UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DÉBORA MARIA BORSATO

COMPOSIÇÃO QUÍMICA, CARACTERIZAÇÃO POLÍNICA E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE MÉIS PRODUZIDOS POR MELIPONÍNEOS DO PARANÁ (BRASIL)

CURITIBA
2013

DÉBORA MARIA BORSATO

COMPOSIÇÃO QUÍMICA, CARACTERIZAÇÃO POLÍNICA E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE MÉIS PRODUZIDOS POR MELIPONÍNEOS DO PARANÁ (BRASIL)

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel
Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago

CURITIBA
2013

Borsato, Débora Maria
Composição química, caracterização polínica e avaliação de atividades biológicas de méis produzidos por meliponíneos do Paraná (Brasil) / Débora Maria Borsato – Curitiba, 2013.
151 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientador: Professor Dr. Obdulio Gomes Miguel
Co-orientador: Professor Dr. Paulo Vitor Farago
Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2013.

Inclui bibliografia

1. Abelha sem ferrão. 2. Análise polínica. 3. Compostos fenólicos. 4. Mel. 5. Potencial medicinal. I. Miguel, Obdulio Gomes. II. Farago, Paulo Vitor. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 615.321

TERMO DE APROVAÇÃO

DÉBORA MARIA BORSATO

Título: **COMPOSIÇÃO QUÍMICA, CARACTERIZAÇÃO POLÍNICA E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE MÉIS PRODUZIDOS POR MELIPONÍNEOS DO PARANÁ (BRASIL)**

Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Doutor, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, Medicamentos e Correlatos.

Prof. Dr. Obdúlio Gomes Miguel
Orientador

Prof. Dr. Paulo Vitor Farago
Co-orientador – Universidade Estadual de Ponta Grossa

Profª. Drª. Rosi Zanoni da Silva
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Prof. Dr. Dorivaldo da Silva Raupp
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Prof. Dr. Adhemar Pegoraro
Universidade Federal do Paraná

Profª. Drª. Yanna Dantas Rattmann
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 17 de abril de 2013.

A todas as pessoas que se fizeram presente em minha vida, contribuindo direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pelo amor incomensurável que posso sentir em todos os momentos e pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

Ao meu adorado esposo, Luiz Antônio Barbosa, pelo amor e apoio incondicional em todos os momentos. Agradeço por estar ao meu lado, trazendo harmonia e paz a minha vida.

Aos meus queridos pais, Tânia Mara Spinardi e Candido Cesar Borsato, por tudo o que fizeram e ainda fazem por mim.

Ao meu amado irmão, Aurélio Vinícius Borsato, por ser meu melhor amigo, por se preocupar comigo como um pai se preocupa com uma filha, por querer sempre a minha felicidade, por me incentivar e me apoiar incansavelmente.

Aos meus queridos avós, Orlando Spinardi (*in memorian*), Eclair Maria Spinardi, Genésio Borsato (*in memorian*) e Nahyr Arndt Borsato, pelos exemplos de vida.

Aos demais familiares, pelo incentivo, apoio e convívio agradável.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel, que conduziu este trabalho com muita sabedoria. Agradeço por ter aceitado orientar esta tese, oportunizando o meu aprendizado. Agradeço pela amizade, confiança e paciência durante este período.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Paulo Vitor Farago, pelo incentivo em todos os momentos em que estive desanimada e por me ajudar a superar os obstáculos que apareceram durante estes anos. Agradeço por sua incansável colaboração, dedicação, amizade e paciência.

À Profª. Drª. Marilis Dallarmi Miguel, pelo apoio, incentivo, confiança e amizade.

Ao meliponicultor Éderson José Holdizs, por ceder gentilmente as amostras de mel e pelo apoio a este estudo.

Aos professores Drª. Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales Maia, Drª. Daniela de Almeida Cabrini, Dr. Luís Antônio Esmerino, Dr. Michel Fleith Otuki, Dr. Najeh Maissar Khalil, pela colaboração com este trabalho.

À pesquisadora Drª. Cynthia Fernandes Pinto da Luz, pelo auxílio com a melissopalinologia.

Aos professores e Dr. Adhemar Pegoraro, Dr. Dorivaldo da Silva Raupp, Drª. Rosi Zanoni da Silva e Drª. Yanna Dantas Rattmann pelas importantes contribuições e sugestões na avaliação desta tese.

A minha querida amiga e colega de doutorado, Patrícia Mathias Döll Boscardin, que compartilhou comigo dessa experiência, tornando-a mais agradável, pois juntas conseguíamos rir das dificuldades e encontrar força e ânimo para seguir adiante.

A minha querida amiga Samantha Yumi Kojima, pela amizade sincera, por sempre vibrar com as minhas conquistas e por torcer pela minha felicidade.

As minhas queridas amigas Ana Mery de Oliveira Camlofski e Patrícia Mazureki Campos, pelo incentivo e carinho.

Aos pós-graduandos em Farmacologia, da Universidade Federal do Paraná, Arthur da Silveira Prudente e Daniel Mendes, pelo auxílio com os ensaios da atividade anti-inflamatória.

À pós-graduanda em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Estadual do Centro-Oeste, Juliana Kovalczuk de Oliveira, pelo auxílio com os ensaios da atividade antioxidante.

À aluna de iniciação científica, do curso de Farmácia da Universidade Estadual de Ponta Grossa, Bárbara Helen Bolzan, pelo auxílio com as análises físicas e químicas.

Aos colegas do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná e da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pelo convívio agradável.

Aos funcionários e aos técnicos de laboratório da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela ajuda indispensável, em especial, à Denise Maria de Souza Mendes, à Elizabete Munhoz, à Júlia Folmer e ao Nilson Biagini Sabino.

À Universidade Federal do Paraná, especialmente ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, por propiciar esta oportunidade de crescimento técnico-científico.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Programa de Apoio a Planos de Reestruturação e Expansão das Universidades Federais (REUNI), pela concessão da bolsa de estudos.

Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.

(Madre Tereza de Calcutá)

RESUMO

O mel de abelhas sem ferrão é um alimento com características físicas e químicas particulares e de sabor exótico, alcançando um maior valor de mercado em comparação aos méis de *Apis mellifera* Linnaeus, 1758. Entretanto, apesar do grande número de espécies de meliponíneos existentes, poucas investigações têm sido conduzidas para a avaliação do potencial terapêutico de seus méis. Assim, com o propósito de ampliar o conhecimento sobre méis obtidos a partir de diferentes meliponíneos nativos do Brasil, este trabalho teve por objetivo investigar a qualidade física e química e a origem botânica, bem como estudar o efeito antibacteriano, antifúngico, antioxidante e anti-inflamatório desses produtos, provenientes do estado do Paraná. As características físicas e químicas observadas para os méis de meliponíneos não atenderam, na totalidade, as exigências estabelecidas pela legislação vigente para o mel *de A. mellifera*. As famílias mais representativas nos espectros polínicos das amostras avaliadas foram Anacardiaceae, Arecaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Melastomataceae/Crombetaceae, Myrtaceae, Rubiaceae, Salicaceae e Solanaceae. Considerando a origem botânica dos méis, por meio da melissopalinologia, apenas duas amostras foram classificadas como mel monofloral. Foi encontrada uma correlação positiva entre os teores de fenólicos totais e a atividade antioxidante dos extratos fenólicos obtidos a partir dos méis (EFMs). Todas as amostras de mel *in natura* apresentaram atividade antimicrobiana contra cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. Os EFMs indicaram reduzido efeito antimicrobiano, em relação aos méis de meliponíneos. Foram identificados 11 compostos fenólicos no extrato metanólico do mel produzido pela abelha sem ferrão *Melipona marginata* Lepeletier, 1836. Esse extrato, quando aplicado topicamente, demonstrou um efeito anti-inflamatório, confirmado pela redução do edema, da migração leucocitária e da produção de espécies reativas de oxigênio na pele de camundongos.

.

Palavras-chave: abelha sem ferrão, análise polínica, compostos fenólicos, mel, potencial medicinal

ABSTRACT

The stingless bee honey is a food with particular physicochemical properties and exotic flavor. This hive product reaches a higher price in the market as compared to the honey from *Apis mellifera* Linnaeus, 1758. In spite of the high number of meliponines, few investigations have been devoted to evaluate the therapeutic potential of honeys from stingless bees. Concerning the purpose of increasing the knowledge about honeys from different stingless bees native to Brazil, the aim of this study was to investigate the physicochemical quality and botanical origin, as well as evaluating the antibacterial, antifungal, antioxidant and anti-inflammatory effect of these products from Paraná. The stingless bee honeys presented physicochemical characteristics that not attend to all the legal requirements established for *A. mellifera* honey. Considering the pollen spectra of the studied samples, the most representative families were Anacardiaceae, Arecaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Melastomataceae/Crombetaceae, Myrtaceae, Rubiaceae, Salicaceae and Solanaceae. Regarding the botanical origin, melissopalynology showed that only two sample was classified as a monofloral honey. A positive correlation between total phenolic content and antioxidant activity of honey phenolic extracts (EFMs) was observed. All fresh honey samples presented antimicrobial activity against strains of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. A lower antimicrobial activity was verified for EFMs as compared to pure honeys. A total of 11 phenolic compounds were identified in methanolic honey extract from *Melipona marginata* Lepeletier, 1836. This extract showed a topical anti-inflammatory effect confirmed by decreasing ear edema, leukocyte migration and production of reactive oxygen species in the skin of mice.

Key words: honey, medicinal potential, phenolic compounds, pollen analysis, stingless bee

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 - CORRELAÇÃO ENTRE O CONTEÚDO DE FENÓLICOS TOTAIS E A CONCENTRAÇÃO NECESSÁRIA DO ANTIOXIDANTE PARA SUPRIMIR 50% DO AGENTE OXIDANTE ABTS$^{\bullet+}$ (IC_{50}) PARA OS EFMs OBTIDOS A PARTIR DOS MÉIS DE MELIPONÍNEOS EM ESTUDO..... 109

FIGURA 02 - CORRELAÇÃO ENTRE O CONTEÚDO DE FENÓLICOS TOTAIS E A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE FRENTE AO RADICAL DPPH• PARA OS EFMs OBTIDOS A PARTIR DOS MÉIS DE MELIPONÍNEOS EM ANÁLISE..... 111

FIGURA 03 - EFEITO DO EXTRATO DO MEL DE *Melipona marginata* Lepeletier, 1836 (EMM) NO EDEMA DE ORELHA INDUZIDO POR TPA..... 121

FIGURA 04 - EFEITO DO EXTRATO DO MEL DE *Melipona marginata* Lepeletier, 1836 (EMM) E DEXAMETASONA (DEXA) ADMINISTRADOS POR VIA TÓPICA SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE (MPO) NO SOBRENADANTE DE HOMOGENATOS DE ORELHAS SUBMETIDAS AO TPA..... 122

FIGURA 05 - ANÁLISE HISTOLÓGICA DO EFEITO DO EXTRATO DO MEL DE *Melipona marginata* Lepeletier, 1836 SOBRE O EDEMA E A INFILTRAÇÃO LEUCOCITÁRIA NO MODELO DE EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELA APLICAÇÃO TÓPICA DE TPA..... 123

FIGURA 06 - EFEITO DO EXTRATO DO MEL DE *Melipona marginata* Lepeletier, 1836 (EMM) E DEXAMETASONA (DEXA) ADMINISTRADOS POR VIA TÓPICA SOBRE A PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS), INDUZIDA PELA APLICAÇÃO TÓPICA DO TPA..... 124

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 - ESPECIFICAÇÕES FÍSICAS E QUÍMICAS ESTABELECIDAS PELA LEGISLAÇÃO BRASILEIRA PARA A ANÁLISE DE MÉIS..... 22

TABELA 02 - PROPOSTAS ESTABELECIDAS PARA A PADRONIZAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS DE MÉIS DE MELIPONÍNEOS..... 38

TABELA 03 - IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE MEL, SEGUNDO A ORIGEM ENTOMOLÓGICA, O MUNICÍPIO DE PROCEDÊNCIA E A DATA DA COLETA..... 50

TABELA 04 - MÉTODOS UTILIZADOS PARA A DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS EM MÉIS..... 54

TABELA 05 - DETERMINAÇÃO DA UMIDADE DO MEL A PARTIR DA LEITURA DO ÍNDICE DE REFRAÇÃO..... 55

TABELA 06 - CLASSIFICAÇÃO DO MEL CONFORME A COLORAÇÃO..... 66

TABELA 07 - RESULTADOS DAS ANÁLISES DE UMIDADE, AÇÚCARES REDUTORES, SACAROSE, SÓLIDOS INSOLÚVEIS E CINZAS PARA OS MÉIS ELABORADOS PELAS ESPÉCIES DE MELIPONÍNEOS EM ESTUDO..... 77

TABELA 08 - RESULTADOS DAS ANÁLISES DE pH, ACIDEZ, ÍNDICE DE DIASTASE, HMF E COR PARA OS MÉIS ELABORADOS PELAS ESPÉCIES DE MELIPONÍNEOS EM ANÁLISE..... 78

TABELA 09 - ESPECTRO POLÍNICO PARA OS MÉIS ELABORADOS PELOS MELIPONÍNEOS EM INVESTIGAÇÃO (AMOSTRAS 1 A 7)..... 89

TABELA 10 - ESPECTRO POLÍNICO PARA OS MÉIS ELABORADOS PELOS MELIPONÍNEOS EM ESTUDO (AMOSTRAS 8 A 14)..... 90

TABELA 11 - ESPECTRO POLÍNICO PARA OS MÉIS ELABORADOS PELOS MELIPONÍNEOS EM ANÁLISE (AMOSTRAS 15 A 17)... 91

TABELA 12 - ESPECTRO POLÍNICO PARA OS MÉIS ELABORADOS PELOS MELIPONÍNEOS EM ESTUDO (AMOSTRAS 18 A 21)... 92

TABELA 13 - RENDIMENTO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS PARA OS MÉIS DE MELIPONÍNEOS EM INVESTIGAÇÃO..... 106

TABELA 14 - RESULTADOS DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS (mg EAG. g^{-1} DE EFM) PARA OS EFMs OBTIDOS A PARTIR DOS MÉIS DE MELIPONÍNEOS EM ESTUDO..... 107

TABELA 15 - RESULTADOS DA ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA DESCOLORAÇÃO DO RADICAL CATIÔNICO $ABTS^{\bullet+}$, EM IC_{50}, PARA OS MÉIS E PARA OS EFMs OBTIDOS A PARTIR DOS MÉIS DE MELIPONÍNEOS EM ANÁLISE..... 108

TABELA 16 - RESULTADOS DA ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE FRENTE AO RADICAL DPPH•, EM PORCENTAGEM, PARA OS EFMs OBTIDOS A PARTIR DOS MÉIS DE MELIPONÍNEOS EM ESTUDO..... 110

TABELA 17 - VALORES DE MIC_{90} PARA OS MÉIS ELABORADOS PELAS ESPÉCIES DE MELIPONÍNEOS EM INVESTIGAÇÃO..... 114

TABELA 18 - VALORES DE MIC_{90} PARA OS EXTRATOS FENÓLICOS DOS MÉIS ELABORADOS PELAS ESPÉCIES DE MELIPONÍNEOS EM ANÁLISE..... 115
TABELA 19 - CONCENTRAÇÕES DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DETECTADOS NO EXTRATO METANÓLICO DO MEL DA ABELHA SEM FERRÃO *Melipona marginata* Lepeletier, 1836.... 119

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABTS	2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
$ABTS^{\bullet+}$	radical catiônico 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
Abs_{336}	absorvância a 336 nm
Abs_{284}	absorvância a 284 nm
Abs_{635}	absorvância a 635 nm
Abs_i	absorvância inicial
Abs_f	absorvância final
a.C.	antes de Cristo
ALFAC	solução contendo 85 mL de etanol 80%, 10 mL de formol 40% e 5 mL de ácido acético glacial
AOAC	*Association of Official Analytical Chemists*
ANOVA	análise de variância
AP-1	ativador proteico-1
AR	açúcares redutores
AT	açúcares totais
ATCC	*American Type Culture Collection*
A_w	atividade de água
BHA	butil-hidroxianisol
BHT	butil-hidroxitolueno
ºC	graus Celsius
CCD	*Colony Colapse Disorder*
$C_4H_4KNaO_6.4H_2O$	tartarato duplo de sódio e potássio tetra-hidratado
CHM	caldo Müller-Hinton
CHMG	caldo Müller-Hinton com 2% de glicose
IC_{50}	concentração necessária do antioxidante para suprimir 50% do agente oxidante
MIC	concentração inibitória mínima
MIC_{90}	concentração de amostra (m/V) capaz de inibir o crescimento microbiano em 90%
cm	centímetro
COX	cicloxigenase
COX-2	cicloxigenase-2
Cu^{2+}	íon cúprico
Cu^{+}	íon cuproso
Cu_2O	óxido cuproso
$CuSO_4.5H_2O$	sulfato de cobre penta-hidratado
DCF	2'-7' diclorofluoresceína
DCFH	2'-7' diclorodihidrofluoresceína
DCFH-DA	diacetato de 2'-7' diclorodihidrofluoresceína
DMSO	dimetilsulfóxido
DP	desvio padrão
DPPH•	radical livre 1,1-difenil-2-picril-hidrazila
EAG	equivalente em ácido gálico
EFM	extrato fenólico do mel
EFMs	extratos fenólicos dos méis
MS	*mass spectrometry*

EMM	extrato do mel de *Melipona marginata* Lepeletier, 1836
EPM	erro padrão da média
ESI	ionização por *electrospray*
et al.	expressão latina abreviada, *et alli* (e outros)
EUA	Estados Unidos da América
F	fator de correção
g	grama
HCl	ácido clorídrico
HClO	ácido hipocloroso
HMF	hidroximetilfurfural
H_2O_2	peróxido de hidrogênio
HPLC	*high performance liquid chromatography*
HPLC-UV-ESI-MS	*high performance liquid chromatography with UV and electrospray ionization tandem mass spectrometry detection*
HTAB	hexadeciltrimetilamônio
IL	Interleucina
iNOS	NO sintase induzível
IR	índice de refração
IUPAC	*International Union of Pure and Applied Chemistry*
kg	quilograma
$K_4Fe(CN_6).3H_2O$	ferrocianeto de potássio tri-hidratado
KI	iodeto de potássio
L	litro
LOX	lipoxigenase
LPS	lipopolissacarídeo
m	massa
M	molar
MAPK	proteíno-quinases ativadas por mitógenos
mDO	milidensidade óptica
mEq	miliequivalente
mg	miligrama
MIP-2	proteína inflamatória de macrófagos
ML	microscopia fotônica
Mm	milimolar
mm	milímetro
MPO	mieloperoxidase
MRSA	*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina
Ms	millisiemens
m/z	relação massa/carga
μg	micrograma
μL	microlitro
μm	micrometro
n	número de repetições
Na_2CO_3	carbonato de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
NF- κB	fator de transcrição nuclear-kappaB
nm	nanômetro
NO	óxido nítrico
O_2	oxigênio
PBS	*phosphate buffered solution* (solução-tampão fosfato)

PEG	polietilenoglicol
Pfund	escala de classificação da coloração do mel
PGE_2	prostaglandina E2
$PGF_{2\alpha}$	prostaglandina F2-alfa
Ph	potencial hidrogeniônico
PKC	proteína quinase C
PLA	fosfolipase A_2
%	porcentagem
PR	Paraná
psi	*pound force per square inch* – unidade de medida de pressão
PVP	poli(vinil-pirrolidina)
r	coeficiente de correlação
R$	real – moeda brasileira
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
ROS	espécies reativas de oxigênio
S	estimativa de desvio padrão
ºS	unidade de rotação óptica
spp.	abreviatura de várias espécies
t-BHQ	*t*-butil-hidroquinona
t (h)	tempo, em hora
TMB	tetrametilbenzidina
TNF-*α*	fator de necrose tumoral-alfa
TPA	acetato de 12-O-tetradecanoilforbol
UFPR	Universidade Federal do Paraná
UI	unidades internacionais
UNESP	Universidade Estadual Paulista
US$	*United States dollar* – moeda estadounidense
UV	radiação ultravioleta
UV-Vis	espectrofotometria na região do ultravioleta-visível
V	volume
x g	unidades de gravidade
x_i	resultado de cada replicata
x_m	média dos resultados da triplicata
$Zn(CH_3COO)_2.2H_2O$	acetato de zinco di-hidratado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 17
2 REVISÃO DA LITERATURA..... 19
2.1 MEL..... 19
2.1.1 Qualidade físico-química e microbiológica do mel..... 21
2.1.2 Análise polínica do mel..... 24
2.1.3 Composição e propriedades medicinais do mel..... 28
2.1.3.1 Ação antimicrobiana..... 28
2.1.3.2 Ação antioxidante..... 30
2.1.3.3 Ação anti-inflamatória..... 32
2.2 MELIPONÍNEOS..... 34
2.3 MEL DE MELIPONÍNEOS..... 35
2.3.1 Qualidade física, química e microbiológica do mel de meliponíneos..... 35
2.3.2 Análise polínica do mel de meliponíneos..... 39
2.3.3 Potencial medicinal do mel de meliponíneos..... 41
2.4 POLINIZAÇÃO..... 43
3 OBJETIVOS..... 48
3.1 OBJETIVO GERAL..... 48
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 48
4 MATERIAL E MÉTODOS..... 49
4.1 MATERIAIS..... 49
4.1.1 Amostras de méis de meliponíneos..... 49
4.1.2 Equipamentos..... 50
4.1.3 Fármacos, reagentes e solventes..... 51
4.2 MÉTODOS..... 53
4.2.1 Análises físicas e químicas..... 53
4.2.1.1 Umidade..... 54
4.2.1.2 Açúcares redutores e sacarose..... 56
4.2.1.2.1 Açúcares redutores..... 56
4.2.1.2.2 Sacarose..... 58
4.2.1.3 Sólidos insolúveis..... 59
4.2.1.4 Cinzas..... 60
4.2.1.5 pH e acidez..... 61
4.2.1.6 Índice de diastase..... 62
4.2.1.7 (HMF..... 64
4.2.1.8 Cor..... 65
4.2.2 Classificação em mel floral ou em mel de melato..... 66
4.2.3 Análise polínica..... 66
4.2.4 Obtenção do extrato fenólico do mel (EFM)..... 67
4.2.5 Fenólicos totais..... 68
4.2.6 Avaliação da atividade sequestrante do radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazila (DPPH•)..... 68
4.2.7 Ensaio da descoloração do radical catiônico 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS•+)..... 69
4.2.8 Atividade antimicrobiana..... 70
4.2.8.1 Microrganismos e preparo do inóculo..... 70
4.2.8.2 Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) pela técnica da microdiluição em caldo..... 70

4.2.9 Análise por HPLC-UV-ESI-MS do extrato fenólico do mel de *Melipona marginata* Lepeletier, 1836..... 71
4.2.10 Atividade anti-inflamatória *in vivo* do extrato fenólico do mel *de Melipona marginata* Lepeletier, 1836..... 73
4.2.10.1 Animais e condições de manutenção..... 73
4.2.10.2 Avaliação do edema de orelha..... 73
4.2.10.3 Edema de orelha induzido pela aplicação tópica do TPA..... 74
4.2.10.3.1 Atividade da enzima MPO..... 74
4.2.10.3.2 Análise histológica..... 75
4.2.10.3.3 Determinação deROS..... 75
4.2.10.4 Análise estatística..... 76
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 77
5.1 ANÁLISES FÍSICAS E QUÍMICAS..... 77
5.1.1 Umidade..... 78
5.1.2 Açúcares redutores e sacarose..... 80
5.1.3 Sólidos insolúveis..... 81
5.1.4 Cinzas..... 81
5.1.5 pH e acidez..... 82
5.1.6 Índice de diastase..... 84
5.1.7 HMF..... 85
5.1.8 Cor..... 86
5.2 CLASSIFICAÇÃO EM MEL FLORAL OU EM MEL DE MELATO 87
5.3 ANÁLISE POLÍNICA..... 88
5.4 OBTENÇÃO DO EXTRATO FENÓLICO DO MEL (EFM)..... 105
5.5 FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE..... 107
5.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA..... 114
5.7 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO EXTRATO FENÓLICO DO MEL DE *Melipona marginata* Lepeletier, 1836..... 118
5.8 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA *IN VIVO*..... 120
5.8.1 Efeito do extrato do mel de *Melipona marginata* Lepeletier, 1836 (EMM) sobre o edema de orelha, migração celular e estresse oxidativo induzidos por TPA..... 120
6 CONCLUSÕES..... 131
REFERÊNCIAS..... 132

1 INTRODUÇÃO

O mel é um alimento apreciado, em função do seu sabor característico. Sua qualidade nutricional, devida à presença de vitaminas e minerais, seu valor energético elevado, suas propriedades medicinais, como a ação antioxidante e a atividade antisséptica, e suas propriedades sensoriais têm atraído vários consumidores. Além disso, o seu valor de mercado e a sua qualidade estão, normalmente, relacionados com sua origem botânica e com sua composição química (BORSATO *et al*., 2010).

O mel produzido pela abelha *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 é o mais comum, sendo amplamente estudado e usado pela população. No entanto, particularmente na região Neotropical, além das abelhas africanizadas, espécies de abelhas indígenas sem ferrão ou meliponíneos, como *Melipona* spp., *Scaptotrigona* spp. e *Trigona* spp., elaboram méis diferenciados, com características sensoriais, físicas e químicas particulares e que possuem um valor comercial mais elevado, quando comparados ao mel da abelha *A. mellifera* (GUERRINI *et al*., 2009; ALMEIDA-MURADIAN; MATSUDA; BASTOS, 2007; GAREDEW; SCHMOLZ; LAMPRECHT, 2004; SOUZA *et al*., 2004a; TORRES *et al*., 2004).

O mel elaborado pelos meliponíneos tem sido utilizado tradicionalmente como um alimento com finalidades medicinais, principalmente em zonas rurais e entre os povos indígenas, que atribuem a ele propriedades terapêuticas específicas, como no tratamento de processos inflamatórios e infecciosos (CORTOPASSI-LAURINO; GELLI, 1991; POSEY, 1987).

Quanto ao uso terapêutico, alguns trabalhos exploraram as propriedades medicinais de méis de abelhas sem ferrão, sendo especialmente relacionados à investigação de suas propriedades antimicrobianas. Nesse sentido, foi avaliado o efeito antimicrobiano de méis produzidos por espécies de abelhas indígenas sem ferrão provenientes de diferentes países, dentre eles o Brasil (BOORN *et al*., 2010; IRISH *et al*., 2008; GONÇALVES; ALVES-FILHO; MENEZES, 2005; TORRES *et al*., 2004; MIORIN *et al*., 2003).

Entretanto, ao considerar que o número de meliponíneos ultrapasse 500 e 192 espécies, respectivamente no mundo e no Brasil (BALLIVIÁN, 2008; CRANE, 2004), pode-se estabelecer que esses estudos representam apenas um grupo

pequeno de investigações, que, embora promissores, não abrangem a totalidade dos méis produzidos pelas diferentes espécies de abelhas indígenas sem ferrão existentes.

Dessa forma, com base na literatura consultada, não foram verificados trabalhos relativos à avaliação das propriedades medicinais de méis de abelhas indígenas sem ferrão elaborados pelas espécies *Melipona bicolor*, *Melipona marginata*, *Melipona rufiventris*, *Melipona quadrifasciata*, *Scaptotrigona bipunctata*, *Scaptotrigona xanthotricha.* Com relação às espécies *Tetragona clavipes* e *Tetragonisca angustula*, apenas um estudo abordou o potencial antimicrobiano dos méis produzidos por essas abelhas no estado do Paraná (CORTOPASSI-LAURINO; GELLI, 1991).

Assim, com o propósito de ampliar o conhecimento sobre o potencial medicinal e a composição de méis obtidos a partir de diferentes meliponíneos nativos do Brasil, o objetivo desse trabalho foi determinar as características físicas e químicas e a origem botânica, bem como avaliar o efeito antibacteriano, antifúngico, antioxidante e anti-inflamatório desses produtos provenientes do estado do Paraná.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 MEL

O mel é um produto viscoso, adocicado e, geralmente, de aroma agradável. Apreciado desde a Grécia antiga, foi utilizado pelo homem como alimento, medicamento e oferenda aos deuses. A primeira referência escrita sobre o mel, um texto sumério de cerca de 2100 a 2000 a.C, menciona o uso do mel como uma pomada. Existem relatos do uso do mel como medicamento em papiros egípcios de cerca de 1500 a.C., nos quais o mel estava na composição de centenas de prescrições para uso externo e interno. No Egito antigo, também foi usado como oferenda em cerimônias religiosas, sendo que os israelitas destinavam o mel de suas primeiras colheitas para presentear a Deus. Na Babilônia e na Grécia antiga, o mel foi ainda empregado para conservar os corpos de reis e generais mortos em batalha, até que fossem transportados para o funeral (BOGDANOV *et al*., 2008; O MEL..., 2003; SATO; MIYATA, 2000; CRANE, 1996; MOLAN, 1996).

Por um longo período de tempo, o mel foi o único edulcorante utilizado pelo homem, até ser substituído, gradativamente, por açúcares refinados e manufaturados, como os extraídos da cana-de-açúcar e da beterraba (BOGDANOV *et al*., 2008; O MEL...,2003; PEREIRA *et al*., 2003; COUTO; COUTO, 1996).

Há diversos tipos de méis, produzidos, principalmente, pelas abelhas do gênero *Apis*. A espécie *A. mellifera* é encontrada na Europa, África e Oriente Médio; a *Apis cerana* Fabricius, 1793 é uma abelha de colmeias nativas do sul da Ásia; a *Apis dorsata* Fabricius, 1793 e a *Apis florea* Fabricius, 1787 são espécies nativas dos trópicos da Ásia e caracterizam-se por ter como ninho um favo único ao ar livre. Mas, existem outras espécies que produzem diferentes tipos de méis, como as abelhas sem ferrão ou meliponíneos, presentes nos trópicos de todos os continentes, as quais somam cerca de 500 *taxa* ao todo. Há, também, espécies de vespas, na América do Sul tropical, e formigas, em algumas áreas secas da Austrália e da América do Norte, que produzem mel, mas não produzem cera (CRANE, 2004, 1996, 1983).

O mel é elaborado pelas abelhas melíferas, a partir do néctar das flores ou das secreções procedentes de partes vivas de plantas ou ainda, de secreções de insetos sugadores de seivas vegetais que permanecem sobre as partes vivas dessas plantas. As abelhas recolhem, transformam, combinando esse material com substâncias específicas próprias, armazenam e deixam maturar nos favos da colmeia (BRASIL, 2000; CRANE, 1983).

A partir do néctar, as abelhas produzem os méis florais, os quais são os mais apreciados e alcançam os maiores preços no mercado. O mel pode ser classificado, a partir da sua origem floral, em monofloral, quando a maior parte do néctar é coletada de uma única espécie vegetal; polifloral, quando mais de uma espécie botânica contribui com o néctar; e silvestre, se produzido a partir de espécies nativas. Os méis florais são caracterizados por meio da análise microscópica, que possibilita a identificação e a quantificação dos grãos de pólen (SODRÉ *et al*., 2007; ANDRADE E SILVA, 2003; MOREIRA; DE MARIA, 2001; COUTO; COUTO, 1996).

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

Considerando a quantidade e o valor de mercado do mel produzido pelas diferentes espécies de abelhas, pode-se constatar que existem diferenças. Enquanto que a abelha *A*. *mellifera* pode produzir quantidades superiores a 13 L de mel por colônia ao ano (PEREZ *et al*., 2006), a produção média de mel da abelha *Melipona subnitida* Ducke, 1910 por colônia ao ano é de 2 L, segundo um estudo realizado no município de Jandaíra, Rio Grande do Norte (CÁMARA *et al*., 2004). Já a produtividade da espécie *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 alcança 8 L de mel por colônia ao ano (SILVA; LAGES, 2001). Embora a produção do mel de *A*. *mellifera* seja numericamente maior quando comparada à produção realizada pelos meliponíneos, o preço de mercado de produtos de *Apis* é muito inferior àquele de abelhas sem ferrão. Enquanto que um quilograma de mel de *A*. *mellifera* é vendido entre R$10,00 e R$15,00, um litro de mel de meliponíneos pode alcançar um preço

de R$ 20,00 a R$100,00 no mercado nacional. O mel produzido pelas abelhas indígenas sem ferrão é mais valorizado devido ao sabor exótico que possui e à baixa oferta desse produto para a comercialização (ALVES *et al*., 2005).

2.1.1 Qualidade física, química e microbiológica do mel

Os requisitos de qualidade física e química do mel foram estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, na Instrução Normativa № 11, de 20 de outubro de 2000, a qual constitui o Regulamento de Identidade e Qualidade do Mel (Tabela 01). Esse regulamento impede a adição de açúcares e/ou outras substâncias que alterem a composição original do mel. Quanto às características sensoriais, o mel pode ter cor variável, de quase incolor a pardo-escura; deve ter sabor e aroma característicos, conforme a sua origem, e pode apresentar consistência variável, de acordo com o seu estado físico. Quanto às características físicas e químicas, para o critério de maturidade, os parâmetros a serem avaliados se referem às análises de açúcares redutores, umidade e sacarose; para satisfazer a condição de pureza, os méis devem apresentar grãos de pólen e precisam atender às especificações para os teores de sólidos insolúveis em água e minerais (cinzas). Além disso, para avaliar suas condições de deterioração, é necessário averiguar os teores de acidez livre, hidroximetilfurfural (HMF) e atividade diastásica. O mel não deve ter indícios de fermentação e deve ser acondicionado em embalagem adequada para alimentos, que mantenha as condições previstas para o armazenamento e que confira uma proteção elevada contra a contaminação. O mel em favos e o mel com pedaços de favos só devem ser acondicionados nas embalagens destinadas para sua venda direta ao público (BRASIL, 2000).

TABELA 01 – ESPECIFICAÇÕES FÍSICAS E QUÍMICAS ESTABELECIDAS PELA LEGISLAÇÃO BRASILEIRA PARA A ANÁLISE DE MÉIS

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

FONTE: BRASIL (2000)

O teor de umidade é o critério de qualidade que determina a capacidade do mel de se manter estável e livre de fermentação. Um alto teor de umidade pode acelerar a cristalização em determinados tipos de mel e pode favorecer o crescimento de certas leveduras, devido ao aumento da atividade de água (GOMES *et al*., 2010; BOGDANOV *et al.*, 1999; BOGDANOV; MARTIN; LÜLLMANN, 1997; CRANE, 1983). De acordo com Noronha (1997), todo mel com umidade superior a 18% está sujeito à fermentação.

A colheita prematura do mel, que corresponde ao momento em que a sacarose do néctar ainda não foi totalmente convertida em glicose e frutose, pode resultar em teores de sacarose acima do limite estabelecido pela legislação. Entretanto, alguns méis podem não indicar teores elevados de sacarose, mesmo quando colhidos prematuramente, pois néctares de origens florais diversas possuem diferenças em sua composição química de carboidratos (VARGAS, 2006).

A porcentagem de cinzas no mel expressa a presença quantitativa do material mineral e se constitui em um parâmetro amplamente utilizado nas determinações que visam verificar a sua qualidade (ESTEVINHO *et al*., 2012; MARCHINI, MORETI; OTSUK, 2005). O conteúdo de cinzas no mel é, geralmente, pequeno e depende da composição do néctar das plantas que contribuem para a sua formação. A quantidade de minerais existentes nas cinzas também é influenciada pelo tipo de solo em que a planta nectarífera tem seu crescimento (FELSNER *et al.*, 2004).

A acidez do mel pode ser explicada pela presença de ácidos orgânicos e alguns íons inorgânicos, tais como o fosfato, provenientes de diferentes fontes de néctar. Também pode ser resultante da ação da enzima glicose-oxidase, que forma

o ácido glucônico, da ação de bactérias durante a maturação do produto e, ainda, pode estar relacionada às quantidades de minerais presentes no mel. Um alto teor de acidez pode ser indicativo da fermentação de açúcares em ácidos orgânicos (GOMES *et al*., 2010; HORN, 1997).

O HMF é um composto furânico, formado como um produto intermediário da reação de Maillard pela desidratação direta de açúcares em condições ácidas (caramelização), durante o tratamento térmico aplicado aos alimentos. Pode estar presente naturalmente no mel, mas seu nível elevado é um indicativo de superaquecimento, longa estocagem ou falsificação (RIZELIO *et al*., 2012; FALLICO *et al.*, 2004; BOGDANOV *et al.*, 1999; WHITE JÚNIOR, 1994).

O mel contém uma pequena quantidade de diferentes enzimas, notavelmente, a diastase (*α*- e *β*-amilase), a invertase, a glicose-oxidase, a catalase e a fosfatase ácida, as quais são provenientes das fontes nectaríferas, dos fluidos salivares e das secreções da glândula faríngea das abelhas (HUIDOBRO *et al*., 1995). O nível de diastase encontrado no mel depende de sua origem geográfica e floral e pode ser um indicativo da deterioração do mel, pois a atividade diastásica decresce com o armazenamento e com o aquecimento do mel (GOMES *et al*., 2010; BOGDANOV; RUOFF; PERSANO-ODDO, 2004), sendo um parâmetro importante na avaliação da qualidade do produto.

Assim como o alto teor de HMF, a baixa atividade diastásica é um indicativo do uso de altas temperaturas durante o processamento ou de longo tempo de armazenamento do mel. No entanto, esses critérios de qualidade devem ser avaliados com cautela, pois há uma grande variabilidade da quantidade dessas substâncias em méis provenientes de diferentes origens (FALLICO *et al*., 2006).

A cor do mel depende de vários fatores, como a origem floral, o processamento, o armazenamento, os fatores climáticos durante o fluxo de néctar, a temperatura que afeta o amadurecimento do mel na colmeia, entre outros. O conteúdo de minerais interfere consideravelmente na coloração dos méis, sendo que méis de coloração mais clara possuem menores teores de cinzas quando comparados aos méis de coloração mais escura (AL *et al*., 2009). A legislação brasileira também estabelece que a cor dos méis possa variar de quase incolor a pardo-escuro (BRASIL, 2000), sendo este um parâmetro comercialmente importante, pois em países com grande consumo de mel, méis de coloração mais clara são os preferidos (CRANE, 1983).

É importante destacar que, nas legislações nacionais e internacionais vigentes, não há a exigência da realização de análises microbiológicas para o mel. São estabelecidas, apenas, práticas de higiene durante a manipulação do produto (BRASIL, 2001, 2000; CODEX ALIMENTARIUS COMISSION, 2001; MERCOSUL, 1999).

2.1.2 Análise polínica do mel

A identificação das plantas visitadas pelas abelhas é de fundamental importância para os apicultores, por indicar as fontes de alimento utilizadas para a coleta do néctar e do pólen, visando maximizar o aproveitamento dos recursos tróficos, principalmente em áreas de vegetação natural (ALVES; CARVALHO; SOUSA, 2006; HOWER, 1953). Um dos métodos para caracterizar a flora visitada pelas abelhas é por meio da análise dos tipos polínicos encontrados nos méis (ALVES; CARVALHO; SOUSA, 2006; SEIJO *et al.*, 1992; DURKEE, 1971).

Para que seja feita a identificação botânica e geográfica do mel, é necessário o conhecimento do seu espectro polínico, por meio da contagem de grãos de pólen contidos no mel diluído em água destilada. O pólen dominante (acima de 45%) representa a origem botânica do mel; o acessório (acima de 15 a 45%) indica outras plantas visitadas; e o isolado (menor que 15%) fornece a procedência geográfica da amostra (ESCUREDO *et al*., 2012; MIRANDA; ANDRADE, 1990).

O termo “mel unifloral” é usado para descrever méis em que a maior parte do néctar tenha sido derivada de uma única espécie de planta. Usualmente, o mel é considerado unifloral, se a frequência do pólen de uma planta é maior do que 45% (ESTEVINHO *et al*., 2012; GOMES *et al*., 2010; MAURIZIO, 1975). Porém, um mínimo de 10 a 20% de pólen de *Arbutus*, *Citrus*, *Thymus* ou *Rosmarinus* é suficiente para considerar um mel como monofloral (ESTEVINHO *et al*., 2012; TERRAB; DIEZ; HEREDIA, 2003). Já o mel de *Castanea* ou de *Cynoglossum* requer um mínimo de 70 a 90% de grãos de pólen, em função da baixa produção de néctar, para ser considerado como monofloral (ESTEVINHO *et al*., 2012; ANKLAM, 1998). Não existe, portanto, uma relação fixa e constante entre a quantidade de néctar e a de grãos de pólen produzidos pelas plantas, de modo que cada espécie botânica deve ser considerada individualmente (BARTH, 1989).

A melissopalinologia pode ser útil para determinar e controlar a origem geográfica e botânica do mel. Além disso, a análise polínica fornece informações importantes sobre a extração e a filtração do mel, sobre a fermentação (RUSSMANN, 1998), sobre alguns tipos de adulteração (KERKVLIET *et al*., 1995) e sobre aspectos higiênicos, como contaminações com pó mineral, fuligem ou grãos de amido (LOUVEAUX; MAURIZIO; VORWOHL, 1970). Porém, para uma correta diagnose da sua origem botânica, são necessárias também as análises físicas, químicas e sensoriais (VON DER OHE; PERSANO-ODDO; PIANA, 2004).

O levantamento palinológico qualitativo e quantitativo de uma amostra de mel, obtido pela análise polínica, constitui o seu espectro polínico. Esse espectro diz respeito às plantas produtoras de néctar, às plantas não produtoras, e ainda às falsificações, contaminações e misturas. Quanto à avaliação nectarífera da amostra, ou seja, das espécies vegetais que realmente contribuem para a formação do mel, deve-se levar em conta a presença de pólen de plantas nectaríferas (sub-representadas), poliníferas (super-representadas) e anemófilas nos espectros polínicos (ESTEVINHO *et al*., 2012; GOMES *et al*., 2010; BARTH, 1989).

As plantas nectaríferas, sub-representadas nos espectros polínicos, fornecem muito néctar, mas pouco pólen. Assim, poucos grãos são indicativos de grande quantidade de néctar. Nos méis puros dessa categoria, aparecem poucos grãos de pólen e sedimento. Como exemplo, entre as espécies sub-representadas mais frequentes na região Sul-Sudeste do Brasil, estão as Rutaceae produtoras de frutas cítricas (*Citrus* spp.), Lamiaceae (*Salvia* spp., *Hyptis* spp. e espécies cutivadas para temperos culinários) e algumas Mimosaceae (*Acacia* spp.) (BARTH, 2005, 1989).

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

As espécies de *Eucalyptus* têm produção variável de pólen, de modo que ora se enquadram como nectaríferas, ora como poliníferas (BARTH, 2005). Dentre as espécies botânicas fornecedoras de alimento para as abelhas, o eucalipto é considerado um dos melhores e mais abundantes (MARCHINI; MORETI; SILVEIRA

NETO, 2003). Segundo Nogueira Neto (1953), o néctar das flores de eucalipto pode produzir méis de diferentes qualidades, como, por exemplo, o de *Eucalyptus robusta* Sm., é escuro, perfumado e agradável. Já o néctar de *Eucalyptus ficifolia* F. Muell. é claro e saboroso e o de *Eucalyptus globulus* Labill. é escuro e de baixa qualidade. No Brasil, a cultura de eucalipto é importante para a produção de celulose, madeira e energia e as espécies mais cultivadas são *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh., *Eucalyptus citriodora* Hook., *Eucalyptus cloeziana* F. Muell., *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden, *Eucalyptus maidenii* F. Muell., *Eucalyptus paniculata* Sm., *Eucalyptus saligna* Sm., *Eucalyptus tereticornis* Sm. e *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake (MARCHINI; MORETI; SILVEIRA NETO, 2003; KERR; AMARAL, 1960).

Há ainda as plantas anemófilas, as quais não produzem néctar. O pólen anemófilo é seco e leve, sendo disperso pelo vento. Ele pode entrar, ocasionalmente, na composição do espectro polínico de méis monoflorais, pois é coletado e armazenado nos alvéolos dos favos das colmeias, separadamente do néctar, como fonte de proteínas. A presença desse tipo de pólen no mel pode ser, às vezes, em quantidade considerável, devido ao processo de extração, ou mesmo, devido à adição intencional, o que caracteriza a falsificação do produto. Entretanto, por intermédio desses grãos de pólen, pode-se identificar a região geográfica onde foi coletado o mel. Na região Sul-Sudeste, entre as plantas anemófilas, que ocorrem com maior frequência, estão as espécies de *Cecropia* e Poaceae, dentre as quais se destaca o milho (*Zea mays* L.) (BARTH, 2005, 1989). Além disso, a alta frequência de grãos de pólen de plantas anemófilas, aliada à presença de elementos figurados, como algas, esporos de fungos (fumaginas), partículas de fuligem e massa granulosa, caracterizam o mel de melato (BARTH, 1989).

A análise polínica qualitativa de méis provenientes de diferentes regiões geográficas e florísticas pode fornecer importantes dados, tanto para a caracterização dos méis com relação a sua origem botânica e geográfica e de sua época de coleta, quanto para a avaliação do mel de origem desconhecida ou duvidosa (ESTEVINHO *et al*., 2012; FEÁS *et al*., 2010; BARTH, 1989).

Entretanto, Barth (2005) salienta que a avaliação dos dados obtidos pela contagem polínica ainda necessita aprimoramento. Não basta realizar uma simples repartição dos tipos de grãos de pólen encontrados nas amostras de mel em classes de frequência. Na interpretação das informações, para alcançar uma diagnose final da amostra, é importante conhecer a relação pólen-néctar das espécies apícolas

encontradas no mel (BARTH, 1989). O conhecimento sobre as plantas que produzem maior ou menor quantidade de néctar, maior ou menor quantidade de pólen, bem como sobre as plantas que são de maior ou de menor interesse para as abelhas é, em parte, até empírico. Esse interesse pode variar de região para região. Como exemplo, pode-se citar a espécie apícola *Dombeya wallichii* (Lindl.) K. Schum. (astrapeia), que é muito procurada pelas abelhas do Rio de Janeiro. No entanto, em Santa Catarina, ela não é atrativa para as abelhas, devido ao elevado teor de água presente no néctar da espécie nessa região (BARTH, 2005).

Barth (2005) sugere, então, um modelo de avaliação quantitativa do mel, por meio dos espectros polínicos obtidos a partir das amostras analisadas. Do total de grãos de pólen contado por amostra (mais que 300 grãos), subtrai-se o número de grãos de pólen de plantas anemófilas e poliníferas, obtendo somente o pólen nectarífero. Sobre esse total de pólen nectarífero, são calculados os respectivos percentuais para cada táxon nectarífero, levando em consideração as particularidades das espécies nectaríferas em avaliação. Caso haja alta incidência de uma espécie polinífera, acima de 98% do total de grãos de pólen contados, a produção de néctar dessa planta classifica o mel como monofloral.

Barth (2004), em uma extensa revisão feita sobre a melissopalinologia no Brasil, relata que referências sobre a análise polínica de méis do Sul do Brasil não são frequentes. Os méis que caracterizam essa região são, geralmente, provenientes de Asteraceae e de Anacardiaceae, em especial de *Senecio brasiliensis* (Spreng.) Less. (maria-mole) e *Lithraea* sp. (aroeira), respectivamente (BARTH, 1990). Os diversos *taxa* de Asteraceae, *Eucalyptus*, Myrtaceae e *Mimosa scabrella* Benth. ocorrem frequentemente na região Sul (BARTH; CORÉ-GUEDES., 1999; BARTH, 1989).

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

2.1.3 Composição e propriedades medicinais do mel

Na composição química do mel são encontradas, no mínimo, 200 substâncias (GÓMEZ-CARAVACA *et al*., 2006), entre as quais: água, açúcares, com predominância de glicose e frutose, uma mistura complexa de outros carboidratos, enzimas, aminoácidos, ácidos orgânicos, minerais, substâncias aromáticas, pigmentos e grãos de pólen. Adicionalmente, o mel pode conter cera de abelhas procedente do processo de extração (BRASIL, 2000). Sua composição pode ser variável, dependendo da origem floral, da região geográfica, das condições climáticas e do processamento (ARRÁEZ-ROMÁN *et al.*, 2006).

A apiterapia tem sido recentemente o foco das atenções como uma forma de medicina preventiva utilizada para o retardo do aparecimento de certas doenças, bem como para a promoção de saúde (INOUE *et al.*, 2005). Além de ser um adoçante natural e um alimento de alto valor energético, o mel apresenta efeito imunológico, antibacteriano, anti-inflamatório, analgésico, sedativo, expectorante e de hipossensibilização (WIESE, 1986). Estudos demonstram que o mel tem sido utilizado recentemente na prática médica para o tratamento de infecções pós-operatórias em adultos e neonatos, para a estimulação da cicatrização de ferimentos e de queimaduras e para o tratamento de úlceras gástricas, úlceras dos pés em diabéticos, úlceras venosas, fascite necrosante e furúnculos (AL-WAILI *et al*., 2011; GHELDOF; ENGESETH, 2002).

2.1.3.1 Ação antimicrobiana

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

O efeito antibacteriano do mel ocorre de modo direto e indireto. A ação direta é baseada na inibição ou na morte de bactérias e de fungos promovida por componentes específicos presentes no mel. Já a ação indireta ocorre pela indução do organismo a uma resposta imunológica à infecção, pois a ingestão do mel também conduz a um efeito antibacteriano e cicatrizante pela redução dos níveis de

prostaglandinas e aumento dos níveis de óxido nítrico (NO). Além disso, o mel promove efeitos prebióticos (AL-WAILI *et al*., 2011).

Os fatores antimicrobianos que compõem o mel promovem vários efeitos tóxicos nos microrganismos que afetam diretamente o seu metabolismo e a sua estrutura celular. Dentre os fatores que contribuem para a ação antimicrobiana do mel estão a baixa atividade de água (A_w), a alta pressão osmótica, o baixo pH, a acidez, a atividade enzimática da glicose-oxidase que resulta na formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), a alta taxa carbono/nitrogênio, o baixo potencial redox relacionado ao alto conteúdo de açúcares redutores, o baixo conteúdo de proteínas, a presença de derivados fitoquímicos, como flavonoides, ácidos fenólicos e substâncias voláteis (AL-WAILI *et al*., 2011; CUSHNIE; LAMB, 2005; WESTON, 2000; MOLAN, 1996; WHITE JÚNIOR, 1979; HOOPER, 1976).

A atividade antimicrobiana do mel é devida, principalmente, ao H_2O_2 produzido enzimaticamente. No entanto, no mel não diluído, a acidez também é um significativo fator antimicrobiano. Adicionalmente, o pH variando de 3,2 a 4,5 é baixo suficiente para a inibição do desenvolvimento de patógenos, cujos valores de pH ótimos variam entre 7,2 e 7,4 (SATO; MIYATA, 2000; MOLAN, 1996; HOOPER, 1976). O H_2O_2 pode ser transformado por componentes do mel, na reação com ácido ascórbico e íons metálicos e pela ação da enzima catalase, originária do pólen e do néctar. Por meio de testes, com a degradação do H_2O_2 pela catalase, pode-se evidenciar a presença de outros fatores antimicrobianos no mel, como os derivados fitoquímicos (MOLAN, 1996).

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

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

Emsen (2007) testou o uso tópico do mel esterilizado, com a finalidade de fixação rápida de enxertos de pele. Foram submetidos ao tratamento 11 pacientes com lesões de diferentes etiologias. A utilização do mel foi efetiva na fixação dos enxertos, devido às suas propriedades terapêuticas. Não foram observadas complicações, como infecções, perda ou rejeição do enxerto. As maiores vantagens desse procedimento foram a recuperação rápida do paciente, a fácil aplicação e o baixo custo da terapia.

2.1.3.2 Ação antioxidante

Diante da comprovação de efeitos deletérios sobre o fígado e marcada proliferação do retículo endoplasmático, entre outros efeitos causados por doses elevadas de antioxidantes sintéticos, como: butil-hidroxianisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT) e *t*-butil-hidroquinona (*t*-BHQ), iniciou-se o interesse pelo uso de antioxidantes naturais (DURÁN; PADILLA, 1993). Como consequência, foi dada ênfase à identificação e à purificação de novos compostos com atividade antioxidante provenientes de fontes biológicas.

Os compostos fenólicos formam um dos mais importantes grupos de substâncias vegetais antioxidantes, sendo amplamente distribuídos e compreendendo, pelo menos, 8.000 estruturas conhecidas (BRAVO, 1998). Esses compostos são responsáveis por exibir atividades antialérgica, antibacteriana, anticarcinogênica, anti-inflamatória, antiaterogênica, antitrombótica, além de estimular a modulação imune e promover efeito analgésico e ação vasodilatadora (GÓMEZ-CARAVACA *et al*., 2006; SILVA *et al*. 2004; PULIDO *et al*., 2000; MIDDLETON, 1998; COOK; SAMMON, 1996).

As evidências científicas permitem afirmar que a propriedade antioxidante das especiarias e de outros vegetais está relacionada, principalmente, com os seus compostos fenólicos. A maioria dos antioxidantes naturais é constituída por compostos fenólicos contendo grupos funcionais ativos na posição *orto*, com exceção dos tocoferois; enquanto que nos antioxidantes sintéticos, com exceção dos

galatos, esses grupos encontram-se na posição *para* (MADSEN; BERTELSEN; SKIBSTED, 1997; NAMIKI, 1990; POKORNÝ, 1991).

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

Nos estudos realizados sobre compostos fenólicos em mel, tem sido identificada a presença de flavonoides, como: miricetina, hesperetina, quercetina, luteolina, 8-metoxicanferol, canferol, apigenina, isorramnentina, pinocembrina, pinobanksina, crisina, galangina, tectocrisina e ácidos fenólicos, como: ácido elágico, ácido benzoico, ácido fenilacético, ácido mandélico, ácido *β*-fenilático, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico e ácido ferúlico, entre outros (ESCUREDO *et al*., 2012; ARRÁEZ-ROMÁN *et al*., 2006; SOLER *et al.*, 1995; FERRERES *et al.*, 1994). Além dos compostos fenólicos, os antioxidantes presentes no mel incluem enzimas, como: a catalase, a glicose-oxidase e a peroxidase e, ainda, substâncias não-enzimáticas, como: os ácidos orgânicos, os produtos da reação de Maillard, os aminoácidos, as proteínas, o α-tocoferol, o ácido ascórbico e os carotenoides (THE NATIONAL HONEY BOARD, 2003, apud MEDA *et al*., 2005).

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

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

Nagai *et al*. (2006) usaram diferentes modelos para avaliar o efeito antioxidante de alguns méis e produtos relacionados. As maiores capacidades de sequestro de superóxidos foram encontradas na própolis e na geleia real. Porém, os autores demonstraram que algumas amostras de mel tiveram maior habilidade em sequestrar o radical DPPH•, quando comparadas à geleia real e à própolis. Adicionalmente, os méis analisados apresentaram uma alta capacidade de inibição do radical hidroxila (acima de 77% de inibição).

Alvarez-Suarez *et al*. (2012) avaliaram a capacidade antioxidante de extratos fenólicos obtidos a partir de méis monoflorais cubanos em eritrócitos. Os resultados indicaram que os extratos foram capazes de inibir danos oxidativos nas hemácias, exibindo considerável atividade sequestrante de radicais livres e protegendo as células contra a hemólise e a peroxidação lipídica induzida por radicais livres. Além disso, houve redução do consumo de importantes enzimas intracelulares antioxidantes, como a superóxido dismutase e a glutationa reduzida. Os autores sugerem que esse fato pode ser devido à incorporação de flavonoides altamente lipossolúveis na membrana dos eritrócitos e à capacidade desses compostos em atravessá-la e atingir o citosol.

2.1.3.3 Ação anti-inflamatória

Apesar das doenças inflamatórias terem sua etiologia e fisiopatologia melhor elucidadas atualmente, as terapias clássicas utilizadas para tratá-las causam diversos efeitos colaterais indesejáveis (GOTTLIEB, 2005). Dessa forma, há uma

crescente busca de novos esquemas terapêuticos e de novas fontes de agentes anti-inflamatórios para o tratamento dessas alterações. O mel, por apresentar uma constituição complexa, rica em compostos bioativos, é uma importante fonte de busca de novas substâncias com ação anti-inflamatória.

Em um estudo realizado por Bilsel *et al*. (2002) foi comprovado que a ingestão de mel causou a diminuição da inflamação em um modelo experimental de colite inflamatória em ratos, sendo que a administração de mel foi tão eficaz como o tratamento com prednisolona no modelo estudado.

Al-Waili e Boni (2003) determinaram a ação anti-inflamatória em humanos, após a ingestão de 70 g de mel. Os efeitos foram observados pela concentração plasmática média de tromboxano B_2, a qual foi reduzida em 7, 34 e 35%, e a de prostaglandina E2 (PGE_2), que apresentou redução de 14, 10 e 19% em 1, 2 e 3 horas, respectivamente, após a ingestão de mel. O nível de prostaglandina F2-alfa ($PGF_{2\alpha}$) foi diminuído em 31% em 2 horas e em 14% em 3 horas, após a ingestão de mel. No décimo quinto dia, as concentrações plasmáticas de tromboxano B_2, PGE_2 e $PGF_{2\alpha}$ diminuíram em 48, 63 e 50%, respectivamente.

Em outro estudo foi demonstrado que o mel Gelam produzido na Malásia pela abelha *A. mellifera* é capaz de estimular as células de fibroblasto, ativar a epitelização e acelerar a cicatrização de feridas. Além disso, possui atividade contra bactérias, incluindo MRSA, bem como apresenta uma elevada capacidade antioxidante e sequestrante de radicais livres (ALJADI; KAMARUDDIN, 2004).

Kassim *et al*. (2010) investigaram os efeitos do mel Gelam e seus extratos sobre a inflamação em modelos animais. O edema de pata em ratos foi induzido com carragenina nos modelos de inflamação não imune e nociceptivo, e com lipopolissacárido (LPS) no modelo inflamatório imune. O mel e seus extratos foram capazes de inibir o edema e a dor, bem como apresentaram potentes atividades inibitórias contra NO e PGE_2 em ambos os modelos avaliados.

Outro estudo, realizado no Nepal, investigou as propriedades anti-inflamatórias do mel na mucosite induzida por radiação oral. Os autores concluíram que o mel aplicado topicamente na mucosa oral de pacientes submetidos à terapia de radiação parece fornecer um benefício considerável por limitar a severidade da inflamação (KHANAL; BALIGA; UPPAL, 2010).

2.2 MELIPONÍNEOS

Atualmente, cerca de 20.000 espécies de abelhas habitam os mais diversos tipos de ecossistemas. Diferente da maioria das abelhas, que possuem hábitos solitários, as abelhas sociais mostram vários níveis de organização social, ou seja, vivem em colônias que reúnem centenas a milhares de indivíduos (ALMEIDA-ANACLETO, 2007; PRONI, 2000).

Os meliponíneos possuem a característica de apresentarem um ferrão atrofiado, o qual não pode ser usado como meio de defesa. Por isso, são denominadas popularmente como abelhas sem ferrão ou *stingless bees*. São encontrados tipicamente nas regiões de clima tropical e em algumas regiões de clima temperado sub-tropical, até 30 graus de latitude norte e sul. Distribuem-se, portanto, na maior parte do território Latino-Americano, compreendendo desde o Rio Grande do Sul até o México, além de Austrália, Indonésia, Malásia, Índia e África. (PRONI, 2000).

Na classificação estabelecida por Silveira; Melo e Almeida (2002), baseada em estudos realizados por Roig-Alsina e Michener (1993), Alexander e Michener (1995), as abelhas indígenas sem ferrão encontram-se na superfamília Apoidea, família Apidae, sub-família Apinae, tribo Apini e sub-tribo Meliponina, que é representada por vários gêneros e centenas de espécies.

Antes da colonização das Américas pelos europeus, o uso dos produtos das abelhas sem ferrão e, em alguns casos, a sua criação, fazia parte dos costumes socioculturais, inclusive alimentares, medicinais, ritualísticos e comerciais de muitos povos indígenas. No Brasil, até o século XIX, o mel utilizado na alimentação pelos índios e a cera empregada na confecção de velas pelos padres jesuítas eram elaborados pelas abelhas sem ferrão (BALLIVIÁN, 2008).

O mel, o pólen, a própolis e a cera produzidos pelos meliponíneos têm sido utilizados pelos povos indígenas e habitantes de zonas rurais. Esses produtos são empregados no combate a diversos processos patológicos, como doenças do trato respiratório, infecções e inflamações. Entre esses povos, é comum também a prática da aplicação tópica do mel das abelhas sem ferrão para o tratamento de doenças oculares, como a catarata e a conjuntivite (VIT; MEDINA; ENRÍQUEZ, 2004; CORTOPASSI-LAURINO e GELLI, 1991; POSEY, 1987).

No Brasil, há, pelo menos, 192 espécies de abelhas sem ferrão. Entretanto, devido ao desmatamento, ao uso intensivo de agrotóxicos e, também, pela ação indiscriminada dos meleiros extrativistas, essas espécies estão seriamente ameaçadas de extinção (BALLIVIÁN, 2008).

2.3 MEL DE MELIPONÍNEOS

O mel produzido pelas abelhas sem ferrão possui características muito distintas quando comparado ao mel tradicional produzido pela abelha do gênero *Apis*. Além disso, o mel de meliponíneos é um produto que tem alcançado um alto valor de mercado em relação ao mel tradicional, apresentando uma demanda crescente de mercado. Entretanto, ainda existem poucas informações, na literatura nacional e internacional sobre a sua composição, considerando, particularmente, a diversidade de espécies existentes (ALMEIDA-MURADIAN; MATSUDA; BASTOS, 2007; SOUZA *et al.*, 2004a).

2.3.1 Qualidade física, química e microbiológica do mel de meliponíneos

Normalmente, o mel produzido por meliponíneos tem maior teor de umidade e, portanto, é mais factível à fermentação (BIJLSMA, 2006). A cor desse produto varia de quase transparente a âmbar escuro; o sabor e os níveis de açúcares dependem do paladar individual, da espécie produtora, da época em que foi produzido e coletado, da região de procedência e, principalmente, da origem floral (AZEREDO; AZEREDO; DAMASCENO, 1999). Trabalhos sobre a composição desses méis são excassos, considerando o número de espécies de meliponíneos existentes, e trazem dados sobre os parâmetros de qualidade usados para o mel de *Apis*, como o índice de diastase, teor de HMF, conteúdo de cinzas e teor de açúcares (SOUZA *et al.*, 2006; ALMEIDA-MURADIAN; BASTOS; MATSUDA, 2005; ALVES *et al*., 2005; MATSUDA; BASTOS; ALMEIDA-MURADIAN, 2005; BASTOS; SILVA, 2002; VIT *et al.*, 1998; VIT; PULCINI, 1996).

Em um estudo realizado por Evangelista-Rodrigues *et al*. (2005) foram avaliadas as características físicas e químicas de méis de abelhas *A. mellifera* e *M. scutellaris* produzidos em duas regiões no estado da Paraíba. Observou-se que o mel da abelha nativa apresentou um maior teor de umidade (25,25%), quando comparado ao apresentado pelo mel da abelha africanizada (18,76%). Essa característica do mel da abelha nativa pode acelerar o processo de fermentação, dificultando o seu armazenamento e, consequentemente, diminuindo a sua vida útil de prateleira. Adicionalmente, foi encontrado um menor índice de acidez no mel da abelha nativa (28,33 $mEq.kg^{-1}$) do que no mel da abelha africanizada, tanto oriundo do Brejo (35,00 $mEq.kg^{-1}$), como do Cariri (41,66 $mEq.kg^{-1}$). Esses resultados comprovaram a preferência do consumidor pelo sabor do mel de abelhas nativas, pois um menor teor de acidez está relacionado ao sabor mais suave desse produto.

Souza *et al*. (2006) compilaram dados de estudos sobre a composição de 152 amostras de mel de abelhas sem ferrão, realizados desde 1964. A origem entomológica do mel correspondeu a 17 espécies de Meliponini do Brasil, uma da Costa Rica, seis do México, 27 do Panamá, uma do Suriname, duas de Trinidade e Tobago e sete da Venezuela, sendo que a maioria das espécies pertenciam ao gênero *Melipona*. Os autores encontraram os seguintes resultados para os parâmetros físicos e químicos: umidade (19,9–41,9%), pH (3,15–4,66), acidez livre (5,9–109,0 $mEq.kg^{-1}$), cinzas (0,01–1,18%), atividade diastásica (0,9–23,0 na escala Göthe), condutividade elétrica (0,49–8,77 $mS.cm^{-1}$), HMF (0,4–78,4 $mg.kg^{-1}$), atividade da invertase (19,8–90,1 UI), nitrogênio (14,34–144,0 $mg.100g^{-1}$), açúcares redutores (58,0–75,7%) e sacarose (1,1–4,8%).

Almeida-Muradian, Matsuda e Bastos (2007) avaliaram os parâmetros físicos e químicos de quatro amostras coletadas na região amazônica do Brasil, produzidas por abelhas sem ferrão das espécies *Melipona compressipes manaosensis* Schwarz, 1932 e *Melipona seminigra merrillae* Cockerell, 1919. As análises foram realizadas empregando-se métodos oficiais e os valores médios encontrados para os parâmetros investigados foram: umidade, 30,13%; pH, 3,65; acidez, 24,57 $mEq.kg^{-1}$; atividade de água, 0,75; frutose, 31,91%; glicose, 29,30% e sacarose, 0,19%.

As características físicas e químicas de 33 amostras de mel produzido por espécies de *Melipona* colhidas no estado da Bahia foram analisadas por Souza *et al*. (2009). Os valores médios encontrados para os parâmetros físicos e químicos

investigados atenderam à maioria dos critérios estabelecidos pela regulamentação nacional e internacional, destinada à fiscalização do mel de *Apis*, com exceção da umidade que foi elevada para todas as amostras. Com relação ao conteúdo de açúcares redutores, os autores sugeriram que esse parâmetro fosse ajustado para o mel de meliponíneos, pois quase metade das amostras estava fora dos limites estabelecidos para esse critério de qualidade. Adicionalmente, não foi possível a determinação da atividade diastásica na totalidade das amostras, indicando que a utilização desse critério não seja o melhor recurso para a definição da deterioração do mel.

A necessidade de estabelecimento de um padrão de identidade e qualidade do mel de meliponíneos, a exemplo do que ocorre com o mel de *Apis*, conforme definido pelo *Codex Alimentarius* e pelas legislações de cada país, implica no conhecimento de sua composição. Dessa forma, faz-se necessário o estudo de diferentes méis para a sua padronização e consequente elaboração de uma legislação que contemple as suas características reais.

Nesse sentido, alguns autores sugerem uma padronização para o mel produzido pelas abelhas sem ferrão. Vit, Medina e Enríquez (2004) propõem parâmetros referentes ao controle de qualidade de méis para uso medicinal, elaborados por abelhas sem ferrão, provenientes da Guatemala, do México e da Venezuela. As normas foram elaboradas para méis produzidos por três gêneros de Meliponinae (*Melipona*, *Scaptotrigona* e *Trigona*), com base em estudo prévio que os diferenciou por meio de análise estatística multivariada, a partir de suas características físicas e químicas (VIT *et al*., 1998). Villas-Bôas e Malaspina (2005) também sugerem padrões físicos e químicos para o mel produzido por abelhas indígenas sem ferrão de todo o Brasil, considerando um levantamento bibliográfico de trabalhos publicados referentes a esse tema. Entretanto, esses autores não consideram a divisão entre gêneros para a sugestão de parâmetros, com a justificativa de que os trabalhos existentes no Brasil não dão subsídios para tal diferenciação. As propostas de padronização para os méis de meliponíneos anteriormente descrtitas estão sumarizadas na Tabela 02.

TABELA 02 – PROPOSTAS ESTABELECIDAS PARA A PADRONIZAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS DE MÉIS DE MELIPONÍNEOS

Parâmetro	**Especificações**			
	Vit, Medina e Enríquez (2004)			Villas-Bôas e Malaspina (2005)
	Melipona	*Scaptotrigona*	*Trigona*	Meliponinae
Umidade (%)	≤ 30	≤ 30	≤ 30	≤ 35
Açúcares redutores (%)	≥ 50	≥ 50	≥ 50	≥ 50
Sacarose (%)	≤ 6	≤ 2	≤ 6	≤ 6
*Sólidos insolúveis (%)	-	-	-	≤ 0,4
Minerais (%)	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,6
Acidez ($mEq.kg^{-1}$)	≤ 70	≤ 85	≤ 75	≤ 85
HMF ($mg.kg^{-1}$)	≤ 40	≤ 40	≤ 40	≤ 40
Índice de diastase (escala Göthe)	≥ 3	≥ 3	≥ 7	≥ 3

NOTA: *PARÂMETRO NÃO CONSIDERADO POR VIT, MEDINA E ENRÍQUEZ (2004)

Nas legislações nacionais e internacionais vigentes para o mel de *Apis*, não há a exigência da realização de análises microbiológicas para o mel. São estabelecidas, apenas, práticas de higiene durante a manipulação do produto (BRASIL, 2001, 2000; CODEX ALIMENTARIUS COMISSION, 2001; MERCOSUL, 1999). As análises microbiológicas eram exigidas pela Portaria nº 451, de 19 de setembro de 1997 (BRASIL, 1997), mas foi revogada pela Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001), que não inclui a análise microbiológica de mel. Embora não haja parâmetros microbiológicos para o mel, é importante ressaltar que esses conceitos precisam ser revistos, principalmente devido ao consumo desse produto por crianças, idosos e indivíduos doentes (MURATORI; SOUZA, 2002). Além disso, considerando a elevada umidade apresentada pelos méis elaborados pelas abelhas sem ferrão, o que favorece o desenvolvimento de microrganismos, as análises microbiológicas deveriam ser uma exigência para a avaliação desse produto.

Em um estudo realizado por Rosa *et al*. (2006), que avaliaram méis de *Melipona compressipes fasciculata* Smith, 1854 e de *A. mellifera* da baixada maranhense, foi constatado que 50% das amostras apresentaram contagem para bolores e leveduras acima de 100 Unidades Formadoras de Colônias por grama ($UFC.g^{-1}$), o que seria considerado inapto para o consumo humano direto, segundo preconizado na Portaria nº 451, de 19 de setembro de 1997 (BRASIL, 1997). Oliveira *et al*. (2005) registraram que 65% das 20 amostras de mel de *M. compressipes fasciculata* do estado do Maranhão seriam impróprias para o consumo, em

decorrência da contagem de bolores e leveduras, entretanto, não obtiveram nenhuma amostra positiva para a análise do grupo coliforme.

Almeida-Anacleto (2007), trabalhando com as seguintes espécies de meliponíneos, *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811, *Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier, 1836, *Nannotrigona testaceicornis* Lepeletier, 1836, *Frieseomelitta varia* Lepeletier, 1836 e *Tetragona clavipes* Fabricius, 1804 do município de Piracicaba, estado de São Paulo, encontrou em 64,5% das 31 amostras de mel analisadas contagem superior a 100 UFC.g^{-1} para fungos e leveduras, além de 2 amostras de *T. angustula* positivas para a presença de coliformes totais.

A tentativa de aplicar as normatizações nacionais e internacionais estabelecidas para o mel de *A. mellifera* podem gerar equívocos quanto à avaliação da qualidade do mel produzido por meliponíneos (SOUZA *et al*., 2009). Dessa forma, todos os estudos realizados reforçam a necessidade do desenvolvimento de um padrão próprio para os méis de abelhas sem ferrão, incluindo critérios microbiológicos.

2.3.2 Análise polínica do mel de meliponíneos

A análise melissopalinológica é um método capaz de avaliar o resultado da visita das abelhas às flores, identificando suas preferências por meio dos espectros polínicos das amostras de mel (FREITAS; BARTH; LUZ, 2010). Nesse sentido, alguns trabalhos têm sido dedicados à investigação das plantas visitadas pelas diferentes espécies de abelhas sem ferrão, com o objetivo de elucidar os hábitos alimentares dessas abelhas e identificar a origem botânica dos méis por elas produzidos.

Cortopassi-Laurino e Geli (1991) realizaram a análise polínica em 14 amostras de méis produzidos por seis espécies de meliponíneos em cinco estados do Brasil. Os tipos polínicos classificados como pólen dominante (acima de 45%) nos espectros polínicos foram representados pelos *taxa Borreria latifolia* (Aubl.) K. Schum., *Borreria verticillata* (L.) G. Mey., *Centella* , *Eucalyptus*, *Mimosa bimucronata* (DC.) Kuntze, *Mimosa taimbensis* Burkart, *Myrcia* e *Piptadenia*. Como pólen acessório (acima de 15 a 45%), foram encontrados os tipos polínicos pertencentes

aos seguintes *taxa*: *B. verticilata*, *Bougainvillea spectabilis* Willd., *Cassia*, *Datura* e *M. bimucronata*.

Roubik (2003) avaliou amostras do mel elaborado por *T. angustula* provenientes da Bolívia e do Peru. A partir da análise melissopalinológica, foram identificados de 15 a 52 tipos polínicos presentes nas amostras por colônia de abelha, sendo que os gêneros *Anacardium*, *Celtis*, *Machaerium* e *Spondias* foram comuns entre os méis avaliados.

Para elucidar os recursos alimentares utilizados pelas abelhas da espécie *Melipona mandacaia* Smith, 1863 foi analisado o espectro polínico do mel por elas produzido. A identificação das plantas visitadas foi realizada com base na análise dos tipos polínicos encontrados nas amostras de mel coletadas em 11 colônias localizadas no município de São Gabriel, em área de caatinga do estado da Bahia. Foram encontrados 26 tipos polínicos, sendo o tipo *Piptadenia rigida* (Fabaceae) considerado o dominante. Os tipos polínicos *Ricinus communis* (Euphorbiaceae), *Mimosa verrucosa* (Fabaceae) e *Mimosa arenosa* (Fabaceae) foram considerados como pertencentes à classe de pólen isolado importante. As famílias mais representativas nos espectros polínicos das amostras de mel foram Fabaceae, Euphorbiaceae, Asteraceae e Anacardiaceae (ALVES; CARVALHO; SOUSA, 2006).

Andrade *et al*. (2009) avaliaram o perfil polínico de 27 amostras produzidas por *M. scutellaris* provenientes de colônias instaladas em meliponário localizado em área de agricultura familiar no estado da Bahia. Um total de 43 tipos polínicos, pertencentes a 15 famílias de plantas, foi identificado. O perfil polínico do mel dessa região foi caracterizado por representantes das famílias Fabaceae, Myrtaceae e Solanaceae, com destaque para os tipos polínicos *Mimosa pudica*, *Mimosa quadrivalvis*, *Eucalyptus*, *Eugenia uniflora*, *Solanum* e *Solanum paniculatum*.

Guerrini *et al*. (2009), ao estudarem amostras de mel de abelhas sem ferrão (Meliponinae) da região amazônica do Equador, identificaram a presença de tipos polínicos pertencentes às famílias Aquifoliaceae (*Ilex* spp.), Burseraceae (*Protium* spp.), Combretaceae, Asteraceae, Cruciferae, Fabaceae (*Acacia* spp.), Malvaceae, Moraceae, Myrtaceae, Polygonaceae, Proteaceae, Rhamnaceae, Scrophulariaceae e Vitaceae (*Parthenocissus* spp.).

Em um trabalho conduzido por Freitas; Barth e Luz (2010), a vegetação nectarífera de importância para as abelhas Meliponinae foi investigada por meio da análise melissopalinológica de amostras de mel de várias regiões do Brasil e da

Venezuela. Foram analisadas 11 amostras de mel, sendo oito do Brasil e três da Venezuela. Os tipos polínicos que predominaram nas amostras coletadas no estado brasileiro do Amazonas foram pertencentes às famílias Burseraceae e Solanaceae. Na Paraíba, a família Fabaceae (tipo *Crotalaria*) teve destaque nos espectros polínicos e, em Santa Catarina, a presença de Rhamnaceae (tipo *Hovenia dulcis*) foi predominante. No estado venezuelano do Amazonas, as famílias que se apresentaram como pólen dominante nos espectros polínicos foram Caesalpiniaceae e Euphorbiaceae (tipo *Acalypha avensis*). No estado de Falcón, foi predominante a família Fabaceae (tipo *Crotalaria*). Os tipos polínicos significantes encontrados nas amostras de mel assinalaram as diferentes fontes tróficas visitadas pelas abelhas Meliponinae.

O espectro polínico do mel de *Melipona fasciculata* Smith, 1854 foi analisado por Martins e colaboradores (2011). A identificação das plantas visitadas por essa espécie foi realizada em 12 amostras de mel coletadas, mensalmente, em uma colônia localizada no município de Palmeirândia, na área da Baixada Ocidental Maranhense, Brasil. Foram encontrados 45 tipos polínicos, sendo *Pontederia parviflora* Alexander (Pontederiaceae), espécie mais frequente em todo o período de amostragem (38,6%), sendo determinada como pólen dominante nos meses de outubro (86%), junho (85%), julho (76%), agosto (49%) e setembro (51%) e como pólen acessório em dezembro, janeiro e março. *Mimosa caesalpiniifolia* Benth. (Fabaceae) foi a segunda espécie mais frequente (22,8%) sendo considerada como pólen dominante nos meses de novembro (46%), abril (74%) e maio (72%). A espécie *Myrcia eximia* DC. (Myrtaceae) foi classificada como pólen isolado importante. As famílias mais representativas no espectro polínico das amostras de mel foram Pontederiaceae e Fabaceae.

2.3.3 Potencial medicinal do mel de meliponíneos

O mel das abelhas sem ferrão tem sido utilizado popularmente como um alimento com finalidades medicinais, principalmente em zonas rurais e entre povos indígenas, que atribuem a ele propriedades terapêuticas específicas (CORTOPASSI-LAURINO; GELLI, 1991; POSEY, 1987). Quanto ao uso terapêutico do mel de abelhas sem ferrão, alguns trabalhos foram conduzidos a investigar esse

potencial medicinal, os quais são especialmente relacionados a investigações das suas propriedades antimicrobianas.

Nesse sentido, alguns trabalhos avaliaram o efeito antimicrobiano de méis produzidos por espécies de abelhas indígenas sem ferrão provenientes de diferentes países. Torres *et al*. (2004) evidenciaram a ação do mel de *Tetragonisca angustula* proveniente da Colômbia frente a bactérias Gram-positivas (*Bacillus brevis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis* e *Micrococcus luteus*) e Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas syringae*). Já os fungos *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* e *Trichoderma viride* não foram sensíveis ao tratamento com o mel da referida espécie. Garedew, Schmolz e Lamprecht (2004), ao investigarem a ação antibacteriana do mel de *Trigona* spp. proveniente da Etiópia, provaram que as duas amostras de mel testadas foram eficientes contra as mesmas cepas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Dardón e Enríquez (2008) comprovaram o efeito antimicrobiano de amostras de mel de nove espécies de meliponíneos da Guatemala contra diversas bactérias e leveduras. Irish *et al*. (2008) confirmaram o efeito do mel da abelha australiana *Trigona carbonaria* Smith, 1854 frente ao microrganismo *S. aureus*. Guerrini *et al*. (2009) demonstraram o potencial antibacteriano do mel de abelhas nativas do Equador frente a *Enterococcus faecalis*, *E*. *coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *S*. *aureus* subsp. *aureus*. Boorn *et al*. (2010) comprovaram que o mel de *T*. *carbonaria* apresentou um amplo espectro de atividade antibacteriana. Entretanto, a atividade contra *Candida* foi limitada.

No Brasil, a atividade antimicrobiana de méis produzidos por algumas espécies de abelhas indígenas sem ferrão foi também investigada. Cortopassi-Laurino e Gelli (1991) constataram que do total de ensaios de antibiose realizados com mel de meliponíneos, 50% dos microrganismos mostraram-se sensíveis. Miorin *et al*. (2003) comprovaram a atividade antibacteriana de amostras de mel e própolis produzidos por *T*. *angustula* diante de *S*. *aureus*. Gonçalves, Alves Filho e Menezes (2005) avaliaram a atividade antimicrobiana do mel da abelha *Nannotrigona testaceicornis*, sendo que os microrganismos *E*. *coli*, *Proteus* spp., *P*. *aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, bem como *Staphylococcus* spp. coagulase negativa, revelaram-se sensíveis frente à ação do mel estudado. Entretanto, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *S*. *aureus* e *Streptococcus α*–hemolítico mostraram-se resistentes à ação do produto. Alves *et al*. (2008) comprovaram que o uso tópico de mel de *M. subnitida* em feridas infectadas da pele

de ratos estimulou a resposta imunológica, reduziu significativamente a infecção por bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, bem como o tempo de cicatrização.

2.4 POLINIZAÇÃO

O valor dos serviços prestados ao homem gratuitamente pelos recursos naturais, tais como a polinização de plantas realizada por insetos, morcegos e pássaros, a manutenção da fertilidade do solo, a regulação do clima, a fotossíntese, o controle natural de pragas, o fornecimento de bens do ecossistema, entre outros, foi estimado por Costanza *et al*. (1997) equivalerem a US$ 33 trilhões anuais.

A polinização mediada por insetos, ou seja, a transferência de pólen dentre as flores via insetos vetores é um serviço de ecossistema que promove uma série de benefícios diretos e indiretos à população humana (FISHER *et al*., 2009).

Estima-se que a polinização entomófila é responsável por 35% da produção mundial de culturas agrícolas e beneficia os rendimentos de 75% das espécies cultiváveis de importância global (KLEIN *et al*., 2007). A natureza e a extensão desses benefícios podem variar entre os diferentes cultivos agrícolas, incluindo desde o aumento da quantidade e qualidade dos frutos e sementes produzidas até o aceleramento do desenvolvimento das culturas e o aumento da diversidade genética dentro das espécies cultivadas (HAJJAR *et al.*, 2008; FREE, 1993).

Recentemente, o valor dos serviços de polinização prestados pelos insetos para os cultivos agrícolas foi estimado equivaler a aproximadamente US$ 184 bilhões ao ano globalmente (GALLAI *et al*., 2009). Esses serviços também são essenciais para a propagação de numerosas espécies de plantas silvestres (OLLERTON *et al*., 2011), muitas das quais contribuem indiretamente para o bem-estar humano, como componentes importantes da paisagem (WILLIS; GARROD, 1993).

No entanto, a importância da polinização e sua real dimensão para a vida em nosso planeta é quase sempre ofuscada por definições de caráter acadêmico e pouco assimiláveis ao público, e ainda pela baixa compreensão de como ela ocorre e de suas consequências nos ecossistemas silvestres e agrícolas (FREITAS; IMPERATRIZ-FONSECA, 2005).

Além da produção de mel e de outros produtos de interesse comercial, as abelhas desempenham uma função ambiental relevante, pois dentre todos os polinizadores, elas ocupam posição de destaque, pois dependem das visitas às flores para a obtenção de pólen e de néctar. Já a maioria dos outros polinizadores visita as flores somente para satisfazer suas necessidades imediatas, geralmente não as tendo como única fonte de alimento. De um modo geral, as abelhas alimentam-se quase que exclusivamente de pólen e de néctar. Dessa forma, precisam visitar grandes quantidades de flores para atenderem suas necessidades nutricionais individuais, das crias e da colônia. Essa característica faz com que as abelhas sejam os principais polinizadores das plantas (FREE, 1993; CORBET; WILLIAMS; OSBORNE, 1991).

As mais de 20 mil espécies de abelhas polinizam a floração de, no mínimo, 90 culturas, tais como abacate, abóbora, aipo, aspargo, brócolis, cereja, kiwi, laranja, limão, maçã, melão, milho, morango, nozes, pepino, pêssego, soja, entre outras. Estima-se que a maioria das espécies vegetais cultivadas no mundo (73%) seja polinizada por abelhas (FAO, 2004). Pesquisadores afirmam que cerca de um terço da dieta humana provém de plantas polinizadas por insetos, sendo que as abelhas são responsáveis por 80% da polinização (CORTEZ, 2008).

Nas regiões tropicais, as abelhas sociais (Meliponina, Bombina e Apina) estão entre os visitantes florais mais abundantes (BAWA, 1990; HEITHAUS, 1979). Os meliponíneos (Meliponina) formam o mais diversificado grupo de abelhas sociais tropicais. Apresentam um nível de organização social comparável ao da espécie *A. mellifera*, sendo que suas colmeias são perenes e constituídas por uma única rainha e milhares de operárias (BROSI, 2009).

As abelhas sem ferrão são responsáveis pela polinização de mais de 60 culturas tropicais, sendo os polinizadores silvestres primários da cultura do café (RICKETTS, 2004; KLEIN; STEFFAN-DEWENTER; TSCHARNTKE, 2003) e contribuem para a polinização eficaz de cultivos como abacate, morango, pepino, pimentão, tomate e rambotã (SLAA *et al.*, 2006). Também participam da polinização de culturas como carambola, chuchu, coco, macadâmia, manga e urucum (HEARD, 1999), entre outras. Os serviços de polinização mediados pelos meliponíneos contribuem com bilhões de dólares para as economias tropicais ao ano (KLEIN *et al*., 2007).

No Brasil, as abelhas indígenas sem ferrão são responsáveis pela polinização de 40 a 90% das árvores das florestas brasileiras, enquanto que outros animais como morcegos, aves, borboletas e alguns mamíferos desempenham o papel polinizador restante (KERR; CARVALHO; NASCIMENTO, 1996). Segundo Kerr (1997), as espécies de meliponíneos são responsáveis pela polinização de plantas nativas fanerógamas, correspondendo a 30% das espécies da caatinga e do pantanal, e de até 90% das espécies em remanescentes de Floresta Atlântica, na Serra do Mar.

Os meliponíneos podem desempenhar uma função estratégica na reconstituição de florestas tropicais e na preservação da natureza. Dependendo da espécie e do tamanho corporal, essas abelhas conseguem alcançar uma distância de voo de 600 a 2.400 metros. Estudos constataram a predominância desses insetos nas copas das árvores mais altas e mais antigas de florestas, indicando a sua importância para a reconstituição da floresta primária. Por outro lado, as abelhas africanizadas dificilmente são encontradas no interior de florestas densas, apresentando-se somente em áreas desmatadas. Desse modo, devido ao papel ecológico que desempenham, promovendo uma comunicação entre os fragmentos remanescentes de florestas, os meliponíneos são úteis em projetos de preservação ambiental (BALLIVIÁN, 2008).

No entanto, devido à redução das fontes de alimento e locais de nidificação, ocupação intensiva das terras e uso de defensivos agrícolas, as populações de abelhas silvestres têm sido reduzidas drasticamente, colocando em risco todo o bioma em que vivem (FREITAS *et al*., 2009). Dessa forma, a preservação das florestas nativas é dependente da preservação dos meliponíneos.

Geralmente, as abelhas não costumam se apresentar em número suficiente para polinizar extensas culturas agrícolas. Dessa forma, os produtores transportam grandes colônias de abelhas para os locais das culturas para facilitar a polinização (SHARPE; HEYDEN, 2009). Além da espécie *A. mellifera*, várias outras espécies de abelha, como a *Bombus terrestris* (mamangava), estão sendo manejadas com finalidade comercial para a polinização agrícola em grande escala (DELAPLANE; MAYER, 2000).

No entanto, ao longo dos últimos anos, muitos apicultores de países da América do Norte, Europa e Oriente Médio observaram um colapso generalizado de suas colônias de abelhas *Apis*. A causa do problema ainda é desconhecida, razão

pela qual está sendo descrito como *Colony Collapse Disorder* (CCD) (WATANABE, 2008).

Os pesquisadores ainda não identificaram a causa exata da CCD, mas muitos acreditam que, pelo menos em parte, esteja associada a pesticidas. A morte maciça de abelhas pode ser resultado da combinação de uma variedade de fatores, incluindo possivelmente poluição ambiental, doenças ocasionadas por ácaros e vírus, além de práticas agrícolas inadequadas, principalmente relacionadas ao uso abusivo de produtos fitossanitários tóxicos e ao cultivo de monoculturas (CORTEZ, 2008; OLDROYD, 2007). Como consequência da CCD, ocorre uma ameaça à produção de alimentos, potencializando os crescentes riscos de uma crise alimentar global. Além disso, a possível morte dos insetos polinizadores causada pelos pesticidas destaca a preocupação sobre a intensiva utilização de agrotóxicos, comprometendo a qualidade de nossa alimentação. Dessa forma, a segurança alimentar está ameaçada e a crise alimentar pode adquirir contornos ainda mais trágicos com a morte contínua de colônias de abelhas, pois a falta desse pequeno inseto polinizador pode acarretar efeitos devastadores na produção agrícola (CORTEZ, 2008).

Quanto ao incremento da produtividade agrícola, no Brasil, os serviços de polinização entomófila não têm sido valorizados e estudados suficientemente, dando-se maior ênfase a novas variedades de plantas, novos agrotóxicos, novas técnicas de cultivo e ao equilíbrio ecológico isoladamente, como se o aumento da produção não interagisse com o processo de polinização das plantas. Apenas duas culturas de maior expressão econômica estão associadas de forma intencional ao uso de polinizadores em larga escala no país, sendo a maçã na região Sul, especialmente em Santa Catarina, e o melão na região Nordeste, particularmente nos estados do Ceará e do Rio Grande do Norte. Enquanto isso, produtores em outros países que já dominam a introdução e o manejo de polinizadores em áreas agrícolas, investem hoje no manejo de paisagens, procurando tornar suas propriedades mais adequadas para atrair e desenvolver populações de polinizadores naturais ou espontâneos (FREITAS; IMPERATRIZ-FONSECA, 2005).

Portanto, são necessários estudos aprofundados sobre os diversos polinizadores presentes na fauna brasileira, bem como sobre a resposta econômica das diversas culturas à polinização entomófila, dado o potencial de incremento na geração de dividendos ao setor agrícola, com consequente melhoria das condições

de vida e de acesso à alimentação, beneficiando a população em geral (FLORES; TRINDADE, 2007). Além disso, o desenvolvimento de métodos de conservação, manejo ou introdução de polinizadores em áreas silvestres pode garantir a preservação da vida vegetal e também a manutenção da variabilidade genética.

Em síntese, as abelhas são elementos importantíssimos tanto para o homem quanto para o meio ambiente pois, além do valor comercial de seus produtos, elas desenvolvem a polinização, que contribui para o aumento da produção de frutos e sementes de diversos vegetais de interesse agroflorestal (JANSEN, 1980; WIESE, 1986; FREE, 1993). Os representantes Apidae constituem a base das cadeias tróficas, mantendo um fluxo de energia para as demais espécies animais, incluindo o homem. Dessa forma, a sobrevivência das espécies depende da manutenção dos recursos genéticos das plantas nativas e cultivadas, principalmente no que se refere ao aumento da população humana que requer, como necessidade primária, o incremento na produção de alimentos (PRONI, 2000).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os parâmetros físicos e químicos, a origem floral e as atividades biológicas de méis elaborados por diversas espécies de meliponíneos provenientes de diferentes regiões do estado do Paraná (Brasil).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar os parâmetros físicos e químicos de qualidade dos méis;
- Identificar os tipos polínicos e a origem botânica dos méis;
- Obter os extratos fenólicos dos méis;
- Quantificar os compostos fenólicos totais nos extratos fenólicos obtidos a partir dos méis;
- Pesquisar a atividade antioxidante dos méis *in natura* e de seus extratos fenólicos;
- Investigar a atividade antimicrobiana dos méis *in natura* e de seus extratos fenólicos frente aos microrganismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*;
- Determinar a composição química e investigar a atividade anti-inflamatória *in vivo* do extrato fenólico do mel elaborado pela espécie *Melipona marginata* Lepeletier, 1836.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Amostras de méis de meliponíneos

Foram analisadas 21 amostras de mel de oito espécies de meliponíneos, obtidas em diferentes municípios do estado do Paraná, entre os anos de 2009, 2010 e 2011, conforme detalhado na Tabela 03. As amostras foram coletadas em volume de 350 mL, *in natura*, acondicionadas em frascos de vidro âmbar e armazenadas sob refrigeração (4 – 8ºC) durante todo o período de estudo.

TABELA 03 – IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE MEL, SEGUNDO A ORIGEM ENTOMOLÓGICA, O MUNICÍPIO DE PROCEDÊNCIA E A DATA DA COLETA

Amostra	Origem entomológica	Nome popular	Procedência	Data da coleta
1	*Melipona bicolor* Lepeletier, 1836	Guaraipo	Curitiba	03/09/2009
2	*Melipona bicolor* Lepeletier, 1836	Guaraipo	Curitiba	25/03/2010
3	*Melipona bicolor* Lepeletier, 1836	Guaraipo	Guaraqueçaba	20/03/2010
4	*Melipona bicolor* Lepeletier, 1836	Guaraipo	Guaraqueçaba	25/02/2011
5	*Melipona marginata* Lepeletier, 1836	Manduri	Curitiba	03/09/2009
6	*Melipona marginata* Lepeletier, 1836	Manduri	Boa Esperança do Iguaçu	02/02/2011
7	*Melipona marginata* Lepeletier, 1836	Manduri	Guaraqueçaba	25/02/2011
8	*Melipona quadrifasciata* Lepeletier, 1836	Mandaçaia	Curitiba	03/09/2009
9	*Melipona quadrifasciata* Lepeletier, 1836	Mandaçaia	Guaraqueçaba	20/03/2010
10	*Melipona quadrifasciata* Lepeletier, 1836	Mandaçaia	Guaraqueçaba	25/02/2011
11	*Melipona quadrifasciata* Lepeletier, 1836	Mandaçaia	Boa Esperança do Iguaçu	02/02/2011
12	*Melipona rufiventris* Lepeletier, 1836	Tujuba	Guaraqueçaba	25/02/2011
13	*Melipona rufiventris* Lepeletier, 1836	Tujuba	Guaraqueçaba	20/03/2010
14	*Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier, 1836	Tubuna	Mandirituba	04/03/2011
15	*Scaptotrigona xantotricha* Moure, 1950	Tujumirim	Guaraqueçaba	25/02/2011
16	*Tetragona clavipes* Fabricius, 1804	Borá	Boa Esperança do Iguaçu	15/03/2010
17	*Tetragona clavipes* Fabricius, 1804	Borá	Boa Esperança do Iguaçu	10/02/2011
18	*Tetragona clavipes* Fabricius, 1804	Borá	Cornélio Procópio	15/02/2011
19	*Tetragona clavipes* Fabricius, 1804	Borá	Guaraqueçaba	25/02/2011
20	*Tetragonisca angustula* Latreille, 1811	Jataí	Boa Esperança do Iguaçu	02/02/2011
21	*Tetragonisca angustula* Latreille, 1811	Jataí	Guaraqueçaba	03/02/2010

4.1.2 Equipamentos

- Balança (Shimadzu, Quioto, Japão)
- Bomba de vácuo (Prismatec, 131B, Itu, Brasil)
- Espectrofluorofotômetro (CytoFluor, Shimadzu RF-5000U, Quioto, Japão);

- Espectrofotômetro UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, Genesys 10 UV Scanning, Madison, Estados Unidos);
- Estufa (Quimis, Q-136M4, Diadema, Brasil);
- Estufa (Odontobras, EL 1.4, Araraquara, Brasil)
- Forno mufla (Jung, 2310, Blumenau, Brasil);
- LC-Agilent 1100 equipado com desgaseificador (G1322A), bomba quaternária (G1311A), amostrador automático (G1313A), compartimento de coluna (G1316A) e detector de UV (G1314A) (Agilent Technologies, Santa Clara, Estados Unidos);
- LC/MSD Trap (G2445), equipado com uma interface API-electrospray (Agilent Technologies, Santa Clara, Estados Unidos);
- Leitor de microplacas (Bio-TeK Instruments Inc., EL808, Winooski, VT, Estados Unidos);
- Leitor de microplacas (Molecular Devices, SpectraMax 190, Sunnyvale, Estados Unidos);
- Liofilizador (Terroni, LD-1500, São Carlos, Brasil);
- Micrômetro digital (Shangai Metal Great Tools Co., MT-045B, Shangai, China);
- Microscópio (OLYMPUS, BX 50, Center Valley, Pensilvânia, Estados Unidos);
- Potenciômetro (Hanna Instruments, HI 8424, Estados Unidos);
- Redutec (Tecnal Laboratory Equipment Ltda., TE 086, Piracicaba, Brasil);
- Refratômetro de bancada Abbe (Scientific Instruments & Optical Sales, WY1A, Queensland, Australia);
- Rotaevaporador (Quimis, QE3444B2, Diadema, Brasil)

4.1.3 Fármacos, reagentes e solventes

- Acetato de dexametasona (Sigma-Aldrich, Estados Unidos);
- Acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos);
- Acetato de sódio P.A. (Vetec, Brasil);
- Acetato de zinco di-hidratado P.A. [$Zn(CH_3COO)_2.2H_2O$] (Synth, Brasil);
- Acetona P.A. (Vetec, Brasil);

- Ácido acético glacial P.A. (Vetec, Brasil);
- Ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, Estados Unidos);
- Ácido clorídrico (HCl) 37% (Synth, Brasil);
- Ácido fórmico grau HPLC (EMD Chemicals Inc., Alemanha);
- Ácido fosfórico P.A. (Vetec, Brasil);
- Ácido gálico (Sigma-Aldrich, Estados Unidos);
- Água deionizada;
- Amberlite XAD-2 (Supelco Analytical, Estados Unidos)
- Amido solúvel P.A. (Synth, Brasil);
- Bissulfito de sódio P.A. ($NaHSO_3$) (Synth, Brasil);
- Caldo Müeller-Hinton (Himedia, Índia);
- Carbonato de sódio anidro P. A. (Na_2CO_3) (Vetec, Brasil);
- Cloreto de sódio P.A. (Vetec, Brasil);
- Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DSFA-DA) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos);
- Dimetilformamida P.A. (Vetec, Brasil);
- Dimetilsufóxido (DMSO) P.A. (Vetec, Brasil);
- 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos);
- Etanol P.A. (99,8% de pureza, Synth, Brasil);
- Fenol P.A. (Synth, Brasil);
- Fenolftaleina Alcoólica 1% (Synth, Brasil);
- Ferrocianeto de potássio tri-hidratado P.A. [$K_4Fe(CN_6).3H_2O$] (Synth, Brasil);
- Folin-Ciocalteu (reagente de fenol) (Biotec, Brasil);
- Formaldeído (Merck, Alemanha);
- Fosfato de sódio dibásico anidro P.A. (Synth, Brasil);
- Fosfato de sódio monobásico anidro P.A. (Vetec, Brasil);
- Frutose P.A. (Synth, Brasil);
- Gelatina em pó (Synth, Brasil);
- Glicerina P.A. (Merck, Alemanha);
- Glicose anidra (Synth, Brasil);
- Hexadeciltrimetilamônio (HTAB) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos);

- Hidróxido de sódio P.A. (NaOH) (Biotec, Brasil);
- Iodeto de potássio P.A. (KI) (Synth, Brasil);
- Iodo (Merck, Alemanha);
- Metanol (99,8% de pureza, Vetec, Brasil);
- Metanol grau HPLC (EMD Chemicals Inc., Alemanha);
- Parafina (Synth, Brasil);
- Peróxido de hidrogênio P.A. (Vetec, Brasil);
- Persulfato de potássio P.A. (Merck, Alemanha);
- Rutina (Sigma-Aldrich, Estados Unidos);
- Sulfato de cobre penta-hidratado ($CuSO_4.5H_2O$) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos);
- Tartarato duplo de sódio e potássio ($C_4H_4KNaO_6.4H_2O$) (Merck, Alemanha);
- Tetrametilbenzidina (TMB) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos).
- 1,1-difenil-2-2picril-hidrazila (DPPH) (Sigma-Aldrich, Estados Unidos);

4.2 MÉTODOS

Em cada amostra de mel, foram realizadas as análises físicas e químicas, a caracterização polínica e a investigação das atividades biológicas. Somente a amostra de mel proveniente da espécie *Melipona marginata* Lepeletier, 1836 (amostra 5), produzida no município de Curitiba (PR), foi submetida à determinação da composição fenólica e à avaliação da atividade anti-inflamatória *in vivo*. Essa amostra foi selecionada para esses estudos devido a sua origem monofloral, a partir de *M. scabrella,* uma espécie de alto valor apícola, comumente encontrada no Paraná (BRATH, 1989).

4.2.1 Análises físicas e químicas

Os critérios físicos e químicos avaliados compreenderam a umidade, os açúcares redutores, a sacarose, os sólidos insolúveis, as cinzas, o pH, a acidez, o

índice de diastase, o teor de HMF e a cor, a partir dos métodos citados na Tabela 04.

TABELA 04 – MÉTODOS UTILIZADOS PARA A DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS EM MÉIS

Parâmetro Analisado	**Método**	**Referência**
Umidade	Refratometria	AOAC, 2000
Açúcares redutores	Titulometria de Lane-Eynon	BOGDANOV; MARTIN; LÜLLMANN, 1997
Sacarose	Titulometria de Lane-Eynon	BOGDANOV; MARTIN; LÜLLMANN, 1997
Sólidos insolúveis	Gravimetria	BOGDANOV; MARTIN; LÜLLMANN, 1997
Cinzas	Gravimetria	BORSATO *et al*., 2010; VARGAS, 2006
pH e acidez	Potenciometria e Titulometria	BOGDANOV; MARTIN; LÜLLMANN, 1997; KOMATSU, 1996
Índice de diastase	Método de Malaspina	SANTOS; MALASPINA; PALMA, 2003
HMF	Espectrofotometria	AOAC, 2000
Cor	Método de Bianchi	BIANCHI, 1981

4.2.1.1 Umidade

A determinação da umidade das amostras foi realizada pelo método refratométrico (AOAC, 2000), empregando um refratômetro de bancada Abbe, modelo WY1A. De forma sintética, 200 μLde cada amostra de mel foi colocada no dispositivo refrator do equipamento, que foi fechado e, após o ajuste do ângulo limite, a leitura do índice de refração (IR) foi feita diretamente na escala.

A medida refratométrica fornece o teor de substância seca em todos os casos em que se trate de soluções açucaradas puras. Quando a solução açucarada tem misturas com outras substâncias, como é o caso do mel ou sucos de frutas, o valor encontrado é geralmente muito próximo do total de substância seca (CECCHI, 2003). Assim, para a obtenção da umidade do mel, o valor do IR foi confrontado com uma tabela de correspondência entre IR e umidade do mel (Tabela 05). Esta tabela é derivada de uma equação desenvolvida por Wedmore, a partir dos dados de Chataway (BOGDANOV; MARTIN; LÜLLMANN, 1997).

Além disso, o IR das substâncias líquidas depende da temperatura. Geralmente, os refratômetros são regulados a 20ºC (CECCHI, 2003). Se o mel estiver exatamente a 20ºC, pode-se aplicar o IR obtido diretamente à Tabela 05. Porém, para leituras feitas em diferentes temperaturas, deve-se acrescentar ou

diminuir do IR obtido o valor de 0,00023, para cada grau Celsius a mais ou a menos, a depender da temperatura da amostra.

TABELA 05 – DETERMINAÇÃO DA UMIDADE DO MEL A PARTIR DA LEITURA DO ÍNDICE DE REFRAÇÃO

Índice de Refração (20ºC)	**Umidade (%)**	**Índice de Refração (20ºC)**	**Umidade (%)**	**Índice de Refração (20ºC)**	**Umidade (%)**
1,5044	13,0	1,494	17,0	1,4840	21,0
1,5038	13,2	1,4935	17,2	1,4835	21,2
1,5033	13,4	1,4930	17,4	1,4830	21,4
1,5028	13,6	1,4925	17,6	1,4825	21,6
1,5023	13,8	1,4920	17,8	1,4820	21,8
1,5018	14,0	1,4915	18,0	1,4815	22,0
1,5012	14,2	1,4910	18,2	1,4810	22,2
1,5007	14,4	1,4905	18,4	1,4805	22,4
1,5002	14,6	1,4900	18,6	1,4800	22,6
1,4997	14,8	1,4895	18,8	1,4795	22,8
1,4992	15,0	1,4890	19,0	1,4790	23,0
1,4987	15,2	1,4885	19,2	1,4785	23,2
1,4982	15,4	1,4880	19,4	1,4780	23,4
1,4976	15,6	1,4875	19,6	1,4775	23,6
1,4971	15,8	1,4870	19,8	1,4770	23,8
1,4966	16,0	1,4865	20,0	1,4765	24,0
1,4961	16,2	1,4860	20,2	1,4760	24,2
1,4956	16,4	1,4855	20,4	1,4755	24,4
1,4951	16,6	1,4850	20,6	1,4750	24,6
1,4946	16,8	1,4845	20,8	1,4745	24,8
				1,4740	25,0

FONTE: AOAC (2000); BOGDANOV; MARTIN; LÜLLMANN (1997).

Em caso de valores de IR não disponíveis na Tabela 05, por meio da análise gráfica e do cálculo do coeficiente angular e do coeficiente linear, é possível aplicar a equação y = 614,60 – 400.x, sendo y = umidade e x = IR.

4.2.1.2 Açúcares redutores e sacarose

4.2.1.2.1 Açúcares redutores

Para a quantificação de açúcares redutores foi utilizado o método titulométrico recomendado pela legislação brasileira (BRASIL, 2000) e descrito pela *European Honey Commission* (BOGDANOV; MARTIN; LÜLLMANN, 1997).

Trata-se do procedimento de Lane-Eynon, baseado na capacidade dos açúcares redutores, como glicose e frutose, reduzirem o cobre presente na solução cuproalcalina (Soluções de Fehling A + Fehling B, modificadas por Soxhlet), sob ebulição (CECCHI, 2003; BOGDANOV; MARTIN; LÜLLMANN, 1997; KOMATSU, 1996). Em meio alcalino, os íons cúpricos Cu^{2+} são reduzidos a cuprosos Cu^{+}, e os açúcares são oxidados a ácidos orgânicos (KOMATSU, 1996). A solução passa da cor azul a vermelho tijolo, e deve ficar constantemente em ebulição durante a titulação, porque o Cu_2O formado pode ser novamente oxidado pelo O_2 do ar, voltando a apresentar a cor azul. A titulação deve levar, no máximo, 3 minutos, porque pode haver decomposição dos açúcares com o aquecimento prolongado (CECCHI, 2003).

Inicialmente, 5,00 g de amostra foram dissolvidos em água deionizada até 25 mL, em balão volumétrico, obtendo-se a solução 1:5 (m/V). Dessa solução homogeneizada, foram transferidos 2 mL para um balão volumétrico de 100mL, completando o volume com água deionizada e homogeneizando para obter a solução 1:250 (V/V). A solução 1:5 (m/V) também foi reservada para a análise de sacarose.

A titulação foi realizada utilizando o aparelho de oxirredutimetria (Redutec, Tecnal, modelo TE 086). Foram adicionados no equipamento 5 mL da solução de Fehling A, 5 mL da solução de Fehling B e 40 mL de água deionizada. Uma bureta de 25 mL foi preenchida com a solução de mel 1:250. Após o início da ebulição das soluções de Fehling diluídas em água, foi iniciada a titulação, sendo liberados 5 mL da solução de açúcares. Com o reinício da ebulição, a solução aquosa de Fehling tornou-se avermelhada, mas ainda com muita presença da coloração azul (íons Cu^{2+}). A titulação foi reiniciada, dessa vez, gota a gota, observando a modificação da cor. Foi considerado o fim da reação quando a solução, contra a luz fluorescente,

não apresentou qualquer tonalidade ou reflexo azul, estando colorida por um vermelho tijolo intenso. A análise foi realizada em triplicata e as estimativas de desvio padrão (S) de cada amostra foram calculadas por meio da seguinte equação:

$$S = (\sum(x_i - x_m)^2 / (n-1))^{0,5}$$

Sendo:

x_i = resultado de cada replicata;

x_m = média dos resultados da triplicata;

n = número de repetições (n = 3).

As soluções de Fehling recomendadas para a análise de mel são modificadas e as concentrações de seus reagentes distinguem-se das soluções de Fehling utilizadas para outros alimentos (BOGDANOV; MARTIN; LÜLLMANN, 1997).

A solução de Fehling A foi preparada dissolvendo 69,28 g de sulfato de cobre penta-hidratado ($CuSO_4.5H_2O$ – MM = 249,71 $g.mol^{-1}$) em água deionizada para 1 L de solução, em balão volumétrico.

A solução de Fehling B foi preparada dissolvendo 346 g de tartarato duplo de sódio e potássio ($C_4H_4KNaO_6.4H_2O$) em cerca de 300 mL de água deionizada. À parte, em béquer plástico e em banho de gelo na capela, foram dissolvidos 100 g de hidróxido de sódio (NaOH) em cerca de 200 mL de água deionizada. As soluções de tartarato de sódio e potássio e hidróxido de sódio foram unidas em balão volumétrico de 1 L, homogeneizadas, e, após a completa reação, percebida pelo resfriamento e por cessarem as eliminações de bolhas, o volume do balão foi completado com água deionizada.

As soluções de Fehling A e B foram, então, armazenadas separadamente em frascos de vidro âmbar sob refrigeração por 48 horas, antes de serem padronizadas.

Para a padronização, foi utilizada uma solução 0,5% (m/V) de glicose. Para cada padronização, realizou-se um mínimo de quatro titulações, e a média dos valores obtidos foi aplicada na equação para obtenção do fator de correção (F) das soluções de Fehling:

$$F = (\%\ \text{da glicose}) \times (\text{média dos volumes gastos}) \times 0,01$$

Nas concentrações descritas para as soluções de Fehling, o fator de correção foi próximo a 0,025, valor recomendado pela literatura (BOGDANOV; MARTIN; LÜLLMANN, 1997).

Tendo-se o fator de correção, o cálculo da porcentagem de açúcares redutores (AR) foi realizado por meio da equação:

$$\% \text{ AR} = \frac{250 \text{ (diluição da solução de mel)} \times F \times 100}{\text{média dos volumes gastos na titulação}}$$

4.2.1.2.2 Sacarose

Considerando que a sacarose é um dissacarídeo não-redutor, constituído por duas moléculas de açúcares redutores (glicose e frutose), unidas por uma ligação glicosídica (NELSON; COX, 2008), após a hidrólise, é possível quantificar indiretamente a sacarose na solução analisada por meio da análise dos açúcares redutores formados.

A partir da solução 1:5 de mel preparada na análise de açúcares redutores, foram transferidos 2 mL para um béquer de vidro de 100 mL, na qual foram adicionados 40 mL de água deionizada e 1 mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado. Essa solução foi submetida ao aquecimento até a ebulição, resfriada, neutralizada com NaOH até pH 7 ± 0,2 e o seu volume foi completado com água deionizada até 100 mL, em balão volumétrico. Após a homogeneização, a solução de mel foi titulada com as soluções de Fehling, conforme descrito no item 4.2.1.2.1. A média dos volumes gastos em três titulações foi aplicada na equação, de maneira semelhante ao cálculo utilizado para a determinação dos açúcares redutores, e o resultado final foi expresso como porcentagem de açúcares totais (% AT):

$$\% \text{ AT} = \frac{250 \text{ (diluição da solução de mel)} \times F \times 100}{\text{média dos volumes gastos na titulação}}$$

Assim como para os açúcares redutores, as estimativas de desvio padrão (S) das amostras foram calculadas por meio da equação $S = (\sum(x_i - x_m)^2 / (n-1))^{0,5}$.

O aquecimento até a ebulição, em condições fortemente ácidas, promove a hidrólise da sacarose. Nesse processo, somam-se às moléculas de glicose e frutose os íons de uma molécula de água (H^+ OH^-) (NELSON; COX, 2008). Dessa forma, foi possível considerar que a massa molecular da sacarose (MM = 342 $g.mol^{-1}$) representou 95% das massas moleculares da glicose e da frutose juntas (MM = 360 $g.mol^{-1}$). Assim, a porcentagem de sacarose de uma amostra foi calculada pela seguinte equação:

$$\% \text{ sacarose} = (\% \text{ Açúcares totais} - \% \text{ Açúcares redutores}) \times 0,95$$

A mesma relação foi aplicada para o cálculo da estimativa de desvio padrão da sacarose: $S_{sacarose} = |S_{açúcares\ redutores} - S_{açúcares\ totais}| \times 0,95$.

4.2.1.3 Sólidos insolúveis

Para a quantificação dos sólidos insolúveis, foi utilizado o método gravimétrico com filtração em cadinhos porosos (BOGDANOV; MARTIN; LÜLLMANN, 1997).

As amostras diluídas em água na proporção 1:2, a 80ºC, foram transferidas para cadinhos porosos nº 3, previamente secos em estufa (Odontobras, EL 1.4, Araraquara, Brasil) a 105ºC por 12 horas e pesados. As amostras foram lavadas nos cadinhos, com água a 80ºC, até que o volume de cada filtrado atingisse 1 L. Os cadinhos foram novamente secos a 105ºC por 12 horas e pesados. Foram utilizadas amostras de mel de cerca de 5,00 g. As medidas foram realizadas em balança com precisão de ± 0,001 g.

O cálculo da porcentagem de sólidos insolúveis foi efetuado a partir da seguinte equação:

$$\text{Sólidos insolúveis (\%)} = [(M_2 - M_1)/ M_a] \times 100$$

Sendo:

M_2 = massa do cadinho contendo os sólidos, após dessecação em estufa e resfriamento em dessecador;

M_1 = massa do cadinho, após dessecação em estufa e resfriamento (tara do cadinho);

M_a = massa da amostra

100 = fator de porcentagem

4.2.1.4 Cinzas

As cinzas de um alimento é o resíduo inorgânico que permanece após a queima da matéria orgânica, que é transformada em CO_2, H_2O e NO_2 (CECCHI, 2003).

Foram adicionados 2,00 g de mel em cadinhos previamente calcinados a 550ºC em forno mufla (Jung, 2310, Blumenau, Brasil) por 1 hora. Inicialmente, os cadinhos foram levados à capela e as amostras foram carbonizadas em chama. Esse procedimento foi realizado para evitar que as amostras transbordassem do cadinho e que se acumulasse fuligem no interior da mufla. Em seguida, os cadinhos foram levados para a mufla, por 6 horas a 550ºC. Para evitar a quebra de cadinhos por choque térmico, antes de removê-los da mufla, foi aguardado o tempo necessário para a temperatura abaixar entre 100 e 200ºC. Após o resfriamento em dessecador, os cadinhos foram pesados e a porcentagem de cinzas da amostra foi calculada.

A porcentagem de cinzas foi obtida por meio da equação:

$$\text{Cinzas (\%)} = [(M_2 - M_1)/ M_a] \times 100$$

Sendo:

M_2 = massa do cadinho contendo a amostra, após calcinação e resfriamento em dessecador;

M_1 = massa do cadinho, após calcinação e resfriamento (tara do cadinho);

M_a = massa da amostra

100 = fator de porcentagem

Cada amostra de mel foi analisada em triplicata e foram calculadas as estimativas de desvio padrão (S).

4.2.1.5 pH e acidez

Para a medida do pH e da acidez das amostras de mel foram utilizadas as recomendações de Bogdanov, Martin e Lüllmann (1997).

Foram pesados 2,00 g de mel, os quais foram diluídos em água deionizada até o volume de 15 mL. O pH foi determinado com o auxílio de um potenciômetro (Hanna Instruments, modelo HI 8424) previamente calibrado. Essa mesma solução foi utilizada para a determinação da acidez, sendo que, para essa análise, foram adicionadas duas gotas de fenolftaleína 1%. A titulação foi executada com NaOH 0,05M em bureta de 10 mL, até o ponto de viragem, caracterizado pela coloração levemente rósea, que persistiu por dez segundos (KOMATSU, 1996).

Para o cálculo da acidez foi utilizada a equação:

$$\text{Acidez} = \frac{\text{Volume gasto (mL)} \times \text{Molaridade}_{(NaOH)} \times F_{(NaOH)} \times 1000}{\text{Massa de amostra (g)}}$$

Em razão da utilização de exatamente 2,00 g de amostra e NaOH a 0,05M, a equação anterior pode ser resumida em:

$$\text{Acidez} = \text{Volume gasto (mL)} \times F_{(NaOH)} \times 25, \text{ expressa em } mEq.kg^{-1}$$

As análises foram realizadas em triplicata e as estimativas de desvio padrão (S) de cada amostra foram calculadas por meio da equação $S = (\sum(x_i - x_m)^2 / (n-1))^{0,5}$.

A IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) recomenda a expressão dos dados em *molar*, ao invés de *equivalente-grama*. No caso da acidez no mel, com a utilização de NaOH (MM = 40 $g.mol^{-1}$) e a representação da acidez em ácido glucônico (PM = 196 $g.mol^{-1}$), os valores expressos em ambas as unidades são idênticos. Dessa forma, optou-se por representá-los no presente estudo em $mEq.kg^{-1}$, conforme recomenda a legislação brasileira e internacional (BRASIL, 2000; MERCOSUL, 1999; BOGDANOV; MARTIN; LÜLLMANN, 1997) e conforme tem sido expresso nos trabalhos científicos consultados.

4.2.1.6 Índice de diastase

O índice de diastase foi determinado segundo o método de Malaspina (SANTOS; MALASPINA; PALMA, 2003), desenvolvido no Laboratório do Centro de Estudos de Insetos Sociais da UNESP – Universidade Estadual Paulista, Campus de Rio Claro. O método é uma modificação do procedimento descrito por Bogdanov; Martin e Lüllmann (1997), e utiliza a leitura em espectrofotômetro da descoloração de uma solução de amido, iodo e mel em condições controladas. Quanto mais rápida a descoloração, maior a atividade diastásica da amostra, expressa em unidades da Escala Göthe ou Schade por grama de mel. A unidade Göthe é definida como a quantidade de enzima capaz de converter 0,01 g de amido em uma hora a 40ºC.

Para a execução do método, algumas soluções foram preparadas previamente:

- Tampão acetato a 0,1 M, pH 5,3, sendo conservado sob refrigeração;
- Solução de cloreto de sódio a 0,1 M;
- Solução de iodo a 0,02 M, dissolvido com auxílio de KI;
- Solução de amido a 1% (m/V). Essa solução foi aquecida até a ebulição, sob constante agitação e acrescida de água fria. Após o resfriamento, o seu volume foi completado em balão volumétrico. A solução foi preparada no momento do uso, não sendo armazenada para evitar contaminação.

De cada amostra de mel foram pesados 5,00 g. A essa massa, foram acrescentados cerca de 20 mL de água deionizada, sendo o pH corrigido a 5,3, com NaOH e o volume da solução completado até 50 mL.

O sistema de reação foi obtido da seguinte forma: em um tubo de ensaio foram adicionados 5 mL da solução de mel, 500 μL do tampão acetato a 0,1 M, 500 μL da solução de cloreto de sódio a 0,1 M, 150 μL da solução de iodo a 0,02 M e 9,6 mL de água deionizada. Esse sistema foi mantido em banho-maria a 40 ± 1ºC. Foi essencial que a solução de mel estivesse tamponada antes do contato com o cloreto de sódio, pois em pH abaixo de 4, a atividade diastásica poderia ser inibida (BOGDANOV; MARTIN; LÜLLMANN, 1997). Ao sistema reacional, foram adicionados, por fim, 250μL da solução de amido a 1% e um cronômetro foi disparado. A solução foi agitada até a completa homogeneização e a absorvância da solução foi medida em espectrofotômetro UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, Genesys 10 UV Scanning, Madison, Estados Unidos) na região do visível, a 660 nm, utilizando água como branco. Essa primeira leitura correspondeu ao valor da absorvância inicial (Abs_i), aplicada posteriormente na equação.

Foram realizadas leituras periódicas de absorvância, retornando sempre o tubo ao banho-maria, até se atingir um valor de leitura espectrofotométrica entre 0,240 e 0,200. No instante em que essa faixa foi atingida, a contagem do tempo no cronômetro foi interrompida imediatamente, sendo o tempo transcorrido registrado. O último valor de absorbância medido foi considerado correspondente à absorbância final (Abs_f). O índice de diastase foi calculado por meio da seguinte equação:

$$\text{Índice de diastase} = \frac{(Abs_i - Abs_f) \times 0{,}3}{t\,(h) \times V \times 0{,}016}$$

Sendo:

0,3 = constante de absortividade = 0,3 mg^{-1} (previamente determinado por meio do ensaio sem mel, dado pelo método);

t (h) = tempo, em hora, entre as medidas de Abs_i e Abs_f;

V = volume da solução de mel a 10% no tubo de ensaio (mL);

0,016 = volume total em litros da solução no tubo de ensaio (16 mL).

A análise foi realizada em triplicata e as estimativas de desvio padrão (S) de cada amostra foram calculadas a partir da equação $S = (\sum(x_i - x_m)^2 / (n-1))^{0,5}$.

4.2.1.7 HMF

Para a análise do conteúdo de HMF, foi utilizado o método espectrofotométrico recomendado pela AOAC (2000). Previamente, as seguintes soluções foram preparadas:

- Solução de Carrez I: 15 g de $K_4Fe(CN_6).3H_2O$ foram diluídos e o volume foi completado para 100 mL com água deionizada;
- Solução de Carrez II: 30 g de $Zn(CH_3COO)_2.2H_2O$ foram diluídos e o volume foi completado para 100 mL com água deionizada;
- Solução de bissulfito de sódio 0,2% (m/V).

Em um béquer, foram adicionados 5,00 g de mel e cerca de 25 mL de água deionizada, dissolvendo a amostra. Foram adicionados 500 μL da solução de Carrez I, homogeneizando, e mais 500 μL da solução de Carrez II, homogeneizando. Nesse momento, a solução se tornou turva e o volume foi completado para 100 mL. A suspensão foi então filtrada em papel, descartando-se os primeiros 10 mL filtrados.

Da solução filtrada, foram pipetados 5 mL em quatro tubos de ensaio. No primeiro, foram adicionados 5 mL da solução de bissulfito de sódio a 0,2%, sendo esse o tubo referência. Nos demais, foram adicionados 5 mL de água deionizada, sendo denominados de soluções teste.

As soluções foram homogeneizadas e medidas em espectrofotômetro UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, Genesys 10 UV Scanning, Madison, Estados Unidos) nos comprimentos de onda de 284 nm e 336 nm em cubeta de quartzo. Antes das medidas, em triplicata, o aparelho foi calibrado com a solução referência correspondente.

Em caso de leituras de absorvância superiores a 0,6, as soluções teste e referência foram diluídas na mesma proporção, repetindo-se a leitura.

O teor de HMF no mel, expresso em $mg.kg^{-1}$, foi calculado pela seguinte equação:

$$HMF = |Abs_{284} - Abs_{336}| \times F$$

Considerando-se F = 149,7, calculado por meio da equação:

$$F = \frac{126 \times 1000 \times 1000}{16830 \times 10 \times 5}$$, sendo:

126 = massa molar ou massa molecular do HMF;

16830 = absortividade molecular do HMF a 284 nm;

1000 = conversão de miligrama para grama;

10 = conversão de centilitro para litro;

1000 = conversão de grama para quilograma;

5 = massa de mel empregada.

As estimativas de desvio padrão (S) de cada amostra foram calculadas por meio da equação $S = (\sum(x_i - x_m)^2 / (n-1))^{0,5}$.

4.2.1.8 Cor

Para a determinação da cor no mel foi utilizado o método de Bianchi (1981), que consistiu na medida da absorbância a 635 nm (Abs_{635}) de uma solução a 50% (m/V) de mel em água deionizada. Após a diluição, a solução foi deixada em repouso por 10 a 15 minutos antes da leitura em espectrofotômetro UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, Genesys 10 UV Scanning, Madison, Estados Unidos) O aparelho foi previamente calibrado com água deionizada.

A cor foi expressa em mm Pfund, e calculada a partir da seguinte equação:

$$Cor = (371,39 \times Abs_{635}) - 38,70$$

A classificação foi baseada na escala de Pfund (Tabela 06).

TABELA 06 – CLASSIFICAÇÃO DO MEL CONFORME A COLORAÇÃO

Coloração do mel	**Pfund (mm)**	**Abs_{635} (nm)**
Branco-água	0 ≥ 8	0,104 ≥ 0,125
Extra-branco	> 8 e ≤ 16,5	> 0,125 e ≤ 0,148
Branco	> 16,5 e ≤ 34	> 0,148 e ≤ 0,195
Âmbar extra-claro	> 34 e ≤ 50	> 0,195 e ≤ 0,238
Âmbar claro	> 50 e ≤ 85	> 0,238 e ≤ 0,333
Âmbar	> 85 e ≤ 114	> 0,333 e ≤ 0,411
Âmbar escuro	> 114	> 0,411

4.2.2 Classificação em mel floral ou em mel de melato

Foi utilizada a Equação de Kirkwood, proposta por Kirkwood, Mitchell e Smith (1961, 1960), que relaciona os valores de pH, cinzas e açúcares redutores na matéria seca para classificar o mel, quanto a sua origem, em mel floral ou em de melato. Os autores estabelecem o valor limite de 73,1, abaixo do qual o mel deve ser classificado como mel de melato, ou como mistura de mel floral com mel de melato. É importante destacar que a legislação brasileira (BRASIL, 2000) estabelece especificações diferentes para mel floral e para mel de melato.

Equação de Kirkwood:

$$X = -8{,}3x_1 - 12{,}3x_2 + 1{,}43x_3$$

Sendo:

x_1 = pH;

x_2 = % de cinzas em matéria seca;

x_3 = % de açúcares redutores em matéria seca;

$X < 73{,}1$ = mel de melato.

4.2.3 Análise polínica

Para cada amostra de mel, foi retirada uma alíquota de 10 mL, sendo diluída em 20 mL de água destilada e centrifugada, durante 10 min a 2000 x g. O sobrenadante foi retirado e o sedimento disperso em 10 mL de água destilada,

sendo novamente centrifugado por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e, empregando um cubo de gelatina glicerinada de Kisser (BARTH, 1989) fixado na extremidade de um estilete, foi coletado o sedimento presente no fundo do tubo. Três lâminas de cada amostra foram montadas contendo o material polínico (LOUVEAUX, MAURIZIO; VORWOHL, 1970).

Os grãos de pólen preparados para exame em microscopia fotônica (ML) foram observados em microscópio óptico (Olympus, BX 50, Center Valley, Pensilvânia, Estados Unidos). A análise quantitativa foi realizada por meio da contagem sequencial de 100 grãos de pólen/repetição/amostra. A partir desse procedimento, foram determinadas as porcentagens e as classes de ocorrência que, segundo Louveaux, Maurizio e Vorwohl (1970), são as seguintes: pólen dominante (> 45% do total de grãos), pólen acessório (> 15 a 45%), pólen isolado importante (3 a 15%) e pólen isolado ocasional (< 3%).

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

4.2.4 Obtenção do extrato fenólico do mel (EFM)

Para a determinação do conteúdo de fenólicos totais e para a avaliação das atividades biológicas, foi obtido, inicialmente, o extrato fenólico de cada amostra de mel. O método de extração foi realizado de acordo com Ferreres *et al.* (1991), com modificações. Uma alíquota de 80 g de mel foi completamente misturada com 400 mL de água, sendo o pH corrigido a 2,0 com HCl concentrado 37%. A mistura foi filtrada para a remoção de partículas sólidas. O filtrado foi transferido para um béquer contendo 80 g de resina Amberlite® XAD-2 (Fluka Chemie; poro: 9 nm, partícula: 0,3-1,2 mm), permanecendo sob agitação por 15 minutos. O filtrado e a resina foram transferidos para uma coluna de vidro (25 x 2 cm). Dessa forma, os compostos fenólicos ficaram retidos na resina, enquanto os açúcares e os outros compostos polares foram eluídos com solvente aquoso. A coluna foi lavada com 100 mL de água acidificada e, em seguida, com 300 mL de água deionizada. Toda a fração fenólica foi, então, eluída com aproximadamente 300 mL de metanol, até que desapareceu a coloração da eluição, e concentrada em rotaevaporador (Quimis, QE3444B2, Diadema, Brasil), com temperatura controlada de até 60^{o}C e sob

pressão reduzida, produzida por uma bomba de vácuo (Prismatec, 131B, Itu, Brasil). Dessa forma, foi obtido o EFM, o qual foi submetido ao processo de liofilização em liofilizador (Terroni, LD-1500, São Carlos, Brasil).

4.2.5 Fenólicos totais

O conteúdo total de fenólicos no EFM foi determinado pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteau (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA, 1999). Esse método envolve a oxidação de fenólicos por um reagente amarelo heteropoliácido de fosfomolibdato e fosfotungstênio (reagente de Folin-Ciocalteau), com a medida colorimétrica do complexo azul Mo-W que se forma na reação em meio alcalino. Para a determinação de fenólicos totais, foram misturados 0,5 mL de EFM, a 500 μg.mL^{-1} em metanol, com 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteau, diluído a 1:10, e com 2,0 mL de Na_2CO_3 a 4% (m/V). A absorvância foi medida a 740 nm, em espectrofotômetro UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, Genesys 10 UV Scanning, Madison, Estados Unidos), depois de duas horas de incubação no escuro à temperatura ambiente. A quantidade total de fenólicos foi expressa como mg de equivalente em ácido gálico (EAG) por g de EFM.

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

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

Para a avaliação da atividade antioxidante, o EFM reagiu com o radical DPPH• em uma solução de etanol. Na forma de radical, o DPPH• possui uma coloração violeta intensa e uma absorção característica em espectrofotômetro, a 517 nm, a qual desaparece após a redução pelo hidrogênio retirado de um composto antioxidante. A mistura reacional foi constituída da adição de 0,5 mL do EFM, a 1000 μg.mL^{-1} em metanol, 3,0 mL de etanol e 0,3 mL da solução do radical DPPH•, a 0,5

mmol.L^{-1} em etanol. Adicionalmente, foi verificada a atividade antioxidante dos padrões ácido ascórbico, ácido gálico e rutina, a 1000 μg.mL^{-1} em etanol, frente ao radical DPPH•.

A atividade antioxidante (AA) foi determinada sob a forma de porcentagem, calculada por meio da taxa de declínio da absorvância, medida em espectrofotômetro UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, Genesys 10 UV Scanning, Madison, Estados Unidos), da solução etanólica de DPPH•-EFM, após 40 minutos de reação (fase estável), em relação à solução de referência (DPPH• em etanol), de acordo com a equação a seguir:

$$\% \text{ AA} = 100 - [(A_{amostra} - A_{branco} / A_{controle}) \times 100]$$

Na qual:

A = cada valor de absorvância.

4.2.7 Ensaio da descoloração do radical catiônico 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS•$^{+}$)

Resumidamente, soluções aquosas de ABTS (7 mmol.L^{-1}) e persulfato de potássio (2,45 mmol.L^{-1}) foram misturadas em uma proporção volumétrica de 1:1 e incubadas ao abrigo da luz, à temperatura ambiente por 12 horas, para a obtenção do radical catiônico ABTS•$^{+}$ (RE *et al*., 1999).

Em seguida, a solução de ABTS•$^{+}$ foi diluída em 50 mmol.L^{-1} de uma solução tampão de fosfato de sódio (pH = 7,4), para a obtenção de um valor de absorvância de ± 0,7 a 734 nm. A complexação entre o ABTS•$^{+}$ e os méis ou os EFMs foi medida pelo decréscimo da absorvância a 734 nm, após 30 minutos, em leitor de microplacas (Molecular Devices, SpectraMax 190, Sunnyvale, Estados Unidos). Todas as leituras foram realizadas em triplicata. A atividade antioxidante foi calculada pela seguinte equação:

$$\% \text{ Inibição} = [(A_b - A_a) / A_b] \times 100$$

Onde, A_b é a absorvância do controle positivo e A_a é a absorvância da amostra.

Os resultados foram expressos como concentração necessária do antioxidante para suprimir 50% do agente oxidante (IC_{50}).

4.2.8 Atividade antimicrobiana

4.2.8.1 Microrganismos e preparo do inóculo

Todos os ensaios foram realizados em triplicata, utilizando-se cepas provenientes da *American Type Culture Collection* (ATCC) de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 10530) e *Candida albicans* (ATCC 10231). O inóculo foi preparado pela suspensão das colônias em solução salina até a turbidez de uma solução padrão de McFarland de 0,5. A suspensão McFarland 0,5 (1×10^8 UFC.mL^{-1}) foi diluída 1:10 para se conseguir uma diluição de 10^7 UFC.mL^{-1}. Um volume de 5 μL dessa suspensão foi inoculado no caldo, sendo a concentração final de microrganismos do teste aproximadamente 5×10^4 UFC.poço^{-1} .

4.2.8.2 Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) pela técnica de microdiluição em caldo

Inicialmente, as amostras de mel foram diluídas a 50% no caldo Müeller-Hinton (CMH) para os testes com *S*. *aureus* e com *E*. *coli* e no caldo Müeller-Hinton com 2% de glicose (CMHG) para os ensaios com *C*. *albicans*. Os EFMs foram diluídos a 10 mg.mL^{-1} nesses mesmos meios de culturas. Todas as soluções resultantes foram filtradas por membrana 0,22 μm. Os filtrados foram armazenados em tubos estéreis a 4°C.

A determinação da concentração inibitória mínima dos méis e dos EFMs foi realizada segundo o método de microdiluição em caldo proposta pelo NCCLS (2003). Foram utilizadas microplacas com fundo em “U”, esterilizadas com 96 orifícios (TPP®, Estados Unidos). Um volume de 100 μL de cada mel a 50% foi

adicionado em um poço da microplaca. Em seguida, foi colocado 5 μL de cada inóculo microbiano. A mesma quantidade de inóculo foi também utilizada para as diluições seriadas de 25 a 1,56% dos méis de abelhas sem ferrão. Um procedimento similar foi empregado para os extratos, sendo que ao volume de 100 μL de cada EFM previamente adicionado em cada poço da microplaca, nas diluições seriadas de 10 a 0,3125 $mg.mL^{-1}$, foi acrescido 5 μL de cada inóculo microbiano. Além disso, com o propósito de estabelecer uma análise comparativa, foi avaliada a atividade antimicrobiana de soluções de açúcares composta por glicose e frutose em proporções iguais (BORSATO; CRUZ; ALMEIDA, 2009), nas concentrações de 70, 65, 60, 55, 50 e 45%, diluídas em CMH e CMHG para um volume final de 100 μL. Em cada uma dessas soluções também foi adicionado 5 μL de inóculo microbiano.
As microplacas foram tampadas e incubadas em estufa (Quimis, Q-136M4, Brasil), a 35ºC, por 24 horas. A leitura foi feita antes e após as 24 horas de incubação em leitor de microplacas (Bio-Tek Instruments Inc., EL808, Winooski, VT, Estados Unidos) a 405 nm. Como controle positivo, foi avaliado o crescimento microbiano nos meios de cultura sem a adição de amostra. Considerando a possível influência da coloração das amostras na leitura espectrofotométrica, diluições dos méis, dos EFMs e das soluções de açúcar em CMH e CMHG, na ausência de inóculo microbiano, foram avaliadas após 24 horas de incubação. Os resultados dos ensaios antimicrobianos foram expressos como MIC_{90}, concentração de amostra (m/V) capaz de inibir o crescimento microbiano em 90%.

4.2.9 Análise por HPLC-UV-ESI-MS do extrato fenólico do mel de *Melipona marginata* Lepeletier, 1836

O extrato fenólico do mel de *M. marginata* liofilizado foi redissolvido em 1 mL de metanol (grau HPLC) e filtrado por membrana de 0,45 μm antes da análise cromatográfica.

As análises cromatográficas foram realizadas de acordo com Jasicka-Misiak *et al*. (2012) e Kassim *et al*. (2010), com algumas modificações. Em síntese, um volume de 20 μL do extrato metanólico do mel obtido anteriormente foi injetado no sistema de HPLC. A análise dos compostos fenólicos por HPLC-UV foi realizada usando um sistema de cromatografia líquida LC-Agilent 1100 equipado com

desgaseificador (G1322A), bomba quaternária (G1311A), amostrador automático (G1313A), compartimento de coluna (G1316A) e detector de UV (G1314A), controlado por software ChemStation (Agilent Technologies, Santa Clara, Estados Unidos). Os compostos fenólicos foram detectados utilizando espectros de absorção no UV monitorados a 290 e 360 nm, pois a maioria dos ácidos fenólicos e flavonoides presentes no mel apresentam absorção máxima no UV próximo a esses dois comprimentos de onda. A separação por cromatografia líquida foi realizada em uma coluna de fase reversa C18, Zorbax SB (4.6 x 250 mm; tamanho de partícula: 5 *μ*m; Agilent Technologies, Santa Clara, Estados Unidos). A fase móvel foi constituída por 0,25% de ácido fórmico e 2% de metanol em água (solvente A) e metanol (solvente B) a uma taxa de fluxo constante de solvente de 1 $mL.min^{-1}$. O seguinte esquema de eluição de gradiente foi utilizado (relação A:B): 10:90%, t = 0 min, 40:60%, t = 10 min; 90:10% , t = 20 min; 100:0%, t = 30 min; 10:90%, t = 45 min. A temperatura do forno da coluna foi fixada em 35°C. A identificação dos compostos fenólicos do extrato do mel foi realizada comparando-se o tempo de retenção e perfis cromatográficos de analitos desconhecidos com padrões. As curvas de calibração do ácido cafeico a 290 nm e da quercetina a 360 nm foram usadas como referência para o cálculo das concentrações dos ácidos fenólicos e dos flavonoides, respectivamente.

Para a análise de HPLC-ESI-MS, foi usado um LC/MSD Trap (G2445), equipado com uma interface API-electrospray (Agilent Technologies, Santa Clara, Estados Unidos), controlado pelo software LC/MSD Trap (Bruker Daltonics, Billerica, Estados Unidos), utilizado para a aquisição e o processamento dos dados. As condições usadas para HPLC-ESI-MS foram iguais às condições anteriormente relatadas para HPLC-UV. O espectrômetro de massa por *ion trap* foi operado nos modos de íons negativos e positivos, com uma faixa de varredura de m/z 50-800, com as seguintes definições: temperatura de secagem de 350ºC, pressão do nebulizador 30 psi, e fluxo de gás (nitrogênio) de 10 L/min.

4.2.10 Atividade anti-inflamatória *in vivo* do extrato fenólico do mel de *Melipona marginata* Lepeletier, 1836

4.2.10.1 Animais e condições de manutenção

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos *Swiss* machos (25-35 g) mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia, da Universidade Federal do Paraná (UFPR), em condições de temperatura controlada (22 ± 2°C), respeitando uma fase clara/escura de 12 horas e recebendo água e ração comercial (Nuvital) *ad libitum*. Os animais foram conduzidos ao laboratório por um período de pelo menos uma hora antes do início dos experimentos. Os testes foram desenvolvidos com quatro grupos experimentais, sendo que de acordo com o planejamento estatístico, foi definida a necessidade da utilização de cinco animais por grupo. Os experimentos foram realizados de acordo com as orientações para os cuidados com animais de laboratórios, determinadas pela Comissão de Ética para o Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da UFPR. O presente projeto foi avaliado por essa comissão técnico-científica e aprovado sob o protocolo número 482.

4.2.10.2 Avaliação do edema de orelha

A avaliação do edema de orelha foi realizada mediante o método revisado por Hecker e Schimdt (1974). O edema de orelha foi expresso como o aumento da espessura da orelha dos camundongos, calculada por meio da diferença entre a medida realizada após a indução do edema por aplicação do agente flogístico e a medida basal, realizada antes da sua aplicação. A espessura da orelha foi aferida utilizando um micrômetro digital (MT-045B; Shangai Metal Great Tools Co., Shangai, China). A medida foi realizada próxima à extremidade medial da orelha e a sua espessura foi registrada em micrômetros. Para minimizar variações concernentes à técnica, as medições foram realizadas por um único experimentador. O agente indutor (TPA), o extrato fenólico do mel em diferentes concentrações e a

dexametasona foram diluídos em 20 *µ*L de acetona e aplicados na orelha direita dos camundongos.

4.2.10.3 Edema de orelha induzido pela aplicação tópica do TPA

O TPA é um composto presente no óleo de cróton (*Croton tiglium* L.), sendo um potente agente flogístico e promotor de tumor capaz de gerar uma resposta inflamatória e hiperproliferativa bastante intensa, assemelhando-se com algumas doenças cutâneas. Esse modelo de inflamação cutânea aguda permite identificar inibidores da biossíntese das prostaglandinas e leucotrienos, sendo amplamente utilizado na triagem de compostos que pertencem à classe dos inibidores da cicloxigenase (COX) e/ou lipoxigenase (LOX), bem como compostos com atividade corticoide (GÁBOR, 2001).

O edema de orelha foi induzido pela aplicação tópica de 2,5 *µ*g/orelha de acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA) nos camundongos. O extrato fenólico do mel foi aplicado topicamente, nas concentrações de 0,03 a 1 mg/orelha, imediatamente após a indução com TPA. Como controle positivo foi usado a dexametasona (0,05 mg/orelha). O grupo veículo foi tratado com acetona e o grupo controle recebeu somente a aplicação do TPA. A espessura da orelha foi avaliada após 6 horas da aplicação do TPA (DE YOUNG *et al*., 1989). Após esse mesmo período de tempo, os animais foram sacrificados e círculos de 6 mm de tecido da orelha dos camundongos foram coletados e submetidos à quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS). A análise histológica e a avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) foram realizadas nas biópsias coletadas 24 horas após a aplicação do TPA.

4.2.10.3.1 Atividade da enzima MPO

A atividade enzimática da mieloperoxidase foi avaliada de acordo com o método de Bradley *et al*. (1982) modificada por De Young *et al*. (1989). Aos círculos de 6 mm de tecido da orelha dos camundongos foram adicionados 0,75 mL de solução de fosfato de sódio a 80 mM, pH 5,4, contendo 0,5% de

hexadeciltrimetilamônio (HTAB). Essa mistura foi homogeneizada por aproximadamente 45 segundos a 0ºC. Os homogenatos foram decantados em microtubos e a eles foi adicionado um volume de 0,75 mL da solução de fosfato de sódio já descrita. Um alíquota de 1,5 mL da amostra foi colocada em microtubo e centrifugada a 12000 x g a 4ºC por 15 minutos. Triplicatas de 30 μL do sobrenadante foram depositadas em placas de 96 poços e, em seguida, foram adicionados 200 μL de uma mistura contendo 100 μL de solução de fosfato de sódio a 80 mM, pH 5,4, 85 μL de solução-tampão fosfato (PBS) a 0,22 M, pH 5,4 e 15 μL de H_2O_2 a 0,017% em cada poço. A reação teve início pela adição de 20 μL de tetrametilbenzidina HCl (TMB) a 18,4 mM, dissolvida em uma solução aquosa de dimetilformamida a 8%. A placa foi incubada a 37ºC por 3 minutos e a reação foi interrompida pela adição, em cada poço, de 30 μL de acetato de sódio a 1,46 M, pH 3,0. A atividade enzimática foi determinada colorimetricamente usando leitor de placas (Bio-TeK Instruments Inc., EL808, Winooski, VT, Estados Unidos), no comprimento de onda de 620 nm, sendo expressa em mDO/biópsia.

4.2.10.3.2 Análise histológica

As amostras de orelhas coletadas de camundongos e submetidas à aplicação tópica de TPA foram fixadas em solução ALFAC (85 mL de álcool etílico 80%, 10 mL de formaldeído 40% e 5 mL de ácido acético glacial) por um período de 16 horas, sendo, em seguida, conservadas em álcool 70% até o início do processo de desidratação. Posteriormente, as amostras foram desidratas em série etanólica crescente e emblocadas em parafina. Foram realizadas secções transversais de 3-4 μm de espessura, as quais foram coradas por hematoxilina e eosina (RECIO *et al.*, 2000). A infiltração de leucócitos, edema e espessura da epiderme foram avaliadas em áreas representativas com aumento de 200x e/ou 400x.

4.2.10.3.3 Determinação de ROS

A determinação de ROS na pele dos camundongos foi baseada nos métodos de Keston e Brandt (1965) e Driver, Kodavanti e Mundy (2000), com modificações.

Esse ensaio determina diretamente a geração de radicais livres de oxigênio usando o composto fluorogênico diacetato de 2'-7' diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA). A pré-incubação do DCFH-DA com os homogenatos de tecido induz a clivagem do diacetato, pela ação de esterases, e conduz à formação de 2'-7' diclorodihidrofluoresceína (DCFH). Na presença de ROS, o composto não-fluorescente DCFH é rapidamente oxidado ao composto altamente fluorescente 2'-7' diclorofluoresceína (DCF).

A produção de ROS na pele dos camundongos foi avaliada 6 horas após a aplicação tópica simultânea do TPA, da acetona (veículo), do extrato de mel (1,0 mg/orelha) ou da dexametasona (0,05 mg/orelha). Inicialmente, uma biópsia de 6 mm de diâmetro da orelha dos camundongos foi coletada, sendo diretamente homogeneizadas em 1 mL de solução-tampão fosfato (PBS), pH 7,2, a 0°C, por 45 segundos. Em seguida, os homogenatos foram incubados por 30 minutos com 0,4873 mg DSFH-DA dissolvidos em 50 ml de dimetilsulfóxido (DMSO), de forma a atingir uma concentração final de 1 μM. Após o período de incubação, a intensidade de fluorescência promovida pela formação do composto 2'-7' diclorofluoresceína (DCF) foi mensurada por meio de um espectrofluorofotômetro (CytoFluor, Shimadzu RF-5000U, Kyoto, Japão), no comprimento de onda de excitação de 485 nm e de emissão de 530 nm.

4.2.10.4 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando a análise de variância (ANOVA) de uma via, sendo que, quando necessário, foi empregado o teste *post hoc* de Tukey e Newman Keuls. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) e média ± desvio padrão (DP). Valores de p menores do que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados como indicativos de significância. Os cálculos foram realizados utilizando o Software estatístico GraphPad Prism version 5.00 (San Diego, CA, Estados Unidos).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISES FÍSICAS E QUÍMICAS

Os resultados, referentes aos parâmetros físicos e químicos avaliados, estão sumarizados nas Tabelas 07 e 08.

TABELA 07 – RESULTADOS DAS ANÁLISES DE UMIDADE, AÇÚCARES REDUTORES, SACAROSE, SÓLIDOS INSOLÚVEIS E CINZAS PARA OS MÉIS ELABORADOS PELAS ESPÉCIES DE MELIPONÍNEOS EM ESTUDO

Amostras	Umidade (%)	Açúcares redutores (%)	Sacarose (%)	Sólidos insolúveis (%)	Cinzas (%)
1 *M. bicolor*[a]	32,76	62,31 (± 0,43)	1,70 (± 0,35)	0,064 (± 0,04)	0,29 (± 0,05)
2 *M. bicolor*[a]	32,60	62,66 (± 0,44)	2,79 (± 0,04)	0,052 (± 0,03)	0,26 (± 0,05)
3 *M. bicolor*[b]	31,40	53,04 (± 0,33)	2,86 (± 0,12)	0,012 (± 0,01)	0,21 (± 0,05)
4 *M. bicolor*[b]	33,00	70,37 (± 1,15)	3,45 (± 0,38)	nd	nd
5 *M. marginata*[a]	32,16	61,06 (± 0,21)	2,77 (± 0,18)	nd	2,81 (± 0,24)
6 *M. marginata*[c]	29,00	76,29 (± 0,59)	5,53 (± 0,24)	nd	nd
7 *M. marginata*[b]	33,60	71,99 (± 1,04)	3,93 (± 0,43)	nd	nd
8 *M. quadrifasciata*[a]	28,84	59,23 (± 0,33)	1,42 (± 0,19)	0,045 (± 0,01)	0,32 (± 0,14)
9 *M. quadrifasciata*[b]	31,60	60,84 (± 0,37)	2,86 (± 0,21)	nd	0,25 (± 0,04)
10 *M. quadrifasciata*[b]	33,80	68,82 (± 0,96)	4,91 (± 0,13)	0,010 (± 0,00)	nd
11 *M. quadrifasciata*[c]	28,60	74,31 (± 0,56)	3,35 (± 0,05)	0,020 (± 0,00)	nd
12 *M. rufiventris*[b]	31,20	75,62 (± 0,29)	4,35 (± 0,27)	0,040 (± 0,00)	nd
13 *M. rufiventris*[b]	31,40	60,84 (± 0,00)	1,84 (± 0,18)	0,038 (± 0,02)	0,21 (± 0,11)
14 *S. bipunctata*[d]	24,60	67,73 (± 0,23)	2,37 (± 0,42)	0,050 (± 0,00)	0,20 (± 0,04)
15 *S. xanthotricha*[b]	24,40	71,38 (± 0,51)	4,50 (± 0,06)	0,040 (± 0,00)	0,04 (± 0,01)
16 *T. clavipes*[c]	27,20	48,52 (± 0,13)	1,16 (± 0,11)	0,039 (± 0,00)	0,36 (± 0,04)
17 *T. clavipes*[c]	27,20	45,88 (± 0,74)	4,78 (± 0,40)	0,060 (± 0,00)	0,04 (± 0,00)
18 *T. clavipes*[e]	25,60	43,35 (± 1,01)	2,99 (± 0,57)	0,060 (± 0,00)	0,26 (± 0,03)
19 *T. clavipes*[b]	27,20	47,39 (± 0,39)	2,14 (± 0,17)	0,060 (± 0,00)	0,34 (± 0,12)
20 *T. angustula*[c]	25,00	62,67 (± 0,34)	2,25 (± 0,22)	0,020 (± 0,00)	0,23(± 0,06)
21 *T. angustula*[b]	26,80	70,36 (± 0,43)	3,30 (± 0,23)	nd	0,34(± 0,01)

NOTA: nd = VALORES NÃO DETECTADOS; PROCEDÊNCIA GEOGRÁFICA DA AMOSTRA: [a]CURITIBA; [b]GUARAQUEÇABA; [c]BOA ESPERANÇA DO IGUAÇU; [d]MANDIRITUBA; [e]CORNÉLIO PROCÓPIO

TABELA 08 – RESULTADOS DAS ANÁLISES DE pH, ACIDEZ, ÍNDICE DE DIASTASE, HMF E COR PARA OS MÉIS ELABORADOS PELAS ESPÉCIES DE MELIPONÍNEOS EM ANÁLISE

Amostras	pH	Acidez (mEq.kg^{-1})	Índice de diastase (Göthe)	HMF (mg.kg^{-1})	Cor
1 *M. bicolor*[a]	3,47	71,14 (± 1,35)	3,64 (± 0,06)	0,07 (± 0,00)	Âmbar escuro
2 *M. bicolor*[a]	3,84	33,96 (± 0,90)	1,17 (± 0,06)	2,74 (± 0,17)	Âmbar escuro
3 *M. bicolor*[b]	2,87	180,82 (± 1,86)	0,94 (± 0,05)	19,16 (± 0,15)	Âmbar escuro
4 *M. bicolor*[b]	3,24	102,16 (± 1,50)	2,20 (± 0,20)	1,58 (± 0,14)	Âmbar escuro
5 *M. marginata*[a]	4,93	10,64 (± 0,74)	2,25 (± 0,14)	0,45 (± 0,00)	Âmbar escuro
6 *M. marginata*[c]	3,37	76,46 (± 1,26)	1,93 (± 0,15)	2,30 (± 0,17)	Âmbar
7 *M. marginata*[b]	3,21	104,76 (± 1,50)	1,67 (± 0,06)	3,66 (± 0,14)	Âmbar
8 *M. quadrifasciata*[a]	4,21	21,41 (± 0,84)	1,85 (± 0,26)	1,15 (± 0,04)	Âmbar escuro
9 *M. quadrifasciata*[b]	3,40	32,35 (± 0,47)	0,92 (± 0,01)	24,95 (± 0,09)	Âmbar escuro
10 *M. quadrifasciata*[b]	3,31	104,76 (± 1,50)	2,00 (± 0,35)	2,08 (± 0,14)	Âmbar
11 *M. quadrifasciata*[c]	3,44	45,89 (± 1,50)	2,13 (± 0,49)	2,45 (± 0,23)	Âmbar escuro
12 *M. rufiventris*[b]	3,34	60,60 (± 1,50)	1,53 (± 0,15)	2,08 (± 0,76)	Âmbar
13 *M. rufiventris*[b]	3,33	33,04 (± 0,48)	0,99 (± 0,09)	18,71 (± 0,15)	Âmbar escuro
14 *S. bipunctata*[d]	4,17	34,63 (± 1,50)	2,67 (± 0,06)	2,50 (± 0,69)	Âmbar escuro
15 *S. xanthotricha*[b]	3,93	44,16 (± 2,60)	3,70 (± 0,10)	1,20 (± 0,26)	Âmbar escuro
16 *T. clavipes*[c]	3,54	68,01 (± 1,12)	1,97 (± 0,28)	6,89 (± 0,26)	Âmbar escuro
17 *T. clavipes*[c]	3,74	106,49 (± 2,60)	6,95 (± 0,35)	1,00 (± 0,09)	Âmbar escuro
18 *T. clavipes*[e]	3,77	103,02 (± 1,50)	8,27 (± 0,74)	4,04 (± 0,52)	Âmbar escuro
19 *T. clavipes*[b]	4,09	111,69 (± 0,00)	11,27 (± 1,22)	1,40 (± 0,69)	Âmbar escuro
20 *T. angustula*[c]	4,40	31,17 (± 0,00)	5,27 (± 0,06)	5,59 (± 0,09)	Âmbar escuro
21 *T. angustula*[b]	4,10	45,02 (± 1,50)	4,53 (± 0,12)	9,93 (± 0,35)	Âmbar escuro

NOTA: PROCEDÊNCIA GEOGRÁFICA DA AMOSTRA: [a]CURITIBA; [b]GUARAQUEÇABA; [c]BOA ESPERANÇA DO IGUAÇU; [d]MANDIRITUBA; [e]CORNÉLIO PROCÓPIO

5.1.1 Umidade

As amostras de mel analisadas apresentaram um teor médio de umidade de 29,43%, com uma variação de 24,40 a 33,80% para as amostras 15 e 10, respectivamente. Considerando as espécies de abelhas sem ferrão produtoras dos méis avaliados, é possível constatar que os méis elaborados pelas espécies do gênero *Melipona* (amostras 1 a 13) apresentaram uma umidade média mais elevada (31,53%), quando comparados aos méis provenientes das espécies do gênero

Scaptotrigona (amostras 14 e 15), das espécies *T*. *clavipes* (amostras 16 a 19) e *T*. *angustula* (amostras 20 e 21), que apresentaram um valor médio de umidade de 24,50, 26,80 e 25,90%, respectivamente.

Os resultados verificados no presente estudo estão de acordo com os obtidos por Evangelista-Rodrigues *et al*. (2005), Souza *et al*. (2006), Almeida-Muradian, Matsuda e Bastos (2007), Almeida-Anacleto *et al*. (2009) e Souza *et al*. (2009), que constataram que o mel produzido por diferentes espécies de meliponíneos possui um teor de umidade acima do limite máximo de 20%, permitido pela legislação brasileira vigente (BRASIL, 2000). Além disso, os valores obtidos nesse estudo encontram-se dentro do limite máximo de 35%, sugerido para os méis de meliponíneos do Brasil (VILLAS-BÔAS; MALASPINA, 2005).

Vários fatores podem influenciar o teor de umidade do mel, como a origem botânica, as condições climáticas, a época da colheita, o grau de maturação do produto, as condições inadequadas de processamento e de armazenamento e, ainda, as adulterações (RODRÍGUEZ *et al*., 2004). Adicionalmente, outro fator que pode explicar a elevada umidade apresentada pelos méis elaborados pelas abelhas sem ferrão é o manejo utilizado para opercular os potes de mel. Enquanto que a abelha africanizada, de um modo geral, opercula o favo de mel quando este já se encontra em ponto de coleta, ou seja, com valores de umidade variando entre 17 e 18%, a abelha nativa realiza a operculação dos potes de armazenamento de mel no momento que o mel ainda apresenta um elevado teor de umidade (EVANGELISTA-RODRIGUES *et al*., 2005).

A legislação brasileira (BRASIL, 2000) preconiza que a umidade do mel de *Apis* deve ser inferior a 20%, devido às condições tropicais encontradas no Brasil, como umidade e temperaturas elevadas, as quais podem facilitar o processo de fermentação do produto. Dessa forma, a elevada umidade, característica particular do mel de abelhas sem ferrão, torna-o susceptível ao processo de fermentação. Além disso, dificulta o seu armazenamento e pode comprometer a sua vida útil de prateleira. Portanto, diferentes estratégias, como a pasteurização e a refrigeração, podem ser usadas para melhorar a sua conservação.

5.1.2 Açúcares redutores e sacarose

Os conteúdos de açúcares redutores e de sacarose variaram nas amostras de mel entre 43,35 (± 1,01) e 76,29% (± 0,51) e entre 1,16 (± 0,11) e 5,53 %(± 0,24), respectivamente. Comparativamente às amostras elaboradas pelas demais espécies de meliponíneos, os méis produzidos pela abelha *T. clavipes* apresentaram os menores teores de açúcares redutores, sendo que a variação observada entre as amostras produzidas por essa espécie foi de 43,35% (± 1,01) e 48,52% (± 0,13).

Almeida-Anacleto (2007), ao estudar 31 amostras de mel produzidas pelas espécies *T. angustula*, *S. bipunctata*, *N. testaceicornis, F. varia* e *T. clavipes,* detectou teores de açúcares redutores da ordem de 31,93 a 64,15%, sendo que os menores valores encontrados foram para o mel da espécie *F. varia* e os maiores para o mel elaborado pela abelha *S. bipunctata.* Para os teores de sacarose, foi encontrada uma variação de 0,13 a 2,32%.

As duas amostras avaliadas no presente estudo, elaboradas por *T. angustula* apresentaram valores de açúcares redutores de 62,67% (± 0,34) e 70,36% (± 0,43). As porcentagens de sacarose determinadas foram de 2,25% (± 0,22) e 3,30% (± 0,23). Entretanto, em um estudo conduzido por Almeida-Anacleto *et al*. (2009), em que foi avaliada a composição de 20 amostras de mel provenientes dessa mesma espécie de abelha sem ferrão, os teores encontrados para esses dois critérios foram menores, sendo que a variação encontrada para o teor de açúcares redutores foi de 48,66 a 57,97%. Com relação às porcentagens obtidas para sacarose, os resultados variaram de 0,13 a 1,87%.

De modo geral, os resultados encontrados nesse estudo para os teores de açúcares redutores e de sacarose estão de acordo aos apontados por Souza *et al*. (2006). Esses autores avaliaram dados sobre as características físicas e químicas de 152 amostras de méis de diferentes espécies de meliponíneos, provenientes de oito países do continente americano, sendo que a amplitude observada para o teor de açúcares redutores foi de 58,0 a 75,7%. Para o conteúdo de sacarose, esse estudo apontou uma variação de 1,1 a 4,8%.

Com relação às exigências estabelecidas pela legislação brasileira, a qual estabelece parâmetros para o mel produzido por *Apis*, 12 amostras seriam consideradas reprovadas, considerando 65% como teor mínimo de açúcares

redutores. No entanto, para os teores de sacarose, todas as amostras atenderam aos requisitos estabelecidos por essa legislação, que indica uma porcentagem máxima de 6% (BRASIL, 2000). De acordo com os valores sugeridos por Villas-Bôas e Malaspina (2005) para o mel de abelhas sem ferrão do Brasil, que consideram um valor mínimo de 50% para açúcares redutores e um teor máximo de 6% para sacarose, apenas quatro amostras, provenientes da espécie *T. clavipes*, não se enquadram no parâmetro proposto para açúcares redutores.

5.1.3 Sólidos insolúveis

Para a análise de sólidos insolúveis em água, as amostras apresentaram valores entre 0,010% (± 0,00) e 0,064% (± 0,04). Empregando-se o método proposto por Bogdanov, Martin e Lüllmann (1997), não foi possível determinar o conteúdo de sólidos insolúveis em seis amostras. Os sólidos insolúveis presentes no mel estão diretamente relacionados às condições de coleta e de processamento, assim como aos hábitos das abelhas que o elaboraram (VILLAS-BÔAS; MALASPINA, 2005). Os resultados encontrados no presente estudo estão de acordo com os descritos por Evangelista-Rodrigues (2005), que encontraram teores de sólidos insolúveis variando entre 0,013 e 0,0192% em amostras de mel de *A. mellifera* e *M. scutellaris* produzidos em duas regiões no estado da Paraíba. Adicionalmente, esses resultados estão em conformidade com os parâmetros estabelecidos pela legislação brasileira, a qual considera 0,1% como porcentagem máxima aceita de sólidos insolúveis em amostras de mel (BRASIL, 2000). Além disso, atendem também à especificação sugerida por Villas-Bôas e Malaspina (2005), que permite até 0,4% de sólidos insolúveis para méis provenientes de abelhas sem ferrão.

5.1.4 Cinzas

O teor de cinzas variou de 0,04% (± 0,00) a 2,81% (± 0,24). Pelo método empregado para a análise de cinzas (BORSATO *et al*., 2010; VARGAS, 2006), não foi possível detectar o seu teor em seis amostras. A porcentagem de cinzas presente no mel é um indicativo do conteúdo mineral e se constitui em um parâmetro

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

Pamplona (1989), ao comparar amostras de méis elaboradas por *A. mellifera* e por meliponíneos constatou que o valor de minerais é de 2 a 3 vezes maior nos méis de abelhas sem ferrão. No entanto, de acordo com os resultados obtidos no presente estudo, apenas uma amostra apresentou um teor de cinzas mais elevado em comparação às demais amostras. No estudo realizado por Souza *et al*. (2006), que compilou dados referentes a 152 amostras de méis de diferentes espécies de meliponíneos, foi encontrada uma variação de 0,01 a 1,18%. Entretando, Almeida-Anacleto *et al*. (2009) encontraram teores de cinzas em amostras de *T. angustula* variando de 0,21 a 0,60%. Evangelista-Rodrigues *et al*. (2005) também obtiveram teores de cinzas inferiores a 0,6% em méis das abelhas *A. mellifera* e *M. scutellaris*.

A porcentagem de cinzas estabelecida pela norma vigente é de, no máximo, 0,6% (BRASIL, 2000), o que coincide com o valor sugerido para as amostras de méis de meliponíneos brasileiros (VILLAS-BÔAS; MALASPINA, 2005). Dessa forma, apenas uma amostra, produzida por *M. marginata*, não se encontra de acordo com essas especificações.

5.1.5 pH e acidez

O pH das amostras variou de 2,87 a 4,93. Segundo Crane (1983), variações observadas no pH se devem, possivelmente, a particularidades da composição florística nas áreas de coleta, uma vez que o pH do mel pode ser influenciado pelo pH do néctar. Diferenças na composição do solo ou a associação de espécies vegetais para formar a composição final do mel, afirma Noronha (1997), podem também influenciar o pH desse produto.

Os resultados apresentados nesse estudo estão, em geral, de acordo aos apontados pela literatura, sendo que foram obtidos valores entre 3,15 e 4,66 para o pH, na compilação de resultados de 152 amostras de méis de diversas espécies de meliponíneos provenientes de oito países do continente americano (SOUZA *et al*.,

2006). De modo semelhante, Almeida-Muradian, Matsuda e Bastos (2007) determinaram o pH de 4 amostras coletadas na região amazônica do Brasil, produzidas por abelhas sem ferrão das espécies *M. compressipes manaosensis* e *M. seminigra merrillae, e* encontraram valores que variaram de 3,41 a 4,06. Adicionalmente, Almeida-Anacleto *et al*. (2009) encontrou valores de pH entre 3,54 a 4,64 para méis de *T. angustula.*

Não há limite estabelecido pelas legislações de abrangência nacional e internacional para valores de pH no mel de *Apis* (BOGDANOV; MARTIN; LÜLLMANN, 1997; BRASIL, 2000; MERCOSUL, 1999), assim como também não há sugestões de padronização, considerando o pH, para méis de meliponíneos no México, Guatemala e Venezuela (VIT; MEDINA; ENRÍQUEZ., 2004) e no Brasil (VILLAS-BÔAS; MALASPINA, 2005).

Para a análise de acidez, os valores encontrados variaram de 10,64 $mEq.kg^{-1}$ (± 0,74) a 180,82 $mEq.kg^{-1}$ (± 1,86). Um valor elevado de acidez no mel pode indicar um estado de fermentação, principalmente se a umidade da amostra for superior a 20% (VARGAS, 2006).

Os teores de acidez determinados nesse estudo são condizentes aos apontados pela literatura. Cortopassi-Laurino e Gelli (1991) avaliaram as características físicas e químicas de 14 amostras de diferentes espécies de meliponíneos provenientes de distintas regiões do Brasil. Esses autores determinaram, para a maioria das amostras, valores de acidez entre 30 e 90 $mEq.kg^{-1}$. No entanto, um grupo de cinco amostras apresentou uma acidez mais elevada, com teores superiores a 160 $mEq.kg^{-1}$. No estudo realizado por Souza *et al*. (2006) foram encontrados teores de 5,9 a 109,0 $mEq.kg^{-1}$ para acidez, na compilação de resultados de 152 amostras de méis de diversas espécies de meliponíneos provenientes de oito países do continente americano. Almeida-Anacleto (2007), ao avaliar 31 amostras de mel produzidas pelas espécies *T. angustula*, *S. bipunctata*, *N. testaceicornis, F. varia* e *T. clavipes,* detectou conteúdos de acidez que variaram entre 7,50 a 166,00 mEq.kg-1. Entretanto, Almeida-Muradian, Matsuda e Bastos (2007) encontraram teores menores para as amostras de mel de meliponíneos avaliadas, sendo que a variação foi de 20,63 a 27,13 $mEq.kg^{-1}$.

A legislação brasileira estabelece o valor máximo de 50 $mEq.kg^{-1}$ para a acidez no mel (BRASIL, 2000), enquanto que o valor sugerido para o mel de

meliponíneos no Brasil pode ser de até 80 mEq.kg^{-1} (VILLAS BÔAS; MALASPINA, 2005). Dessa forma, 52,4% das amostras avaliadas no presente trabalho não atendem à legislação vigente para esse critério e 42,8% delas não se enquadram no limite proposto para o mel de abelhas sem ferrão no Brasil.

Não foi observada uma relação de proporcionalidade entre os valores de pH e de acidez (mEq.kg^{-1}) nas amostras investigadas no presente trabalho. Esse fato pode ser justificado porque esses parâmetros representam características diferentes. O valor de pH é relativo à concentração hidrogeniônica da solução, enquanto que a acidez depende da presença e das propriedades químicas como estrutura e grau de ionização de ácidos orgânicos e inorgânicos, como também do conteúdo particular de aminoácidos, os quais são fornecidos pelo néctar e pólen das plantas e pelas enzimas salivares dos meliponíneos (BORSATO *et al*., 2010).

5.1.6 Índice de diastase

A determinação do índice de diastase das amostras revelou valores entre 0,92 (± 0,01) e 11,27(± 1,22) na escala Göthe.

A medida da atividade diastásica é exigida para a análise de méis pela legislação vigente (BRASIL, 2000), sendo amplamente reconhecida como um parâmetro para a determinação da deterioração do mel, pois a atividade dessa enzima diminui com o armazenamento e com o aquecimento do mel (TOSI *et al*., 2008; BOGDANOV; MARTIN; LÜLLMANN, 1997). Além disso, é um parâmetro importante para a determinação de possíveis adulterações do produto, pois a adição de xaropes comerciais de açúcar invertido, preparados por aquecimento e inversão ácida da sacarose da cana-de-açúcar, pode reduzir o índice de diastase presente no mel. No entanto, devido ao fato de possuírem atividade diastásica, xaropes com alto teor de frutose, produzidos a partir de amido de milho pela ação de amilases e de isomerases também podem ser usados na falsificação. Nesse caso, a detecção da fraude pode ser feita pela determinação da concentração de HMF, que nessa situação estará elevada (VARGAS, 2006).

Os índices de diastase detectados na presente investigação estão de acordo com os determinados por Souza *et al*. (2006), que obtiveram uma variação de 0,9 a 23,0 na escala Göthe para méis de diferentes espécies de abelhas sem ferrão. Em

outro trabalho, realizado por Almeida-Anacleto (2007), foram encontrados valores mais elevados para essa enzima, sendo que a variação foi de 3,16 a 54,11 na escala Göthe. Já no estudo realizado por Souza *et al*. (2009), com 33 amostras de mel produzido por espécies de *Melipona* colhidas no estado da Bahia, não foi possível a determinação da atividade diastásica na totalidade das amostras.

Para o índice de diastase, apenas sete amostras analisadas atenderam às exigências da legislação brasileira (BRASIL, 2000), como também ao mínimo sugerido para méis de meliponíneos no Brasil (VILLAS-BÔAS; MALASPINA, 2005).

Essa variabilidade dos resultados obtidos para a atividade diastásica, também verificada para o mel de *Apis*, levou White Júnior (1994) a questionar o uso da determinação dessa enzima como um indicador de qualidade do mel, devido à grande variação na quantidade de diastase em méis recém-colhidos e não aquecidos, sugerindo a exclusão dessa análise por ser um teste redundante, enganoso e variável.

Considerando os diferentes resultados verificados para a atividade diastásica entre os estudos realizados, é possível observar que apenas algumas espécies de meliponíneos produzem méis com índices de diastase inferiores aos recomendados pela legislação, indicando que a utilização desse critério não seja o melhor recurso para a definição da deterioração do mel produzido por essas abelhas. Dessa forma, de acordo com Souza *et al*. (2009), ao invés de objetivar a verificação da qualidade do mel produzido, a diastase poderia vir a se constituir em um marcador para o mel produzido por meliponíneos, atestando a sua origem entomológica. No entanto, para isso ainda são necessários estudos aprofundados sobre a produção dessa enzima pelas abelhas sem ferrão.

5.1.7 HMF

Os méis estudados apresentaram valores de HMF variando de 0,07 $mg.kg^{-1}$ (± 0,00) a 24,95 (± 0,09) $mg.kg^{-1}$. De acordo com a literatura, outros trabalhos revelaram variações maiores no teor de HMF dentre as amostras avaliadas. Souza *et al*. (2006), na compilação dos dados referentes a 152 amostras méis de diversas espécies de meliponíneos detectaram valores de HMF entre 0,4 e 78,4 $mg.kg^{-1}$. Almeida-Anacleto (2007) obteve para as 31 amostras de mel elaboradas por

diferentes espécies de abelhas sem ferrão teores de HMF variando entre 0,75 e 71,49 $mg.kg^{-1}$.

O HMF é uma substância resultante da transformação dos açúcares presentes no mel (MARCHINI; MORETI; OTSUK, 2005). Sua concentração se eleva à medida que o mel é aquecido ou armazenado por longos períodos. Além disso, um alto conteúdo de HMF pode ser indicativo de adulteração (RIZELIO *et al*., 2012). No entanto, de acordo com White Júnior (1992), méis procedentes de países subtropicais, devido a altas temperaturas, podem apresentar, naturalmente, um alto conteúdo de HMF, sem que o mel tenha sido superaquecido ou adulterado.

O valor máximo de HMF sugerido para o controle de qualidade de mel de abelhas sem ferrão é inferior (VILLAS-BÔAS; MALASPINA, 2005) ao estabelecido pela legislação brasileira para o mel de abelha *A. mellifera* (BRASIL, 2000). Dessa forma, os teores de HMF verificados no presente estudo refletem uma adequação às exigências estabelecidas pela legislação nacional, que permite um valor máximo de 60 $mg.kg^{-1}$, como também ao parâmetro proposto por Villas-Bôas e Malaspina (2005), que sugerem que os méis produzidos por meliponíneos no Brasil devem apresentar um teor máximo de 40 $mg.kg^{-1}$ para essa substância.

Considerando a avaliação conjunta dos resultados apresentados para o índice de diastase e para o teor de HMF, é possível observar que algumas amostras apresentaram uma baixa atividade diastásica, conforme indicado no item 5.1.6. No entanto, os teores de HMF detectados foram adequados aos limites preconizados pela legislação (BRASIL, 2000) e pela literatura (VILLAS-BÔAS; MALASPINA, 2005). Algumas condições, como o uso de altas temperaturas durante o processamento ou o longo tempo de armazenamento do mel podem resultar em altos teores de HMF e baixa atividade diastásica. Porém, no presente estudo, somente o índice de diastase mostrou-se inadequado às condições ideais. Dessa forma, essa constatação reforça o cuidado que se deve ter na avaliação isolada do índice de diastase para a definição da qualidade do mel.

5.1.8 Cor

As amostras apresentaram colorações variando do âmbar ao âmbar escuro. Portanto, todas as amostras analisadas enquadram-se aos critérios estabelecidos

pela legislação (BRASIL, 2000). Cortopassi-Laurino e Gelli (1991) ao estudarem as características físicas e químicas de 14 amostras de diferentes espécies de meliponíneos provenientes de distintas regiões do Brasil, encontraram colorações variando do âmbar ao âmbar claro. Almeida-Anacleto (2007) classificou as 31 amostras analisadas em colorações que variaram do âmbar ao âmbar extra claro. A autora constatou ainda que nas amostras produzidas por *T. angustula* e *T. clavipes* houve uma prevalência da cor âmbar, enquanto que nos méis elaborados por *N. testaceicornis* e *S. bipunctata*, verificou-se que praticamente o mesmo número de amostras apresentou colorações entre âmbar claro e âmbar extra claro.

5.2 CLASSIFICAÇÃO EM MEL FLORAL OU EM MEL DE MELATO

A Equação de Kirkwood foi estabelecida para determinar a ocorrência de melato no mel. Kirkwood; Mitchell e Smith (1961, 1960) analisaram amostras de mel floral e de melato e, após identificarem os parâmetros que mais variaram, estabeleceram uma equação, baseada em estudos matemáticos, para ser aplicada na diferenciação desses dois tipos de mel. Foram utilizados os resultados de pH, porcentagem de cinzas em matéria seca e porcentagem de açúcares redutores em matéria seca, a fim de obter uma função discriminativa X, sendo adotado o limite de 73,1, abaixo do qual o mel é classificado como mel de melato ou mistura de mel floral com mel de melato.

Campos *et al*. (2003) compararam dois métodos de classificação para mel floral ou melato. Foram analisadas 25 amostras, sendo que os resultados foram utilizados para a classificação em mel floral ou em mel de melato pela Equação de Kirkwood (KIRKWOOD; MITCHELL; SMITH 1961, 1960) e pelo método de White (WHITE JÚNIOR, 1980), o qual se baseia na determinação da rotação óptica. Amostras de mel de melato, segundo White Júnior (1980), apresentam desvio maior que $^{-}$ 2ºS. Das 25 amostras analisadas, 11 foram classificadas como mel de melato, de acordo com Kirkwood; Mitchell e Smith (1961, 1960) e White Júnior (1980). Apesar da divergência em quatro amostras, o teste exato de Fisher indicou que os métodos são equivalentes e ambos podem ser usados para diferenciação de amostras de mel.

No presente trabalho, a equação de Kirkwood foi empregada com o objetivo de verificar se esse método pode ser aplicado na diferenciação da origem do mel meliponíneos. De acordo com os resultados obtidos, as amostras 5, 16, 17, 18 e 19 foram classificadas como sendo mel de melato ou proveniente de uma mistura entre mel de melato e mel floral. O valor de X, para cada amostra, variou de 36,78 a 129,44. Dessa forma, a equação de Kirkwood, para méis de meliponíneos, carece em sensibilidade analítica, sendo que os seus resultados devem ser avaliados em conjunto com os dados obtidos pela análise polínica, para se chegar a uma correta identificação da origem botânica das amostras de mel.

5.3 ANÁLISE POLÍNICA

O espectro polínico das amostras em estudo está sumarizado nas Tabelas 09 a 12, sendo apresentadas as porcentagens médias dos diferentes tipos polínicos presentes nas amostras e sua classificação quanto à representatividade na amostra. O pólen dominante (acima de 45%) representa, geralmente, a origem botânica do mel; o acessório (acima de 15 a 45%) indica outras plantas visitadas; e as classes de pólen isolado importante (de 3 a 15%) e de pólen isolado ocasional (menor que 3%) trazem informações sobre a procedência geográfica da amostra (ESCUREDO *et al*., 2012; MIRANDA; ANDRADE, 1990).

TABELA 09 – ESPECTRO POLÍNICO PARA OS MÉIS ELABORADOS PELOS MELIPONÍNEOS EM INVESTIGAÇÃO (AMOSTRAS 1 A 7)

Amostra	Origem entomológica	Pólen Dominante (%)	Polén Acessório (%)	Pólen Isolado Importante (%)	Pólen Isolado Ocasional (%)
1[a]	*M. bicolor*		*Mimosa scabrella* (Fabaceae) - 40,38 *Myrcia* (Myrtaceae) - 26,31	*Eucalyptus* (Myrtaceae) - 14,03 *Solanum* (Solanaceae) - 14,03	*Baccharis* (Asteraceae) - 1,75 *Euterpe/Syagrus* (Arecaceae) - 1,75 *Persea* (Lauraceae) - 1,75
2[a]	*M. bicolor*		*Solanum* (Solanaceae) - 27,35 *Myrcia* (Myrtaceae) - 24,80 *Eucalyptus* (Myrtaceae) - 17,95	*Baccharis* (Asteraceae) - 13,67 Melastomataceae/Combretaceae - 4,27 *Vernonia* (Asteraceae) - 4,27	*Aegiphila* (Lamiaceae) - 1,71 *Euterpe/Syagrus* (Arecaceae) - 1,71 *Phoradendron* (Loranthaceae) - 1, 71 Piptadenia/Stryphnodendron (Fabaceae) - 1,71 *Paullinia* (Sapindaceae) - 0,85
3[b]	*M. bicolor*	Melastomataceae/Combretaceae - 84,18		*Myrcia* (Myrtaceae) - 10,20 *Mimosa verrucosa* (Fabaceae) - 4,60	*Solanum* (Solanaceae) - 1,02
4[b]	*M. bicolor*	Melastomataceae/Combretaceae - 81,86		*Myrcia* (Myrtaceae) - 9,54	*Euterpe/Syagrus* (Arecaceae) - 2,73 *Phoradendron* (Loranthaceae) - 1, 36 Poaceae - 0,91 *Acacia* (Fabaceae) - 0,45 *Astrocaryum* (Arecaceae) - 0,45 *Baccharis* (Asteraceae) - 0,45 Cyperaceae - 0,45 *Ilex* (Aquifoliaceae) - 0,45 *Paullinia* (Sapindaceae) - 0,45 *Piper* (Piperaceae) - 0,45 *Tabebuia* (Bignoniaceae) - 0,45
5[a]	*M. marginata*	*Mimosa scabrella* (Fabaceae) - 98,10			*Solanum* (Solanaceae) - 1,20 *Myrcia* (Myrtaceae) - 0,50 *Eucalyptus* (Myrtaceae) - 0,20
6[c]	*M. marginata*		*Cestrum* (Solanaceae) - 31,53 *Myrcia* (Myrtaceae) - 27,05	*Inga* (Fabaceae) - 13,51 *Mimosa caesalpiniifolia* (Fabaceae) - 11,71 Solanaceae - 6,30	Melastomataceae/Combretaceae - 2,70 *Baccharis* (Asteraceae) - 1,80 *Piper* (Piperaceae) - 1,80 *Delonix regia* (Fabaceae) - 0,90 *Euterpe/Syagrus* (Arecaceae) - 0,90 *Tabebuia* (Bignoniaceae) - 0,90 Tipo polínico não identificado - 0,90
7[b]	*M. marginata*	Melastomataceae/Combretaceae - 67,90	*Myrcia* (Myrtaceae) - 24,69		*Astrocaryum* (Arecaceae) - 2,47 *Lithraea* (Anacardiaceae) - 2,47 *Doliocarpus* (Dilleniaceae) - 0,82 *Inga* (Fabaceae) - 0,82 *Cordia* (Boraginaceae) - 0,41 Poaceae - 0,41

NOTA: PROCEDÊNCIA GEOGRÁFICA DA AMOSTRA: [A]CURITIBA; [B]GUARAQUEÇABA; [C]BOA ESPERANÇA DO IGUAÇU. CLASSES DE FREQUÊNCIA POLÍNICA: PÓLEN DOMINANTE (> 45% DO TOTAL DE GRÃOS), PÓLEN ACESSÓRIO (> 15 A 45%), PÓLEN ISOLADO IMPORTANTE (3 A 15%) E PÓLEN ISOLADO OCASIONAL (< 3%)

TABELA 10 – ESPECTRO POLÍNICO PARA OS MÉIS ELABORADOS PELOS MELIPONÍNEOS EM ESTUDO (AMOSTRAS 8 A 14)

Amostra	Origem entomológica	Pólen Dominante (%)	Polén Acessório (%)	Pólen Isolado Importante (%)	Pólen Isolado Ocasional (%)
8[a]	*M. quadrifasciata*		*Mimosa verrucosa* (Fabaceae) - 31,08	*Euterpe/Syagrus* (Arecaceae) - 10,81 *Myrcia* (Myrtaceae) - 10,81 *Persea* (Lauraceae) - 10,81 *Solanum* (Solanaceae) - 10,81 *Eucalyptus* (Myrtaceae) - 9,46 *Baccharis* (Asteraceae) - 8,11 *Mimosa scabrella* (Fabaceae) - 8,11	
9[b]	*M. quadrifasciata*	Melastomataceae/Combretaceae - 76,03		*Euterpe/Syagrus* (Arecaceae) - 13,83 *Myrcia* (Myrtaceae) - 9,22	*Ilex* (Aquifoliaceae) - 0,46 *Inga* (Fabaceae) - 0,46
10[b]	*M. quadrifasciata*	Melastomataceae/Combretaceae - 68,05		*Myrcia* (Myrtaceae) - 13,61 *Weinmannia* (Cunoniaceae) - 5,92	*Euterpe/Syagrus* (Arecaceae) - 2,95 *Astrocaryum* (Arecaceae) - 2,37 *Matayba* (Sapindaceae) - 2,37 *Piper* (Piperaceae) - 2,37 *Phoradendron* (Loranthaceae) - 1,77 *Inga* (Fabaceae) - 0,59
11[c]	*M. quadrifasciata*		*Myrcia* (Myrtaceae) - 40,74 Melastomataceae/Combretaceae - 15,43	*Piptadenia/Stryphnodendron* (Fabaceae) - 11,73 Solanaceae - 8,64 Fabaceae - 6,17 *Prunus/Rubus* (Rosaceae) - 5,55 *Lithraea* (Anacardiaceae) - 3,70	*Euterpe/Syagrus* (Arecaceae) - 2,47 *Mimosa caesalpiniifolia* (Fabaceae) - 2,47 *Baccharis* (Asteraceae) - 0,62 *Clitoria* (Fabaceae) - 0,62 *Mimosa scabrella* (Fabaceae) - 0,62 *Paullinia* (Sapindaceae) - 0,62 *Zanthoxylum* (Rutaceae) - 0,62
12[b]	*M. rufiventris*	Melastomataceae/Combretaceae - 55,36	*Myrcia* (Myrtaceae) - 29,06	*Astrocaryum* (Arecaceae) - 4,15 *Euterpe/Syagrus* (Arecaceae) - 4,15	*Casearia* (Salicaceae) - 0,69 *Matayba* (Sapindaceae) - 0,69 Monocotiledônea - 0,69 *Phoradendron* (Loranthaceae) - 0,69 *Alchornea* (Euphorbiaceae) - 0,35 *Cecropia* (Urticaceae) - 0,35 *Ilex* (Aquifoliaceae) - 0,35 *Inga* (Fabaceae) - 0,35 *Schizolobium parahyba* (Fabaceae) - 0,35
13[b]	*M. rufiventris*	Melastomataceae/Combretaceae - 62,89	Euterpe/Syagrus (Arecaceae) - 22,01	*Myrcia* (Myrtaceae) - 13,21	*Aegiphila* (Lamiaceae) - 0,63 *Croton* (Euphorbiaceae) - 0,63 *Solanum* (Solanaceae) - 0,63
14[d]	*S. bipunctata*		*Myrcia* (Myrtaceae) - 39,55 *Lithraea* (Anacardiaceae) - 23,38	*Zanthoxylum* (Rutaceae) - 11,19 *Mimosa scabrella* (Fabaceae) - 5,22 *Weinmannia* (Cunoniaceae) - 5,22	*Delonix regia* (Fabaceae) - 2,49 Melastomataceae/Combretaceae - 2,49 *Baccharis* (Asteraceae) - 2,24 *Euterpe/Syagrus* (Arecaceae) - 1,49 *Matayba* (Sapindaceae) - 1,49 Monocotiledônea - 0,99 *Paullinia* (Sapindaceae) - 0,75 Tipo polínico não identificado - 0,75 *Acacia* (Fabaceae) - 0,5 *Anadenanthera* (Fabaceae) - 0,5 *Piper* (Piperaceae) - 0,5 *Serjania* (Sapindaceae) - 0,5 *Eucalyptus* (Myrtaceae) - 0,25 Gentianaceae - 0,25 *Ilex* (Aquifoliaceae) - 0,25

NOTA: PROCEDÊNCIA GEOGRÁFICA DA AMOSTRA: [a]CURITIBA; [b]GUARAQUEÇABA; [c]BOA ESPERANÇA DO IGUAÇU; [d]MANDIRITUBA. CLASSES DE FREQUÊNCIA POLÍNICA: PÓLEN DOMINANTE (> 45% DO TOTAL DE GRÃOS), PÓLEN ACESSÓRIO (> 15 A 45%), PÓLEN ISOLADO IMPORTANTE (3 A 15%) E PÓLEN ISOLADO OCASIONAL (< 3%)

TABELA 11 – ESPECTRO POLÍNICO PARA OS MÉIS ELABORADOS PELOS MELIPONÍNEOS EM ANÁLISE (AMOSTRAS 15 A 17)

Amostra	Origem entomológica	Pólen Dominante (%)	Polén Acessório (%)	Pólen Isolado Importante (%)	Pólen Isolado Ocasional (%)
15[b]	*S. xanthotricha*	*Acalypha* (Euphorbiaceae) - 47,08		*Mimosa caesalpiniifolia* (Fabaceae) - 9,09 *Lithraea* (Anacardiaceae) - 8,16 *Baccharis* (Asteraceae) - 6,49 *Myrcia* (Myrtaceae) - 5,84 *Euterpe/Syagrus* (Arecaceae) - 5,52 *Faramea* (Rubiaceae) - 5,19	*Acacia* (Fabaceae) - 1,95 *Cordia* (Boraginaceae) - 1,95 *Matayba* (Sapindaceae) - 1,62 *Zanthoxylum* (Rutaceae) - 1,62 *Phoradendron* (Loranthaceae) - 1,30 *Croton* (Euphorbiaceae) - 0,97 Melastomataceae/Combretaceae - 0,97 *Ocotea* (Lauraceae) - 0,65 *Copaifera* (Fabaceae) - 0,32 *Ilex* (Aquifoliaceae) - 0,32 *Paullinia* (Sapindaceae) - 0,32 Poaceae - 0,32 *Phaseolus* (Fabaceae) - 0,32
16[c]	*T. clavipes*	*Delonix regia* (Fabaceae) - 57,21		*Zanthoxylum* (Rutaceae) - 12,44 *Ilex* (Aquifoliaceae) - 8,95 *Piptadenia/Stryphnodendron* (Fabaceae) - 4,99 *Myrcia* (Myrtaceae) - 3,98 *Euterpe/Syagrus* (Arecaceae) - 3,48	*Protium* (Burseraceae) - 2,98 Poaceae - 1,99 Fabaceae - 0,99 *Alternanthera* (Amaranthaceae) - 0,50 *Baccharis* (Asteraceae) - 0,50 Melastomataceae/Combretaceae - 0,50 *Piper* (Piperaceae) - 0,50 *Tetrapterys* (Malpighiaceae) - 0,05 *Trema* (Cannabaceae) - 0,05
17[c]	*T. clavipes*	*Faramea* (Rubiaceae) - 54,02		*Euterpe/Syagrus* (Arecaceae) - 10,73 *Piper* (Piperaceae) - 8,430 *Trema* (Cannabaceae) - 3,45 *Myrcia* (Myrtaceae) 3,07	*Amaranthus* (Amaranthaceae) - 1,92 Poaceae - 1,92 *Zea mays* (Poaceae) - 1,92 *Baccharis* (Asteraceae) - 1,53 *Cecropia* (Urticaceae) - 1,53 *Lithraea* (Anacardiaceae) - 1,53 *Delonix regia* (Fabaceae) - 1,15 Fabaceae - 1,15 *Piptadenia/Stryphnodendron* (Fabaceae) - 1,15 *Zanthoxylum* (Rutaceae) - 1,15 *Acacia* (Fabaceae) - 0,77 *Eryngium* (Apiaceae) - 0,77 *Ilex* (Aquifoliaceae) - 0,77 *Sida* (Malvaceae) - 0,77 *Citrus* (Rutaceae) - 0,38 Cyperaceae - 0,38 *Mimosa caesalpiniifolia* (Fabaceae) - 0,38 *Paullinia* (Sapindaceae) - 0,38 *Prunus/Rubus* (Rosaceae) - 0,38 *Triumfetta* (Malvaceae) - 0,38

NOTA: PROCEDÊNCIA GEOGRÁFICA DA AMOSTRA: [b]GUARAQUEÇABA; [c]BOA ESPERANÇA DO IGUAÇU. CLASSES DE FREQUÊNCIA POLÍNICA: PÓLEN DOMINANTE (> 45% DO TOTAL DE GRÃOS), PÓLEN ACESSÓRIO (> 15 A 45%), PÓLEN ISOLADO IMPORTANTE (3 A 15%) E PÓLEN ISOLADO OCASIONAL (< 3%)

TABELA 12 – ESPECTRO POLÍNICO PARA OS MÉIS ELABORADOS PELOS MELIPONÍNEOS EM ESTUDO (AMOSTRAS 18 A 21)

Amostra	Origem entomológica	Pólen Dominante (%)	Polén Acessório (%)	Pólen Isolado Importante (%)	Pólen Isolado Ocasional (%)
18[e]	*T. clavipes*		*Faramea* (Rubiaceae) - 33,33 *Euterpe/Syagrus* (Arecaceae) - 20,00	*Baccharis* (Asteraceae) - 8,00 *Amaranthus* (Amaranthaceae) - 6,67 *Cordyline* (Asparagaceae) - 6,67 *Doliocarpus* (Dilleniaceae) - 6,67 *Delonix regia* (Fabaceae) - 3,33	Cyperaceae - 2,00 *Commelina* (Commelinaceae) - 2,00 *Pithecoctenium crucigerum* (Bignoniaceae) - 2,00 Poaceae - 2,00 Monocotiledônea - 1,33 *Ocotea* (Lauraceae) - 1,33 *Croton* (Euphorbiaceae) - 0,67 Melastomataceae/Combretaceae - 0,67 *Piper* (Piperaceae) - 0,67 *Piptadenia/Stryphnodendron* (Fabaceae) - 0,67 *Serjania* (Sapindaceae) - 0,67 *Tabebuia* (Bignoniaceae) - 0,67 *Tetrapterys* (Malpighiaceae) - 0,67
19[b]	*T. clavipes*		*Piper* (Piperaceae) - 26,98	*Piptadenia/Stryphnodendron* (Fabaceae) - 11,73 Poaceae - 11,73 *Euterpe/Syagrus* (Arecaceae) - 8,80 *Phoradendron* (Loranthaceae) - 7,33 *Eryngium* (Apiaceae) - 5,57 *Trema* (Cannabaceae) - 4,40 *Paullinia* (Sapindaceae) - 4,11	*Ilex* (Aquifoliaceae) - 2,64 *Alchornea* (Euphorbiaceae) - 2,35 *Delonix regia* (Fabaceae) - 2,35 *Inga* (Fabaceae) - 2,05 *Zanthoxylum* (Rutaceae) - 1,47 *Astrocaryum* (Arecaceae) - 1,17 *Citrus* (Rutaceae) - 1,17 *Tetrapterys* (Malpighiaceae) - 1,17 *Acalypha* (Euphorbiaceae) - 0,59 *Baccharis* (Asteraceae) - 0,59 *Croton* (Euphorbiaceae) - 0,59 Cyperaceae - 0,59 *Mimosa verrucosa* (Fabaceae) - 0,59 *Myrsine* (Primulaceae) - 0,59 *Ocotea* (Lauraceae) - 0,59 *Palicourea* (Rubiaceae) - 0,59 *Typha* (Typhaceae) - 0,59
20[c]	*T. angustula*		*Euterpe/Syagrus* (Arecaceae) - 21,71 *Cecropia* (Urticaceae) - 20,64	*Trema* (Cannabaceae) - 13,88 *Piptadenia/Stryphnodendron* (Fabaceae) - 8,90 *Prunus/Rubus* (Rosaceae) - 6,76 *Acalypha* (Euphorbiaceae) - 6,41 *Baccharis* (Asteraceae) - 4,63 *Faramea* (Rubiaceae) - 4,27 *Zanthoxylum* (Rutaceae) - 3,56	Poaceae - 2,49 *Piper* (Piperaceae) - 2,14 *Myrcia* (Myrtaceae) - 1,78 *Eryngium* (Apiaceae) - 1,07 *Ilex* (Aquifoliaceae) - 0,71 *Lithraea* (Anacardiaceae) - 0,71 *Antigonum* (Polygonaceae) - 0,36
21[b]	*T. angustula*	*Piper* (Piperaceae) - 51,36	*Cecropia* (Urticaceae) - 24,87 *Banara* (Salicaceae) -15,13		Poaceae - 2,70 *Alchornea* (Euphorbiaceae) - 1,08 Monocotiledônea - 1,08 *Myrcia* (Myrtaceae) - 1,08 *Phoradendron* (Loranthaceae) - 1,08 *Zanthoxylum* (Rutaceae) - 1,08 *Trema* (Cannabaceae) - 0,54

NOTA: PROCEDÊNCIA GEOGRÁFICA DA AMOSTRA: [b]GUARAQUEÇABA; [c]BOA ESPERANÇA DO IGUAÇU; [e]CORNÉLIO PROCÓPIO. CLASSES DE FREQUÊNCIA POLÍNICA: PÓLEN DOMINANTE (> 45% DO TOTAL DE GRÃOS), PÓLEN ACESSÓRIO (> 15 A 45%), PÓLEN ISOLADO IMPORTANTE (3 A 15%) E PÓLEN ISOLADO OCASIONAL (< 3%)

A análise polínica das amostras de mel provenientes do município de Curitiba, produzidos pelas espécies *M. bicolor, M. marginata* e *M. quadrifasciata*, revelou a presença de 14 tipos polínicos diferentes. *Mimosa scabrella*, *Mimosa verrucosa* (Fabaceae), *Eucalyptus*, *Myrcia* (Myrtaceae) e *Solanum* (Solanaceae) destacaram-se como representantes das classes de pólen dominante ou de pólen acessório nos espectros polínicos.

Nas amostras do município de Guaraqueçaba, produzidas pelas abelhas *M. bicolor*, *M. marginata*, *M. quadrifasciata*, *M. rufiventris*, *S. xanthotricha*, *T. clavipes* e *T. angustula*, foram observados como tipos polínicos dominantes *Acalypha* (Euphorbiaceae), Melastomataceae/Combretaceae e *Piper* (Piperaceae) e, como pólen acessório, foram identificados os tipos *Euterpe/Syagrus* (Arecaceae), *Cecropia* (Urticaceae), *Banara* (Salicaceae), *Myrcia* (Myrtaceae) e *Piper* (Piperaceae). Nesses méis foram encontrados 45 tipos polínicos diferentes.

As amostras de mel coletadas no município de Boa Esperança do Iguaçu, produzidas pelas espécies *M. marginata*, *M. quadrifasciata*, *T. clavipes* e *T. angustula* apresentaram 38 tipos polínicos diferentes em seus espectros, dentre os quais *Delonix regia* (Fabaceae) e *Faramea* (Rubiaceae) destacaram-se como pólen dominante e *Cestrum* (Solanaceae), Melastomataceae/Combretaceae e *Myrcia* (Myrtaceae) foram observados compondo a classe de pólen acessório.

No espectro polínico da amostra proveniente do município de Mandirituba, elaborada pela abelha *S. bipunctata,* foram encontrados 20 tipos polínicos, dentre os quais *Myrcia* (Myrtaceae) e *Lithraea* (Anacardiaceae), apresentaram-se como pólen acessório.

A avaliação polínica do mel coletado no município de Cornélio Procópio, produzido pela espécie *T. clavipes*, constatou a presença de 20 tipos polínicos diferentes, sendo que *Faramea* (Rubiaceae) e *Euterpe/Syagrus* (Arecaceae) foram identificados em quantidades relativas à classe de pólen acessório.

A partir dos resuttaos da análise polínica, é possível observar que os méis elaborados pelas abelhas *S. bipunctata* (amostra 14), *S. xanthotricha* (amostra 15) e *T. clavipes* (amostras 17, 18 e 19) exibiram a maior diversidade polínica, comparativamente aos demais méis investigados no presente estudo.

Considerando os dados apresentados na literatura, na pesquisa desenvolvida por Cortopassi-Laurino e Geli (1991), no qual foram estudadas amostras de mel provenientes do estado do Paraná, os autores identificaram as presenças do tipo

polínico *Centella* (Apiaceae) e do tipo *Cassia* (Fabaceae) como pólen dominante e acessório, respectivamente, no mel produzido por *T. angustula. O*s tipos polínicos *Caesalpinia peltophoroides* (Fabaceae) e *Datura* (Solanaceae) foram encontrados compondo a classe de pólen acessório no mel elaborado por *T. clavipes*. Para esse mel, não foi identificado nenhum tipo polínico dominante.

As famílias mais representativas nos espectros polínicos das amostras avaliadas no presente estudo foram Anacardiaceae, Arecaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Melastomataceae/Combretaceae, Myrtaceae, Rubiaceae, Salicaceae e Solanaceae.

Em uma revisão sobre as principais espécies de plantas utilizadas por diversas espécies de meliponíneos e pela *A. mellifera* na região Neotropical, Ramalho, Kleinert-Giovannini e Imperatriz-Fonseca (1990) relatam que, comumente, famílias que apresentam um grande número de espécies, como Asteraceae, constituem importantes fontes de pólen e de néctar, desde o sul do Brasil até o sul do México. Adicionalmente, outras famílias que são consideradas por esses autores como fontes tróficas significativas para as abelhas sem ferrão são Anacardiaceae, Arecaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Lamiaceae, Melastomataceae, Moraceae, Myrtaceae, Rubiaceae e Solanaceae.

No trabalho realizado por Andrade *et al*. (2009), em que foram analisadas 27 amostras de mel produzidas pela espécie de abelha sem ferrão *M. scutellaris* no estado da Bahia, foi constatada a contribuição de espécies representantes das famílias Fabaceae, Myrtaceae e Solanaceae. No espectro polínico do mel produzido por *M. mandacaia*, as famílias mais representativas foram Fabaceae, Euphorbiaceae, Asteracea*e* e Anacardiaceae (ALVES; CARVALHO; SOUSA, 2006). Na pesquisa conduzida por Freitas; Barth e Luz (2010), considerando os resultados obtidos para as amostras de mel produzidas por meliponíneos em território brasileiro, espécies pertencentes às famílias Burseraceae e Solanaceae predominaram nas amostras provenientes do estado do Amazonas. Na Paraíba, a família Fabaceae teve destaque nos espectros polínicos e, em Santa Catarina, os representantes de Rhamnaceae foram predominantes. O espectro polínico do mel de *M. fasciculata*, produzido na área da Baixada Ocidental Maranhense, foi analisado por Martins e colaboradores (2011), sendo que as famílias mais representativas no espectro polínico desse mel foram Pontederiaceae e Fabaceae.

Dessa forma, as famílias mais representativas no espectro polínico das amostras do presente estudo são também descritas na literatura para méis produzidos por diferentes espécies de meliponíneos, considerando, em particular, a flora do estado do Paraná.

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

Amostra 1 – Mel elaborado pela espécie *M. bicolor,* coletado em 03/09/2009 no município de Curitiba (PR)

No espectro polínico dessa amostra foi observada a ausência de pólen dominante e a presença de dois tipos de pólen acessório: *Mimosa scabrella* (Fabaceae) e *Myrcia* (Myrtaceae). Como representantes da classe de pólen isolado importante foram encontrados *Eucalyptus* (Myrtaceae) e *Solanum* (Solanaceae). Na classificação de pólen isolado ocasional foram identificados os tipos *Bacharis* (Asteraceae), *Euterpe*/*Syagrus* (Arecaceae) e *Persea* (Lauraceae). Assim, conclui-se que o mel em questão apresenta contribuição nectarífera de uma espécie do gênero *Mimosa,* provavelmente *M. scabrella* (bracatinga), de espécies que apresentam o tipo polínico *Myrcia*, *Eucalyptus* (Myrtaceae) e *Solanum* (Solanaceae), sendo de origem heterofloral. Várias espécies do gênero *Mimosa* possuem grãos do tipo polínico *Mimosa scabrella*, tornando-se impossível a separação por espécies (BARTH, 1989). Entretanto, sabe-se que a bracatinga é uma espécie nativa de alto valor apícola e comumente encontrada no Paraná. As demais espécies (*Mimosa adenocarpa* Benth., *Mimosa calycina* Benth., *Mimosa eriocaulis* Benth., *Mimosa hypoglauca* Mart., *Mimosa lanata* Benth., *Mimosa meticulosa* Mart., *Mimosa monticola* Dusén, *Mimosa pudica* L., *Mimosa regnellii* Benth., *Mimosa sensitiva* L., *Mimosa somnians* Humb. & Bonpl. ex Willd. e *Mimosa vellosiella* Herter), que possuem as mesmas características morfológicas desse tipo polínico, possuem importância apícola desconhecida (BARTH, 1989).

Amostra 2 – Mel elaborado pela espécie *M. bicolor,* coletado em 25/03/2010 no município de Curitiba (PR)

Esse mel não apresentou nenhum tipo polínico dominante. Como constituintes da classe de pólen acessório, foram observadas as presenças de *Solanum* (Solanaceae), *Myrcia* (Myrtaceae) e *Eucalyptus* (Myrtaceae). Como pólen isolado importante, foram encontrados tipos polínicos compatíveis com *Bacharis* (Asteraceae)*,* Melastomataceae/Combretaceae e *Vernonia* (Asteraceae). A classe de pólen isolado ocasional foi composta por *Aegiphila* (Verbenaceae), *Euterpe*/*Syagrus* (Arecaceae), *Piptadenia*/*Stryphnodendron* (Fabaceae), *Phoradendron* (Loranthaceae) e *Paullinia* (Sapindaceae). Dessa forma, essa amostra foi classificada como mel heterofloral com maiores contribuições de néctar de *Solanum* spp., *Myrcia,* podendo ser de diversas mirtáceas, *Eucalyptus* spp. e *Baccharis* spp.

Amostra 3 – Mel elaborado pela espécie *M. bicolor,* coletado em 20/03/2010 e produzido no município de Guaraqueçaba (PR)

No espectro polínico desse mel foi encontrada a presença dominante do tipo polínico Melastomataceae/Combretaceae. Não foram observados tipos polínicos pertencentes à classe de pólen acessório. Como pólen isolado importante, foi identificada a presença de *Myrcia* (Myrtaceae) e *Mimosa verrucosa* (Fabaceae). O tipo polínico *Solanum* (Solanaceae) foi determinado como pólen isolado ocasional. Assim, esse mel foi diagnosticado como sendo de origem heterofloral com grande contribuição nectarífera de Melastomataceae/Combretaceae. As famílias Melastomataceae e Combretaceae possuem tipos polínicos muito semelhantes, de modo que a diferenciação entre eles se torna difícil pela análise polínica (CASSINO; MEYER, 2011). Dessa forma, podemos considerar que a contribuição nectarífera para essa amostra pode ser proveniente de espécies pertencentes às duas famílias botânicas.

Amostra 4 – Mel elaborado pela espécie *M. bicolor*, coletado em 25/02/2011 no município de Guaraqueçaba (PR)

Nessa amostra de mel foi identificada a presença do tipo polínico Melastomataceae/Combretaceae como pólen dominante. Nenhum tipo polínico foi classificado como pólen acessório. O tipo polínico *Myrcia* (Myrtaceae) foi classificado

como pólen isolado importante. Como pólen isolado ocasional, foram observados os seguintes tipos polínicos: *Euterpe/Syagrus* (Arecaceae), *Phoradendron* (Loranthaceae), Poaceae, *Acacia* (Fabaceae), *Astrocaryum* (Arecaceae), *Baccharis* (Asteraceae), *Cyperaceae*, *Ilex* (Aquifoliaceae), *Paullinia* (Sapindaceae), *Piper* (Piperaceae), *Tabebuia* (Bignoniaceae). Dessa forma, pode-se concluir que a amostra avaliada corresponde a mel heterofloral com grande contribuição nectarífera de espécies botânicas que podem ser pertencentes tanto à família Melastomataceae, quanto à Combretaceae.

Amostra 5 – Mel elaborado pela espécie *M. marginata*, coletado em 03/09/2009 no município de Curitiba (PR)

O tipo polínico *Mimosa scabrella* (Fabaceae) apresentou dominância no espectro polínico desse mel. Não foram verificadas espécies compondo as classes de pólen acessório e pólen isolado importante. Três tipos polínicos foram classificados como pólen isolado ocasional: *Solanum* (Solanaceae), *Myrcia* (Myrtaceae) e *Eucalyptus* (Myrtaceae). Assim, a amostra foi identificada como mel monofloral de uma espécie do gênero *Mimosa,* provavelmente *M. scabrella* (bracatinga). Essa amostra, embora tenha sido classificada como mel de melato, pela equação de Kirkwood (resultado demonstrado no item 5.2), não apresentou elementos figurados característicos de melato, quando analisada microscopicamente.

Amostra 6 – Mel elaborado pela *M. marginata*, coletado em 02/02/2011 no município de Boa Esperança do Iguaçu (PR)

O espectro polínico dessa amostra não demonstrou nenhum tipo polínico representativo da classe de pólen dominante. Na classe de pólen acessório foi identificada a presença dos tipos polínicos *Cestrum* (Solanaceae) e *Myrcia* (Myrtaceae). Os tipos *Inga (*Fabaceae) e *Mimosa caesalpiniifolia* (Fabaceae) foram classificados como pólen isolado importante. Como pólen ocasional foram observados os tipos polínicos Melastomataceae/Combretaceae, *Baccharis* (Asteraceae), Solanaceae, *Piper* (Piperaceae), *Delonix regia* (Fabaceae), *Euterpe/Syagrus* (Arecaceae), *Tabebuia* (Bignoniaceae) e um tipo polínico não identificado. Assim, essa amostra foi classificada como mel heterofloral com maiores

contribuições de néctar de *Cestrum* spp., de espécies que apresentam o tipo polínico *Myrcia*, podendo ser de diversas mirtáceas e *Inga* spp.

Amostra 7 – Mel elaborado pela espécie *M. marginata*, coletado em 25/02/2011 no município de Guaraqueçaba (PR)

O tipo polínico dominante no espectro polínico desse mel foi Melastomataceae/Combretaceae. Como pólen acessório foi encontrado o tipo *Myrcia* (Myrtaceae). Não foram observados tipos polínicos pertencentes à classe de pólen isolado importante. *Astrocaryum* (Arecaceae), *Lithraea* (Anacardiaceae), *Doliocarpus* (Dilleniaceae), *Inga* (Fabaceae), *Cordia* (Boraginaceae) e Poaceae foram classificados como pólen isolado ocasional. De acordo com a interpretação do espectro polínico, essa amostra foi considerada como mel heterofloral com maiores contribuições nectaríferas de representantes das famílias Melastomataceae e/ou Combretaceae e de espécies que apresentam o tipo polínico *Myrcia*, podendo ser de diversas mirtáceas.

Amostra 8 – Mel elaborado pela espécie *M. quadrifasciata*, coletado em 03/09/2009 no município de Curitiba (PR)

O espectro polínico desse mel foi caracterizado pela ausência de pólen dominante e pela presença do tipo polínico *Mimosa verrucosa* (Fabaceae) como pólen acessório. Compondo a classe de pólen isolado importante foram observados: *Euterpe*/*Syagrus* (Arecaceae), *Myrcia* (Myrtaceae), *Persea* (Lauraceae), *Solanum* (Solanaceae), *Eucalyptus* (Myrtaceae), *Bacharis* (Asteraceae) e *Mimosa scabrella* (Fabaceae). Não foram encontrados tipos polínicos pertencentes à classe de pólen isolado ocasional. Dessa forma, a amostra foi considerada como mel heterofloral com contribuições nectaríferas das espécies representadas por todos os tipos polínicos encontrados.

Amostra 9 – Mel elaborado pela espécie *M. quadrifasciata*, coletado em 20/03/2010 no município de Guaraqueçaba (PR)

Foi verificado como pólen dominante, no espectro dessa amostra de mel, o tipo polínico representativo de Melastomataceae/Combretaceae. Nenhum tipo polínico foi classificado como pólen acessório. Como pólen isolado importante, dois tipos polínicos foram observados: *Euterpe*/*Syagrus* (Arecaceae) e *Myrcia*

(Myrtaceae). A classe de pólen isolado ocasional foi composta por *Ilex* (Aquifoliaceae) e *Inga* (Fabaceae). É possível concluir que a amostra em questão trata-se de mel heterofloral com grande contribuição nectarífera de *taxa* botânicos que podem ser pertencentes tanto à família Melastomataceae, quanto à Combretaceae.

Amostra 10 – **Mel elaborado pela espécie *M. quadrifasciata*, coletado em 25/02/2011 no município de Guaraqueçaba (PR)**

O espectro polínico dessa amostra demonstrou o tipo polínico Melastomataceae/Combretaceae como pólen dominante. Não houve pólen acessório. *Myrcia* (Myrtaceae) e *Weinmannia* (Cunoniaceae) foram classificados como pólen isolado importante. Na classe de pólen isolado ocasional foram identificados os tipos *Euterpe/Syagrus* (Arecaceae), *Astrocaryum* (Arecaceae), *Matayba* (Sapindaceae), *Piper* (Piperaceae), *Phoradendron* (Loranthaceae) e *Inga* (Fabaceae). Considerando a avaliação polínica dessa amostra, é possível classificá-la como mel heterofloral com grande contribuição nectarífera de representantes das famílias Melastomataceae e/ ou Combretaceae.

Amostra 11 – **Mel elaborado pela espécie *M. quadrifasciata*, coletado em 02/02/2011 no município de Boa Esperança do Iguaçu (PR)**

Esse mel não apresentou nenhum tipo polínico dominante. Como constituintes da classe de pólen acessório foram verificados os tipos *Myrcia* (Myrtaceae) e Melastomataceae/Combretaceae. Como pólen isolado importante foram identificados *Piptadenia/Stryphnodendron* (Fabaceae), Solanaceae, Fabaceae, *Prunus/Rubus* (Rosaceae) e *Lithraea* (Anacardiaceae). A classe de pólen isolado ocasional foi composta por *Euterpe/Syagrus* (Arecaceae), *Mimosa caesalpiniifolia* (Fabaceae), *Baccharis* (Asteraceae), *Clitoria* (Fabaceae), *Mimosa scabrella* (Fabaceae), *Paullinia* (Sapindaceae) e *Zanthoxylum* (Rutaceae). Assim, pode-se concluir que esse mel é heterofloral com maiores contribuições nectaríferas de espécies que apresentam o tipo polínico *Myrcia*, podendo ser de diversas mirtáceas, de representantes das famílias Melastomataceae e/ou Combretaceae e de *Piptadenia* spp. e/ ou *Stryphnodendron* spp.

Amostra 12 – Mel elaborado pela espécie *M. rufiventris*, coletado em 25/02/2011 no município de Guaraqueçaba (PR)

O tipo polínico dominante encontrado nessa amostra foi Melastomataceae/Combretaceae. Como pólen acessório, foi identificada a presença de *Myrcia* (Myrtaceae). *Astrocaryum* (Arecaceae) e *Euterpe/Syagrus* (Arecaceae) apresentaram-se compondo a classe de pólen isolado importante. A classe de pólen isolado ocasional foi formada pelos tipos *Casearia* (Salicaceae), *Matayba* (Sapindaceae), Monocotiledônea, *Phoradendron* (Loranthaceae), *Alchornea* (Euphorbiaceae), *Cecropia* (Urticaceae), *Ilex* (Aquifoliaceae), *Inga* (Fabaceae) e *Schizolobium parahyba* (Fabaceae). De acordo com a interpretação do espectro polínico, essa amostra foi considerada como mel heterofloral com maiores contribuições nectaríferas de representantes das famílias Melastomataceae e/ou Combretaceae e de espécies que apresentam o tipo polínico *Myrcia*, podendo ser de diversas mirtáceas.

Amostra 13 – Mel elaborado pela espécie *M. rufiventris*, coletado em 20/03/2010 no município de Guaraqueçaba (PR)

O tipo polínico dominante no espectro polínicos dessa amostra foi Melastomataceae/Combretaceae. Como pólen acessório foi verificado a presença de *Euterpe*/*Syagrus* (Arecaceae). Na classe de pólen isolado importante, foi observado o tipo *Myrcia* (Myrtaceae). Os tipos polínicos *Aegiphila* (Verbenaceae), *Croton* (Euphorbiaceae) e *Solanum* (Solanaceae) foram encontrados em porcentagens condizentes à classe de pólen isolado ocasional. Dessa forma, a amostra em questão foi considerada como mel heterofloral com grande contribuição nectarífera de espécies de Melastomataceae e/ou Combretaceae.

Amostra 14 – Mel elaborado pela espécie *S. bipunctata*, coletado em 04/03/2011 no município de Mandirituba (PR)

Essa amostra de mel não apresentou nenhum tipo polínico em porcentagem condizente à classe de pólen dominante. Os tipos *Myrcia* (Myrtaceae) e *Lithraea* (Anacardiaceae) foram classificados como pólen acessório. *Zanthoxylum* (Rutaceae), *Mimosa scabrella* (Fabaceae) e *Weinmannia* (Cunoniaceae) foram observados como pólen isolado importante. Compondo a classe de pólen isolado ocasional, foram encontrados *Delonix regia* (Fabaceae),

Melastomataceae/Combretaceae, *Baccharis* (Asteraceae), *Euterpe/Syagrus* (Arecaceae), *Matayba* (Sapindaceae), Monocotiledônea, *Paullinia* (Sapindaceae), um tipo polínico não identificado, *Acacia* (Fabaceae), *Anadenanthera* (Fabaceae), *Piper* (Piperaceae), Serjania (Sapindaceae), *Eucalyptus* (Myrtaceae), Gentianaceae e *Ilex* (Aquifoliaceae). Assim, é possível indicar que essa amostra trata-se de mel heterofloral com maiores contribuições do néctar de *Lithraea* spp. e de espécies que apresentam o tipo polínico *Myrcia*, podendo ser de diversas mirtáceas.

Amostra 15 – Mel elaborado pela espécie *S. xanthotricha*, coletado em 25/02/2011 no município de Guaraqueçaba (PR)

No espectro polínico dessa amostra, foi identificado o tipo polínico *Acalypha* (Euphorbiaceae) como pólen dominante. Não foi observado nenhum tipo polínico como pólen acessório. A classe de pólen isolado importante foi constituída por *Mimosa caesalpiniifolia* (Fabaceae), *Lithraea* (Anacardiaceae), *Baccharis* (Asteraceae), *Myrcia* (Myrtaceae), *Euterpe/Syagrus* (Arecaceae), *Faramea* (Rubiaceae). Os tipos polínicos *Acacia* (Fabaceae), *Cordia* (Boraginaceae), *Matayba* (Sapindaceae), *Zanthoxylum* (Rutaceae), *Phoradendron* (Loranthaceae), *Croton* (Euphorbiaceae), Melastomataceae/Combretaceae, *Ocotea* (Lauraceae), *Copaifera* (Fabaceae), *Ilex* (Aquifoliaceae), *Paullinia* (Sapindaceae), Poaceae e *Phaseolus* (Fabaceae) foram classificados como pólen isolado ocasional. Dessa forma, considerando a interpretação do espectro polínico, pode-se indicar que essa amostra tem origem heterofloral com maior contribuição do néctar de *Acalypha* spp.

Amostra 16 – Mel elaborado pela espécie *T. clavipes*, coletado em 15/03/2010 no município de Boa Esperança do Iguaçu (PR)

O espectro polínico desse mel foi caracterizado pela presença dominante do tipo polínico *Delonix regia* (Fabaceae). Como pólen acessório, nenhum tipo polínico foi classificado. A classe de pólen isolado importante foi composta por *Zanthoxylum* (Rutaceae), *Ilex* (Aquifoliaceae), *Piptadenia*/*Stryphnodendron* (Fabaceae), *Myrcia* (Myrtaceae) e *Euterpe*/*Syagrus* (Arecaceae). Os tipos polínicos *Protium* (Burseraceae), Poaceae, Fabaceae, *Alternanthera* (Amaranthaceae), *Bacharis* (Asteraceae), Melastomataceae/Combretaceae, *Piper* (Piperaceae), *Tetrapterys* (Malpighiaceae) e *Trema* (Cannabaceae) foram considerados como pertencentes à classe de pólen isolado ocasional. Essa amostra, embora tenha sido classificada

como mel de melato, pela equação de Kirkwood (resultado demonstrado no item 5.2), não apresentou elementos figurados característicos de melato, quando analisada microscopicamente. Assim, esse mel foi considerado heterofloral, composto por *Delonix regia* (Bojer ex Hook.) Raf. (flamboyant), *Zanthoxylum* spp. e *Ilex* spp.

Amostra 17 – Mel elaborado pela espécie *T. clavipes*, coletado em 10/02/2011 no município de Boa Esperança do Iguaçu (PR)

O espectro polínico dessa amostra apresentou o tipo *Faramea* (Rubiaceae) como pólen dominante. Não houve presença de tipo polínico em porcentagem condizente à classe de pólen acessório. Os tipos *Euterpe/Syagrus* (Arecaceae), *Piper* (Piperaceae), *Trema* (Cannabaceae) e *Myrcia* (Myrtaceae) foram identificados como pólen isolado importante. Na classe de pólen isolado ocasional foram encontrados os seguintes tipos polínicos: *Amaranthus* (Amaranthaceae), Poaceae, *Zea mays* (Poaceae), *Baccharis* (Asteraceae), *Cecropia* (Urticaceae), *Lithraea* (Anacardiaceae), *Delonix regia* (Fabaceae), Fabaceae, *Piptadenia/Stryphnodendron* (Fabaceae), *Zanthoxylum* (Rutaceae), *Acacia* (Fabaceae), *Eryngium* (Apiaceae), *Ilex* (Aquifoliaceae), *Sida* (Malvaceae), *Citrus* (Rutaceae), Cyperaceae, *Mimosa caesalpiniifolia* (Fabaceae), *Paullinia* (Sapindaceae), *Prunus/Rubus* (Rosaceae) e *Triumfetta* (Malvaceae). Essa amostra, embora tenha sido classificada como mel de melato, pela equação de Kirkwood (resultado demonstrado no item 5.2), não apresentou elementos figurados característicos de melato, quando analisada microscopicamente. Assim, a amostra foi considerada como mel heterofloral com maior contribuição nectarífera de *Faramea* spp.

Amostra 18 – Mel elaborado pela espécie *T. clavipes*, coletado em 15/02/2011 no município de Cornélio Procópio (PR)

Esse mel não apresentou nenhum tipo polínico dominante. Como pólen acessório, foram observados os tipos *Faramea* (Rubiaceae) e *Euterpe/Syagrus* (Arecaceae). Na classe de pólen isolado importante, foram observados *Baccharis* (Asteraceae), *Amaranthus* (Amaranthaceae), *Cordyline* (Asparagaceae), *Doliocarpus* (Dilleniaceae) e *Delonix regia* (Fabaceae). Os tipos polínicos Cyperaceae, *Commelina* (Commelinaceae), *Pithecoctenium crucigerum* (Bignoniaceae), Poaceae, Monocotiledônea, *Ocotea* (Lauraceae), *Croton* (Euphorbiaceae),

Melastomataceae/Combretaceae, *Piper* (Piperaceae), *Piptadenia/Stryphnodendron* (Fabaceae), *Serjania* (Sapindaceae), *Tabebuia* (Bignoniaceae) e *Tetrapterys* (Malpighiaceae) foram classificados como pólen isolado ocasional. Essa amostra, embora tenha sido classificada como mel de melato, pela equação de Kirkwood (resultado demonstrado no item 5.2), não apresentou elementos figurados característicos de melato, quando analisada microscopicamente. Dessa forma, a amostra foi considerada como mel heterofloral com maiores contribuições nectaríferas de *Faramea* spp. e de espécies que apresentam o tipo polínico *Euterpe*/*Syagrus*, podendo ser de diversas palmeiras.

Amostra 19 – Mel elaborado pela espécie *T. clavipes*, coletado em 25/02/2011 no município de Guaraqueçaba (PR)

Nessa amostra não houve nenhum tipo polínico como pólen dominante. Na classe de pólen acessório, foi identificado o tipo *Piper* (Piperaceae). *Piptadenia/Stryphnodendron* (Fabaceae), Poaceae, *Euterpe/Syagrus* (Arecaceae), *Phoradendron* (Loranthaceae), *Eryngium* (Apiaceae), *Trema* (Cannabaceae) e *Paullinia* (Sapindaceae) foram observados compondo a classe de pólen isolado importante. Os tipos polínicos *Ilex* (Aquifoliaceae), *Alchornea* (Euphorbiaceae), *Delonix regia* (Fabaceae), *Inga* (Fabaceae), *Zanthoxylum* (Rutaceae), *Astrocaryum* (Arecaceae), *Citrus* (Rutaceae), *Tetrapterys* (Malpighiaceae), *Acalypha* (Euphorbiaceae), *Baccharis* (Asteraceae), *Croton* (Euphorbiaceae), Cyperaceae, *Mimosa verrucosa* (Fabaceae), *Myrsine* (Primulaceae), *Ocotea* (Lauraceae), *Palicourea* (Rubiaceae) e *Typha* (Typhaceae) foram classificados como pólen isolado ocasional. Essa amostra, embora tenha sido classificada como mel de melato, pela equação de Kirkwood (resultado demonstrado no item 5.2), não apresentou elementos figurados característicos de melato, quando analisada microscopicamente. De acordo com a avaliação do espectro polínico, essa amostra foi considerada como mel heterolfloral com maiores contribuições nectaríferas de *Piptadenia* spp. e/ ou *Stryphnodendron* spp., de espécies que apresentam o tipo polínico *Euterpe*/*Syagrus*, podendo ser de diversas palmeiras, *Phoradendron* spp., *Eryngium* spp. e *Paullinia* spp.

Amostra 20 – Mel elaborado pela espécie *T. angustula*, coletado em 02/02/2011 no município de Boa Esperança do Iguaçu (PR)

O espectro polínico desse mel não apresentou nenhum tipo polínico dominante. Como pólen acessório, foram observados os tipo *Euterpe/Syagrus* (Arecaceae) e *Cecropia* (Urticaceae). Os tipos polínicos *Trema* (Cannabaceae), *Piptadenia/Stryphnodendron* (Fabaceae), *Prunus/Rubus* (Rosaceae), *Acalypha* (Euphorbiaceae), *Baccharis* (Asteraceae), *Faramea* (Rubiaceae) e *Zanthoxylum* (Rutaceae) foram classificados como pólen isolado importante. Compondo a classe de pólen isolado ocasional, foram encontrados Poaceae, *Piper* (Piperaceae), *Myrcia* (Myrtaceae), *Eryngium* (Apiaceae), *Ilex* (Aquifoliaceae), *Lithraea* (Anacardiaceae) e *Antigonum* (Polygonaceae). Dessa forma, essa amostra foi considerada como mel heterofloral com maior contribuição do néctar de espécies que apresentam o tipo polínico *Euterpe*/*Syagrus*, podendo ser de diversas palmeiras e de *Piptadenia* spp. e/ ou *Stryphnodendron* spp.

Amostra 21 – Mel elaborado pela espécie *T. angustula*, coletado em 03/02/2010 no município de Guaraqueçaba (PR)

Essa amostra apresentou o tipo polínico *Piper* (Piperaceae) como pólen dominante. *Cecropia* (Urticaceae) e *Banara* (Salicaceae) foram identificados compondo a classe de pólen acessório. Não foram observados tipos polínicos pertencentes à classe de pólen isolado importante. Poaceae, *Alchornea* (Euphorbiaceae), Monocotiledônea, *Myrcia* (Myrtaceae), *Phoradendron* (Loranthaceae), *Zanthoxylum* (Rutaceae) e *Trema* (Cannabaceae) formaram a classe de pólen isolado ocasional. Considerando a interpretação do espectro polínico dessa amostra, pode-se estabelecer que o mel em questão apresenta origem monofloral, a partir do néctar de *Banara* spp.

Dessa forma, de acordo com a interpretação do espectro polínico dos méis de meliponíneos em estudo, apenas duas amostras foram classificadas com sendo de origem monofloral, produzidas a partir de *M*. *scabrella* e de *Banara* spp. As outras 19 amostras foram consideradas de origem heterofloral, apresentando três ou mais *taxa* botânicos.

Segundo a literatura, há relatos de que os principais méis monoflorais produzidos por meliponíneos são provenientes de *Acacia polyphylla* DC.

(Fabaceae), *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan (Fabaceae), *Citrus* spp. (Rutaceae), *Eucalyptus* spp. (Myrtaceae), Brassicaceae, *M. caesalpiniifolia* (Fabaceae), *Myrcia* spp. (Myrtaceae), *Piptadenia rigida* Benth. (Fabaceae), *Schinus* spp. (Anacardiaceae), *Solanum* spp. (Solanaceae) e *Vernonia polyanthes* (Spreng.) Less. (Asteraceae) (BARTH, 2004, ALVES; CARVALHO; SOUZA, 2006; SOUZA et al., 2006). Dessa forma, considerando os resultados apresentados no presente trabalho, é possível indicar que os méis monoflorais de meliponíneos também podem ser produzidos a partir de *M. scabrella* (Fabaceae) e de *Banara* spp. (Salicaceae)

Os dados obtidos na presente pesquisa, a partir da análise melissopalinológica, contribuem ao entendimento das espécies de flores visitadas pelos meliponíneos, indicando suas preferências florais na região estudada. Além disso, a análise polínica é uma ferramenta analítica valiosa que permite identificar a procedência botânica do mel produzido por essas espécies. Essa característica do produto pode definir o seu valor de mercado, pois o preço e a qualidade do mel estão, normalmente, relacionados com sua origem botânica ou floral e com sua composição química.

5.4 OBTENÇÃO DO EXTRATO FENÓLICO DO MEL (EFM)

Para a determinação do conteúdo de fenólicos totais e para a realização das atividades biológicas, foi previamente obtido o extrato fenólico de cada amostra de mel. O rendimento do processo de extração, expresso em $mg.g^{-1}$ de mel, está sumarizado na Tabela 13.

TABELA 13 – RENDIMENTO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS PARA OS MÉIS DE MELIPONÍNEOS EM INVESTIGAÇÃO

Amostras	**Origem entomológica**	**Procedência geográfica**	**Rendimento do EFM ($mg.g^{-1}$ de mel)**
1	*M. bicolor*	Curitiba	5,34
2	*M. bicolor*	Curitiba	6,30
3	*M. bicolor*	Guaraqueçaba	4,30
4	*M. bicolor*	Guaraqueçaba	0,96
5	*M. marginata*	Curitiba	5,08
6	*M. marginata*	Boa Esperança do Iguaçu	1,57
7	*M. marginata*	Guaraqueçaba	3,79
8	*M. quadrifasciata*	Curitiba	5,12
9	*M. quadrifasciata*	Guaraqueçaba	1,64
10	*M. quadrifasciata*	Guaraqueçaba	2,84
11	*M. quadrifasciata*	Boa Esperança do Iguaçu	4,85
12	*M. rufiventris*	Guaraqueçaba	1,61
13	*M. rufiventris*	Guaraqueçaba	2,82
14	*S. bipunctata*	Mandirituba	2,60
15	*S. xanthotricha*	Guaraqueçaba	0,69
16	*T. clavipes*	Boa Esperança do Iguaçu	2,00
17	*T. clavipes*	Boa Esperança do Iguaçu	4,91
18	*T. clavipes*	Cornélio Procópio	3,11
19	*T. clavipes*	Guaraqueçaba	1,90
20	*T. angustula*	Boa Esperança do Iguaçu	3,96
21	*T. angustula*	Guaraqueçaba	1,49

O rendimento de extrato obtido, a partir de cada amostra, variou de 0,69 a 6,30 $mg.g^{-1}$ de mel para as amostras elaboradas por *S. xanthotricha* (amostra 15) e por *M. bicolor* (amostra 2), respectivamente. A partir da avaliação dos resultados, foi possível observar que as amostras provenientes dos municípios de Curitiba (amostras 1, 2, 5 e 8) e de Boa Esperança do Iguaçu (amostras 11 e 17) apresentaram os melhores valores de rendimento. Já as amostras provenientes de Guaraqueçaba (amostras 4 e 15) evidenciaram os menores rendimentos. Não foi possível estabelecer uma correlação entre a origem entomológica do mel e rendimento de EFM obtido. Dessa forma, é possível sugerir que tanto a origem botânica quanto a procedência geográfica do mel influenciam no teor de compostos fenólicos presentes no produto final.

5.5 FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O conteúdo total de fenólicos no EFM foi determinado pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteau (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA, 1999) e os resultados estão indicados na Tabela 14.

TABELA 14 – RESULTADOS DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS (mg EAG. g^{-1} DE EFM) PARA OS EFMs OBTIDOS A PARTIR DOS MÉIS DE MELIPONÍNEOS EM ESTUDO

Amostras	Origem entomológica	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 3	Média	SD
1[a]	*M. bicolor*	12,60	15,26	15,08	14,31	1,49
2[a]	*M. bicolor*	14,42	15,26	15,26	14,98	0,48
3[b]	*M. bicolor*	27,34	27,50	27,34	27,39	0,09
4[b]	*M. bicolor*	30,32	35,60	33,96	33,29	2,70
5[a]	*M. marginata*	26,72	26,16	29,48	27,45	1,78
6[c]	*M. marginata*	27,32	30,80	31,64	29,92	2,29
7[b]	*M. marginata*	14,10	16,74	18,06	16,30	2,02
8[a]	*M. quadrifasciata*	16,90	18,56	19,06	18,17	1,13
9[b]	*M. quadrifasciata*	18,72	22,04	23,52	21,43	2,46
10[b]	*M. quadrifasciata*	24,02	25,00	21,38	23,47	1,87
11[c]	*M. quadrifasciata*	14,60	18,40	16,40	16,47	1,90
12[b]	*M. rufiventris*	26,00	29,16	29,64	28,27	1,98
13[b]	*M. rufiventris*	14,42	15,08	16,24	15,25	0,92
14[d]	*S. bipunctata*	24,96	28,32	29,64	27,64	2,41
15[b]	*S. xanthotricha*	52,82	52,82	49,68	51,77	1,81
16[c]	*T. clavipes*	33,12	33,12	35,12	33,79	1,15
17[c]	*T. clavipes*	19,22	22,54	23,70	21,82	2,33
18[e]	*T. clavipes*	30,14	31,80	32,30	31,41	1,13
19[b]	*T. clavipes*	21,36	24,84	26,00	24,07	2,41
20[c]	*T. angustula*	25,18	25,18	25,84	25,40	0,38
21[b]	*T. angustula*	53,47	50,67	55,46	53,20	2,41

NOTA: PROCEDÊNCIA GEOGRÁFICA DA AMOSTRA: [a]CURITIBA; [b]GUARAQUEÇABA; [c]BOA ESPERANÇA DO IGUAÇU; [d]MANDIRITUBA; [e]CORNÉLIO PROCÓPIO

A quantidade total de fenólicos, expresso em mg EAG. g^{-1} de EFM, variou de 14,31 (± 1,49) no mel elaborado por *M. bicolor* (amostra 1) a 53,20 (± 2,41) no mel produzido por *T. angustula* (amostra 21). Além da amostra 21, o mel proveniente de *S. xanthotricha* (amostra 15), comparativamente aos demais méis estudados, também demonstrou uma concentração elevada de fenólicos totais, correspondente a 51,77 (± 1,81) mg EAG. g^{-1} de EFM.

Os resultados do teste de descoloração do radical $ABTS^{\bullet+}$, realizado de acordo com Re *et al*. (1999), para as amostras de mel *in natura* e para os EFMs correspondentes estão apresentados na Tabela 15.

TABELA 15 – RESULTADOS DA ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA DESCOLORAÇÃO DO RADICAL CATIÔNICO ABTS$^{\bullet+}$, EM IC_{50}, PARA OS MÉIS E PARA OS EFMs OBTIDOS A PARTIR DOS MÉIS DE MELIPONÍNEOS EM ANÁLISE

Amostras	Origem entomológica	Procedência geográfica	MEL IC_{50} (mg.mL^{-1})	EFM IC_{50} (µg.mL^{-1})
1	*M. bicolor*	Curitiba	>5,00	>250,00
2	*M. bicolor*	Curitiba	>5,00	>250,00
3	*M. bicolor*	Guaraqueçaba	4,66	120,73
4	*M. bicolor*	Guaraqueçaba	>5,00	58,42
5	*M. marginata*	Curitiba	4,55	160,00
6	*M. marginata*	Boa Esperança do Iguaçu	>5,00	98,05
7	*M. marginata*	Guaraqueçaba	5,00	219,52
8	*M. quadrifasciata*	Curitiba	4,23	226,17
9	*M. quadrifasciata*	Guaraqueçaba	>5,00	190,30
10	*M. quadrifasciata*	Guaraqueçaba	3,77	169,85
11	*M. quadrifasciata*	Boa Esperança do Iguaçu	>5,00	215,45
12	*M. rufiventris*	Guaraqueçaba	>5,00	96,94
13	*M. rufiventris*	Guaraqueçaba	>5,00	240,76
14	*S. bipunctata*	Mandirituba	4,19	133,76
15	*S. xanthotricha*	Guaraqueçaba	2,35	52,74
16	*T. clavipes*	Boa Esperança do Iguaçu	3,64	126,10
17	*T. clavipes*	Boa Esperança do Iguaçu	1,74	111,65
18	*T. clavipes*	Cornélio Procópio	>5,00	107,69
19	*T. clavipes*	Guaraqueçaba	1,85	120,07
20	*T. angustula*	Boa Esperança do Iguaçu	3,32	155,90
21	*T. angustula*	Guaraqueçaba	2,03	58,60

Para as amostras de mel *in natura*, foi possível observar uma maior atividade antioxidante frente ao radical ABTS$^{\bullet+}$ nos méis produzidos pelas abelhas *T. clavipes* (amostras 17 e 19), *T. angustula* (amostra 21) e *S. xanthotricha* (amostra 15), que apresentaram os menores valores de IC_{50}, 1,74, 1,85, 2,03 e 2,35 mg.mL^{-1}, respectivamente.

Considerando a inibição do ABTS$^{\bullet+}$ pelos EFMs, o extrato fenólico obtido a partir do mel de *S. xanthotricha* (amostra 15) apresentou a maior atividade antioxidante (IC_{50} = 52,74 µg.mL^{-1}). Os extratos provenientes dos meís de *M. bicolor* (amostra 4) e *T. angustula* (amostra 21) também apresentaram elevadas capacidades antioxidantes, IC_{50} = 58,42 µg.mL^{-1} e IC_{50} = 58,60 µg.mL^{-1}, respectivamente, quando comparados aos demais extratos avaliados. Os maiores valores de IC_{50} foram observados nos extatos dos méis de *M. bicolor* (amostras 1 e 2).

Não foi observada uma relação de proporcionalidade entre a atividade antioxidante das amostras de mel *in natura* e de seus extratos. Isso pode ser explicado pela diversidade de antioxidantes que podem estar presentes nos méis, além dos compostos fenólicos, como enzimas (catalase, glicose oxidase e

peroxidase) e, ainda, substâncias não-enzimáticas como ácidos orgânicos, produtos da reação de Maillard, aminoácidos, proteínas, α-tocoferol, ácido ascórbico e carotenoides (THE NATIONAL HONEY BOARD, 2003, apud MEDA *et al*., 2005).

Foi encontrada uma correlação (r = 0,8531) entre a quantidade de fenólicos e a concentração necessária do antioxidante para suprimir 50% do agente oxidante ABTS•$^{+}$ (IC_{50}) (Figura 01). Essa correlação confirma a tendência de aumento da atividade antioxidante, ou seja, diminuição do valor de IC_{50}, conforme a elevada concentração de fenólicos da amostra.

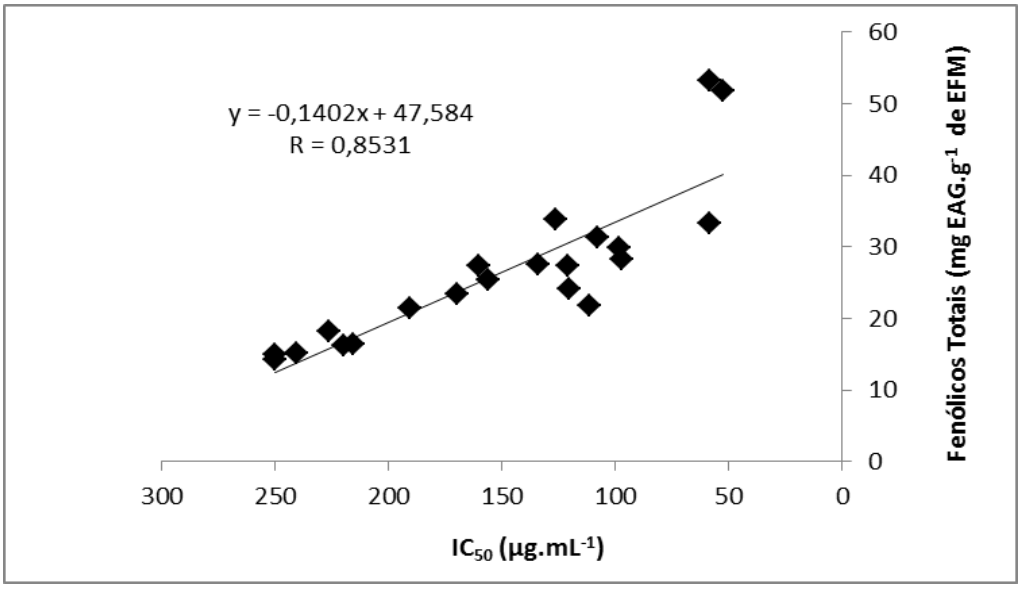

FIGURA 01 – CORRELAÇÃO ENTRE O CONTEÚDO DE FENÓLICOS TOTAIS E A CONCENTRAÇÃO NECESSÁRIA DO ANTIOXIDANTE PARA SUPRIMIR 50% DO AGENTE OXIDANTE ABTS•$^{+}$ (IC_{50}) PARA OS EFMs OBTIDOS A PARTIR DOS MÉIS DE MELIPONÍNEOS EM ESTUDO

A medida da atividade sequestrante do radical DPPH•, em porcentagem, foi realizada de acordo com o método descrito por Yen e Wu (1999) e Chen *et al*. (2003) e os resultados obtidos estão compilados na Tabela 16.

TABELA 16 – RESULTADOS DA ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE FRENTE AO RADICAL DPPH•, EM PORCENTAGEM, PARA OS EFMs OBTIDOS A PARTIR DOS MÉIS DE MELIPONÍNEOS EM ESTUDO

Amostras	Origem entomológica	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 3	Média	SD
1[a]	*M. bicolor*	15,38	19,95	17,55	17,63	2,29
2[a]	*M. bicolor*	17,31	15,86	20,91	18,03	2,60
3[b]	*M. bicolor*	18,75	15,62	18,02	17,46	1,64
4[b]	*M. bicolor*	47,57	49,51	50,97	49,35	1,71
5[a]	*M. marginata*	31,01	29,08	30,04	30,04	0,97
6[c]	*M. marginata*	46,60	46,12	45,63	46,12	0,49
7[b]	*M. marginata*	15,05	13,59	14,56	14,40	0,74
8[a]	*M. quadrifasciata*	24,76	23,80	21,88	23,48	1,47
9[b]	*M. quadrifasciata*	27,40	28,85	26,68	27,64	1,11
10[b]	*M. quadrifasciata*	32,04	29,13	30,58	30,58	1,46
11[c]	*M. quadrifasciata*	24,27	21,36	21,84	22,49	1,56
12[b]	*M. rufiventris*	41,75	39,32	42,23	41,10	1,56
13[b]	*M. rufiventris*	28,12	24,27	22,35	24,91	2,94
14[d]	*S. bipunctata*	49,03	51,46	51,46	50,65	1,40
15[b]	*S. xanthotricha*	69,42	69,90	75,24	71,52	3,23
16[c]	*T. clavipes*	54,09	58,17	57,21	56,49	2,13
17[c]	*T. clavipes*	69,90	67,96	69,90	69,25	1,12
18[e]	*T. clavipes*	47,57	44,17	49,02	46,92	2,49
19[b]	*T. clavipes*	39,80	39,80	38,35	39,32	0,84
20[c]	*T. angustula*	35,44	35,44	37,38	36,09	1,12
21[b]	*T. angustula*	68,93	66,99	63,11	66,34	2,96

NOTA: PROCEDÊNCIA GEOGRÁFICA DA AMOSTRA: [a]CURITIBA; [b]GUARAQUEÇABA; [c]BOA ESPERANÇA DO IGUAÇU; [d]MANDIRITUBA; [e]CORNÉLIO PROCÓPIO

Para os extratos fenólicos dos méis, a 1000 μg.mL^{-1}, a atividade antioxidante frente ao DPPH• variou de 14,40% (± 0,74) no mel elaborado por *M. marginata* (amostra 7) a 71,52% (± 3,23) no mel de *S. xanthotricha* (amostra 15). As amostras provenientes das espécies *S. xanthotricha, T. clavipes* e *T. angustula* (15, 17 e 21) apresentaram as maiores capacidades antioxidantes, quando comparadas às demais amostras investigadas no presente trabalho. Como controle positivo, foi testada a atividade antioxidante do ácido ascórbico, ácido gálico e rutina, a 1000 μg.mL^{-1}, sendo verificada uma capacidade antioxidante média de 93,75% (± 0,24), 91,75% (± 0,14) e 87,58% (± 0,60), respectivamente, para esses padrões de antioxidantes. Dessa forma, os resultados sugerem que iguais concentrações dos extratos das amostras 15, 17 e 21, apresentam uma capacidade antioxidante considerável, comparativamente aos antioxidantes ácido ascórbico, ácido gálico e rutina.

O coeficiente de correlação calculado (r = 0,7838) entre a quantidade de fenólicos e a porcentagem de atividade antioxidante frente ao radical DPPH•, está

ilustrado na Figura 02. Essa correlação representa uma tendência de aumento da atividade antioxidante, conforme a elevada concentração de fenólicos da amostra.

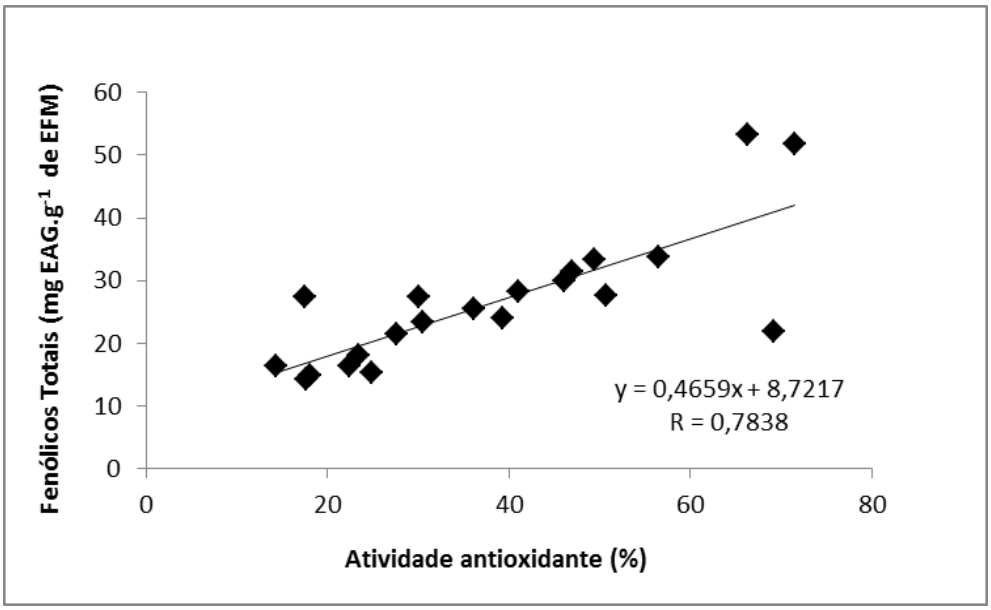

FIGURA 02 – CORRELAÇÃO ENTRE O CONTEÚDO DE FENÓLICOS TOTAIS E A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE FRENTE AO RADICAL DPPH• PARA OS EFMs OBTIDOS A PARTIR DOS MÉIS DE MELIPONÍNEOS EM ANÁLISE

Serra (2007) obervou, em méis portugueses, uma correlação entre o teor de compostos fenólicos, as características antioxidantes e a cor. No entanto, no presente estudo, embora tenha sido estabelecida uma correlação entre o teor de compostos fenólicos e a ação antioxidante, não foi possível observar essa mesma característica considerando a coloração das amostras. Do total de amostras, aproximadamente 81% foram classificadas como sendo de cor âmbar escuro e as demais amostras, apenas 4, foram consideradas como mel de coloração âmbar, não havendo, portanto, uma grande variação na coloração dos méis avaliados que permitisse indicar uma correlação entre a cor, os teores de fenólicos totais e a atividade antioxidante.

Não há relatos na literatura sobre a atividade antioxidante dos méis elaborados pelas espécies de abelhas sem ferrão investigadas nesta pesquisa. No entanto, alguns pesquisadores descreveram o efeito antioxidante para méis produzidos por outras espécies de meliponíneos.

Em estudo realizado por Persano-Oddo e colaboradores (2008) foram avaliados o conteúdo de fenólicos totais e a atividade antioxidante de oito amostras de mel *in natura* produzido pela espécie *T. carbonaria* da Austrália. O teor de fenólicos totais encontrado foi de 55,74 (± 6,11) mg de ácido gálico.100 g^{-1} de mel. A atividade antioxidante, expressa como porcentagem de inibição do radical catiônico $ABTS^{\bullet+}$ foi de 233,96 (± 50,95) μM em equivalentes de Trolox®. A atividade sequestrante de radicais livres apresentada pelo mel, na presença do DPPH•, foi de 48,03 (±12,58) em equivalentes de ácido ascórbico.

Guerrini e colaboradores (2009) determinaram a atividade antioxidante de extratos metanólicos obtidos a partir de méis de diferentes espécies de abelhas sem ferrão (Meliponinae) nativas do Equador e de méis comerciais de *A. mellifera*. Os resultados demostraram que as amostras de mel de meliponíneos apresentaram uma maior atividade antioxidante, quando comparadas às amostras de *Apis,* sendo que a porcentagem de inibição do radical DPPH• foi de 88,1% (± 11,1) e da oxidação do β-caroteno foi de 70,8% (± 8,9). Esses resultados foram obtidos com a concentração mais elevada testada (100 $mg.mL^{-1}$) e foram semelhantes aos apresentados pelo controle positivo BHA, em igual concentração.

Outra investigação, realizada por Oliveira e colaboradores (2012), avaliou os teores de ácidos fenólicos e a atividade antioxidante em méis produzidos por *A. mellifera*, *M. fasciculata* e *Melipona flavolineata* Friese, 1900 da Amazônia. As amostras de mel foram obtidas em quatro municípios do estado do Pará. A atividade antioxidante foi determinada pelo método do DPPH• nas amostras de mel *in natura* e foi expressa em IC_{50}, por meio da análise gráfica que relaciona o percentual de atividade com a concentração da substância ensaiada. Os resultados da atividade antioxidante, em IC_{50}, variaram de 8,87 a 41,76 mg.100 mL^{-1} para as amostras de *A. mellifera*, de 15,58 a 54,43 mg.100 mL^{-1} para as amostras de *M. fasciculata* e de 6,85 a 48,92 mg.100 mL^{-1} para os méis de *M. flavolineata.* O conteúdo de fenólicos totais variou de 36,68 a 154,28, de 25,53 a 88,81 e de 26,39 a 236,71 mg de ácido gálico.100 g^{-1} de mel para as amostras de *A. mellifera*, *M. fasciculata* e *M. flavolineata*, respectivamente. Os méis da espécie *A. mellifera* das regiões de São João de Pirabas e São Miguel do Guamá mostraram melhor inibição do radical DPPH•, tendo maior atividade antioxidante em relação às demais espécies, exceto para méis de *M. flavolineata* da região de São João de Pirabas que obtiveram o melhor percentual de inibição, com média de 6,85%. A correlação entre o valor de

IC_{50} e o conteúdo de fenólicos totais foi estatisticamente significativa, sendo obtido um coeficiente de correlação de 0,87.

Silva e colaboradores (2013) avaliaram a atividade antioxidante do mel produzido pela espécie de abelha sem ferrão *M. subnitida* por três diferentes métodos, que incluíram o efeito antioxidante na oxidação do *β*-caroteno, e a atividade sequestrante dos radicais DPPH• e $ABTS^{•+}$. Os testes foram realizados em nove amostras de mel *in natura*, nos extratos metanólicos e nas frações acetato de etila correspondentes. Todas as amostras avaliadas exibiram atividade anti-radicalar. Os valores de IC_{50} variaram de 10,6 a 12,9 $mg.mL^{-1}$ para o mel *in natura*, 108,5 a 208,6 $\mu g.mL^{-1}$ para o extrato metanólico e 43,5 a 87,8 $\mu g.mL^{-1}$ para a fração acetato de etila no teste do DPPH•. No ensaio de descoloração do radical $ABTS^{•+}$, os resultados de IC_{50} variaram de 6,1 a 9,7 $mg.mL^{-1}$, 21,2 a 53,1 $\mu g.mL^{-1}$ e 13,2 a 33,9 $\mu g.mL^{-1}$, para o mel *in natura*, para o extrato metanólico e para a fração acetato de etila, respectivamente. Os autores concluíram que a atividade antioxidante das amostras de mel estava fortemente correlacionada com o seu conteúdo fenólico.

Dessa forma, é possível indicar que, para as 21 amostras de mel de meliponíneos avaliadas neste estudo, foram encontrados teores de fenólicos totais correlacionados à atividade antioxidante, condizentes aos apontados pela literatura para os extratos fenólicos obtidos a partir de méis produzidos por diferentes espécies de abelhas sem ferrão.

Ensaios baseados no uso dos radicais DPPH• e $ABTS^{•+}$ estão entre os métodos de espectrofotometria mais empregados para a determinação da capacidade antioxidante de alimentos, bebidas e extratos vegetais, pois esses radicais podem reagir diretamente com compostos antioxidantes. Adicionalmente, esses procedimentos são simples, rápidos, sensíveis, reprodutíveis e permitem a análise rápida de um grande número de amostras (AWIKA *et al*., 2003; ÖZÇELIK; LEE; MIN, 2003).

Ao comparar os resultados obtidos a partir dos dois métodos empregados neste estudo, é possível observar que o radical catiônico $ABTS^{•+}$ foi mais sensível à presença de compostos antioxidantes, pois menores concentrações dos extratos apresentaram maior capacidade antioxidante frente ao $ABTS^{•+}$ quando comparada à inibição do radical DPPH•. Isso pode ser explicado pelas características químicas dessas substâncias. O $ABTS^{•+}$ é mais reativo do que o DPPH•, pois ao contrário das reações com radicais DPPH•, em que ocorre a transferência de radicais livres de

hidrogênio, as reações com radicais $ABTS^{\bullet+}$ envolvem um processo de transferência de elétrons (AK; GÜLÇIN, 2008).

5.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os resultados de MIC_{90}, concentração de amostra (m/V) capaz de inibir o crescimento microbiano em 90%, obtidos nos ensaios de atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição em caldo, para as amostras de mel produzidas pelas espécies de abelhas nativas sem ferrão *M*. *bicolor*, *M*. *marginata*, *M*. *quadrifasciata*, *M*. *rufiventris*, *S*. *bipunctata*, *S*. *xanthotricha*, *T*. *clavipes* e *T*. *angustula*, estão sumarizados na Tabela 17.

TABELA 17 – VALORES DE MIC_{90} PARA OS MÉIS ELABORADOS PELAS ESPÉCIES DE MELIPONÍNEOS EM INVESTIGAÇÃO

Amostras	**Origem entomológica**	**MIC_{90} (% m/V)**		
		Escherichia coli	***Staphylococcus aureus***	***Candida albicans***
1[a]	*M*. *bicolor*	25,00	25,00	50,00
2[a]	*M*. *bicolor*	25,00	25,00	50,00
3[b]	*M*. *bicolor*	12,50	12,50	25,00
4[b]	*M*. *bicolor*	12,50	12,50	25,00
5[a]	*M*. *marginata*	25,00	12,50	50,00
6[c]	*M*. *marginata*	25,00	25,00	50,00
7[b]	*M*. *marginata*	12,50	12,50	50,00
8[a]	*M*. *quadrifasciata*	6,25	3,13	25,00
9[b]	*M*. *quadrifasciata*	25,00	50,00	50,00
10[b]	*M*. *quadrifasciata*	12,50	12,50	25,00
11[c]	*M*. *quadrifasciata*	25,00	25,00	50,00
12[b]	*M*. *rufiventris*	25,00	25,00	50,00
13[b]	*M*. *rufiventris*	25,00	50,00	50,00
14[d]	*S*. *bipunctata*	3,12	1,56	12,50
15[b]	*S*. *xanthotricha*	25,00	25,00	50,00
16[c]	*T*. *clavipes*	25,00	25,00	50,00
17[c]	*T*. *clavipes*	12,50	12,50	25,00
18[e]	*T*. *clavipes*	12,50	25,00	25,00
19[b]	*T*. *clavipes*	12,50	25,00	25,00
20[c]	*T*. *angustula*	6,25	6,25	25,00
21[b]	*T*. *angustula*	50,00	50,00	50,00

NOTA: PROCEDÊNCIA GEOGRÁFICA DA AMOSTRA: [a]CURITIBA; [b]GUARAQUEÇABA; [c]BOA ESPERANÇA DO IGUAÇU; [d]MANDIRITUBA; [e]CORNÉLIO PROCÓPIO

É possível observar que os três microrganismos avaliados foram sensíveis as 21 amostras de mel de meliponíneos nas concentrações testadas, sendo que, em

geral, as bactérias *E*. *coli* e *S*. *aureus* mostraram-se mais sensíveis. Além disso, para as amostras codificadas de 1 a 20, foram verificados valores de MIC_{90} mais elevados para a levedura *C*. *albicans* do que aqueles obtidos para *E*. *coli* e *S*. *aureus*, o que indica que esse microrganismo é comparativamente mais resistente à ação dos compostos antimicrobianos presentes nas amostras de mel em avaliação, como previamente já relatado na literatura (DARDÓN; ENRÍQUEZ, 2008; BOORN *et al*., 2010). Apenas a amostra 21, proveniente de *T*. *angustula* apresentou os mesmos valores de MIC_{90} para os três microrganismos.

Os resultados da atividade antimicrobiana evidenciados para os extratos fenólicos elaborados a partir dos méis de abelhas indígenas sem ferrão estão apresentados na Tabela 18.

TABELA 18 – VALORES DE MIC_{90} PARA OS EXTRATOS FENÓLICOS DOS MÉIS ELABORADOS PELAS ESPÉCIES DE MELIPONÍNEOS EM ANÁLISE

EFM	**Origem entomológica**	**MIC_{90} ($mg.mL^{-1}$)**		
		Escherichia coli	***Staphylococcus aureus***	***Candida albicans***
1[a]	*M*. *bicolor*	>10	>10	>10
2[a]	*M*. *bicolor*	>10	10	>10
3[b]	*M*. *bicolor*	>10	>10	>10
4[b]	*M*. *bicolor*	>10	10	>10
5[a]	*M*. *marginata*	>10	>10	>10
6[c]	*M*. *marginata*	>10	10	>10
7[b]	*M*. *marginata*	>10	>10	>10
8[a]	*M*. *quadrifasciata*	>10	10	>10
9[b]	*M*. *quadrifasciata*	>10	>10	>10
10[b]	*M*. *quadrifasciata*	>10	>10	>10
11[c]	*M*. *quadrifasciata*	>10	>10	>10
12[b]	*M*. *rufiventris*	>10	>10	>10
13[b]	*M*. *rufiventris*	>10	>10	>10
14[d]	*S*. *bipunctata*	>10	10	>10
15[b]	*S*. *xanthotricha*	>10	10	>10
16[c]	*T*. *clavipes*	>10	10	>10
17[c]	*T*. *clavipes*	>10	>10	>10
18[e]	*T*. *clavipes*	>10	>10	>10
19[b]	*T*. *clavipes*	>10	10	>10
20[c]	*T*. *angustula*	>10	>10	>10
21[b]	*T*. *angustula*	>10	10	>10

NOTA: PROCEDÊNCIA GEOGRÁFICA DA AMOSTRA: [a]CURITIBA; [b]GUARAQUEÇABA; [c]BOA ESPERANÇA DO IGUAÇU; [d]MANDIRITUBA; [e]CORNÉLIO PROCÓPIO

Nas condições avaliadas, os EFMs revelaram um potencial antimicrobiano menor do que os méis *in natura*. Para 9 amostras de EFM, apenas o crescimento de *S*. *aureus* foi inibido em 90% quando se utilizou 10 $mg.mL^{-1}$. Os microrganismos

E. *coli* e *C*. *albicans* demonstraram-se resistentes à ação dos EFMs nas concentrações testadas.

Com a finalidade de verificar se o efeito osmótico, isoladamente, é capaz de inibir o crescimento de microrganismos, também foi investigada a atividade antimicrobiana de uma solução de açúcares contendo iguais proporções de glicose e frutose. Apenas para *E*. *coli*, foi observada uma inibição do crescimento em 90% quando se utilizou soluções de açúcares em concentração maior ou igual a 50%. Para os microrganismos *S*. *aureus e C*. *albicans*, entretanto, não houve inibição do crescimento nas concentrações testadas. Isso demonstra que a alta pressão osmótica pode exercer um efeito inibidor do crescimento de *E*. *coli.* Porém, o potencial antimicrobiano apresentado pelos méis investigados não pode ser atribuído somente ao efeito osmótico contra *E*. *coli*, pois as amostras foram diluídas inicialmente a 50% (m/V). Nessa diluição, o mel tem a sua concentração de açúcares reduzida à metade. Considerando que o mel produzido por algumas espécies do gênero *Melipona* apresentam um teor médio de açúcares de, aproximadamente, 71% em sua composição (SOUZA *et al*., 2004b), a concentração de açúcares na diluição inicial não ultrapassou 40%, o que, portanto, de forma isolada, não seria suficiente para fornecer os resultados obtidos para esse microrganismo.

No presente estudo, os méis de *M*. *quadrifasciata* (amostra 8), *S*. *bipunctata* (amostra 14) e *T*. *angustula* (amostra 20) foram os que inibiram o crescimento de *E*. *coli* e *S*. *aureus* em menores concentrações, sendo, portanto, os méis de meliponíneos mais interessantes sob o ponto de vista da ação antibacteriana. Além disso, o mel de *S*. *bipunctata* apresentou a menor MIC_{90} para os três microrganismos avaliados, destacando-se, portanto, como o melhor agente antibacteriano e antifúngico, comparativamente aos demais méis investigados.

A partir dos resultados, é possível estabelecer que a ação antimicrobiana não é decorrente somente da espécie de abelha sem ferrão produtora do mel, uma vez que diferentes amostras, elaboradas pelo mesmo meliponíneo, demonstraram um comportamento diferenciado em relação ao efeito analisado. Nesse sentido, a composição química particular de cada amostra, bem como os diferentes aspectos que a influenciam, pode ter apresentado um papel decisivo nessa atividade biológica. Conforme a literatura (WESTON, 2000), a variação na ação antimicrobiana pode ser devida a muitos fatores que afetam a composição química

dos méis, como diferenças no solo e nas condições atmosféricas, bem como relacionados às espécies vegetais que contribuem para a formação desses produtos.

Em termos gerais, existem vários fatores que podem contribuir com a propriedade antimicrobiana do mel, dentre os quais estão a baixa A_w, a alta pressão osmótica, o baixo pH, o sistema glicose/oxidase com formação de H_2O_2, a alta taxa carbono/nitrogênio, o baixo potencial redox relacionado ao alto conteúdo de açúcares redutores, o baixo conteúdo de proteínas, a presença de componentes fitoquímicos e de substâncias voláteis (HOOPER, 1976; WHITE JUNIOR, 1979; MOLAN, 1996; WESTON, 2000; COOPER; MOLAN; HARDING, 2002). Dessa forma, essas diferentes qualidades, em sinergismo, podem ter sido responsáveis pelos efeitos antibacterianos e antifúngicos verificados para os méis de abelhas nativas sem ferrão.

Além disso, o mel produzido pelas abelhas sem ferrão difere em muitos aspectos do mel obtido a partir das abelhas do gênero *Apis*. Os meliponíneos apresentam uma característica particular relevante, pois armazenam o mel em potes de cerume que são feitos de cera combinada com própolis (BALLIVIÁN, 2008), enquanto que a abelha *A. mellifera* armazena o seu mel em favos elaborados somente com cera (PERSANO-ODDO *et al*. 2008). Diante do exposto, ao considerar que o mel de abelha sem ferrão, durante o seu armazenamento, fica em contato com a própolis, rica em resinas de plantas, há a possibilidade de que esses constituintes fitoquímicos sejam infundidos ao mel, conferindo-lhe propriedades antibacterianas, antifúngicas e antivirais (TEMARU *et al*., 2007). Dessa forma, as espécies botânicas que contribuem para a composição da própolis também determinam a composição química do mel, o que pode justificar as diferenças na ação antimicrobiana encontradas para amostras provenientes da mesma espécie de abelha sem ferrão.

Diferentemente do verificado para as amostras de mel de meliponíneos *in natura*, os EFMs indicaram menor efeito antimicrobiano. Weston, Brocklebank e Lu (2000) investigaram o perfil cromatográfico da fração fenólica e a atividade antibacteriana de 19 amostras de mel de manuka (*Leptospermum scoparium* Forst.) e demonstraram que os compostos fenólicos, isoladamente, não são os principais componentes responsáveis pela presença/ausência da atividade antibacteriana. Dessa forma, os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com a

literatura, uma vez que somente um terço dos EFMs, extraídos das amostras de mel de abelhas sem ferrão dos gêneros *Melipona*, *Scaptotrigona*, *Tetragona* e *Tetragonisca*, tiveram uma ação antibacteriana apenas contra *S*. *aureus*. Com isso, é possível postular que os compostos fenólicos tem uma contribuição minoritária e parcial ao efeito antimicrobiano dos méis de meliponíneos, sendo que outros fatores, como mencionados previamente, são fundamentais para explicar essa propriedade nos méis *in natura*.

Dessa forma, e considerando que o mel é uma mistura complexa de compostos químicos, o que inclui carboidratos, derivados fitoquímicos, ácidos orgânicos, dentre outros constituintes, é possível propor que os méis de *Melipona*, *Scaptotrigona*, *Tetragona* e *Tetragonisca* podem ser indicados como alimentos com propriedades funcionais, com aplicação no tratamento de infecções causadas por *E*. *coli*, *S*. *aureus* e *C*. *albicans*. Portanto, os resultados obtidos no presente estudo apoiam uma alegação medicinal para o mel de abelhas nativas sem ferrão, como aquela já atribuída ao mel de *A*. *mellifera*.

5.7 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO EXTRATO FENÓLICO DO MEL DE *Melipona marginata* Lepeletier, 1836

A análise da composição fenólica do extrato metanólico do mel produzido pela abelha sem ferrão *M. marginata* indicou a presença de 11 compostos fenólicos. A amostra apresentou ácidos fenólicos e derivados como ácido benzoico, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, siringato de metila, ácido sinapínico e 1-1 dimetilalil ácido cafeico. Como flavonoides, o extrato do mel de *M. marginata* revelou a presença de miricetina, apigenina, quercetina-3-O-ramnosídeo e canferol. Os dados de cada composto fenólico detectado por HPLC-UV-ESI-MS estão sumarizados na Tabela 19.

TABELA 19 – CONCENTRAÇÕES DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DETECTADOS NO EXTRATO METANÓLICO DO MEL DA ABELHA SEM FERRÃO Melipona marginata Lepeletier, 1836

Tempo de retenção (min)	Composto	Concentração (µg.100 g^{-1} extrato metanólico do mel)
10,2	ácido benzoico	515,48 ± 22,12
11,5	ácido cafeico	3.349,34 ± 35,75
11,9	ácido *p*-cumárico	296,21 ± 13,93
12,4	ácido ferúlico	634,77 ± 28,30
12,8	siringato de metila	597,12 ± 19,18
14,1	ácido sinapínico	160,43 ± 15,67
14,6	1-1 dimetilalil ácido cafeico	257,52 ± 12,55
15,6	miricetina	328,38 ± 15,49
15,9	apigenina	72,42 ± 9,50
16,2	quercetina-3-O-ramnosídeo	832,81 ± 29,32
16,7	canferol	9.559,02 ± 32,09
Conteúdo fenólico total		16.603,50

NOTA: OS COMPOSTOS FENÓLICOS FORAM IDENTIFICADOS POR COMPARAÇÃO DOS DADOS DE ESPECTROSCOPIA DE MASSA COM OS PADRÕES E OS DADOS DA LITERATURA. ALÉM DISSO, OS PADRÕES EXTERNOS FORAM INJETADOS NAS MESMAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS, QUANDO DISPONÍVEIS, A FIM DE COMPARAR OS PERFIS CROMATOGRÁFICOS E O TEMPO DE RETENÇÃO. OS VALORES FORAM EXPRESSOS COMO MÉDIAS (µg.100 g^{-1} DE EXTRATO METANÓLICO DO MEL) ± DP. OS VALORES APRESENTADOS SÃO REPRESENTATIVOS DE TRÊS EXPERIMENTOS INDIVIDUAIS.

Alguns desses compostos fenólicos estão fortemente relacionados com efeitos anti-inflamatórios, como previamente relatados na literatura. Hidroxicinamatos como os ácidos cafeico e ferúlico podem reduzir a inflamação neurovascular e podem inibir a proteína inflamatória de macrófagos-2 (MIP-2) e os níveis de fator de necrose tumoral-alfa (TNF-*α*) em macrófagos estimulados com LPS, respectivamente (LARROSA *et al*., 2009). Flavonois como o canferol podem mostrar o efeito inibitório sobre a NO sintase induzível (iNOS) e cicloxigenase-2 (COX-2) (CRESPO, *et al*., 2008). Flavonas como a apigenina podem demonstrar um efeito inibitório na produção de TNF-*α* decorrente da ativação do fator de transcrição nuclear-kappaB (NF- κB) (FUNAKOSHI-TAGO *et al*., 2011).

Ao considerar que a amostra investigada mostrou um perfil químico particular, em que foram identificados compostos fenólicos com atividade anti-inflamatória previamente descrita, e que um sinergismo entre os compostos pode ser mais expressivo do que o efeito isolado de cada composto, é razoável investigar a atividade anti-inflamatória tópica do extrato metanólico do mel da abelha sem ferrão *M. marginata* em camundongos.

5.8 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA *IN VIVO*

5.8.1 Efeito do extrato do mel de *Melipona marginata* Lepeletier, 1836 (EMM) sobre o edema de orelha, migração celular e estresse oxidativo induzidos por TPA

A atividade anti-inflamatória do extrato obtido a partir da amostra elaborada pela abelha *M. marginata* foi avaliada por meio do modelo de edema de orelha, migração celular e estresse oxidativo em camundongos.

Seis horas após a aplicação do agente flogístico TPA, os animais exibiram edema, representado pelo aumento significativo da espessura da orelha. O edema, induzido por TPA, foi inibido pelo tratamento tópico com o extrato do mel de *M. marginata.* Os resultados apresentados na Figura 03 mostram que o extrato foi capaz de inibir a formação do edema com uma inibição máxima de 54 ± 5% na concnetração de 1,0 mg/orelha. Entretanto, essa resposta inibitória do extrato não apresentou um padrão dependente da concentração administrada. A dexametasona (0,05 mg/orelha), usada como controle positivo, causou uma redução expressiva do edema.

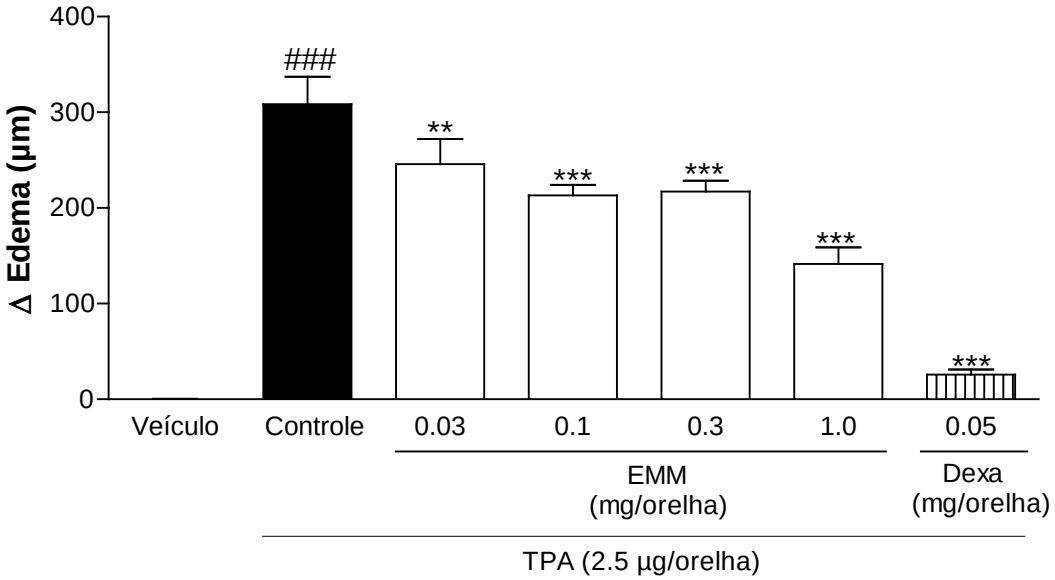

FIGURA 03 – EFEITO DO EXTRATO DO MEL DE *Melipona marginata* Lepeletier, 1836 (EMM) NO EDEMA DE ORELHA INDUZIDO POR TPA. OS ANIMAIS FORAM DESAFIADOS TOPICAMENTE COM O TPA (CONTROLE), COM EXCEÇÃO DO GRUPO VEÍCULO QUE RECEBEU APENAS A APLICAÇÃO DE ACETONA (VEÍCULO). NA SEQUÊNCIA, OS ANIMAIS FORAM TRATADOS COM O EXTRATO (0,03 A 1 mg/ORELHA) E COM A DEXAMETASONA (DEXA, 0,05 mg/ORELHA). AS BARRAS REPRESENTAM A MÉDIA ± EPM (N=5-8) DO AUMENTO DA ESPESSURA DA ORELHA EM MICRÔMETROS. ANOVA, SEGUIDA PELO TESTE *POST-HOC* DE NEWMAN-KEULS. $^{###}p$<0,001 QUANDO COMPARADO AO GRUPO VEÍCULO. $^{**}p$<0,01 E $^{***}p$<0,001 QUANDO COMPARADOS AO GRUPO CONTROLE.

Posteriormente, foi avaliada a atividade da enzima MPO, que é um marcador enzimático da infiltração de leucócitos polimorfonucleares no tecido inflamado, a qual atinge o pico em 24 horas após a aplicação do TPA e, então, decresce lentamente (LLORET; MORENO, 1995). Foram testadas as mesmas concentrações utilizadas no modelo de edema de orelha induzido pelo TPA. A administração tópica de TPA aumentou expressivamente a atividade da enzima MPO. A atividade enzimática foi significativamente reduzida nas orelhas dos animais tratadas com o extrato do mel de *M. marginata*, o qual diminuiu a atividade da MPO em 75 ± 3% a uma concentração de 1,0 mg/orelha (Figura 04). Da mesma forma que na redução do edema de orelha, a resposta inibitória do extrato não apresentou um padrão dependente da concentração administrada. Nesse ensaio, a dexametasona também foi utilizada como controle positivo.

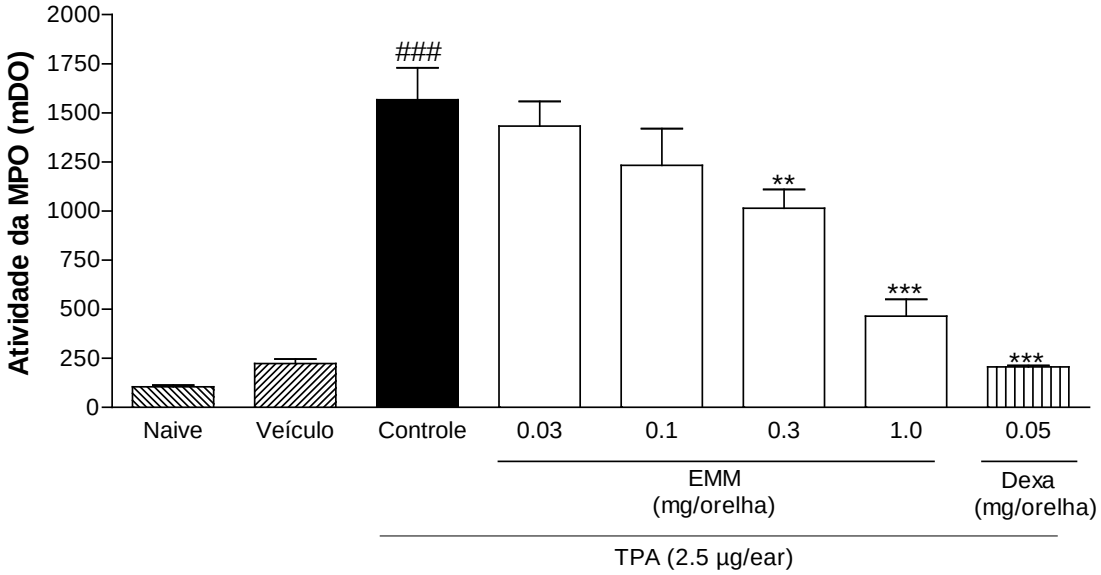

FIGURA 04 – EFEITO DO EXTRATO DO MEL DE *Melipona marginata* Lepeletier, 1836 (EMM) E DEXAMETASONA (DEXA) ADMINISTRADOS POR VIA TÓPICA SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE (MPO) NO SOBRENADANTE DE HOMOGENATOS DE ORELHAS SUBMETIDAS AO TPA. OS ANIMAIS FORAM DESAFIADOS COM TPA (CONTROLE), COM EXCEÇÃO DO GRUPO VEÍCULO, QUE RECEBEU A APLICAÇÃO DE ACETONA (VEÍCULO), E DO GRUPO NAIVE. A ATIVIDADE DA MPO FOI AVALIADA 24 H APÓS A ADMINISTRAÇÃO DO TPA. A ATIVIDADE ENZIMÁTICA FOI QUANTIFICADA POR MEIO DE LEITOR DE PLACA (λ=620 nm). CADA BARRA REPRESENTA A MÉDIA ± EPM. (N= 5-8). ANOVA, SEGUIDA PELO TESTE *POST-HOC* DE NEWMAN-KEULS. $^{###}$ p< 0,001 QUANDO COMPARADO AO GRUPO VEÍCULO. **p<0,01 E ***p<0,001 QUANDO COMPARADOS AO GRUPO CONTROLE.

O edema também foi avaliado por meio da análise histológica das orelhas dos camundongos. A análise por microscopia óptica, 24 horas após a indução da inflamação com TPA, revelou aumento na espessura da orelha com evidente formação de edema (Figura 05 – C). O edema foi reduzido com a administração tópica de 1,0 mg/orelha do extrato do mel de *M. marginata* (Figura 05 – D), bem como por 0,05 mg/orelha de glicocorticoide dexametasona (Figura 05 – E). O grupo que recebeu apenas veículo não mostrou nenhuma mudança, mantendo-se intacto, assim como o naive (Figura 05 – A e B).

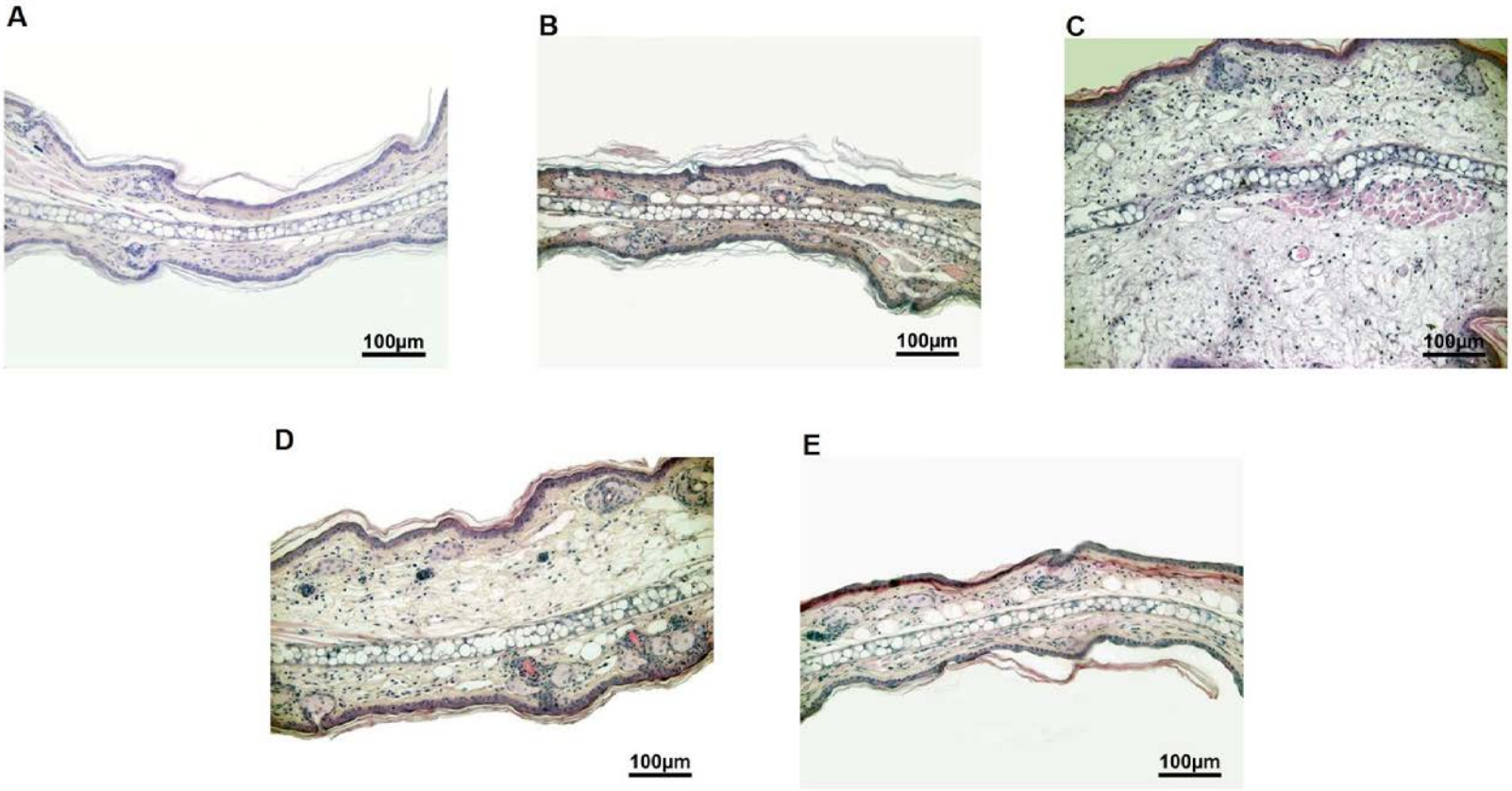

FIGURA 05 – ANÁLISE HISTOLÓGICA DO EFEITO DO EXTRATO DO MEL DE *Melipona marginata* Lepeletier, 1836 SOBRE O EDEMA E A INFILTRAÇÃO LEUCOCITÁRIA NO MODELO DE EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELA APLICAÇÃO TÓPICA DE TPA. FOTOS REPRESENTATIVAS DE CORTES TRANSVERSAIS (3–4μm) DE ORELHAS DE CAMUNDONGOS CORADAS COM HEMATOXILINA-EOSINA (AUMENTO DE 200X, ESCALA DE 100 μm) COLETADAS APÓS A APLICAÇÃO DO TPA. (A) NAIVE, (B) VEÍCULO, (C) CONTROLE (TPA), (D) EXTRATO DO MEL DE *M. marginata* (1,0 mg/ORELHA), (E) DEXAMETASONA (0,05 mg/ORELHA).

A aplicação de TPA promoveu um aumento da produção de ROS na orelha dos camundongos, 6 horas após a sua administração. Quando o extrato do mel de *M. marginata* foi administrado topicamente, a produção de ROS foi reduzida em 55 ± 14%, a uma concentração de 1,0 mg/orelha. A administração de dexametasona (0,05 mg/orelha) também foi capaz de reduzir significativamente a produção de ROS promovida por TPA (Figura 06).

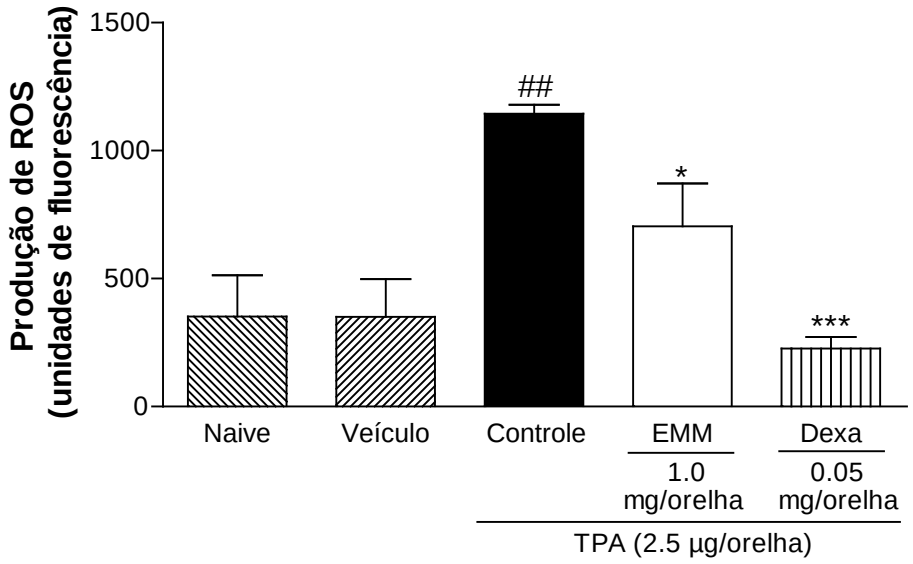

FIGURA 06 – EFEITO DO EXTRATO DO MEL DE *Melipona marginata* Lepeletier, 1836 (EMM) E DEXAMETASONA (DEXA) ADMINISTRADOS POR VIA TÓPICA SOBRE A PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS), INDUZIDA PELA APLICAÇÃO TÓPICA DO TPA. OS ANIMAIS FORAM DESAFIADOS COM TPA (CONTROLE), COM EXCEÇÃO DO GRUPO VEÍCULO, QUE RECEBEU A APLICAÇÃO DE ACETONA (VEÍCULO), E DO GRUPO NAIVE. A PRODUÇÃO DE ROS FOI AVALIADA EM HOMOGENTATOS DE ORELHAS 6 H APÓS A ADMINISTRAÇÃO DO TPA. A INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA FOI MENSURADA POR MEIO DE ESPECTROFLUOROFOTÔMETRO (λ = 485 nm – EXCITAÇÃO; λ = 530 nm – EMISSÃO). CADA BARRA REPRESENTA A MÉDIA ± EPM. (N = 5-8). ANOVA, SEGUIDA PELO TESTE *POST-HOC* DE NEWMAN-KEULS. $^{\#\#}p<$ 0,01 QUANDO COMPARADO AO GRUPO VEÍCULO. $^{*}p<0,05$ E $^{***}p<0,001$ QUANDO COMPARADOS AO GRUPO CONTROLE.

A avaliação da atividade anti-inflamatória de produtos naturais pode ser realizada por diversos modelos experimentais inflamatórios. Esses modelos permitem identificar compostos com ação anti-inflamatória, os quais podem ser empregados no tratamento de doenças inflamatórias, considerando que tais modelos promovem condições semelhantes às observadas em alguns tipos de dermatites (BOUCLIER *et al.*, 1990). No presente trabalho, o extrato do mel de *M. marginata* foi avaliado quanto a um possível efeito anti-inflamatório por meio do modelo experimental de inflamação aguda induzida pelo TPA. O controle positivo utilizado nesse estudo foi a dexametasona, um glicocorticoide notoriamente reconhecido por sua potente ação anti-inflamatória. Os resultados desse estudo demonstraram que o extrato, quando aplicado topicamente, foi efetivo na redução do edema de orelha promovido pela aplicação tópica do TPA.

O agente irritante TPA é um composto presente no óleo de cróton (*C. tiglium*). Destaca-se por ser um potente agente flogístico e promotor de tumor capaz de desencadear uma resposta inflamatória e hiperproliferativa muito intensa, semelhante a algumas doenças cutâneas (GÁBOR, 2003; GÁBOR, 2001). A resposta inflamatória cutânea, provocada pela aplicação tópica de TPA, é caracterizada por vasodilatação e desenvolvimento de eritema nas primeiras duas horas, acompanhado do aumento da espessura da orelha como consequência do extravasamento celular, que alcança um pico máximo na sexta hora e tende a diminuir, atingindo os valores basais após 24 horas. Entre a quarta e a sexta hora, é possível constatar a aderência dos leucócitos polimorfonucleares na parede dos vasos e a degranulação de mastócitos. Contudo, a infiltração máxima de leucócitos no tecido é atingida somente 24 horas após a administração tópica do TPA (YOUNG; WAGNER; SPIRES, 1983).

O TPA desencadeia a ativação da proteína quinase C (PKC), bem como a ativação da via das proteíno-quinases ativadas por mitógenos (MAPK), fosfolipase A2 (PLA2), indução da expressão da COX-2 e translocação/ativação da LOX, que culmina na síntese e liberação de múltiplos mediadores pró-inflamatórios, aos quais se atribui o desenvolvimento do edema, migração leucocitária e hiperproliferação celular (MURAKAWA *et al.*, 2006; DE BERNARDIS *et al.*, 1994). A ativação da via MAPK pela PKC causa a ativação de alguns fatores de transcrição nuclear, como NF-κB e o ativador proteico-1 (AP-1). Esses fatores de transcrição nuclear têm uma função central na regulação de várias proteínas pró-inflamatórias, como algumas

citocinas (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF-*α*), moléculas de adesão e enzimas pró-inflamatórias (COX-2, iNOS) (PASCUAL; GLASS, 2006; GLASS; OGAWA, 2006; GARCIA-PIÑERES *et al.*, 2001). Por outro lado, a fosforilação da PLA2 pela PKC resulta na liberação de ácido araquidônico, seguida da produção de prostaglandinas e leucotrienos via COX e LOX, respectivamente (WANG *et al.*, 2000).

Outros parâmetros inflamatórios envolvidos em diversas doenças cutâneas também podem ser avaliados por meio do modelo de edema de orelha induzido pelo TPA. Nesse sentido, destaca-se a avaliação da infiltração leucocitária no tecido lesado durante uma resposta inflamatória aguda (WINYARD, 2003; GÁBOR, 2001). Os neutrófilos são as primeiras células que se deslocam para a região exposta a um estímulo nocivo. Na região de inflamação, os neutrófilos liberam várias substâncias, tais como ROS, mediadores pró-inflamatórios e enzimas proteolíticas, como a MPO, colaborando para a manutenção do processo inflamatório (BRADLEY *et al.*, 1982).

Para aprofundar a investigação do efeito anti-inflamatório do extrato do mel de *M. marginata*, foi determinada a influência do tratamento tópico na migração leucocitária. Os resultados referentes à atividade da MPO e às análises histológicas demostraram claramente que o extrato foi capaz de interferir na infiltração dessas células.

A MPO, presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, reage com peróxido de hidrogênio e ânion cloro, em concentrações fisiológicas, para produzir ácido hipocloroso (HClO), o qual é um potente oxidante citotóxico relacionado ao dano tecidual provocado pelos neutrófilos na inflamação, bem como a uma ação antimicrobiana (ROMAN, 2006). Dessa forma, a enzima MPO é um importante marcador da presença de leucócitos polimorfonucleares na região de inflamação, considerando que a avaliação de sua atividade está diretamente relacionada à quantidade de células infiltradas no tecido inflamado (BRADLEY *et al.* 1982). Postula-se que a inibição da atividade da MPO quando da administração de um composto pode estar relacionada à inibição direta dessa enzima, à diminuição de neutrófilos no tecido inflamado, ou ainda à redução da disponibilidade de seu substrato (H_2O_2) (ARNHOLD, 2003).

Nas doenças inflamatórias, os níveis de ROS estão consideravelmente aumentados, contribuindo para o dano tecidual e a exacerbação do processo inflamatório (PÉREZ-GARCIA, 1996). Nesse contexto, teve-se por objetivo a avaliação da atividade antioxidante do extrato do mel de *M. marginata* por meio da

determinação indireta da formação de ROS. Os resultados obtidos para essa avaliação confirmaram a atividade antioxidante desse extrato no modelo do TPA, a qual pode ser explicada pela presença dos constituintes fenólicos. Os fenólicos estão entre os compostos fitoquímicos que podem apresentar seus efeitos antioxidantes, diminuindo o estresse oxidativo e suas consequências (SHAHIDI, 2004). O efeito antioxidante dos compostos fenólicos é devido, diretamente, à ação sequestrante de radicais livres (SHAHIDI, 2000, WETTASINGHE; SHAHIDI 1999a,b) e, indiretamente à quelação de íons metálicos pró-oxidantes. A quelação do íon metálico exige, geralmente, a *orto*-hidroxilação do anel fenila nos ácidos fenólicos e flavonoides ou a presença do grupo 3- ou 5-hidroxila nos flavonoides (WETTASINGHE; SHAHIDI, 2002). No entanto, também é importante considerar que a inibição da infiltração de leucócitos na derme promovida pelo extrato poderia ser o mecanismo dominante na diminuição das ROS, uma vez que os neutrófilos, quando ativados, são responsáveis por uma produção bastante intensa dessas espécies reativas (NAKAMURA *et al*., 2003). Entretanto, neste trabalho também foi confirmado que o extrato do mel de *M. marginata* apresenta atividade antioxidante direta frente aos radicais $ABTS^{\bullet+}$ e DPPH•.

As ROS produzidas por via endógena ou exógena tendem a causar um dano oxidativo no DNA, bem como a desregulação de vias de sinalização celular que estão envolvidas nos estágios da carcinogênese. A aplicação tópica do TPA na pele de camundongos resulta em alterações bioquímicas, mudanças nas funções celulares e alterações histológicas, dentre as quais incluem edema, hiperplasia epidérmica, inflamação, proliferação celular e estresse oxidativo (FURSTENBERGER; SORG; MARKS, 1983) que podem acarretar na promoção de tumor cutâneo (HO *et al*., 2007). Essas alterações são consideradas marcadores da promoção de tumor na pele, sendo utilizados na avaliação do potencial quimiopreventivo de agentes contra a tumorogênese (SLAGA, 1984). As características do extrato do mel de *M. marginata*, no que se refere ao fato de inibir a formação de ROS durante o processo inflamatório, bem como atuar sobre outros parâmetros, apontam para a possibilidade de atuar na prevenção de doenças relacionadas com um desequilíbrio do estado oxi-redutivo em nível celular, como por exemplo, o câncer de pele.

O mel, por apresentar uma constituiição complexa, rica em compostos bioativos, é uma interessante fonte de substâncias com ação anti-inflamatória.

Nesse sentido, a atividade anti-inflamatória de diferentes tipos de méis e de seus extratos tem sido amplamente pesquisada.

Em um estudo realizado por Bilsel *et al*. (2002) foi comprovado que a ingestão de mel causou diminuição da inflamação em um modelo experimental de colite inflamatória em ratos, sendo que a administração de mel foi tão eficaz como o tratamento com prednisolona no modelo estudado.

Al-Waili e Boni (2003) determinaram a ação anti-inflamatória em humanos, após a ingestão de 70 g de mel. Os efeitos foram observados pela concentração plasmática média de tromboxano B_2, a qual foi reduzida em 7%, 34%, e 35%, e a de PGE_2, diminuída em 14%, 10% e 19% em 1, 2 e 3 horas, respectivamente, após a ingestão de mel. O nível de $PGF_{2\alpha}$ foi diminuído em 31% em 2 horas e em 14% em 3 horas, após a ingestão do produto. No décimo quinto dia, as concentrações plasmáticas de tromboxano B_2, PGE_2 e $PGF_{2\alpha}$ diminuíram em 48%, 63% e 50%, respectivamente.

Van den Berg e colaboradores (2008) avaliaram as propriedades antioxidante e anti-inflamatória *in vitro* de méis de diferentes origens botânicas com o objetivo de selecionar a variedade mais ativa para ser empregada no desenvolvimento de um produto para o tratamento de feridas. Os testes incluíram duas amostras de méis já empregados na composição de produtos comerciais cicatrizantes, sendo uma do mel unifloral de manuka (*L. scoparium*) produzido na Nova Zelândia e a outra do mel multifloral especial (*miel de abeja orgánica*) proveniente do Chile. As outras variedades testadas foram duas amostras do mel de trigo-mourisco (*Fagopyrum esculentum* Moench) produzidas nos estados de Nova Iorque e Dakota do Norte (EUA); duas variedades exóticas do Havaí (EUA), o mel de macadâmia (*Macadamia integrifolia* Maiden & Betche) e o mel de *kiawe* [*Prosopis pallida* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) Kunth]; e a última amostra foi obtida a partir de uma mistura do mel de trevo (*Trifolium* spp.) e do mel de alfafa (*Medicago sativa* L.), provenientes do Canadá. As amostras de mel foram testadas em ensaios de inibição da produção de ROS por neutrófilos polimorfonucleares humanos ativados. A atividade antioxidante foi determinada pela eliminação de ânion superóxido em um sistema isento de células. A inibição do sistema complemento foi avaliada pela redução dos níveis de ROS, limitando a formação de fatores de complemento que atraem e estimulam os polimorfonucleares. Comparado aos méis de outras origens florais, o mel de trigo-mourisco proveniente de Nova

Iorque demonstrou os melhores resultados para as atividades avaliadas. Os autores concluíram que as propriedades apresentadas por essa amostra de mel derivam, principalmente, dos seus constituintes fenólicos. Além disso, em experimentos clínicos iniciais, foi demonstrado que o produto desenvolvido (MelMax), contendo esse mel, apresentou resultados promissores, quando aplicado em feridas provocadas por queimaduras e em úlceras venosas de membros inferiores.

Foi demonstrado que o mel produzido na Malásia pela abelha *A. mellifera* (Gelam) é capaz de estimular os fibroblastos, ativar a epitelização e acelerar a cicatrização de feridas. Além disso, possui atividade antibacteriana frente ao *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), bem como apresenta uma elevada capacidade antioxidante e sequestrante de radicais livres (Aljadi; Kamaruddin, 2004). Nesse sentido, Kassim *et al*. (2010) investigaram os efeitos do mel Gelam e seus extratos sobre a inflamação em modelos animais. O edema de pata em ratos foi induzido com carragenina, nos modelos de inflamação não imune e nociceptivo, e com LPS no modelo inflamatório imune. O mel e seus extratos foram capazes de inibir o edema e a dor, bem como apresentaram potentes atividades inibitórias contra mediadores inflamatórios, NO e PGE_2, em ambos os modelos.

Outro estudo, realizado no Nepal, investigou as propriedades anti-inflamatórias do mel na mucosite induzida por radiação oral. Os autores concluíram que o mel aplicado topicamente na mucosa oral de pacientes submetidos à terapia por radiação trouxe um benefício considerável por meio da limitação da severidade da inflamação (KHANAL; BALIGA; UPPAL, 2010).

Considerando investigações acerca do potencial anti-inflamatório de méis de meliponíneos, apenas o estudo realizado por Alves *et al*. (2008) relata o efeito da aplicação tópica do mel da abelha silvestre *M. subnititda* em feridas infectadas na pele de ratos. Nessa pesquisa, ratos Wistar foram submetidos à exérese de segmento de 1 cm^2 de pele total do dorso. Os ratos do grupo C (não infectado) foram tratados com solução salina sobre a ferida, diariamente. No grupo MEL (não infectado), as feridas também tratadas com mel uma vez ao dia. Nos grupos C/I e MEL/I as feridas foram inoculadas com uma solução polimicrobiana. Caracterizada a infecção, as feridas foram tratadas com solução salina e mel, respectivamente. Culturas microbianas foram feitas 24 horas após a inoculação e ao final do terceiro dia de tratamento das feridas. Após a epitelização, foi contado o tempo de cicatrização e as feridas foram biopsiadas para histopatologia e dosagem de TNF-*α*,

IL-1*β* e IL-6 no tecido. O tempo médio de cicatrização do grupo MEL/I foi menor que nos demais grupos ($p < 0,05$). Verificou-se que a densidade de colágeno, leucócitos, fibroblastos e a dosagem de citocinas (especialmente TNF) foram maiores no grupo infectado e tratado com mel, quando comparado aos demais grupos. Houve significante redução de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas nas feridas após o tratamento com mel. Dessa forma, os autores concluíram que o uso tópico do mel de *M. subnitida* em feridas infectadas da pele de ratos estimulou a resposta imunológica, reduziu a infecção, bem como o tempo de cicatrização.

Em síntese, o tratamento tópico com o extrato fenólico obtido a partir do mel de *M. marginata* apresentou uma atividade anti-inflamatória, reduzindo o edema, a migração de leucócitos e a produção de ROS na pele de camundongos após a aplicação do TPA. No entanto, é muito cedo para propor o mecanismo pelo qual esse extrato exerce a sua atividade anti-inflamatória. O conteúdo fenólico do extrato metanólico do mel de *M. marginata* pode influenciar uma ou mais etapas da cascata inflamatória induzida por TPA, tais como a ativação de PKC e PLA2, a indução da COX-2, e a produção e liberação de citocinas (GÁBOR, 2001; DE YOUNG *et al*., 1989). Uma vez que a presença de diversos compostos fenólicos com atividade anti-inflamatória foi observada na composição química do extrato do mel de *M. marginata*, como previamente descrito na literatura, (FUNAKOSHI-TAGO *et al*., 2011; LARROSA *et al*. 2009; CRESPO, *et al*., 2008), a sua atividade anti-inflamatória tópica pode ser explicada por um efeito sinérgico dos componentes fenólicos identificados na amostra.

Esses resultados proveem uma base experimental para a utilização do mel de *M. marginata* em inflamações da pele e podem abrir o caminho para o desenvolvimento futuro de oportunidades terapêuticas contra o processo inflamatório utilizando produtos naturais.

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos para as 21 amostras de mel de meliponíneos, elaboradas por *M. bicolor*, *M. marginata*, *M. quadrifasciata*, *M. rufiventris*, *S. bipunctata*, *S. xanthotricha*, *T. clavipes* e *T. angustula*, provenientes do estado do Paraná, foi possível concluir que:

Os méis de meliponíneos apresentaram características físicas e químicas que não contemplam na totalidade as exigências estabelecidas pela legislação vigente para o mel *de A. mellifera*. Esses resultados reforçam a necessidade de se implantar uma padronização específica para o mel produzido pelas abelhas sem ferrão.

As famílias mais representativas nos espectros polínicos das amostras avaliadas foram Anacardiaceae, Arecaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Melastomataceae/Combretaceae, Myrtaceae, Rubiaceae, Salicaceae e Solanaceae.

Com relação à origem botânica dos méis, por meio da análise polínica, apenas duas amostras foram classificadas como sendo de origem monofloral, produzidas a partir de *Mimosa scabrella* e de *Banara* spp. As outras 19 amostras foram consideradas de origem heterofloral, apresentando três ou mais *taxa* botânicos.

Considerando o processo de extração dos EFMs, não foi possível estabelecer uma correlação entre a origem entomológica do mel e a quantidade de extrato obtido.

Não foi observada uma relação de proporcionalidade entre a atividade antioxidante das amostras de mel *in natura* e de seus extratos. Os teores de compostos fenólicos e a atividade antioxidante estão de acordo com os resultados da literatura para outras espécies de meliponíneos, apresentando uma correlação positiva entre os dois parâmetros.

Todas as amostras de mel *in natura* apresentaram atividade antimicrobiana contra cepas de *E*. *coli*, *S*. *aureus* e *C*. *albicans*. De forma comparativa, a amostra de mel de *S*. *bipunctata* demonstrou ser o melhor agente antimicrobiano. Os EFMs indicaram reduzido efeito antimicrobiano, em relação aos méis de meliponíneos.

Foram identificados 11 compostos fenólicos no extrato metanólico do mel produzido pela abelha sem ferrão *M. marginata*. Esse extrato, quando aplicado topicamente, demonstrou um efeito anti-inflamatório, confirmado pela redução do edema, da migração leucocitária e da produção de ROS na pele de camundongos.

REFERÊNCIAS

AK, T.; GÜLÇIN, Í. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. **Chemico-Biological Interactions**, v.174, p.27–37, 2008.

ALEXANDER, B. A.; MICHENER, C. D. Phylogenetic studies of the families of short-tongued bees (Hymenoptera: Apoidea). **The University of Kansas Science Bulletin**, Lawrence, v. 55, p. 377–424, 1995.

ALJADI, A.M.; KAMARUDDIN, M.Y. Evaluation of the phenolic contents and antioxidante capacities of two Malaysian floral honeys. **Food Chemistry**, v. 85, p.513–518, 2004.

ALMEIDA-ANACLETO, D. de. **Recursos alimentares, desenvolvimento das colônias e características físico-químicas, microbiológicas e polínicas de mel e cargas de pólen de meliponíneos, do município de Piracicaba, estado de São Paulo.** 2007,133f. Tese Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

ALMEIDA-ANACLETO, D. de; SOUZA, B de A.; MARCHINI, L. C.; MORETI, A. C. de C. C. Composição de amostras de mel de abelha Jataí (*Tetragonisca angustula* Latreille, 1811). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, p.535–541, 2009.

ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; BASTOS, D.H.M.; MATSUDA, A.H. Amazon Melipona honey quality control. In: **VI International Food Data Conference: Food Compositions and the Nutrition Dilema**, 2005, Pretoria. VI International Food Data Conference: Food Compositions and the Nutrition Dilema, 2005.

ALMEIDA-MURADIAN, L. B.; MATSUDA, A. M.; BASTOS, D. H. M. Physicochemical parameters of amazon melipona honey. **Química Nova**, v. 30, p. 707–708, 2007.

AL, M. L.; DANIEL, D.; MOISE, A.; BOBIS, O.; LASLO, L.; BOGDANOV, S. Physicochemical and bioactive properties of different floral origin honeys from Romania. **Food Chemistry**, v. 112, p. 863–867, 2009.

ALVAREZ-SUAREZ, J. M.; GIAMPIERI, F.; GONZÁLEZ-PARAMÁS, A. M.; DAMIANI, E.; ASTOLFI, P.; MARTINEZ-SANCHEZ, G.; BOMPADRE, S.; QUILES, J. L.; SANTOS-BUELGA, C.; BATTINO, M. Phenolics from monofloral honeys protect human erythrocyte membranes against oxidative damage. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, 1508–1516, 2012.

ALVES, D. F. S.; CABRAL JÚNIOR, F. das C.; CABRAL, P. P. de A. C.; OLIVEIRA JÚNIOR, R. M. de ; REGO, A. C. M. do; MEDEIROS, A. C. Efeitos da aplicação tópica do mel de *Melipona subnitida* em feridas infectadas de ratos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 35, p. 188–193, 2008.

ALVES, R. M. O.; CARVALHO, C. A. L.; SOUZA, B. A. Espectro polínico de amostras de mel de *Melipona mandacaia* Smith, 1863 (Hymenoptera: *Apidae*). **Acta Scientiarum - Biological Sciences**, v. 28, n. 1, p. 65–70, 2006.

ALVES, R. M. O.; CARVALHO; C. A. L.; SOUZA, B. A; MARCHINI, L. C. Características físico-químicas de amostras de mel de *Melipona mandacaia* Smith (Hymenoptera: Apidae). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 644–650, 2005.

ALVES, R. M. O.; SOUZA, B. A.; CARVALHO, C. A. L.; JUSTINA, G. D.. **Custo de produção de mel: uma proposta para abelhas africanizadas e meliponíneos**. 1 ed. Série meliponicultura-nº 02. Cruz das Almas: Universidade Federal da Bahia/SEAGRI-BA, 2005. 14p.

AL-WAILI, N. S.; BONI, N. S. Natural honey lowers plasma prostaglandin in normal individuals. **Journal of Medicinal Food**, v. 6, p.129–133, 2003.

AL-WAILI, N. S.; SALOM, K.; BUTLER, G.; AL GHAMDI, A. A. Honey and microbial infections: a review supporting the use of honey for microbial control. **Journal of Medicinal Food**, v.14, p. 1079–1096, 2011.

ANDRADE E SILVA, R. C. P. de. **Apicultura** – Mundo, Brasil, Paraná. Curitiba: Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento, 2003. 38 p.

ANDRADE, J. P.; COSTA, S. N.; SANTANA, A. L. A.; SANTOS, P. C.; ALVES, R. M. de O.; CARVALHO, C. A. L. Perfil polínico do mel de *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae) proveniente de colônias instaladas em área de agricultura familiar na Bahia. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 4, n. 2, 2009, p. 636–640.

ANKLAM, E. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. **Food Chemistry**, v. 63, n. 4, p. 549–562, 1998.

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

ARNHOLD, J. Free radicals – Friends or foes? Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. **Biochemistry**, v. 69, n. 1, p. 4–9, 2003.

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

AWIKA, J. M.; ROONEY, L. W.; WU, X.; PRIOR, R. L.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Screening methods to measure antioxidant activity of Sorghum (*Sorghum bicolor*) and Sorghum product. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 6657–6662, 2003.

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

BALLIVIÁN, J. M. P. P. **Abelhas nativas sem ferrão**. São Leopoldo: Oikos, 2008. 128 p.

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

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

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

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

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

BAWA, K.S. Plant-pollinator interactions in tropical rain forests. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 21, p. 399–422, 1990.

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

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

BIJLSMA, L.; BRUIJN, L.L.M.; MARTENS, E.P.; SOMMEIJER, M.J. Water content of stingless bee honey (Apidae, Meliponini): Interspecific variation and comparison with honey of *Apis mellifera*. **Apidologie**, v. 37, p. 480–486, 2006.

BILSEL, Y.; BUGRA, D.; YAMANER, S.; BULUT, T.; CEVIKBAS, U.; TURKOGLU, U. Could honey have a place in colitis therapy? Effects of honey, prednisolone, and disulfiram on inflammation, nitric oxide, and free radical formation. **Digestive Surgery**, v.19, p.306–311, 2002.

BOGDANOV, S.; JURENDIC, T.; SIEBER, R.; GALLMANN, P. Honey for nutrition and health: a review. **American Journal of the College of Nutrition**, v. 27, p. 677–689, 2008.

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

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

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

BOORN, K. L.; KHOR, Y. Y.; SWEETMAN, E.; TAN, F.; HEARD, T. A.; HAMMER, K. A. Antimicrobial activity of honey from the stingless bee *Trigona carbonaria* determined by agar diffusion, agar dilution, broth microdilution and time-kill methodology. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, p. 1534–1543, 2010.

BORSATO, D. M.; CRUZ, M. C. R. da; ALMEIDA, M. M. de Atividade antimicrobiana de méis comercializados na Região dos Campos Gerais – Paraná. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.10, n.1, 2009.

BORSATO, D. M.; VARGAS, T; KOOP, L.; FARAGO, P. V.; ALMEIDA, M. M. de. Physicochemical quality control of bee honeys from Campos Gerais region of Paraná – Brazil. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 28, n. 2, p. 205–212, 2010.

BOUCLIER, M.; CAVEY, D.; KAIL, N.; HENSBY, C. Experimental models in skin pharmacology. **Pharmacology Review**, v. 42, p. 127–154, 1990.

BRADLEY, P. P.; PRIEBAT, D.A.; CHRISTENSEN, R.D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 78, p. 206–209, 1982.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **Portaria nº 451, de 19 de setembro de 1997.** Critérios e padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php> e em: <http://extranet.agricultura.gov.br/consultasislegis/do/consultaLei?op=viewTextual&codigo=85> Acesso em: 12/05/2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000.** Regulamento Técnico de identidade e qualidade do mel. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/consultasislegis/do/consultaLei?op=viewTextual&codigo=7797> Acesso em: 12/05/2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Resolução RDC 12, de 02 de janeiro de 2001.** Padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=144&word=> Acesso em: 12/05/2012.

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

BROSI, B. The complex responses of social stingless bees (Apidae: Meliponini) to tropical deforestation. **Forest Ecology and Management**, v. 258, p. 1830–1837, 2009.

CÁMARA, J. Q.; SOUSA, A. H. ; VASCONCELOS, W. E. ; FREITAS, R. S.; MAIA, P. H. S.; ALMEIDA, J. C.; MARACAJÁ, P. B. Estudos de meliponíneos, com ênfase a *Melipona subnitida* D. no município de Jandaíra, RN. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**. v. 4, n. 1, p. 1–19, 2004.

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

CASSINO, R.; MEYER, K. E. B. Morfologia de grãos de pólen e esporos de níveis holocênicos de uma vereda do Chapadão dos Gerais (Buritizeiro, Minas Gerais), Brasil. **Journal of Geoscience**, v. 7, p. 41–70, 2011.

CECCHI, H.M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2.ed. Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 2003.

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

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

CODEX ALIMENTARIUS COMISSION. **Revised Codex Standard for Honey.** Codex Stan 12 – 1981, 2. Ver., 2001. 7p. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.net/web/standard_list.do?lang=em>. Acesso em: 10/05/2012.

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

COOPER, R.A.; MOLAN, P.C.; HARDING, K.G. The sensitivity to honey of Gram-positive cocci of clinicance isolated from wounds. **Journal of Applied Microbiology**, v.93, p. 857–863, 2002.

CORTOPASSI-LAURINO, M.; GELLI, D. S. Analyse pollinique, propriétés physico-chimiques et action des mieis d'abellies africanisées *Apis mellifera* et de Méliponinés du Brésil. **Apidologie**, v.22, p.61–73, 1991.

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

CORBET, S. A.; WILLIAMS, I. H.; OSBORNE, J. L. Bees and the pollination of crops and wild flowers in the European Community. **Bee World**, Cardiff, v. 72, n. 2, p. 47–59, 1991.

CORTEZ, H. **Agrotóxicos matam abelhas e envenenam nossa alimentação**. Ecodebate, cidadania & meio ambiente, 2008. Disponível em: <http://www.ecodebate.com.br/2008/09/01/agrotoxicos-matam-abelhas-e-envenenam-nossa-alimentacao> Acesso em: 25/03/2012.

COSTANZA, R.; D'ARGE, R.; GROOT, R.; FARBERK, S.; GRASSO, M.; HANNON, B.; LIMBURG, K.; NAEEM, S.; O'NEILL, R. V.; PARUELO, J.; RASKIN, R. G.; SUTTONKK, P.; VAN DER BELT, M. The value of the world's ecosystem services and natural capital. **Nature**, v. 387, p. 253–260, 1997.

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

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

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

CRESPO, I.; GARCÍA-MEDIAVILLA, M. V.; GUTIÉRREZ, B.; SÁNCHEZ-CAMPOS, S.; TUÑÓN, M. J.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J. A comparison of the effects of kaempferol and quercetin on cytokine-induced pro-inflammatory status of cultured human endothelial cells. **British Journal of Nutrition**, v. 100, p. 968–976, 2008.

CUSHNIE, T.; LAMB, A. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, p.343–356, 2005.

DARDÓN, M. J; ENRÍQUEZ, E. Caracterización fisicoquímica y antimicrobiana de la miel de nueve especies de abejas sin aguijón (Meliponini) de Guatemala. **Interciencia**, v. 33, p. 916–922, 2008.

DE BERNARDIS, L.; LEONARDI, G.; CARUSO, A.; CUTULI, V.M; ARNICO-ROXAS, M. Protective effects of papavarine salicylate in mouse ear dermatitis and PAF-induced rat paw oedema. **Agents and Actions**, v. 42, n.1-2, p.29–33, 1994.

DELAPLANE, K. S., MAYER, D. E. Crop Pollination by Bees. CABI Publishing, Wallingford, 2000, 360 p.

DE YOUNG, L. M.; KHEIFETS, J.B.; BALLARON, S.J.; YOUNG, J.M. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. **Agents Actions**, v. 26, p. 335–341, 1989.

DRIVER, A.S., KODAVANTI, P.R., MUNDY, W.R. Age-related changes in reactive oxygen species production in rat brain homogenates. **Neurotoxicology and Teratology**, v.22, p. 175–81, 2000.

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

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

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

ESCUREDO, O.; SILVA, L. R.; VALENTÃO, P.; SEIJO, M.; ANDRADE, P. B. Assessing Rubus honey value: Pollen and phenolic compounds content and antibacterial capacity. **Food Chemistry**, v. 130, p. 671–678, 2012.

ESTEVINHO, L. M.; FEÁS, X.; SEIJAS, J. A.; VÁZQUEZ-TATO, M. P. Organic honey from *Trás-Os-Montes* region (Portugal): Chemical, palynological, microbiological and bioactive compounds characterization. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 258–264, 2012.

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

EVANGELISTA-RODRIGUES, A.; SILVA, E. M. S. DA; BESERRA, E. M. F.; RODRIGUES, M. L. Análise físico-química dos méis das abelhas *Apis mellifera* e Melipona scutellaris produzidos em duas regiões no estado da Paraíba. Ciência Rural, v. 35, n. 5, p. 1166–1171, 2005.

FALLICO, B.; ARENA, E.; VERZERA, A.; ZAPPALÀ, M. The European Food Legislation and its impact on honey sector. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 11, p. 49–54, 2006.

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

FAO (Food and Agriculture Organization). Conservation and management of pollinators for sustainable agriculture - the international response. In: Freitas, B.M.; Pereira, J.O.P. (ed.) **Solitary bees**: conservation, rearing and management for pollination. Imprensa Universitária. Fortaleza, Brasil, 2004. p. 19–20.

FEÁS, X., PIRES, J., ESTEVINHO, M.L., IGLESIAS, A., PINTO DE ARAUJO, J.P. Palynological and physicochemical data characterisation of honeys produced in the Entre-Douro e Minho region of Portugal. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, p. 1255–1262, 2010.

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

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

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

FLORES, R. F.; TRINDADE, J. L. F da. Importância da polinização entomófila em diferentes culturas com interesse econômico para o Brasil. In: V Semana de Tecnologia em Alimentos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Campus Ponta Grossa – Paraná – Brasil, v. 02, n. 01, 21 a 25 de maio, 2007. Disponível em: <http://www.pg.utfpr.edu.br/setal/docs/artigos/2007/polinizacao_entomofila.pdf> Acesso em: 15/07/2012.

FREE, J. B. **Insect pollination of crops**. London: Academic Press, 1993. 684 p.

FISHER, B., TURNER, R. K., MORLING, P. Defining and classifying ecosystem servicesfor decision making. **Ecological Economics**, v. 68, p. 634–653, 2009.

FREITAS, A. da S. de; BARTH, O. M.; LUZ, C. F. P da. Análise polínica comparativa e origem botânica de amostras de mel de Meliponinae (Hymenoptera, Apidae) do Brasil e da Venezuela. **Mensagem Doce**, n.106, maio, 2010.

FREITAS, B. M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Importância econômica da polinização. **Mensagem Doce**, n. 80, março, 2005.

FREITAS, B. M., IMPERATRIZ-FONSECA, V. L., MEDINA, L. M., KLEINERT, A. M. P., GALLETO, L., NATES-PARRA, G., QUEZADAEUÁN, J. J. G. Diversity, threats and conservation of native bees in the Neotropics. **Apidologie**, v.40, p. 332–346, 2009.

FUNAKOSHI-TAGO, M.; NAKAMURA, K.; TAGO, K.; MASHINO, T.; KASAHARA, T. Anti-inflammatory activity of structurally related flavonoids, Apigenin, Luteolin and Fisetin. **International Immunopharmacology**, v. 11, p. 1150–1159, 2011.

FURSTENBERGER, G.; SORG, B.; MARKS, F. Tumor promotion by phorbol esters in skin: evidence for a memory effect. **Science**. v. 220, p. 89–91, 1983.

GÁBOR, M. **Mouse ear inflammation models and their pharmacological applications**. Budapeste: Akadémiai Kiadó, 2001, 335p.

GÁBOR, M. Models of acute inflammation in the ear. In: WINYARD, P. G.; WILLOUGHBY, D. A. **Inflammation protocols**. New Jersey: Humana Press, p.129–131, 2003.

GALLAI, N., SALLES, J. M., SETTELE, J., VAISSIERE, B. E. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. **Ecological Economics**, v. 68, p. 810–821, 2009.

GARCIA-PIÑERES, A. J.; CASTRO, V.; MORAES, G.; SCHMIDT, T. J.; STRUNCK, E.; PAHL, H. L.; MERFORT, I. Cysteine 38 in p65/NF-κB plays a crucial role in DNA binding inhibition by sesquiterpene lactones. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 39713–39720, 2001.

GAREDEW, A.; SCHMOLZ, E.; LAMPRECHT, I. Microcalorimetric investigation on the antimicrobial activity of honey of the stingless bee *Trigona* spp. and comparison of some parameters with those obtained with standard methods. **Thermochimica Acta**, v. 415, p. 99–106, 2004.

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

GLASS, C.K.; OGAWA, S. Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. **Nature Reviews in Immunology**, v. 6, p. 44–55, 2006.

GONÇALVES, A. L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Atividade antimicrobiana do mel da abelha nativa sem ferrão *Nannotrigona testaceicornis* (Hymenoptera: Apidae, Meliponini). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, p. 455–459, 2005.

GUERRINI, A.; BRUNI, R.; MAIETTI, S.; POLI, C.; ROSSI, D.; PAGANETTO, G.; MUZZOLI, M.; SCALVENZI, L.; SACCHETTI, G. Ecuadorian stingless bee (Meliponinae) honey: A chemical and functional profile of an ancient health product. **Food Chemistry**, v. 114, p. 1413–1420, 2009.

GOMES, S.; DIAS, L. G.; MOREIRA, L. L.; RODRIGUES, P.; ESTEVINHO, L. Physicochemical, microbiological and antimicrobial properties of commercial honeys from Portugal. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 544–548, 2010.

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

GOTTLIEB, A.B. Therapeutic options in the treatment of psorisis and atopic dermatitis. **Journal of American Academy Dermatology**, v. 53, p. 3–16, 2005.

HAJJAR, R., JARVIS, D. I., GEMMILL-HERREN, B. The utility of crop genetic diversity in maintaining ecosystem services. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 123, p. 261–270, 2008.

HEARD, T. A. The role of stingless bees in crop pollination. **Annual Review of Entomology**, v. 44, p. 183–206, 1999.

HECKER, E.; SCHMIDT, R. Phorbol esters: the irrigants and co-carcinogens of *Croton tiglium* L. **Fortschritte Der Chemie Organischer Naturstoffe**, v. 31, p. 377–467, 1974.

HEITHAUS, E. . Community structure of neotropical flower visiting bees and wasps: diversity and phenology. **Ecology**, n. 60, p. 190–202, 1979.

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

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

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

HO, Y.; LAI, C.; LIU, H.; HO, S.; TAI, C.; PAN, M.; WANG, Y. Dihydrolipoic acid inhibits skin tumor promotion through anti-inflammation and anti-oxidation. **Biochemical Pharmacology**. v.73, p.1786–1795, 2007.

HUIDOBRO, J. F.; SANTANA, F. J.; SANCHEZ, M. P.; SANCHO, M. T.; MUNIATEGUI, S.; SIMAL-LOZANO, J. Diastase, invertase and alpha-glucosidase activities in fresh honey from north–west Spain. **Journal of Apicultural Research**, v. 34, p. 39–44, 1995.

INOUE, K; MURAYAMA, S.; SESHIMO, F. ; TAKEBA, K. ; YOSHIMURA, Y.; NAKAZAWA, H. Identification of phenolic compound in manuka honey as specific superoxide anion radical scavenger using electron spin resonance (ESR) and liquid chromatography with coulometric array detection. **Journal of the Science of Food and Agriculture** v. 85, p. 872–878, 2005.

IRISH, J.; CARTER, D. A.; BLAIR, S.E.; HEARD, T. A. Antibacterial activity of honey from the Australian stingless bee Trigona carbonaria. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 32, p. 89–90, 2008.

JANSEN, D. H. **Ecologia vegetal nos trópicos**. São Paulo: EDUSP, 1980. 79 p.

JASICKA-MISIAK I, POLIWODA A, DEREN M, KAFARSKI P. Phenolic compounds and abscisic acid as potential markers for the floral origin of two Polish unifloral honeys. **Food Chemistry**, v. 131, p. 1149–1156, 2012.

KASSIM, M.; ACHOUI, B.; MANSOR, M.; YUSOFF, K. M. The inhibitory effects of Gelam honey and its extracts on nitric oxide and prostaglandin E2 in inflammatory tissues. **Fitoterapi**a, v. 81, p. 1196–1201, 2010.

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

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

KERR, W. E.; CARVALHO, G. A.; NASCIMENTO, V. A. **Abelha urucu: biologia, manejo e conservação**. Belo Horizonte: Fundação Aguangaú, 1996, 143 p.

KERR, W. E. A importância da meliponicultura para o país. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v.1, n.3, p. 42–44, 1997.

KESTON, A.S.; BRANDT, R. The fluorometric analysis of ultramicro quantities of hydrogen peroxide. **Analytical Biochemistry**, v. 11, p. 1–5, 1965.

KHANAL, B.; BALIGA, M.; UPPAL, N. Effect of topical honey on limitation of radiation-induced oral mucositis: an intervention study. **International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery**, v. 39, n. 12, p. 1181–1185, 2010.

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

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

KLEIN, A., STEFFAN-DEWENTER, I., TSCHARNTKE, T. Fruit set of highland coffee increases with the diversity of pollinating bees. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 270, p. 955–961, 2003.

KLEIN, A. M.; VAISSIERE, B. E.; CANE, J. H.; STEFFAN-DEWENTER, I.; CUNNINGHAM, S. A.; KREMEN, C.; TSCHARNTKE, T. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 274, p. 303–313, 2007.

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

LARROSA, M.; LUCERI , C.; VIVOLI, E.; PAGLIUCA, C.; LODOVICI, M.; MONETI, G.; DOLARA, P. Polyphenol metabolites from colonic microbiota exert anti-inflammatory activity on different inflammation models**. Molecular Nutrition & Food Research**, v. 53, p. 1044–1054, 2009.

LLORET, S.; MORENO, J.J. Effects of an anti-inflammatory peptide (anti-flammin-2) on cell influx, eicosanoid biosynthesis and oedema formation by arachidonic acid and tetradecanoyl phorbol dermal application. **Biochemical Pharmacology**, v. 50, n. 3, p. 347–353, 1995.

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

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

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

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

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

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

MATSUDA, A.H.; BASTOS, D.H.M.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B. Main sugar composition of Brazilian Meliponinea Honey - preliminary study. In: **39th. Apimondia International Apicultural Congress**, 2005, Dublin. 39th. Apimondia International Apicultural Congress-Abstracts, 2005. p.37.

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

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

MERCOSUL**. Regulamento Técnico Mercossul "Identidade e Qualidade do Mel".** Resolução GMC N^{o} 15/94. Montevidéu, 1999. Disponível em: <http:/extranet.agricultura.gov.br/consultasislegis/do/consultaLei?op=viewTextual&codigo=6020> Acesso em: 08/05/2012.

MIDDLETON, Jr. E. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 439, p. 175–182, 1998.

MIORIN, P. L.; LEVY JUNIOR, N. C.; CUSTODIO, A. R.; BRETZ, W. A.; MARCUCCI, M. C. Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 913–920, 2003.

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

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

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

MURAKAWA, M.; YAMAOKA, K.; TANAKA, Y.; FUKUDA, Y. Involvement of tumor necrosis factor (TNF)-*α* in phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin edema in mice. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, p. 1331–1336, 2006.

MURATORI, M. S. C.; SOUZA, D. C. Características microbiológicas de 132 amostras de mel de abelhas do Piauí. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 14., 2002, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: Confederação Brasileira de Apicultura, 2002. p. 77.

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

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

NAKAMURA, Y.; KOZUKA, M.; NANIWA, K.; TAKABAYASHI, S.; TORIKAL, K.; HYASHI, R.; SATO, T.; OHIGASHI, H.; OSAWA, T. Arachidonic acid cascade inhibitors modulate phorbol ester-induced oxidative stress in female ICR mouse skin: defferential roles of 5-lipoxygenase and cyclooxygenase-2 in leukocyte infiltration and activation. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 35 (9), p. 997–1007, 2003.

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

NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**; Approved Standard - Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 5th ed. W. H. Freeman: New York, 2008. 1100p.

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

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

OLDROYD, B. P. What's killing American honey bees? **PLoS Biology**, v. 5, p. 1195–1199, 2007.

OLIVEIRA, E.G.; NASCIMENTO, A.R.; COSTA, M.C.P.; MONTEIRO-NETO, V. Qualidade microbiológica do mel de tiúba (Melipona compressipes fasciculata) produzido no estado do Maranhão. **Higiene Alimentar**, v. 19, n. 133, p. 92–99, 2005.

OLIVEIRA, P. S.; MÜLLER, C. S.; DANTAS, K. das G. F.; ALVES, C. N.; VASCONCELOS, M. A. M. de; VENTURIERI, G. C. Ácidos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante em méis de *Melipona fasciculata*, *M. flavolineata* (Apidae, Meliponini) e *Apis mellifera* (Apidae, Apini) da Amazônia. **Química Nova**, v. 35, p.1728–1732, 2012.

OLLERTON, J., WINFREE, R., TARRANT, S. How many flowering plants are pollinated by animals? **Oikos**, v. 120, p. 321–326, 2011.

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

ÖZÇELIK, B.; LEE, J. H.; MIN, D. B. Effects of light, oxygen and pHon the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method to evaluate antioxidants. **Journal of Food Science**, v. 68, p. 487–490, 2003.

PAMPLONA, B. C. **Exame dos elementos químicos inorgânicos encontrados em méis brasileiros de** *Apis mellifera* **e suas relações físico-biológicas**. São Paulo, 1989. 131 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo – USP.

PASCUAL, G.; GLASS, C. K. Nuclear receptor versus inflammation: mechanisms of transrepression. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 17, p. 321–328, 2006.

PEREIRA, F. De M.; LOPES, M. T. DO R.; CAMARGO, R. C. R. DE; VILELA, S. L. DE O. Produção de mel. **Embrapa Meio Norte**, Sistema de Produção, 3, versão eletrônica, jul. 2003. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mel/index.htm> Acesso em: 14/05/2012.

PÉREZ-GARCIA, F.; MARIN, E.; CANIGUERAL, S.; ADZET, T. Anti-inflammatory action of Pluchea sagittalis: involvement of an antioxidant mechanism. **Life Sciences**, v.59 (24), p. 2033–2040, 1996.

PEREZ, L.H. et al. Câmbio e embargo europeu podem prejudicar exportações apícolas em 2006. **Mensagem Doce**, n.86, p.22–26, 2006.

PERSANO-ODDO, L.; HEARD, T. A.; RODRÍGUES-MALAVER, A.; PÉREZ, R. A.; FERNÁNDEZ-MUIÑO, M.; SANCHO, M. T.; SESTA, G.; LUSCO, L.; VIT, P. Composition and antioxidant activity of *Trigonia carbonaria* honey from Australia. **Journal of Medicinal Food**, v. 11, p. 789–794, 2008.

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

POSEY, D. A. Etnoentomologia de tribos indígenas da Amazônia. In: RIBEIRO, D. (Ed.) **Suma etnológica brasileira**. Edição atualizada do Handbook of South American Indians. Petrópolis: FINEP/Vozes, v.1, 2ed., Etnobiologia, p. 251–271, 1987. 303p.

PRONI, E. A. Biodiversidade de abelhas indígenas sem ferrão (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae) na bacia do rio Tibagi, estado do Paraná, Brasil. **Arquivos de Ciências Veterninárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 3, p. 145–150, 2000.

PULIDO, R., BRAVO, L., SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3396–3402, 2000.

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

RAMALHO, M.; KLEINERT-GIOVANNINI, A.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Important bee plants for stingless bees (Melipona and Trigonini) and africanized honeybees (*Apis mellifera*). A review. **Apidologie**, v. 21, p. 469–488, 1990.

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

RECIO, M. C.; GINER, R. M.; URIBURU, L.; MÁÑEZ, S.; Cerdá, M.; DE LA FUENTE, J. R.; RÍOS, L. *In vivo* activity of pseudoguaianolide sesquiterpene lactones in acute and chronic inflammation. **Life Sciences**, v. 66, n. 26, p. 2509–2518, 2000.

RICKETTS, T. H. Tropical forest fragments enhance pollinator activity in nearby coffee crops. **Conservation Biology**, v. 18, p. 1262–1271, 2004.

RIZELIO, V. M.; GONZAGA, L. V.; BORGES, G. S. C.; MICKE, G. A.; FETT, R.; COSTA, A. C. O. Development of a fast MECK method for determination of 5-HMF in honey samples. **Food Chemistry**, v. 133, p. 1640–1645, 2012.

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

ROIG-ALSINA, A.; MICHENER, C. D. Studies of the phylogeny and classification of long-tongued bees (Hymenoptera: Apoidea). **The University of Kansas Science Bulletin**, Lawrence, v. 55, p. 123–173, 1993.

ROMAN, R. M**. Valor prognóstico da mieloperoxidase na doença arterial coronariana**. 82 f. Dissertação (Mestrado em Cardiologia e Ciências Cardiovasculares) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

ROSA, I. G.; NASCIMENTO, A. R.; OLIVEIRA, E. G. Aspectos microbiológicos de méis de *Apis mellifera* e de *Melipona compressipes fasciculata* da baixada maranhense. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 16, 2006, Aracajú. **Anais...** Aracajú: Confederação Brasileira de Apicultura, 2006. 1 CD-ROM.

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

ROUBIK, D. W. Honey biodiversity. In: III Seminario Mesoamericano sobre abejas sin aguijón, 2003, Tapachula, México. **Anais…** Tapachula: ECOSUR, 2003, p. 45–47.

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

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

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

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

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

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

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

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

SHARPE, R. J.; HEYDEN, L. C. Honey bee colony collapse disorder is possibly caused by a dietary pyrethrum deficiency. Bioscience Hypotheses, v. 2, p. 439–440, 2009.

SILVA, B. M.; ANDRADE, P. B.; VALENTÃO, P.; FERRERES, F.; SEABRA, R.M.; FERREIRA, M.A. Quince (Cydonia oblonga Miller) fruit (pulp, peel and seed) and jam: antioxidanta ctivity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 4705–4712, 2004.

SILVA, J. C. S. da; LAGES, V. N. A meliponicultura como fator de ecodesenvolvimento na área de Proteção Ambiental da ilha de Santa Rita, Alagoas. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 1, n.3, 2001. Disponível em: <http://www.uepb.edu.br/eduep/rbct/sumarios/pdf/santarita.pdf> Acesso em: 03/07/2012.

SILVA, T. M. S.; SANTOS, F. P. dos; EVANGELISTA-RODRIGUES, A.; SILVA, E. M. S. da; SILVA, G. S. da; NOVAIS, J. S. de; SANTOS, F. de A. R. dos; 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.

SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R.; ALMEIDA, E. A. B. **Abelhas brasileiras**: sistemática e classificação. Belo Horizonte: Fundação Araucária, 2002. 253 p.

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

SLAA, E. J., SANCHEZ CHAVES, L. A., MALAGODI-BRAGA, K. S., HOFSTEDE, F. E. Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. **Apidologie**, v. 37, p. 293–315, 2006.

SLAGA, T.J. Multistage skin carcinogenesis: a useful model for the study of the chemoprevention of cancer. **Acta Pharmacology Toxicology.** v. 55 (2), p. 107–124, 1984.

SODRÉ, G. da S.; MARCHINI, L. C.; ROSA, V. P. da; MORETI, A. C. de C. C.; CARVALHO, C. A. L. de. Conteúdo microbiológico de méis de *Apis mellifera* (Hymenoptera:A pidae) dos Estados do Ceará e Piauí. **Boletim de Indústria Animal**, Nova Odessa, v. 64, n. 1, p. 39–42, 2007.

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

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

SOUZA, R.C. da S.; YUYAMA, L.K.O.; AGUIAR, J.P.L.; OLIVEIRA, F.P.M. Valor nutricional do mel e pólen de abelhas sem ferrão da região amazônica. **Acta Amazonica**, v. 34, p. 333–336, 2004b.

SOUZA, B. de A.; MARCHINI, L. C.; ODA-SOUZA, M.; CARVALHO, C. A. L. de; ALVES, R. M. de O. Caracterização do mel produzido por espécies de Melipona Illiger, 1806 (Apidae: Meliponini) da região nordeste do Brasil: 1. Características físico-químicas. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 303–308, 2009.

SOUZA, B.; ROUBIK, D.; BARTH, O.M.; HEARD, T.; ENRÍQUEZ, E.; CARVALHO, C.; VILLAS-BÔAS, J.; MARCHINI, L.; LOCATELLI, J.; PERSANO-ODDO, L.; ALMEIDA-MURADIAN, L.; BOGDANOV, S.; VIT, P.: Composition of stingless bee honey: setting quality standards. **Interciencia.** v. 31, p. 867–875, 2006.

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.

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

TORRES, A.; GARADEW, A.; SCHMOLZ, E.; LAMPRECHT, I. Calorimetric investigation of the antimicrobial action and insight into the chemical properties of “angelita” honey - a product of the stingless bee *Tetragonisca angustula* from Colombia. **Thermochimica Acta**, v. 415, p 107–113, 2004.

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

VAN DEN BERG, A. J. J.; VAN DEN WORM, E.; QUARLES VAN UFFORD, H. C.; HALKES, S. B. A.; HOEKSTRA, M. J.; BEUKELMAN, C. J. An in vitro examination of the antioxidant and anti-infl ammatory properties of buckwheat honey. **Journal of Wound Care**, v. 17, p. 172–178, 2008.

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

VILLAS-BÔAS, J. K.; MALASPINA, O. Parâmetros fisico-químicos propostos para o controle de qualidade do mel de abelhas indígenas sem ferrão no Brasil. **Mensagem Doce**, São Paulo, n. 82, 2005.

VIT, P; MEDINA, M.; ENRÍQUEZ, M. E. Quality standards for medicinal uses of Meliponinae honey in Guatemala, México and Venezuela. **Bee World**, v. 85, n. 1, p. 2–5, março 2004.

VIT, P.; PERSANO ODDO, L.; MARANO, M.L.; SALAS DE MEJIAS, E. Venezuelan stingless bee honeys characterized by multivariate analysis of physiochemical properties. **Apidologie**, v. 29, p. 377–389, 1998.

VIT, P..; PULCINI, P. Diastase and invertase activites in Meliponini and Trigonini honeys from Venezuela. **Journal of Apicultural Research**, v. 35, p. 57–62, 1996.

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

WANG, B.; FUJISAWA, H.; ZHUANG, L.; FREED, I.; HOWELL, B.G.; SHAHID, S.; SHIVJI, G. M.; MAK, T. W.; SAUDER, D. N. CD4+ Th1 and CD8+ type 1 cytotoxic T-cells both play a crucial role in the full development of contact hypersensitivity. **Journal of Immunology**, v. 165, p. 6783–6790, 2000.

WATANABE M. E. Colony collapse disorder: Many suspects, no smoking gun. **Bioscience**, v. 58, p. 384–388, 2008.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

WIESE, H. **Nova apicultura**. Porto Alegre: Agropecuária, 1986. 493 p.

WILLIS, K. G., GARROD, G. D. Valuing landscapes: a contingent valuation approach. **Journal of Environmental Management**, v. 37, p. 1–22, 1993.

WINYARD, P.G. Key stages in the acute inflammatory response and their relevance as therapeutic targets. In: WINYARD, P. G.; WILLOUGHBY, D. A. **Inflammation protocols,** New Jersey: Humana Press, p.3–4, 2003.

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

YOUNG, J. M.; WAGNER, B. M.; SPIRES, D. A. Tachyphylaxis in 12-0-tetradecanoylphorbol acetate and arachidonic acid-induced ear edema. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 80, n. 1, p. 48–52, 1983.

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