, D. P.; PINTO, M. S. C.; SILVA, K. B.; TARGINO, L. C. Levantamento da flora apícola em municípios da microrregião de Catolé do Rocha-PB. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**. v. 9, p. 223-235. 2014.

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

SILVANO, M. F.; VARELA, M. S.; PALACIO, M. A.; RUFFINENGO, S.; YAMUL, D. K.. Physicochemical parameters and sensory properties of honeys from Buenos Aires region. **Food Chemistry**, v. 152, p. 500-507. 2014.

SILVEIRA, F. A.; G. A. R. MELO & E. A. B. ALMEIDA. **Abelhas brasileiras: sistemática e identificação**. Belo Horizonte, IDMAR, p. 253, 2002.

SOUSA, J. M. B.; AQUINO, I. S.; MAGNANI, M.; ALBUQUERQUE, J. R.; SANTOS, G. G; SOUZA, L. S. Physicochemical aspects and sensory profile of stingless bee honeys from Seridó region, State of Rio Grande do Norte, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, p.1763-1772. 2013.

SOUZA, B. A.; MARCHINE, L. C.; ODA-SOUZA, M.; CARVALHO, C. A. L.; ALVES, R. M. O. A. Characterization of honey produced by species of *Melipona* Illiger, 1806 (apidae: *Meliponini*) from the northeast area of Brazil: 1. Physico-chemical characteristics. **Química Nova**, v. 32, p. 303-308. 2009.

SOUZA, B. A; CARVALHO, C. A. L.; SODRÉ, G. S.; L. C.. MARCHINI. Características físico-químicas de amostras de mel de *Melipona asilvai* (Hymenoptera: Apidae). **Ciência Rural**, v. 34, p. 1623-1624, 2004.

SRISAYAM, M.; CHANTAWANNAKUL, P. Antimicrobial and antioxidant properties of honeys produced by Apismelliferain Thailand. **Journal of Apiprodukt and Apimedical Science**, v. 2, p.77-83. 2010.

SZABO, M. R.; IDITOIV, C.; CHAMBRE, D.; LUPEA, A. X. Improved DPPH determination for antioxidant activity spectrophotometric assay. **Chemical**, v. 62, p. 214-216. 2007.

TEMARU, E.; SHIMURA, S.; AMANO, K.; KARASAWA, T. Antibacterial activity of honey from stingless honeybees (Hymenoptera; Apidae; Meliponinae). **Polish Journal of Microbiology**, v. 56, p. 281-285. 2007.

TRUCHADO, P.; FERRERES, F.; TOMA´ S-BARBERA´ N, F. A. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry reveals the widespread occurrence of flavonoid glycosides in honey, and their potential as floral origin markers. **Journal Chromatography**, v. 1216, p. 7241-7248. 2009.

UTHURRY, A. C.; HEVIA, D.; GOMEZ-CORDOVES, C. Role of honey polyphenols in health. **Journal of ApiProduct and ApiMedical Science**, v. 3, p. 141-159. 2011.

VIT, P.. Review: valorization honey of stingless bees (*Meliponini*). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science**, v. 50, p. 20-28. 2008.

VIT, P.; GUTIÉRREZ, G. M.; RODRÍGUEZ-MALAVAR, A. J.; AGUILERA, G., FERNÁNDEZ-DÍAZ, C.; TRICIO. E. A. Comparison of honeys produced by the bee yateí (*Tetragonisca fiebrigi*) in Argentina and Paraguay. **Acta Clinica Biochemistry Latinoamericana**, v. 43, 219-26. 2009.

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

WHITE, J. W. S.; UBERS, M. H. Studies on honey inhibine. 2. A chemical assay. **Journal of Apicultural Research**, v.2, p. 93-100, 1963.

WIEGAND, I.; HILPERT, K.; HANCOCK, R. E. W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. **Nature Protocols**, v. 3, n. 2, p. 163-175, 2008.

ZANELLA, F. C. V. The bees of the Caatinga (Hymenoptera, Apoidea, Apiformes): A species list and comparative notes regarding their distribution. **Apidologie**, Versailles. v. 31, p. 579-592. 2000.



## **5. RESULTADO e DISCUSSÃO**

**Artigo I: Formatado de acordo com as normas da revista LWT - Food Science and Technology \_ (ISSN: 0023-6438)**

**Sugar profile, physicochemical and sensory aspects of monofloral honeys produced by different stingless bee species in Brazilian semi-arid region**

**Running Title: Characterization of brazilian monofloral honeys from meliponini**

Janaína Maria Sousa <sup>a</sup>, Evandro Souza <sup>b</sup>, Gilmardes Marques <sup>a</sup>, Marta Benassi <sup>c</sup>, Beatriz Gullón <sup>d</sup>, Maria Manuela Pintado <sup>d</sup>, Marciane Magnani <sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> *Laboratory of Microbial Process in Foods, Department of Food Engineering, Center of Technology, Federal University of Paraíba, Campus I, 58051-900, João Pessoa, Paraíba, Brazil*

<sup>b</sup> *Laboratory of Food Microbiology, Department of Nutrition, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, Campus I, 58051-900, João Pessoa, Paraíba, Brazil*

<sup>c</sup> *Department of Food Science and Technology, Center of Agrarian Sciences, State University of Londrina, Campus I, 86057-970, Londrina, Paraná, Brazil*

<sup>d</sup> *Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica do Porto, Porto, Portugal*

\* Corresponding author: Laboratory of Microbial Processes in Foods, Department of Food Engineering, Technology Center, Federal University of Paraíba, Campus I, 58051-900, João Pessoa, Brazil. e-mail: [magnani2@gmail.com.br](mailto:magnani2@gmail.com.br); Phone number: + 55 83 3216 7576; Fax number: + 55 83 3216 7354

## Abstract

Monofloral honeys produced by the stingless bee *M. Subnida* Duke and *M. scutellaris* Latrelle in a Brazilian semi-arid region were analyzed regarding their physicochemical (moisture, protein, proline, hydroxymethyl-furfural, color, electrical conductivity, pH, free acidity, and sugar profile) and sensory aspects (color, viscosity and flavor). The floral source influenced the color, acidity, sugar profile, ash and proline content in the honeys. The intensity of the acidic flavor, sweet taste and color in the honeys varied according to the floral source. No differences were perceived for honeys from the same floral source produced by different bee species. Principal component analysis revealed that most of the variability was defined by the water content, total acidity, glucose, sucrose and color, as well as by acid taste, acid flavor, honey flavor and sweet taste. These findings reveal that Brazilian monofloral honeys produced by stingless bees possess well-defined characteristics that are influenced by the floral source.

**Key-words:** bee, honey, characterization, quality control.

## 1. Introduction

Honey is a natural food consumed without any processing and is characterized by its complex composition, which varies according to the bee species, geographical region, available floral source and storage conditions (Karabagias, Badeka, Kontakos, Karabournioti & Kontominas, 2014; Habib, Meqbali, Kamal, Souka & Ibrahim, 2014). The major components of honey are sugars mostly fructose and glucose although other minor components, such as enzymes, proteins, organic acids, minerals, pollen grains, waxes and phytochemicals, are also present (Manzanares, García, Galdón, Rodríguez & Romero, 2014). Some of these constituents are naturally found in nectar (or pollen),

while others are inserted by bees during the honey maturation process, thereby defining the differences in composition and functional properties of the honeys (Sant'Ana, Sousa, Salgueiro, Lorenzon & Castro, 2012).

The phytochemicals are considered to be the most important components influencing the flavor and possible benefits of honeys to human health. Thus, characterization of honeys produced in defined geographical regions, or by specific bee species, is necessary to obtain a regional standard of quality, authenticity and added-value (Belay, Solomon, Bultossa, Adgaba & Melaku, 2015; Silvano, Varela & Palacio, 2014). Traditionally, the combined studies of melissopalynological, physicochemical and sensory parameters are used to determine the botanical origin and quality of monofloral honeys (Truchado, et al., 2010). However, studies of physicochemical parameters, sugar profile and mineral content have been suggested as criteria for the characterization of monofloral honeys (Manzanares et al., 2014). The quantitative descriptive analysis (QDA) is usually applied as a tool to access specific sensory characteristics in honey (Castro-Vázquez, Díaz-Maroto, González-Viñas & Pérez-Coello 2009). However, the descriptive method Ranking Descriptive Analysis (RDA) has been cited as useful to study sensory properties of foods because it is less time consuming (in comparison to QDA) and allows, in addition to the descriptions of the attributes, the ranking among the samples for each assessed sensory attribute (Richter, Avancini, Prudencio & Benassi (2010). Researchers have stated that application of multivariate statistical methods is a highly effective tool for characterizing honeys of different geographical, botanical and entomological origins (Ferreira, Aires, Barreira, & Estevinho, 2009; Silvano et al., 2014; Habib et al., 2014).

The semiarid northeastern region of Brazil has a unique biodiversity of stingless bees and native flora, enabling the production of honey with particular characteristics.

In this region, a biome (caatinga) composed by botanical species exists that is adapted to the typical climatic conditions of one rainy and one dry regular season during the year. Some of the botanical species are commonly visited by native bee species, known as indigenous bees, stingless bees, or meliponini bees (Silva et al., 2014; Silva et al., 2013). Among the miliponini species already identified in the north and northeastern regions of Brazil, special attention has been given to *Melipona subnitida* Ducke (jandaíra) and *Melipona scutellaris* Latrelle (uruçu); these bee species typically visit botanical species available only in a specific period of the year (rainy or dry season), thus producing different types of honeys during the year.

Considering these aspects, studies on the characterization of monofloral honeys produced by native stingless bees in the Brazilian northeastern region could be important incentives for the maintenance of the stingless bee population and to help conserve the flora and indigenous bees in this region. In this study, honeys produced by jandaíra and urucu bees from specific botanical sources, which are typically found in the northeastern region of Brazil during the rainy and dry seasons, were characterized in terms of their sugar content, physicochemical parameters and sensory attributes.

## **2. Material and methods**

### *2.1 Honey samples*

A total of 24 samples of monofloral honeys produced by stingless bees *M. subnitida* Ducke (jandaíra) and *M. scutellaris* Latrelle (uruçu) in the semiarid region of Brazilian northeastern (Seriód region, state of Rio Grande do Norte and Agreste region of Paraíba state) were obtained during the 2012 dry season from *Ziziphus joazeiro* Mart. (juazeiro) and *Mimosa quadrivalvis* L. (malícia) (n = 12) and during the 2013 rainy season from *Mimosa arenosa* Willd Poir (jurema branca) and *Croton heliotropiifolius*

Kunth (velame branco) (n=12). Honeys were always collected in triplicate from four meliponary in four distinct points. Samples were stored in sterilized amber glass containers, shipped to the laboratory, and then maintained at 6-8 °C in the dark until analysis (Silva et al., 2013). To ensure that the honeys were monofloral, the melissopalynological procedure was applied to all samples (Silva et al., 2013). For this procedure, 10 g of each honey sample was diluted in 20 mL of distilled water and then centrifuged at 4000 rpm for 20 min. The sediment was dried at 40 °C and then mounted with Entellan Rapid (Merck, 1.07961.0500). The honeydew elements and pollen grains (n = 500) were counted and identified in 20 distinct optical areas using an optical microscope (Nikon Optiphot II microscópio; 400× and 1000×). The pollen grains were compared to reference images of University of São Paulo, São Paulo, Brazil. All samples contained more than 80% pollen grains of the same botanical origin.

## *2.2 Physicochemical analysis*

All of the physicochemical parameters were determined in triplicate according to the Harmonized Methods of the International Honey Commission - IHC (2002) and the Association of Official Analytical Chemists - AOAC (1990). The water content was determined via refractometry using an Abbé-type refractometer at 20 °C (Q767-B, Tokyo, Japan); the corresponding values were obtained according to the table of Chatway. The brix values in honeys were determined via refractometry following the AOAC Official method 31.119. The total acidity was analyzed using the sum of free acidity and lactic acidity determined by titration of 10 g of honey dissolved in 75 mL of distilled water with 0.05 mol/L NaOH to pH 8.30, with the results expressed as mEq/kg. The pH was measured in a solution of 10 g of honey in 75 mL ultrapure water using a digital potentiometer (QUIMIS, Q488AS). The protein content was measured

using the Kjeldahl method, based on the conversion of the organic nitrogen present in the sample to  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , using 6.25 as the conversion factor. The proline content was determined via the measurement of the absorbance at 510 nm of the resulting product between proline and ninhydrin in an acidic medium. The electrical conductivity was measured at 20 °C in a 20 g/100 g (w/v) solution of honey in ultrapure water using a radiometer (Analyser, model 600), with the results expressed as mS/cm. The ash content was measured after burning the sample at 550 °C. The color was determined using the Pfund method; the absorbance of the honeys [diluted to 50 g/ 100 g (w/v) in ultrapure water] was determined at 636 nm and then converted to the Pfund scale ( $\text{mmPfund} = -38.7 + 371.39 \times \text{Abs}$ ). Hydroxymethyl furfural (HMF) was measured using the method of White (Silvano et al. 2014). Because the results indicated that HMF was absent in the assessed honey samples, the samples were further submitted to Ultra Performance Liquid Chromatographic (UPLC) analysis to quantify HMF according to a previously described procedure (Habib et al. 2014).

### *2.3 Sugar profile*

Approximately 0.5 g of honey was weighed directly in polypropylene tubes and then mixed with 10 mL of water. Next, a milliliter of this dissolution was passed through a 0.20- $\mu\text{m}$  cellulose acetate membrane prior to HPLC analysis. The determination of the sugars (sucrose, glucose, arabinose and fructose) was performed using a 1100 series Hewlett-Packard chromatograph equipped with a refractive index detector operated at 50 °C and a 300  $\times$  7.8 mm CARBOsep CHO 682 column (Transgenomic, Glasgow, U.K.) operating at 80 °C. Distilled water was used as the mobile phase (flow rate 0.4 mL/min). The HPLC sample peaks were identified by comparing the retention times obtained from standards. The honey samples were also

spiked with standards (Sigma ®) (fructose, glucose, sucrose, arabinose and maltose) to verify the identity of the chromatographic peaks. Duplicate injections were performed, and the average peak areas were used for the quantification.

#### *2.4 Sensory analysis*

This work was submitted to the National Committee in Research Ethics (Brazil) and approved under number CAAE: 06371012.8.0000.5188. Sensory analyses were performed using Ranking Descriptive Analysis (RDA) according to the procedures described by Richter et al. (2010). The panel was composed of 19 assessors, all members (students, technicians and teachers) of the Federal University of Paraíba (João Pessoa, Brazil), with ages ranging from 16 to 62 years and with previous experience in sensory analysis. The sessions were performed in a tasting room, separated from the area where the samples were prepared and maintained at room temperature (25 °C) during the evaluation. The coded samples were presented in random order to each assessor in 40-mL glass vials sealed with a twist-off cap and at room temperature. The order of presentation was balanced and randomized to eliminate contrast effect and positional bias. Mineral water was provided for the assessors to perform mouth-rinsing between samples. The sessions were performed between 10:00 and 12:00, and the panelists declared that they were not hungry at the commencement of the tests. During the initial sessions, the assessors underwent training in descriptive analysis, during which they generated descriptors over the course of seven sessions. Due to the high number of honey samples, the panel opted to evaluate four samples per session (honeys of juazeiro and malícia produced by jandaíra and urucu bee) and (honeys of jurema branca and velame branco produced by jandaíra and urucu bee). The common descriptors chosen by the panel were compiled, together with significant descriptors



selected for the formulation of a glossary (amber color, viscosity, honey flavor, acid flavor sweet taste, bitter taste, and acid taste). The honey samples were evaluated by RDA in two distinct sessions, where each sample was individually evaluated using the glossary and then ordered according to increasing intensity for each of the attributes.

## *2.5 Data analysis*

Statistical analyses were performed using Statistica Software 5.1. The mean values obtained for the variables studied in the honey samples were compared by Two-Way ANOVA and the Tukey Test. The sensory data were analyzed by the Friedman test (Newell e MacFarlane, 1987), considering four samples, 19 judges and the critical value: 21. Principal Component Analysis (PCA) was performed due to its efficiency of providing accurate graphical representations, which best integrate all the significant data. PCA also represents objects or variables on a graph to study the proximity of the objects. A  $p\text{-value} \leq 0.05$  was considered to be significant.

## **3. Results and Discussion**

### **3.1 Water content (g/100 g)**

The water content of the honey samples ranged from 23.93 to 28.96 g/100 g, and no differences were observed ( $p \geq 0.05$ ) among honeys from the same floral source produced by different bee species (Table 1), with the exception of honey from jurema branca. In honey, water content has been linked to the floral source, although climatic conditions, soil, collection period and processing aspects may strongly affect this parameter (Silvano et al., 2014; Perna, Simonetti, Intaglietta & Gambacorta, 2013). The water content values found in the assessed honeys are similar to those reported in previous studies (22 to 35 g/100 g) involving characterization of honeys produced by

jandaíra and urucu bees in different states of northeastern Brazil (Sousa et al., 2013; Silva et al., 2013; Souza et al., 2006), which indicate that the analyzed samples presented satisfactory quality. Water content values greater than 30 g/100 g in honey favors product fermentation by osmotolerant yeasts, resulting in changes in the sensory characteristics, mostly in texture/viscosity (Chirife, Zamora & Lema, 2006). Water content is one of the most important parameters for evaluating the quality of honeys because it influences the other physical and chemical characteristics and, thus, the shelf life of the product (Guerrini et al., 2009).

### 3.2 °Brix

The °Brix values for the honey samples ranged from 70.08 to 74.37. No differences ( $p \geq 0.05$ ) were observed regarding the floral source among the assessed honey samples (Table 1). However, honeys from malícia differed ( $p \leq 0.05$ ) according to the bee species. The °Brix values are directly related to the levels of sugars present in honey, making them an important indicator of possible adulteration (Guerrini et al., 2009). Generally, honeys produced by stingless bees exhibit lower °Brix values when compared to honeys produced by *A. mellifera* ( $\geq 75$ ), as honeys from stingless bees possess higher water content and a lower percentage of total sugars (Habib et al., 2014; Guerrini et al., 2009). Previous studies found °Brix values similar to those detected in this study for honeys produced by the urucu bee in the state of Paraíba - Brazil (average of 72 °Brix) (Campos, Gois & Carneiro, 2010), and for honeys produced by stingless bees in South American countries (57.5 to 75.0 °Brix) (Souza et al., 2006).

### 3.3 pH and acidity

The pH values found in honeys ranged from 3.1 to 5.33, differing ( $p \leq 0.05$ ) among the honeys from different floral sources and/or bee species. The intrinsic pH value in honey may be influenced by the storage conditions and the occurrence of microbial growth, which is capable of causing changes in honey texture and stability (Feás, Pires, Iglesias & Estevinho, 2010). Previous studies describe pH values less than and greater than (2.9 to 6.5) those found in this study for multifloral honeys produced by stingless bees (Almeida-Muradian, Hitomi Matsuda, Markowicz & Bastos, 2007; Sousa et al., 2013). In general, honeys from a floral source or honeydew honeys exhibit acidic pH values, without a direct relationship with the botanical source. However, the pH values in honeys have been linked with other parameters that are influenced by geographical and botanical origin, such as mineral content (Vanhanen, Emmertz & Savage, 2011).

The acidity values ranged from 17.88 to 86.85 mEq/kg<sup>-1</sup> in the samples evaluated. Differences were observed ( $p \leq 0.05$ ) among the honeys from different floral sources and/or bee species (Table 1). Previous studies that characterized wild honey produced by stingless bees in north and northeastern Brazil reported lower and higher acidity values (18.5 to 95.2 mEq/kg<sup>-1</sup>) when compared to those observed in the present study (Alves, Carvalho, Souza, Sodr  & Marchini, 2005; Sousa et al., 2013). The acidity value corresponds to the balance of organic acids present in honey, in particular, gluconic, citric and acetic acid (Vit, 2008), which vary according to the floral composition and the bee species (Oddo et al., 2008). This variation may explain the differences in the acidity values observed for honeys from distinct floral sources.

### 3.4 Protein and proline

The mean protein values in honeys ranged from 0.28 to 0.57 g/100 g (Table 1), and no difference ( $p > 0.05$ ) in this parameter was observed among the honeys from the same floral source, despite being produced by bees from different species. These results reinforce the findings of Habib et al., (2014), who revealed that the protein content in honeys is dependent on the floral source and that different values may be associated with the presence of proteins derived from nectar of flowers and enzymes introduced by bees in honeys.

The proline levels in honey ranged from 20.53 to 4.69 mg/kg (Table 2). The honeys from juazeiro produced by both bee species also exhibited higher proline contents ( $p \leq 0.05$ ) when compared to the other honeys analyzed; however, honeys from the same floral source exhibited similar proline contents ( $p \geq 0.05$ ). Proline is the main free amino acid present in honeys produced by stingless bees, making it useful for the characterization of the botanical source because is related to the floral source and the amount of pollen present in the honeys (Truzzi, Annibaldi, Illuminati, Finale & Scarponi, 2014).

### 3.5 Sugar quantitative profile

The type of sugar present in the greatest amounts in the honeys was fructose, followed by sucrose and glucose (Table 1). With the exception of honeys from juazeiro, the honeys of the same floral source produced by different bee species differed ( $p \geq 0.05$ ) in the amounts of each detected sugar; this difference was also found for different floral sources. In the floral honeys, the glucose content corresponds to the characteristics of the nectar of the predominant flowers and varies among the plant species (Escuredo, Dobre, Fernández-González & Seijo, 2014). The glucose and fructose levels of the honeys studied were higher than those reported in previous

studies, with multifloral honeys produced by stingless bees in Ecuador (25.5 g/100 g of total sugars for glucose and 25.2 g/100 g of total sugars for fructose) (Guerrini et al., 2009) and in southern Brazil (8.2 to 35.39 g/100 g of total sugars for glucose and 31.88 to 45.46 g / 100 g of total sugars for fructose) (Rizélio, et al., 2012; Biluca et al., 2014).

The fructose/glucose (F/G) ratio in the honeys evaluated ranged from 1.1 to 1.56 (Table 2), which is similar to the ratio found by Oddo et al., (2008) (1.42) in honey samples produced by stingless bees in Australia. The F/G ratio directly influences the sweet taste of honey because fructose is sweeter than glucose. Furthermore, the predominance of fructose also delays the crystallization process of honeys because such sugar has higher solubility than glucose (Rizélio et al., 2012), which provides higher stability to the product during storage (Dobre, Georgescu, Alexe, Escuredo & Seijo, 2012). The sucrose contents found are lower than those described in previous studies for multifloral honeys produced by the jandaíra bee (3.7 g/100 g of total sugars) and the urucu bee (5.33-8.89 g/100 g of total sugars) (Souza et al., 2013; Campos et al., 2010). These results demonstrate the lack of adulteration and honey collection at the ideal maturation time because high sucrose content may result from the addition of commercial sugar or may be attributed to the early honey collection in the unfinished process of transformation of sucrose into glucose and fructose by invertase (Küçük, et al., 2007).

### 3.8 Electrical conductivity

The electrical conductivity (EC) of the honeys studied ranged from 300 to 670  $\mu\text{Sc}/\text{cm}^{-1}$  (Table 1), classifying them as floral honeys ( $\leq 800 \mu\text{Sc}/\text{cm}^{-1}$ ) (Codex Alimentarius, 2001). Differences were found in the EC ( $p \geq 0.05$ ), regardless of the floral source or bee species. Campos et al., (2010) observed values from 539.6 to 586

$\mu\text{Sc}/\text{cm}^{-1}$  for multifloral honeys produced by uruçu bees in a semiarid region of northeastern Brazil. Results similar to those of the present study were previously reported for monofloral honeys produced by *A. mellifera* in a semiarid region of the United Arab Emirates (254-605  $\mu\text{Sc}/\text{cm}^{-1}$ ) (Habib et al. 2014). The electrical conductivity intensity of honeys has been described as a measure of the amount of mineral elements possessing good electrical conductivity property contained in the honey (Derby et al., 2014). However, higher electrical conductivity values do not necessarily correspond to higher amounts of ash in honeys (Escuredo, Miguez, Fernandez-Gonzalez & Carmen, 2012), as evidenced in the present study. Other factors, such as floral source, the amount of organic acids and proteins, and storage time can also influence the electric conductivity of honey samples (Karabagias et al., 2014).

### 3.4 Ash

Honeys of the same botanical origin did not differ ( $p \geq 0.05$ ) for different producer bee species (Table 1). The highest ash values ( $p \leq 0.05$ ) were observed for honeys from juazeiro. Ash content, representing the total minerals present in honey, is directly related to the environmental, geographical and botanical aspects of the region where it is produced (Finola, Lasagno & Marioli, 2007; Bogdanov, Jurendic & Sieber, 2007). The ash content observed for honeys from malícia, velame branco and jurema branca are similar to the levels reported for honeys from angico (*Anadenanthera* sp.) (0.01 - 0.02 g/100 g) produced by jandaíra bees (Silva et al., 2014) and for wild honeys (0.1 - 0.302 g/100 g) produced by uruçu bees (Campos et al., 2010) in a Brazilian semiarid region, reinforcing the influence of geographic factors on this parameter (Santos, Moreira & Maria, 2015). The amount of minerals can help in the differentiation of floral honey from honeydew honey and can influence the physicochemical and

sensory aspects of the product (Guerrini et al., 2009; Habib et al., 2014). Several comparative studies have shown higher concentrations of minerals in honeydew honeys compared with floral honeys (Vanhanen et al., 2011). However, ash values similar to those of honeydew honeys have been described for monofloral honeys from chestnut (*Castanea* sp.) and urze (*Erica* spp.) (Lachman, et al., 2007; Vanhanen et al., 2011). The high ash content in some honey may be due to the nectar characteristics of some botanical species, such as juazeiro in the present study. Honeys from juazeiro presented ash values up to 10 times higher than those observed for honeys from the other botanical sources evaluated (Table 1).

### 3.7 Color and HMF

The color of honeys on the Pfund scale exhibited values from 35.83 to 103.4 (Table 2). Honeys from juazeiro produced by both bee species exhibited the highest values ( $p < 0.05$ ) on the Pfund scale, being classified as amber. Interestingly, these honeys also exhibited the highest ash and pH values ( $p < 0.05$ ) when compared to all other honey samples. Previous studies have reported that the color intensity of honeys varies according to pH and mineral content, exhibiting a positive correlation with these two parameters (Sodré, Carvalho, Fonseca, Alves & Souza, 2007; Guerrini et al., 2009). However, factors such as exposure to light, heat and storage time, as well as enzymatic reactions, may also affect this parameter.

HMF was not detected in honey samples in the colorimetric or UPLC analyses, characterizing the evaluated monofloral honeys from stingless bees as fresh and high quality honeys (Habib et al., 2014). HMF is widely known as a parameter of freshness in honeys because it is absent in fresh honeys and tends to increase during processing and/or aging of the product. Several factors influence the HMF levels, such as

temperature and time of heating, storage conditions, pH and floral source. Overall, the HMF level provides an indication of overheating of honey samples and/or storage in unsatisfactory conditions (Fallico, Arena, Verzera & Zappala, 2006).

### 3.9 Sensory analysis

The sensory characteristics of aroma and acidic flavor, sweet taste and intense amber color (caramel) described for monofloral honeys are reported in the sensory evaluation of honeys produced by stingless bees (Ferreira et al., 2009; Souza et al., 2013); however, there are no previous studies on the ordering of these attributes according to the perceived intensity. In general, honeys from the same floral source were observed to have similar sensory attributes and did not differ with respect to the bee species that produced them. The physicochemical and sensory characteristics of honeys vary according to botanical origin, maturation time, weather and storage conditions (Ferreira et al., 2009).

Considering the ordering of the intensity of the attributes of amber color, viscosity, honey aroma and sweet taste, the judges determined that the honeys from juazeiro produced by both species of stingless bees were more intense ( $p \leq 0.05$ ) compared with the honeys from malícia (Table 2). Previous studies have reported a direct correlation of these sensory attributes in honeys with physicochemical parameters, such as °Brix, pH, ash content, proteins, color and total sugars (Sodré et al., 2007; Habib et al., 2014). This correlation may explain the difference in intensity of the attributes of honeys from juazeiro and malícia perceived by the judges in the evaluation because the °Brix values, protein, ash, total sugar and instrumental color were higher ( $p \leq 0.05$ ) in the honeys from juazeiro compared to those in the honeys from malícia for both bee species (Table 2). This result is also corroborated by the fact that the judges



determined the honeys from malícia as being more acidic (aroma and acid taste) than those from juazeiro ( $p \leq 0.05$ ); in addition, the judges determined that the honeys from malícia did not differ ( $p \geq 0.05$ ) in aroma and acid taste when considering the bee species (Table 2). The greater intensity of aroma and acid taste described in the sensory evaluation for honeys from malícia compared to those from juazeiro appears to be associated with their higher total acidity, lower pH index, and the lowest total sugar, which could mask the acidity (Table 1). These features are possibly derived from the nectar offered by the malícia flower to the bee species, considering that acidity is a parameter strongly related to the botanical origin (Belay et al., 2015). Several studies have reported high physicochemical and sensory heterogeneity among monofloral honeys as a result of their botanical and entomological origins, which are considered to be markers of these products (Silvano et al., 2014; Ferreira et al., 2009; Vit, 2008).

Similar to the observed intensity ordering of the attributes of honeys from juazeiro and malícia, honeys from jurema branca were perceived as being more intense ( $p \leq 0.05$ ) regarding the attributes of color, viscosity, honey aroma and sweet taste when compared to honey from velame branco (Table 2), but were not considered to be different ( $p > 0.05$ ) when considering the bee species. In the physicochemical analysis, honeys from velame branco exhibited high values for °Brix, pH, ash, protein, instrumental color and total sugars (Table 1), partially explaining the sensory characterization. In contrast, higher intensities for the attributes of acid aroma, acid taste and bitter taste were described for honeys from velame branco (Table 2), when compared to honeys from jurema branca. Although these attributes are directly correlated with the total acidity levels, the ash content, and the pH and type of organic acids present in monofloral honeys (Manzanares et al., 2014), high acidity is typical physicochemical and sensory characteristic of honeys produced by stingless bees (Vit,

2008). In the present study, honeys from malícia and velame branco exhibited higher intensity for the attributes of aroma and acid taste and lower intensity for amber color when compared to honeys from juazeiro and jurema branca. This result is in agreement with the previous findings that honeys produced by stingless bees that exhibit less intense amber color have more intense aroma and acid taste (Ferreira et al., 2009).

Once the individual behavior of each honey was studied, a PCA was used to assess the overall effect of the variables (floral source and bee specie) on the principal components that define the honey samples. The physicochemical parameters of the honey samples that provide a major contribution to PC1 were water content, total acidity, glucose and color; sensory parameters that contribute in this PC were acid taste and acid flavor together with honey flavor and sweet taste, which were in contrast to the aforementioned result (Figure 1A). PC1, which explains 48.15% of the variance, clearly separates acid taste and acid flavor from sweet taste, water content, glucose and total acidity. Most of the variability regarding the physicochemical and sensory properties of honey from different floral sources produced by distinct bee species can be explained with these variables. However, PC2, which explains 17.14% of the variance, was only defined by sucrose level; the remaining variability not taken into account by PC1 was explained by this variable. For PC1, the water content, total acidity and glucose were found to be the most important variables that explain the separation of the honey of malícia produced by both bee species studied from the other tested honeys (Figure 1B).

Previous studies also described the characteristics of acid flavor and acid taste for the honey of malícia produced in a semiarid region of Brazil (Sousa et al., 2013; Campos et al., 2015), which are strongly associated with the nectar of the floral source collected by bees (Belay et al., 2015; Silvano et al., 2014). Physicochemical evaluation of the honey of malícia produced by stingless bees showed high water content;

regarding the low viscosity, it is described as being a fluid honey (Sousa et al. 2013). PC1 also explains the separation of the honeys of juazeiro produced by uruçú bees from the other honeys assessed (Figure 1B), which could be related to the higher values of color, honey flavor and sweet taste when compared with the honeys of the other floral sources studied (Table 2). The honey of juazeiro produced by jandaíra bees also exhibited higher values for these same parameters (color, honey flavor and sweet taste); note that this honey was ranked by the sensory panel as being more intense regarding acid taste and acid flavor, which could influence the distribution of the samples according to the PCA (Table 2; Figure 1B). However, the honey of juazeiro exhibited no differences ( $p \geq 0.05$ ) when produced by different bee species regarding the physicochemical parameter total acidity. Discordance between the physicochemical analysis and the sensory analysis was also described in a previous study that characterized honeys in terms of physicochemical and sensory analyses using Quantitative Descriptive Analysis (QDA) (Silvano et al., 2014).

According to PC2, the similarity observed between the honey of jurema branca and velame branco produced by jandaíra was defined by the levels of sucrose (Figure 1B). These samples exhibited the lowest sucrose amounts when compared to the other assessed honey samples (Table 1). This result suggests that this variable strongly contributes, with the same weight, despite the floral source, for the unique characteristics in these two honeys, which appears in the y axis (Figure 1B); this result is similar to results found for the honeys of jurema branca and velame branco produced by jandaíra in the sensory evaluation by RDA (Table 2). The angle between the vectors that represents the variables can be understood as the correlation between the variables. Those vectors with an angle of  $90^\circ$  indicate that both variables are not correlated, whereas the angles less than or greater than  $90^\circ$  suggest a positive or negative

correlation between the variables, respectively (Silvano et al., 2014). For the honey samples studied, the water content exhibited a positive correlation with glucose ( $r = 0.88$ ) and with total acidity ( $r = 0.5$ ), whereas a negative correlation was observed with viscosity ( $r = -0.54$ ) and color ( $r = -0.50$ ). As expected, honeys with lower water content (juazeiro and velame branco) were ranked as being more intense for the viscosity attribute when compared to the other honeys (malícia and jurema branca), regardless of the bee species involved. A strong positive correlation ( $r = 0.89$ ) was also observed for acid flavor and acid taste, revealing the accuracy of the panel regarding the sensory evaluation performed. In contrast, a negative correlation was observed between total acidity and sweet taste ( $r = -0.63$ ). The highest total acidity values were observed for malícia honey produced by both bee species assessed; this honey exhibited lower values for the intensity of sweet taste in the sensory evaluation by RDA.

#### **4. Conclusions**

Monofloral honeys produced by distinct stingless bee species in a Brazilian northeastern region presented unique characteristics related to the floral source and a good correlation between the physicochemical and sensory parameters. These findings revealed that RDA is a feasible technique for establishing differences between honey samples. In particular, honeys from juazeiro differed from other honeys regarding their intense color and high proline, glucose, and ash contents, while honeys from malícia exhibited the highest acidity. This study reported, for the first time, the variance and similarities of the physicochemical and sensory aspects related to the floral source in monofloral honeys produced by distinct stingless bee species during the rainy and dry seasons in a northeastern region of Brazil.

## Acknowledgments

The authors would like to thank to Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Brazil) for the Science Without Borders scholarship awarded to the first author (Sousa, J.M.B.) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq - Brazil) and the Foundation for Science and Technology (FCT – Portugal) by financial support. Moreover, the authors would like to thank the sensory panel for their cooperation and the beekeepers for providing the honey samples.

## References

- Almeida-Muradian, L. B., Hitomi Matsuda, A. & Markowicz Bastos, D. H. (2007). Physicochemical parameters of amazon *Melipona* honey. *Química Nova*, 30, 707-708.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists) (1990). Official methods of the analysis of official analytical chemists. (15th ed.) Vol. II, USA: Virginia.
- Alves, R. M. O., Carvalho, C. A. L., Souza, B. A., Sodré, G. S. & Marchini, L. C. (2005). Physico-chemical characteristics of honey samples of stingless bee *Melipona mandacaia* Smith (Hymenoptera:Apidae). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25, 644-650.
- Belay, A., Solomon, W. K., Bultossa. G., Adgaba, N. & Melaku, S. (2015). Botanical origin, colour, granulation, and sensory properties of the Hareenna forest honey, Bale, Ethiopia. *Food Chemistry*, 167, 213-219.
- Biluca, F. C., Betta, F. B., Oliveira, G. P., Pereira, L. M., Gonzaga, L. V., Costa, A. C. O. et al. (2014). 5-HMF and carbohydrates content in stingless bee honey by CE before and after thermal treatment. *Food Chemistry*, 159, 244-249.

- Bogdanov, S. Jurendic, T. & Sieber, R.. (2007). Honey for Nutrition and Health: A Review. *Journal of the American College of Nutrition* 27, 6.
- Campos, F. S., Gois, G. C. & Carneiro, G. G. (2010). Physico-chemical parameters of the honey of stingless bee *Melipona scutellaris* produced in the Paraíba. *Zootechny*, 7, 186-190.
- Castro-Vázquez, L., Díaz-Maroto, M. C., González-Viñas, M. A. & Pérez-Coello, M. S. (2009). Differentiation of monofloral citrus, rosemary, eucalyptus, lavender, thyme and heather honeys based on volatile composition and sensory descriptive analysis. *Food Chemistry*, 12, 1022-1030.
- Chirife, J., Zamora, M. C. M. & Otto, A. (2006). The correlation between water activity and % moisture in honey: Fundamental aspects and application to Argentine honeys. *Journal of Food Engineering*, 72, 287-292.
- Dobre, I., Georgescu, L. A, Alexe, P. Escuredo, O. & Seijo, M. C. (2012). Rheological behavior of different honey types from Romania. *Food Research International*, 49, 126-132.
- Escuredo, O., Dobre, I., Fernández-González, M. & Seijo, M. C. (2014). Contribution of botanical origin and sugar composition of honeys on the crystallization phenomenon. *Food Chemistry*, 149, 84–90.
- Escuredo, O., Miguez, M., Fernandez-Gonzalez, M. & Carmen, S. M. (2012). Differentiation of blossom honey and honeydew honey from Northwest Spain. *Agriculture*, 2, 25–37.
- Feás, X., Pires, J., Estevinho, M. L., Iglesias, A. & Pinto de Araújo, J. P. (2010). Palynological and physicochemical data characterisation of honeys produced in the Entre-Douro e Minho region of Portugal. *Journal of Food Science Technology*, 45, 1255-1262.

Ferreira, I. C. F. R., Aires, E., Barreira, J. C. M. & Estevinho, L. M. (2009). Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and Phenolic extract. *Food Chemistry*, 114, 1438-1443.

Finola, M. S., Lasagno, M. C., & Marioli, J. M. (2007). Microbiological and chemical characterization of honeys from central Argentina. *Food Chemistry*, 100, 1649-1653.

Guerrini, A., Bruni R., Maietti S., Poli, F., Rossi, D., Paganetto G., et al. (2009). Ecuadorian stingless bee (Meliponinae) honey: A chemical and functional profile of an ancient health product *Food Chemistry*, 114, 1413-1420.

Habib H. M., Al Meqbali, F. T., Kamal, H., Souka, U. D. & Ibrahim, W. H. (2014). Physicochemical and biochemical properties of honeys from arid regions. *Food Chemistry*, 153, 35-43.

International Honey Commission - IHC. (2002). Swiss Bee Research Centre. FAM, Liebefeld, CH-3003 Bern, Switzerland.

Lachman, J., Kolihova, D., Miholova, D., Košata, J., Titera, D. & Kult, K. (2007). Analysis of minority honey components: Possible use for the evaluation of honey quality. *Food Chemistry*, 101, 973-979.

Küçük, M., Kolayli, S., Karaoglu, S., Ulusoy, E., Baltaci, C. & Candan F. (2007). Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chemistry*, 100, 526-34.

Karabagias, I. K., Badeka, A. V., Kontakos, S., Arabournioti, S. & Kontominas, M. G. (2014). Botanical discrimination of Greek unifloral honeys with physico-chemical and chemometric analyses. *Food Chemistry*, 165, 181-190.

Manzanares, A. B., García, Z. H. B., Galdón, R., Rodríguez, E. R. & Romero, C. D. (2014). Physicochemical characteristics of minor monofloral honeys from Tenerife, Spain. *LWT- Food Science and Technology*, 55, 572-578.

- Newell, G. J. & Macfarlane, J. D. (1987). Expanded tables for multiple comparison procedures in the analysis of ranked data. *Journal of Food Science*, 52, 1721-1725.
- Oddo, P. L., Heard, T. A., Rodríguez-Malaver, A., Pérez, R. A., Fernández-Muiño, M. A., Sancho, M. T. et al. (2008). Composition and antioxidant activity of trigona carbonaria honey from Australia. *Journal of Medicinal Food*, 11, 789-794.
- Perna, A., Simonetti, A., Intaglietta, I. & Gambacorta, E. (2013). Antioxidant Properties, Polyphenol Content and Colorimetric Characteristics of Different Floral Origin Honeys from Different Areas of Southern Italy. *Journal of Life Sciences*, 7, 428-436.
- Richter, V. B., Avancini, T. C., Prudencio, S. H. & Benassi, M. T. (2010). Proposing a ranking descriptive sensory method. *Food Quality and Preference*, 21, 611-620.
- Rizélio, V. M., Tenfen, L., Silveira, R., Gonzaga, L. V., Costa, A. C. O. & Fett, R. (2012). Development of a fast capillary electrophoresis method for determination of carbohydrates in honey samples. *Talanta*, 93, 62-66.
- Sant'Ana, L. D., Sousa, J. P. L. M., Salgueiro, F. B., Lorenzon, M. C. A. & Castro, R. M. (2012). Characterization of monofloral honeys with multivariate analysis of their chemical profile and antioxidant activity. *Journal of Food Science*, 77, 135-140.
- Santos, A., Moreira, R. F. A. & Maria, C. A. B. (2015). Study of the principal constituents of tropical angico (*Anadenanthera* sp.) honey from the atlantic forest. *Food Chemistry*, 171, 421-425.
- Silva, T. M. G., Silva, P. R., Camara, C. A., Silva, G. S., Santos, F. A. R., Silva, T. M. S. (2014). Chemical analysis and antioxidant potential of angico honey collected by stingless bee Jandaíra. *Journal of Chemistry*, 5, 1370-1379.
- Silva, T. M. S., Santos, F. P., Evangelista-Rodrigues, A., Silva, E. M. S., Silva, G. S., Novais, J. S. et al. (2013). Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical



analysis and antioxidant activity of jandaíra (*Melipona subnitida*) honey. *Journal of Food Composition and Analysis*, 29, 10-18.

Silvano, M. F., Varela, M. S., Palacio, M. A., Ruffinengo, S. & Yamul, D. K. (2014). Physicochemical parameters and sensory properties of honeys from Buenos Aires region. *Food Chemistry*, 152, 500-507.

Sodré, G. S., Carvalho, C. A. L., Fonseca, A. A. O., Alves, R. M. O. & Souza, B. A. (2008). Sensorial profile and acceptability of stingless bee honey submitted to conservation processes. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28, 72-77.

Sousa, J. M. B., Aquino, I. S., Magnani, M., Albuquerque, J. R., Santos, G. G. & Souza, L. S. (2013). Physicochemical aspects and sensory profile of stingless bee honeys from Seridó region, State of Rio Grande do Norte, Brazil *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, 34, 1763-1772.

Souza, B., Roubik, D., Barth, O., Heard, T., Enríquez, E., Carvalho, C., et al. (2006). Composition of stingless bee honey: Setting quality standards. *Interciência*, 31, 867-875.

Truzzi, C., Annibaldi, A., Illuminati, S. Finale, C. & Scarponi, G. (2014). Determination of proline in honey: Comparison between official methods, optimization and validation of the analytical methodology. *Food Chemistry*, 150, 477-481.

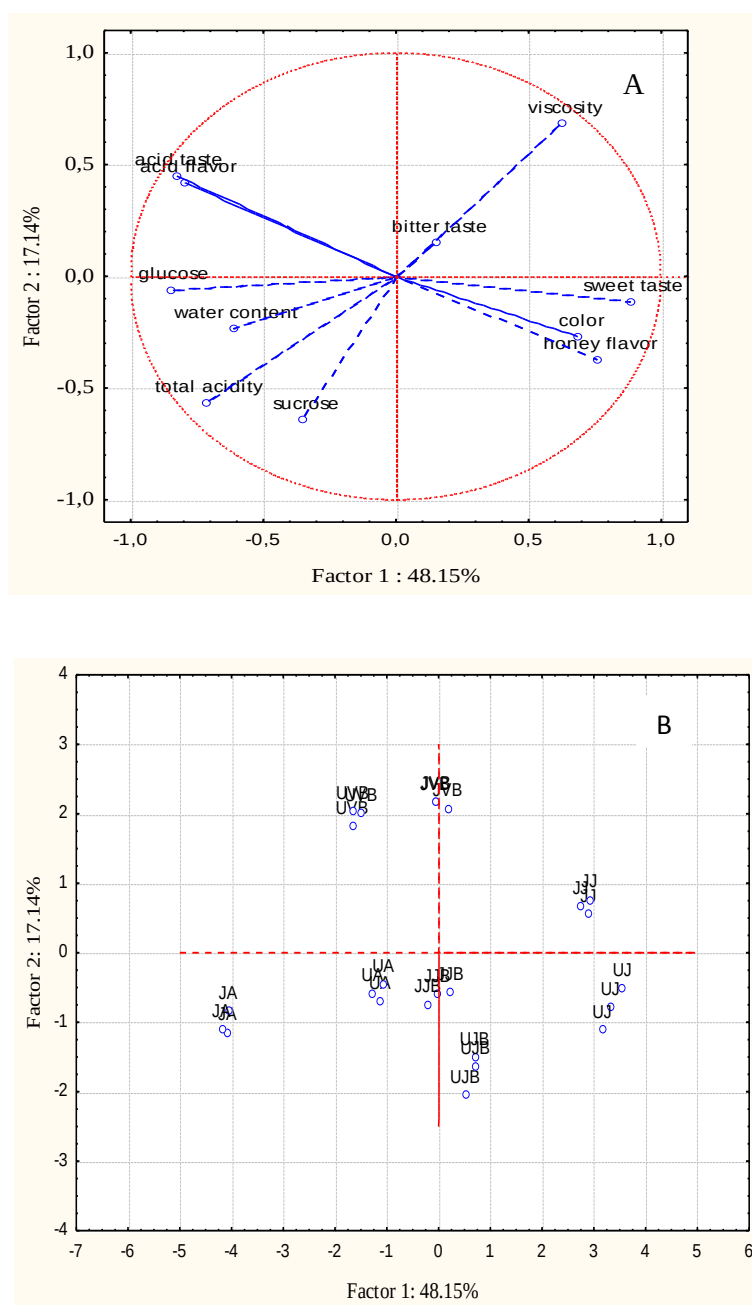
Truchado, P., Tourn, E., Gallez, L. M., Moreno, D. A., Ferreres, F. & Tomás-Barberà, A. (2010). Identification of botanical biomarkers in argentinean diplotaxis honeys: flavonoids and glucosinolates. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 58, 12678–12685.

Vanhanen, L. P., Emmertz, A. & Savage, G. P. (2011). Mineral analysis of mono-floral New Zealand honey. *Food Chemistry*, 128, 236-240.

Vit, P. (2008). Review: valorization honey of stingless bees (Meliponini). *Fac Farm*, 50, 20-28.

## Figure Legend

**Figure 1.** (A) Principal Component Analysis (PCA) of the physicochemical (water content, total acidity, glucose, sucrose,) and sensory (acid flavor, acid taste, viscosity, sweet taste, bitter taste, honey flavor, color) aspects of monofloral honey; (B) distribution of samples according PCA: JJ (juazeiro/ jandaíra); UJ (juazeiro/uruçu); JA (malícia/ jandaíra); UA (malícia/uruçu); JJB (jurema branca/ jandaíra); UJB (jurema branca/uruçu); JVB (velame branco/jandaíra); UVB (velame branco/uruçu).



**Table 1.** Mean values ( $\pm$  standard deviation) of the physicochemical parameters and the sugar profiles of monofloral honeys produced by different Stingless bees (jandaíra and urucu) in the semiarid region of Northeastern Brazil from different floral sources

| Physicochemical parameters       | Stingless bee / monofloral honeys  |                                 |                                |                                |                                         |                                |                                 |                                |
|----------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
|                                  | jandaíra ( <i>M. Subnida</i> Duke) |                                 |                                |                                | uruçu ( <i>M. scutellaris</i> Latrelle) |                                |                                 |                                |
|                                  | juazeiro                           | malícia                         | velame branco                  | jurema branca                  | juazeiro                                | malícia                        | velame branco                   | jurema branca                  |
| Water (g/100 g)                  | 23.93 <sup>Ad</sup> $\pm$ 0,4      | 27.20 <sup>Ab</sup> $\pm$ 0.2   | 25.63 <sup>Ac</sup> $\pm$ 0.4  | 28.96 <sup>Aa</sup> $\pm$ 0.02 | 24.33 <sup>Ab</sup> $\pm$ 0.3           | 26.53 <sup>Aa</sup> $\pm$ 0.8  | 25.80 <sup>Aa</sup> $\pm$ 0.4   | 25.46 <sup>Bab</sup> $\pm$ 0.6 |
| °Brix                            | 74.17 <sup>Aa</sup> $\pm$ 0.2      | 71.0 <sup>Bb</sup> $\pm$ 0,2    | 72.43 <sup>Aab</sup> $\pm$ 1.2 | 72.07 <sup>Aab</sup> $\pm$ 1.0 | 74.27 <sup>Aa</sup> $\pm$ 0.5           | 73.07 <sup>Aa</sup> $\pm$ 0.6  | 72.5 <sup>Aa</sup> $\pm$ 0.5    | 72.88 <sup>Aa</sup> $\pm$ 1.2  |
| pH                               | 5.33 <sup>Aa</sup> $\pm$ 0.4       | 3.10 <sup>Bc</sup> $\pm$ 0.02   | 3.85 <sup>Ab</sup> $\pm$ 0.01  | 3.63 <sup>Ab</sup> $\pm$ 0.02  | 4.2 <sup>Ba</sup> $\pm$ 0.05            | 4.05 <sup>Ab</sup> $\pm$ 0.02  | 3.59 <sup>Bc</sup> $\pm$ 0.04   | 3.61 <sup>Ac</sup> $\pm$ 0.01  |
| TA (mEq/kg)                      | 28.2 <sup>Ac</sup> $\pm$ 0,9       | 86.85 <sup>Aa</sup> $\pm$ 0.4   | 17.88 <sup>Bd</sup> $\pm$ 1.0  | 37.83 <sup>Bb</sup> $\pm$ 0.8  | 30.4 <sup>Ac</sup> $\pm$ 1.2            | 66.13 <sup>Ba</sup> $\pm$ 2.4  | 32.1 <sup>Ac</sup> $\pm$ 0.4    | 42.4 <sup>Ab</sup> $\pm$ 0.7   |
| Protein (%)                      | 0.53 <sup>Aa</sup> $\pm$ 0.01      | 0,430 <sup>Aab</sup> $\pm$ 0.05 | 0.30 <sup>Aa</sup> $\pm$ 0.03  | 0.28 <sup>Aa</sup> $\pm$ 0.02  | 0.57 <sup>Aa</sup> $\pm$ 0.04           | 0.45 <sup>Aab</sup> $\pm$ 0.03 | 0.31 <sup>Ab</sup> $\pm$ 0.01   | 0.31 <sup>Ab</sup> $\pm$ 0.1   |
| Proline (mg/kg)                  | 20.53 <sup>Aa</sup> $\pm$ 3.7      | 11.96 <sup>Ab</sup> $\pm$ 2.1   | 5.98 <sup>Ab</sup> $\pm$ 0.8   | 10.83 <sup>Ab</sup> $\pm$ 1.1  | 17.41 <sup>Aa</sup> $\pm$ 0.9           | 7.56 <sup>Bb</sup> $\pm$ 0.5   | 4.69 <sup>Ac</sup> $\pm$ 1.0    | 8.93 <sup>Ab</sup> $\pm$ 0.7   |
| EC ( $\mu$ Sc/cm <sup>-1</sup> ) | 598 <sup>Bb</sup> $\pm$ 2.6        | 636 <sup>Aa</sup> $\pm$ 1.0     | 300 <sup>Bd</sup> $\pm$ 3.1    | 520 <sup>Bc</sup> $\pm$ 0.2    | 670 <sup>Aa</sup> $\pm$ 5.1             | 514 <sup>Bc</sup> $\pm$ 2.3    | 340 <sup>Ad</sup> $\pm$ 1.5     | 571 <sup>Ab</sup> $\pm$ 3.4    |
| Ash (g/100 g)                    | 0.52 <sup>Aa</sup> $\pm$ 0,07      | 0.04 <sup>Ab</sup> $\pm$ 0.01   | 0.11 <sup>Ab</sup> $\pm$ 0.05  | 0.12 <sup>Ab</sup> $\pm$ 0.02  | 0.41 <sup>Aa</sup> $\pm$ 0.08           | 0.03 <sup>Bb</sup> $\pm$ 0.01  | 0.12 <sup>Ab</sup> $\pm$ 0.02   | 0.11 <sup>Ab</sup> $\pm$ 0.01  |
| Color (nm Pfund)                 | 95.46 <sup>Ba</sup> $\pm$ 0.2      | 55.62 <sup>Bb</sup> $\pm$ 0,02  | 35.83 <sup>Bd</sup> $\pm$ 0.3  | 54.16 <sup>Bc</sup> $\pm$ 0.1  | 103.4 <sup>Aa</sup> $\pm$ 0.6           | 82.86 <sup>Ab</sup> $\pm$ 0.4  | 55.9 <sup>Ac</sup> $\pm$ 0.4    | 57.20 <sup>Ac</sup> $\pm$ 1.1  |
| HMF                              | nd                                 | nd                              | nd                             | nd                             | nd                                      | nd                             | nd                              | nd                             |
| <b>Sugars (g/100 g)</b>          |                                    |                                 |                                |                                |                                         |                                |                                 |                                |
| Glucose (g/100 g)                | 37.74 <sup>Ac</sup> $\pm$ 0.4      | 45.42 <sup>Aa</sup> $\pm$ 0.3   | 42.18 <sup>Bb</sup> $\pm$ 0.6  | 45.73 <sup>Aa</sup> $\pm$ 0.4  | 38.11 <sup>Ac</sup> $\pm$ 0.3           | 42.62 <sup>Ba</sup> $\pm$ 0.2  | 43.36 <sup>Aa</sup> $\pm$ 0.01  | 41.41 <sup>Bb</sup> $\pm$ 0.5  |
| Fructose (g/100 g)               | 59.21 <sup>Aa</sup> $\pm$ 1.1      | 50.00 <sup>Bd</sup> $\pm$ 0.9   | 55.74 <sup>Ab</sup> $\pm$ 1.9  | 52.64 <sup>Ac</sup> $\pm$ 2.5  | 57.66 <sup>Aa</sup> $\pm$ 1.5           | 55.58 <sup>Aab</sup> $\pm$ 1.0 | 53.84 <sup>Bb</sup> $\pm$ 0.9   | 53.62 <sup>Ab</sup> $\pm$ 0.7  |
| Sucrose (g/100 g)                | 1.67 <sup>Ab</sup> $\pm$ 0.2       | 3.93 <sup>Aa</sup> $\pm$ 0.2    | 0.76 <sup>Bc</sup> $\pm$ 0.04  | 1.24 <sup>Bbc</sup> $\pm$ 0.2  | 2.61 <sup>Ba</sup> $\pm$ 0.5            | 1.91 <sup>Ba</sup> $\pm$ 0.3   | 2.06 <sup>Aa</sup> $\pm$ 0.3    | 3.07 <sup>Aa</sup> $\pm$ 0.5   |
| Maltose (g/100 g)                | nd                                 | nd                              | nd                             | nd                             | nd                                      | nd                             | nd                              | nd                             |
| Arabiose (g/100 g)               | nd                                 | 0.54 <sup>A</sup> $\pm$ 0.03    | 1.03 <sup>A</sup> $\pm$ 0.1    | 0.47 <sup>A</sup> $\pm$ 0.1    | 0.39 <sup>b</sup> $\pm$ 0.4             | 0.46 <sup>Ab</sup> $\pm$ 0.4   | 0.78 <sup>Ba</sup> $\pm$ 0.01   | 0.20 <sup>Ac</sup> $\pm$ 0.3   |
| TS (g/100 g)                     | 68.28 <sup>Aab</sup> $\pm$ 0.7     | 63.28 <sup>Ac</sup> $\pm$ 1.0   | 67.9 <sup>Abc</sup> $\pm$ 1.9  | 71.29 <sup>Aa</sup> $\pm$ 1.4  | 67.62 <sup>Aab</sup> $\pm$ 1.6          | 62.79 <sup>Ab</sup> $\pm$ 1.4  | 68.041 <sup>Aab</sup> $\pm$ 2.3 | 71,25 <sup>Aa</sup> $\pm$ 1.5  |
| F/G                              | 1.56 <sup>Aa</sup> $\pm$ 0.02      | 1.10 <sup>Bc</sup> $\pm$ 0.02   | 1.32 <sup>Ac</sup> $\pm$ 0.02  | 1.15 <sup>Bc</sup> $\pm$ 0.02  | 1.51 <sup>Aa</sup> $\pm$ 0.04           | 1.30 <sup>Ab</sup> $\pm$ 0.02  | 1.24 <sup>Bb</sup> $\pm$ 0.02   | 1.29 <sup>Ab</sup> $\pm$ 0.03  |

TA = Total acidity; EC = Electrical conductivity; TS = Total Sugars; nd = not detected.: (*Ziziphus joazeiro*); Malícia: (*Mimosa quadrivalvis*); Velame branco: (*Croton heliotropiifolius*); Jurema branca: (*Mimosa arenosa*). Different capital letters in the same row indicates significant differences ( $p \leq 0.05$ ) between honeys from the same botanical source produced by distinct bee species according to the Tukey test. Different lowercase letters in the same row indicates significant differences ( $p \leq 0.05$ ) between honeys from different floral source produced by the same bee species according to the Tukey test

**Table 2.** Intensity values of the sensory attributes (assessed by RDA) of monofloral honeys produced by different stingless bees (jandaíra and uruçú) in the semiarid region of Northeastern Brazil from different floral sources

| Sensory attributes | Stingless bee / monofloral honeys  |                  |                                         |                  |
|--------------------|------------------------------------|------------------|-----------------------------------------|------------------|
|                    | Jandaíra ( <i>M. subnida</i> Duke) |                  | Uruçú ( <i>M. scutellaris</i> Latrelle) |                  |
|                    | juazeiro                           | malícia          | juazeiro                                | malícia          |
| Amber color        | 62 <sup>a</sup>                    | 22 <sup>b</sup>  | 71 <sup>a</sup>                         | 38 <sup>b</sup>  |
| Viscosity          | 71 <sup>a</sup>                    | 20 <sup>b</sup>  | 61 <sup>a</sup>                         | 38 <sup>b</sup>  |
| Honey flavor       | 68 <sup>a</sup>                    | 29 <sup>b</sup>  | 58 <sup>a</sup>                         | 35 <sup>b</sup>  |
| Acid flavor        | 44 <sup>b</sup>                    | 72 <sup>a</sup>  | 21 <sup>c</sup>                         | 53 <sup>ab</sup> |
| Sweet taste        | 62 <sup>a</sup>                    | 16 <sup>c</sup>  | 69 <sup>a</sup>                         | 43 <sup>b</sup>  |
| Acid taste         | 40 <sup>b</sup>                    | 74 <sup>a</sup>  | 19 <sup>c</sup>                         | 54 <sup>ab</sup> |
| Bitter taste       | 52 <sup>a</sup>                    | 60 <sup>a</sup>  | 56 <sup>a</sup>                         | 20 <sup>b</sup>  |
| Sensory attributes | Jandaíra ( <i>M. subnida</i> Duke) |                  | Uruçú ( <i>M. scutellaris</i> Latrelle) |                  |
|                    | juazeiro                           | malícia          | juazeiro                                | malícia          |
|                    | juazeiro                           | malícia          | juazeiro                                | malícia          |
| Amber color        | 26 <sup>c</sup>                    | 56 <sup>ab</sup> | 37 <sup>cb</sup>                        | 71 <sup>a</sup>  |
| Viscosity          | 55 <sup>a</sup>                    | 44 <sup>ab</sup> | 64 <sup>a</sup>                         | 27 <sup>b</sup>  |
| Honey flavor       | 29 <sup>c</sup>                    | 56 <sup>ab</sup> | 39 <sup>bc</sup>                        | 66 <sup>a</sup>  |
| Acid flavor        | 58 <sup>ab</sup>                   | 28 <sup>c</sup>  | 65 <sup>a</sup>                         | 39 <sup>bc</sup> |
| Sweet taste        | 49 <sup>a</sup>                    | 66 <sup>a</sup>  | 25 <sup>b</sup>                         | 50 <sup>a</sup>  |
| Acid taste         | 52 <sup>ab</sup>                   | 43 <sup>bc</sup> | 71 <sup>a</sup>                         | 21 <sup>c</sup>  |
| Bitter taste       | 59 <sup>a</sup>                    | 36 <sup>b</sup>  | 44 <sup>ab</sup>                        | 51 <sup>ab</sup> |

Rank sum values of the answers of 19 assessors of the ordination of intensity to the attributes in the honey samples. Different letters in the same row indicates significant differences ( $p \leq 0.05$ ) according to Newell and MacFarlane (1987); juazeiro: (*Ziziphus joazeiro*); malicia: (*Mimosa quadrivalvis*); velame branco: (*Croton heliotropiifolius*); jurema branca: (*Mimosa arenosa*)

**Artigo II: Formatado de acordo com as normas da revista Food Chemistry \_  
(ISSN: 0308-8146)**

**Polyphenolics profile, antioxidant and antibacterial activity of honeys from *Ziziphus joazeiro* Mart., *Croton heliotropiifolius* Kunth and *Mimosa* species produced by *Meliponini* in Brazilian semiarid region**

**Running Title: Bioactivity of monofloral meliponini honeys**

Janaína Maria Batista de Sousa<sup>1</sup>, Evandro Leite de Souza<sup>2</sup>, Gilmardes do Nascimento Marques<sup>1</sup>, Bruno Raniere Lins de Albuquerque Meireles<sup>3</sup>, Angela Tribuzy Magalhães Cordeiro<sup>3</sup>, Beatriz Gullón<sup>4</sup>, Maria Manuela Estevez Pintado<sup>4</sup>, Marciane Magnani<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> *Laboratory of Microbial Process in Foods, Department of Food Engineering, Center of Technology, Federal University of Paraíba, Campus I, 58051-900, João Pessoa, Paraíba, Brazil*

<sup>2</sup> *Laboratory of Food Microbiology, Department of Nutrition, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, Campus I, 58051-900, João Pessoa, Paraíba, Brazil*

<sup>3</sup> *Laboratory of Fuel, Federal University of Paraíba, Campus I, 58051-900, João Pessoa, Paraíba, Brazil*

<sup>4</sup> *Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica do Porto, Porto, Portugal*

\* Corresponding author: Laboratory of Microbial Processes in Foods, Department of Food Engineering, Technology Center, Federal University of Paraíba, Campus I, 58051-900, João Pessoa, Brazil. e-mail: magnani2@gmail.com.br; Phone number: + 55 83 3216 7576; Fax number: + 55 83 3216 735

## Abstract

This study assessed the polyphenolic profile, the antioxidant and antibacterial activities of rare monofloral honeys produced by *Melipona subnitida* Ducke (jandaíra) and *M. scutellaris* Latrelle (uruçu) in Brazilian semiarid region. Honeys from *Ziziphus joazeiro* Mart. (juazeiro) and *Croton heliotropiifolius* Kunth (velame branco) showed the highest total phenolics content (TPC) when compared with the other honeys produced by the same bee specie. Juazeiro and velame-branco honeys showed the greatest antioxidant activity and scavenging ability in assays with DPPH and ABTS<sup>•+</sup> radicals, respectively, while honeys from *Mimosa quadrivalvis* L. (malícia) presented the strongest antiperoxyl radical activity in ORAC assay. Juazeiro honeys presented the highest quantities of phenolic acids, particularly of trans-cinnamic, p-coumaric, ellagic, and ferulic acids, and of the flavonoids catechin, rutin, hesperetin and chrysin, when compared with the other honeys produced by the same bee specie. Malícia honeys presented the highest total flavonoids content (TFC) than honeys from velame branco and *Mimosa arenosa* Willd. Poir. (jurema branca), with the greatest quantities of myricetin, quercetin and kaempferol amongst the honeys studied. The different whole meliponini honeys presented different antimicrobial effects against the bacterial strains tested, as measured by their minimum inhibitory concentrations (MICs). However, the lowest MICs were found for honeys that presented the highest TPC. The results showed the impact of the botanical source on the polyphenolic profile, as well as on the antioxidant and antimicrobial properties of meliponini honeys. Juazeiro and malícia honeys deserve further investigation because they presented interesting scavenging ability toward the distinct radicals tested.

**Key-words:** meliponini, honey, radical scavenger, antimicrobial effect



## 1. Introduction

Honeys are members of a class of natural compounds, recently considered of high scientific and therapeutic interest. In the long human tradition, honey has been used not only as a nutrient but also as a medicine. Despite the relevant importance of polyphenolic compounds, recognized as the major constituents responsible for health-promoting properties of honey (Habib, Meqbali, Kamal, Souka & Ibrahim, 2014; Meda Lamien, Romito, Millogo & Nacoulma, 2015), their identification and quantification are of great interest to know the contribution to the overall bioactivity of honey (Manzanares, García, Galdón, Rodríguez & Romero, 2014). In honeys, polyphenolic compounds, comprising phenolic acids and flavonoids, are also considered potential markers of the botanical origin (Alvarez-Suarez et al., 2012).

Antioxidant activity, or simply antioxidant capacity of honeys, is the ability and potential of these products to reduce oxidative reactions within the food systems and human health (Frankel et al., 1998). The antioxidants that naturally occur in honey composition contribute to its antioxidant capacity (Erejuwa, Sulaiman, Wahab, Sirajudeen, Salleh, & Gurtu, 2011; Silva et al., 2013). Furthermore, the phenolic profile of honeys and consequently their antioxidant capacity depend on the floral sources visited by the bee producers (Habib et al., 2014; Meda et al., 2015)

Apart the antioxidant activity, honeys also possess a large broad antimicrobial activity able to inhibit the growth of many foodborne pathogens and bacteria of clinical importance (Vorlova, Karpiskova, Chabiniokova, Kalabova, & Brazdova, 2005). The antimicrobial properties of honeys were firstly attributed to their high sugar concentration and presence of peroxide compounds (mainly hydrogen peroxide) (Weston, Brocklebank & Lu, 2000; White, 1963). However, it has been reported that the polyphenols are also strongly related with the antimicrobial activity of monofloral

honeys (Rodriguez, Mendoza, Iturriga & Castaño-Tostado, 2012). Moreover, studies have found that honey from specific floral source presents stronger antibacterial activity than others (Silici, Sagdic, & Ekici, 2010; Hussain et al., 2015). The predominance of particular botanical specie in honey is primarily influenced by geographical, seasonal and environmental factors (Andrade, Ferreres & Amaral, 1997). The phenolic profile is variable depending mainly on the floral source, but also of the entomological origin (Kirnpal-Kaur, Tan, Boukraa & Gan 2011; Belitz, Grosch & Schieberle 2009). Thus, honeys produced by distinct bee specie, or collected from different locations possess different active compounds, and consequently differences in their biological properties (Kirnpaul-Kaur et al., 2011).

Monofloral honeys are of interest because show phenolic profiles related to the honey-producing plant (Habib et al., 2014; Cavazza, Corradini, Musci, & Salvadeo, 2013). This is particularly relevant in a Brazilian semi-arid region where unique biodiversity of stingless bees (Meliponini) and native flora are found, and consequently, several monofloral honeys are produced only in this region (Silva et al., 2013). Only few studies considering the bioactivity of monofloral honeys produced by Meliponini are available, although it is well-known that these products possess differences, including their phenolic profile, when compared with honeys produced by bee from *Apisgenera* (Silva et al., 2013). Among the miliponini species, *Melipona subnitida* Ducke (jandaíra) and *M. scutellaris* Latrelle (uruçu) are species that typically visit botanical species available only in the rainy or dry season of the semi-arid region of Brazil, thus producing different types of honeys during the year (Sousa et al., 2013). To the best of our knowledge, no studies to identify the antioxidant and antimicrobial activity of these honeys have been previously performed.

Considering these aspects, the aims of the present study were a) to assess the antioxidant activity of the honeys rare monofloral honeys produced by distinct stingless bee species in Brazilian semi-arid region, using distinct methods; b) to determine the total phenolics and flavonoids, as well as the individual phenolic profile of the monofloral honeys studied; and c) to evaluate the antibacterial activity of the whole honeys against pathogenic bacteria strains.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Honey samples

A total of 24 samples of monofloral honeys produced by stingless bee *Melipona subnitida* D. (jandaíra) and *Melipona scutellaris* L. (uruçu) in semiarid region of Brazilian Northeastern, at Seridó region, state of Rio Grande do Norte and at Agreste region, state of Paraíba (Fig. 1) were obtained during 2012 dry season from *Ziziphus joazeiro* Mart. (juazeiro) and *Mimosa quadrivalvis* L. (malícia) (n=12) and 2013 rainy season from *Mimosa arenosa* Willd Poir (jurema branca) and *Croton heliotropiifolius* Kunth (velame branco) (n=12). Honeys were collected always in triplicate from 4 meliponary in four distinct points. Samples were stored in sterilized amber glass containers, shipped to the laboratory and maintained at 6-8 °C in the dark until analysis (Silva et al., 2013). When the analysis was delayed for more than a month from sampling, the honeys were frozen at -18 °C. In order to ensure that the honeys were monofloral the melissopalynological procedure was applied to all honey samples (Barth, 1989). For this, 10 g of each honey sample were diluted in 20 mL of distilled water and centrifuged at 4000 rpm for 20 min. The sediment was dried at 40 °C and mounted with Entellan Rapid (Merck, 1.07961.0500). The honeydew elements and pollen grains (n = 500) were counted and identified in 20 distinct optical areas (Nikon Optiphot II

microscópio; 400 x and 1000x). The pollen grains were compared to reference images of University of São Paulo (São Paulo, Brazil). All samples contained more than 45% pollen grains of the same botanical origin.

## 2.2 Test strains

The strains *Listeria monocytogenes* 3375, *Staphylococcus aureus* 18N, *Escherichia coli* CINF1, *Salmonella* spp. CINF2, *Pseudomonas aeruginosa* CINF3 isolated from food samples were obtained from the Collection of Innovation Center and Business Support of Porto (CINATE, Porto, Portugal). Strains were stored in cryovials with glycerol at 15% (v/v) and maintained at -80 °C before use. Inoculum of the each bacteria strain used in antimicrobial testing were obtained after preparing suspensions in sterile saline solution (0.85% NaCl p/v) from overnight cultures grown in Mueller-Hinton (MH) agar (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) at 37 °C. Each strain was grown in MH broth (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) at 37 °C for 18 – 20 h (late exponential growth phase), harvested through centrifugation (4500 *g*, 15 min, 4 °C), washed twice in sterile saline solution and re-suspended in MH broth to obtain standard cell suspensions at which the OD reading at 660 nm (OD<sub>660</sub>) was 0.1, which provided viable cell counts of approximately 8 log CFU/mL, when pour-plated onto MH agar (McMahon et al., 2008).

## 2.3. Total phenolics content

The concentration of total phenolics was measured using the Folin & Ciocalteu's phenol reagent (Habib et al., 2014). Briefly, each honey (1 g) was diluted in ultrapure water (H<sub>2</sub>O) (10 mL) and filtered through a grade 1 Whatman<sup>®</sup> qualitative filter paper. An aliquot of 0.5 mL (filtrate) was mixed with 2.5 mL of 0.2 N Folin & Ciocalteu's

reagent (Sigma Aldrich, Germany) for 5 min; then 2 mL of 7.5 % sodium carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (Labosi, Paris, France) was added to the solution. After incubation at room temperature for 2 h, the absorbance of the reaction mixture was measured and compared with a methanol blank at 760 nm using a spectrophotometer (UV1240 Shimadzu). Gallic acid (Sigma Aldrich®, Germany) (0 - 100 mg/mL) was used as standard to produce the calibration curve. Total phenolics content was expressed as mg gallic acid equivalents (GAE)/100 g honey.

#### *2.4. Total flavonoids content*

The total flavonoids content was measured using a colorimetric assay (Meda et al., 2005). An aliquot of 5 mL of a honey solution (1:10 g/mL ddH<sub>2</sub>O) was mixed with 5 mL of a methanolic solution (2g/ 100 mL) of aluminium trichloride ( $\text{AlCl}_3$ ) (Labosi, Paris, France). Absorption readings at 415 nm (UV1240 Shimadzu) were measured after 10 min and compared with a blank sample consisting of a 5 mL honey solution with 5 mL methanol without  $\text{AlCl}_3$ . The total flavonoids content was determined using a standard curve with quercetin (Sigma Aldrich, Germany) (0 – 50 mg/L) as the standard. The mean of three readings was used and expressed as mg of quercetin equivalents (QE)/100 g of honey.

#### *2.5. Antioxidant assays*

##### *2.5.1 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) free radical-scavenging assay*

The scavenging activity against 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical (Sigma-Aldrich®, Germany) and the antioxidant activity were determined according to a procedure described elsewhere (Meda et al. (2005). Honey samples were dissolved in

methanol (100 mg/mL), and 0.75 mL of each sample was mixed with 1.5 mL of DPPH (Fluka Chemie, Switzerland) in methanol (0.05 mg/mL), with methanol serving as the blank sample. The mixtures were left for 15 min at room temperature and the absorbance was measured at 517 nm. Quercetin (0 – 25 µg/mL) and ascorbic acid (Labosi, Paris, France) (0 - 50 µg/mL) were used as positive controls. The measurements were performed in triplicate. The index DPPH radical scavenging activity (RSA), expressed as percent of inhibition, was calculated as follow:

$$\text{RSA [ \% ]} = [(\text{absorbance}_{\text{control}} - \text{absorbance}_{\text{sample}}) / \text{absorbance}_{\text{control}} \times 100] \text{ (eq. 1.)}$$

#### 2.4.2 ABTS<sup>•+</sup> free radical-scavenging assay

ABTS<sup>•+</sup> [2,2'- azino-bis (3-thylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] cation radical was obtained with the reaction of 2 mM phosphate-buffered stock solution of 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) (Sigma-Aldrich) with potassium persulphate (POCh). The mixture was left to stand for 24 h at room temperature. Prior to analysis, the ABTS<sup>•+</sup> solution was diluted with 75 µM phosphate buffer solution pH 7.0 (PBS) to produce a solution with an absorbance ( $\lambda$ ) of  $0.20 \pm 0.03$  at  $\lambda = 734$  nm. Fifty microliters of a methanolic solution of honey (1:10) was mixed with 5 mL of the ABTS<sup>•+</sup> cation radical solution and after 6 min, the absorbance was measured at a wavelength of 734 nm using a spectrophotometer (UV1240 Shimadzu). The control test was made with methanol instead of the honey methanolic solution. The measurements were performed in triplicate. The antioxidant activity was determined using standard curves for Trolox (Sigma-Aldrich, Germany; 0.00 for 2000 µmol Trolox / mL;  $Y = -0.0002x + 0.6934$ ;  $R = 0.991$ ) and the results were expressed in µmol TE/100 g (Sant'Ana et al., 2012).

#### 2.4.3 Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay

The ORAC assay was performed using a procedure described elsewhere (Gorjanovic' et al., 2013). All reagents were prepared in PBS, and Trolox (6.25 – 200  $\mu$ M) was used as standard. The solution of honey (1:10) were suitably diluted (10 - 60 v/v) in PBS. Each well of a 96 well-microplate was added of 150  $\mu$ L of fluorescein (0.08  $\mu$ M) and 25  $\mu$ L of honey solution. The plate was incubated for 10 min at 37 °C and then 25  $\mu$ L of 150 mM AAPH [L (+)-ascorbic acid, Epicatechin gallate, 2,2'-azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride] were added to each well to start the reaction. The plate was shaken automatically for 3 s and the fluorescence was measured for every 2 min during 120 min at 37 °C, with emission and excitation wavelengths of 485 and 530 nm, respectively, using a microplate fluorescence reader (Synergy<sup>TM</sup> Multi-Detection Microplate Reader; Bio-Tek<sup>1</sup> Instruments, Inc., USA). The ORAC values were expressed as  $\mu$ mol of Trolox equivalent per gram of honey ( $\mu$ mol TE/100g of honey).

#### 2.5 Extraction of the phenolic compounds from honey

The different honey samples (50 g each) were mixed (1:5) with acidified water (pH 2 with 1M HCl until completely fluid and filtered through cotton to remove solid particles. The filtrate was then passed through a column (25 x 2 cm) of Amberlite XAD-2 resin (pore size = 9 nm, particle size = 0.3-1.2 mm). Sugars and polar compounds were eluted with acidified water (350 mL) (fraction 1); the column was washed with 300 mL of neutral water (fraction 2), and phenolic compounds were further eluted with methanol (600 mL). The methanol extracts were concentrated for 10 mL under vacuum at 40 °C in a rotary evaporator (Alvarez- Suarez et al., 2010)

## 2.6. Chromatographic analysis and identification of phenolic

HPLC analyses were performed using a Shimadzu Prominence LG2OAT HPLC equipped with a photodiode array detector (SPDM2O) and a reversed-phase column (Shimpack CLCDS, 4.6 mm x 250 mm x 5 mm). For the benzoic and cinnamic acid derivatives, the mobile phase consisted of a mixture of 2% aqueous acetic acid in water (A) and acetonitrile: methanol (2:1) (B) at a flow rate of 1 mL/min. A gradient elution was used, starting with 20% B up to 15 min, 30% B at 20 min, 40% B at 30 min and isocratic at 40% B up to 45 min. The flavonoids were separated using a mobile phase consisting of 1% aqueous acetic acid (A) and methanol (B) at a flow rate of 1 mL/min. The mobile phase was delivered using the following solvent gradient: 0–3 min 40% B, 5-15 min 45% B, 17-25 min 50% B, 27-35 min 55% B and 35-40 min 70% B. The injection volume was 10 µL. The identification of phenolic compounds was based on the retention times, the UV-spectra and chromatographic comparison (co-injection) with authentic markers Sigma Aldrich ® (Silva et al., 2013).

## 2.7 Antibacterial assays

The antibacterial activity of the honey samples were measured by determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) using a microdilution assay in accordance to the Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines described in the document M07-A9 (2012). The honey samples were prepared in a concentrations range from 10 - 50 g/100 mL in MHB and sterilized by filtration through a qualitative 0.22 µm filter paper (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belgium).

Approximately 50 µL of each of the tested honey concentration was dispensed into each well of a 96-well microplate containing 100 µL of MH broth. Subsequently, 50 µL of bacterial suspension (approximately 6 log CFU/mL) were added to each well.



The microplate was loosely wrapped with cling wrap to prevent bacterial dehydration and honey volatilization. Each plate included controls without honey. The system was incubated at 37 °C for 24 h. The MIC values were confirmed as the lowest concentrations capable of inhibiting visible bacterial growth.

## 2.8. Statistical analysis

All assays were performed in three independent experiments in triplicate, and the results are expressed as average  $\pm$  standard deviations (SD) of the assays. For the phenolics and flavonoids content, as well as for antioxidant and antimicrobial assays, statistical analysis was performed to determine significant differences ( $p \leq 0.05$ ) using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by post-hoc Tukey's test. The Pearson's linear correlation coefficients ( $r$ ) between selected parameters were also calculated in bivariate linear correlations. For MIC determination assays, the results are expressed as modal values because the MIC values were the same in all repetitions. Sigma Stat 3.5 computer software (Jandel Scientific Software, San Jose, California) was used for the statistical analysis of the data.

## Results and Discussion

### 3.1 Total phenolics (TPC) and flavonoids content (TFC)

The TPC in assessed honey samples varied from  $31.5 \pm 2.1$  to  $126.6 \pm 2.7$  mg GAE/100g with differences ( $p \leq 0.05$ ) among samples from distinct floral sources (Table 1). Considering these results, honeys from juazeiro produced by both bee species studied presented the highest ( $p \leq 0.05$ ) TPC (JJ:  $126.6 \pm 2.7$  and JU:  $61.1 \pm 3.7$  mg GAE/100g), while the lowest ( $p \leq 0.05$ ) TPC values were observed in honeys from

malícia ( $31.5 \pm 2.1$  e  $34.2 \pm 1.5$  mg GAE/100 g). The average TPC for all honeys analyzed was  $56.32 \pm 28.5$  mg GAE/100 g.

Previous study reported highest TPC (120 mg GAE/100g) for honey produced by jandaíra from *Mimosa coesalpiniiifloia* Benth (Silva et al., 2013), a botanical specie typical from semiarid region. Highest TPC (240 and 148.29 mg GAE/100g) was also observed for heterofloral honeys produced by Meliponini in Paraguai and Argentina (Vit, Gutiérrez, Rodríguez-Malaver, Aguilera, Fernández-Díaz, & Tricio, 2009).

The TFC in honeys studied varied from  $4.2 \pm 0.6$  to  $1.9 \pm 0.1$  mg QE/100g with differences ( $p \leq 0.05$ ) between honeys produced by the same bee specie from different botanical sources (Table 1). Honeys from juazeiro and malícia showed the highest ( $p \leq 0.05$ ) TFC (approximately  $4.2 \pm 0.2$  mg QE/100 g), while honeys from velame branco presented the lowest ( $p \leq 0.05$ ) TFC (JVB:  $2.4 \pm 0.1$  e UVB:  $1.9 \pm 0.1$  mg QE/100g). The average TFC for all honeys analyzed was  $2.97 \pm 0.9$  mg QE/100. The TFC of honeys analyzed in our study was higher than those reported by Lianda, Sant'Ana, Echevarria, & Castro (2012) for honeys produced by *Apismellifera* from *Citrus spp.* (0.17 mg QE/100g) and *Robinia* L. (acacia) (1.75 mg QE/100g), and by Can, Yildiz, Sahin, Turumtay, Silici, & Kolayli (2015) for honeys from *Tilia. platyphllos* (lime) (0.95 mg QE/100g).

The influence of floral source on the TPC e TFC of honeys from the same geographic region was already reported (Alvarez-Suarez et al. 2010; Silva et al., 2013). Researchers have stated that environmental and climatic conditions where the plants grown define their metabolism and directly impact the nectar composition (offered to the bee for honey production (Al-Mamary, Al-Meerri and Al-Habori, 2002; Perna, Simonetti & Gambacorta, 2013; Flores et al., 2015). Particularly, regions characterized by a hot, humid climate, with very high exposure to sunlight (as Brazilian

Northeastern), are known to exert a marked influence on the polyphenolic content of plants (Tenore, Ritieni, Campiglia & Novellino 2012). Sun-exposed plants (as juazeiro) can contain much more total phenolics than the same varieties or others as growing in the shade (Tenore et al., 2012).

### 3.2 DPPH-free radical-scavenging assay

DPPH, a stable nitrogen centered radical, has been widely used to test the free radical scavenging ability of various substances or compounds (Habib et al., 2014). The reduction capability of DPPH was determined by the decrease in its absorbance at 517 nm, which is induced by antioxidants. The scavenging activity of DPPH radical (RSA%) varied from  $11.2 \pm 1.3\%$  to  $46.9 \pm 1.9\%$ . The honeys from juazeiro and velame branco produced by jandaíra species showed the greatest ( $p \leq 0.05$ ) RSA%. According to the Pearson's correlation, these results were influenced by the TPC ( $r = 0.8662$ ;  $p \leq 0.01$ ) and by the antioxidant activity of the DPPH radical mg QEAC/100g ( $r = 0.9976$ ) and DPPH mg AEAC/100g ( $r = 0.9525$ ), respectively (Table 2). Previously studies with honeys produced from *Apishoneys* observed positive correlation between TPC and RSA% (Escuredo, Miguez, Fernandez-Gonzalez, & Seijo, 2013; Meda et al., 2005). However, the RSA% of a sample cannot be only predicted on the basis of its TPC and TFC, as observed in the present study (Table 1). In honeys, the antioxidant capacity could be a result of the combined activity of a wide range of compounds found therein, including phenolics, peptides, organic acids, enzymes, minerals, Maillard reaction products and possibly other minor components (Escuredo et al., 2013; Sant'Ana et al., 2012; Gheldof et al., 2002).

### 3.3 ABTS<sup>•+</sup> free radical-scavenging assay

The ABTS method measure the ability of compounds to capture the radical 2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS<sup>•+</sup>), which can be generated in chemical and enzymatic reactions (Kuskoski, Asuero, Troncoso, Filho, & Fett, 2005). There was a significant ( $p \leq 0.05$ ) variation in the scavenger activity of ABTS<sup>•+</sup> free radical among the honey samples tested. Similarly to observed for DPPH assays, honeys from juazeiro and velame branco showed the highest ( $p \leq 0.05$ ) scavenging activities of ABTS<sup>•+</sup> (JJ:  $81.6 \pm 4.5$ ; UJ:  $46.5 \pm 5.9$  and JVB:  $35.3 \pm 1.9$ ; UVB:  $39.6 \pm 1.0 \mu\text{mol/TE/100g}$ ). The lowest ( $p \leq 0.05$ ) scavenging activity for the ABTS<sup>•+</sup> radical (JA:  $24.8 \pm 0.9$  e UA:  $23.2 \pm 2.9 \mu\text{mol/TE/100g}$ ) was observed for malícia honeys ( $p \leq 0.05$ ). Previous study detected stronger and weaker ABTS<sup>•+</sup> scavenge activity for honeys from *Fagopyrum esculentum* (buckwheat) ( $66.35 \mu\text{mol/TE/100g}$ ) and *Acacia tortilis* (acacia) ( $31.61 \mu\text{mol/TE/100g}$ ), respectively (Socha, Juszczak, Pietrzyk, Gałkowska, Fortuna & Witczak, 2011).

The honeys tested presented higher inhibition potential against ABTS<sup>•+</sup> radical (up to four-fold) than against DPPH (Table 1). These results could be related to the specific action monitored in the ABTS<sup>•+</sup> assay, which indicate the antioxidant activity of compounds of both hydrophilic and lipophilic nature (Meda et al., 2005; Kuskoski et al., 2005). In general, the antioxidant properties of different honey samples depend on the structure of their phenolic compounds, as a consequence of the ability of these compounds to donate the hydrogen ion or electrons for the free-radicals (Gašić' et al., 2014). The positive correlations between the TPC and the capability of ABTS<sup>•+</sup> radical inhibition ( $r = 0.9853$ ,  $p \leq 0.01$ ), and between the capability of ABTS<sup>•+</sup> radical inhibition and the TFC ( $r = 0.8228$ ,  $p \leq 0.05$ ), indicate that phenolics and flavonoids are the main responsible for the antioxidant properties of studied honeys. Still, the differences observed among honeys produced from the same bee specie, but using

different predominant floral samples for nectar collection, reinforce the influence of the botanical source on the honeys antioxidant properties (Piljac-Žegarac, Stipčević & Belščak, 2009; Lianda et al. 2012).

### 3.4 ORAC

The ORAC method consists of measuring the decrease in fluorescence of a protein, as result of the loss of its conformation when it suffers oxidative damage caused by a source of peroxy radicals (ROO•) (Zulueta, Esteve, & Frigola, (2009). The ORAC radical scavenging effect of honeys samples varied from  $8.9 \pm 0.1$  to  $54.3 \pm 0.3$   $\mu\text{mol}/\text{TE}/100\text{g GAE}/100\text{g}$ , with differences ( $p \leq 0.05$ ) among honeys from distinct bee specie and floral sources. For this assay, honeys from malícia showed an antioxidant potential up to 4-fold higher than the other tested honeys (Table 1). Significant correlations ( $p \leq 0.01$ ) were found between ORAC and RSA ( $r = 0.9363$ ), FCT ( $r = 0.9667$ ), FCT ( $r = 0.8957$ ), color ( $r = 0.9296$ ), DPPH ( $r = 0.9347$ ) and ABTS ( $r = 0.9851$ ).

The potential advantages (and differences) of ORAC assay compared with the other applied methods include the use of peroxy radical as reactants, with redox potential and mechanism of reaction (i.e. hydrogen atom vs. electron transfer) similar to those of physiological oxidants, and the use of a physiological pH. Thus, the antioxidants react with an overall charge and protonation state similar to that found in the human body (Bisby, Brooke & Navaratnam, 2008; Gorjanovic de et al. 2013). In general, compounds with more hydroxyl substitutions possess the stronger antiperoxy radical activities. Particularly in flavonoids, the di-OH substitution at C-3' and C-4' is plays an important role in the peroxy radical absorbing activity (Cao et al., 1997).

This relation structure-activity could explain why the honeys from malícia showed the highest capability as antioxidant in ORAC assay, even if these honeys presented the lowest TPC among the honeys tested, when considered the same bee producer. Malícia honeys presented the highest quantities of the flavonoids kaempferol, quercetin and myricetin (Table 2), which possess hydroxyl groups substituents on C-3' and C-4 '. Still, it is known that when similar total phenolic contents occur, these do not necessarily correspond to the same antioxidant responses. The response of different phenolic compounds in the Folin-Ciocalteu assay also depends on their particular chemical structure (Atoui, Mansouri, Boskou, & Kefalas, 2005).

The discordance among the antioxidant potential, considering the results of activity in DPPH, ABTS<sup>•+</sup> and ORAC assays, was also observed for monofloral honeys from acacia, lime and singing bean produced by *Apis* (Meda et al., 2005; Alvarez-Suarez et al., 2010; Socha et al., 2011). This variation is attributed to the profile of phenolic compounds of each honey. Different chemical structures possess distinct capabilities to capture the radicals assayed, particularly because the number and position of their hydroxyl groups (Atoui et al., 2005). At the present time, no single available assay for testing the antioxidant capacity provides all of the information desired. The evaluation of overall antioxidant capacity may require multiple assays to generate an “antioxidant profile” encompassing reactivity toward both aqueous (DPPH and ABTS) and lipid/organic radicals (ORAC) directly via radical quenching and radical reducing mechanisms (DPPH; ABTS; FRAP and ORAC) and indirectly via metal complexing (FRAP) (Alvarez-Suarez et al., 2012).

### *3.4 Phenolic profile*

The results obtained for the polyphenolic composition of honey samples are presented in Table 2. The identity of most of the phenolic compounds in the analyzed honey samples could be confirmed positively by comparison with standards. However, other compounds present in these samples with similar phenolic spectra and chromatographic behavior could not be identified due to the no availability of standard compounds. Flavonoids and benzoic and cinnamic acids are the most common phenolic compounds found in honeys produced by *Apis* (Alvarez-Suarez et al., 2012; Sabatier Amiot, Tacchini & Aubert, 1992). In meliponini, the flavonoids cited as prevalent are naringenin, quercetin and isorhamnetin along with gallic, vanillic, 3,4-dihydroxybenzoic and cumaric acid (Silva et al., 2013). However, to the best of our knowledge, only a few studies assessing the phenolic compounds profile of meliponini honeys from heterofloral source are available (Vit et al., 2009; Silva et al., 2013; Silva et al., 2013), and no studies assessing these characteristics in meliponini honeys from monofloral sources are available. To evaluate the presence of the phenolic compounds in tested monofloral honeys, fourteen genuine phenolic compounds that are commonly found in honey samples, comprising genuine benzoic and cinnamic acid derivatives, and eight flavonoids were selected.

The HPLC-DAD analyses of the of studied honeys revealed the influence of the floral source on their polyphenolic profile. Generally, the HPLC chromatograms of the phenolic acids and flavonoids indicated that the honeys from the same floral source had similar phenolic profiles, with exception of honey from juazeiro. The presence of all phenolic acids, particularly p-coumaric, ellagic, 3,4-hydroxybenzoicd, and the flavonoids rutin, catechin, chrysin and narigenin were detected in higher amounts in juazeiro honeys, when compared with the other tested honeys produced by the same bee specie. This is probably a characteristic of this botanical specie and of its pollen. An

early study of honeys produced in arid regions, where climatic conditions are similar to those found in Brazilian northeast, observed high quantity of rutin in honeys from *Z. spina-cristi*, suggesting it as a marker in honeys from *Ziziphus* species (Habib et al., 2014;).

In malícia honeys, the phenolic acid detected in higher quantities was 3,4-hydroxybenzoic and the flavonoids quercetin, miricetin and kaempferol. Interestingly, a previous study concerning the pollen loads collected from jandaira honey possessing 98.95% of pollen from *M. gemmulata* indicated the presence of naringenin. This suggested that naringenin may be specific for honeys from *Mimosa* species (Silva et al., 2006). In the present study, two honeys from the same genus, malícia (*Mimosa quadrivalvis* L.) and jurema branca (*Mimosa arenosa*), showed variation in contents of naringenin in honeys produced by both bee species. Additionally, naringenin was present in all honeys samples suggesting that it is not a marker of *Mimosa* honeys, as previously proposed.

### 3.5 Antimicrobial activity

The antimicrobial activity of polyphenolic compounds (phenolic acids and flavonoids) is well known. We have chosen to assess the antimicrobial properties of the entire honey (diluted in growth media) considering that total honey may be more beneficial than isolated constituents. Bioactive individual components in honeys can change their antibacterial effects in the presence of other compounds, establishing a synergistic effect (Silici, et al., 2010).

The target bacterial strains exhibited different sensitivities when challenged with the different monofloral honey samples tested, as measured by determination of MIC. Honey from juazeiro and velame branco, produced by both bee species, displayed the



lowest MICs (honeys from juazeiro: <10 - 20; honeys from velame branco: 10g/ 100 mL – 30g/ 100 mL). The highest MICs were displayed by honeys from malícia (30g/ 100 mL – 50g/ 100 mL) (Table 3). In general, considering the floral source of honeys an approximate general ranking of the antimicrobial activity could be described as follows: juazeiro > velame branco > jurema branca > malicia. The samples that showed the strongest antimicrobial activities also presented the highest TPC.

The reasons for the antimicrobial activity of honeys are so far controversial. Some studies have reported antimicrobial activity of monofloral or multifloral honeys produced by *Apis*(Elbanna, Attalla, Elbadry, Abdeltawab, Gamal-Eldin, & Ramadan 2014) or *Meliponini* (Silva et al., 2013a). However, because the great variation in the methodologies used (e.g. agar diffusion, disk-difusion, microplate and colorimetric assays), variety of honey samples used (e.g. extracts or whole honeys) and the use of fresh or ripe honeys, the available data are inconsistent.

Some researchers state that the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produced by action of glucose oxidase or the non-peroxide activity are the main aspects related with the antimicrobial activity of honeys (Wang, Huang, Tai & Huang, 2012; Al-Habsi et al., 2012; Elbanna et al., 2014). The effects of the non-peroxide activity in antimicrobial properties of honeys are more pronounced in ripe honeys (as that used in the present study), where only a small peroxide amount (not sufficient to inhibit bacterial growth) is found (Bizerra, Silva & Hayashi, 2012). Consistently, it has also been shown that the antibacterial activity of honeys is related with the polyphenols found therein (Silici, et al. 2010; Brudzynski, Abubaker, St-Martin & Castle, 2011). It could be proposed that the non-peroxide compounds are mostly related with the antibacterial effects presented by the honeys samples studied, because the samples possessing the highest phenolics contents presented the smallest MICs against the tested bacterial strains. Moreover, the presence

of higher amounts of flavonoids such as rutin, catechin and chrysin in honeys from juazeiro could also contribute to its stronger antimicrobial activity. Flavonoids are able to interfere with the structural and functional properties of bacterial membranes, which in turn become increasingly permeable to protons, ultimately leading to the loss of cell integrity with leakage of cytoplasmic content (Kirnpal-Kaur et al. 2011).

Considering the detected MICs, the sensitivity of the tested bacteria followed the order: *Salmonella* spp. > *S. aureus* > *L. monocytogenes* > *E. coli* > *P. aeruginosa*. These results are in accordance with the literature which reports that different bacteria differs in their sensitivity to honeys, wherein *Salmonella* spp. was the most sensitive followed by *S. aureus*, *L. monocytogenes* and *E. coli* (Rodriguez et al., 2012), and *S. aureus* is more sensitive to honey than *P. aeruginosa* (Alvarez-Suarez et al. 2010). These results are worthy of note because *Salmonella* spp., as a Gram-negative bacteria, has commonly presented higher resistance to antimicrobials when compared with Gram (+) bacteria (e.g., *S. aureus* and *L. monocytogenes*) (Mazzarrino et al. 2015). Overall, whole Meliponini honeys presented capability to inhibit bacteria growth, so further studies could be performed to assess the contribution of their individual compounds for the establishment of these inhibitory effects and their possible action mode on bacterial cells.

## Conclusion

The honeys from juazeiro and velame branco produced by meliponini jandaíra and urucu showed the highest TPC, the highest antioxidant activity (as measured as scavenger of DPPH and ABTS•+ radicals) and the highest MICs against pathogenic bacteria. Otherwise, honeys from malícia produced by both bee specie studied showed the highest potential to capture oxygen radical and the greatest quantities of quercetin,

myricetin and kaempferol. This study detected, for the first time, the presence of the great quantities of the some phenolic acids and flavonoids in juazeiro and maillecia honeys produced by meliponini, as well as the variance and similarities of their bioactivity related with the floral source.

## **Acknowledgments**

The authors would like to thank to Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Brazil) for the Science Without Borders scholarship awarded to the first author (Sousa, J.M.B.) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq - Brazil) and the Foundation for Science and Technology (FCT - Portugal) by financial support. Moreover, the authors would like to thank the beekeepers for providing the honey samples.

## **References**

- Al-Habsi, N. A. & Niranjana, K. (2012). Effect of high hydrostatic pressure on antimicrobial activity and quality of Manuka honey. *Food Chemistry*. 135, 1448-1454.
- Al-Mamary, M.; Al-Meer, A. & Al-Habib, M. (2002). Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutritional Research*, 22, 1041-1047.
- Alvarez-Suarez, J. M., Tulipani S., Díaz, D., Estevez Y., Romandini, S., Giampieri, F. et al. (2010). Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. *Food Chemistry Toxicology*, 48, 2490-2499.

- 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). *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.
- Atoui, A. K., Mansouri, A., Boskou, G. & Kefalas, P. (2005). Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*, 89, 27-36.
- Belitz, H. D., Grosch, W. & Schieberle, P. (2009). *Food Chemistry*, (4th ed.), Springer-Verlag, pp. 883-891.
- Bisby, H. R., Brooke, R. & Navaratnam, S. (2008). Effect of antioxidant oxidation potential in the oxygen radical absorption capacity (ORAC) assay. *Food Chemistry*, 108, 1002-1007.
- Bizerra, F. C., Silva, J. P. I. & Hayashi, M. A. F. (2012). Exploring the antibacterial properties of honey and its potential. *Frontiers in Microbiology*. 3, 398.
- Brudzynski, K., Abubaker, K., St-Martin, L., Castle, A. (2011) Re-examining the role of hydrogen peroxide in bacteriostatic and bactericidal activities of honey. *Frontiers in Microbiology*, 2, 213.
- Can, Z. Yildiz, O., Sahin, H., Turumtay, A. E., Silici, S. & Kolayli, S. (2015). An investigation of Turkish honeys: Their physico-chemical properties, antioxidant capacities and phenolic profiles. *Food Chemistry*, 180, 133-141.
- Cavazza, A., Corradini, C., Musci, M. & Salvadeo, P. (2013). High-performance liquid chromatographic phenolic compound fingerprint for authenticity assessment of honey. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 1169-1175.

- Elbanna, K.; Attalla, K.; Elbadry, M.; Abdeltawab, A.; Gamal-Eldin, H. & Ramadan, M. F. (2014). Impact of floral sources and processing on the antimicrobial activities of different unifloral honeys. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4, 194-200.
- Erejuwa, O., Sulaiman, S. A, Wahab, M. S., Sirajudeen, K. N., Salleh, M. S. & Gurtu S. (2011) .Glibenclamide or metformin combined with honey improves glycemic control in streptozotocin-induced diabetic rats. *International Journal of Biological Sciences*, 7, 244-252.
- Escuredo, O., Miguez, M., Fernandez-Gonzalez, M., Seijo, M. C. (2013).Nutritional value and antioxidant activity of honeys produced in a European Atlantic area. *Food Chemistry*, 138, 851-856.
- Farin, F. H., Karthaus, R. W., Kujala, P., Rakhshandehroo, M., Schwank, G., Vries, R. G. J., Kalkhoven, E., Nieuwenhuis, E. E. S. & Clevers, H. (2014). Paneth cell extrusion and release of antimicrobial products is directly controlled by immune cell-derived IFN- $\gamma$ . *Journal of cell biology*. 7, 1393-1405.
- Flores, R. S. M., Escuredo, O. & Seijo, C. S. (2015). Assessment of physicochemical and antioxidant characteristics of *Quercus pyrenaica* honeydew honeys. *Food Chemistry*. 166, 101-106.
- Frankel, S., Robinson, G. E. & Berenbaum, M. R. (1998). Antioxidant content and correlated characteristics of 14 monofloral honeys. *Journal of Apicultural Research*. 37, 27-31.
- Gašić, U., Kekeš, S., Dabić, D., Trifković, J., Milojković-Opsenica, D. Maja Natić & M. Tešić, Z. (2014). Phenolic profile and antioxidant activity of Serbian polyfloral honeys. *Food Chemistry*. 145, 599-607.

- Gheldof, N., Wang X. H., & Engeseth N. J. (2002). Identification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 50, 5870-5877.
- Gorjanovic', S. Z., Alvarez-Suarez, J. M., Novakovic', M. M., Pastor, F. T., Pezo, L., Battino, M. & Suz'njevic', M. Z. (2013). Comparative analysis of antioxidant activity of honey of different floral sources using recently developed polarographic and various spectrophotometric assays. *Journal of Food Composition and Analysis*. 30, 13-18.
- Habib, H. M., Meqbali, F. T., Kamal, A. I. H., Souka U. D. & Ibrahim, W. H. Physicochemical and biochemical properties of honeys from arid regions (2014). *Food Chemistry*, 153, 35-43.
- Hussain, M. B., Hannan, H., Akhtar, N., Fayyaz, Q. G., Imran, M., Saleem, S. & ureshi, A. I. (2015). Evaluation of the antibacterial activity of selected Pakistani honeys against multi-drug resistant *Salmonella typhi*. *Complementary and Alternative Medicine*, 15, 2-9.
- Kirnpal-Kaur, B. S., Tan H. T., Boukraa L. & Gan S. H. Different solid phase extraction fractions of Tualang (*Koompassia excelsa*) honey demonstrated diverse antibacterial properties against wound and enteric bacteria (2011). *Journal of Api Product and Api Medical Science*, 3, 59-65.
- Kuskoski, E. M.; Asuero, A. G.; Troncoso, A. M.; M. Filho, J. & Fett, R. (2005). Application of various chemical methods to determine antioxidant activity of fruit pulp. *Science and Technology Food*. 25, 726-732.
- Lianda, R. L. P., Sant'Ana, O. L., Echevarria, A. & Castro, R. N. (2012). Antioxidant activity and phenolic composition of brazilian honeys and their extracts. *Journal Brazilian Chemistry Society*. 23, 618-627.

- Mazzarrino, G., Paparella, A., Chaves-López, C., Faberi, A., Sergi, M., Sigismondi, C. et al. (2015). *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* inactivation dynamics after treatment with selected essential oils. *Food Control*, 50, 794-803.
- Meda, A., Lamien, C. E., Romito, M., Millogo, J. & Nacoulma, O. G (2005). Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Faso honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*, 91, 571-577.
- Perna, A., Simonetti, A. & Gambacorta, E. I. I. (2013). Antioxidant Properties, polyphenol content and colorimetric characteristics of different floral origin honeys from different areas of southern Italy. *Journal of Life Sciences*, 7, 428-436.
- Piljac-Žegarac, J., Stipčević, T. & Belščak, A. (2009). Antioxidant properties and phenolic content of different floral origin honeys. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, 1, 43-50.
- Rodriguez, B. A., Mendoza, S., Iturriga, M. H. & Castaño-Tostado, E. (2012). Quality parameters and antioxidant and antibacterial properties of some Mexican honeys. *Journal of Food Science*, 71, 121-127.
- Sabatier, S., Amiot, M. J., Tacchini, M. & Aubert, S. (1992). Identification of flavonoids in sunflower honey. *Journal Food Science*, 57, 773-774.
- Silici, S., Sagdic, O. & Erik, L. (2010). Total phenolic content, antiradical, antioxidant and antimicrobial activities of *Rhododendron* honeys. *Food Chemistry*, 121, 238-243.
- Silva, I. A. A., Silva, T. M. S., Camara, C. A., Queiroz, N., Magnani, M., Novais, J. S., Soledade, L. E. B., Lima, E. O., Souza, A. L. & Souza, A. G. (2013)a. Phenolic profile, antioxidant activity and palynological analysis of stingless bee honey from Amazonas, Northern Brazil. *Food Chemistry*, 141, 3552-3558.

Silva, T. M. S., Câmara, 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. *Journal of Food Composition and Analysis*. 19, 507-511.

Silva, T. M. S., Santos, F. P., Evangelista-Rodrigues, A., Silva, E. M. S., Silva, G. S., Novais, J. S., Santos, F. D. A. R. & Camara, C. A. (2013). Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaíra (*Melipona subnitida*) honey. *Journal of Food Composition and Analysis*. 29, 10-18.

Socha, R., Juszczak, L., Pietrzyk, S., Gałkowska, D., Fortuna, T. & Witczak, T. (2011). Phenolic profile and antioxidant properties of Polish honeys. *International Journal of Food Science*. 46, 528-534.

Sousa, J. M. B., Aquino, I. S., Magnani, M., Albuquerque, J. R., Santos, G. G. & Souza, L. E. (2013). Physicochemical aspects and sensory profile of stingless bee honeys from Seridó region, State of Rio Grande do Norte, Brazil *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, 34, 1763-1772.

Tenore, C. G., Ritieni, A., Campiglia, P. & Novellino, E. (2012). Nutraceutical potential of monofloral honeys produced by the Sicilian back honeybees (*Apis mellifera*ssp. sicula). *Food and Chemical Toxicology*, 50, 1955-1961.

Vit, P., Gutiérrez, G. M., Rodríguez-Malaver, A. J., Aguilera, G., Fernández-Díaz, C. & Tricio, E. A. (2009). Comparison of honeys produced by the bee yateí (*Tetragonisca fiebrigi*) in Argentina and Paraguay. *Acta Bioquím Clín Latinoam*, 43, 219-26.

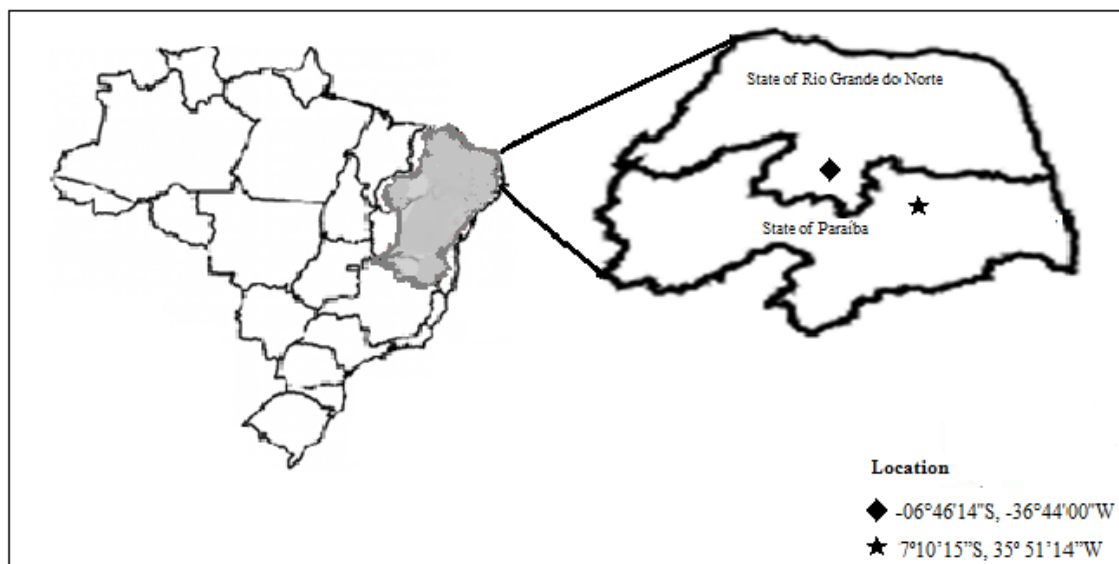
Vorlova, L., Karpiskova, R., Chabiniokova, I., Kalabova, K. & Brazdova, Z. (2005). The antimicrobial activity of honeys produced in the Czech Republic. *Czech Journal of Animal Science*, 50, 376-384.



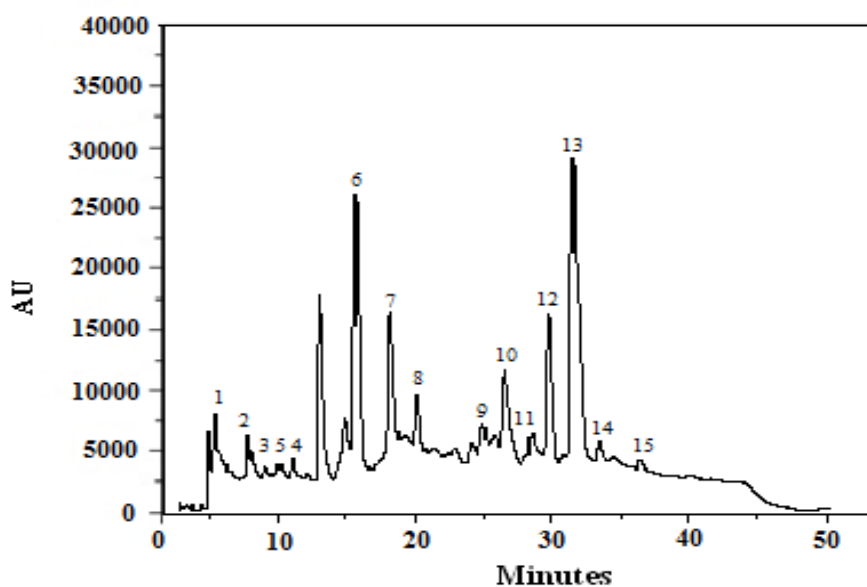
- Wang, B. S., Huang, G. J., Tai, H. M. & Huang, M. H., (2012). Antioxidant and anti-inflammatory activities of aqueous extracts of *Schizonepeta tenuifolia* Briq. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 526-531.
- Weston, R. J., Brocklebank, L. K. & Lu, Y. (2000). Identification and quantitative levels of antibacterial components of some New Zealand honeys. *Food Chemistry*, 70, 427-435.
- White, J. W. J. Composition of honey. In: Crane E, editor. Honey: a comprehensive survey. London: Heinemann; 1979, p. 157-206.
- Zulueta, A. M. J. & Frigola, E. A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*. 114, 310-316.

## Figure Legend

**Figure 1.** Map of semiarid region of Brazilian Northeastern showing the distribution of honey samples studied and respective geographic coordinates. ♦ Seridó region, state of Rio Grande do Norte; ★ Agreste region, state of Paraíba



**Figure 2.** Chromatogram of the *Ziziphus joazeiro* (juazeiro) honey produced by jandaíra (*Melipona subnitida*) - honey sample JJ; peaks identified 1: 2,4-dihydroxybenzoic acid; 2: 3,4-hydroxybenzoic acid; 3: Ferulic acid; 4: Ellagic acid; 5: Trans-cinnamic acid; 6: P-coumaric acid; 7: Syringic acid; 8 Myricetin; 9: Quercetin; 10: Catechin; 11: Rutin; 12: Kaempferol; 13: Hesperetin; 14: Naringenin; 15: Chrysin



**Table 1.** Total phenolics and flavonoids content and antioxidant activity (DPPH, ABTS and ORAC) of monofloral honeys produced by meliponini species (jandaíra and urucu) in the semiarid region of Northeastern Brazil

| Phenolic compounds   | Meliponini / monofloral honeys     |                           |                          |                           |                                         |                          |                           |                            |
|----------------------|------------------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|-----------------------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------|
|                      | jandaíra ( <i>M. Subnida</i> Duke) |                           |                          |                           | uruçu ( <i>M. scutellaris</i> Latrelle) |                          |                           |                            |
|                      | Juazeiro<br>(JJ)                   | Malícia<br>(JA)           | Velame<br>Branco (JVB)   | Jurema<br>Branca (JJB)    | Juazeiro<br>(UJ)                        | Malícia<br>(UA)          | Velame<br>Branco (UVB)    | Jurema<br>Branca (UJB)     |
| TPC (mg GAE/100g)    | 126.6 <sup>Aa</sup> ± 2.7          | 31.54 <sup>Cd</sup> ± 2.1 | 57.5 <sup>Ab</sup> ± 3.7 | 48.1 <sup>Bc</sup> ± 0.5  | 61.1 <sup>Ba</sup> ± 3.7                | 34.2 <sup>Cb</sup> ± 1.5 | 54.0 <sup>ABa</sup> ± 3.8 | 37.5 <sup>Cb</sup> ± 2.1   |
| TFC (mg GAE/100g)    | 4.2 <sup>Aa</sup> ± 0.6            | 4.1 <sup>Aa</sup> ± 0.4   | 2.6 <sup>Cb</sup> ± 0.6  | 2.4 <sup>Ac</sup> ± 0.1   | 4.4 <sup>Aa</sup> ± 0.2                 | 4.0 <sup>Ab</sup> ± 0.4  | 1.9 <sup>Ac</sup> ± 0.1   | 2.1 <sup>Bc</sup> ± 0.5    |
| DPPH (mg AEAC/100g)  | 23.6 <sup>Aa</sup> ± 1.0           | 11.0 <sup>Cc</sup> ± 0.7  | 19.9 <sup>Ab</sup> ± 1.8 | 10.7 <sup>Cc</sup> ± 0.8  | 18.9 <sup>Ba</sup> ± 1.6                | 4.5 <sup>Dc</sup> ± 0.7  | 4.3 <sup>Bcb</sup> ± 1.7  | 11.7 ± 0.2 <sup>BCb</sup>  |
| DPPH (mg QEAC/100 g) | 10.8 <sup>Aa</sup> ± 0.5           | 4.6 <sup>Cc</sup> ± 0.4   | 9.0 <sup>Ab</sup> ± 0.8  | 4.4 <sup>Cc</sup> ± 0.4   | 6.2 <sup>Ba</sup> ± 0.9                 | 1.6 ± 0.3 <sup>Db</sup>  | 6.0 <sup>Ba</sup> ± 0.4   | 4.6 ± 0.1 <sup>Bca</sup>   |
| ORAC (μmol/TE/100g)  | 22.1 <sup>Cb</sup> ± 0.4           | 33.7 <sup>Ba</sup> ± 2.7  | 9.6 <sup>Cd</sup> ± 0.6  | 14.9 <sup>ACb</sup> ± 0.3 | 22.6 <sup>Cb</sup> ± 1.0                | 54.3 <sup>Aa</sup> ± 0.3 | 8.9 <sup>Cd</sup> ± 0.1   | 11.7 <sup>Bc</sup> ± 0.5   |
| ABTS (μmol/TE/100g)  | 81.6 <sup>Aa</sup> ± 4.5           | 24.8 <sup>Cc</sup> ± 0.9  | 35.3 <sup>Bb</sup> ± 1.9 | 26.3 <sup>Abc</sup> ± 0.0 | 46.5 <sup>Ba</sup> ± 5.9                | 23.2 <sup>Cb</sup> ± 2.9 | 39.6 <sup>Aa</sup> ± 1.0  | 26.7 <sup>Cb</sup> ± 1.8   |
| RSA (%)              | 46.9 <sup>Aa</sup> ± 1.9           | 23.3 <sup>Cc</sup> ± 1.4  | 40.1 <sup>Ab</sup> ± 3.2 | 22.7 <sup>Cc</sup> ± 1.6  | 29.5 <sup>Ba</sup> ± 3.4                | 11.2 <sup>Dc</sup> ± 1.3 | 27.5 <sup>Bab</sup> ± 0.5 | 24.6 <sup>BCab</sup> ± 0.4 |

Mean values ± standard deviations. TP = total phenolics; TF = total flavonoids; AEAC, ascorbic acid equivalent antioxidant content; QEAC, quercetin equivalent antioxidant content. Different capital letters in the same row indicates significant differences ( $p \leq 0.05$ ) between honeys from the same botanical source and produced by distinct bee species according to the Tukey's test. Different lowercase letters in the same row indicates significant differences ( $p \leq 0.05$ ) between honeys from different floral source and produced by the same bee species according to the Tukey's test.

**Table 2.** Correlation matrix of antioxidant activity (ORAC, ABTS and DPPH), total phenolics and flavonoids content and RSA (%) of monofloral honeys produced by Meliponini species (jandaíra and urucu) in the semiarid region of northeastern Brazil.

| Variables                                                    | PCT<br>(mg GAE/100g) | FCT<br>(mg QEAC/100g) | RSA<br>(%) | ORAC     | ABTS <sup>•+</sup> | DPPH<br>(mg QEAC/100g) | DPPH<br>(mg AEAC/100g) |
|--------------------------------------------------------------|----------------------|-----------------------|------------|----------|--------------------|------------------------|------------------------|
| PCT (mg GAE/100g)                                            | 1                    | 0.7700*               | 0.8662**   | 0.9667** | 0.9853**           | 0.8663**               | 0.8313 **              |
| FCT (mg QEAC/100g)                                           |                      | 1                     | 0.9377**   | 0.8957** | 0.8228*            | 0.9178**               | 0.9403**               |
| RSA (%)                                                      |                      |                       | 1          | 0.9363** | 0.8917**           | 0.9976**               | 0.9525**               |
| ORAC ( $\mu\text{mol}/\text{TE}/100\text{g}$ )               |                      |                       |            | 1        | 0.9851**           | 0.9347**               | 0.8941**               |
| ABTS <sup>•+</sup> ( $\mu\text{mol}/\text{TE}/100\text{g}$ ) |                      |                       |            |          | 1                  | 0.8930**               | 0.8671**               |
| DPPH (mg QEAC/100g)                                          |                      |                       |            |          |                    | 1                      | 0.9705**               |
| DPPH (mg AEAC/100g)                                          |                      |                       |            |          |                    |                        | 1                      |

**Table 3.** Phenolic acids and flavonoids of monofloral honeys produced by Meliponini species (jandaíra and uruçú) in the semiarid region of Northeastern Brazil.

| Phenolic acids            | Meliponini / monofloral honeys     |              |                  |                  |                                         |              |                  |                  |
|---------------------------|------------------------------------|--------------|------------------|------------------|-----------------------------------------|--------------|------------------|------------------|
|                           | jandaíra ( <i>M. Subnida</i> Duke) |              |                  |                  | uruçú ( <i>M. scutellaris</i> Latrelle) |              |                  |                  |
|                           | Juazeiro                           | Malícia      | Velame<br>Branco | Jurema<br>Branca | Juazeiro                                | Malícia      | Velame<br>Branco | Jurema<br>Branca |
| 2,4-dihydroxybenzoic acid | 30.0 ± 0.15                        | 16.9 ± 0.08  | 1.33 ± 0.02      | 3.50 ± 0.07      | 25.50 ± 0.08                            | 17.20 ± 0.02 | 1.32 ± 0.02      | 3.00 ± 0.05      |
| 3,4-hydroxybenzoic acid   | 24.0 ± 0.15                        | 0.98 ± 0.05  | 0.30 ± 0.01      | 3.80 ± 0.12      | 22.30 ± 0.02                            | 1.0 ± 0.01   | 0.40 ± 0.01      | 3.60 ± 0.13      |
| Ferulic acid              | 18.0 ± 0.09                        | 0.51 ± 0.04  | 0.90 ± 0.07      | 2.10 ± 0.01      | 11.10 ± 0.07                            | 0.70 ± 0.02  | 1.50 ± 0.02      | 2.00 ± 0.07      |
| Ellagic acid              | 41.0 ± 0.12                        | 1.20 ± 0.02  | 1.40 ± 0.06      | 10.00 ± 0.01     | 24.30 ± 0.05                            | 1.50 ± 0.02  | 1.10 ± 0.02      | 9.80 ± 0.03      |
| Trans-cinnamic acid       | 13.0 ± 0.02                        | 0.13 ± 0.04  | 0.20 ± 0.01      | 3.70 ± 0.05      | 10.80 ± 0.12                            | 0.30 ± 0.11  | 0.20 ± 0.04      | 4.00 ± 0.5       |
| P-coumaric acid           | 45.0 ± 0.42                        | 1.02 ± 0.05  | 1.90 ± 0.03      | 4.40 ± 0.35      | 32.70 ± 0.13                            | 1.40 ± 0.04  | 0.90 ± 0.15      | 2.50 ± 0.02      |
| Syringic acid             | 12.0 ± 0.02                        | 5.00 ± 0.01  | 4.90 ± 0.07      | 2.40 ± 0.08      | 11.60 ± 0.06                            | 5.30 ± 0.21  | 4.50 ± 0.02      | 2.20 ± 0.01      |
| <b>Flavonoids</b>         |                                    |              |                  |                  |                                         |              |                  |                  |
| Myricetin                 | 1.10 ± 0.02                        | 21.10 ± 0.14 | 4.0 ± 0.09       | 4.21 ± 0.21      | 1.81 ± 0.1                              | 18.01 ± 0.1  | 3.92 ± 0.07      | 5.50 ± 0.13      |
| Quercetin                 | 4.20 ± 0.06                        | 23.31 ± 0.44 | 2.7 ± 0.10       | 1.72 ± 0.02      | 4.42 ± 0.04                             | 17.30 ± 0.2  | 3.21 ± 0.4       | 2.01 ± 0.12      |
| Catechin                  | 14.90 ± 0.04                       | 0.70 ± 0.01  | 1.50 ± 0.03      | 0.31 ± 0.02      | 10.52 ± 0.04                            | 1.22 ± 0.08  | 0.61 ± 0.01      | 0.04 ± 0.01      |
| Rutin                     | 86.12 ± 0.02                       | 5.30 ± 0.26  | 7.10 ± 0.12      | 3.20 ± 0.02      | 55.51 ± 0.05                            | 6.02 ± 0.1   | 6.72 ± 0.2       | 3.50 ± 0.2       |
| Kaempferol                | 4.91 ± 0.2                         | 6.10 ± 0.05  | 3.80 ± 0.07      | 2.80 ± 0.12      | 4.73 ± 0.04                             | 5.80 ± 0.03  | 3.61 ± 0.1       | 2.61 ± 0.10      |
| Hesperetin                | 7.70 ± 0.2                         | 0.31 ± 0.03  | 0.51 ± 0.05      | 0.33 ± 0.02      | 4.12 ± 0.1                              | 0.33 ± 0.07  | 0.71 ± 0.1       | 0.31 ± 0.02      |
| Naringenin                | 8.70 ± 0.07                        | 0.33 ± 0.02  | 0.50 ± 0.58      | 6.51 ± 0.02      | 9.10 ± 0.1                              | 0.21 ± 0.02  | 0.60 ± 0.08      | 5.24 ± 0.02      |
| Chrysin                   | 13.01 ± 0.15                       | 0.71 ± 0.04  | 0.52 ± 0.01      | 0.30 ± 0.09      | 10.90 ± 0.2                             | 0.90 ± 0.1   | 0.51 ± 0.02      | 0.73 ± 0.02      |

Mean values (µg/1g of honey) from three repetition ± standard deviations; nd = not detected

**Table 4.** Minimum inhibitory concentration (MIC; g/100mL) of monofloral honeys produced by Meliponini (jandaíra and urucu) in the semiarid region of Brazilian Northeastern Brazil against pathogenic bacterial strains

| Honeys samples* | <i>E. coli</i> CINF1 | <i>P. aeruginosa</i> CINF3 | <i>S. aureus</i> 18N | <i>Salmonella</i> sp. CINF2 | <i>L. monocytogenes</i> 3375 |
|-----------------|----------------------|----------------------------|----------------------|-----------------------------|------------------------------|
| JJ              | 10                   | 10                         | <10                  | <10                         | 20                           |
| JA              | 30                   | 40                         | 50                   | 30                          | 50                           |
| JVB             | 20                   | 30                         | 20                   | 30                          | 30                           |
| JJB             | 30                   | 40                         | 40                   | 30                          | 30                           |
| UJ              | 20                   | 20                         | 10                   | 10                          | 20                           |
| UA              | 40                   | 50                         | 50                   | 40                          | 40                           |
| UVB             | 20                   | 20                         | 20                   | 10                          | 20                           |
| UJB             | 30                   | 50                         | 30                   | 30                          | 40                           |

JJ: honeys from juazeiro produced by jandaíra bee; JA: honeys from malícia produced by jandaíra bee; JVB: honeys from velame branco produced by jandaíra bee; JJB: honeys from jurema branca produced by jandaíra bee; UJ: honeys from juazeiro produced by urucu bee; UA: honeys from malícia produced by urucu bee; UVB: honeys from velame branco produced by urucu bee; UJB: honeys from jurema branca produced by urucu bee

## 6. CONCLUSÃO FINAL

Os méis monoflorais de *Ziziphus joazeiro* (juazeiro), *Mimosa quadrivalvis* L (malícia), *Croton heliotropiifolius* Kunth (velame branco) e *Mimosa arenosa* Willd Poir (jurema branca) produzidos pelas espécies de abelhas *Melipona subnuda* Duke (jandaíra) e *M. scutellaris* Latrelle (uruçu) na região do Semiárido do Nordeste brasileiro apresentam uma composição característica de elevada umidade e acidez.

Os aspectos físico-químicos e sensoriais dos méis produzidos por ambas as espécies de abelha estudadas foram influenciados pela origem botânica, particularmente os méis de juazeiro e de malícia, que apresentaram a maior quantidade de compostos fenólicos totais e os melhores resultados nos ensaios com os radicais DPPH e ABTS<sup>•+</sup>, bem como a maior atividade contra as bactérias ensaiadas. Entretanto, no ensaio ORAC, os méis de malícia demonstraram a maior capacidade de captura de radicais dentre os méis avaliados.

Embora não tenha sido encontrado um marcador específico para os méis monoflorais estudados, os méis de juazeiro mostraram elevadas quantidades dos ácidos fenólicos: ácido elágico e ácido p-cumárico, enquanto que os méis de malícia se destacaram pela elevada quantidade de alguns flavonoides como quercetina e miricetina.

Devido à escassez de informações existentes sobre os méis monoflorais produzidos pelas espécies de abelhas sem ferrão jandaíra e uruçu a partir do néctar de plantas típicas da região do semiárido do Nordeste do Brasil, este estudo realizou avaliação pioneira dos aspectos físico-químicos e sensoriais, bem como do potencial antioxidante e antimicrobiano destes méis, e disponibiliza informações que contribuem para a construção do conhecimento de parâmetros que caracterizam os méis de abelhas sem ferrão produzidos no Brasil, tanto no que concerne aos seus aspectos de qualidade, quanto as suas propriedades bioativas.

## **ANEXOS**





**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

**CERTIDÃO**

**Certifico que o Comitê de Ética em Pesquisa, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba – CEP/CCS aprovou por unanimidade na 2ª Reunião realizada no dia 19/02/2013, o projeto de pesquisa intitulado: “ASPECTOS DE QUALIDADE E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE MÊIS MONOFLORAIS DE ABELHAS NATIVAS SEM FERRÃO PRODUZIDOS NO SEMIÁRIDO” da Pesquisadora Janaína Maria Batista de Sousa. Prot. nº 00494/12. CAAE: 06371012.8.0000.5188.**

**Igualmente, informo que a autorização para posterior publicação fica condicionada à apresentação do resumo do estudo proposto à apreciação do Comitê.**

  
**Drª Eliane Marques D. Sousa**  
**Coordenadora CEP/CCS/UFPB**  
**Mat. SIAPE: 0332618**