

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA APLICADA
MESTRADO EM QUÍMICA APLICADA

MAIDELÉN DEL CARMEN LOZANO GUERRERO

DESENHO DE MODELOS DE PREDIÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E TEOR
DE PROLINA DE MEL DE ABELHAS SEM FERRÃO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

GUARAPUAVA

2021

MAIDELÉN DEL CARMEN LOZANO GUERRERO

DESENHO DE MODELOS DE PREDIÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE MEL
DE ABELHAS SEM FERRÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química Aplicada da Universidade Estadual do Centro-Oeste, para obtenção do grau de Mestre em Química.

Orientadora: Prof. Dr^a. Yohandra Reyes Torres

GUARAPUAVA

2021

Catálogo na Publicação
Rede de Bibliotecas da Unicentro

L925d

Lozano Guerrero, Maidelen Del Carmen

Desenho de modelos de predição da atividade antioxidante de mel de abelhas sem ferrão / Maidelen Del Carmen Lozano Guerrero. -- Guarapuava, 2021.

xiii, 80 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Química. Área de concentração: Química Aplicada, 2021.

Orientadora: Yohandra Reyes Torres

Banca Examinadora: Isabel Craveiro Moreira Andrei, Daiane Finger

Bibliografia

1. DPPH. 2. FRAP. 3. Imagens digitais. 4. PLS. 5. Calibração multivariada e aminoácidos. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Química.

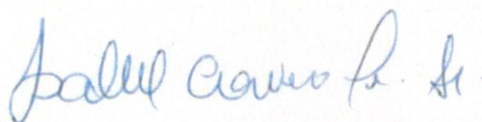
CDD 540

MAIDELLEN DEL CARMEN LOZANO GUERRERO

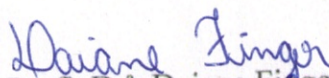
**DESENHO DE MODELOS DE PREDIÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E
TEOR DE PROLINA DE MEL DE ABELHAS SEM FERRÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química, área de concentração em Química Aplicada, para a obtenção do título de Mestre.

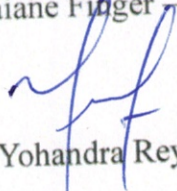
Aprovado em 31 de agosto de 2021.



Prof.^a. Dr.^a. Isabel Craveiro Moreira Andrei - UTFPR



Prof.^a. Dr.^a. Daiane Finger - Unicentro



Prof.^a. Dr.^a. Yohandra Reyes Torres

Orientadora

GUARAPUAVA-PR

2021

DEDICATÓRIA

A minha mãe Aracely Guerrero de Avila (*In memoriam*), a minha avó Blasina de C. de Avila Cedron, por me levar por bons caminhos cada uns de meus passos e crer em mim. A meu amado Duvan Gil R. por despertar em mim a cientista que toda mulher leva por dentro.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me acompanhar em cada um dos meus passos, dar-me a fortaleza em todo momento.

Minha orientadora Dr^a. Yohandra Reyes Torres, pelo acolhimento, compreensão e conhecimento compartilhado.

A toda minha família, pelo apoio e a compressão principalmente a minha avó Blasina de Avila, Lile Martelo, Katia de Avila, Jhony Guerrero e Jorge Luis Guerrero. E minha querida e adorada mãe Aracely Guerrero que desde o céu me dá seu apoio.

A meus amigos de colômbia Eva Taborda, Flor Maria Palacio, Daniela Giraldo que sempre estiveram para mi durante todo o processo. E a mis novos amigos do Brasil a Neida rodrigues e família Bruns Daniela e Adriano.

A todos os companheiros e amigos do laboratório CRONAT, João Fábio Turco, Camila Lima e Marina Lima.

A meu amado namorado Duvan Gil Rodriguez por seu apoio, compreensão e por estar para mi em todo os momentos.

Aos professores e todos os membros do programa da Pós-Graduação em Química Aplicada, A UNICENTRO por toda a infraestrutura e equipamentos,

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)

RESUMO

O mel produzido pelas abelhas nativas ou sem ferrão é utilizado na alimentação saudável e na medicina tradicional. São méis de sabor suavemente adocicado com propriedades antissépticas, anti-inflamatórias e cicatrizantes no tratamento de feridas infetadas, além de possuir outras propriedades como antimicrobianas, antivirais, anticâncer e antioxidantes. No Brasil podemos achar mais de 192 espécies de abelhas nativas. Estas abelhas comparadas com as abelhas do gênero *Apis*, são morfológicamente de tamanhos medianos ou pequenos, por conseguinte, sua produção do mel é reduzida. Suas propriedades nutracêuticas atrativas e sua baixa produção fazem que esses méis apresentem um custo superior em relação ao mel produzido pelas abelhas *Apis*. Esses fatos contribuem para sua adulteração e ainda não existe uma legislação própria para sua regulamentação e padronização. O objetivo principal deste trabalho foi construir modelos estatísticos para estimar de maneira indireta e rápida a capacidade antioxidante e teor de prolina em 94 amostras de méis de abelhas sem ferrão de 4 estados do Brasil. Dessa forma, foram primeiramente determinadas a capacidade antioxidante pelo método de redução do radical estável DPPH (2,2-difenil 1-picrilhidrazina) e redução do Fe^{3+} a Fe^{2+} (FRAP) e teor de aminoácidos totais em equivalente de prolina. Na sequência foram obtidas imagens digitais dos méis, as quais foram convertidas em dados de formato RGB e logo construídos os modelos de correlação utilizando regressão por mínimo quadrado parciais (PLS). Os modelos gerados por PLS apresentaram parâmetros de mérito, com coeficiente de correlação, RMSEC, RMSECV, RMSEP e razão RMSEP/ RMSECV, adequados para as determinações da atividade antioxidante e teor de prolina de novas amostras de mel. Dessa forma, a calibração multivariada dos dados de fotografia digital do mel mostra-se como uma ferramenta viável para construir modelos de predição que podem ser empregados para prever a atividade antioxidante e o teor de prolina em amostras de mel de abelhas sem ferrão.

Palavras chaves: DPPH; FRAP; Imagens Digitais; PLS, Calibração Multivariada e Aminoácidos.

ABSTRACT

The honey produced by native or stingless bees is used in healthy food and in traditional medicine. These honeys have a mildly sweet flavor with antiseptic, anti-inflammatory and healing properties in the treatment of infected wounds, in addition to having other properties such as antimicrobial, antiviral, anticancer and antioxidant. In Brazil, we can find more than 192 species of native bees. These bees, compared to *Apis* bees, are morphologically of medium or small sizes, therefore, their honey production is reduced. Its attractive nutraceutical properties and its low production make these honeys have a higher cost compared to honey produced by *Apis* bees. These facts contribute to its adulteration and currently there is not a proper regulation and standardization legislation for this type of honey.

The main purpose of this work was to build statistical models to estimate the antioxidant capacity and proline content in 94 samples of stingless bee honey from 4 Brazilian states. Thus, the antioxidant capacity was first determined by the method of reduction of the stable radical DPPH (2,2-diphenyl 1-picrylhydrazine) and reduction of Fe^{3+} to Fe^{2+} (FRAP) and total amino acid content in proline equivalent. Next, digital images of the honeys were obtained, which were converted into RGB format data and then built the correlation models using regression by partial least squares (PLS). The models generated by PLS showed parameters of merit, with correlation coefficient, RMSEC, RMSECV, RMSEP and RMSEP/RMSECV ratio, suitable for the determination of antioxidant activity and proline content of new honey samples. Thus, the multivariate calibration of digital honey photography data is a viable tool to build prediction models that can be used to indirectly predict the antioxidant activity content and proline content in honey samples from stingless bees.

Keywords: DPPH; FRAP; Digital Images; PLS; Multivariate Calibration; Amino Acids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura do radical livre estável DPPH•.....	24
Figura 2 -Reação geral entre o radical DPPH• e compostos	24
Figura 3 - Estrutura química da quercetina	25
Figura 4 - Geometrias de equilíbrio de mínimos absolutos de quercetina neutra-Fe ²⁺ (1), quercetina desprotonada-Fe ²⁺ (2), quercetina desprotonada- [Fe (H ₂ O) ₄] ²⁺ (3), duas quercetinas desprotonadas-Fe ²⁺ (4) e duas quercetinas desprotonadas –Fe (H ₂ O) ₂] ²⁺ (5) complexos.	25
Figura 5 - Reação de redução do complexo Fe ³⁺ -TPTZ a Fe ²⁺ -TPTZ no ensaio FRAP.	26
Figura 6 - Reação de ninidrina com aminoácido prolina	28
Figura 7 -Modelo de cor aditiva mais conhecida é o Modelo RGB.....	30
Figura 8 - Cubo de cores RGB	30
Figura 9 – Estados brasileiros de origem das amostras de mel de abelhas nativas	33
Figura 10 – Fotografia das amostras de mel no banho maria para ser medidas pelo ensaio FRAP	41
Figura 11 – Etapas do ensaio de determinação de prolina em mel	43
Figura 12 – Suporte utilizado para obtenção das fotografias	44
Figura 13 - Imagens digitais recortadas das amostras de mel	45
Figura 14 - Gráfico representativo da variação da absorbância da solução ensaio versus o tempo.	47
Figura 15 - Gráfico de Pareto para o planejamento fatorial 2 ² com ponto central.....	48
Figura 16 - Gráfico de efeitos principais para % inibição.....	48
Figura 17 – Porcentagem de inibição do radical DPPH apresentado por grupos de méis	49
Figura 18 - Comparação da porcentagem de inibição do radical DPPH em méis	50
Figura 19 - Relação entre a % de inibição do radical DPPH e a concentração do antioxidante padrão quercetina.....	52
Figura 20 - Relação entre a % de inibição do radical DPPH e a concentração do antioxidante padrão ácido ascórbico	52
Figura 21 - Gráficos de efeitos principais para ensaio FRAP	55
Figura 22 - Gráficos de efeitos interação do ensaio FRAP	56
Figura 23 - Curvas analíticas do complexo TPTZ-Fe ²⁺ (µM).....	56

Figura 24 - Capacidade antioxidante dos méis de abelha sem ferrão expressos em $\mu\text{mol Fe}^{2+}$ /100 g de mel apresentado por grupos de méis.....	57
Figura 25 - Comparação da concentração $\mu\text{mol Fe}^{2+}$ /100 g do mel produzidos por diferentes espécies de	58
Figura 26 – Curvas analíticas do ensaio de prolina obtidas durante os nove dias de análise.	60
Figura 27 - Concentração de prolina expresso em mg/kg do mel apresentado por grupos de méis	61
Figura 28 - Comparação da concentração de prolina em méis produzidos por diferentes espécies de abelhas sem ferrão.....	62
Figura 29 - Gráfico de correlação linear entre os resultados do DPPH expressado em equivalente de quercetina e FRAP	64
Figura 30 – Valores preditos e medidos segundo o Modelo PLS imagens/quercetina (1) amostras de calibração, (2) amostras de validação, (3) Conjunto das amostras de calibração + validação	67
Figura 31 - Valores preditos e medidos segundo o Modelo PLS imagens/FRAP (1) amostras de calibração, (2) amostras de validação, (3) Conjunto das amostras de calibração + validação.....	68
Figura 32 - Modelos imagens/ prolina mg/g; modelo de calibração, modelo de Predição, modelo.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Espécie de abelha sem ferrão no Brasil.....	16
Tabela 2 - Relação das amostras de mel analisadas: espécies de abelhas produtora e origem geográfica.	34
Tabela 3 - Parâmetros avaliados e níveis estabelecidos no planejamento 2^2 com ponto central.	37
Tabela 4 - Ensaios do Planejamento fatorial 2^2 com ponto central.	38
Tabela 5 - Parâmetros avaliados e níveis estabelecidos no planejamento 2^3 ensaio FRAP.	40
Tabela 6 - Ensaio do planejamento fatorial 2^3 para otimização do ensaio FRAP.	40
Tabela 7 - Resultados da comparação pelo teste de Tukey por espécies, dos valores que apresentaram diferença significativa dos resultados determinados pelo método de DPPH.	50
Tabela 8 – Atividade antioxidante dos méis expressa como resultados máximos e mínimos de equivalente de quercetina (mg/100g do mel) e equivalente de ácido ascórbico (mg/100g do mel) por espécie de abelhas.....	53
Tabela 9 - Parâmetros avaliados e valor de p no planejamento fatorial 2^3 tendo como resposta a absorvância	55
Tabela 10 - Resultados máximos e mínimos para o ensaio FRAP ($\mu\text{mol}/100\text{ g}$ do mel) por espécie de abelhas.....	60
Tabela 11 - Resultados máximos e mínimos para o ensaio de prolina (mg/kg).....	62
Tabela 12 – Figuras de mérito para o modelo imagens/atividade antioxidante em equivalente quercetina mg/g.....	66
Tabela 13 – Figura de mérito para modelos imagens/atividade antioxidante pelo método de redução do íon férrico (FRAP)	68
Tabela 14 - Modelos imagens/concentração de prolina mg/g	69

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GERAL	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3	REFERÊNCIAL TEÓRICO	16
3.1	AS ABELHAS SEM FERRÃO	16
3.2	MEL	17
3.3	CAPACIDADE ANTIOXIDANTE	20
3.4	MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE MEL DE ABELHA SEM FERRÃO	22
3.4.1	Método pela inibição do radical estável DPPH	23
3.4.2	Método pela redução do íon férrico (FRAP)	25
3.4.3	Vantagens e desvantagens dos métodos DPPH e FRAP	26
3.5	PROLINA	27
3.6	ANÁLISES MULTIVARIADA DE IMAGENS	28
3.7	MODELO DE COR RGB	29
3.8	QUIMIOMETRIA	30
3.9	REGRESSÃO POR MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS (PLS)	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1	AMOSTRAS DE MEL: ABELHAS PRODUTORAS E ORIGEM GEOGRÁFICA	33
4.2	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO MEL DE ABELHAS NATIVAS: ENSAIO DPPH	37
4.2.1	Otimização das condições de realização do ensaio DPPH	37
4.2.1.1	Planejamento fatorial 2 ² com ponto central para otimização dos volumes relativos das soluções de mel e DPPH.	37
4.2.2	Determinação do tempo de reação entre os antioxidantes do mel e o radical DPPH	38
4.2.3	Determinação da capacidade antioxidante das amostras de mel através do método da inibição do radical estável DPPH	38
4.3	ENSAIO FRAP	39

4.3.1	Otimização das condições de realização do ensaio FRAP para análise das amostras de mel.....	39
4.3.1.1	Planejamento fatorial 2 ³ para otimização dos volumes relativos das soluções de mel, FRAP e o tempo.	39
4.3.2	Determinação da capacidade antioxidante das amostras de mel através do método de redução de ferro (FRAP).....	41
4.4	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROLINA EM MEL DE ABELHA NATIVA.....	42
4.5	OBTENÇÃO DE IMAGENS DIGITAIS DE MÉIS DE ABELHAS NATIVAS.....	43
4.6	PROCESSAMENTO DAS FOTOGRAFIAS DIGITAIS PARA ANÁLISE MULTIVARIADA.....	44
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA UNIVARIADA E CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA	45
4.7.1	Análises de ANOVA.....	45
4.7.2	teste t para variâncias diferente	46
4.7.3	Análise de correlação de Pearson.....	46
4.7.4	Análises de regressão por mínimos quadrado parciais (PLS).....	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1	CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE MÉIS DE ABELHAS NATIVAS NO ENSAIO DPPH	47
5.1.1	Resultados da otimização das condições experimentais	47
5.1.2	Capacidade antioxidante das amostras de mel pelo método do DPPH.....	48
5.2	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO MEL DE ABELHAS NATIVAS NO ENSAIO FRAP.....	54
5.2.1	Resultado do planejamento fatorial (2 ³).....	54
5.2.2	Determinação da capacidade antioxidante das amostras de mel através do método de redução de ferro (FRAP).....	56
5.3	DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE PROLINA DAS AMOSTRAS DE MEL...60	
5.4	CORRELAÇÃO ENTRE OS DADOS DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DPPH, FRAP E TEOR DE PROLINA	64
5.5	DESENVOLVIMENTO DE MODELOS DE CALIBRAÇÃO E VALIDAÇÃO POR PLS.....	65
5.5.1	Modelos gerados para correlacionar as imagens e atividade antioxidante em equivalente de quercetina	65

5.5.2 Modelos gerados para correlacionar as imagens e atividade antioxidante pelo método pela redução do íon férrico (FRAP)	67
5.5.3 Modelos gerados para correlacionar as imagens e concentração de prolina mg/g	69
6 CONCLUSÕES	71
REFERÊNCIA.....	72

1. INTRODUÇÃO

O mel é um produto produzido pelas abelhas a partir do néctar das plantas e constituído principalmente dos açúcares frutose e glicose. Além disso, o mel possui muitos nutrientes como vitaminas, minerais, enzimas e aminoácidos livres. Compostos orgânicos voláteis, presentes em quantidades traços, como os aldeídos, os álcoois, as cetonas, os ácidos, os ésteres e seus derivados conferem aroma e sabor do mel (Costa *et al.*, 2018; Karabagias *et al.*, 2014).

Outros compostos fitoquímicos, como flavonoides, ácidos fenólicos e carotenos que exibem numerosas atividades biológicas, atuam como antioxidantes naturais do mel (Alqarni *et al.*, 2014; Chuttong *et al.*, 2016; Ramón-Sierra *et al.*, 2015; Sarmiento Silva *et al.*, 2013). Dessa forma, o mel além de ser um adoçante natural também apresenta propriedades antioxidantes (Ávila *et al.*, 2019).

As abelhas mais populares na produção do mel são as do gênero *Apis*- subfamília Apidae (Braghini *et al.*, 2020). O mel produzido por este tipo de abelha é amplamente comercializado e apresenta qualidade e identidade identificadas. A composição do mel e seu valor comercial, em geral, depende principalmente da origem floral, origem geográfica e espécie de abelha, entre outros fatores como o procedimento de obtenção do mel do favo e segundo sua apresentação ou metodologia de processamento do produto (Codex Alimentarius Commission, 2001; Codex Alimentarius Commission FAO/OMS e Codex Alimentarius, 2001; Patrignani *et al.*, 2018).

Além das abelhas *Apis mellifera*, outras espécies de abelhas produzem mel, como as abelhas nativas ou abelhas sem ferrão, embora em menor quantidade. Segundo estudos de Costa *et al.*, (2018), no Brasil podem-se encontrar aproximadamente 192 espécies de abelhas nativas que não possuem ferrão. Por exemplo, podem-se apreciar espécies endêmicas do semiárido como as *Melipona subnitida* Ducke (Jandaíra) e *M. scutellaris* Latrelle (Uruçu), entre outras espécies mais conhecidas como as “*meliponini*” ou as “*Meliponinae*” ou simplesmente brasileiras ou indígenas (Sarmiento Silva *et al.*, 2013). O mel de abelhas sem ferrão aporta benefícios medicinais no controle de tumores, doenças visuais e diabetes (Ávila *et al.*, 2019; Borsato *et al.*, 2014).

Esforços estão sendo realizados para padronizar o mel produzido pelas abelhas nativas, mas até o momento muito pouco tem sido documentado sobre suas propriedades físico-químicas, composição química e atividades biológicas (Brasil, 2000; Souza *et al.*, 2006). O fato de não existir um controle de qualidade próprio para o mel de abelhas nativas favorece sua

adulteração. Geralmente, o processo de adulteração de méis é feito com a adição de glicose, xaropes, melados ou caldos de cana-de-açúcar. Esse processo de adulteração altera a composição química do mel principalmente, a relação de açúcares, mas também de minerais e compostos fitoquímicos (Souza-Kruliski *et al.*, 2010).

Por outro lado, os ensaios químicos utilizados no controle de qualidade utilizam reagentes com algum grau de periculosidade, solventes orgânicos e múltiplas etapas que resultam em ensaios dispendiosos, que geram resíduos e implicam em exposição do analista e do meio ambiente.

Considerando esses apontamentos, neste trabalho nos propusemos contribuir para o conhecimento das propriedades do mel de abelha sem ferrão especificamente de sua capacidade antioxidante e teor de aminoácidos. Paralelamente, investigamos se é possível obter modelos estatísticos adequados para estimar essas propriedades através de métodos indiretos e rápidos buscando assim alternativas aos métodos analíticos tradicionais.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Formular modelos estatísticos para estimar de maneira indireta e rápida a capacidade antioxidante e teor de aminoácidos totais do mel de abelhas sem ferrão.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Determinar a capacidade antioxidante do mel mediante os métodos de redução do radical estável DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazina) e FRAP.
- ❖ Determinar o conteúdo de aminoácidos totais em equivalentes de prolina em amostras de mel de abelhas sem ferrão.
- ❖ Investigar possível correlação entre a cor do mel, sua capacidade antioxidante e teor de aminoácidos totais.
- ❖ Construir modelos de regressão aplicando o método de mínimo quadrados parciais PLS, correlacionando dados de imagens com a capacidade antioxidante obtida pelo método DPPH, FRAP e concentração de prolina.

3. REFERÊNCIAL TEÓRICO

3.1 AS ABELHAS SEM FERRÃO

As abelhas sem ferrão são conhecidas como abelhas indígenas, nativas brasileiras ou meliponini, são uma espécie que pertencem a família Meliponina (*Hymeno-ptera, Apidae*). A família Apidae possui quatro subfamília: a dos Apíneos, a Meliponíneos, a Bombíneos e a Euglossíneos. Estes são insetos de grande diversidade que se encontram distribuídos em diversas áreas geográficas. Entre as diversas funções de estes insetos, destacam-se como, importantes polinizadores em regiões tropicais e subtropicais (Nogueira-neto, 1997; Pereira *et al.*, 2017; Villas-Bôas, 2012).

Morfologicamente, os *Meliponíneos* apresentam tamanho que varia de pequenos e médios. Estas espécies possuem um ferrão atrofiado o que impede sua capacidade para ferocar (Silva e Lima Da Paz, 2012; Costa *et al.*, 2018). No Brasil encontram-se aproximadamente 192 espécies de abelhas nativas que não possuem ferrão, entre elas estão as *Melipona subnitida* Ducke (jandaira) e *M. scutellaris* Latrelle (uruçu), *Tetragonisca angustula* (Jataí), *Melipona quadrifasciata* (Mandaçaia), *Melipona bicolor schencki* (Costa *et al.*, 2018). Na **Tabela 1** apresentam-se algumas das espécies mais comuns de abelhas sem ferrão do Brasil.

Tabela 1 - Espécie de abelha sem ferrão no Brasil

Nome científico	Nomes Populares	Região do Brasil
<i>Melipona compressipes</i>	Jupará, Jandaíra, Jandaíra-Preta	Norte
<i>Melipona fasciculata</i>	Tiúba, Uruçu-cinzenta	
<i>Melipona seminigra</i>	Uruçu-Boca-de-Renda, Jandaíra- Amarela	
<i>Scaptotrigona</i>	Canudo	
<i>Melipona asilai</i>	Monduri, rajada	Nordeste
<i>Melipona fasciculata</i>	Tiúba	
<i>Melipona mandacaia</i>	Mandaçaia	
<i>Melipona quadrifasciata</i>	Mandaçaia	
<i>Melipona scutellaris</i>	Uruçu, -Nordestina, Uruçu verdadeira	Centro- Oeste
<i>Melipona subnitida</i>	Jandaíra, Uruçu,	
<i>Melipona compressipes</i>	Uruçu, Jandaíra	
<i>Melipona rufiventris</i>	Uruçu-Amarela Uruçu	
<i>Melipona seminigra</i>	Uruçu	Sudeste
<i>Scaptotrigona</i>	Canudo	
<i>Tetragonisca angustula</i>	Jataí	
<i>Melipona bicolor</i>	Guarupú, Guaraipo	
<i>Melipona quadrifasciata</i>	Mandaçaia	Sul
<i>Melipona rufiventris</i>	Uruçu-Amarela	
<i>Tetragonisca angustula</i>	Jataí	
<i>Melipona bicolor</i>	Guarupú, Guaraipo	
<i>Melipona quadrifasciata</i>	Mandaçaia	Sul
<i>Melipona mondury</i>	Monduri	
<i>Tetragonisca angustula</i>	Jataí	

FONTE: Manual técnico de abelhas sem ferrão (2012).

As abelhas utilizam resinas de plantas na construção de ninhos, desenvolvendo estratégias durante os períodos de escassez de alimentos para sustentar suas colônias (De Paula *et al.*, 2021). As abelhas são conhecidas como produtoras de mel por excelência, mais também fornecem outros produtos como cera, própolis, pólen, geleia real (Villas-Bôas, 2012). As abelhas são importantes para a fauna, estas participam como preservadora do meio ambiente e manutenção das espécies existentes, são as principais polinizadores das espécies florais, e se estima que apresentam uma participação em torno de 40 a 90% da reprodução das plantas (Martini *et al.*, 2015).

3.2 MEL

O mel é um alimento produzido pelas abelhas a partir do néctar das flores ou das secreções procedentes das partes vivas das plantas (Brasil, 2000). Desde a antiguidade o homem utilizou o mel amplamente para fins nutricionais e medicinais. Na atualidade o mel é utilizado para substituir açúcares refinados e em na produção de produtos de beleza. Na medicina tradicional, o mel é empregado como antisséptico, anti-inflamatório e cicatrizante para o tratamento de feridas infectadas e no tratamento da asma (Smetanska *et al.*, 2021). Segundo o Rao *et al.* (2016), os antigos chineses, os egípcios e os romanos utilizavam o mel para o tratamento de feridas e doenças do intestino.

Segundo o regulamento técnico de Identidade e Qualidade do mel, o mel pode ser classificado por três critérios: origem, o procedimento de obtenção do mel do favo e segundo sua apresentação e /ou processamento (Brasil, 2000). O mel está constituído principalmente por grandes concentrações de açúcares como, a frutose e a glicose. Além dos açúcares o mel possui outros nutrientes em pequenas proporções como vitamina B, vitamina C, sódio, cálcio, minerais, proteínas, aminoácidos, ácidos orgânicos, fenóis e os componentes lipídicos, sendo todos esses componentes os que aportam ao mel propriedades funcionais para a saúde do corpo humano (Gomes *et al.*, 2017; Schievano *et al.*, 2021).

O mel de abelha sem ferrão é um produto que tem sido valorizado pela população ao perceber suas propriedades medicinais. Uma característica desejável que apresenta o mel de abelha sem ferrão é que possui baixa viscosidade oferecendo uma cristalização lenta em comparação com outros méis (Biluca *et al.*, 2014; Ooi *et al.*, 2021). A legislação Brasileira encarregada da regulamentação e padronização do mel para fins comerciais, atende somente às

características do mel das abelhas *Apis mellifera*, portanto, não leva em consideração as características próprias que tem o mel de abelhas nativas ou sem ferrão (Lira *et al.*, 2014).

O mel produzido pelas abelhas sem ferrão possui qualidades que as distinguem quando são comparadas com a do gênero *Apis*. Estudo realizado por Holanda *et al.*, (2012) que avaliou as características físico-químicas do mel de abelha sem ferrão da espécie *Melipona fasciculata* produzido na região do Cerrado Maranhense encontrou que o teor de umidade variou de 21,44 a 27,51%, pH entre 3,1 a 4,4, e o conteúdo de açúcares redutores de 50,01 a 65,79%. Comparando estes valores com os estabelecido pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento na Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000 (Brasil, 2000) para o mel de abelhas do gênero *Apis Melífera*, temos que o máximo em umidade é 20%, um intervalo de pH entre 3,3 a 4,6 e um mínimo de 65% para açúcares redutores.

Dias *et al.*, (2014) estudaram as propriedades físico-químicas de méis produzidos pelas abelhas sem ferrão encontrando uma variação para valores de pH de 3,49 a 4,65 e umidade de 22 a 29,5%. Portanto, de acordo com os valores estabelecidos em Brasil, (2000), as umidades das amostras ficaram acima da umidade máxima requerida nos padrões de qualidade do mel de *Apis*, de 20%.

Ferreira *et al.*, (2012), caracterizaram os méis de *Apis melífera* de diferentes floradas e compararam com méis de abelhas *Meliponeae*. Os pesquisadores avaliaram o teor de umidade e pH entre os méis de abelhas indígenas Jandaíra (*Melipona subnitida Ducke*) e rajada (*Melipona asilvae*) do semiárido do estado da Paraíba, Brasil. Os valores encontrados para a umidade dos méis variaram de 18,3% a 27,63% para os méis de abelha sem ferrão e de 16,3% a 22,2% para os méis de abelha do gênero *Apis*. Os valores do pH variaram de 3,3±0,01 para o mel da Jandaíra, 3,8±0,03 para o mel da abelha rajada e 4,0±0,11 para o mel de uruçú e para os méis de abelhas do gênero *Apis* foram encontrados valores de pH na faixa de 3,78 a 4,35. O estudo mostrou que os méis das abelhas sem ferrão apresentam em média teores de umidade maiores quando comparados com o mel das abelhas *Apis mellifera*.

Lopes Alves *et al.*, (2011), estudaram as características físico-químicas e microbiológicas de amostras de méis produzidos por espécies de *Melipona* em três estados do Nordeste Brasileiro. Entre os parâmetros analisados estiveram pH e umidade. Os valores encontrados para pH foram de 3,15 a 3,67, e os teores de umidade de 23, 27 e 24%. Foi observado que o mel de abelha nativa apresentava um maior teor de água quando comparado com o mel de abelha africanizada.

Dessa forma, os estudos realizados até o presente com mel de abelhas sem ferrão indicam que o mesmo possui características diferentes do mel de *Apis mellifera*, o que leva à necessidade de estudos para a padronização de diferentes de méis de abelhas sem ferrão.

Além disso, as abelhas sem ferrão apresentam importância na polinização e preservação da vegetação e, portanto, são de crucial importância para o setor agrônomico favorecendo o maior rendimento das lavouras, preservação da flora e do meio ambiente. Soma-se a isso o fato de que o mel de abelha sem ferrão tem um preço comercial superior se comparado com o mel de abelhas da espécie *Apis*. Uma indagação rápida na plataforma de venda Mercado Livre mostrou que 150g de mel de abelhas sem ferrão da Amazônia custam cerca de 40 reais e 50 g do mel de abelha sem ferrão Uruçu-Amarela 60 reais.

Segundo Gomes *et al.*, (2017) o mel, além de ser um alimento, exibe propriedades benéficas como antimicrobianas, anti-inflamatórias, antivirais e antioxidantes. Entre os componentes químicos presentes no mel que poderiam ser responsáveis pela atividade antioxidante encontram-se os flavonoides e ácidos fenólicos.

Alguns autores avaliaram o efeito antimicrobiano de méis de abelhas sem ferrão. Por exemplo, Borsato *et al.*, (2013) avaliaram a atividade antibacteriana e antifúngica de méis provenientes do estado do Paraná (Brasil) evidenciando que, os méis de abelhas sem ferrão (*Melipona*, *Scaptotrigona*, *Tetragona* e *Tetragonisca*) apresentaram atividade antimicrobiana para cepas de *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans*. Nesse estudo destacou-se uma amostra de mel de *Scaptotrigona bipunctata* como o melhor agente antimicrobiano.

Por outro lado, Domingos *et al.*, (2021) estudaram a atividade antibacteriana de méis de abelhas sem ferrão amazônicas. Entre as espécies estudadas encontram-se a *Melipona eburnea*, *Melipona grandis*, *Melipona flavolineata* e *Melipona seminigra*. Os resultados demonstraram que o mel de abelha sem ferrão possui atividade antimicrobiana *in vitro* contra bactérias patogênicas.

De igual forma, Mercês *et al.*, (2013) determinaram a atividade antimicrobiana do mel de cinco espécies de abelhas sem ferrão brasileiras: *Melipona asilvai*, *Melipona quadrifasciata anthidioides*, *Friseomelita doederleinei*, *Tetragonisca angustula* e *Plebeia sp.* O estudo demonstrou que todos os méis tiveram ação antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*. Anteriormente, Miorin *et al.*, (2003), haviam demonstrado que o mel da espécie de abelha sem ferrão *Tetragonisca angustula* possuía boa atividade antimicrobiana contra a bactéria *S. aureus*

Em estudo recente, Biluca *et al.*, (2020), investigaram a atividade anti-inflamatória de mel de abelha sem ferrão (*Meliponinae*) obtidas de apicultores nos municípios de São Miguel

do Oeste e Santa Rosa de Lina (estado de Santa Catarina, Brasil). Os resultados mostraram um efeito anti-inflamatório significativo que pode estar associado à composição fenólica das amostras do mel das abelhas sem ferrão. Investigação realizada por Mahmood *et al.*, (2020), com mel da espécie de abelha sem ferrão da Malásia (*Trigona itama*) constatou que além de apresentar atividade anti-inflamatória, esse mel poderia ser um adjuvante quimioterápico como agente anticâncer no tratamento de carcinomas de células escamosas orais.

Por sua parte Kaya e Yildirim, (2021), determinaram que os extratos fenólicos de mel de abelha sem ferrão aplicados às células cancerígenas durante um período de 24 horas em diferentes concentrações diminuiriam significativamente a vitalidade celular mostrando um efeito anticâncer. Outros estudos relatam que esse mel tem efeitos benéficos na fertilidade. Um ensaio com ratos expostos ao estresse auditivo descreveu uma diminuição na fertilidade que pode ser melhorada com 0,2 ml de mel a 5% dissolvido em água (Rao *et al.*, 2016).

3.3 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

Segundo a Anvisa, antioxidante é a substância que retarda o aparecimento de alteração oxidativa no alimento (Brasil. Ministerio da Saude, 1997). Quimicamente, os antioxidantes são um conjunto heterogêneo de substâncias formadas por minerais, vitaminas, pigmentos naturais e outros compostos vegetais e, ainda, enzimas, que bloqueiam os efeitos danosos dos radicais livres, exercendo um papel protetor nas células do corpo.

Muitos antioxidantes podem ser encontrados em vegetais, frutas, legumes, hortaliças e cereais integrais, estando assim acessíveis através de uma alimentação natural (FiB, 2009).

Os antioxidantes classificam-se em primários, sinergistas, removedores de oxigênio, biológicos, agentes quelantes e antioxidantes mistos (FiB, 2009). Os antioxidantes primários são compostos fenólicos que promovem a remoção ou inativação dos radicais livres. Os sinergistas são substâncias com pouca ou nenhuma atividade antioxidante, que podem aumentar a atividade dos antioxidantes primários, como exemplo o butil-hidroxi-anisól (BHA) é um sinergista para propilgalato (FiB, 2009). Os removedores de oxigênio são compostos que atuam capturando o oxigênio presente no meio. O ácido ascórbico, seus isômeros e seus derivados são removedores de oxigênio, mas também podem atuar como sinergista na regeneração de antioxidantes primários (Bailey, 1996; Ramalho e Neuza, 2006). Os biológicos são substâncias que podem remover oxigênio ou compostos altamente reativos de um sistema alimentício como por exemplos as enzimas glucose oxidase, superóxido dismutase e catalases (Ramalho e Neuza,

2006). Os agentes quelantes/sequestrantes complexam íons metálicos, principalmente cobre e ferro, que catalisam a oxidação lipídica; entram nesta categoria os ácidos cítricos e seus sais, fosfatos e sais de ácido etileno diamino tetra acético (EDTA). E os antioxidantes mistos incluem compostos de plantas e animais que têm sido amplamente estudados como antioxidantes em alimentos, entre eles estão várias proteínas hidrolisadas e derivados de ácido cinâmico (ácido caféico), flavonoides (FiB, 2009; Ramalho e Neuza, 2006).

De acordo com a definição de Sies e Stahl, (1995), os antioxidantes são "qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação do substrato de maneira eficaz". Os antioxidantes apresentam diferentes mecanismos de defesa na proteção dos organismos segundo os quais podem impedir a formação de radicais livres, interceptar os radicais livres gerados pelo metabolismo celular e reparar as lesões causadas pelos radicais (Bianchi e Antunes, 1999a; Modeiros e Souza, 2016).

Os radicais livres são espécies orgânicas e inorgânicas que contém um ou mais elétrons não pareados, sendo estes compostos instáveis e muito reativos. Radicais livres são produzidos naturalmente em nosso organismo pelo metabolismo, podem ser gerados no citoplasma, nas membranas celulares ou nas mitocôndrias (Bianchi e Antunes, 1999a; de Vasconcelosa *et al.*, 2014).

O sistema de defesa antioxidante é formado por compostos enzimáticos e não enzimáticos. No sistema enzimático estão presentes as enzimas superóxido-dismutase, glutathione-peroxidase e catalases. Dos componentes não-enzimáticos da defesa antioxidante destacam-se alguns minerais (cobre, manganês, zinco, selênio e ferro), vitaminas (A, C e E) carotenóides (beta-caroteno, licopeno e luteína), flavonóides (genisteína, quercetina) (Esh Shami e Machado Moreira, 2004).

Causas prováveis para a produção de radicais livres no organismo são o estresse, fatores ambientais, consumo de alimentos muito processados industrialmente, dentre outras causas. Uma das consequências do excesso de radicais livres no organismo é o envelhecimento e morte celular causando problemas na saúde, como doenças cardíacas, cânceres, cataratas, artrites, diabetes, esclerose múltiplas, inflamações crônicas, envelhecimentos precoce e doenças do sistema imune (Bianchi e Antunes, 1999b; A. Oliveira *et al.*, 2015).

Os antioxidantes têm três mecanismos principais para exercer seu papel protetor: a transferência do átomo de H, a transferência de um único elétron e a quelação de metais (Leopoldini *et al.*, 2011).

Estudos demonstram que o mel apresenta uma ampla gama de compostos com atividade antioxidante. Dentre os principais temos os componentes polifenóis, os ácidos fenólicos, os flavonóides e as enzimas peroxidase e catalase (Silva *et al.*, 2013).

Sarmiento *et al.* (2013) determinaram a capacidade antioxidante de mel de abelha da espécie Jandaíra (*Melipona subnitida*) de duas regiões semiáridas do estado da Paraíba, Brasil, através do método de eliminação do radical estável DPPH. O estudo concluiu que o conteúdo fenólico presente nas amostras de méis da espécie Jandaíra é parcialmente responsável pela sua atividade antioxidante.

Outro estudo realizado por Ooi *et al.*, (2021) determinou os efeitos dos antioxidantes do mel de abelhas sem ferrão da espécie *Trigona itama*, na Malásia (MARDI), utilizando o método de eliminação de radicais livres DPPH. Um estudo realizado por Nweze *et al.*, (2017) investigou a capacidade antioxidante de nove amostras de méis multifloral de abelhas das espécies *Apis mellifera* e *Hypotrigena* coletadas no estado de Enugu na Nigéria, pelo método de poder redutor férrico/antioxidante (FRAP). Os autores concluíram que todas as variedades de mel investigadas mostraram altos valores de atividade no ensaio FRAP, confirmando suas importantes propriedades antioxidantes.

Em Ranneh *et al.* (2018) foi analisada a capacidade antioxidante do mel de abelha sem ferrão da espécie *Apis dorsata* e abelhas *Trigona* coletado em Malásia pelo método de eliminação de radicais livres ou DPPH. Os resultados indicaram que estes méis possuem propriedades antioxidantes significativas.

3.4 MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE MEL DE ABELHA SEM FERRÃO

Diversos métodos *in vitro* baseados em princípios e condições experimentais distintos podem ser utilizados para avaliar a atividade antioxidante em amostras de mel. Os métodos são escolhidos de acordo a reação envolvida. Entre os métodos mais comumente utilizados encontram-se a capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC), ABTS⁺ (ácido 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolina- 6-sulfônico), CUPRAC do inglês *Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity*, a neutralização ou redução do radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil), e o poder antioxidante redutor do ferro (FRAP) (Oliveira, 2015).

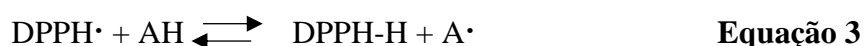
Neste trabalho foram usados os dois últimos mencionados os quais serão descritos com mais detalhes.

O método ORAC mede a capacidade dos antioxidantes em sequestrar radicais peroxil que são gerados por uma fonte radical (Tomei e Salvador, 2007). O ABTS é um método que consiste na captura do radical 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) produzido pela oxidação do ABTS^{•+} quando amostras que contém os antioxidantes são adicionadas (Tiveron, 2010). O método CUPRAC se baseia em um mecanismo de transferência de elétrons na redução de Cu(II) a Cu(I) por agentes redutores (Oliveira *et al.*, 2010).

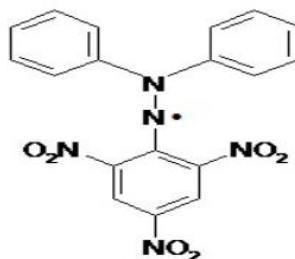
3.4.1 Método pela inibição do radical estável DPPH

A molécula 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH[•]), mostrada na (**Figura 1**), é amplamente conhecida e se caracteriza como um radical orgânico livre estável. Esse método é amplamente utilizado para a determinação da capacidade antioxidante de substâncias puras, misturas ou matrizes complexas.

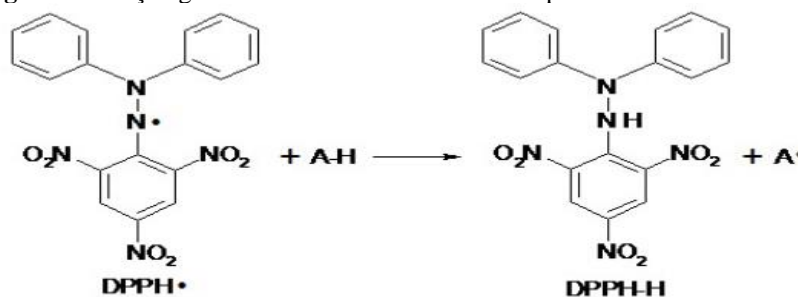
É descrito na literatura que a neutralização ou redução do radical DPPH (**Figura 2**) pode ocorrer através de dois tipos de mecanismos: (1) por transferência de um elétron (**ET**) (equação 1), ou (2) transferência de um átomo de hidrogênio (**HT**) (equação 2). Também a reação entre compostos antioxidantes e o radical DPPH pode ser reversível (Equação 3).



O radical DPPH apresenta uma coloração púrpura ou violeta com uma absorção em solução de etanol ou metanol entorno de 515-520 nm. A capacidade de uma amostra antioxidante pode ser monitorada utilizando um espectrofotômetro UV/visível. A redução do DPPH, tornando-se uma molécula estável, ocorre com perda ou diminuição da cor violeta, tornando-se numa solução de cor amarelo pálido (Oliveira, 2015).

Figura 1- Estrutura do radical livre estável DPPH•

FONTE: Oliveira (2015).

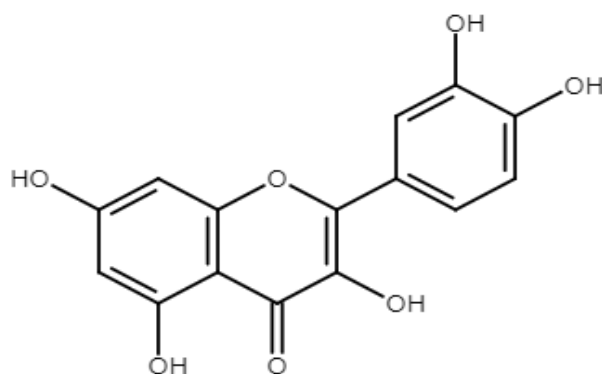
Figura 2 -Reação geral entre o radical DPPH• e compostos antioxidantes.

FONTE: Oliveira (2015).

Em muitos estudos a capacidade antioxidante das amostras de mel é expressa utilizando como padrão analítico o ácido ascórbico (vitamina C) e/ou a quercetina. O ácido ascórbico é considerado um dos antioxidantes naturais mais eficientes por ser um sequestrador muito eficiente de radicais livres. Estudo realizado por Sagdic *et al.*, (2013) expressou a capacidade antioxidante em equivalente de ácido ascórbico para mel que variam de 70 ± 5 mg/g de mel, a 86 ± 16 mg/g de mel. Outro estudo realizado por Kek *et al.*, (2018) determinou a capacidade antioxidante de méis produzido por abelhas *Apis dorsata*, expressando a capacidade antioxidante em equivalente de ácido ascórbico, obtendo concentração que variam de 14,23 a 26,64 mg AEAC/100g. O ácido ascórbico em soluções aquosas combate a espécies reativas de nitrogênio, impedindo a nitrogenação de moléculas (Sucupira *et al.* 2012).

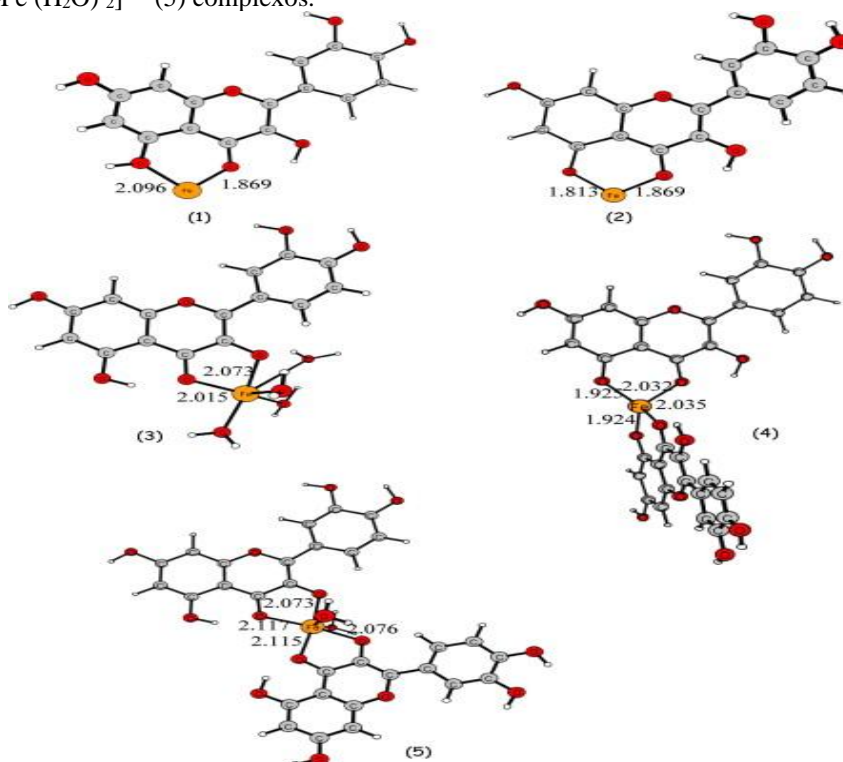
Por outro lado, existem também numerosos estudos que comprovam a atividade antioxidante da quercetina (**Figura 3**). Pertencente à classe dos flavonoides, a quercetina é encontrada em fontes naturais como cebola roxa, maçã, cerejas, alcaparras, uva vermelha inclusive no mel (Bueno-Costa *et al.*, 2016; Galo *et al.*, 2018). Os flavonoides são considerados micronutrientes por sua estrutura ideal para o sequestro de radicais livres (Alves *et al.*, 2015), e exercem sua atividade antioxidante inclusive através da formação de complexos estáveis com metais de transição envolvidos em reações moleculares que geram radicais livres altamente nocivos, como por exemplo, o radical hidroxila, produzido na reação de Fenton como é mostrado na **Figura 4** (Leopoldini *et al.*, 2011).

Figura 3 - Estrutura química da quercetina



FONTE: O autor (2021)

Figura 4- Geometrias de equilíbrio de mínimos absolutos de quercetina neutra- Fe^{2+} (1), quercetina desprotonada- Fe^{2+} (2), quercetina desprotonada- $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ (3), duas quercetinas desprotonadas- Fe^{2+} (4) e duas quercetinas desprotonadas - $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ (5) complexos.



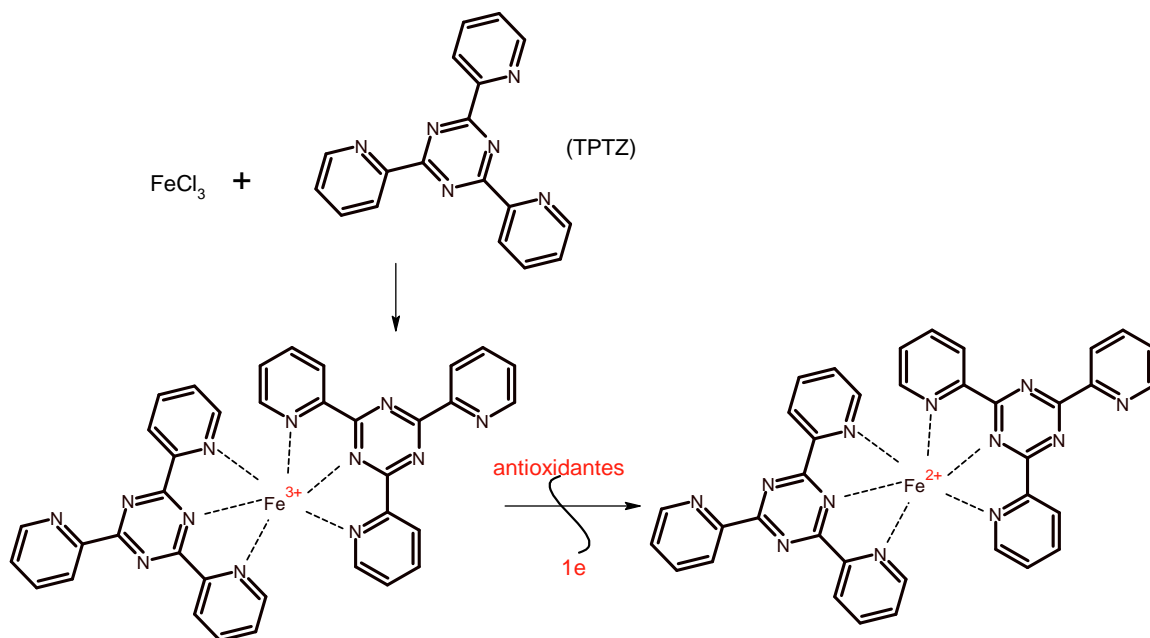
FONTE: Tomada de (Leopoldini *et al.*, 2011)

3.4.2 Método pela redução do íon férrico (FRAP)

O método FRAP (*ferric reducing antioxidant power*) se baseia na redução do cátion Fe^{3+} a Fe^{2+} em pH ácido pelo mecanismo de transferência de elétrons (ET). O método usa a 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) (**Figura 5**) como agente complexante e colorimétrico. O íon Fe^{3+} na presença da TPTZ forma um complexo de coloração roxo claro. Quando se leva a cabo a redução do íon Fe^{3+} , por parte de os antioxidantes presentes nas amostras, há uma alteração da cor, passando de roxo claro a roxo intenso. A reação pode ser monitorada através de um

espectrofotômetro UV/visível, num comprimento de onda de 593nm. (Urrea Victoria *et al.*, 2016; Benzie e Strain, 1996)

Figura 5 - Reação de redução do complexo Fe^{3+} -TPTZ a Fe^{2+} -TPTZ no ensaio FRAP.



FONTE: A autora (adaptado de Urrea 2016).

3.4.3 Vantagens e desvantagens dos métodos DPPH e FRAP

Os métodos DPPH e FRAP são uns dos ensaios mais utilizados na determinação da atividade antioxidante em amostras biológicas. Os mesmos apresentam tanto vantagens quanto desvantagens analíticas. Dentre as vantagens podemos citar sua rapidez, simplicidade e praticidade na aplicação. O método DPPH por ser um radical livre estável está disponível comercialmente, sendo necessário apenas o preparo de uma solução em solvente orgânico e de concentração adequada de DPPH. Por outro lado, no método FRAP é necessário preparar a solução do reagente FRAP, porém a solução é de preparo simples e os resultados são reprodutíveis (Oliveira de Sousa Pereira, 2010; Sucupira *et al.*, 2012).

Entre algumas das desvantagens dos métodos podemos mencionar: para o método de DPPH• falta da padronização de ensaios e forma de expressar os resultados (Oliveira, 2015), o tipo de solvente utilizado para dissolver o radical DPPH• (etanol e metanol) (Oliveira, 2015), a influência da luz e do pH do solvente utilizado para dissolver o radical DPPH•, sendo assim, todo o procedimento tem que ser realizado no escuro (Gülçin, 2012; Oliveira, 2015).

Entre as desvantagens apresentadas pelo método FRAP estão: o sistema de teste, o qual deve ser aquoso, de acordo com Moon e Shibamoto, (2009), esta é uma desvantagem do método

por que os antioxidantes de referência devem ser solúveis em água. Outra limitação do método FRAP, encontra-se com os compostos com potencial redox menor que o do par Fe (III)/Fe (II), que possam teoricamente reduzir o Fe (III) em Fe (II), contribuindo para valores de FRAP e induzindo a resultados maiores e falsos (Tiveron, 2010).

Adicionalmente, todos os métodos citados são realizados *in vitro* e muitas vezes não refletem o que aconteceria no sistema *in vivo*. Portanto, eles representam apenas uma estimativa do potencial antioxidante das amostras avaliadas.

3.5 PROLINA

A prolina é um dos aminoácidos mais presentes no mel, proveniente das secreções salivares das abelhas (Modeiros e Souza, 2016). É utilizado como padrão de referência para quantificar o conteúdo total de aminoácidos presentes no mel. Muitos estudos relacionam o teor de aminoácidos do mel com sua capacidade antioxidante (Da Silva *et al.*, 2016; Smetanska *et al.*, 2021). Os aminoácidos agem como antioxidantes, os quais, ajudam com a eliminação ou inibição dos radicais hidroxilas ou radicais livres no organismo quando o mel é ingerido (Long *et al.*, 2012). A propriedade de eliminação dos radicais hidroxilas da prolina foi usada recentemente pela comissão internacional do mel como critério para a determinação da capacidade antioxidante nos méis (Dağdeviren *et al.*, 2018).

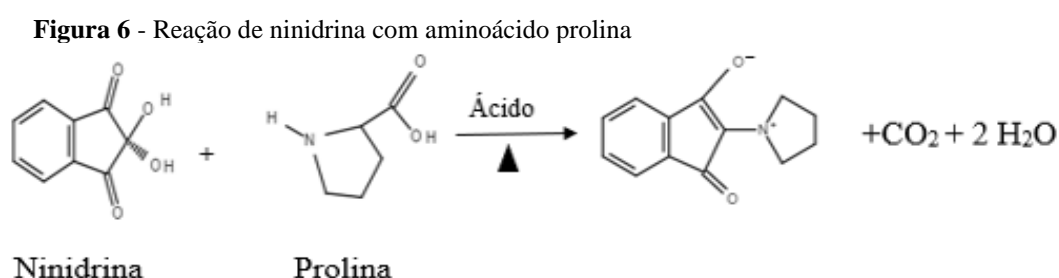
Além disso, o conteúdo da prolina presente no mel é útil como critério adicional da qualidade e maturação, proporcionando indicação de adulteração com açúcar (Meda *et al.*, 2005). Segundo o manual “*HARMONISED METHODS OF THE INTERNATIONAL HONEY COMMISSION*” um mel para ser considerado de boa qualidade deve ter um valor mínimo de teor de prolina de 180 mg/kg (Bogdanov, 2002).

De acordo com Bogdanov, (2009) o conteúdo de prolina muda de mel para mel, por exemplo, na Alemanha um mel que apresenta um teor de prolina inferior a 180 mg/kg é indicio de um mel não maduro ou adulterado. O teor de prolina em mel está representando cerca de 50-85% do total dos aminoácidos presentes, entretanto, quando esses dados são comparados com méis de abelhas nativas tem se verificado que a ocorrência desse aminoácido em méis de nativas é escassa (Duarte, 2009). Estudo realizado por Duarte, (2009), achou valores para o teor de prolina em mel de abelhas *Apis mellifera* em um intervalo de 403,1 a 1491,2 mg/kg e para méis de abelhas sem ferrão os valores de prolina variaram de 87 a 412,1 mg/kg, demonstrando que o

conteúdo de prolina para méis de abelhas nativas é inferior que o de méis de abelhas da espécie *Apis*.

Segundo Nanda *et al.*, (2009), os valores baixos de prolina podem estar relacionados à origem floral e as condições climáticas. Janiszewska *et al.*, (2012) analisaram o teor de prolina em méis de apicultores poloneses e concluíram que o teor de prolina não pode ser um bom indicador da origem botânica do mel dada a variabilidade entre as amostras de mesma origem confirmando que a prolina é adicionada principalmente por abelhas no processo de transformação do néctar em mel. Estudo com méis monoflorais mexicanos conferiram que existe uma correlação positiva entre o conteúdo de prolina e o potencial antioxidante através de ensaio de FRAP (Rodríguez *et al.*, 2012).

O procedimento para determinar o teor de prolina no mel, consiste na adição de uma alíquota de mel, ácido fórmico e uma solução de ninidrina em etilenoglicol. Os aminoácidos como a prolina reagem com a ninidrina em meio ácido formando um composto dipolar (**Figura 6**).



FONTE: adaptada de da Costa e Toro (2021)

3.6 ANÁLISES MULTIVARIADA DE IMAGENS

A análise de imagem digital ou imageamento foi desenvolvida por Geladi *et al.*, (1986) e tem tido grande acolhida na área da química devido a ser uma ferramenta útil, rápida e baixo custo para estimar concentrações de vários analitos, como medida em teores equivalente de vitamina C e também para mediada das geoprópolis produzidas por abelhas sem ferrão (Turco *et al.*, 2020).

Damasceno *et al.*, (2015) correlacionaram imagens digitais de águas potáveis com valores experimentais de pH, por meio da técnica de calibração multivariada empregando o algoritmo PLS. O estudo determinou que as imagens digitais podem ser empregadas como amostras de valor analítico, devido à facilidade em obtenção e de análise de grande quantidade de dados.

O estudo de Rios, (2018) empregou modelo matemático para estimar a idade de manchas de sangue em diferentes substratos e em diferentes condições ambientes aplicando imagens digitais. Mostrou que o método é adequado e tem potencial para ser usado em laboratórios de análises forenses.

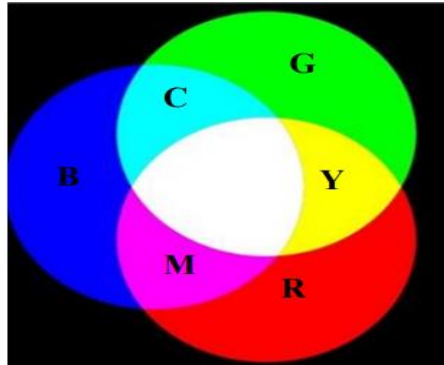
Herrero-Latorre *et al.*, (2019) investigaram a quantificação e adulteração de vinhos envelhecidos, baseados em análise de imagem multivariada e regressão de imagem multivariada baseados em informação do modelo de cor RGB (Red, Green, Blue). Foi concluído que as informações dos modelos RGB, sobre a cor dos vinhos podem ser exploradas aplicando procedimentos quimiométricos multivariados para detectar e quantificar adulterações de vinhos de alta qualidade, além disso, devido à sua simplicidade e baixo custo pode ser aplicada em laboratórios de controle como uma primeira e rápida etapa na detecção de fraudes em vinhos.

As imagens digitais monocromáticas são aproximações de imagem reais geralmente obtidas utilizando-se dispositivos de captura de imagem. (Turco, 2019). Na atualidade existem diversas variedades de modelos de cores ou também chamados espaços de cores, entre os que se destaca RGB (Red, Green, Blue), HSV (Hue, Saturation e Value) e CMYK (Ciano, Magenta, Yellow, black). Consideram-se os sistemas de cores mais utilizados para analisador digital de cores, utilizando-se para transformar as informações de cores em valores numéricos, e desta maneira ser tratados como informação analítica. (Damasceno *et al.*, 2015; Fan *et al.*, 2021; Rios, 2018).

3.7 MODELO DE COR RGB

O princípio de percepção de cores pelo olho humano é a base do modelo de cor RGB. As cores são especificadas por meio de a mistura das três cores primárias aditivas vermelho (R), verde (G) e azul (B) em uma matriz tridimensional. As cores secundárias resultam da combinação de duas dessas cores, em intensidades iguais: ciano (azul + verde), magenta (azul + vermelho) ou amarelo (verde + vermelho), conforme ilustra a **Figura 7**.

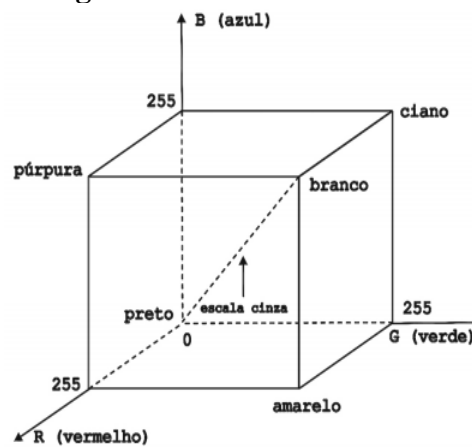
Figura 7 -Modelo de cor aditiva mais conhecida é o Modelo RGB



FONTE: Adaptado de <https://www.amopintar.com/modelos-de-cor/>

É possível converter matematicamente as características de uma imagem RGB em escala de cinza, sendo essa uma soma ponderada das cores primárias (vermelho, azul e verde). Cada canal traz consigo uma quantidade de tom que pode variar de 0 que é ausência total a 255 que é presença (em resolução de 8 bits) níveis de tonalidades. Por exemplo a combinação da cor verde (R=0, G = 255 e B = 0). Por tanto uma imagem RGB é um arranjo tridimensional de cores primárias (FEITOSA, 2015). O modelo RGB geometricamente podem ser visualizados em um cubo de cores ver **Figura 8**.

Figura 8 - Cubo de cores RGB



FONTE: Damasceno (2015)

Na **Fig. 8** cada eixo representa a contribuição da cor primária com intensidade variando de 0 a 255 (8 bits) para formar outras cores. Ou seja, possui 256 níveis de intensidade, com 16,7 milhões de cores. Para cada par de eixos, um plano é gerado com a cor secundária no topo de cada plano (contribuição igual das duas cores primárias). Na intersecção dos três planos, existe o preto, sem cor, ao contrário do branco, que é uma mistura justa das três cores primárias com intensidade máxima. A diagonal principal desse grupo é a escala de cinza.

3.8 QUIMIOMETRÍA

Segundo a sociedade de quimiometria: a quimiometria é a aplicação de ferramentas matemáticas e estatística à química (Feitosa, 2015). De acordo com de Barros Neto *et al.*, (2006) a quimiometria pode-se aplicar no planejamento e otimização de experimentos, reconhecimentos de padrões (análises exploratórias e classificação), e na calibração multivariada, empregando procedimentos matemáticos e estatísticos para interpretar, classificar e fornecer a máxima informação na análise de dados obtidos (Feitosa, 2015).

O objetivo da quimiometria está fundamentado em reduzir as grandes quantidades de informações que em ocasiões podem ser redundantes, para dados ou informações reduzidos que podem ser também chamados de variáveis latentes e ser mais fáceis para sua explicação e interpretação. Czarnecki *et al.*, (2015). Entre os métodos quimiométricos empregados no tratamento de dados analíticos encontra-se os reconhecimentos de padrões e calibração multivariada, destacando-se a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS, *Partial Least Square*) na calibração multivariada (Rios, 2018).

3.9 REGRESSÃO POR MÍNIMOS QUADRADOS PARCIAIS (PLS)

O método de regressão por mínimo quadrado parciais (PLS) foi inicialmente originado para ser usado no campo da econometria, com o decorrer do tempo, vem-se aplicando em outros setores como na química, os farmacêuticos, os alimentícios e os plásticos. A principal finalidade do método PLS é construir um modelo matemático linear, para estabelecer uma relação $\mathbf{X} = (x_1, \dots, x_k)$ em uma matriz ($N \times K$) denominadas variáveis independentes ou predictoras, com $\mathbf{Y} = (y_1, \dots, y_M)$ em uma matriz ($N \times M$) designadas variáveis dependentes ou resposta. O resultado é uma equação semelhante à **Equação 4** (Rodrigues e Machado, 2013):

$$\mathbf{y} = \mathbf{x}\mathbf{b} + \mathbf{e} \qquad \text{Equação 4}$$

Onde: \mathbf{x} denomina-se variáveis independentes ou preditora; \mathbf{y} variáveis dependentes ou resposta; \mathbf{b} corresponde ao vetor de regressão e \mathbf{e} corresponde ao vetor que representa os erros do modelo.

O método PLS extrai um pequeno número de novas variáveis, que podem ser chamadas de fatores ou componentes, os fatores descrevem \mathbf{X} e predizem \mathbf{Y} . A regressão PLS é uma técnica de predição que está em ênfase de desenvolvimento para criar modelos preditivos com

a capacidade de modelar em uma análise multivariáveis com respostas conjuntamente (Morellato, 2010).

Na construção de modelos de regressão são necessárias duas etapas: a primeira etapa é a construção do modelo de calibração, e na segunda etapa a construção do modelo de validação. Uma aplicação comum é modelar a relação entre medidas espectrais (NIR, IR e UV), e a composição química ou propriedades físico-químicas das amostras (Rios, 2018).

A validação dos modelos é uma etapa importante já que está relacionada com a capacidade preditiva do modelo. Por tanto, na determinação do número de variáveis latentes (VL) para o modelo deve-se sempre selecionar um número adequado de VL que proporcione informações suficientes para modelar os dados. Segundo Abdi (2010), a capacidade de predição dos modelos não sempre melhora com o aumento das variáveis latentes usadas no modelo. Regularmente a predição de um modelo tende a aumentar até um certo número de variáveis latentes. Quando se dá o caso que o número de variáveis latentes aumenta e a predição diminui, tem-se indício que o modelo está superdimensionando, por tanto é importante otimizar um número de variáveis latentes.

O parâmetro RMSEP do inglês, *root mean squares error of prediction*, é um indicador da confiabilidade e a capacidade preditiva, além de indicar os erros de predição dos modelos. Segundo Li (2010) o desempenho do modelo pode ser verificado por sua capacidade de predição pelos parâmetros RMSEP para o conjunto de validação e RMSEC (do inglês, *root mean square error of calibration*), para o conjunto de calibração. A raiz quadrada do erro médio da validação RMSECV do inglês, *Root Mean Standard Error of Cross Validation*, o coeficiente de correlação ou R^2 , a razão de RMSEP e RMSECV são utilizadas para indicar a robustez do modelo. Valores da razão de RMSEP e RMSECV mais próximos a 1 indicam um modelo robusto (Augusto *et al.*, 2017; Rios, 2018) com excelente capacidade de predição da propriedade estimada para um conjunto novo de amostras.

Dominguez e Centurión, (2015) com o objetivo de analisar a cor em oitenta amostras de méis do sudoeste da província de Buenos Aires, Argentina aplicaram análises de imagens digitais combinado com calibração multivariada usando mínimos quadrados parciais (PLS). Os resultados obtidos utilizando o modelo de cores HSB, indicam que o uso de imagens digitais combinadas com calibração multivariada é uma excelente estratégia de análise para quantificar a cor nestes tipos de amostras, além de ser um método simples, rápido que requer pequenas quantidades de amostras e de fácil automatização.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS DE MEL: ABELHAS PRODUTORAS E ORIGEM GEOGRÁFICA

Para este trabalho foram analisadas 94 amostras do mel de abelhas sem ferrão e uma amostra de abelha *Apis mellifera*. Onde 89 amostras de mel de abelhas sem ferrão foram cedidas pela professora Eliane Sloboda Rigobello da Universidade Tecnológica Federal Do Paraná, a professora obteve as amostras diretamente das doações feitas pelos apicultores do Brasil (**Figura 9**) de 21 municípios de quatro estados do Brasil (**Tabela 2**). A maioria das amostras são provenientes do estado do Paraná dos municípios Marialva, Tuneiras do Oeste, Jussara, Marechal Candido Rondon, Guaraqueçaba, Floresta, Ponta Grossa, Perobal, Pérola, Cambará, Mandirituba, Ortigueira, Maringá, Nova Tebas, São Lorenzo, Foz de Iguaçu, Santa Helena, São José dos Pinhais, Guarapuava. Foram recebidas nove amostras de Rondônia dos municípios Ariqueme e Cacoal, uma amostra do estado Goiás e uma do estado Bahia. Outras 5 amostras de mel de abelhas sem ferrão foram cedidas pelo professor João Marcelo da Universidade Estadual Do Centro-Oeste (UNICENTRO). A amostra de mel de abelha *Apis mellifera* foi obtida no comercio local de Guarapuava. Todas as amostras de mel foram preservadas em freezer até o momento de serem utilizadas para análise.

Figura 9 – Estados brasileiros de origem das amostras de mel de abelhas nativas



FONTE: O autor (2021)

As amostras de mel foram reunidas em grupos se apresentavam a mesma origem geográfica e a mesma espécie de abelha produtora.

Tabela 2 - Relação das amostras de mel analisadas: espécies de abelhas produtora e origem geográfica.

Amostras	Código	Amostras por grupo	Abelha produtora	Nome popular	Estado	Município	Grupo
1	1. 01	4	<i>Tetragonisca angustula</i>	Jataí	Rondônia	Ariquemes	I
2	2. 03		<i>Tetragonisca angustula</i>	Jataí	Rondônia	Ariquemes	
3	3. 05		<i>Tetragonisca angustula</i>	Jataí	Rondônia	Ariquemes	
4	4. 06		<i>Tetragonisca angustula</i>	Jataí	Rondônia	Ariquemes	
5	5. 07	2	<i>Tetragonisca angustula</i>	Jataí	Rondônia	Cacoal	II
6	6. 08		<i>Tetragonisca angustula</i>	Jataí	Rondônia	Cacoal	
7	7. 11	3	<i>Tetragonisca weyrauchi</i>	Jataí acreana	Rondônia	Ariquemes	III
8	8. 12		<i>Tetragonisca weyrauchi</i>	Jataí acreana	Rondônia	Ariquemes	
9	9. 14		<i>Tetragonisca weyrauchi</i>	Jataí acreana	Rondônia	Ariquemes	
10	10. 1 – A1	2	<i>Tetragonisca angustula</i>	Jataí	Paraná	Marialva	IV
11	11. 2 – A2		<i>Tetragonisca angustula</i>	Jataí	Paraná	Marialva	
12	12. 3 – B	1	<i>Tetragonisca angustula</i>	Jataí	Paraná	Jussara	V
13	13. 4 – C	1	<i>Tetragonisca angustula</i>	Jataí	Paraná	Marechal Candido Rondon	VI
14	14. 5 – D1	1	<i>Tetragonisca angustula</i>	Jataí	Paraná	Guaraqueçaba	VII
15	15. 6 – D2	1	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Mandaçaia	Paraná	Guaraqueçaba	VIII
16	16. 7 – D3	1	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Canudo	Paraná	Guaraqueçaba	IX
17	17. 8 – E1	1	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Mandaçaia	Paraná	São José dos Pinhais	X
18	18. 9 – E2	1	<i>Melipona bicolor schencki</i>	Guaraipo	Paraná	São José dos Pinhais	XI
19	19. 10 – F	1	<i>Tetragonisca angustula</i>	Jataí	Paraná	Floresta	XII
20	20. 11 – G	1	<i>Tetragonisca angustula</i>	Jataí	Paraná	Tuneiras	XIII
21	21. 12 – H	1	<i>Tetragonisca angustula</i>	Jataí	Paraná	Ponta Grossa	XIV
22	22.13 – I-1	1	<i>Tetragonisca angustula</i>	Jataí	Paraná	Perobal	XV
23	23.14 – I-2	2	<i>Tetragonisca angustula</i>	Jataí	Paraná	Pérola	XVI
24	24. 15 – J		<i>Tetragonisca angustula</i>	Jataí	Paraná	Pérola	
25	25.16 – K1	1	<i>Tetragonisca angustula</i>	Jataí	Paraná	Cambará	XVII
26	26. 17 – K2	1	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Canudo	Paraná	Cambará	XVIII
27	27. 18 – L1	1	<i>Tetragonisca angustula</i>	Jataí	Paraná	Mandirituba	XIX
28	28. 19 – L2	1	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Canudo	Paraná	Mandirituba	XX
29	29. 20 – L3	1	<i>Tetragonisca angustula</i>	Jataí	Paraná	Mandirituba	XXI

(Continua)

(Continuação)

Amostras	Código	Amostras por grupo	Abelha produtora	Nome popular	Estado	Município	Grupo
30	30. 21 – L4	2	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Mandaçaia	Paraná	Mandirituba	XXII
31	31. 22 – L5		<i>Melipona quadrifasciata</i>	Mandaçaia	Paraná	Mandirituba	
32	32. 23 – L6	1	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Canudo	Paraná	Mandirituba	XXIII
33	33. 24 – M	1	<i>Tetragonisca angustula</i>	Jataí	Paraná	Ortigueira	XXIV
35	35. 26 – O	1	<i>Scaptotrigona Bipunctata</i>	Canudo	Paraná	Maringá	XXV
36	36	1	<i>Tetragonisca angustula</i>	Jataí	Paraná	Nova Tebas	XXVI
37	37. T001	41	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Canudo	Paraná	Maringá	XXVII
38	38. T002		<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Canudo	Paraná	Maringá	
39	39. T002		<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Canudo	Paraná	Maringá	
40	40. T002		<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Canudo	Paraná	Maringá	
41	41. T003		<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Canudo	Paraná	Maringá	
42	42. T003		<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Canudo	Paraná	Maringá	
43	43. T003		<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Canudo	Paraná	Maringá	
46	46. T005		<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Canudo	Paraná	Maringá	
47	47. T005		<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Canudo	Paraná	Maringá	
48	48. T006		<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Canudo	Paraná	Maringá	
49	49. T006		<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Canudo	Paraná	Maringá	
50	50. T006		<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Canudo	Paraná	Maringá	
51	51. T007		<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Canudo	Paraná	Maringá	
52	52. T007		<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Canudo	Paraná	Maringá	
53	53. T007		<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Canudo	Paraná	Maringá	
54	54. T008		<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Canudo	Paraná	Maringá	
55	55. T008	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Canudo	Paraná	Maringá		
56	56. T008	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Canudo	Paraná	Maringá		
57	57. T009	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Canudo	Paraná	Maringá		
58	58. T009	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Canudo	Paraná	Maringá		
59	59. T009	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Canudo	Paraná	Maringá		
60	60. T010	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Canudo	Paraná	Maringá		
61	61. T011	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Canudo	Paraná	Maringá		
62	62. T011	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Canudo	Paraná	Maringá		
63	63. T011	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Canudo	Paraná	Maringá		
64	64. T012	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Canudo	Paraná	Maringá		

(Continua)

(Conclusão)

Amostras	Código	Amostras por grupo	Abelha produtora	Nome popular	Estado	Município	Grupo
65	65. T012		<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Canudo	Paraná	Maringá	
66	66. T012		<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Canudo	Paraná	Maringá	
67	67. T013		<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Canudo	Paraná	Maringá	
68	68. T013		<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Canudo	Paraná	Maringá	
69	69. T013		<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Canudo	Paraná	Maringá	
70	70. T015		<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Canudo	Paraná	Maringá	XXVII
71	71. T015		<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Canudo	Paraná	Maringá	
72	72. T015		<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Canudo	Paraná	Maringá	
73	73. T016		<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Canudo	Paraná	Maringá	
74	74. T016		<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Canudo	Paraná	Maringá	
75	75. T016		<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Canudo	Paraná	Maringá	
76	76. T017		<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Canudo	Paraná	Maringá	
77	77. T017		<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Canudo	Paraná	Maringá	
78	78. T017		<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Canudo	Paraná	Maringá	
79	79. T019		<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Canudo	Paraná	Maringá	
44	44.T004	2	<i>Scaptotrigona postica</i>	Mandaguari	Paraná	Maringá	XXVIII
45	45.T005		<i>Scaptotrigona postica</i>	Mandaguari	Paraná	Maringá	
80	80	1	<i>Tetragonisca angustula</i>	Jataí	Paraná	Maringá	XXIX
81	81	2	<i>Tetragonisca angustula</i>	Jataí	Paraná	São Lourenço	XXX
82	82		<i>Tetragonisca angustula</i>	Jataí	Paraná	São Lourenço	
83	83	1	<i>Tetragonisca angustula</i>	Jataí	Paraná	Foz do Iguaçu	XXXI
84	84	1	<i>Tetragonisca angustula</i>	Jataí	Paraná	Santa Helena	XXXII
85	85	1	<i>Tetragonisca angustula</i>	Jataí	Paraná	Guaraqueçaba	XXXIII
86	86	1	<i>Melipona marginata</i>	Manduri	Paraná	Guaraqueçaba	XXXIV
87	87	1	<i>Tetragona clavipes</i>	Borá	Paraná	Guaraqueçaba	XXXV
88	88	1	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Mandaçaia	Bahia		XXXVI
89	89	1	<i>Tetragona clavipes</i>	Borá	Goiás		XXXVII
90	90	1	<i>Tetragonisca angustula</i>	Jataí	Paraná	Nova Tebas	XXXVIII
91	91	1	<i>Melipona marginata</i>	Manduri	Paraná	Guarapuava	XXXIX
92	92	1	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Mandaçaia	Paraná	Guarapuava	XL
93	93	1	<i>Melipona mondury</i>	Uruçu	Paraná	Guarapuava	XLI
94	94	1	<i>Melipona bicolor schencki</i>	Guaraipo	Paraná	Guarapuava	XLII
95	95	1	<i>Tetragonisca angustula</i>	Jataí	Paraná	Guarapuava	XLIII
96	96	1	<i>Apis mellifera</i>		Paraná		XLIV

4.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO MEL DE ABELHAS NATIVAS: ENSAIO DPPH

4.2.1 Otimização das condições de realização do ensaio DPPH

4.2.1.1 Planejamento fatorial 2² com ponto central para otimização dos volumes relativos das soluções de mel e DPPH.

Primeiramente foi feito um planejamento fatorial 2² (**Tabela 3**) com ponto central para determinar as quantidades adequadas da solução do mel e de radical livre DPPH a utilizar no ensaio.

Tabela 3 - Parâmetros avaliados e níveis estabelecidos no planejamento 2² com ponto central.

Parâmetros avaliados	Nível superior (+1)	Nível inferior (-1)	Ponto central
Volume de mel (µL)	500	100	300
Volume de DPPH (µL)	150	50	100

FONTE: O autor (2020).

Para esses experimentos foi utilizada a amostra 12 por apresentar cor mais escura, característica que em alguns estudos tem sido relacionada a uma maior atividade antioxidante (Gomes *et al.*, 2017; Oliveira *et al.*, 2012). O mel (1 mL) foi dissolvido em 10 mL de água deionizada. Posteriormente, a solução foi agitada durante 10 minutos em um vórtex. Foi preparada uma solução de DPPH em metanol na concentração de 1,3 mM, segundo metodologia de Gomes *et al.*, (2017) com adaptação. Para tal, pesaram-se 0,05 g de DPPH que foram dissolvidos em 100 mL de metanol. Essa solução estoque foi conservada em frasco âmbar coberto com papel alumínio.

Foram realizados 13 ensaios (utilizando a amostra 12), os volumes utilizando foram predefinidos pelo planejamento fatorial (**Tabela 4**) e ajustando o volume final com metanol até completar 3 mL. A solução controle para leitura da absorbância inicial de cada ensaio foi constituída pelo volume da solução de DPPH como descrito no planejamento e substituindo volume de mel por água deionizada. Cada solução de ensaio ficou em repouso por 25 minutos protegida da luz com papel alumínio. Após esse tempo foi transferida para cubeta de quartzo e a absorbância foi lida em espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu® UV-1800) a 517 nm.

Tabela 4 - Ensaios do Planejamento fatorial 2^2 com ponto central.

Ensaio	Volume de mel (μL)	Volume de DPPH (μL)
1	100	50
2	500	50
3	100	150
4	500	150
5	20	100
6	580	100
7	300	30
8	300	170
9	300	100
10	300	100
11	300	100
12	300	100
13	300	100

FONTE: O autor (2021).

4.2.2 Determinação do tempo de reação entre os antioxidantes do mel e o radical DPPH

Para a determinação do tempo de reação ideal entre os antioxidantes do mel e o radical DPPH foram misturados 100 μL da solução do mel e 150 μL da solução de DPPH 1,3 mM, (volumes determinados previamente como ótimos de acordo com o planejamento 2^2) e 2750 μL metanol. A absorbância da solução resultante foi medida a 517 nm, cada 5 minutos, durante um período de 50 minutos.

4.2.3 Determinação da capacidade antioxidante das amostras de mel através do método da inibição do radical estável DPPH

A determinação da capacidade antioxidante foi feita utilizando o método espectrofotométrico de inibição do radical estável DPPH. Para cada uma das amostras de mel foi preparada uma solução com água destilada numa proporção 1 mL do mel, 10 mL de água deionizada e agitada durante 10 minutos em vórtex. Após esse tempo, foi tomada uma alíquota de 100 μL desta solução, adicionada 150 μL de solução de DPPH e 2750 μL de metanol. Após o período de 25 minutos e em ausência de luz foi realizada a leitura da absorbância em 517 nm contra um branco de metanol. Para cada amostra de mel este procedimento foi realizado em triplicata. A solução controle para leitura da absorbância inicial foi constituída de 100 μL de água deionizada, 150 μL da solução de DPPH e 2750 μL de metanol.

A capacidade antioxidante de cada mel foi expressa através da porcentagem de inibição do radical DPPH calculada pela diminuição da absorbância das amostras de mel em relação a absorbância do controle dividido pela absorbância do controle e multiplicado por 100 (ver **Equação 5**) (Oliveira, 2015).

$$I (\%) = [(A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}) / (A_{\text{controle}})] * 100$$

Equação 5

Onde: I (%) = porcentagem de inibição;

A_{controle} = Absorbância do controle;

A_{amostra} = Absorbância de cada amostra.

A capacidade antioxidante de cada mel também foi expressa em termos de equivalente de quercetina e equivalentes de ácido ascórbico (atividade antioxidante em $\mu\text{g/mL}$ de quercetina ou de ácido ascórbico). Para tal, foram elaboradas curvas analíticas com cada antioxidante padrão, quercetina (SIGMA, 98%) e ácido ascórbico (F. Maia® 99,9%)

Preparou-se uma solução estoque de quercetina e outra de ácido ascórbico, ambas na concentração de $1000 \mu\text{g/mL}$ em 10 mL de metanol (P.A). A partir da solução estoque foram preparadas soluções diluídas de cada padrão em balão volumétrico de 5 mL . As soluções padrão de quercetina foram preparadas nas concentrações de $50, 40, 20, 10, 5, 1 \mu\text{g/mL}$, e de ácido ascórbico de $80, 50, 40, 20, 10, 5 \mu\text{g/mL}$.

Para a realização de cada curva analítica foi tomado $100 \mu\text{L}$ de cada solução diluída de antioxidante padrão, $150 \mu\text{L}$ de DPPH e $2750 \mu\text{L}$ de metanol. Após agitação, aguardou-se um tempo de 25 minutos de repouso em ausência de luz e realizou-se a medida da absorbância a 517 nm , contra um branco de metanol, no espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu® UV-1800). Uma solução foi utilizada como controle, a qual foi preparada com $150 \mu\text{L}$ de DPPH e $2850 \mu\text{L}$ de metanol. Para poder expressar a concentração de quercetina e ácido ascórbico em $\text{mg}/100 \text{ g}$ do mel se pesou-se 1 mL de cada umas das mel, todo o procedimento foi realizado em duplicata.

4.3 ENSAIO FRAP

4.3.1 Otimização das condições de realização do ensaio FRAP para análise das amostras de mel

4.3.1.1 Planejamento fatorial 2^3 para otimização dos volumes relativos das soluções de mel, FRAP e o tempo.

Primeiramente foi feito um planejamento fatorial 2^3 para determinar as quantidades da solução do mel, FRAP e o tempo adequado para a reação (**Tabela 5**).

Tabela 5 - Parâmetros avaliados e níveis estabelecidos no planejamento 2³ensaio FRAP.

Parâmetros avaliados	Nível superior (+)	Nível inferior (-1)
Volume de mel (µL)	300	100
Volume de FRAP (µL)	800	400
Tempo (min)	30	10

FONTE: O autor (2021).

Para os procedimentos de otimização foi utilizada a amostra 89 por dispor de maior quantidade. A amostra foi descongelada em temperatura ambiente. Posteriormente, foram preparados 8 tubos *falcon* com uma réplica. No preparo das amostras, se pesaram-se 0,2 g de uma porção do mel em tubos de 15 mL, dissolvidos em 1 mL de água deionizada, posteriormente, a solução foi agitada durante 5 minutos em um vórtex.

A solução do reagente FRAP foi preparada segundo a metodologia de Rufino *et al.*, (2006). Foram misturados no momento da análise 25 mL de solução tampão acetato 0,3 M, em seguida 2,5 mL de uma solução 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) (Sigma®99%) 10 mM), e 2,5 mL de uma solução aquosa de cloreto férrico 20 mM.

Os experimentos com a amostra 89 foram conduzidos de acordo com os ensaios delineados no desenho fatorial (**Tabela 6**), ajustando o volume final com água deionizada até completar 3 mL. As soluções foram misturadas no vórtex durante um período de 1 minuto. O controle para a leitura da absorbância inicial de cada ensaio foi constituído pelo volume da solução do reagente FRAP, como descrito no planejamento e substituindo volume de mel por água deionizada. Cada solução foi protegida da luz com papel alumínio. Após o tempo de espera, a solução foi transferida para a cubeta de quartzo e a absorbância foi lida em espectrofotômetro UV-Vis (Shimadza® UV- 1800) a 593 nm.

Tabela 6 - Ensaio do planejamento fatorial 2³ para otimização do ensaio FRAP.

Ensaio	Volume de solução de mel (µL)	Volume da solução do reagente FRAP (µL)	Tempo (min)
1	100	400	10
2	300	400	10
3	100	800	10
4	300	800	10
5	100	400	30
6	300	400	30
7	100	800	30
8	300	800	30
9	100	400	10
10	300	400	10
11	100	800	10
12	300	800	10
13	100	400	30
14	300	400	30
15	100	800	30
16	300	800	30

FONTE: O autor (2021).

4.3.2 Determinação da capacidade antioxidante das amostras de mel através do método de redução de ferro (FRAP)

A capacidade antioxidante foi medida pelo método FRAP, empregando a metodologia utilizada por Rufino *et al.*, (2006). Para cada uma das amostras de mel foram pesados 0,2 g, diluídos em 1,0 mL de água deionizada e a mistura agitada durante 5 minutos em vórtex. Após esse tempo, foi tomada uma alíquota de 100 μ L, e misturada com 400 μ L da solução do reagente FRAP, e 2500 μ L de água deionizada para completar um volume de 3 mL. Esta nova solução foi homogeneizada utilizando um vórtex, e logo, deixada por um período de 10 minutos em banho maria a 37 °C protegida da luz com papel alumínio (**Figura 10**).

Após decorrido os 10 minutos no banho de maria, foi medida a absorbância em um espectrofotômetro UV-Vis (Shimadza® UV- 1800) em um comprimento de onda de 593 nm. O branco foi preparado com 100 μ L de água deionizada, 400 μ L de solução do reagente FRAP e mais 2500 de água deionizada.

Para determinar o poder de redução das amostras de mel foi construída uma curva de calibração de sulfato ferroso heptahidratado nas concentrações 100, 300, 500, 700, 900, 1.100, 1.300, 1.500 μ M. Para a preparação das soluções foi preparado uma solução mãe de 2 mM de sulfato ferroso heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (SIGMA 99,0 %).

Para a realização da curva de calibração foram tomados 100 μ L de cada uma das soluções padrão e misturados com 400 μ L da solução do reagente FRAP, e 2500 μ L de água deionizada para completar um volume de 3 mL. A solução passou pela etapa de agitação em vórtex, deixada por um período de 10 minutos em banho maria 37 °C protegida da luz com papel alumínio. Após decorrido o tempo foi medida a absorbância em um espectrofotômetro UV-Vis (Shimadza® UV- 1800) em um comprimento de onda de 593 nm. Os resultados foram calculados em função da massa inicial do mel e expressados em $\mu\text{mol Fe}^{2+}/100 \text{ g}$ do mel.

Figura 10 – Fotografia das amostras de mel no banho maria para ser medidas pelo ensaio FRAP



FONTE: O autor (2021).

4.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROLINA EM MEL DE ABELHA NATIVA

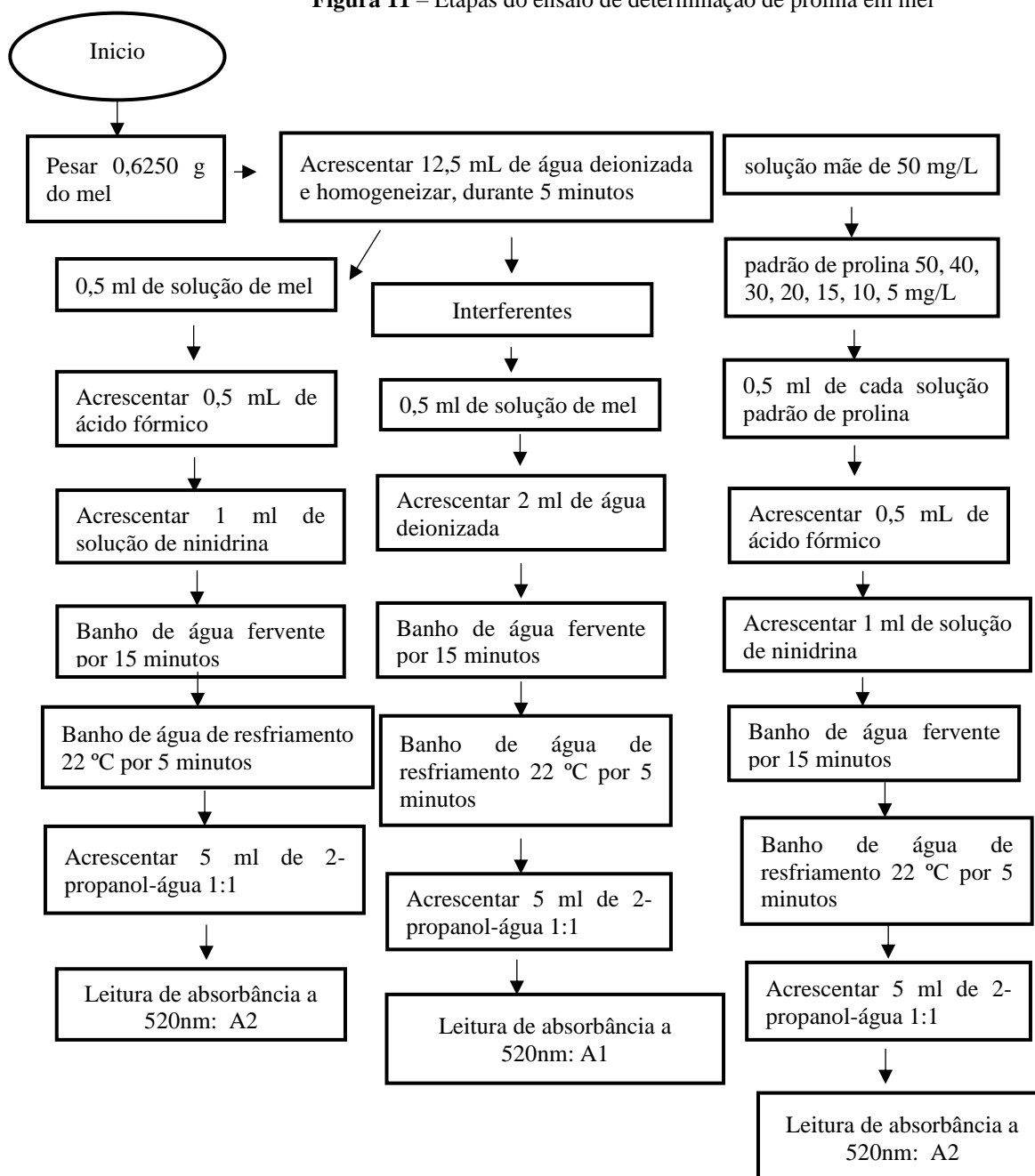
O conteúdo de prolina nas amostras de mel foi determinado segundo a metodologia descrita por Truzzi *et al.*, (2014) com algumas pequenas modificações. As amostras foram descongeladas em temperatura ambiente. As amostras foram preparadas tomando aproximadamente $0,62 \pm 0,1$ g de mel que foram dissolvidos em 12,5 mL de água deionizada e agitados durante 5 minutos em vórtex. Após transcorrido esse tempo foi tomado uma alíquota de 0,5 mL da solução de mel e colocada em num tubo *falcon* de 15 mL. No tubo falcon também se adicionaram, 0,2 mL de ácido fórmico, 1 mL de ninidrina (3% em etilenoglicol) e agitando-se durante 1 minuto em vórtex.

Após este tempo os tubos foram colocados num banho maria fervente durante 15 minutos, e posteriormente num banho de água de resfriamento 22 °C durante 5 minutos. No final adicionou-se 5 mL de 2-propanol (1:1) e a solução foi agitada durante 1 minuto. Todas as soluções para análise foram preparadas em triplicatas (**Figura 11**). A absorbância foi lida em um espectrofotômetro UV-Vis (Shimadza® UV- 1800) em um comprimento de onda de 520 nm. A solução do branco para a leitura da absorbância inicial foi constituída com 0,5 mL de água deionizada, 0,25 mL de ácido fórmico, 1 mL de ninidrina e 5 mL 2-propanol (1:1).

Para determinar o sinal dos interferentes presentes nas soluções de méis, realizou-se a leitura de cada umas das soluções de méis sem adição de quaisquer reagentes. Neste procedimento se tomou uma alíquota de 0,5 mL da solução de mel e colocada em num tubo *falcon* de 15 mL, mais 2 mL de água deionizada e agitando-se durante 1 minuto em vórtex. Após este tempo as soluções foram colocadas em um banho maria fervente durante 15 minutos, e posteriormente num banho de água de resfriamento 22 °C durante 5 minutos. No final adicionou-se 5 mL de 2-propanol (1:1) e a solução foi agitada durante 1 minuto. Todas as soluções foram preparadas em triplicatas. Como sugerido no trabalho de Truzzi *et al.*, (2014), para minimizar a contribuição da cor da solução do mel nos resultados de teor de prolina, foi medida a absorbância A1, pelas etapas delineadas na figura 11, e o valor obtido foi subtraído do valor A2. O registro da absorbância foi realizado em um espectrofotômetro UV-Vis (Shimadza® UV- 1800), em um comprimento de onda de 520 nm.

Uma curva analítica foi construída utilizando o padrão de prolina (Sigma 98%), nas concentrações 50, 40, 30, 20, 15, 10, 5 mg/L em água deionizada. As soluções padrão foram preparadas a partir de uma solução mãe de 50 mg/L. Os resultados foram calculados em função da massa inicial do mel e expressos em equivalentes mg prolina /kg de mel.

Figura 11 – Etapas do ensaio de determinação de prolina em mel



FONTE: O autor (2021)

4.5 OBTENÇÃO DE IMAGENS DIGITAIS DE MÉIS DE ABELHAS NATIVAS

A obtenção das imagens digitais das amostras de méis de abelhas sem ferrão foi realizado pelo método descrito em *Turco et al.*, (2020). Para obter a fotografia dos méis, foram tomados 2 mL de cada amostra de mel e transferidos para um eppendorf de plástico transparente. Foi utilizada como câmera fotográfica um celular *iphone 8 plus* que dispõe de uma resolução full HD 1920 x 1080 pixels. A mesma foi adaptada a um suporte universal com

garra como mostrado na **Figura 12**. Esta montagem permitiu manter a câmera e os eppendorf em uma posição fixa. Para o plano de fundo das fotografias, utilizou-se uma folha de papel branca. Para cada amostra foram obtidas imagens em triplicatas.

Figura 12 – Suporte utilizado para obtenção das fotografias do mel

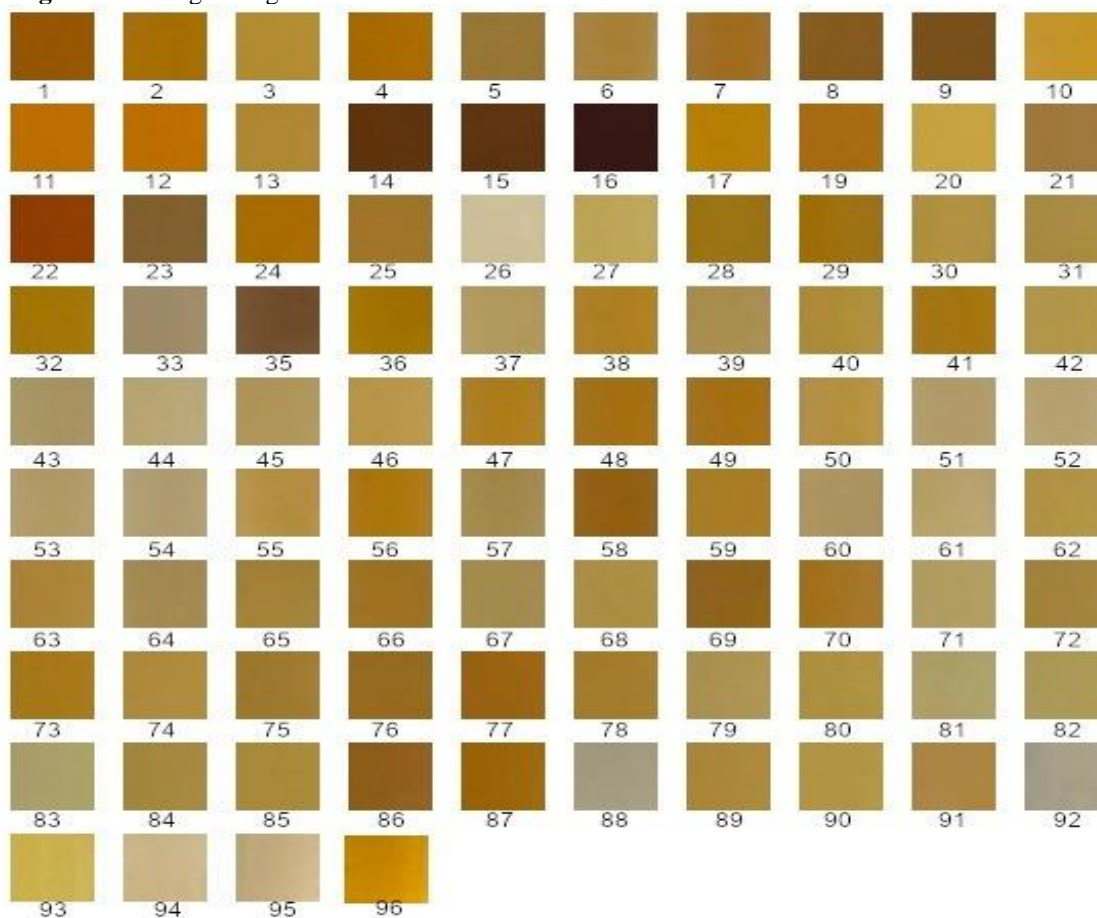


FONTE: O autor (2020)

4.6 PROCESSAMENTO DAS FOTOGRAFIAS DIGITAIS PARA ANÁLISE MULTIVARIADA

As fotografias das amostras de méis foram recortadas digitalmente utilizando o software livre editor de imagens **Gimp® V.2.10.4**. Utilizou-se um tamanho padrão de 409 pixels de largura por 870 pixels de altura de modo a excluir as bordas e deixando somente a cor da amostra de mel. O processo foi realizado em triplicata para todas as amostras do mel (**Figura 13**).

O tratamento das imagens recortadas foi realizado por meio do programa **Gimp**. As imagens foram transformadas para o sistema RGB obtendo-se uma matriz de dados composta por 264 colunas, sendo uma para cada amostra e 768 linhas que corresponde a 256 R, 256 G e 256 B. Os valores obtidos de cada cor foram utilizados como variáveis independentes X. A matriz Y de variáveis dependentes foi constituída pelas respostas obtidas nos ensaios de referências; isto é a capacidade antioxidante dos méis expressa como concentrações equivalentes de ácido ascórbico e/ou de quercetina em unidades (mg/g do mel) e o teor de prolina em unidades mg/kg. Ressaltando que para a correlação das imagens com a concentração de quercetina e ácido ascórbico se contava com 264 imagens. No ensaio de FRAP e prolina o número de imagens aumentou a 279 por ter um total de 93 amostras de mel.

Figura 13 - Imagens digitais recortadas das amostras de mel

FONTE: O autor (2021).

Os dados numéricos obtidos foram então colados em uma planilha Excel (matriz composta por 264 colunas, e 768 linhas que corresponde a 256 R, 256 G, 256 B). Se tirou uma média de todas as colunas das amostras no formato RGB, e logo foram deletadas as colunas com médias inferiores a um 1. Na sequência se procedeu à construção dos modelos de regressão PLS utilizando o software de licença livre ChesmStat® V2.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA UNIVARIADA E CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

4.7.1 Análises de variância: ANOVA

Para auxiliar a interpretação dos dados obtidos nos ensaios DPPH•, FRAP e prolina e investigar a influência do fator espécie de abelha foi realizada uma análise estatística ANOVA com nível de significância de 0,05 (5%), por médio do software **Minitab 18**.

4.7.2 Teste t para variância diferente

Para investigar se existiam diferenças estatisticamente significativas entre os valores de atividade antioxidante e teor de prolina obtidos nos ensaios DPPH•, FRAP e prolina, para méis produzidos nos estados de Rondônia e Paraná, os dados foram submetidos a teste t para variâncias diferentes utilizando o software **Minitab 18**.

4.7.3 Análise de correlação de Pearson

Para estimar a correlação entre os conjuntos de dados obtidos nos ensaios DPPH, FRAP, e prolina os dados foram submetidos a correlação de Pearson (r) foi computada, com nível de significância de 0,05 (5%), utilizando o software **Statistica**.

4.7.4 Análises de regressão por mínimos quadrado parciais (PLS)

A obtenção de modelos matemáticos que modulassem a relação entre os dados numéricos das fotografias digitais das amostras de méis e os valores obtidos nos ensaios de referência realizou-se a modelagem por regressão por mínimos quadrados parciais (PLS). Foi utilizando o software de licença livre ChesmStat® V2.

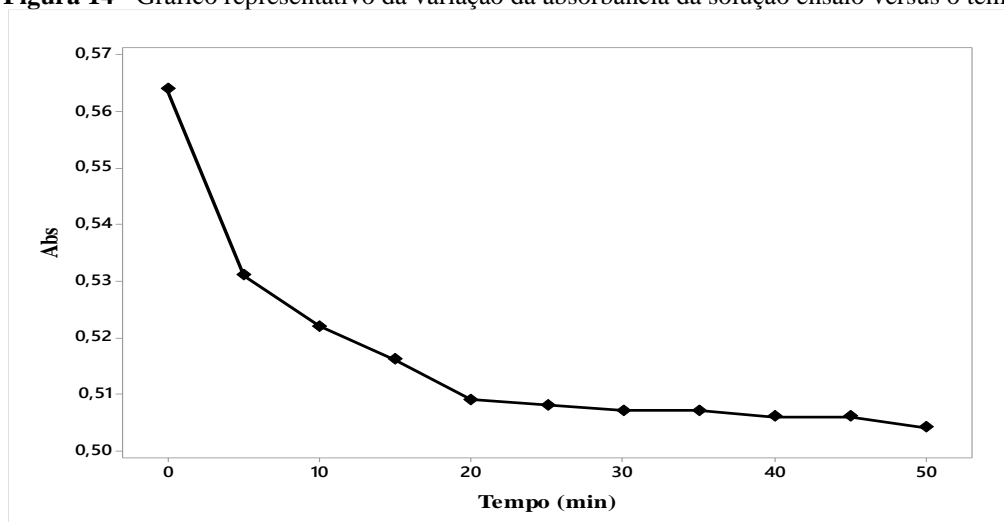
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE MÉIS DE ABELHAS NATIVAS NO ENSAIO DPPH

5.1.1 Resultados da otimização das condições experimentais

Primeiramente foi verificado o tempo de reação mínimo entre os antioxidantes presentes no mel e o radical DPPH. O decaimento da absorbância no comprimento de onda de 517 nm em função do tempo (**Figura 14**) indicou que a partir dos 20 minutos a absorbância permanece praticamente constante, sendo 20 minutos o tempo de espera mínimo para completar a reação. Como a velocidade da reação depende da concentração dos compostos antioxidantes em cada amostra de mel, o tempo de 25 minutos foi escolhido para a realização de todos os ensaios.

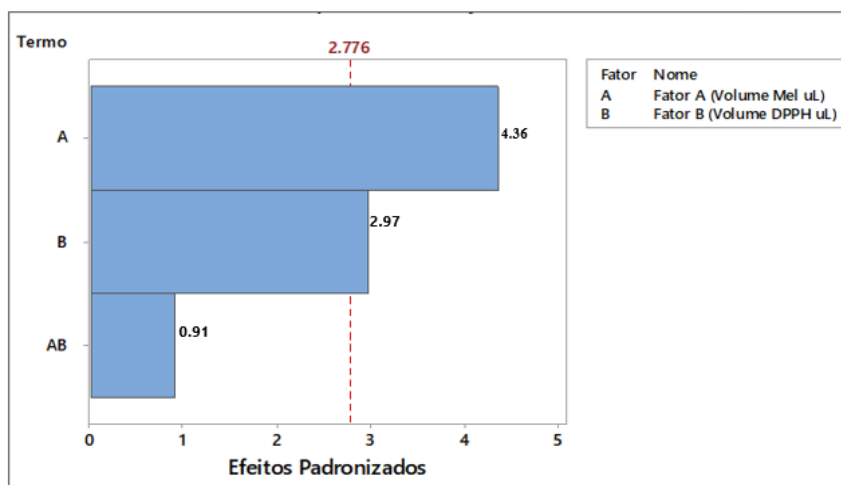
Figura 14 - Gráfico representativo da variação da absorbância da solução ensaio versus o tempo.



FONTE: O autor (2020)

Ensaios prévios realizados para determinar os volumes adequados de solução do mel e radical livre para realizar o ensaio do DPPH indicaram que quando se variava o volume da solução de mel de 150 a 1500 μL a porcentagem de inibição do radical DPPH diminuía. Por outro lado, o aumento da quantidade de DPPH no ensaio aumentava a porcentagem de inibição. Foi aplicado um planejamento fatorial 2^2 com ponto central (**Tabela 3**). No gráfico de Pareto (**Figura 15**), tendo como resposta a porcentagem de inibição foram consideradas como significativas os fatores volume de mel e volume de DPPH, que apresentaram valor de t acima do valor de t (crítico).

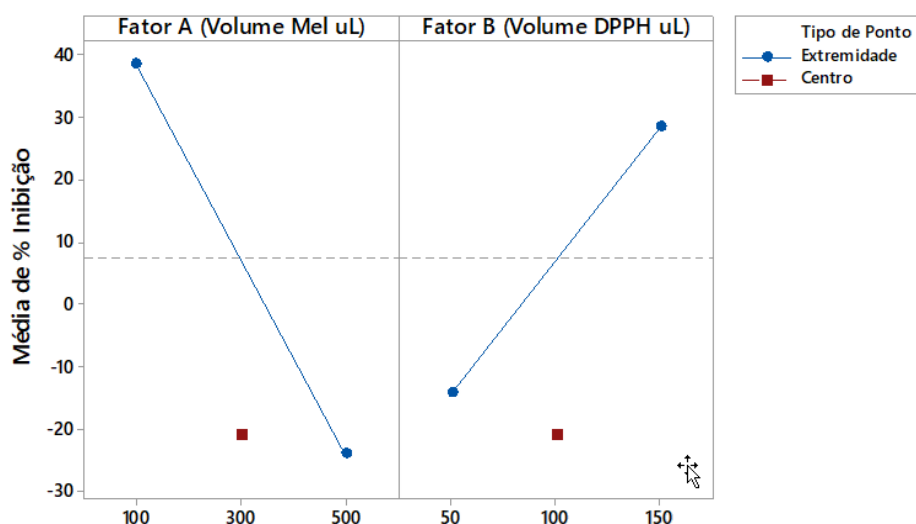
Figura 15 - Gráfico de Pareto para o planejamento fatorial 2^2 com ponto central



FONTE: O autor (2020)

Na **Figura 16** observa-se que quando o volume de solução do mel aumenta, a porcentagem de inibição diminui. Por outro lado, quando o volume de DPPH aumenta a porcentagem de inibição aumenta. Dessa forma, para as concentrações e intervalo de volumes testados, os volumes que permitiram obter as maiores porcentagens de inibição do DPPH foram 100 μ L de mel e 150 μ L de DPPH.

Figura 16- Gráfico de efeitos principais para % inibição



FONTE: O autor (2020)

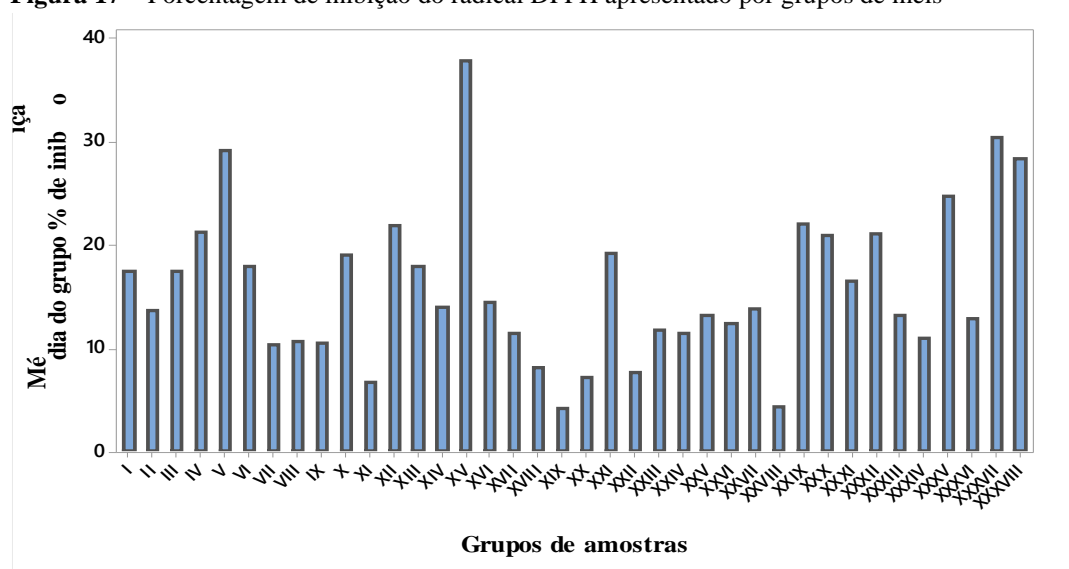
5.1.2 Capacidade antioxidante das amostras de mel pelo método do DPPH

Na **Figura 17** encontram-se os resultados das médias do % de inibição das amostras do mel, agrupados por espécie de abelha e região. Observa-se na **Figura 17** que os grupos que

apresentaram maior porcentagem de inibição (e conseqüentemente, maior número de equivalentes de ácido ascórbico e de quercetina) foram os grupos V, XV, XXXVIII que correspondem a méis produzidos pela espécie de abelha *Tetragonisca angustula*, e também o grupo XXXVII da espécie *Tetragona clavipes*. Resultados semelhantes foram encontrados pelo método DPPH[•] em estudo realizado na Universidade federal do Paraná, onde os méis das espécies de abelhas *Tetragonisca angustula* e *Tetragona clavipes* apresentaram maior capacidade antioxidante com valores de $66,34 \pm 2,96$ e $69,25 \pm 1,12$ respectivamente (Borsato, 2013).

Os valores encontrados para as atividades antioxidantes em porcentagem de inibição do radical DPPH[•] estiveram entre $4,32 \pm 1,03$ e $37,89 \pm 3,85$. Gomes *et al.*, (2017) , encontraram valores para mel de abelha sem ferrão com variações de $24,26\% \pm 0,54$ a $64,63 \pm 101$. Verifica-se que a maioria dos grupos apresentou % I do radical DPPH maior do que 10%, o que seria equivalente a aproximadamente 6,52 mg de quercetina /100 g do mel ou 12,38 mg de ácido ascórbico/100 g do mel) **ver em Anexo 1**.

Figura 17 – Porcentagem de inibição do radical DPPH apresentado por grupos de méis

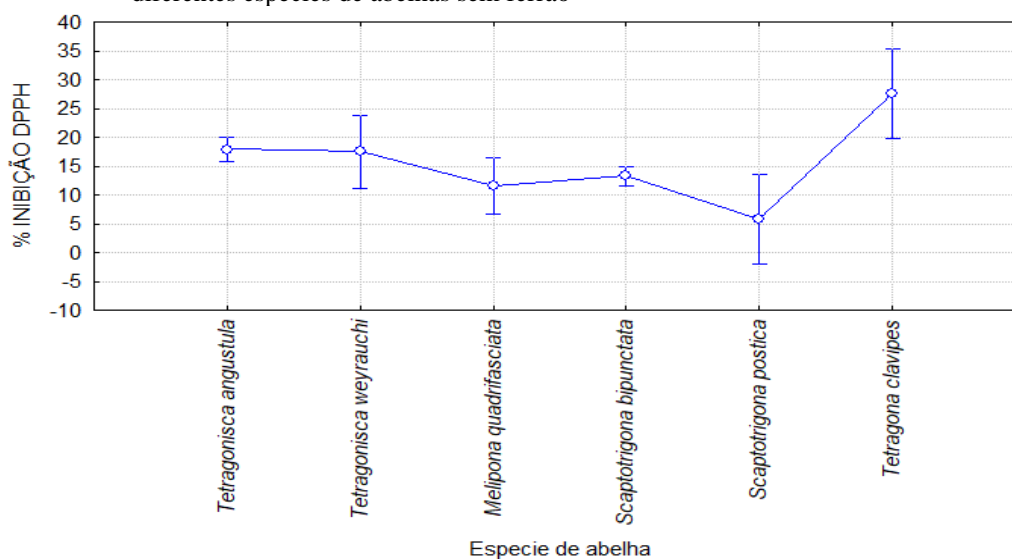


FONTE: O autor (2021).

O mel é considerado um produto natural com considerável atividade antioxidante que tem sido muitas vezes atribuída à presença de ácidos fenólicos e flavonóides (Tuksitha *et al.*, 2018). A origem desses compostos no mel deve-se à flora visitada pelas abelhas. Portanto, o tipo e concentração deles, e conseqüentemente, a atividade antioxidante do mel, relaciona-se com fatores como origem geográfica, sazonalidade, espécies de abelha, dentre outros.

Para investigar a influência dos fatores espécie de abelha e origem geográfica na atividade antioxidante dos méis estudados foi aplicada a ANOVA de um fator (para fator espécie de abelha) e um *teste-t* de variância diferentes para o fator origem geográfica (Rondônia e Paraná). A ANOVA indicou que há diferenças significativas entre a % de Inibição do DPPH de méis produzidos por abelhas de espécies diferentes ($p = 0,0008$). A maior inibição foi observada para o mel da abelha *Tetragona clavipes* independentemente do estado de origem (2 amostras analisadas, uma amostra do Paraná e 01 amostra Goiás, média %I = 27,5) seguido do mel de *Tetragonisca angustula* (29 amostras, média de %I = 17,9) e *Tetragonisca weyrauchi* (3 amostras, apenas de Rondônia %I = 17,5) (**Figura 18**). O teste Tukey aplicado aos valores de porcentagem de inibição (**Tabela 7**) evidenciou que o mel da espécie *Tetragonisca angustula* apresentou diferenças significativas ($P_{\text{valor calculado}} < 0,05$) na % de Inibição do DPPH se comparado aos méis de *Scaptotrigona bipunctata* e *Scaptotrigona postica*. Da mesma forma, o mel de *Tetragona clavipes* se diferenciou dos méis de *Melipona quadrifasciata*, *Scaptotrigona bipunctata* e *Scaptotrigona postica* quanto à % de Inibição do DPPH.

Figura 18 - Comparação da porcentagem de inibição do radical DPPH em méis produzidos por diferentes espécies de abelhas sem ferrão



FONTE: O autor (2021).

Tabela 7 - Resultados da comparação pelo teste de Tukey por espécies, dos valores que apresentaram diferença significativa dos resultados determinados pelo método de DPPH.

(A) Espécie de abelha	(B) Espécie de abelha	Diferenças entre as médias A-B	p - valor
<i>Tetragonisca angustula</i>	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	4,602	0,009541
<i>Tetragona clavipes</i>	<i>Melipona quadrifasciata</i>	15,907	0,011833
<i>Tetragona clavipes</i>	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	14,195	0,008339
<i>Tetragona clavipes</i>	<i>Scaptotrigona postica</i>	21,63	0,002683
<i>Tetragonisca angustula</i>	<i>Scaptotrigona postica</i>	12,03	0,043490

FONTE: O autor (2021)

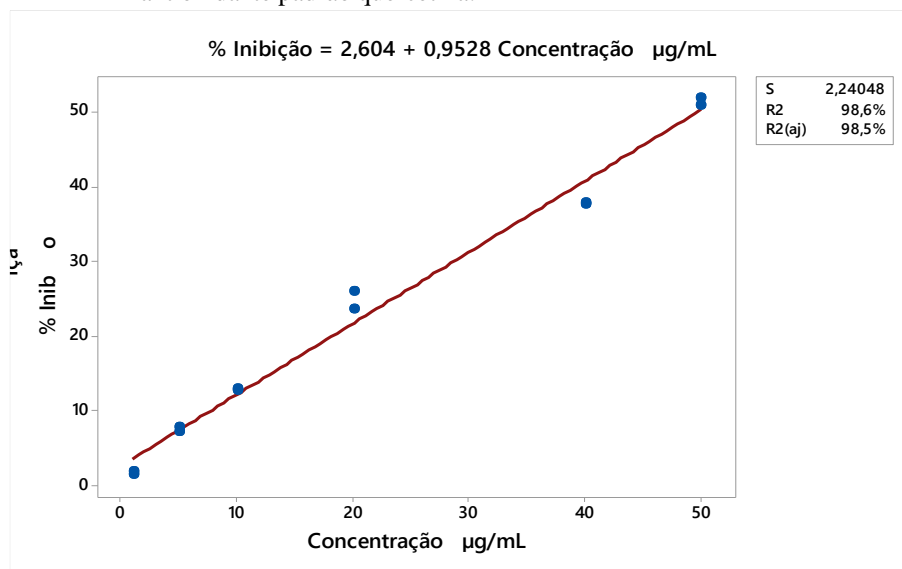
O teste-t de variância diferentes, demonstrou que não existe diferença significativa no nível de 95%, de confiança entre os méis de abelha se ferrão produzidos nos estados de Rondônia e Paraná. Os valores de $t_{\text{calculados}}$ 1,28 foram menor do que valor do t_{critico} 1.782 e um P_{valor} 0,224 > 0,05.

Dessa forma os resultados obtidos sugerem que a espécie de abelha sem ferrão afeta significativamente a capacidade antioxidante do mel. Isso pode ser justificado porque diferentes espécies de abelhas podem ter comportamentos ou afinidades diferentes na visitação de plantas para coleta do néctar. As abelhas para encontrar as flores que possuem a fonte de alimento utilizam principalmente os sentidos da visão e olfatos (Patatt *et al.*, 2011). Por exemplo, uma investigação realizada acerca do recurso polínico coletado por abelhas sem ferrão (*Apidae*, *Meliponinae*), em um fragmento de floresta na região de Manaus Amazonas, encontrou-se que abelhas *Scaptotrigona* e *Melipona* são mais frequentemente encontradas nas árvores mais altas, enquanto *Trigona fulviventris* são mais especialistas em plantas mais próximas do solo (Oliveira *et al.*, 2009).

Menezes *et al.*, (2018), realizaram a avaliação da qualidade de méis de abelhas africanizadas e sem ferrão nativas do nordeste do estado do Pará, observando que os méis de *Apis mellifera*, *Melipona fasciculata* e *Melipona flavolineata* mostraram-se diferentes entre si em quase todas as análises físico-químicas.

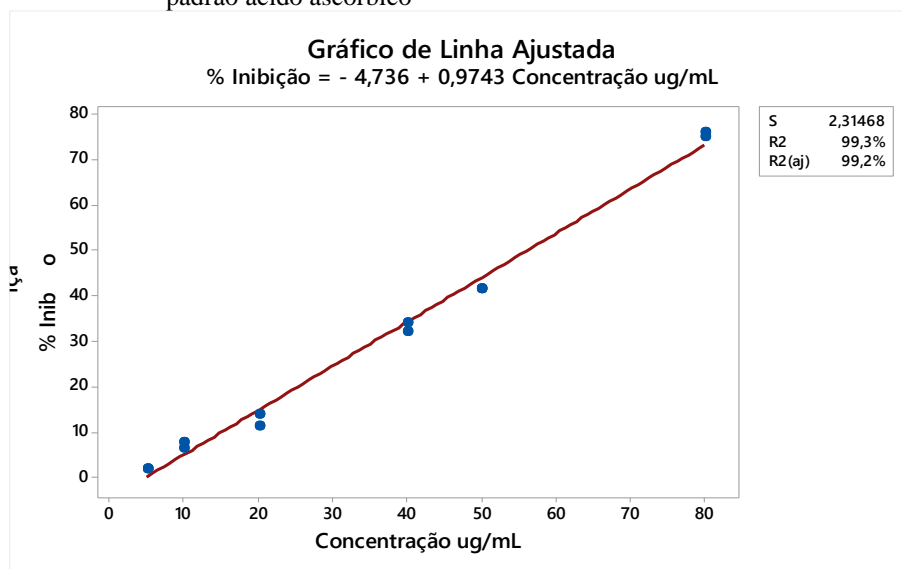
Com a finalidade de comparar nossos resultados com os reportados na literatura a atividade antioxidante calculada com % de inibição do DPPH foi convertida a equivalentes de quercetina e de ácido ascórbico. Nas **Figuras 19 e 20** apresentam-se as curvas analíticas do padrão quercetina e do ácido ascórbico, respectivamente. Nestas pode-se observar que existe uma correlação entre a concentração de quercetina e de ácido ascórbico com a porcentagem de inibição do DPPH. Por meio da equação das curvas analíticas de quercetina e ácido ascórbico foi possível expressar o total da atividade antioxidante das amostras de mel em concentração (mg/100g do mel) equivalente de quercetina e de ácido ascórbico (**Anexo 1**). Para tal, foi interpolado a % de inibição do DPPH provocada por cada amostra de mel nas respectivas curvas analíticas de quercetina e de ácido ascórbico. Os resultados delineados no **Anexo 1** foram organizados por grupos de amostras de mel produzidos pela mesma espécie de abelha e coletados na mesma região.

Figura 19 - Relação entre a % de inibição do radical DPPH e a concentração do antioxidante padrão quercetina.



FONTE: O autor (2020)

Figura 20 - Relação entre a % de inibição do radical DPPH e a concentração do antioxidante padrão ácido ascórbico



FONTE: O autor (2020)

Na **Tabela 8** apresentam-se os resultados de atividade antioxidante dos méis de abelhas sem ferrão analisados agrupados por espécie de abelhas. Podem-se observar os valores máximos e mínimos em equivalente de ácido ascórbico e quercetina que variam de 6,12 a 36,49 mg ácido ascórbico/100 g e de 0,3 a 30,89 mg quercetina/100 g, respectivamente. A espécie *Tetragonisca angustula* apresentou o máximo valor em equivalente de ácido ascórbico e quercetina. Por outra parte a espécie que apresentou o valor mínimo foi *Scaptotrigona bipunctata*.

Tabela 8 – Atividade antioxidante dos méis expressa como resultados máximos e mínimos de equivalente de quercetina (mg/100g do mel) e equivalente de ácido ascórbico (mg/100g do mel) por espécie de abelhas.

Espécie de abelha	Equivalente de quercetina (mg/100g do mel)		Equivalente de ácido ascórbico (mg/100g do mel)	
	Valor mínimo	Valor Máximo	Valor mínimo	Valor Máximo
<i>Tetragonisca angustula</i>	1,3	30,89	7,39	36,49
<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	0,3	15,21	6,12	21,26
<i>Tetragona clavipes</i>	18,48	23,5	24,08	29,06
<i>Melipona quadrifasciata</i>	2,14	13,98	8,08	19,8
<i>Tetragonisca weyrauchi</i>	9,69	19,83	16,41	25,59
<i>Scaptotrigona postica</i>	0,82	2,13	6,78	8,31
<i>Melipona marginata</i>	6,22*		11,38*	

FONTE: O autor (2021). * especie com uma única amostra.

Meda *et al.*, (2005) estudaram o mel em Burkina Faso (próximo a África do Sul) e encontraram valores em equivalente de ácido ascórbico que variam de 4,27 a 17,30 mg / 100 g e de 10,20 a 37,87 mg / 100 g. Noutro estudo, onde analisaram méis indianos, relataram valores em equivalente de ácido ascórbico que variaram de 15 a 30 mg / 100 g (Saxena *et al.*, 2010).

Estudo realizado na Universidade Federal de Santa Catarina, onde os pesquisadores investigaram os compostos fenólicos, a atividade antioxidante e anti-inflamatória em méis de abelhas sem ferrão (*Meliponinae*) foram encontrados valores equivalentes de ácido ascórbico entre 0,8 a 28,2 mg /100 g (Biluca *et al.*, 2020).

Bueno-Costa *et al.*, (2016) estudaram o conteúdo de antioxidantes em méis de abelhas *Apis melíferas* na região do Rio Grande do Sul. Nas amostras analisadas o conteúdo de quercetina variou significativamente, entre os valores de 2,48 a 17,21 mg quercetina/100g. Por outro lado Noor *et al.*, (2014) encontraram valores em equivalentes de quercetina com 2,85-39,86 mg quercetina/100g para méis de abelhas nativas de diferentes regiões do Paquistão.

Sousa *et al.*, (2016) determinaram a capacidade antioxidante de diferentes espécies de abelhas sem ferrão na região semiárida do Nordeste brasileiro encontrando valores equivalentes de ácido ascórbico que variaram entre 4,3 a 23,6 mg /100 g. E valores equivalentes de quercetina que variaram entre 1,6 a 10,8 mg / 100 g. No nosso trabalho todos os méis avaliados, com exceção de *Scaptotrigona postica*, apresentaram intervalos de variação maiores com tendencia a maior atividade no ensaio de DPPH.

Biluca (2018), analisou a capacidade antioxidante pelo método de captura de radicais DPPH em méis de abelhas sem ferrão (*Meliponinae*), produzidos no estado de Santa Catarina e encontrou valor mínimo de 1,41 mg equivalente de ácido ascórbico/100 g para a amostra *Melipona marginata* e máximo de 13,95 equivalente de ácido ascórbico/100 g para amostra de méis de abelhas *Melipona mondury*.

Em outro estudo de Gomes e Araújo, (2014) também foi analisada a capacidade antioxidante de méis de abelhas sem ferrão (*Melipona subnitida*, *Melipona mandacaia* e *Plebeia sp*), aplicando o método de DPPH e expressando os resultados em equivalente de ácido ascórbico. Os autores encontraram valores que variaram entre 6,0 e 15,5 mg/100g para a espécie *Melipona subnitida*, 6,8 e 23,6 mg/100g para o mel de *Melipona mandacaia*, e entre 20,9 e 23,5 mg/100g para o mel de *Plebeia sp*.

Biluca *et al.*, (2013) estudaram a capacidade antioxidante do mel da espécie de abelha *Melipona quadrifasciata* de três cidades no estado de Santa Catarina (Florianópolis, Santo Amaro da Imperatriz e São Miguel do Oeste) através do método DPPH. Os valores médios reportados em equivalente de ácido ascórbico foram 3,23, 7,92, 4,84 mg /100 g, respectivamente para o mel de cada localidade. Os autores destacaram que existia diferença significativa entre as amostras de mel avaliadas oriundas da mesma espécie, porém de origens geográficas diferentes.

De acordo com o trabalho realizado por (Biluca *et al.*, 2020), onde determinaram as atividades antioxidantes de amostras de mel de abelha sem ferrão, foi encontrado que o mel da espécie de abelha *M. marginata* apresentou valores entre a 0,8 a 28,2 mg equivalente de ácido ascórbico/100 g. O estudo também concluiu que existe variabilidade significativa na composição do mel considerando as florações predominantes e a origem geográfica.

Os resultados de atividade antioxidante do mel de abelha sem ferrão aqui obtidos apresentam similaridades com os existentes na literatura, principalmente confirmando a grande variabilidade na potência da atividade antioxidante dos méis medida no ensaio do DPPH e expressa em termos de equivalentes de antioxidantes padrão como quercetina e/ou ácido ascórbico.

5.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO MEL DE ABELHAS NATIVAS NO ENSAIO FRAP

5.2.1 Resultado do planejamento fatorial (2^3)

Os resultados do planejamento fatorial para otimizar os parâmetros volume solução do mel, volume solução FRAP e o tempo de reação e os efeitos calculados são apresentados na (**Tabela 9**). Todos os fatores avaliados foram significativos ($p_{\text{valor}} < 0,05$) e influenciaram os

valores de absorvância lidos. A interação entre volume solução do mel e volume solução FRAP, volume solução do mel e o tempo, foi significativa com valores de $p_{\text{valor}} < 0,05$.

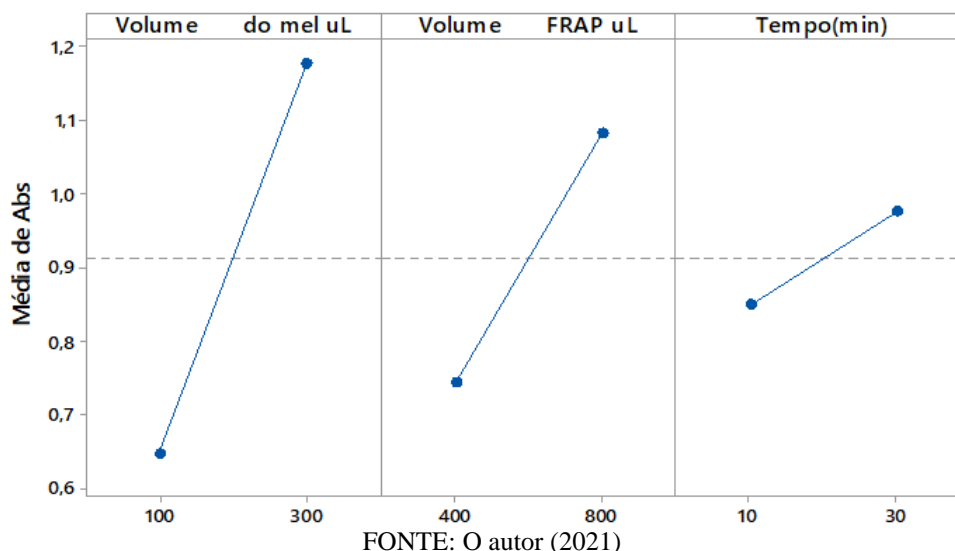
Tabela 9 - Parâmetros avaliados e valor de p no planejamento fatorial 2^3 tendo como resposta a absorvância

Efeitos	P -Valor
Efeitos principais	
Volume solução do mel (μL)	0,000
Volume solução FRAP (μL)	0,000
Tempo(min)	0,000
Interação de os Efeitos	
Volume solução do mel (μL) * Volume solução FRAP (μL)	0,000
Volume solução do mel (μL) * Tempo(min)	0,026
Volume solução FRAP (μL) * Tempo(min)	0,793
Volume solução do mel (μL) * Volume solução FRAP (μL) * Tempo(min)	0,235

FONTE: O autor (2021).

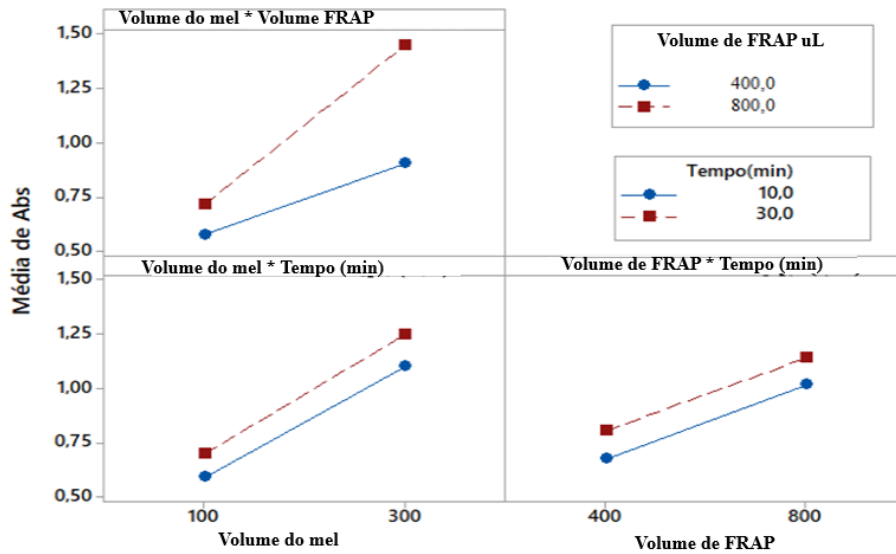
Para realizar o ensaio FRAP foram escolhidos os menores níveis dos fatores volume da solução de mel (100 μL), volume da solução FRAP (400 μL) e tempo 10 min devido à resposta absorvância se encontrar numa faixa adequada para análises quantitativas na região do UV-Vis (**Figura 21**).

Figura 21 - Gráficos de efeitos principais para ensaio FRAP



No gráfico de efeitos de interação (**Figura 22**) pode-se observar que existe uma interação significativa entre os fatores volume de solução do mel e volume de solução FRAP apresentando um P_{valor} de $0,000 < 0,05$. Também a interação entre volume de solução do mel e o tempo apresentou uma interação significativa com P_{valor} de $0,02 < 0,05$ em um intervalo de 95 % de confiança.

Figura 22 - Gráficos de efeitos de interação entre os fatores avaliados no ensaio FRAP

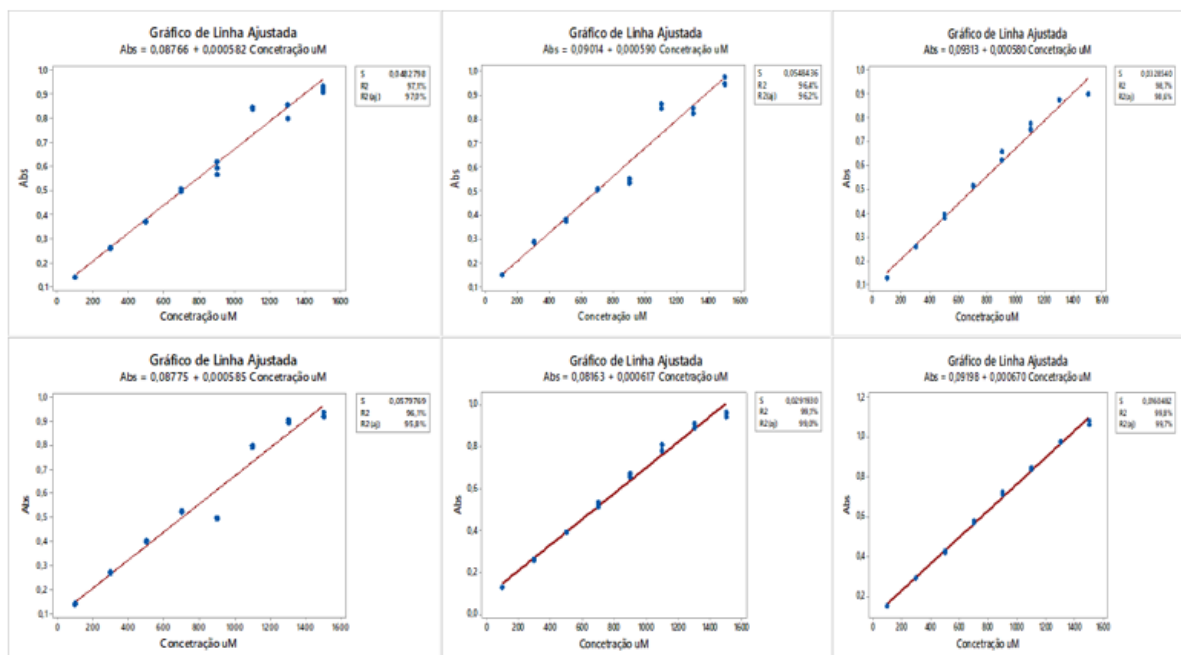


FONTE: O autor (2021)

5.2.2 Determinação da capacidade antioxidante das amostras de mel através do método de redução de ferro (FRAP)

Na **Figura 23** são apresentadas as curvas analíticas do complexo TPTZ-Fe²⁺ construídas por cada dia de ensaio para quantificar o poder de redução das amostras de mel em valores de Fe²⁺ equivalentes. Todas as curvas apresentaram valores adequados para o coeficiente de determinação $R^2 > 95\%$.

Figura 23- Curvas analíticas do complexo TPTZ-Fe²⁺ (μM)

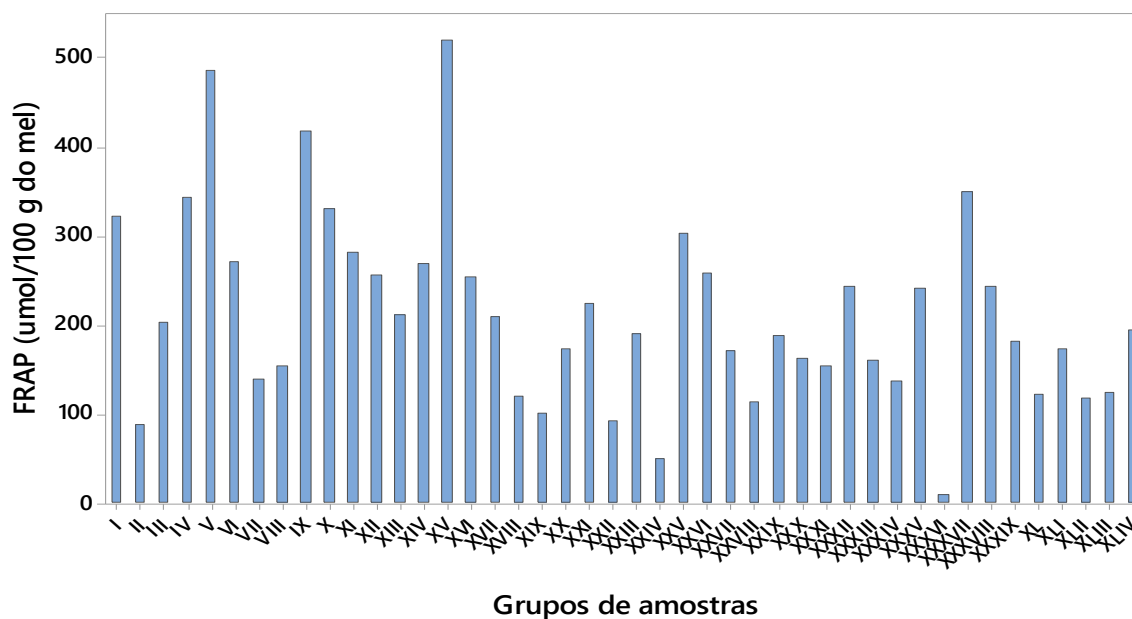


FONTE: O autor (2021)

Os resultados no **Anexo 2** foram organizados por grupos de amostra de mel produzido pela mesma espécie de abelha e coletados na mesma região. Na **figura 24** encontram-se os resultados das medias da capacidade antioxidante expressa em concentração $\mu\text{mol Fe}^{2+}/100\text{ g}$ de mel. Observa-se que os grupos que maiores concentrações apresentam são: o grupo V, *Tetragonisca angustula* estado de Paraná do município Jussara, o grupo XV *Tetragonisca angustula*, do estado de Paraná do município Perobal e também o grupo IX da espécie *Scaptotrigona bipunctata* do estado de Paraná do município Guaraqueçaba apresentando concentrações maiores que $400\ \mu\text{mol}/100\text{g}$ do mel. A maioria dos grupos apresentaram valores de concentrações maior que $100\ \mu\text{mol}/100\text{ g}$ do mel.

Os grupos que apresentaram os menores potenciais antioxidantes através do método FRAP foram os grupos II, da espécie *Tetragonisca angustula* do estado de Rondônia, o grupo XXIV, da espécie *Tetragonisca angustula* do estado de Paraná do município Ortigueira, o grupo XXXVI da especie *Melipona quadrifasciata*, do estado de Bahia.

Figura 24 - Capacidade antioxidante dos méis de abelha sem ferrão expressos em $\mu\text{mol Fe}^{2+} /100\text{ g}$ de mel apresentado por grupos de méis

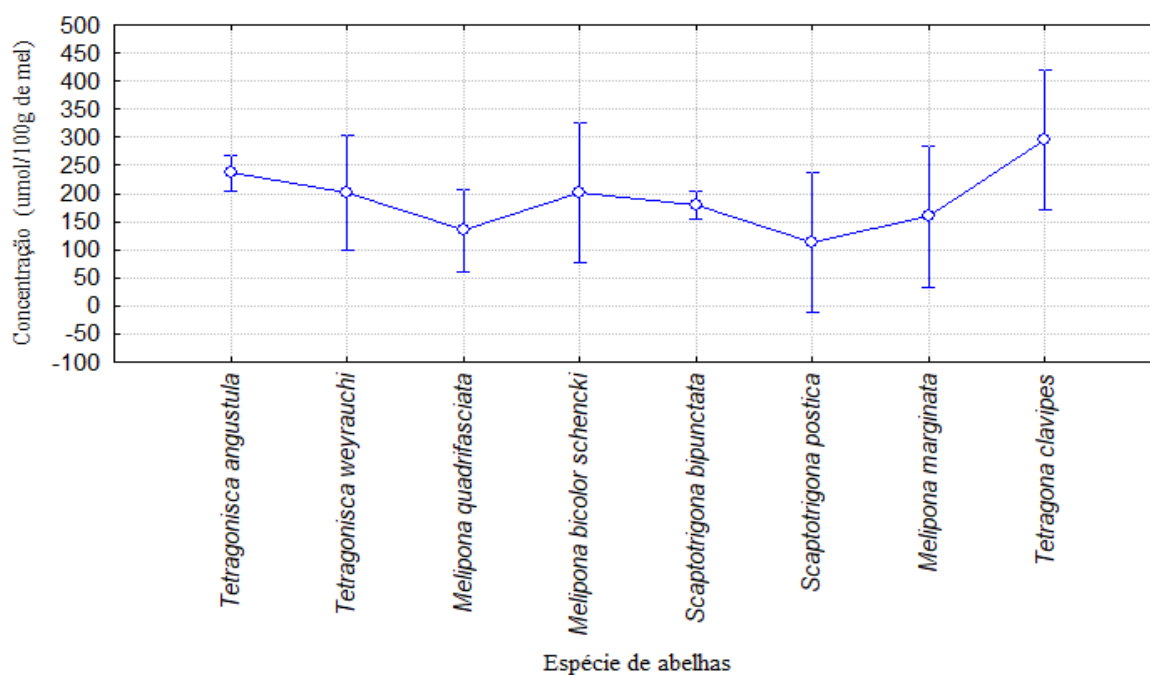


FONTE: O autor (2021)

Com a finalidade de verificar se os dados apresentavam uma distribuição normal, foi feito um teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, no software estatística. Os dados apresentaram como resultado $p_{\text{valor}} 0,20 > 0,05$ apresentando normalidade o que permite a aplicação da estatística paramétrica.

Para investigar a influência dos fatores espécie de abelhas e a origem geográfica nos resultados de atividade antioxidante no ensaio FRAP, foi aplicada um teste de ANOVA de um fator para o fator espécie de abelhas e um teste-*t* de variância diferentes para origem geográfica (Rondônia e Paraná). Oito grupos foram considerados dentro do fator das espécies. O teste de ANOVA demonstrou que existe diferença significativa entre as espécies de abelhas com um p valor $0,042 < 0,05$ (**Figura 25**). O teste-*t* de variância diferentes demonstrou que não existe diferença entre a atividade FRAP dos méis produzidos nos estados Rondônia e Paraná os valores de t calculados 0,85 foram menores do que valor do t crítico 2.306 e um P valor $0,419 > 0,05$ considerando-se o nível de 95%, de confiança.

Figura 25 - Comparação da concentração $\mu\text{mol Fe}^{2+}/100\text{ g}$ do mel produzidos por diferentes espécies de abelhas sem ferrão



FONTE: O autor (2021).

O método FRAP é amplamente utilizado para determinação de antioxidantes e avaliação do poder antioxidante e redutor do mel. Os valores máximos e mínimos determinados para as 9 espécies de abelhas oscilaram entre 10,07 a 519,33 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/100\text{g}$ (**Tabela 10**).

Estudo realizado por Islam *et al.*, (2012) para abelhas *Apis dorsata* na região de Bangladesh determinaram valores máximos e mínimos de FRAP entre $772,4 \pm 2,5 \mu\text{mol Fe}^{2+}/100\text{ g}$ e $140,23 \pm 3,9 \mu\text{mol Fe}^{2+}/100\text{g}$.

Biluca *et al.*, (2016) em um estudo realizado para mel de abelhas sem ferrão de 4 municípios no estado de Santa Catarina (Florianópolis, Santo Amaro da Imperatriz, São Miguel

do Oeste e Santa Rosa de Lima) encontraram valores entre 61,1 $\mu\text{mol Fe}^{+2}$ /100g e 624 $\mu\text{mol Fe}^{+2}$ /100g. Outro estudo realizado por Biluca *et al.*, (2020) encontrou valores para a capacidade de redução no ensaio FRAP que variaram entre 67,5 a 734,5 $\mu\text{mol Fe}^{+2}$ /100g em amostras de mel de abelhas sem ferrão da tribo *Meliponinae*. Assim os resultados mostraram que os méis de abelhas sem ferrão apresentam a capacidade de reduzir íon férrico Fe^{3+} a íon ferroso Fe^{2+} (Biluca *et al.*, 2020, 2016).

(Sousa, 2014) determinaram a capacidade antioxidante pelo método FRAP para méis de três espécies de abelha sem ferrão (*Scaptotrigona sp*, *Melipona fasciculata*, *Tetragonisca angustula*). Oito amostras foram produzidas no município de Belterra-Pará, uma no estado do Maranhão e dez no município de Ilha Grande - Rio de Janeiro. Os valores de ensaio FRAP para o mel de abelha *Scaptotrigona sp* variaram de 77,39 a 223,69 $\mu\text{mol Fe}^{+2}$ /100g, para o mel de *Tetragonisca angustula* de 357,02 a 640,35 $\mu\text{mol Fe}^{+2}$ /100g e para o mel de *Melipona fasciculata* foi de 94,06 $\mu\text{mol Fe}^{+2}$ /100g; concluindo que o mel da espécie *Tetragonisca angustula* foi o que apresentou a mais elevada capacidade antioxidante através do ensaio com FRAP.

Com o objetivo de caracterizar as propriedades físico-químicas, compostos bioativos e capacidade antioxidante de méis produzidos no estado Pará, Ferreira da Costa e Uría Toro (2019) estudaram méis de abelha *Apis mellifera* e mel de abelha sem ferrão. Elas determinaram a capacidade antioxidante pelo método FRAP achando valores de 99 a 599 $\mu\text{M}/100\text{g}$ e 197 a 688 $\mu\text{M}/100\text{g}$ para as espécies *Apis* e abelhas sem ferrão, respectivamente.

Biluca (2018) estudou o mel de abelha sem ferrão produzido no estado de Santa Catarina e encontrou valores que variam de 67,49 $\mu\text{mol Fe (II)}/100\text{g}$ para mel de abelha *Melipona quadrfaciata anthidioides* a 474,61 $\mu\text{mol Fe II}/100\text{g}$ para mel *Melipona mondury*.

Biluca *et al.*, (2013), investigaram a atividade antioxidante da espécie de abelha *Melipona quadrfasciata* de diferentes municípios do estado de Santa Catarina e reportaram valores de 69,72; 231,78 e 175,51 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/100\text{g}$. Os resultados apontaram diferenças significativas entre os méis produzidos em diferentes municípios.

De maneira geral, os resultados numéricos obtidos no nosso estudo se encontram coerentes com resultados reportados na literatura. Adicionalmente, nossos dados indicam diferenças significativas entre a capacidade antioxidante de méis de diferentes espécies de abelha nativa, porém, não entre os méis produzidos por abelhas sem ferrão dos estados do Paraná e Rondônia.

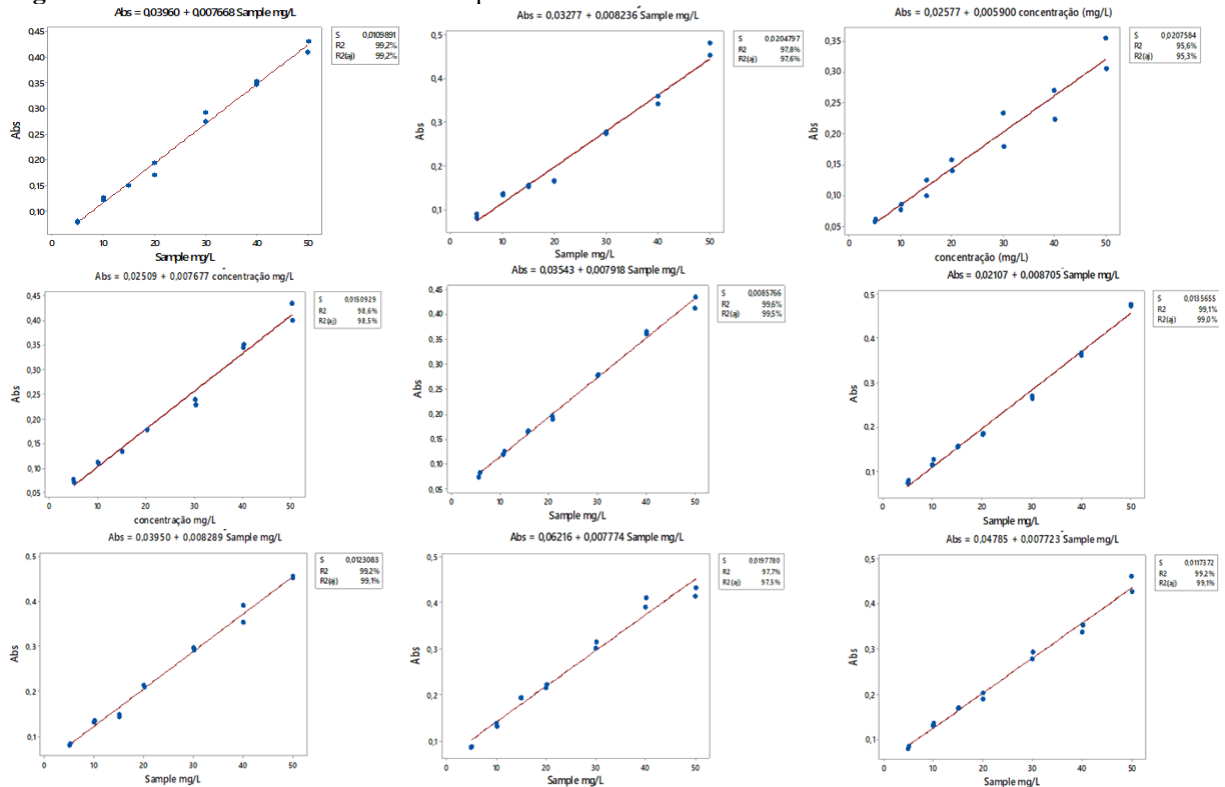
Tabela 10 - Resultados máximos e mínimos para o ensaio FRAP ($\mu\text{mol}/100\text{ g}$ do mel) por espécie de abelhas.

Espécie de abelha	Concentração $\mu\text{mol Fe}^{2+}/100\text{ g}$ do mel	
	Valor mínimo	Valor máximo
<i>Tetragonisca angustula</i>	49,89	519,33
<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	88,62	418,32
<i>Tetragona clavipes</i>	241,75	349,20
<i>Melipona quadrifasciata</i>	10,07	331,21
<i>Tetragonisca weyrauchi</i>	147,40	304,80
<i>Scaptotrigona postica</i>	111,41	115,25
<i>Melipona marginata</i>	137,32	180,76
<i>Melipona bicolor schencki</i>	118,97	282,14
<i>Melipona mondury</i>		172,79*

FONTE: O autor (2021) * Espécie com uma única amostra

5.3 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE PROLINA DAS AMOSTRAS DE MEL

Na **Figura 26** apresentam-se as curvas de calibração de prolina construídas cada dia de ensaio, observando que todas as curvas apresentaram valores adequados para o coeficiente de determinação $R^2 > 95\%$.

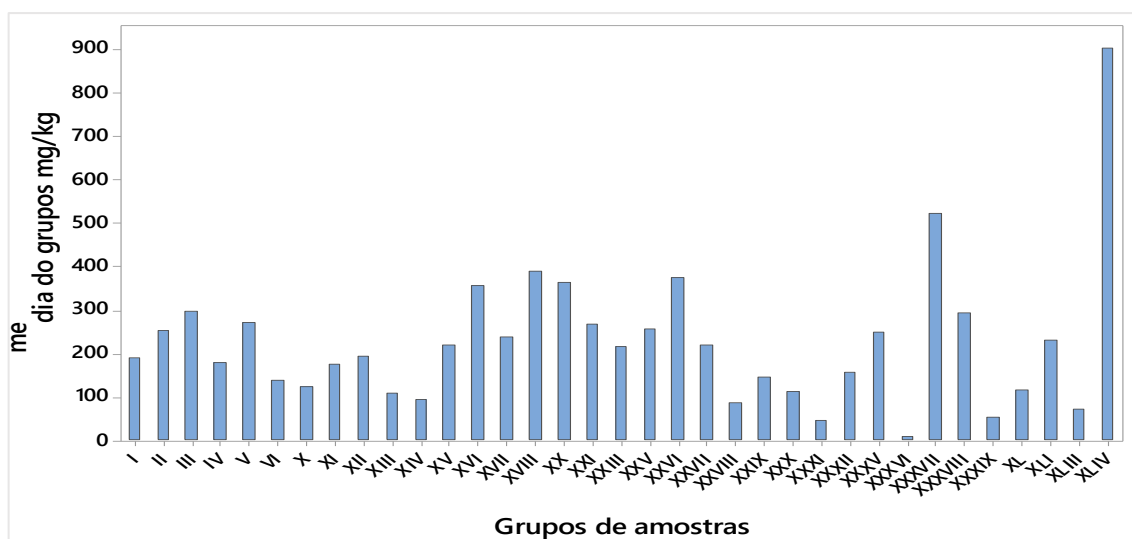
Figura 26 – Curvas analíticas do ensaio de prolina obtidas durante os nove dias de análise.

FONTE: O autor (2021)

As amostras foram organizadas por grupos de méis produzidos pela mesma espécie de abelha e coletados na mesma região. Na **Figura 27** encontram-se os resultados das médias do

conteúdo de prolina expressos em mg/kg do mel. Em 19 amostras não foi detectado conteúdo de prolina ver (**Anexo 2**), as amostras que apresentaram maior conteúdo de prolina foram as dos grupos XVI da espécie *Tetragonisca angustula* do estado de Paraná do município Pérola, o grupo XVIII da espécie *Scaptotrigona bipunctata* do estado do Paraná do município Cambará, o grupo XX da espécie *Scaptotrigona bipunctata* do estado do Paraná do município Mandirituba, o grupo XXVI da espécie *Tetragonisca angustula* do estado de Paraná do município Nova Tebas, o grupo XXXVII da espécie *Tetragona clavipes* estado Goiás. Todos os méis de abelha sem ferrão apresentaram teores menores de prolina que o mel de *Apis mellifera* (grupo XLIV 400 mg / kg de prolina).

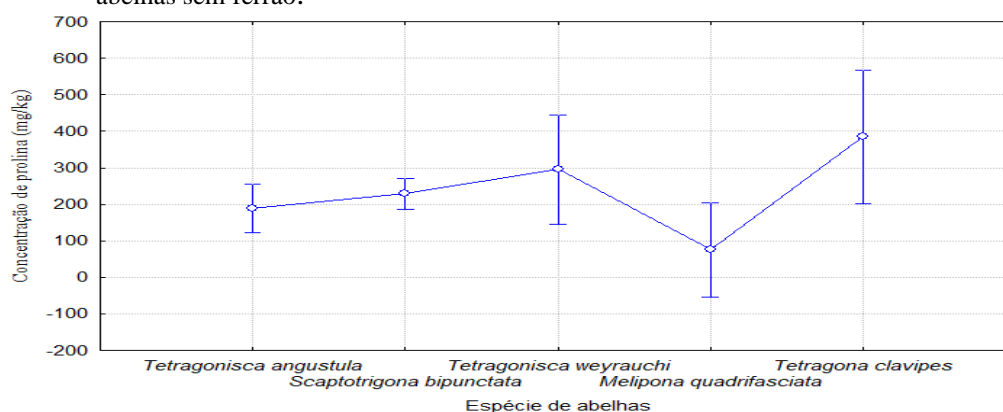
Figura 27 - Concentração de prolina expresso em mg/kg do mel apresentado por grupos de méis



FONTE: O autor (2021)

Com finalidade de analisar se os dados apresentavam uma distribuição normal ou homogêneos foi realizado um teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, no software STATISTICA. Os resultados mostraram que os dados são normais com valores de $P_{\text{valor}} 0,20 > 0,05$. Com a intenção de analisar se os fatores espécie de abelha e lugar de origem dos méis afetam os valores observados para os teores de prolina foi aplicado um teste ANOVA de um fator considerando a espécie de abelha e teste-t de variância diferentes para origem geográfica (estados Rondônia e Paraná). O teste ANOVA de um fator considerando a espécie de abelha indicou que há diferenças significativas entre os teores de prolina dos méis produzidos por diferentes espécies de abelhas sem ferrão ($P_{\text{valor}} 0,04 < 0,05$) o que sugere que nos méis analisados a espécie de abelha influenciou os níveis de concentração de prolina (**Figura 28**).

Figura 28 -Comparação da concentração de prolina em méis produzidos por diferentes espécies de abelhas sem ferrão.



FONTE: O autor (2021).

Por outro lado, o teste *t* para variância diferentes considerando os méis produzidos nos estados de Rondônia e Paraná acusou valor de $t_{\text{calculado}}$ 1,27 menor do que valor do t_{critico} 2.120 e um P_{valor} 0,223 > 0,05 considerando-se o nível de 95%, de confiança. Esse resultado indica que para as espécies de abelha sem ferrão investigadas não existe diferença significativa entre os teores de prolina de méis produzidos nos estados de Rondônia e Paraná.

O conteúdo de prolina é uma indicação de maturação no mel e, encontrasse relacionado em alguns casos, à adulteração com açúcar (Moniruzzaman *et al.*, 2014). Mas também tem sido utilizado para estimar a qualidade e capacidade antioxidante de mel (Gela *et al.*, 2021). Um mel de boa qualidade, em bom estado de maturação e sem indicio de adulteração apresenta um conteúdo de prolina igual o superior a 180 mg/kg.

Os valores encontrados para o conteúdo de prolina das 9 espécies de abelhas sem ferrão oscilaram entre 9,78 e 565,5 mg/kg ver **Tabela 11**. De acordo com o manual “*HARMONISED METHODS OF THE INTERNATIONAL HONEY COMMISSION*” (Bogdanov, 2009), o conteúdo de prolina em mel não deve ser inferior a 180 mg/kg, sendo este utilizado como critério de maturação e qualidade do mel. No entanto, esse limite é relacionado ao mel de *Apis mellifera* não acolhendo as características dos méis de abelhas nativas.

Tabela 11 - Resultados máximos e mínimos para o ensaio de prolina (mg/kg)

Espécie de abelha	Concentração de prolina mg/kg	
	Valor mínimo	Valor máximo
<i>Tetragonisca angustula</i>	46,52	565,5
<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	15,0	550,35
<i>Tetragona clavipes</i>	248,8	521,7
<i>Melipona quadrifasciata</i>	9,78	124,09
<i>Tetragonisca weyrauchi</i>	253,43	356,49
<i>Scaptotrigona postica</i>		87,82*
<i>Melipona marginata</i>		52,64*
<i>Melipona bicolor schencki</i>		176,31*
<i>Melipona mondury</i>		231,18*

FONTE: O autor (2021) * especie com uma única amostra

Estudo realizado por Moniruzzaman *et al.*, (2014) encontrou concentração de prolina entre 237,51 e 1419,33mg / kg para mel monofloral de Bangladesh. Outro estudo realizado por Gela *et al.*, (2021) para méis de abelhas sem ferrão encontrou valores de prolina entre 293 ± 14 mg/kg e 171 ± 13 mg/ kg, evidenciando diferença significativa entre méis de origens diferentes.

De Sousa *et al.*, (2016) determinaram o conteúdo de prolina em amostras do mel de duas espécies de abelhas sem ferrão na região semiárida do nordeste brasileiro do estado da Paraíba e reportaram concentrações de prolina que variaram de 20,5 a 4,6 mg / kg.

Rodríguez *et al.*, (2012) estudaram parâmetros de qualidade e propriedades antioxidantes e antibacterianas de 14 méis comerciais mexicanos (5 amostras multifloral e 9 monofloral), e encontraram valores de teor de prolina que variaram de 146 a 877,6 mg / kg.

Duarte (2009), comparou o conteúdo de prolina para mel de abelhas nativas e africanizadas do estado de Alagoas. Foi encontrado um teor de prolina em mel das espécies *Melipona scutellaris* de 87,1-362,5 equivalente mg de prolina/kg, de *Melipona subnitida* teores médios de 272,9 equivalente mg de prolina/kg, e *Melipona quadrifasciata* 300,7 equivalentes mg de prolina/kg. Foi concluído que os méis de abelhas nativas apresentam menor conteúdo de prolina quando são comparadas com mel de abelhas africanizadas.

Outro estudo realizado por da Costa e Toro, (2021) em méis de abelhas *Apis melliferas* e abelhas sem ferrão (*Plebeia flavocincta* e *Melipona spp.*) do Pará, confirmou que o conteúdo de teor de prolina é maior em méis de abelhas *Apis melliferas*. Os valores determinados de prolina para méis de *Apis melliferas* foram de 48.32 ± 1.19 a 130.64 ± 0.01 mg /kg. Para as três amostras de méis de abelhas sem ferrão foram determinados os valores de $144,7 \pm 13.11$ para méis de *Plebeia flavocincta* e para os méis da espécie *Melipona spp* um teor de prolina de $6,52 \pm 1,02$ mg/kg a $22,71 \pm 0,76$ mg/kg.

Estudos realizados por Ricardo Da Silva, (2015), para mel de abelhas *Melipona Mandaçaiá* da região do Rio São Francisco, nos estados da Bahia e Pernambuco, encontrou conteúdo de prolina que variaram de 184,79 a 232,29 mg/kg de mel, em quanto Duarte *et al.*, (2012), avaliaram o teor de prolina em amostras de mel de abelhas sem ferrão do Brasil, e relataram concentrações variáveis de 201 a 924 mg/ kg.

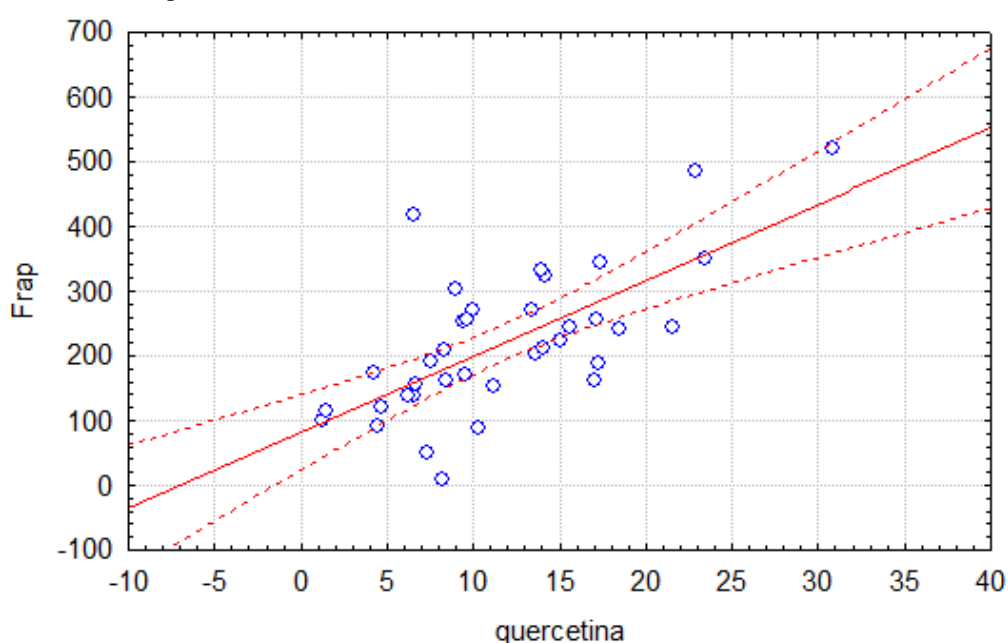
Como pode-se verificar, o teor de prolina em mel de abelha sem ferrão é altamente variável e apresenta valores inferiores ao mel de *Apis mellifera*. Dessa forma, os teores encontrados no nosso estudo para méis de abelhas sem ferrão estão em correspondência com os valores reportados na literatura.

5.4 CORRELAÇÃO ENTRE OS DADOS DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DPPH, FRAP E TEOR DE PROLINA

Para interpretação dos dados obtidos pelas variáveis FRAP, DPPH e prolina foi gerada uma matriz de correlação (Pearson r). A correlação de Pearson foi avaliada de acordo a critérios descritos por Dancy e Reidy (2006), onde um valor de r de $0,10 < r < 0,30$ indica uma correlação fraca; $0,40 < r < 0,60$ correlação moderada; $0,70 < r < 1$ correlação forte. Em nossos resultados se observou uma correlação linear significativa moderada entre a capacidade antioxidante do mel de abelha sem ferrão, determinada pelo método DPPH e pelo método FRAP com $r = 0,68$ ($p = 0,000$) como mostra o gráfico da **Figura 29**.

No entanto, os resultados para a concentração de prolina não tiveram correlação significativa com a atividade antioxidante segundo o ensaio DPPH ($r = 0,190$, $P_{\text{valor}} = 0,325$) ou FRAP ($r = 0,226$, $P_{\text{valor}} = 0,192$), indicando que a atividade antioxidante desses méis não está relacionada ao teor total de aminoácidos. Dessa forma, há necessidade de investigar outros parâmetros como teores de fenólicos e de flavonoides totais nos méis. Nosso resultado foi diferente ao reportado por Islam *et al.*, (2012), que estudaram amostras de mel da espécie *Apis dorsata*, e os valores de prolina apresentaram correlação moderada com os resultados do ensaio DPPH ($r = 0,6430$) e FRAP ($r = 0,4730$), o que indica que pode haver alguma contribuição da prolina nas propriedades antioxidantes do mel de Bangladesh.

Figura 29 - Gráfico de correlação linear entre os resultados do DPPH expressado em equivalente de quercetina e FRAP



FONTE: O autor (2021)

D'Oliveira Sant'Ana *et al.*, (2010) estudaram a correlação entre ensaios de DPPH e FRAP de méis silvestres e de laranja demonstrando uma forte correlação entre o ensaio FRAP e DPPH ($r \geq 0,75$; $p < 0,05$). Também investigaram a correlação entre o teor de fenóis e de flavonóides com a atividade antioxidante (FRAP e DPPH), apresentando o teor em fenóis maiores correlações ($0,835 \leq r \leq 0,958$) com as atividades antioxidantes do que o teor de flavonóides. Dessa forma, os autores demonstraram que as substâncias fenólicas são as principais responsáveis pela ação antioxidante dos extratos. Por outra parte SALGUEIRO (2012), demonstrou que existe uma forte correlação entre os métodos FRAP e DPPH ($r = - 0,84$) para determinar a atividade antioxidante em amostras do mel Brasileiros. De igual maneira, Stremel Azevedo (2017) encontraram correlação significativa entre capacidade antioxidante (DPPH e FRAP) e demonstraram correlação positiva significativa ($r = 0,87$) para mel de melato de Bracatinga (*mimosa scabrella* Bentham).

5.5 DESENVOLVIMENTO DE MODELOS DE CALIBRAÇÃO E VALIDAÇÃO POR PLS

Por meio da ferramenta de regressão PLS as cores de cada uma das amostras de mel foram correlacionadas com a capacidade antioxidante pelo método DPPH expressa como equivalente de quercetina e ácido ascórbico, o poder de redução Fe^{3+} e a concentração de prolina.

5.5.1 Modelos gerados para correlacionar as imagens e atividade antioxidante em equivalente de quercetina

Para o modelo de regressão por PLS foram correlacionados os dados das imagens e as concentrações de antioxidante em equivalente de quercetina em mg/g determinados para todas as amostras de mel. Na **Tabela 12** são apresentadas as figuras de mérito para os melhores modelos obtidos.

Os modelos foram verificados por meio dos parâmetros, de coeficiente de correlação (R^2), valores de erros RMSEC, RMSEP e RMSECV. Segundo Oliveira *et al.*, (2015) quanto mais baixo o valor do erro de análise da calibração RMSEC melhor é o modelo. CONZEN (2006) descreveu que um bom modelo é aquele que apresenta um valor mais baixo no erro de validação RMSEP. Por outro lado, KUMAR (2016) descreve que quanto mais baixo é o valor

do erro quadrático médio da validação cruzada RMSECV o modelo apresenta melhor estimativa.

Em relação ao número de variáveis latentes, segundo Morgano (2005), a escolha ideal do número de variáveis latentes é aquela que proporciona o menor erro possível de previsão. Todos os modelos apresentaram $R^2 > 0,7$ para a calibração e $R^2 > 0,5$ para predição. Esse último valor sugere que para o conjunto de amostras utilizadas para a validação externa do modelo, existe uma correlação moderada entre os valores que foram preditos pelo modelo e os valores obtidos nos ensaios de referência (tidos como valores verdadeiros) e, portanto, existe uma correlação moderada entre as imagens/cores do mel e sua atividade antioxidante no ensaio DPPH. No entanto, os valores dos erros RMSEC, RMSEP e RMSECV para os modelos foram baixos.

O modelo que apresentou os melhores resultados foi o modelo 1, onde para o conjunto de amostras de calibração houve correspondência adequada entre os valores preditos pelo modelo e os valores reais ($R^2 = 0,7405$). No entanto, para o conjunto de amostras de validação do modelo, o coeficiente de correlação de $R^2 = 0,5503$ sugere que o modelo apresenta uma capacidade moderada de predição, já que houve correspondência de apenas 55% entre os valores estimados pelo modelo e os valores medidos (**Figura 30**).

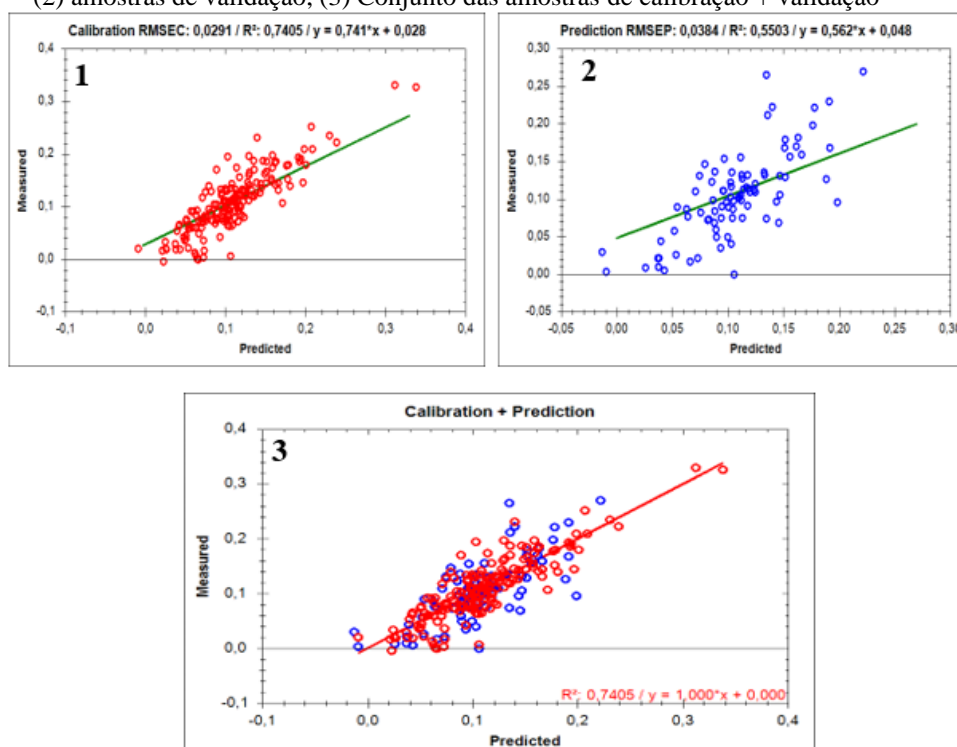
Os valores encontrados para o erro de calibração ou RMSEC = 0,0291 mg/g, para o erro de validação ou RMSEP = 0,0384 e validação cruzada ou RMSECV = 0,0540. A razão RMSEP/RMSECV para o modelo apresentou valor de 0,7111. De acordo com Augusto *et al.*, (2017) quanto mais próximo a 1 for esta razão mais robusto será o modelo. Isso indica a necessidade de otimizar os modelos obtidos buscando alternativas como identificação de amostras anômalas, ou ainda testar vários tipos de pré-processamento de imagens ou outras ferramentas de modelagem estatística.

Tabela 12 – Figuras de mérito para o modelo imagens/atividade antioxidante em equivalente quercetina mg/g

Modelo	Outliers	Variáveis latentes	Calibração (2/3)		Predição (1/3)		Validação cruzada	Razão RMSEP/RMSECV
			R ²	RMSEC (mg/g)	R ²	RMSEP (mg/g)	RMSECV (mg/g)	
1	0	6	0,7405	0,0291	0,5503	0,0384	0,0540	0,7111
2	0	7	0,7721	0,0272	0,5050	0,0404	0,0550	0,7345
3	0	11	0,8463	0,0223	0,5205	0,0405	0,0626	0,6469
4	0	14	0,8825	0,0195	0,5044	0,0417	0,0701	0,5948

FONTE: O autor (2021)

Figura 30 – Valores preditos e medidos segundo o Modelo PLS imagens/quercetina (1) amostras de calibração, (2) amostras de validação, (3) Conjunto das amostras de calibração + validação



FONTE: O autor (2021)

5.5.2 Modelos gerados para correlacionar as imagens e atividade antioxidante pelo método pela redução do íon férrico (FRAP)

Na **Tabela 13** são apresentados os modelos de regressão por PLS desenvolvidos, correlacionando os dados das imagens e as concentrações de antioxidante determinadas pelo método FRAP. Todos os modelos apresentaram R² para a calibração acima de 0,82, indicando bom ajuste entre as imagens do mel e sua atividade antioxidante no ensaio FRAP. Os coeficientes de determinação obtidos na validação cruzada foram acima de 0,64.

Segundo Westerhuis *et al.*, (2008), R² da validação cruzada $\geq 0,40$ são aceitáveis para sistemas biológicos ou amostras complexas. Os erros RMSEC, RMSEP e RMSECV foram baixos, próximos de zero, indicando que a ferramenta PLS produziu modelos matemáticos que modularam adequadamente a relação entre a cor do mel e os resultados obtidos no ensaio FRAP. Ou seja, a incerteza na estimativa da capacidade antioxidante FRAP nas amostras do conjunto de calibração e validação é baixa. Ainda, a razão RMSEP/RMSECV para o modelo 1 apresentou valor de 0,88, o que indica que os erros na estimativa da capacidade antioxidante do mel são equivalentes ao erro do modelo de calibração. Segundo Rios, (2018) quanto mais próximo a 1 for a razão RMSEP/RMSECV mais robusto será o modelo. Isso pode ser

comprovado ao analisar as curvas de calibração adquiridas pelo modelo da regressão linear entre a capacidade antioxidante pelo método de redução do íon férrico (FRAP) e a capacidade predita por meio das imagens digitais (**Figura 31**), que indicam correspondência adequada entre valores preditos pelo modelo e os valores obtidos no ensaio FRAP.

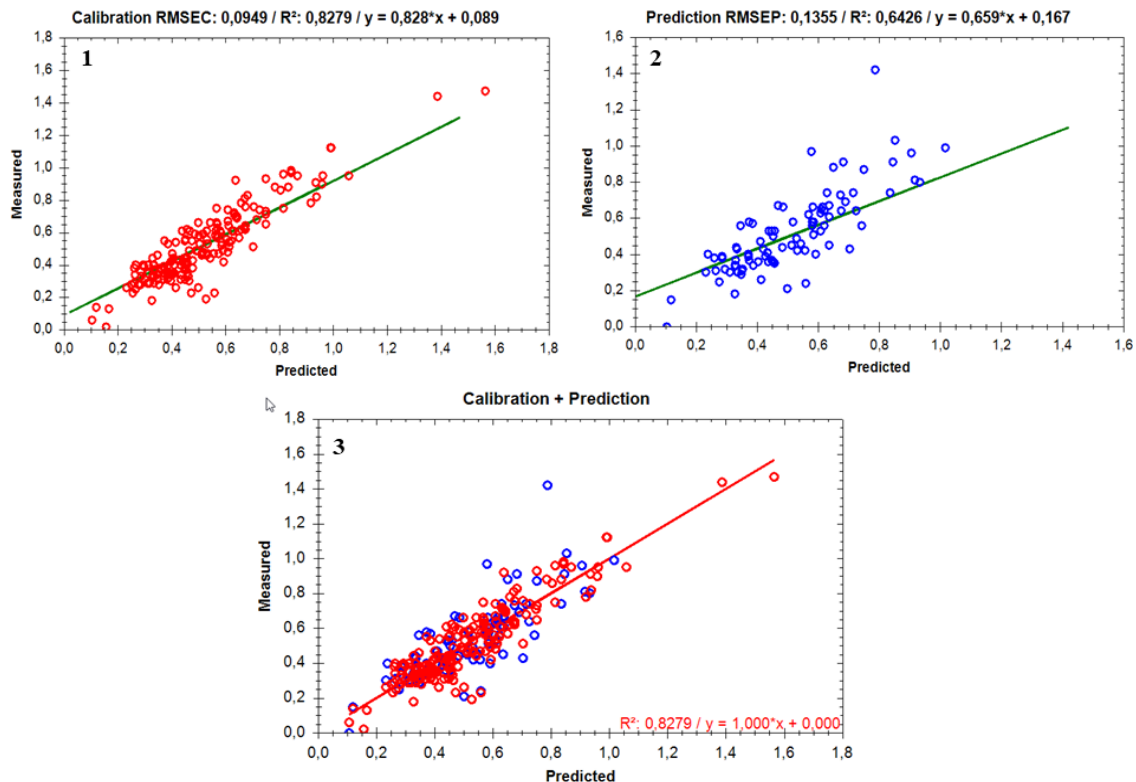
Dessa forma, os modelos obtidos, principalmente o modelo 1, apresentam excelente capacidade de predição da atividade antioxidante no ensaio FRAP e, portanto, podem ser utilizados para estimar a capacidade antioxidante de novas amostras de mel de abelha sem ferrão a partir de imagens digitais do mel.

Tabela 13 – Figuras de mérito para modelos imagens/atividade antioxidante pelo método de redução do íon férrico (FRAP)

Modelo	outliers	Variáveis latentes	Calibração (2/3)		Predição (1/3)		Validação cruzada	Razão RMSEP/RMSECV
			R ²	RMSEC (mg/g)	R ²	RMSEP (mg/g)	RMSECV (mg/g)	
1	4	4	0,8279	0,0948	0,6426	0,1354	0,1539	0,88
2	4	6	0,8690	0,0827	0,6975	0,1249	0,1549	0,80
3	4	7	0,8844	0,0777	0,7063	0,1232	0,1559	0,79
4	7	5	0,8114	0,0833	0,7519	0,0996	0,1488	0,66
5	7	6	0,8371	0,0774	0,7664	0,0967	0,1500	0,64
6	7	7	0,8534	0,0734	0,7781	0,0943	0,1527	0,61

FONTE: O autor (2021).

Figura 31 - Valores preditos e medidos segundo o Modelo PLS imagens/FRAP (1) amostras de calibração, (2) amostras de validação, (3) Conjunto das amostras de calibração + validação



FONTE: O autor (2021)

5.5.3 Modelos gerados para correlacionar as imagens e concentração de prolina mg/g

Na **Tabela 14** são apresentados os modelos de regressão por PLS desenvolvidos para modular a relação entre os dados das imagens e a concentração da prolina nas amostras de mel de abelha sem ferrão. Nos modelos 1 e 2, na coluna outliers (**Tabela 14**), estão amostras que não apresentaram resposta positiva no ensaio de determinação de prolina. Nos modelos 3 e 4, os outliers corresponderam a 20 amostras que não apresentaram valores de prolina e 6 amostras que apresentaram valores distantes das médias das amostras. Por esses motivos, essas amostras foram excluídas do estudo.

Todos os modelos apresentaram R^2 para a calibração acima de 0,79 e para a validação acima de 0,64, indicando bom ajuste entre as imagens do mel e sua concentração de prolina e capacidade adequada de estimativa desse parâmetro para novos conjuntos de amostras de mel. Os erros RMSEC, RMSEP e RMSECV próximos de zero indicam que a incerteza na estimativa dos teores de prolina nas amostras do conjunto de calibração e validação foi baixa. A razão RMSEP/RMSECV para o modelo 1 apresentou valor de 0,65, para o modelo 2 de 0,6181, para o modelo 3 de 0,56, para o modelo 4 de 0,53, quanto mais próximo a 1 for esta razão mais robusto será o modelo, por tanto a análise das figuras de mérito para os modelos obtidos indica que o modelo 1 apresentou a melhor capacidade preditiva do teor de prolina para novas amostras de méis.

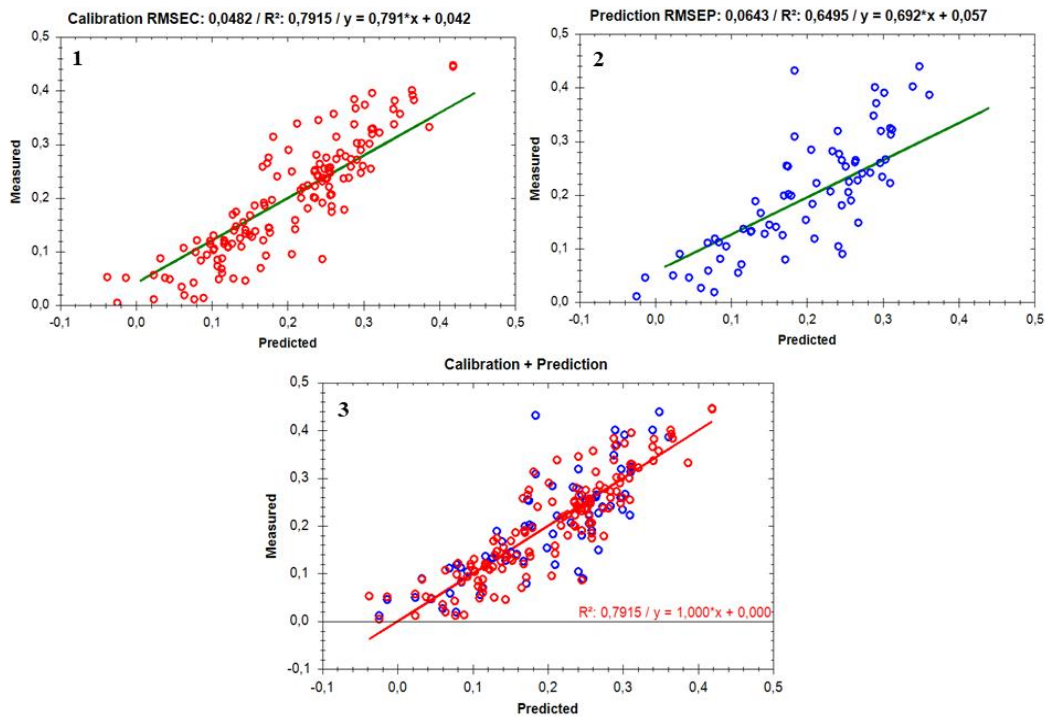
Tabela 14 - Modelos imagens/concentração de prolina mg/g

Modelo	outliers	Variáveis latentes	Calibração (2/3)		Predição (1/3)		Validação cruzada	Razão RMSEP/RMSECV
			R^2	RMSEC (mg/g)	R^2	RMSEP (mg/g)	RMSECV (mg/g)	
1	20	6	0,7914	0,0482	0,6495	0,0643	0,0977	0,6581
2	20	7	0,8197	0,0448	0,6590	0,0633	0,1024	0,6181
3	26	7	0,8154	0,0430	0,6907	0,0581	0,1037	0,5602
4	26	8	0,8370	0,0404	0,7069	0,0565	0,1061	0,5325

FONTE: O autor (2021).

Na **Figura 32** apresenta-se os resultados da calibração e predição no modelo 1, esta figura mostra os valores experimentais versus os valores preditos pelo modelo PLS.

Figura 32 - Modelos imagens/ prolina mg/g; modelo de calibração, modelo de Predição, modelo de calibração + Predição



FONTE: O autor (2021)

Nos parâmetros observados por meio dos métodos de calibração multivariada (PLS) se observa que os dados do ensaio DPPH, FRAP e prolina, apresentam boa concordância entre os valores experimentais e os valores previstos pelo modelo para prever a capacidade antioxidante das amostras de méis a partir de suas imagens digitais. Foram obtidos elevados coeficientes de calibração, indicando bom ajuste dos dados ao modelo, e moderados coeficientes de predição, indicando o poder moderado de predição dos modelos gerados. Os valores de RMSEC, RMSEP e RMSECV foram valores baixos, indicando baixa dispersão entre os valores experimentais e os preditos pelo modelo. Adicionalmente, a razão RMSEP/RMSECV próxima de 1 indica que os modelos obtidos são significativos e robustos (Augusto *et al.*, 2017; Rios, 2018).

6. CONCLUSÕES

Os resultados dos ensaios de referência corroboram a necessidade de estabelecer a variabilidade na capacidade antioxidante e no teor de prolina, bem como outros parâmetros de qualidade do mel de abelha sem ferrão, pois esses mostram níveis diferentes dos observados para o mel de *Apis*. Nesses esforços deve-se considerar a espécie de abelha produtora do mel pois esse fator afeta as propriedades do mel. Entretanto, alguns méis de abelhas sem ferrão apresentam capacidade antioxidante e teor de prolina semelhante ao reportado para os méis produzidos por a espécie *Apis*.

A correlação significativa moderada entre a capacidade antioxidante do mel de abelha sem ferrão, determinada pelo método DPPH e pelo método FRAP, sugere que os antioxidantes do mel podem agir como antioxidantes tanto pelo mecanismo de transferência de átomo de hidrogênio (principal mecanismo no ensaio de DPPH) quanto de transferência de elétrons (principal mecanismo no ensaio de FRAP). A falta de correlação entre a atividade antioxidante do mel de abelha sem ferrão e o teor de prolina indica que a atividade antioxidante desses méis não está relacionada ao teor total de aminoácidos e que outras classes de compostos químicos, possivelmente fenólicos, devem afetar a capacidade antioxidante desse mel.

Os resultados obtidos para os modelos PLS que modularam a relação entre as imagens/cores do mel e sua atividade antioxidante no ensaio DPPH indicam que os modelos apresentaram uma capacidade moderada de predição da atividade antioxidante no ensaio DPPH a partir dos dados de fotografia digital de novas amostras de mel.

Por outro lado, os modelos PLS para a relação entre imagens/cores do mel e sua atividade antioxidante no ensaio FRAP indicaram excelente capacidade de predição e, portanto, podem ser utilizados para estimar a capacidade antioxidante de novas amostras de mel de abelha sem ferrão a partir de imagens digitais do mel.

Os modelos PLS para estimar o teor de prolina a partir de imagens digitais apresentaram ajuste adequado e capacidade moderada de estimativa desse parâmetro para novos conjuntos de amostras de mel de abelha sem ferrão.

Dessa forma, pode-se concluir que os dados numéricos de fotografia digital de méis de abelha sem ferrão podem ser utilizados como ferramenta auxiliar para estimar de forma rápida a capacidade antioxidante do mel e seu teor de aminoácidos totais.

REFERÊNCIA

- ABDI, H. Partial least squares regression and projection on latent structure regression (PLS Regression). **WIREs Computational Statistics**, Texas, v. 2, p.97-106, 2010.
- ALQARNI, A. S. *et al.* Mineral content and physical properties of local and imported honeys in Saudi Arabia. **Journal of Saudi Chemical Society**, v.18, p. 618–25, 2014.
- ALVES, C.Q. *et al.* Avaliação Da Atividade Antioxidante De Flavonóides, **Diálogos & Ciência**, v. 22, p. 67, 2015.
- AUGUSTO, M. C. *et al.* Influência do pré-processamento e escolha das variáveis latentes na construção de modelos PLS para quantificação de fenólicos totais em própolis, **Synergismus científica UTFPR**, Pato Branco, v. 12, n. 1, p. 14–18, 2017.
- ÁVILA, S. *et al.* Bioactive compounds and biological properties of Brazilian stingless bee honey have a strong relationship with the pollen floral origin. **Food Research International** v.123, p.1-10, 2019.
- BAILEY, A.E. **BAILEY'S INDUSTRIAL OIL AND FAT PRODUCTS**. 5th ed. New York: John Wiley; 1996.
- BARROS B. de N.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R, E. 25 Anos de Quimiometria no Brasil. **Quim. Nova**, v. 29, No. 6, p. 1401-1406, 2006.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry** 239, p.70–76, 1996.
- BIANCHI, M. de L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista. Nutrição.**, Campinas, 12(2), p.123-130, 1999a.
- B BILUCA, F. C. **Caracterização química e bioativa de méis de abelhas sem ferrão (*meliponinae*) produzidos no estado de santa catarina**. 2018.Tese (Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018.
- BILUCA, F. C. *et al.* 5-HMF and carbohydrates content in stingless bee honey by CE before and after thermal treatment. **Food Chemistry**, v. 159, p. 244-249, 2014.
- BILUCA, F.C. *et al.* Physicochemical profiles, minerals and bioactive compounds of stingless bee honey (*Meliponinae*). **Journal of Food Composition and Analysis** 50 p. 61-69, 2016.
- BILUCA, F. C. *et al.* Atividade antioxidante, compostos bioativos e características físico-químicas de méis de abelha Mandacaia (*melipona quadrifaciata*) coletados em diferentes municípios do estado de santa Catarina. **SIMPÓSIO DE ALIMENTOS PARA A REGIÃO SUL**, VIII., 2013. p. 1-6.
- BILUCA, F.C. *et al.* Investigation of phenolic compounds, antioxidant and anti-inflammatory activities in stingless bee honey (*Meliponinae*). **Food Research International**. v.129, p. 108756. 2020.
- BOGDANOV, S. HARMONISED METHODS OF THE INTERNATIONAL HONEY

COMMISSION IHC. Introduction and general comments on the methods responsible for the methods.: 2002.

BOGDANOV, S. B. Harmonised methods of the International Honey Commission. 2009.

Bogdanov SB. Harmonised methods of the International Honey Commission. 2009.

BORSATO, D. M. **Composição Química, Caracterização Polínica e Avaliação de Atividade Bilógicas De Méis Produzidos Por Meliponíneos Do Paraná (Brasil)**. 2013. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

BORSATO, D.M. *et al.* Atividade antimicrobiana de méis produzidos por meliponíneos nativos do Paraná (Brasil). **B.CEPPA**, Curitiba, v. 31, n. 1, p. 57-66, 2013.

BORSATO, D.M. *et al.* Prudente AS, Döll-Boscardin PM, Borsato A V., Luz CFP, Maia BHLNS, *et al.* Topical Anti-Inflammatory Activity of a Monofloral Honey of Mimosa scabrella Provided by *Melipona marginata* During Winter in Southern Brazil. **Journal Of Medicinal Food**, v.17, p. 817–25. 2014.

BRAGHINI, F. *et al.* Effect of different storage conditions on physicochemical and bioactive characteristics of thermally processed stingless bee honeys. **Journal Pre-proof**, v. 131, p. 109724. 2020.

BRASIL. MINISTERIO DA SAUDE. **Portaria nº 540**, de 27 de outubro de 1997. Brasília: 1997.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO, Instrução **Normativa nº 11**, de 20 de outubro de 2000. Regulamento técnico de identidade e qualidade do mel.; 2000.

BUENO-COSTA, F. M *et al.* Antibacterial and antioxidant activity of honeys from the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Food Science and Technology**, v. 65, p. 333–40. 2016.

CHUTTONG, B. *et al.* Physicochemical profiles of stingless bee (*Apidae: Meliponini*) honey from South East Asia (Thailand). **Food Chemistry**. 192:p.149–55, 2016.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Codex Alimentarius Commission Standards**. Codex Stan 12-1981 2001.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION FAO/OMS, **Codex Alimentarius**. Revised Codex Standard for Honey, Standards and Standard Methods. Codex Aliment Comm FAOOMS 2001.

CONZEN, J.P. **Practical, Multivariate calibration. A Analytical, guide for the method development in the Chemistry**. Ettlingen: (Bruker); 2006.

COSTA, A. C. V. *et al.* Sensory and volatile profiles of monofloral honeys produced by native stingless bees of the brazilian semiarid region. **Food Research International**, v. 105 p.110–120, 2018.

COSTA, I. F.; TORO, M. J. U. Evaluation of the antioxidant capacity of bioactive

compounds and determination of proline in honeys from Pará. **Journal of Food Science and Technology**, 58(5) p. 1900–1908, 2021.

CZARNECKI, M. A.; MORISAWA, Y.; FUTAMI, Y.; OZAKI, Y. Advances in Molecular Structure and Interaction Studies Using Near-Infrared Spectroscopy. **Chemical Reviews**, v.115, p. 9707–44, 2015.

D'OLIVEIRA, S. L. *et al.* Comparação dos ensaios de DPPH, ABTS e FRAP para estimar a capacidade antioxidante de extratos de méis silvestres e de laranja. **Sociedade Brasileira de Química (SBQ)**, 2010.

DAĞDEVIREN, S. *et al.* A new method of UA_CPE coupled with spectrophotometry for the faster and cost-effective detection of proline in fruit juice, honey, and wine. **Food Chemistry**, v. 255 p.31–40. 2018.

DAMASCENO, D. *et al.* ANÁLISE MULTIVARIADA DE IMAGENS NA QUÍMICA: UM EXPERIMENTO PARA DETERMINAÇÃO DO pH DE ÁGUAS POTÁVEIS. **Química Nova**, v. 38, No. 6, p. 836-841, 2015.

DANCEY, C.; REIDY, J. **Estatística sem matemática: para psicologia usando SPSS para Windows**. 3. ed. Porto Alegre: 2006.

DIAS, M.S. *et al.* levantamento de tecnologias de conservação de mel de abelhas nativas em função de suas propriedades físico-químicas. 8º Congr. Interinstitucional Iniciação Científica, São Paulo, Campinas: 2014, p. 8.

DOMINGOS, S.C.B. *et al.* Antibacterial activity of honeys from Amazonian stingless bees of *Melipona* spp. and its effects on bacterial cell morphology. **Journal of the Science of Food and Agriculture** v.101, p. 2072-2077, 2021.

DOMINGUEZ, M. A.; CENTURIÓN, M. E. Application of digital images to determine color in honey samples from Argentina. **Microchemical Journal**. v. 118, p. 110–114, 2015.

DUARTE, A.W.F. **Mel de Abelhas Nativas E Africanizadas Do Estado De Alagoas: Composição Química, Segurança Microbiológica E Atividade Terapêutica**. 2009. Dissertação (Mestrado em Nutrição) - Faculdade De Nutrição, Universidade Federal De Alagoas, Maceió, 2009.

DUARTE, A.W.F. *et al.* Composition and antioxidant activity of honey from Africanized and stingless bees in Alagoas (Brazil): A multivariate analysis. **Journal of Apicultural Research**. v. 51, p.23–35, 2012.

ESH, S. N. J. I.; MACHADO, M. E. A. Lycopene as an antioxidant agent. **Revista de Nutrição**. v.17, p. 227–36, 2004.

FAN, Y. *et al.* Digital image colorimetry on smartphone for chemical analysis: A review. **Measurement**. v. 171, 2021.

FEITOSA, F. D. R. **Espectro provável e detecção de tons de Modelos matemáticos para redução do pele humana em imagens coloridas representadas nos espaços de cores RGB e HSV**. 2015. Dissertação (Programa de Pós-Graduação do Instituto de Informática), Instituto

de Informática, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.

FERREIRA, DA COSTA I, URÍA, TORO, M. J. caracterização físico-química, quantificação dos compostos bioativos e capacidade antioxidante de méis paraenses. In: Oliveira PDAC de, organizador. *A Produção do Conhecimento nas Ciências da Saúde 2*. 2^o ed, Belo Horizonte: Atena Editora; 2019, p. 143–9.

FERREIRA, W.C. *et al.* Caracterização dos méis de *Apis mellífera* de diferentes floradas comparado com méis de abelhas indígena *Meliponeae*. **Encontro Nac. Educ. Ciência e Tecnol.**, 2012, p. 6.

FiB. Dossiê antioxidantes. **Food Ingredients Bras** 2009;6:16–31.

GALO, G.T. *et al.* Estudo da extração da quercetina a partir da cebola roxa (*allium cepa* L.) e seu uso como conservante alimentar natural. **The Journal of Engineering and Exact Sciences** v. 04, n. 01, 2018.

GELA, A. *et al.* Physico-chemical characteristics of honey produced by stingless bees (*Meliponula beccarii*) from West Showa zone of Oromia Region, Ethiopia. **Heliyon**;v. 7, p 05875, 2021.

GELADI, P.; WOLD. S. E. Image analysis and chemical information in images. **Analytica Chimica Acta** 191 p.473-480, 1986.

GOMES, F. A. **Comparação das Características Físico-Químicas e Antioxidantes De Méis De Diferentes Espécies De Abelhas**. 2014. Dissertação(mestrado em produção animal) - programa de pós-graduação em produção animal, Universidade Federal Rural Do Semi-Árido, Mossoró, 2014.

GOMES, V.V. *et al.* Avaliação da Qualidade do Mel Comercializado no Oeste do Pará, Brasil. **Revista. Virtual Quimica**, 9 (2), p. 815-826, 2017.

GOMES, V. V. *et al.* Evaluation of the quality of honey commercialized in Western Pará, Brazil. **Revista Virtual Quimica**, v. 9, p. 815–26, 2017.

GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of food constituents: An overview. **Arch Toxicol**, 86;p.345-391, 2012.

HERRERO, L. C. *et al.* . Detection and quantification of adulterations in aged wine using RGB digital images combined with multivariate chemometric techniques. **Food Chemistry X**;3:100046. 2019.

HOLANDA, C. A. *et al.* Qualidade dos méis produzidos por *Melipona fasciculata* Smith da região do Cerrado Maranhense. **Quimica. Nova**,v. 35, N. 1, p.55-58, 2012.

ISLAM, A, *et al.* Physicochemical and antioxidant properties of Bangladeshi honeys stored for more than one year. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 12:177, 2012.

JANISZEWSKA, K.; ANIOŁOWSKA, M.; NOWAKOWSKI, P. Free amino acids content of honeys from Poland. **Pol. J. Food Nutr. Sci.**, v. 62, N,2, p. 85-89, 2012.

KARABAGIAS, I. K. *et al.* Headspace Gas Chromatography-Mass Spectrometry for Volatile

Components Analysis in *Ipomoea Cairica* (L.) Sweet Leaves: Natural Deep Eutectic Solvents as Green Extraction and Dilution Matrix. **Food Research International**, 55:p 363–72. 2014.

KAYA, B.; YILDIRIM, A. Determination of the antioxidant, antimicrobial and anticancer properties of the honey phenolic extract of five different regions of Bingöl province. **J Food Sci Technol**, 58:p.2420–30, 2021.

KEK, S. P. *et al.* Classification of entomological origin of honey based on its physicochemical and antioxidant properties. **International Journal of Food Properties**, 20: S2723–S2738. 2018.

KUMAR, S. Analytical Techniques for Natural Product Research. **CABI**; 2016.

LEOPOLDINI, M.; RUSSO N.; TOSCANO, M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. **Food Chemistry**, v. 125, p. 288–306, 2011.

LI, W.; QU. H. Rapid quantification of phenolic acids in *Radix Salvia Miltorrhiza* extract solutions by FT-NIR spectroscopy in transreflective mode. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.52,p.425–431, 2010.

LIRA, A. F. *et al.* Estudo comparativo do mel de *Apis mellifera* com méis de meliponíneos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.8, n.3, p.169-178, 2014.

LONG, D. *et al.* Rapid method for proline determination in grape juice and wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 4259–4264, 2012.

LOPES, A. T. T. *et al.* Vitorino de Meneses AR, Nascimento Silva J, Landim Parente GD, de Holanda Neto JP. Caracterização físico-química e avaliação microbiológica de méis de abelhas nativas do nordeste brasileiro. **Revista Verde (Mossoró – RN – Brasil)** v .6, n. 3, p. 91 - 97, 2011.

MAHMOOD, R.; ASIF, J. A. ; SHAHIDAN, W. N. S. Stingless-bee (*Trigona itama*) honey adversely impacts the growth of oral squamous cell carcinoma cell lines (HSC-2). **European Journal of Integrative Medicine**, v. 37. p. 101162, 2020.

MARTINI, R. P.; PFÜLLER, E. E. ; MARTINS, E. C. **Importância ambiental das abelhas sem ferrão**. ramvi, Getúlio Vargas, v. 02, n. 04, 2015.

MEDA, A. *et al.* Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry** v.91,p. 571–577, 2005.

MENEZES, B. DO. A. D. ; MATTIETTO, R. DE A. ; LOURENÇO, L DE F. H. Avaliação Da Qualidade De Méis De Abelhas Africanizadas E Sem Ferrão Nativas Do Nordeste Do Estado Do Pará. **Cienc. anim. bras., Goiânia**, v.19, p. 1-13, 2018.

MERCÊS, M.D. *et al.* Antimicrobial activity of honey from five species of Brazilian stingless bees. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.43, n.4, p.672-675, 2013.

MIORIN, P. L. *et al.* 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.

MODEIROS, D.; SOUZA, M. Contaminação Do Mel: a Importância Do Controle De Qualidade E De Boas Práticas Apícolas. **Atas Ciências da Saúde**, v. 3, p. 1–22, 2016.

MONIRUZZAMAN, M. *et al.* Identification of Phenolic Acids and Flavonoids in Monofloral Honey from Bangladesh by High Performance Liquid Chromatography: Determination of Antioxidant Capacity. **Hindawi Publishing Corporation**, p. 11, 2014.

MOON, J-K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant Assays for Plant and Food Components. **J. Journal of agricultura and food chemistry**, v.57, p. 1655–1666, 2009.

MORELLATO, S.A. **Modelos de regressão PLS com erros heteroscedásticos**. 2010. Dissertação(Mestrado em Estatística) - Departamento de Estatística, Universidade Federal de São Carlos - DEs/UFSCar, São Carlos, 2010.

MORGANO, A. **Aplicação de métodos quimiométricos em análise de alimento**. 2005. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Departamento de Química Analítica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

NANDA, V. *et al.* Characterisation of honey produced from different fruit plants of northern India. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, p. 2629–2636, 2009.

NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e Criação de Abelhas Indígenas Sem Ferrão**. São Paulo: Nogueirapis, vol. 34. 1997. 445 p.

NOOR, N. *et al.* Antitumour and antioxidant potential of some selected Pakistani honeys. **Food Chem**, v. 143, p. 362–366, 2014.

NWEZE, J. A.; OKAFOR, J. I.; NWEZE, E. I.; NWEZE J.E. Evaluation of physicochemical and antioxidant properties of two stingless bee honeys: A comparison with *Apis mellifera* honey from Nsukka, Nigeria. **BMC Res Notes**, v.10, p. 566. 2017.

OLIVEIRA, A.; COSTA, M.; ROCHA, S. Benefícios Funcionais do Açaí na Prevenção de Doenças Cardiovasculares. **Journal of Amazon Health Science** v.1, p.1-10. 2015.

Oliveira de Sousa Pereira M. **Estudo Comparativo de Métodos de Avaliação da capacidade Antioxidante de Compostos Bioativos**. 2010. Dissertação (Mestrado Em-engenharia Alimentar)-Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2010.

OLIVEIRA, E. M.; BRAGA, J. W. B.; DA COSTA, A. F. Discriminação de madeiras similares por fluorescência molecular e mínimos quadrados parciais. **Química Nova**, v. 38, p. 1176–1180, 2015.

Oliveira, F. P. M.; Absy, M. L.; Miranda, I. S. Pollen resources collected by stingless bees (*Apidae, Meliponinae*) in a forest fragment in the Manaus region, Amazonas. **Acta Amazonica**,v. 39, p. 505–518, 2009.

OLIVEIRA. G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH•: estudo de revisão. **Rev. Bras. Pl. Med**, Campinas, v.17, n.1, p.36-44, 2015.

OLIVEIRA, P. S.; LEE, G.; MOYA, H. D. Determinação de fármacos redutores com o método CUPRAC modificado. Análise de dipirona em formulações farmacêuticas

Sociedade Brasileira de Química (SBQ) 2010.

OLIVEIRA, P. S. *et al.* 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. 1728–32, 2012.

OOI, T. C. *et al.* The stingless bee honey protects against hydrogen peroxide-induced oxidative damage and lipopolysaccharide-induced inflammation in vitro. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, p. 2987–2994, 2021.

PATATT, K.; BEIER, C.; GARBIN, M. E. Relação entre as cores florais e sua polinização por abelhas. XIX **Seminário** de Iniciação Científic. 2011. p. 1758:5.

PATRIGNANI, M. *et al.* Volatile compounds of Argentinean honeys: Correlation with floral and geographical origin. **Food Chemistry**, v. 246, p. 32–40, 2018.

DE PAULA, G. T. *et al.* Stingless bees and microbial interactions. **Current Opinion in Insect Science**, v. 44, p. 41–47, 2021.

PEREIRA, F de M, Souza B de A, Lopes MT do R. Criação de Criação de abelhas-sem-ferrão. 2017.

RAMALHO, C.V. ; NEUZA, J. Antioxidantes Utilizados em Óleos, Gorduras e Alimentos Gordurosos. **Química Nova**, v. 29, p. 755–760, 2006.

RAMÓN-SIERRA, J. M.; RUIZ-RUIZ, J. C.; DE LA LUZ ORTIZ-VÁZQUEZ, E. Electrophoresis characterisation of protein as a method to establish the entomological origin of stingless bee honeys. **Food Chemistry**, v. 18, p. 43–48, 2015.

RANNEH, Y. *et al.* Malaysian stingless bee and Tualang honeys: A comparative characterization of total antioxidant capacity and phenolic profile using liquid chromatography-mass spectrometry. **LWT- Food Science and Technology**, v. 89, p. 1–9, 2018.

Rao PV, *et al.* Biological and therapeutic effects of honey produced by honey bees and stingless bees: A comparative review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, p.657–64, 2016.

RICARDO, DA S. P. **Estudo químico e potencial antioxidante do mel e geoprópolis coletados pela abelha sem ferrão mandaçaia (*Melipona Mandacaia*)**. 2015. (Doutorado em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos) - Programa Pós-Graduação em Desenvolvimento E Inovação Tecnológica Em Medicamentos, Universidade Federal Rural de Pernambuco Programa, Recife,2015.

RIOS, C. A. **Estudo de manchas de sangue: uma abordagem forense empregando espectroscopia raman, imagens digitais e ferramentas quimiométricas**. Dissertação(Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Ciências Exatas Departamento de Química, Universidade Federal De Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018.

RODRIGUES, A.; MACHADO, T. Regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) e espectroscopia no UV / Vís para quantificação de corantes : agilidade e eficiência para

estações de tratamentos de efluentes têxteis. **Rev Eletrônica Produção Eng**, v. 4, p.427–432, 2013.

RODRÍGUEZ, B. A. *et al* Quality parameters and antioxidant and antibacterial properties of some Mexican honeys. **Journal of Food Science**, v. 71, N. 1, 2012.

RUFINO, M. S.M, *et al*. FRAP EMBRAPA. **Comun Técnico**, 125 Embrapa: p.3–6, 2006.

SAGDIC, O.; SILICI, S.; EKICI, L. Evaluation of the phenolic content, antiradical, antioxidant, and antimicrobial activity of different floral sources of honey. **International Journal of Food Properties**, v.16, p. 658–666, 2013.

SALGUEIRO, F. B. **Caracterização de méis brasileiros: físico-química, perfil de substâncias polares, atividade antioxidante e quimiometria**. 2012. Dissertação(Mestrado em ciências) - Programa de pós-graduação em química, Universidade federal rural do rio de janeiro, Seropédica, 2012.

SARMENTO, S.T. M. *et al*. Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaíra (*Melipona subnitida*) honey. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 29, p. 10–8, 2013.

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

SCHIEVANO, E.; DETTORI, A.; PIANA, L.; TESSARI M. Floral origin modulates the content of a lipid marker in *Apis mellifera* honey. **Food Chemistry**, v. 361, p.130050, 2021.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, p. 1315S-1321S, 1995.

SILVA, I. A. A. D. *et al*. Phenolic profile, antioxidant activity and palynological analysis of stingless bee honey from Amazonas, Northern Brazil. **Food Chemistry**, v. 141, p. 3252–3258. 2013.

Da Silva, P. M. *et al*. Chemical composition, stability and authenticity. **Food Chemistry**, v. 196, p.309–23, 2016.

SILVA, W.; Lima Da P. J. R. Abelhas sem ferrão: muito mais do que uma importância econômica. **natureza on line**, 2012.

SMETANSKA, I.; ALHARTHI, SS.; SELIM, K. A. Physicochemical, antioxidant capacity and color analysis of six honeys from different origin. **Journal of King Saud University - Science**, v. 33, p.101447, 2021.

SOUSA, J. M. *et al*. Polyphenolic profile and antioxidant and antibacterial activities of monofloral honeys produced by *Meliponini* in the Brazilian semiarid region. **Food Research International**, 84:61–68, 2016.

De Sousa, J. M. B. *et al*. Sugar profile, physicochemical and sensory aspects of monofloral honeys produced by different stingless bee species in Brazilian semi-arid region. **LWT -Food Science and Technology**, v. 65, p. 645- 651, 2016.

SOUSA, J. P. L. De M. **Perfil Físico-químico, Composição Química e Capacidade Antioxidante de méis produzidos por Abelhas Sem Ferrão**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Departamento de química, Universidade federal rural do rio de janeiro, Seropédica, 2014.

SOUZA-KRULISKI, C. R. *et al.* Estudo de adulteração em méis brasileiros através de razão isotópica do carbono. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, p. 434–439. 2010.

SOUZA, B. *et al.* Composition of stingless bee honey: Setting quality standards. **Interciencia**, v.31, n.12, 2006.

STREMEL, A. M. **Mel de melato de bracinga (*Mimosa scabrella bentham*) do planalto serrano de santa catarina: discriminação e potencialidade Funcional**. 2017. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos.) - Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

SUCUPIRA, N. R. *et al.* Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 14, 263–269, 2012.

TIVERON, A. P. **Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil**. 2010. Dissertação (Ciências e tecnologia de alimentos)-Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Paracicaba, 2010.

TOMEI, R, R, ; Salvador MJ. Metodologias analíticas atuais para avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais. XI **Encontro** Lat. Am. Iniciação Científica e VII Encontro Lat. Am. Pós-Graduação., 2007, p. 1963–7.

TRUZZI, C . *et al.* Determination of proline in honey: Comparison between official methods, optimization and validation of the analytical methodology. . **Food Chemistry**, v. 150, p. 477-481,2014.

TUKSITHA, L. *et al.* Antioxidant and antibacterial capacity of stingless bee honey from Borneo (Sarawak). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v, 21, p. 563–570. 2018.

TURCO, J.F. **Estimação do Teor de Flavonoides e Capacidade Antioxidante de Extratos de Geoprópolis por Análise de Imagens, Infravermelho e Quimiometria**. 2019. Dissertação (Mestrado em química aplicada)- Programa de pós-Graduação em química aplicada, Universidade Estadual Do Centro-Oeste Do Paraná, Guarapuava, 2019.

TURCO, J. F, *et al.* Could antioxidant capacity and flavonoid content of ethanolic extracts of geopropolis from Brazilian native bees be estimated from digital photos and NIR Spectra? **Microchemical Journal**, v. 157, p. 105031,2020.

URREA V. V. *et al.* Ensaio antioxidante em microplaca do poder de redução do ferro (FRAP) para extratos de algas. **Instituto de Biociências**, 2016.

DE VASCONCELOSA, T. B. *et al.*. Antioxidants and Free Radicals: Peril or Protection? **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**, v. 16(3), p. 213-219, 2014.

VILLAS-BÔAS. J. **Manual Tecnológico Mel de Abelhas sem Ferrão**. 2012. WESTERHUIS, J. A. *et al.* Assessment of PLSDA cross validation. **Metabolomics**, v. 4, p. 81–89. 2008.

ANEXO 1 - Amostras de mel, valores de porcentagem inibição, concentração de quercetina e ácido ascórbico.

Grupo	% de inibição	Média do grupo % inibição	Equivalente de quercetina ± DP (mg/100g do mel)	Média do grupo Equivalente de quercetina ± DP (mg/100g do mel)	Equivalente de ácido ascórbico ± DP (mg/100g do mel)	média do grupo de ácido ascórbico ± DP (mg/100g do mel)
I	20,76±3,09	17,45±3,10	16,51±2,81	14,16±3,11	22,67±2,74	20,69±3,21
	16,50±0,86		13,06±0,81		19,52±0,79	
	13,60±2,70		10,26±2,52		16,72±2,46	
	18,94±2,25		16,82±2,31		23,85±2,26	
II	13,48±3,07	13,59±0,16	9,32±2,63	10,31±1,41	15,26±2,58	16,82±2,20
	13,70±2,02		11,31±2,06		18,38±2,01	
III	25,56±1,43	17,51±7,03	19,83±1,23	13,59±5,46	25,59±1,21	19,96±4,93
	12,63±0,94		9,69±0,91		16,41±0,89	
	14,33±0,55		11,25±0,52		17,89±0,51	
IV	22,78±3,73	21,24±2,04	18,51±3,43	17,34±1,66	24,69±3,35	23,60±1,53
	19,90±3,37		16,17±3,15		22,52±3,08	
V	29,19±4,61	29,19±4,61	22,89±3,97	22,89±3,97	28,56±3,88	28,56±3,88
VI	17,95±2,29	17,95±2,29	13,44±2,00	13,44±2,00	19,43±1,96	19,43±1,96
VII	10,39±1,64	10,39±1,64	6,52±1,37	6,52±1,37	12,38±1,34	12,38±1,34
VIII	10,60±1,98	10,60±1,98	6,67±1,65	6,67±1,65	12,50±1,62	12,50±1,62
IX	10,50±2,14	10,50±2,14	6,54±1,77	6,54±1,77	12,34±1,73	12,34±1,73
X	18,99±0,88	18,99±0,88	13,98±0,75	13,98±0,75	19,80±0,74	19,80±0,74
XI	6,69±0,49	6,69±0,49	x	x	x	x
XII	21,94±0,33	21,94±0,33	17,10±0,30	17,10±0,30	23,07±0,29	23,07±0,29
XIII	17,96±3,84	17,96±3,84	14,07±3,52	14,07±3,52	20,33±3,44	20,33±3,44
XIV	13,99±3,11	13,99±3,11	9,98±2,73	9,98±2,73	16,05±2,67	16,05±2,67
XV	37,89±3,85	37,89±3,85	30,89±3,37	30,89±3,37	36,49±3,29	36,49±3,29
XVI	12,22±1,45	14,49±3,21	8,17±1,24	9,38±1,71	14,08±1,21	14,90±1,16
	16,76±0,63		10,59±0,47		15,72±0,46	
XVII	11,38±1,39	11,38±1,39	8,33±1,32	8,33±1,32	14,96±1,29	14,96±1,29
XVIII	8,20±1,61	8,20±1,61	4,73±1,36	4,73±1,36	10,70±1,33	10,70±1,33
XIX	4,13±2,22	4,13±2,22	1,30±1,90	1,30±1,90	7,39±1,85	7,39±1,85
XX	7,21±1,80	7,21±1,80	4,21±1,65	4,21±1,65	10,69±1,61	10,69±1,61
XXI	19,21±1,52	19,21±1,52	15,05±1,38	15,05±1,38	21,22±1,35	21,22±1,35
XXII	5,18±1,71	7,74±3,63	2,14±1,43	4,41±3,21	8,08±1,40	10,42±3,31
	10,31±1,84		6,68±1,60		12,75±1,56	

(Continua)

(Continuação)

Grupo	% de inibição	Média do grupo % inibição	Equivalente de quercetina ± DP (mg/100g do mel)	Média do grupo Equivalente de quercetina ± DP (mg/100g do mel)	Equivalente de ácido ascórbico ± DP (mg/100g do mel)	média do grupo de ácido ascórbico ± DP (mg/100g do mel)
XXIII	11,80±1,50	11,80±1,50	7,60±1,24	7,60±1,24	13,36±1,21	13,36±1,21
XXIV	11,44±2,59	11,44±2,59	7,38±2,16	7,38±2,16	13,20±2,11	13,20±2,11
XXV	13,12±1,22	13,12±1,22	8,97±1,04	8,97±1,04	14,89±1,02	14,89±1,02
XXVI	12,46±2,27	12,46±2,27	9,67±2,23	9,67±2,23	16,50±2,18	16,50±2,18
XXVII	7,99±2,64	13,77±4,72	4,74±2,33	9,53±4,04	10,97±2,27	15,44±4,00
	18,96±1,64		13,94±1,39		19,75±1,36	
	10,71±1,82		6,88±1,55		12,82±1,51	
	16,06±2,26		11,39±1,91		17,21±1,87	
	6,56±2,78		3,35±2,35		9,34±2,30	
	16,96±2,13		12,23±1,81		18,08±1,77	
	4,30±0,90		1,43±0,76		7,47±0,74	
	8,78±3,19		5,26±2,72		11,26±2,66	
	2,97±0,42		0,30±0,34		6,12±0,34	
	4,49±0,73		1,50±0,58		7,19±0,57	
	3,78±1,06		1,11±1,01		7,88±0,98	
	8,31±1,93		4,72±1,59		10,55±1,56	
	19,44±3,82		13,91±3,16		19,54±3,09	
	13,27±1,65		8,83±1,36		14,57±1,33	
	15,25±0,86		10,77±0,74		16,65±0,72	
	15,01±2,78		10,38±2,33		16,15±2,27	
	21,36±4,16		15,50±3,43		21,09±3,36	
	14,35±2,53		9,66±2,08		15,35±2,04	
	21,04±1,92		15,21±1,59		20,79±1,55	
	16,14±3,90		11,07±3,19		16,70±3,12	
19,20±0,36	13,06±0,28	18,41±0,27				
13,22±1,20	8,24±0,93	13,62±0,91				
13,71±3,76	9,29±3,14	15,09±3,07				
15,37±0,61	10,62±0,51	16,35±0,50				
16,83±2,95	12,08±2,51	17,91±2,45				
15,47±2,24	11,32±1,97	17,38±1,92				
13,21±0,80	9,87±0,75	16,34±0,73				

(Continua)

(Conclusão)

Grupo	% de inibição	Média do grupo % inibição	Equivalente de quercetina ± DP (mg/100g do mel)	Média do grupo Equivalente de quercetina ± DP (mg/100g do mel)	Equivalente de ácido ascórbico ± DP (mg/100g do mel)	média do grupo de ácido ascórbico ± DP (mg/100g do mel)
	10,74±1,53		6,83±1,29		12,72±1,26	
	12,10±1,32		7,54±1,05		13,07±1,03	
	16,89±1,40		12,70±1,24		18,80±1,21	
	17,39±0,92		12,85±0,80		18,81±0,79	
	13,91±1,62		9,97±1,43		16,08±1,39	
	15,02±1,59		11,18±1,43		17,40±1,40	
	17,64±1,89		12,65±1,59		18,41±1,56	
	12,20±1,01		8,17±0,86		14,11±0,84	
	19,56±4,66		15,17±4,17		21,26±4,07	
	15,78±1,93		12,55±1,84		19,12±1,80	
	17,69±1,22		13,88±1,12		20,17±1,10	
	13,65±1,05		10,54±1,00		17,16±0,98	
	14,80±1,37		10,29±1,16		16,11±1,13	
	14,44±2,05		9,57±1,66		15,17±1,62	
XXVIII	5,05±0,92 3,59±1,32	4,32±1,03	2,13±0,80 0,82±1,10	1,47±0,92	8,31±0,78 6,78±1,07	7,54±1,09
XXIX	21,99±1,05	21,99±1,05	17,24±0,93	17,24±0,93	23,25±0,91	23,25±0,91
XXX	18,01±3,36 23,99±1,61	21±4,23	14,80±3,23 19,24±1,45	17,02±3,14	21,37±3,16 25,28±1,42	23,32±2,76
XXXI	16,43±0,66	16,43±0,66	11,16±0,53	11,16±0,53	16,70±0,52	16,70±0,52
XXXII	21,05±2,77	21,05±2,77	15,57±2,34	15,57±2,34	21,29±2,29	21,29±2,29
XXXIII	13,12±2,38	13,12±2,38	8,43±1,91	8,43±1,91	14,00±1,87	14,00±1,87
XXXIV	11,02±2,85	11,02±2,85	6,22±2,10	6,22±2,10	11,38±2,06	11,38±2,06
XXXV	24,67±2,60	24,67±2,60	18,48±2,18	18,48±2,18	24,08±2,13	24,08±2,13
XXXVI	12,91±2,76	12,91±2,76	8,23±2,20	8,23±2,20	13,79±2,16	13,79±2,16
XXXVII	30,34 ±1,77	30,34 ±1,77	23,50±1,50	23,50±1,50	29,06±1,47	29,06±1,47
XXXVIII	28,29±2,32	28,29±2,32	21,52±1,95	21,52±1,95	27,06±1,90	27,06±1,90

ANEXO 2 - Amostras de mel, valores de FRAP± DP e prolina ± DP n.d. = não detectado

(Continua)

Grupo	FRAP± DP $\mu\text{mol}/100\text{g}$ de mel	Média do grupo FRAP± DP $\mu\text{mol}/100\text{g}$ de mel	Prolina± DP mg/kg do mel	Média do grupo prolina± DP mg/kg do mel
I	456,67±42,28 304,67±33,06 189,41±23,37 339,09±12,91	322,46±110,01	217,99±16,15 109,71±4,85 193,58±11,10 234,00±9,17	188,82±55,30
II	90,41±13,54 84,04±3,36	87,23±4,50	243,50±17,52 261,64±11,46	252,57±12,82
III	304,80±18,62 147,40±5,71 154,41±3,69	202,20±88,92	356,49±24,31 276,41±14,63 253,43±2,42	295,44±54,10
IV	323,07±6,88 364,54±65,19	343,81±29,32	154,94±11,96 202,93±3,85	178,93±33,93
V	486,31±20,73	486,31±20,73	270,26±18,23	270,26±18,23
VI	271,12±6,97	271,12±6,97	140,07±1,46	140,07±1,46
VII	138,22±16,99	138,22±16,99	n. d.	n. d.
VIII	154,58± 9,37	154,58± 9,37	n. d.	n. d.
IX	418,32±25,55	418,32±25,55	n. d.	n. d.
X	331,21±32,61	331,21±32,61	n. d.	n. d.
XI	282,14±29,23	282,14±29,23	176,31±10,19	176,31±10,19
XII	255,32±51,90	255,32±51,90	195,46±8,10	195,46±8,10
XIII	211,74±21,08	211,74±21,08	108,21±2,52	108,21±2,52
XIV	269,47±4,02	269,47±4,02	94,77±1,33	94,77±1,33
XV	519,33±9,92	519,33±9,92	218,83±3,50	218,83±3,50
XVI	165,03±15,98 342,69±26,58	253,86±125,63	144,98±9,17 565,53±34,29	355,25±297,37
XVII	209,78±20,25	209,78±20,25	236,57±8,67	236,57±8,67
XVIII	119,28±13,23	119,28±13,23	390,50±9,55	390,50±9,55
XIX	100,20±9,70	100,20±9,70	n. d.	n. d.
XX	172,34±4,58	172,34±4,58	362,98±37,29	362,98±37,29
XXI	224,64±5,94	224,64±5,94	269,42±14,04	269,42±14,04
XXII	66,06±1,79	92,17±36,92	52,61±6,88	52,61±6,88
	118,28±21,28		n. d.	n. d.

(Continua)

(Continuação)

Grupo	FRAP± DP µmol/100g de mel	Média do grupo FRAP± DP µmol/100g de mel	Prolina± DP	Média do grupo prolina± DP
XXIII	190,40±6,77	190,40±6,77	216,30±30,45	216,30±30,45
XXIV	49,89±4,81	49,89±4,81	n. d.	n. d.
XXV	302,59±36,91	302,59±36,91	257,92±15,66	257,92±15,66
XXVI	257,21±46,69	257,21±46,69	373,97±16,87	373,97±16,87
XXVII	148,00±4,82 249,27±8,47 122,94±9,75 254,03±4,83 189,96±8,47 210,95±6,56 125,90±13,77 261,74±59,68 228,47±8,43 147,45±6,60 168,78±5,34 228,19±15,35 128,90±6,15 137,08±4,55 112,70±9,99 107,29±3,28 158,25±7,96 145,82±4,71 133,00±10,29 201,41±19,22 214,51±21,21 88,62±6,24 130,66±4,59 192,16±20,98 260,94±14,28 149,31±6,60 163,50±9,88 193,81±14,24	171,86±48,56	116,16±3,68 383,25±16,91 131,10±3,67 441,32±7,75 550,35±11,05 326,21±16,85 79,97±5,02 n. d. 90,48±3,93 49,24±2,57 81,00±11,59 131,34±11,57 n. d. n. d. n. d. n. d. 15,00±3,92 378,30±53,82 n. d. 221,13±15,52 180,46±7,90 n. d. 27,15±7,77 n. d. 175,98±28,75 57,96±10,42 182,98±7,89 218,23±9,78	220,93±129,72

(Continua)

(Conclusão)				
Grupo	FRAP± DP µmol/100g de mel	Média do grupo FRAP± DP µmol/100g de mel	Prolina± DP	Média do grupo prolina± DP
	134,63±1,64 206,56±14,32 206,43±31,17 106,94±11,83 137,97±18,40 178,02±17,95 98,51±6,14 171,74±14,97 214,77±9,11 233,26±29,27 119,82±13,62 224,31±11,90 159,67±26,97		124,93±9,37 265,35±10,43 386,51±18,74 277,34±13,03 246,97±13,03 312,71±11,74 314,05±10,51 264,10±9,15 328,39±5,42 128,85±9,40 326,20±11,95 256,69±24,19 193,94±6,88	220,93±129,72
XXVIII	111,41±0,98 115,25±5,45	113,33±2,72	87,82±2,41 n. d.	87,82±2,41 n. d.
XXIX	188,39±17,01	188,39±17,01	145,14±30,97	145,14±30,97
XXX	131,67±8,60 191,69±21,73	161,68±42,44	120,92±16,89 102,15±6,89	111,53±13,27
XXXI	153,06±7,87	153,06±7,87	46,52±3,97	46,52±3,97
XXXII	243,91±19,82	243,91±19,82	156,08±11,75	156,08±11,75
XXXIII	160,99±4,75	160,99±4,75	n. d.	n. d.
XXXIV	137,32±6,29	137,32±6,29	n. d.	n. d.
XXXV	241,75±23,96	241,75±23,96	248,85±10,33	248,85±10,33
XXXVI	10,07±9,64	10,07±9,64	9,79±3,90	9,79±3,90
XXXVII	349,20±1,66	349,20±1,66	521,68±16,02	521,68±16,02
XXXVIII	243,62±11,86	243,62±11,86	294,52±19,86	294,52±19,86
XXXIX	180,76±8,78	180,76±8,78	52,64±3,91	52,64±3,91
XL	122,72±20,11	122,72±20,11	114,52±14,07	114,52±14,07
XLI	172,79±42,56	172,79±42,56	231,18±37,73	231,18±37,73
XLII	118,97±3,84	118,97±3,84	n. d.	n. d.
XLIII	124,88±14,50	124,88±14,50	73,07±13,70	73,07±13,70
XLIV	193,70±32,24	193,70±32,24	901,90±112,22	901,90±112,22