

**UNIVERSIDADE VILA VELHA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E POTENCIAL BIOATIVO DE  
MEL DE ABELHAS SEM FERRÃO E AFRINCANIZADAS  
OCORRENTES NO ESPÍRITO SANTO**

**LARISSA LIMA FIOROTTI**

**VILA VELHA  
JULHO/2021**

**UNIVERSIDADE VILA VELHA – ES**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E POTENCIAL BIOATIVO DE  
MEL DE ABELHAS SEM FERRÃO E AFRICANIZADA OCORRENTES  
NO ESPÍRITO SANTO**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Denise Coutinho Endringer.

**LARISSA LIMA FIOROTTI**

**VILA VELHA  
JULHO/ 2021**

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

F519c Fiorotti, Larissa Lima.  
Caracterização físico-química e potencial bioativo de mel de abelhas sem ferrão e africanizada ocorrentes no Espírito Santo / Larissa Lima Fiorotti. – 2021.

89 f. : il.

Orientadora: Denise Coutinho Endringer.  
Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Vila Velha, 2021.  
Inclui bibliografias.

1. Farmacologia e terapêutica. 2. Mel de abelha.  
3. Antioxidantes. 4. Câncer – Prevenção. I. Endringer, Denise Coutinho. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 615

**LARISSA LIMA FIOROTTI**

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E POTENCIAL BIOATIVO  
DE MEL DE ABELHAS SEM FERRÃO E AFRICANIZADA  
OCORRENTES NO ESPÍRITO SANTO**

Dissertação apresentada à Universidade  
Vila Velha como pré-requisito do  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciências

Farmacêuticas, para obtenção do grau de  
Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Denise Coutinho  
Endringer.

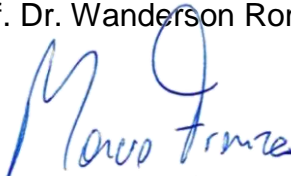
Aprovada em 27 de julho de 2021.

Banca examinadora:



---

Prof. Dr. Wanderson Romão – IFES



---

Prof. Dr. Marcio Fronza – UVV



---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Denise Endringer - UVV  
(Orientadora)

Meu pai Wilson Fiorotti  
Minha mãe Claudia Lima Fiorotti  
Minha irmã Lorena Lima Fiorotti

Dedico.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por sempre estar presente, me abençoando, iluminando, me dando força e fé em todos os momentos, especialmente na conclusão de mais essa etapa em minha vida. Sem Ele, nada disso seria possível.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Denise Endringer, por ter me acolhido em seu grupo de pesquisa, pelas oportunidades, pela confiança depositada em mim e pelos ensinamentos. Você é uma grande inspiração de mulher, mãe e pesquisadora.

À Ariane Cruz pelos ensinamentos, contribuições e paciência desde quando iniciei no Programa de Pós-Graduação. Muito obrigada pelos conhecimentos!

Ao Adelmo Bergamini e Vantuir, por concederem as amostras dos méis. Agradeço também a AME-ES por todo apoio.

Ao Laboratório de Petrolômica e Forense da UFES, pela atenção e disponibilidade na análise de dados deste trabalho.

À Universidade Vila Velha e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade e incentivo à pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES), por todo apoio financeiro para a realização da pesquisa.

Ao professor Dr. Márcio Fronza, pelas sugestões, apoio e por todos os ensinamentos.

Agradeço à Marcelita Marques por toda contribuição, ideias e ensinamentos para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus colegas e amigos de laboratório, Antônio Domingos, Ana Claudia Hertel, Narjara Laranja, Iana Soares, Flávia Porto e Victor Aragão. Agradeço pela amizade, convivência, por cada lanche compartilhado, conversas e saídas nos horários vagos.

Aos meus pais, Wilson Fiorotti, Claudia Fiorotti e minha irmã Lorena Fiorotti, por todo amor, carinho, ensinamento e por sempre acreditarem em mim. Vocês foram fundamentais.

Ao meu namorado, Lázaro Medeiros, por todo companheirismo, apoio nesta caminhada e incentivo a nunca desistir dos meus sonhos. Muito obrigada.

*“A persistência é o caminho do êxito”*  
(Charles Chaplin)

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Abelhas e sua importância econômica e ecológica .....	1
1.2 Abelhas sem ferrão .....	2
1.3 Abelha africanizada.....	6
1.4 Mel.....	8
1.4.1 Características físico-químicas do mel .....	9
1.4.2 Compostos fenólicos em mel de abelha sem ferrão .....	14
1.4.3 Atividade quimiopreventiva do mel .....	16
1.4.4 Atividade antioxidante.....	18
1.5 Hipótese.....	19
2. OBJETIVOS .....	19
2.1 Objetivo Geral.....	19
2.2 Objetivos Específicos.....	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1 Grupo estudado .....	20
3.2 Área de estudo e delineamento da coleta de amostras .....	20
3.3 Caracterização físico-química.....	21
3.3.1 Açúcares redutores e totais .....	21
3.3.2 Sólidos solúveis .....	21
3.3.3 Umidade .....	22
3.3.4 pH e Acidez livre .....	22
3.4 Determinação de polifenóis totais e flavonoides .....	22
3.5 Composição química por ESI-FT-ICR MS .....	23
3.6 Determinação da atividade antioxidante .....	24
3.6.1 DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil).....	24
3.6.2 FRAP (Poder antioxidante de redução férrica) .....	24
3.7 Determinação da atividade citotóxica .....	24
3.8 Avaliação da atividade quimiopreventiva de câncer .....	25
3.8.1 Ensaio in vitro de indução da quinona redutase .....	25
3.8.2 Ensaio de atividade inibitória de NF- $\kappa$ B .....	26
3.9 Análise dos dados.....	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	28
4.1. Características físico-químicas .....	28



4.1.1 Açúcar redutor e total e Sólidos Solúveis Totais.....	28
4.1.2 Umidade .....	31
4.1.3 pH.....	33
4.1.4 Acidez livre .....	34
4.2. Compostos fenólicos e atividade antioxidante .....	37
4.2.1 Polifenóis e flavonoides .....	37
4.2.2 DPPH.....	40
4.2.3 FRAP .....	41
4.3 Composição química pelo ESI (-) FT-ICR MS.....	44
4.4 Viabilidade celular e atividade quimiopreventiva.....	50
4.4.1 Viabilidade celular (MTT) .....	50
4.4.2 Indução da Quinona Redutase .....	50
4.4.3 Atividade inibitória de NF- $\kappa$ B .....	51
5. CONCLUSÃO .....	53
6 REFERÊNCIAS.....	54
7 ANEXOS.....	70

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Potes de recursos de ninho de abelha sem ferrão: A- Cerume, B- Vazio, C- Mel, D- Pólen, E- Pólen fermentado (beebread) (Fonte: AL-HATAMLEH et al., 2020). .....	3
<b>Figura 2.</b> Publicações de mel de abelhas sem ferrão de 1955 a 2020 levantadas no Brasil (gerada a partir do Banco de Dados do Scopus). ....	4
<b>Figura 3.</b> Publicações de mel de abelhas sem ferrão por país (gerada a partir do Banco de Dados do Scopus).....	5
<b>Figura 4.</b> Estrutura molecular da glicose e frutose .....	10
<b>Figura 5.</b> Método Lane-Eynon .....	10
<b>Figura 6.</b> Estruturas químicas de alguns flavonoides encontrados em mel de abelhas. .....	15
<b>Figura 7.</b> Estruturas químicas de alguns ácidos fenólicos encontrados em mel de abelhas.....	15
<b>Figura 8.</b> Estágios da carcinogênese (Fonte: Instituto Nacional de Câncer-INCA). .	16
<b>Figura 9.</b> Distribuição dos pontos de coleta dos Ninho de ASF e AM, no município de Santa Leopoldina, Espírito Santo, sudeste do Brasil (Fonte: Google Earth e Wikipedia) .....	21
<b>Figura 10.</b> Porcentagem de açúcar redutor ( <b>A</b> ) e total ( <b>B</b> ) para méis de abelhas avaliados nas estações seca e chuvosa, no Espírito Santo. Letras iguais indicam diferenças não significativas entre as médias de acordo com teste de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ). TA= <i>Tetragonisca angustula</i> ; TC= <i>Tetragona clavipes</i> ; MC= <i>Melipona capixaba</i> ; MM= <i>Melipona mondury</i> ; MQ= <i>Melipona quadrifasciata</i> ; AM= <i>Apis mellifera</i> . .....	30
<b>Figura 11.</b> Valores de sólidos solúveis totais (°Brix) para méis de abelhas avaliados nas estações seca e chuvosa, no Espírito Santo. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as médias de acordo com teste de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ). TA= <i>Tetragonisca angustula</i> ; TC= <i>Tetragona clavipes</i> ; MC= <i>Melipona capixaba</i> ; MM= <i>Melipona mondury</i> ; MQ= <i>Melipona quadrifasciata</i> ; AM= <i>Apis mellifera</i> . ....	31
<b>Figura 12.</b> Porcentagem da umidade para méis de abelhas avaliados nas estações seca e chuvosa, no Espírito Santo. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as médias de acordo com teste de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ). TA= <i>Tetragonisca angustula</i> ; TC= <i>Tetragona clavipes</i> ; MC= <i>Melipona capixaba</i> ; MM= <i>Melipona mondury</i> ; MQ= <i>Melipona quadrifasciata</i> ; AM= <i>Apis mellifera</i> . ....	33

<b>Figura 13.</b> Valores de pH para méis de abelhas avaliados nas estações seca e chuvosa, no Espírito Santo. Letras iguais indicam diferenças não significativas entre as médias de acordo com teste de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ). TA= <i>Tetragonisca angustula</i> ; TC= <i>Tetragona clavipes</i> ; MC= <i>Melipona capixaba</i> ; MM= <i>Melipona mondury</i> ; MQ= <i>Melipona quadrifasciata</i> ; AM= <i>Apis mellifera</i> . .....	34
<b>Figura 14.</b> Valores de acidez livre ( $\text{mEq kg}^{-1}$ ) para méis de abelhas avaliados nas estações seca e chuvosa, no Espírito Santo. Letras iguais indicam diferenças não significativas entre as médias de acordo com teste de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ). TA= <i>Tetragonisca angustula</i> ; TC= <i>Tetragona clavipes</i> ; MC= <i>Melipona capixaba</i> ; MM= <i>Melipona mondury</i> ; MQ= <i>Melipona quadrifasciata</i> ; AM= <i>Apis mellifera</i> . .....	36
<b>Figura 15.</b> Valores de polifenóis (A) e flavonoides (B) para méis de abelhas avaliados nas estações seca e chuvosa, no Espírito Santo. Letras iguais indicam diferenças não significativas entre as médias de acordo com teste de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ). TA= <i>Tetragonisca angustula</i> ; TC= <i>Tetragona clavipes</i> ; MC= <i>Melipona capixaba</i> ; MM= <i>Melipona mondury</i> ; MQ= <i>Melipona quadrifasciata</i> ; AM= <i>Apis mellifera</i> . .....	39
<b>Figura 16.</b> Relação dos polifenóis (A) e flavonoides (B) com DPPH dos méis de abelhas avaliados, no Espírito Santo. ....	41
<b>Figura 17.</b> Valores de DPPH para méis de abelhas avaliados nas estações seca e chuvosa, no Espírito Santo. Letras iguais indicam diferenças não significativas entre as médias de acordo com teste de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ). TA= <i>Tetragonisca angustula</i> ; TC= <i>Tetragona clavipes</i> ; MC= <i>Melipona capixaba</i> ; MM= <i>Melipona mondury</i> ; MQ= <i>Melipona quadrifasciata</i> ; AM= <i>Apis mellifera</i> . ....	41
<b>Figura 18.</b> Relação dos polifenóis (A) e flavonoides (B) com FRAP dos méis de abelhas avaliados, no Espírito Santo. ....	42
<b>Figura 19.</b> Valores de FRAP para méis de abelhas avaliados nas estações seca e chuvosa, no Espírito Santo. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as médias de acordo com teste de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ). TA= <i>Tetragonisca angustula</i> ; TC= <i>Tetragona clavipes</i> ; MC= <i>Melipona capixaba</i> ; MM= <i>Melipona mondury</i> ; MQ= <i>Melipona quadrifasciata</i> ; AM= <i>Apis mellifera</i> . ....	43
<b>Figura 20.</b> Valores de indução da quinona redutase para méis de abelhas avaliados nas estações seca e chuvosa, no Espírito Santo. ....	51
<b>Figura 21.</b> Valores de inibição do NF- $\kappa$ B para méis de abelhas avaliados nas estações seca e chuvosa, no Espírito Santo. Letras iguais indicam diferenças não significativas entre as médias de acordo com teste de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ). TA= <i>Tetragonisca</i>	

angustula; TC= *Tetragona clavipes*; MC= *Melipona capixaba*; MM= *Melipona*  
mondury; MQ= *Melipona quadrifasciata*; AM= *Apis mellifera*. .....52

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Parâmetros relacionados às características físico-químicas do mel de abelhas sem ferrão e respectivos limites de sua composição, no Espírito Santo. ....6
- Tabela 2.** Parâmetros brasileiros e internacionais relacionados às características físico-químicas do mel de abelha *Apis mellifera*.....7
- Tabela 3.** Produção de mel de abelha africanizada no Brasil de acordo com as regiões do país e municípios do Espírito Santo, em 2018. ....7
- Tabela 4.** Composição físico-química de méis de espécies de abelha sem ferrão e africanizada (N: número de amostradas utilizadas) compilada na literatura em diversos países..... 13
- Tabela 5.** Compostos fenólicos amostrados em méis de espécies de abelhas sem ferrão, amostrados com diferentes metodologias em países distintos. .... 14
- Tabela 6.** Características físico-químicas nas amostras de méis de abelhas avaliadas por espécie no Espírito Santo (TA= *Tetragonisca angustula*; TC= *Tetragona clavipes*; MC= *Melipona capixaba*; MM= *Melipona mondury*; MQ= *Melipona quadrifasciata*; AM= *Apis mellifera*).....36
- Tabela 7.** Características físico-químicas nas amostras de méis de abelhas avaliadas por espécie e estação sazonal no Espírito Santo (TA= *Tetragonisca angustula*; TC= *Tetragona clavipes*; MC= *Melipona capixaba*; MM= *Melipona mondury*; MQ= *Melipona quadrifasciata*; AM= *Apis mellifera*). ....37
- Tabela 8.** Polifenóis, flavonoides, capacidade antioxidante por captura de radical (DPPH) e redução férrica (FRAP) em amostras de mel de abelhas avaliadas no Espírito Santo (TA= *Tetragonisca angustula*; TC= *Tetragona clavipes*; MC= *Melipona capixaba*; MM= *Melipona mondury*; MQ= *Melipona quadrifasciata*; AM= *Apis mellifera*).....43
- Tabela 9.** Polifenóis, flavonoides, capacidade antioxidante por captura de radical (DPPH) e redução férrica (FRAP) em amostras de mel de espécies de abelhas avaliadas de acordo com a estação sazonal no Espírito Santo (TA= *Tetragonisca angustula*; TC= *Tetragona clavipes*; MC= *Melipona capixaba*; MM= *Melipona mondury*; MQ= *Melipona quadrifasciata*; AM= *Apis mellifera*).....43
- Tabela 10.** Compostos químicos identificados pelo ESI (-) FT-ICR MS dos méis das espécies de abelhas sem ferrão e acordo com a estação sazonal no Espírito Santo (TA= *Tetragonisca angustula*; TC= *Tetragona clavipes*; MC= *Melipona capixaba*; MM= *Melipona mondury*; MQ= *Melipona quadrifasciata*; AM= *Apis mellifera*). ....47

**Tabela 11.** Viabilidade celular, indução da Quinona Redutase e inibição do NF- $\kappa$ B em amostras de mel de espécies de abelhas avaliadas no Espírito Santo: TA= *Tetragonisca angustula*; TC= *Tetragona clavipes*; MC= *Melipona capixaba*; MM= *Melipona mondury*; MQ= *Melipona quadrifasciata*; AM= *Apis mellifera*. .....52

**Tabela 12.** Viabilidade celular, indução da Quinona Redutase e inibição do NF- $\kappa$ B em amostras de mel de espécies de abelhas avaliadas no Espírito Santo: TA= *Tetragonisca angustula*; TC= *Tetragona clavipes*; MC= *Melipona capixaba*; MM= *Melipona mondury*; MQ= *Melipona quadrifasciata*; AM= *Apis mellifera*, de acordo com as estações sazonais. ....53

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AME-ES – Associação dos Meliponicultores do Espírito Santo
- AOAC – *Association of Official Analytical Chemists*
- ASF – Abelha sem ferrão
- DMEM – *Dulbecco's modified Eagle's*
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- DP – Desvio padrão
- DPPH – *2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl*
- ELISA – *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*
- ESI-FT-ICR MS – Espectrometria de Massas com Ionização por *electrospray* e Ressonância Ciclotrônica de Íons por Transformada de Fourier (*Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry*)
- FRAP – *Ferric Reducing Antioxidant Power*
- HCL – Ácido clorídrico
- HMF – Hidroximetilfurfural
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- IDAF – Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do Espírito Santo
- INCA – Instituto Nacional do Câncer
- IR – Índice de refração
- IR<sub>50</sub> – Índice de Redução 50%
- MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
- NADPH – Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
- NF-κB – Fator de Transcrição Nuclear Kappa B
- pH – Potencial Hidrogeniônico
- QR – Quinona redutase
- SDS – Dodecil-sulfato de sódio
- SST – Sólidos solúveis totais
- UVV – Universidade Vila Velha

## RESUMO

FIOROTTI, Larissa Lima, M.Sc., Universidade Vila Velha - ES, julho de 2021. **Caracterização físico-química e potencial bioativo de mel de abelhas sem ferrão e africanizada ocorrentes no Espírito Santo.** Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Denise Coutinho Endringer.

O mel, proveniente do néctar das flores, é um importante produto das abelhas, com propriedades adoçante e terapêutica. No entanto, a composição físico-química do mel pode variar conforme uma série de fatores, que podem estar direta ou indiretamente relacionados com as abelhas e o meio em que vivem. O conhecimento sobre a composição química e a atividade biológica do mel de espécies de abelhas ocorrentes no Espírito Santo ainda é escasso. O objetivo desse estudo foi analisar as características físico-químicas e avaliar as atividades antioxidante, citotóxica e quimiopreventiva de câncer do mel de abelhas sem ferrão e com ferrão, comparando entre espécies e estações sazonais (seca e chuvosa). Os parâmetros físico-químicos avaliados foram: açúcares redutores e totais, sólidos solúveis totais, umidade, pH, acidez total, polifenóis totais, flavonoides, ESI-FT-ICR MS (Espectrometria de Massas com Ionização por *electrospray* e Ressonância Ciclotrônica de Íons por Transformada de Fourier). A atividade antioxidante foi investigada pelos métodos de DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) e FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) e os efeitos citotóxicos foram avaliados pelo método colorimétrico do MTT. Para avaliação do efeito quimiopreventivo de câncer foram empregados o ensaio de indução da quinona redutase e o ensaio de inibição de NF- $\kappa$ B (*Fator de Transcrição Nuclear Kappa B*). Os resultados obtidos apontaram que os méis avaliados possuem teores de açúcar redutor que variaram de 36,22% a 66,85%, açúcar total de 39,18% a 68,92%, sólidos solúveis totais de 68,20% a 70,63%, umidade de 22,93% a 31,10%, pH de 3,17 a 4,07 e acidez livre de 20,96 a 171,84 mEq kg<sup>-1</sup>. Os valores de méis de abelha sem ferrão para açúcares redutores demonstraram que 60% das amostras obtiveram teores inferiores ao mínimo recomendado pela legislação estadual (IDAF); para a acidez livre, 50% das amostras apresentaram valores acima do recomendado. Quanto à avaliação de sazonalidade, os açúcares redutores e totais, pH e acidez livre não apresentaram diferença significativa entre as estações, entretanto sólidos solúveis totais e umidade apresentaram valores maiores nas estações chuvosa e seca, respectivamente. Os valores de polifenóis e flavonoides variaram de 14,68 a 99,97 mgEAG.100 g<sup>-1</sup> e 4,52 a 13,27 mgQE.100g<sup>-1</sup>, respectivamente, e não apresentaram diferenças estatísticas de acordo com a estação sazonal amostrada. De acordo com o espectro de massa, identificou-se açúcares, ácidos fenólicos, flavonoides, xantona, cumarina, naftoquinona, epicatequina e fenol simples nos méis analisados. Os méis apresentaram valores de FRAP que variaram de 125,2 a 394,36  $\mu$ mol Fe II 100 g<sup>-1</sup> e de DPPH (IC<sub>50</sub>) que variaram de 16,25 a 64,4 mg.mL<sup>-1</sup>, e apenas FRAP apresentou diferença significativa para as diferentes estações amostradas. Vale destacar que os méis desse estudo não apresentaram citotoxicidade e os méis de *Melipona quadrifasciata* e *Tetragona clavipes* coletados na estação seca, apresentaram indução da quinona redutase. Neste sentido, o mel de *Melipona capixaba* coletado na estação seca apresentou inibição do NF- $\kappa$ B acima de 70%. Os dados obtidos demonstram uma variação da composição físico-química e potencial bioativo dos méis das abelhas analisadas, de modo que estas observações encontradas apontam uma necessidade da elaboração de uma legislação que considere características dos méis de acordo com as espécies, sazonalidade e ecossistemas.

**Palavras-chave:** mel, características físico-químicas, antioxidante, quimioprevenção de câncer, estação sazonal.



## ABSTRACT

FIOROTTI, Larissa Lima, M.Sc., Universidade Vila Velha - ES, July 2021. **Physicochemical characterization and bioactive potential of stingless bee and africanized honey occurring in Espírito Santo.** Advisor: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Denise Coutinho Endringer.

Honey, which comes from the nectar of flowers, is an important product of bees, with sweetening and therapeutic properties. However, the physical-chemical composition of honey can vary according to a number of factors, which may be directly or indirectly related to bees and their environment. The knowledge about the chemical composition and biological activity of honey from bee species occurring in Espírito Santo is still scarce. The aim of this study was to analyze the physicochemical characteristics and evaluate the antioxidant, cytotoxic and cancer chemopreventive activities of stingless bee honey, comparing between species and seasonal seasons (dry and rainy). The physicochemical parameters evaluated were: reducing and total sugars, total soluble solids, moisture, pH, total acidity, total polyphenols, flavonoids, ESI-FT-ICR MS (*Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry*). Antioxidant activity was investigated by DPPH and FRAP methods and cytotoxic effects were evaluated by MTT (*Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio*) colorimetric method. To evaluate the cancer chemopreventive effect, the quinone reductase induction assay and the NF- $\kappa$ B (*Fator de Transcrição Nuclear Kappa B*) inhibition assay were employed. The results obtained indicated that the honeys evaluated have reducing sugar contents that ranged from 36.22% to 66.85%, total sugar from 39.18% to 68.92%, total soluble solids from 68.20% to 70.63%, moisture from 22.93% to 31.10%, pH from 3.17 to 4.07 and free acidity from 20.96 to 171.84 mEq kg<sup>-1</sup>. The values of reducing sugars showed that 66% of the samples had levels lower than the minimum recommended by the state legislation (IDAF); for the free acidity, 50% of the samples had values above the recommended. As for the evaluation of seasonality, reducing and total sugars, pH and free acidity did not show significant differences between the seasons; however, total soluble solids and humidity showed higher values in the rainy and dry seasons, respectively. The values of polyphenols and flavonoids ranged from 14.68 to 99.97 mgEAG.100 g<sup>-1</sup> and 4.52 to 13.27 mgQE.100g<sup>-1</sup>, respectively, and showed no statistical differences according to the seasonal sampling. According to the mass spectrum, sugars, phenolic acids, flavonoids, xanthone, coumarins, naphthoquinone and epicatechins were identified in the honeys analyzed. The honeys presented values of FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) that varied from 125.2 to 394.36  $\mu$ mol Fe II 100 g<sup>-1</sup> and DPPH (*2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl*) that varied from 16.25 to 64.4 mg/mL, and only FRAP presented significant difference for the different stations sampled. It is worth noting that the honeys in this study showed no cytotoxicity and the honeys from *Melipona quadrifasciata* and *Tetragona clavipes* collected in the dry season, showed induction of quinone reductase. In this sense, the honey from *Melipona capixaba* collected in the dry season showed inhibition of NF- $\kappa$ B above 70%. The data obtained show a variation in physicochemical composition and bioactive potential of the honeys of the bees analyzed, so that these observations indicate a need for the development of a legislation that considers characteristics of honeys according to species, seasonality and ecosystems.

**Keywords:** honey, physicochemical characteristics, antioxidant, cancer chemoprevention, seasonal.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Abelhas e sua importância econômica e ecológica

Os produtos produzidos pelas abelhas, principalmente, mel, própolis e pólen, têm importância ecológica, sócio econômica (pelo valor alimentício) e terapêutica, sendo um grupo de animais de interesse comercial e de pesquisa (JAFFÉ *et al.*, 2015). Além disso, o papel das abelhas, como agentes polinizadores, é fundamental para a manutenção do equilíbrio dos ecossistemas (VILLAS-BÔAS, 2012; BRASIL, 2017; AME, 2019).

Dentre os produtos das abelhas, o mel é classificado como um alimento funcional rico em carboidratos (ÁVILA *et al.*, 2018) e uma fonte promissora de compostos ativos, por possuir diversas propriedades terapêuticas (RAO *et al.*, 2016). Os demais produtos das abelhas como o pólen, coletado nas flores é rico em proteínas, vitaminas e flavonoides (TOMÁS-LORENTE *et al.*, 1992) e a própolis, produzida a partir de resinas vegetais coletadas pelas abelhas nas plantas, é utilizada nos ninhos como proteção (KUSTIAWAN *et al.*, 2014). Além disso, a própolis tem sido utilizada em tratamentos médicos e, prevenção de doenças principalmente por suas atividades antibacterianas, anti-inflamatórias, antioxidantes e anticâncer (RAO *et al.*, 2016).

Os produtos gerados pelas abelhas são provenientes de dois grupos, ambos pertencentes à família Apidae (Hymenoptera-Insecta), o grupo das abelhas sem ferrão abelhas (ASF) que compreende as tribos Meliponini e Trigonini e, o grupo das abelhas africanizadas que compreende uma única espécie da tribo Apini, a *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (NOGUEIRA-NETO, 1997; SILVEIRA *et al.* 2002). Essas abelhas são eussociais, possuindo divisão de trabalho entre rainha, operárias e machos (VILLAS-BÔAS, 2012). A prática da criação das ASF para aquisição de seus produtos é chamada de Meliponicultura, diferente da criação racional das abelhas africanizadas, que é designada como Apicultura, esta atividade com maior produção e comercialização em vários países (NOGUEIRA-NETO, 1997; VIT *et al.*, 2013).

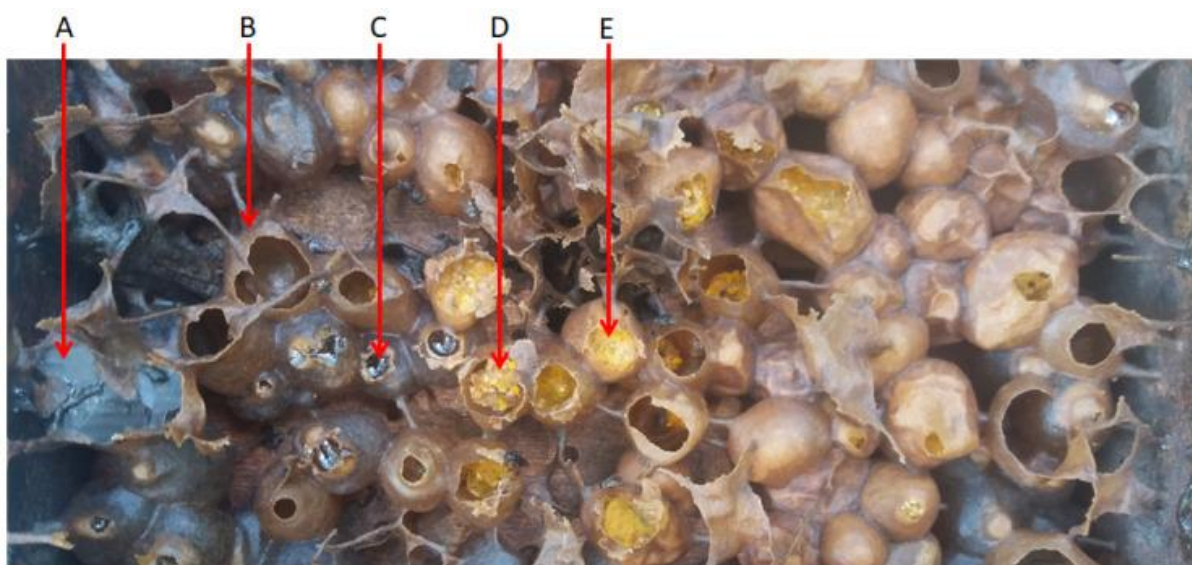
## 1.2 Abelhas sem ferrão

As ASF compreendem mais de 500 espécies em todo o mundo, sendo que mais de 200 espécies estão distribuídas por todo o Brasil e 39 aparecem no Estado do Espírito Santo (LAVINAS *et al.*, 2018; BRASIL, 2019). Essas abelhas são encontradas principalmente em regiões tropicais e subtropicais, na América do Sul, América Central, África, sudeste da Ásia e no norte da Oceania, com destaque para a inserção desse grupo de organismos nas culturas dos povos indígenas e maias (VIT *et al.*, 2012; HRNCIR *et al.*, 2016). Como exemplo, no Brasil, os indígenas coletavam o mel nos locais onde eram identificadas as colônias na floresta e portanto, consumiam esse mel (CAMARGO *et al.*, 2017). Esses insetos possuem tamanhos variados e são de fácil manuseio por não terem ferrão (NOGUEIRA-NETO, 1997).

No Brasil, dentre as ASF, *Melipona quadrifasciata* é encontrada nas regiões sudeste e sul e nos estados da Bahia e Mato Grosso do Sul; *Melipona mondury* nas regiões sudeste e sul e no estado da Bahia; *Tetragona clavipes* nas regiões sudeste e sul e nos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Bahia, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Pará e Piauí; *Tetragonisca angustula* nas regiões sudeste e sul e nos estados do Amapá, Amazonas, Bahia, Ceará, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Paraíba, Pará, Pernambuco e Roraima (MOURE, 2013). A espécie *Melipona capixaba* é encontrada apenas na Mata Atlântica do Espírito Santo, principalmente em locais com altitude entre 700 m e 1.000 m (RESENDE *et al.*, 2008). Neste sentido, sabe-se que a distância média de forrageamento de 500 m é observada para espécies de abelhas menores e 700 m para abelhas grandes (CELLA *et al.*, 2017). O gênero *Melipona* faz distâncias máximas de voo estabelecidas em 1.200m e 2.700m (KERR, 1987; ARAÚJO *et al.*, 2004; KUHN-NETO *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2014; CORREIA *et al.*, 2017). *Tetragonisca angustula* faz distâncias máximas de voo aproximadamente em 623 a 853m (VAN NIEUWSTADT; RUANO IRAHETA, 1996).

A distribuição local das abelhas é influenciada por diversos fatores bióticos e abióticos e, conseqüentemente, estas variáveis também afetam os produtos das abelhas (SILVEIRA *et al.*, 2002). O mel produzido pelas ASF são armazenados em potes, diferente do mel produzido pela *Apis mellifera* que é armazenado em favos (OLIVEIRA *et al.*, 2017). Normalmente, os potes de alimento das ASF tem uma forma oval e apresentam diferentes tamanhos de acordo a espécie, onde o mel e pólen são

armazenados separadamente. Portanto, uma colônia de abelhas sem ferrão contém os potes de potes de mel e potes de pólen (**Figura 1**) (VILLAS-BÔAS, 2012). Os potes das ASF são construídos com cerume, material produzido por cera branca com a própolis e a cor pode variar de amarelo a marrom, de acordo com a quantidade da própolis utilizada na mistura. No caso da abelha *Apis mellifera* os favos são feitos apenas de cera, que é produzida pela secreção das abelhas pelas glândulas existentes em seu abdome (VILLAS-BÔAS, 2012).



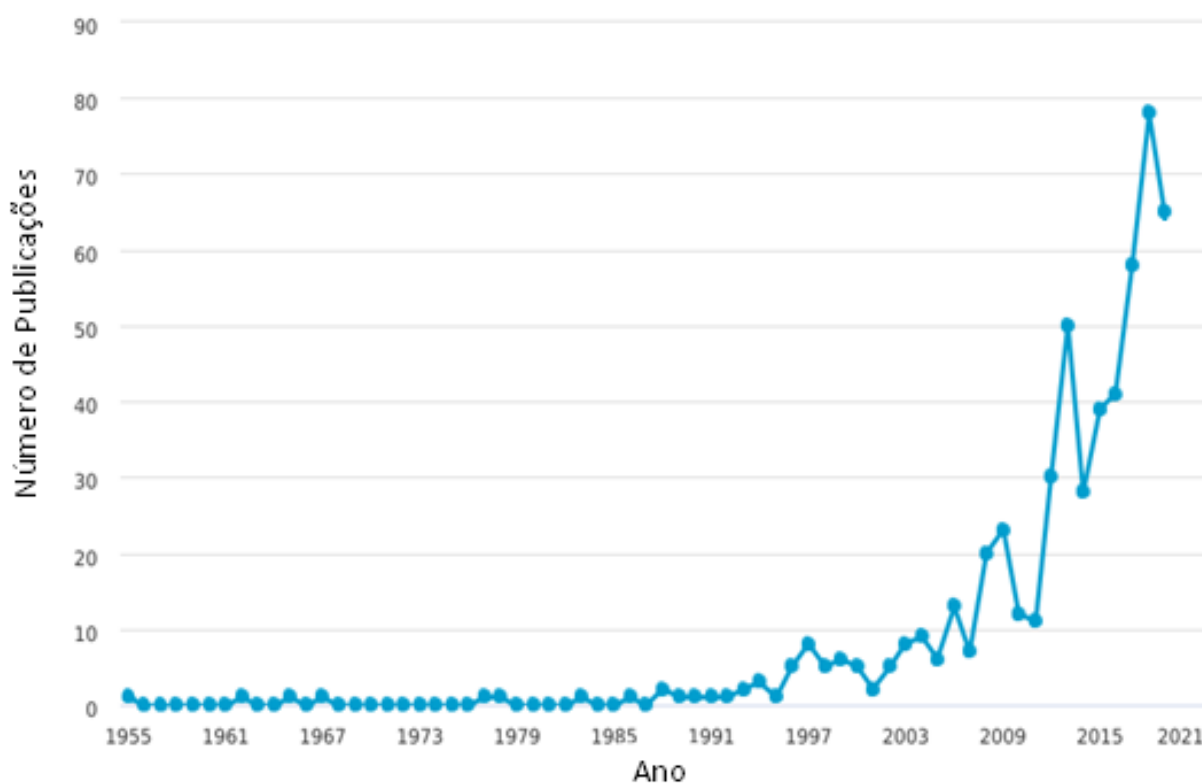
**Figura 1.** Potes de recursos de ninho de abelha sem ferrão: A- Cerume, B- Vazio, C- Mel, D- Pólen, E- Pólen fermentado (*beebread*) (Fonte: AL-HATAMLEH *et al.*, 2020).

Apesar da importância ecológica e econômica para a sociedade, as abelhas estão desaparecendo devido às alterações ambientais, como desmatamento e uso indiscriminado de agrotóxicos (BROWN; OLIVEIRA, 2014). Dentre as ASF, destaca-se a espécie *Melipona capixaba* Moure & Camargo, 1994, que está ameaçada de extinção, classificada nas categorias de risco nacional “Em Perigo (EN)” (ICMBIO, 2018) e estadual (Espírito Santo) “Vulnerável (VU)” (INMA, 2019). Esta espécie é nativa do Espírito Santo e há apenas um artigo publicado em 2012 (LAGE *et al.*, 2012) com poucas informações sobre as características físico químicas do mel desta espécie, sem avaliar suas propriedades bioativas.

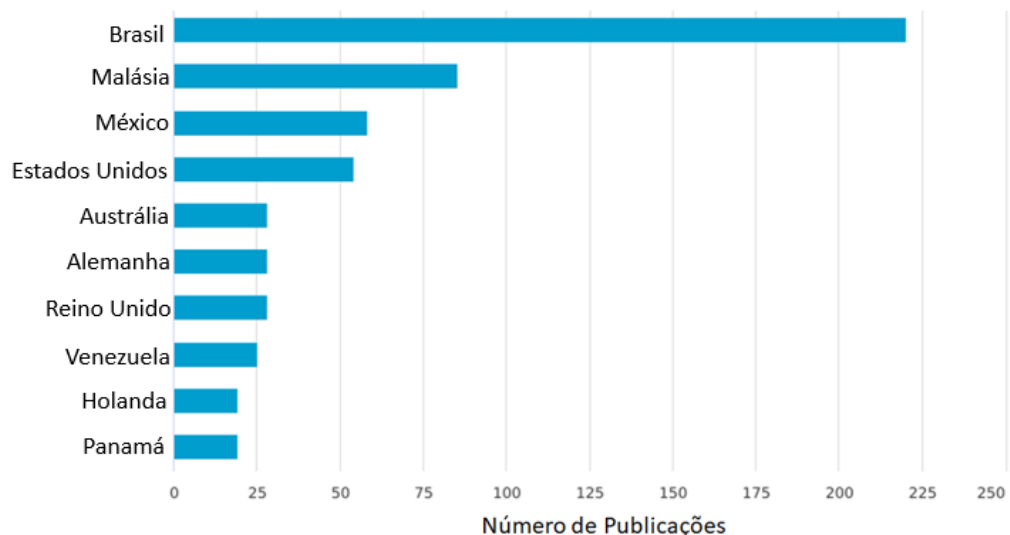
Nos últimos anos, houve um aumento do interesse de comercialização e consumo do mel de ASF (CHUTTONG *et al.*, 2016). As ASF produzem menos mel se comparado com a *Apis mellifera*, produzindo e armazenando 1-5 kg de mel por ano

(CHUTTONG *et al.*, 2016; ÁVILA *et al.*, 2018). Além disso, os méis de ASF são menos comercializados e possuem um custo mais elevado (ÁVILA *et al.*, 2018).

No levantamento bibliográfico acerca de estudos com mel de ASF no mundo (com restrição temporal de 1955 a 2020 e estratégia de busca: abelhas sem ferrão e mel/*stingless bee and honey*), verificou-se 558 estudos, sendo a primeira publicação com mel de abelha sem ferrão observada em 1955, 78 publicações observadas em 2019 e 65 em 2020 (**Figura 2**). De acordo com esse resultado, de 1955 a 2003 houve poucas publicações sobre essa temática, entretanto observa-se que os últimos nove anos (2012 a 2020) concentraram cerca de 70% das publicações, indicando o interesse em estudos com méis de ASF. O Brasil é considerado o país que mais publica estudos relacionados a mel de ASF, seguido da Malásia, com 85 publicações (**Figura 3**).



**Figura 2.** Publicações de mel de abelhas sem ferrão de 1955 a 2020 levantadas no Brasil (gerada a partir do Banco de Dados do *Scopus*).



**Figura 3.** Publicações de mel de abelhas sem ferrão por país (gerada a partir do Banco de Dados do *Scopus*).

As ASF collhem o néctar com a língua onde permanece até chegar à colmeia e entregue às abelhas operárias que armazenam em potes de mel. Para formação do mel, ocorre modificação no néctar, onde há conversão enzimática da sacarose, pela enzima invertase, em glicose e frutose. Posteriormente, ocorre a conversão da glicose em ácido glucônico, pela da enzima glicose-oxidase, no qual essa enzima reduz a sua atividade no mel, quando o pH está abaixo de 5,5. Ocorre também a desidratação do néctar, onde a água sofre evaporação (KERR *et al.*, 1996; NOGUEIRA-NETO, 1997; BERGAMO *et al.*, 2019).

O mel é armazenado nos potes para o amadurecimento, produzindo um mel com textura mais líquida, além de cor e sabor diferentes (BILUCA *et al.*, 2016; ÁVILA *et al.*, 2018). O mel das ASF possui menos açúcar e maior teor de umidade em relação ao da *Apis mellifera*, o que pode aumentar a fermentação (BASTOS; SAMPAIO, 2013). As características físico-químicas e sensoriais de cada mel variam de acordo com as espécies, a localização das plantas e as condições ambientais que as abelhas vivem (LIU *et al.*, 2013). O mel de ASF se armazena em potes produzidos de cerume (cera e própolis), portanto tem maior contato com a própolis, podendo apresentar maior atividade antimicrobiana e propriedades biológicas em comparação ao mel da *Apis mellifera* (ÁVILA *et al.*, 2018). Diante desse contexto, o mel de ASF exerce capacidade antioxidante, quimiopreventiva e antimicrobiana, podendo ser utilizado no tratamento de doenças cardiovasculares, câncer, catarata e doenças inflamatórias (LIU *et al.*, 2013).

Alguns estados brasileiros estão desenvolvendo parâmetros de qualidade para comercializar de forma regular o mel das ASF. Em abril de 2019, foi aprovado no Espírito Santo o regulamento para méis de ASF pelo IDAF (Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do Espírito Santo) (**Tabela 1**) (BRASIL, 2019). No entanto, a nível nacional não há uma regulamentação específica para méis de ASF, apenas para as abelhas *Apis mellifera* e essa falta de informação quanto à característica físico-química pode levar à alteração e falsificação do mel (ZULKHAIRI-AMIN *et al.*, 2018).

**Tabela 1.** Parâmetros relacionados às características físico-químicas do mel de abelhas sem ferrão e respectivos limites de sua composição, no Espírito Santo.

<b>Características Físico-químicas</b>	<b>Limites</b>
Açúcares redutores	Mínimo 60g/100g
Umidade	Máximo 40g/100g
pH	Amplitude 2,9 a 4,5
Acidez livre	Máximo 50 mEq/Kg

Fonte: IDAF (2019)

### 1.3 Abelha africanizada

No Brasil, as abelhas *Apis mellifera* provenientes da Europa foram introduzidas pelos padres jesuítas no Século XIX. Posteriormente, em 1956, outra subespécie de abelha *Apis mellifera*, proveniente da África, foi trazida para o Brasil. Dessa forma, as subespécies de abelhas *Apis mellifera* se cruzaram e deram origem à abelha amplamente conhecida como africanizada, com grande capacidade de reprodução e alta produção de mel (SABBAG; NICODEMO, 2011). As abelhas africanizadas ocorrem em diversos ecossistemas como áreas florestais, formações vegetativas abertas e áreas urbanas (OLIVEIRA; CUNHA, 2005). As abelhas *Apis mellifera* ocorrem em todos os estados do Brasil (SILVEIRA *et al.*, 2002) e podem ter um raio de voo de até 10 km de distância de suas colônias, contudo, restringem a coleta de alimentos em um raio de 1700 m (ROUBIK, 1989; WINSTON, 2003).

As abelhas *Apis mellifera* produzem em média 20 kg de mel por colmeia, 4 a 5 vezes mais que as ASF (CHUTTONG *et al.*, 2016), e cujo mel possui menor teor de umidade e maior teor de açúcar comparado ao mel de abelha sem ferrão (EVANGELISTA-RODRIGUES *et al.*, 2005; DE ALMEIDA ANACLETO *et al.*, 2009). Para uso adequado em sua comercialização, o mel de *Apis mellifera* segue a

legislação nacional, conforme o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel na Instrução Normativa Nº11 de 20 de outubro de 2000 do Ministério da Agricultura e Abastecimento (BRASIL, 2000), e legislação internacional (CODEX ALIMENTARIUS, 2001) (**Tabela 2**).

**Tabela 2.** Parâmetros brasileiros e internacionais relacionados às características físico-químicas do mel de abelha *Apis mellifera*.

<b>Características Físico-Químicas</b>	<b>Legislação Brasileira</b>	<b>Legislação Internacional</b>
Açúcar redutor (%)	Mínimo 65	Mínimo 60
Umidade (%)	Máximo 20	Máximo 20
Acidez livre	Máximo 50	Máximo 50

Fonte: BRASIL, 2000; CODEX ALIMENTARIUS, 2001

De acordo com o IBGE (2018), no Brasil, a região sul é a maior produtora de mel da *Apis mellifera*, seguida da região nordeste e sudeste. Na região sudeste, no estado do Espírito Santo, que representa o total de 0,5% da região Sudeste, o município de Santa Teresa produziu a maior da quantidade de mel quando comparado aos demais municípios do estado como Santa Leopoldina, Santa Maria de Jetibá, Vila Velha e Vitória (**Tabela 3**). Importante destacar que o mel comercializado por meio da Apicultura pode auxiliar na geração ou complementação de renda dos produtores e suas famílias, podendo contribuir para a preservação dessas abelhas e, conseqüentemente da flora e fauna existente (SILVIA, 2015).

**Tabela 3.** Produção de mel de abelha africanizada no Brasil de acordo com as regiões do país e municípios do Espírito Santo, em 2018.

<b>Localidades</b>	<b>Total de mel de abelha (Tonelada)</b>
Brasil	42346
Região Norte	890
Região Nordeste	14213
Região Sudeste	9239
Região Sul	16475
Região Centro-Oeste	1527
ES-Santa Leopoldina	2
ES-Santa Maria de Jetibá	12
ES-Santa Teresa	24
ES-Vila Velha	10
ES-Vitória	-

Fonte: IBGE, 2018



## 1.4 Mel

O mel é classificado como floral quando é obtido do néctar de flores (BRASIL, 2000). O mel floral pode ser dividido em dois grupos, mel monofloral que é produzido a partir do néctar de uma única espécie de planta ou com maior concentração de pólen no mel de uma espécie de planta, ou heterofloral que é produzido a partir do néctar de diversas espécies de plantas, sendo identificado como mel silvestre (BRASIL, 2000). O sabor, aroma e composição química, podem ser modificados de acordo com composição florística de cada região, condições ambientais, climáticas e espécies de abelhas (COSTA *et al.*, 2018).

O mel é uma importante substância altamente nutritiva, considerada líquida e de sabor adocicado (NAILA *et al.*, 2018). Este produto pode incorporar diversos componentes, como grãos de pólen, cera, pequenas partes do corpo das abelhas e muitas outras substâncias com propriedades biológicas (SANT'ANA *et al.*, 2012).

Dentre esses componentes, o mel contém aproximadamente 70 a 80% de carboidratos e 10 a 20% de água e outros componentes, incluindo compostos fenólicos, flavonoides, proteínas, minerais, vitaminas e ácidos orgânicos (OUCHEMOUKH *et al.*, 2007; NORDIN *et al.*, 2018). Os flavonoides têm papel importante na atividade antioxidante do mel, removendo os radicais livres (ALVAREZ-SUAREZ *et al.*, 2012).

O mel também é considerado uma importante fonte de calorias, uma vez que 100 g de mel fornecem aproximadamente 300 kcal (CRISTINA *et al.*, 2004). Em relação aos carboidratos, a frutose e glicose estão presentes em maior quantidade e, em menor quantidade estão as proteínas (CIANCIOSI *et al.*, 2018). Entre os minerais presentes no mel, encontra-se potássio, cálcio, cobre, ferro, magnésio, manganês, fósforo, sódio, zinco, selênio e, a abundância desses minerais no mel pode variar de acordo com a origem floral e região geográfica (BOGDANOV *et al.*, 2008). O mel também contém pequenas quantidades de vitaminas, como ácido ascórbico (C), tiamina (B1), riboflavina (B2), niacina (B3), ácido pantotênico (B5) e piridoxina (B6) (CIANCIOSI *et al.*, 2018).

Diante disso, o mel possui um alto valor medicinal, desde os tempos antigos, onde os egípcios, chineses, gregos e romanos utilizavam o mel como tratamento medicinal para curar doenças cardiovasculares, gastrointestinais e feridas (RAO *et al.*,

2016), além do uso como adoçante natural e devido às suas funcionalidades nutricionais (GUERRINI *et al.*, 2009).

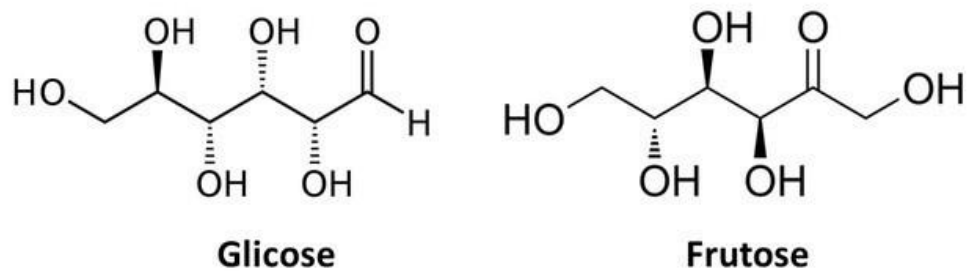
#### 1.4.1 Características físico-químicas do mel

De acordo com a revisão bibliográfica, a **Tabela 4** contém os dados físico-químicos referentes aos méis de diferentes espécies de abelhas sem ferrão compiladas.

##### **Açúcares**

O mel é um alimento com grandes teores de açúcares, produzido pelas abelhas a partir do néctar, que é transformado pela ação de enzimas. A composição do açúcar depende principalmente da natureza botânica do mel, origem geográfica e clima (ESCUREDO *et al.*, 2014). Dentre os açúcares no mel, destacam-se os monossacarídeos (glicose e frutose), os quais são açúcares redutores, formados a partir da hidrólise da sacarose pela ação da enzima invertase, secretada pelas abelhas e sua concentração depende da fonte do néctar. Os principais dissacarídeos encontrados no mel são a maltose e a sacarose (LAZAREVIĆ *et al.*, 2017). Importante ressaltar que uma alta concentração de sacarose pode significar uma amostragem prematura de mel (mel não maduro), pois a sacarose pode não ter sido totalmente convertida em glicose e frutose pela ação da enzima invertase (ÖZCAN *et al.*, 2006).

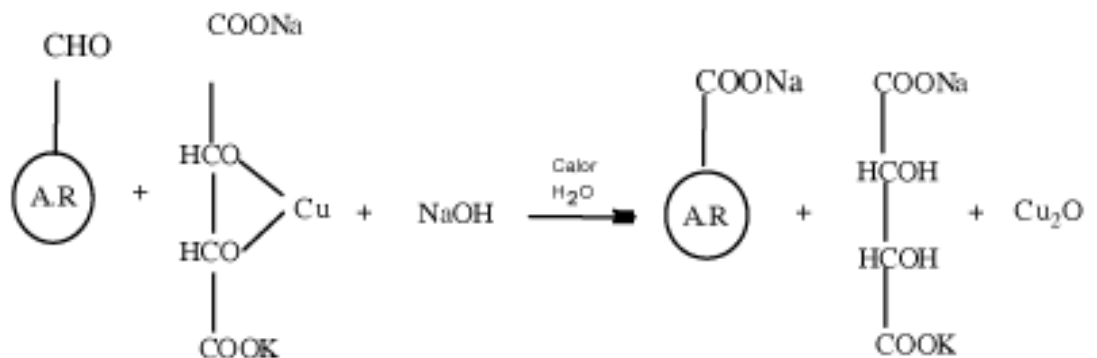
O teor de açúcar redutor dos méis de abelhas sem ferrão pode variar de 13 a 78% (DUARTE *et al.*, 2012; CHUTTONG *et al.*, 2016) (**Tabela 4**). Geralmente, o mel com maior teor de glicose (logP -2,6) tende a cristalizar mais rápido do que a frutose, devido à maior solubilidade em água da frutose (logP -2,8) (BABARINDE *et al.*, 2011). Portanto, de acordo com Nayik *et al.* (2019), a cristalização do mel depende da concentração de açúcar, além do teor de umidade e razão glicose e umidade.



**Figura 4.** Estrutura molecular da glicose e frutose

A glicose e frutose são monossacarídeos e são açúcares redutores porque têm grupos carbonila e cetona livres e podem ser oxidados na presença de um agente oxidante em uma solução alcalina. Os dissacarídeos que não apresentam essa propriedade sem serem hidrolisados por ligações glicosídicas são chamados de açúcares não redutores. Os açúcares redutores podem ser determinados principalmente na redução de íons de cobre em soluções alcalinas (solução de Fehling) (SILVA et al., 2003).

Neste método, o cobre no reagente de Fehling (uma solução alcalina de sulfato de cobre em tampão tartarato de sódio e potássio) é reduzido a óxido cuproso (Figura 5). A solução de Fehling é primeiro padronizada com uma solução de glicose a 1%. Depois disso, o fator de conversão é calculado para ser usado como um parâmetro na análise da amostra relevante (SILVA et al., 2003).



**Figura 5.** Método Lane-Eynon

### **Sólidos solúveis totais**

Os níveis de açúcares no mel estão relacionados com os valores de Sólidos Solúveis Totais (SST) °Brix (grau Brix), medido pelo refratômetro, tornando-o indicador de adulteração (KAMAL *et al.*, 2019), no qual, altos valores de açúcar aumentam os valores de SST (BILUCA *et al.*, 2016).

É um método físico para medir o conteúdo de sólidos solúveis em uma amostra. É baseado em um sistema de classificação de equipamentos e é particularmente adequado para a indústria açucareira, mais precisamente, normalmente é usado para analisar açúcares em soluções (SILVA *et al.*, 2003).

Geralmente, os méis de ASF possuem menores valores de SST em comparação aos méis produzidos por *Apis mellifera* (KAMAL *et al.*, 2019), pois estão diretamente relacionados ao elevado conteúdo de água encontrado em seus méis e, conseqüentemente, menor teor de açúcar (SOUSA *et al.*, 2016). Os valores de SST podem variar de 62,2 a 74,7 °Brix (LAGE *et al.*, 2012; SOUSA *et al.*, 2016) (**Tabela 4**).

### **Umidade**

O conteúdo de umidade pode influenciar nas propriedades físicas do mel, como viscosidade, sabor, conservação e cristalização (ESCUREDO *et al.*, 2013). A Legislação atual sobre mel (Nota Normativa nº 11, Em 2000, o MAPA) 5 estabeleceu um método oficial para análise de parâmetros físicos e químicos do Codex Alimentarius. O teor de umidade do mel é medido pelo método de refração Chataway, que é analisado pelo índice de refração. Esta metodologia analisa indiretamente o teor de umidade (CANO; FELSNER; BRUNS, 2007).

No mel, a umidade pode ser alterada pelo amadurecimento, condições climáticas, composição do néctar e, após a retirada do mel (CHIRIFE *et al.*, 2006). Neste sentido, a temperatura, umidade da origem geográfica durante a produção do mel e manipulação dos meliponicultores na época da colheita podem influenciar nessas variações do teor de umidade do mel (ZAREI *et al.*, 2019). Em uma estação chuvosa, por exemplo, o mel pode sofrer um processo de fermentação maior se comparado com a estação seca (KARABAGIAS *et al.*, 2014).

O teor de umidade dos méis de ASF pode variar de 23,3% a 41% (SILVA *et al.*, 2013; CHUTTONG *et al.*, 2016) (**Tabela 4**). O mel com alta umidade tem maior probabilidade de fermentar e quando excessiva pode dificultar seu armazenamento e sua preservação, reduzindo a vida útil do mesmo e alterando seu sabor (KAVANAGH *et al.*, 2019). Importante ressaltar que comercialmente, as indústrias utilizam o teor de umidade para avaliar a estabilidade de microrganismos do mel (KAVANAGH *et al.*, 2019).

### ***pH e acidez***

O pH é importante para possível crescimento microbiano, pois a maioria das bactérias crescem em um ambiente neutro e levemente alcalino, enquanto leveduras e bolores crescem em um ambiente ácido (pH= 4,0-4,5) e não proliferam em meio alcalino (SILVA *et al.*, 2009). O pH dos méis de ASF podem variar de 3,1 a 6,38 (**Tabela 4**) (BILUCA *et al.*, 2016; DE SOUSA *et al.*, 2016).

A acidez do mel tem relação com os ácidos orgânicos presentes, que podem ser provenientes do néctar e da fermentação de alguns açúcares por leveduras, ocorrendo a formação de ácido acético, enquanto a produção do ácido glucônico é devido a conversão da glicose pela ação da enzima glicose oxidase (BERGAMO *et al.*, 2019). Esse valor de acidez nos méis pode ser influenciado pela fonte floral e espécie de abelha (DE SOUSA *et al.*, 2016). A acidez livre do mel de ASF é mais elevada quando comparada com o mel da *Apis mellifera*, o que justifica o sabor mais ácido desse tipo de mel (VIT *et al.*, 2004), podendo variar de 16,2 a 136,8 mEq kg<sup>-1</sup> (BILUCA *et al.*, 2016; KEK *et al.*, 2017) (**Tabela 4**).

**Tabela 4.** Composição físico-química de méis de espécies de abelha sem ferrão e africanizada (N: número de amostras utilizadas) compilada na literatura em diversos países.

Nome científico	N	Açúcar redutor (%) (m/m)	Açúcar total (%) (m/m)	Brix (%)	Umidade (%) (m/m)	PH	Acidez livre (mEq kg <sup>-1</sup> )	País	Referência
<i>Apis mellifera</i>	NI	4,43	NI	NI	NI	70,91	19,79	Brasil	DUARTE <i>et al.</i> , 2012
<i>Heterotrigona itama</i>	1	NI	NI	NI	28,87	3,27	NI	Malásia	FADZELLY <i>et al.</i> , 2017
	3	NI	NI	NI	33,24	3,26	136,8	Malásia	KEK <i>et al.</i> , 2017
<i>Homotrigona fimbriata</i>	1	22	NI	NI	41	3,3	NI	Tailândia	CHUTTONG <i>et al.</i> , 2016
<i>Lepidotrigona doipaensis</i>	2	29 e 18,8	29 e 19	NI	31 e 32	3,6 e 3,4	NI	Tailândia	CHUTTONG <i>et al.</i> , 2016
<i>Lepidotrigona terminata</i>	1	13	66	NI	30	3,5	NI	Tailândia	CHUTTONG <i>et al.</i> , 2016
<i>Melipona</i> spp	NI	34,83-78,95	NI	NI	NI	NI	NI	Brasil	DUARTE <i>et al.</i> , 2012
<i>Melipona asilvai</i>	11	66,00-76,20	67,72-84,99	NI	26,80-32,00	3,27-4,38	21,50-80,50	Brasil	DE ALMEIDA SOUZA <i>et al.</i> , 2004
<i>Melipona bicolor</i>	5	60,14	NI	NI	28,8-39,1	3,67-3,88	63,8-139	Brasil	BILUCA <i>et al.</i> , 2016
	4	NI	NI	NI	36,18	NI	NI	Brasil	NASCIMENTO <i>et al.</i> , 2015
<i>Melipona beecheii</i>	1	53,1	61,4	NI	22,8	NI	NI	México	RAMÓN-SIERRA <i>et al.</i> , 2015
	1	NI	NI	NI	28,62	3,2	41,5	Cuba	ALVAREZ-SUAREZ <i>et al.</i> , 2018
<i>Melipona capixaba</i>	9	NI	NI	62,20-72,8	25,84-36,04	3,30-3,80	25,0-107,0	Brasil	LAGE <i>et al.</i> , 2012
<i>Melipona marginata</i>	6	NI	NI	NI	28,3-38,2	3,37-4,01	42,4-120	Brasil	BILUCA <i>et al.</i> , 2016
<i>Melipona mondury</i>	2	65,8-69,1	NI	NI	29,6 e 29,9	3,81-6,56	16,2 e 106	Brasil	BILUCA <i>et al.</i> , 2016
	11	NI	NI	63,0-71,0	NI	3,17-5,67	2,07-122,50	Brasil	LAGE <i>et al.</i> , 2012
	12	54,9-69,6	NI	NI	27,5-43,5	3,33-4,26	21,4-106	Brasil	BILUCA <i>et al.</i> , 2016
<i>Melipona quadriasciata</i>	NI	NI	70,03	NI	28,50	3,62	NI	Brasil	DUARTE <i>et al.</i> , 2012
	1	60,06	NI	NI	30	3,74	NI	Brasil	DUARTE <i>et al.</i> , 2012
<i>Melipona seminigra merrillae</i>	5	43,22-74,08	NI	NI	23,38-33,12	3,14-4,28	44,57-49,97	Brasil	SILVA <i>et al.</i> , 2013
<i>Melipona subnida</i>	12	NI	NI	71,1-74,7	23,9-28,9	3,1-5,3	NI	Brasil	DE SOUSA <i>et al.</i> , 2016
<i>Tetragonisca angustula</i>	2	57,3-70,2	NI	NI	23,7-23,8	4,24-5,31	31,4-50,9	Brasil	BILUCA <i>et al.</i> , 2016
	28	43	NI	NI	NI	3,72	NI	Argentina	PUCCIARELLI <i>et al.</i> , 2014
<i>Tetragona clavipes</i>	1	48,41	NI	73,4	25,2	4,52	91,2	Brasil	BILUCA <i>et al.</i> , 2016
<i>Trigona</i> spp	1	63,7	70,6	NI	25	NI	NI	México	RAMÓN-SIERRA <i>et al.</i> , 2015

NI= não informado

### 1.4.2 Compostos fenólicos em mel de abelha sem ferrão

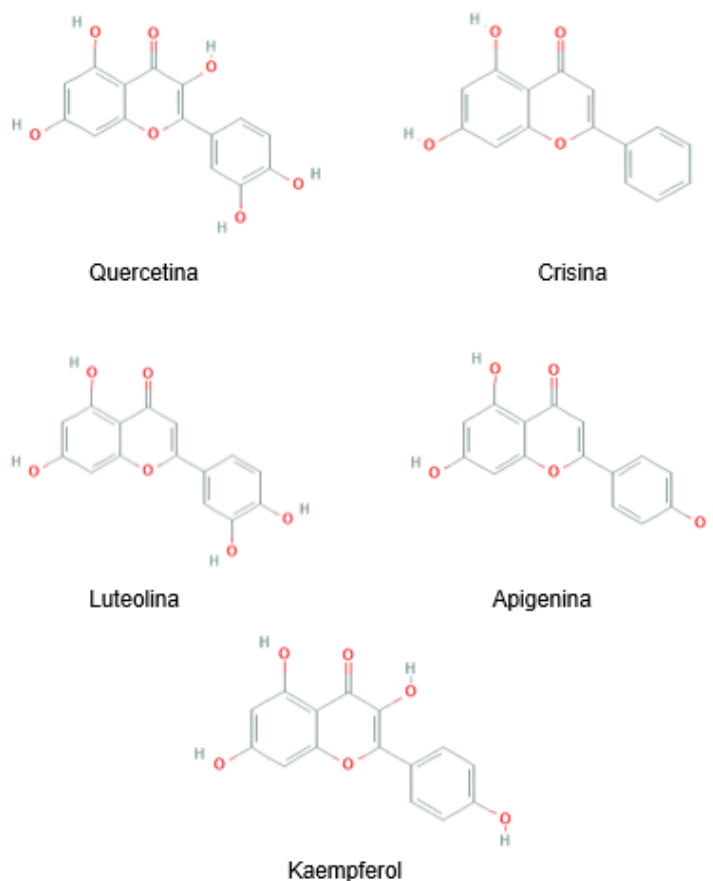
Os polifenóis são compostos químicos que podem ser divididos em flavonoides (flavonóis, flavonas, flavanonas, antocianidinas, antocianinas e isoflavonas) e não flavonoides (ácidos fenólicos, taninos, quinonas entre outros). Os polifenóis são produtos do metabolismo secundário da planta, enquanto os produtos dos metabolismos primários são por exemplo aminoácidos, lipídeos e carboidratos simples (CIANCIOSI *et al.*, 2018).

Na **Tabela 5**, observa-se a presença de compostos fenólicos em méis de diversas espécies de abelhas no Brasil. Com os resultados desses estudos, pode-se verificar que existe uma grande variação na composição de compostos fenólicos dos méis de abelhas sem ferrão do Brasil; portanto, é importante avaliar cada mel como um produto individual. As estruturas químicas de alguns compostos fenólicos presentes em mel são mostradas na **Figura 6 e 7**.

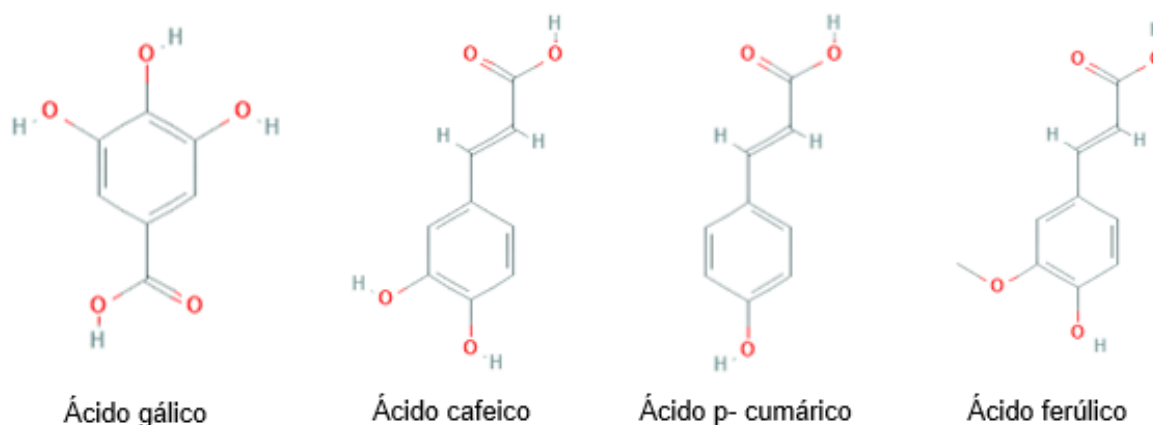
**Tabela 5.** Compostos fenólicos amostrados em méis de espécies de abelhas sem ferrão, amostrados com diferentes metodologias em países distintos.

Táxon	Composto fenólico	Metodologia	Local	Referência
Meliponinae	Ácido p-cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido 4-amino-benzoico, ácido clorogênico, ácido vanílico, taxifolina, narigenina, quercetina	HPLC	Brasil	BILUCA <i>et al.</i> , 2020
<i>Melipona bicolor</i>	Ácido p-cumárico, ácido ferúlico, ácido clorogênico, taxifonila, apigenina, ácido salicílico, naringenina, crisina	LC-ESI-MS/MS	Brasil	BRAGHINI <i>et al.</i> , 2019
<i>Melipona marginata</i>	Ácido benzóico, ácido cafeico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, ácido sinápico, ácido cafeico, miricetina, apigenina, Kaempferol	HPLC-UV-ESI-MS	Brasil	BORSATO <i>et al.</i> , 2014
<i>Melipona seminigra merrillae</i>	Ácido gálico, ácido 3,4-dihidroxibenzóico, ácido vanílico, ácido salicílico, ácido siríngico, cumárico, ácido cinâmico, taxifolina, naringenina, luteolina	HPLC/UV	Brasil	SILVA <i>et al.</i> , 2013
<i>Melipona subnitida Ducke</i> , <i>Melipona scutellaris Latrelle</i>	Ácido ferúlico, ácido elágico, ácido p-cumárico, ácido 3,4 – hidroxibenzoico, miricetina, quercetina, catequina, kaempferol, naringegina, crisina	HPLC/UV	Brasil	DE SOUSA <i>et al.</i> , 2016
<i>Melipona bicolor</i> , <i>Melipona quadrifasciata</i> , <i>Melipona marginata</i> ,	Ácido p-cumárico, quercetina e hesperitina	HPLC–PDA	Brasil	ÁVILA <i>et al.</i> , 2019

Essas substâncias do conteúdo fenólico podem ser fundamentais na atividade antioxidante do mel. Os compostos fenólicos estabilizam os radicais livres quando liberam hidrogênio de um de seus grupos hidroxila e, o grau de atividade está relacionado ao número de seus grupos hidroxila (RICE-EVANS; MILLER, 1996). Além disso, esses compostos têm sido amplamente estudados e são de importância para médicos e nutricionistas, pois são compostos com relevantes efeitos biológicos (HAVSTEEN, 2002).



**Figura 6.** Estruturas químicas de alguns flavonoides encontrados em mel de abelhas.

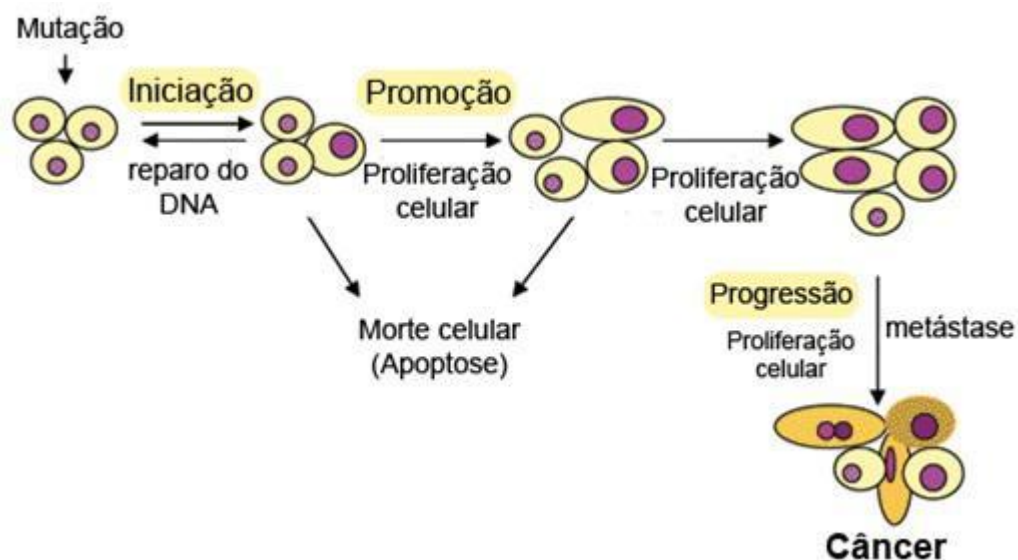


**Figura 7.** Estruturas químicas de alguns ácidos fenólicos encontrados em mel de abelhas.



### 1.4.3 Atividade quimiopreventiva do mel

Na última década, há uma crescente atenção em pesquisas associadas aos produtos naturais e sua quimioprevenção, como o mel, pela alternativa atrativa de prevenção anterior ao estágio em que se classifica como câncer (SPORN; SUH, 2000, 2002). Para melhor compreensão desse sistema, é importante de início conceituar a carcinogênese, considerada um processo de formação do câncer que ocorre de forma lenta, levando anos para a proliferação da célula cancerosa (SPORN; SUH, 2000, 2002). Segundo estes autores, o processo da carcinogênese envolve três estágios (**Figura 8**), no qual o primeiro estágio é a iniciação, onde ocorre a exposição aos agentes cancerígenos, alterando os genes, mas ainda não há formação do tumor. No segundo estágio ou promoção, a célula está geneticamente alterada e sofre ação de agentes carcinógenos, transformando a célula em maligna. Para isso, é necessário um longo contato com agentes carcinógenos e, caso ocorra a suspensão do contato é possível interromper o processo nesse estágio. No terceiro estágio ou progressão, ocorre uma multiplicação irreversível das células alteradas e o câncer está instalado.



**Figura 8.** Estágios da carcinogênese (Fonte: Instituto Nacional de Câncer-INCA).

As principais causas de câncer são mutações genéticas, genes herdados, fatores ambientais e estilo de vida (ANAND *et al.*, 2008). O Instituto Nacional de Câncer (INCA) estima a incidência de 625 mil novos casos de câncer no Brasil para cada ano do triênio 2020-2022, se tornando uma das doenças mais frequentes, associada à uma alta taxa de mortalidade (BADOLATO *et al.*, 2017).

A quimioprevenção do câncer se deve pelo uso de agentes para a inibição ou retardo da carcinogênese antes da progressão (SPORN; SUH, 2000). As ações quimiopreventivas de alimentos podem ser em função da presença de compostos com diversos efeitos sobre as vias mecânicas da carcinogênese (SAUNDERS; WALLACE, 2010).

Os compostos quimiopreventivos da dieta, como os compostos fenólicos, podem atuar como indutores de enzimas desintoxicantes. Além disso, a regulação de enzimas de fase I e enzimas de fase desintoxificação de fase II, podem atuar na prevenção do início do câncer e evitar a ativação de procarcinogênios. A indução de enzimas de fase II atua na proteção contra os efeitos tóxicos e neoplásicos de carcinógenos. A NAD (P) H: quinona redutase faz parte dessas enzimas de fase II (NAIR *et al.*, 2007). Desta forma, a indução da quinona redutase (QR) é um biomarcador útil para quimioprevenção. As principais funções da QR são diminuir a formação de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e elevar a enzima desintoxicante de fase II (YANG; LIU, 2009). Para avaliação da indução da QR é utilizada a linhagem celular derivada de hepatocarcinoma murino (Hepa 1c1c7), que contém quantidades de QR induzíveis e facilmente mensuráveis de indutores de enzimas de fase 2 (YANG; LIU, 2009).

Os radicais livres desempenham um papel significativo na indução da formação de câncer, portanto o mel por ter propriedades antioxidantes pode ter o potencial de impedir o desenvolvimento de câncer (VALKO *et al.*, 2007). A inibição do mel na expansão tumoral também pode ser justificada pela modulação do estresse oxidativo, pela presença de flavonoides e ácidos fenólicos no mel (PYLER, 1982).

A inflamação também tem papel significativo na iniciação de câncer. Neste sentido, o NF- $\kappa$ B participa da via inflamatória e é ativado no processo cancerígeno (WANG; CHO, 2010). A ativação de NF- $\kappa$ B, subsequentemente, resulta na indução de várias proteínas e genes inflamatórios, incluindo ciclooxigenase-2 (COX-2), proteína C reativa e mediadores inflamatórios ou citocinas como a interleucina 1 (IL-1), IL-6 e TNF- $\alpha$ . Todas essas vias e mediadores pró-inflamatórios exercem importância na etiologia relacionada à inflamação do câncer (EREJUWA *et al.*, 2014).

#### 1.4.4 Atividade antioxidante

Os radicais livres são espécies químicas que contêm um elétron desemparelhado na sua órbita mais externa, são altamente instáveis, por isso precisam doar ou retirar um elétron de outra molécula para se estabilizarem (KISHORE *et al.*, 2011). A luz solar, poluição, estresse e alimentos processados são fatores que podem aumentar a quantidade dos radicais livres e conseqüentemente, ocasionar reações em cadeia no corpo e destruir células, podendo desencadear doenças (TUKSITHA *et al.*, 2018).

Uma menor produção de antioxidantes e aumento de ERO pode ocorrer na presença de uma doença, que é chamado de estresse oxidativo (PIZZINO *et al.*, 2017). Há um crescente interesse e pesquisa com agentes naturais para combater o desequilíbrio nesse estresse oxidativo (NIMSE; PAL, 2015), pois acredita-se que uma dieta rica em alimentos antioxidantes auxilie na maior longevidade (CHANG *et al.*, 2016). Neste sentido, os alimentos antioxidantes auxiliam no controle de reações oxidativas, atuando em atividades quimiopreventivas (ALVAREZ-SUAREZ *et al.*, 2010). Os antioxidantes são moléculas que inibem a oxidação de outras moléculas, pois doam um elétron aos radicais livres, neutralizando o dano as células, além de ácidos nucleicos, proteínas e lipídios (KISHORE *et al.*, 2011; CIANCIOSI *et al.*, 2018).

Nos últimos anos, aumentou-se o interesse na determinação da atividade antioxidante do mel (ZAREI *et al.*, 2019), no qual os pesquisadores apontam que esses componentes responsáveis pela atividade antioxidante do mel variam de acordo com a origem floral e geográfica do mel (ALJADI; KAMARUDDIN, 2004). Essa capacidade antioxidante do mel contribui para a prevenção de vários distúrbios agudos e crônicos, como inflamatórios, alérgicos, trombóticos, diabéticos, cardiovasculares, câncer e outros (AHMED *et al.*, 2018).

Gheldof e Engeseth (2002) relataram que os polifenóis do mel podem ter importante atividade antioxidante. Um estudo realizado em São Paulo com méis de *Apis mellifera* revelou alta correlação entre atividade antioxidante e polifenóis (NASCIMENTO *et al.*, 2018).

Diferentes métodos para determinar a capacidade antioxidante em méis podem ser empregados, incluindo o método de desativação de radicais livres DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil), o poder antioxidante redutor do ferro (FRAP, do inglês *Ferric Reducing Antioxidant Power*) (BILUCA *et al.*, 2020a). O método DPPH é muito

utilizado para avaliação da capacidade antioxidante (OLIVEIRA, 2015). Na presença de um antioxidante doador de H<sup>+</sup>, ocorre redução do radical DPPH (KEDARE; SINGH, 2011), ocorrendo uma mudança de cor de roxo para amarelo. Quanto maior a descoloração, maior a doação de H<sup>+</sup> e atividade antioxidante da amostra (REDDY *et al.*, 2012).

## 1.5 Hipótese

A hipótese deste estudo é que a espécie de abelha e a sazonalidade alteram a composição físico-química do mel, suas propriedades antioxidantes e quimiopreventivas de câncer.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar as características físico-químicas e propriedades bioativas de méis de abelhas sem ferrão e africanizadas no Espírito Santo.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar físico-quimicamente os méis de abelhas sem ferrão e abelhas africanizadas e verificar padrões interespecífico e sazonal;
- Avaliar os compostos fenólicos e atividade antioxidante dos méis de abelhas sem ferrão e abelhas africanizadas e verificar padrões interespecífico e sazonal;
- Determinar a atividade citotóxica *in vitro* em cultura de células dos méis de abelhas sem ferrão e abelhas africanizadas;
- Descrever a atividade quimiopreventiva *in vitro* empregando bateria de ensaios dos méis de abelha sem ferrão e abelhas africanizadas e verificar padrões interespecífico e sazonal.

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Grupo estudado

As espécies selecionadas para este estudo foram as abelhas sem ferrão (ASF) *Melipona quadrifasciata* (MQ), *Melipona mondury* (MM), *Melipona capixaba* (MC), *Tetragona clavipes* (TC) e *Tetragonisca angustula* (TA) e a abelha africanizada *Apis mellifera* (AM). As espécies de ASF já foram identificadas.

### 3.2 Área de estudo e delineamento da coleta de amostras

As amostras de mel dos ninhos das ASF (20°05'52"S e 40°36'56"O) e *Apis mellifera* (20°07'41"S e 40°36'59"O) foram coletadas em propriedades particulares no município de Santa Leopoldina e Domingos Martins, Espírito Santo, no qual os ninhos das ASF e de *Apis mellifera* distaram entre si cerca de 3,4 km de distância (**Figura 9**). A região estudada é composta pela Floresta Ombrófila Densa e por plantas arbóreas frutíferas (araçá una, jabuticaba, jambo e pitanga) e de interesse econômico (eucalipto) e herbáceas (assa-peixe e camará), contidas nas propriedades rurais estudadas (CARDOSO *et al.*, 2021).

Como critério de inclusão para o meliponário e apiário selecionado foi: fácil acesso e estar distribuído em áreas preservadas, longe de áreas poluídas, de depósitos de lixo, de criadouros de animais e de regiões com uso de agrotóxicos e adubos químicos.

O mel maduro foi retirado por sucção com seringa nos potes (ASF) e favos (AM), acondicionados em potes plásticos e armazenados sob proteção da luz e a temperatura 8°C. Vale ressaltar que o mel de *Apis mellifera* foi empregado como controle. A primeira coleta foi realizada na estação chuvosa (setembro 2019) e a segunda coleta na estação seca (fevereiro 2020) (INCAPER, 2019, 2020). As amostras de mel foram identificadas por espécie, data e local de coleta, e retiradas diretamente das colmeias.



**Figura 9.** Distribuição dos pontos de coleta dos Ninho de ASF e AM, no município de Santa Leopoldina, Espírito Santo, sudeste do Brasil (Fonte: Google Earth e Wikipedia)

### 3.3 Caracterização físico-química

#### 3.3.1 Açúcares redutores e totais

Os açúcares redutores e a sacarose aparente foram determinados conforme o método descrito por Lane; Eyon. Portanto, 2,5 g da amostra de mel foi diluída em 250 mL de água destilada e posteriormente titulou a solução em 10 mL do licor de Fehling (formado pela solução de Fehling A e B) e 30 mL de água destilada. A solução de Fehling A é formada pelo sulfato de cobre II e a solução de Fehling B é uma solução de tartarato de sódio e potássio aquoso). A determinação do açúcar redutor envolveu a redução da solução de Fehling com uma solução de açúcares redutores do mel. Para a determinação dos açúcares totais, 50 mL da solução inicial foram transferidos para um balão volumétrico de 100 mL com 5 mL de ácido clorídrico e, posteriormente colocado em banho maria a 68° C/ 5 min. Depois neutralizou a amostra com hidróxido de sódio (35%) utilizando papel tornassol como indicador e completou o volume do balão com água destilada. A amostra foi submetida à titulação com licor de Fehling conforme descrito anteriormente (AOAC, 2016). O resultado foi expresso como (%) m/m. As análises foram realizadas em triplicatas.

#### 3.3.2 Sólidos solúveis

A determinação dos sólidos solúveis totais (SST, expresso em °Brix) foi avaliado com o auxílio de um refratômetro digital de bancada de acordo com as normas da

AOAC (2016), obtido da conversão do índice de refração para °Brix (ANEXO 1). As análises foram realizadas em triplicatas.

### **3.3.3 Umidade**

Os teores de umidade dos méis de abelhas sem ferrão foram determinados pelo do método refratométrico, método recomendado pela Association of Official Analytical Chemists - AOAC (2016), As amostras de méis foram analisadas em refratômetro, à temperatura ambiente (25°C) e aplicou-se o método de correção de + ou - 0,00023 para cada grau de temperatura diferente, obtido pela conversão do teor de umidade através da Tabela de Chataway (ANEXO 2). As análises foram realizadas em triplicatas.

### **3.3.4 pH e Acidez livre**

O pH foi determinado utilizando um potenciômetro digital com uma solução preparada com 10 g de amostra de mel diluída em 75 mL de água destilada (AOAC, 2016). As análises foram realizadas em triplicatas.

A acidez livre foi avaliada, a partir de titulação simples com NaOH 0,05 M, em volume até atingir o pH 8,5. As análises foram realizadas em triplicata e a acidez livre expressa em mEq.Kg<sup>-1</sup> de mel (AOAC, 2016). As análises foram realizadas em triplicatas.

## **3.4 Determinação de polifenóis totais e flavonoides**

O conteúdo de compostos fenólicos totais foi determinado por espectrofotometria, utilizando o método de Folin-Ciocalteu. Para cada amostra de mel foi preparada uma solução com água destilada numa proporção de 1:10. Alíquotas de 0,5 mL desta solução de mel foi adicionada para tubos de ensaio, adicionando 2,5 mL de solução Folin-Ciocalteu (10%) e 2 mL de carbonato de sódio (7,5%). Posteriormente a absorbância foi avaliada no comprimento de onda de 760 nm após 2 horas de repouso. Foi definida a curva de calibração utilizando o ácido gálico como padrão com concentrações variando de 10 a 140 mg.ml<sup>-1</sup> para determinar o conteúdo de polifenóis. Os resultados foram expressos em miligrama equivalente de ácido

gálico por 100g de amostra de mel (mg EAG g<sup>-1</sup>) (SINGLETON *et al.*, 1999). As análises foram realizadas em triplicatas.

O conteúdo de flavonoides totais foi determinado conforme o método colorimétrico com cloreto de alumínio. Foi preparada uma solução de mel com água destilada (1:10) e uma alíquota de 0,5 mL foi transferida para tubo de ensaio (triplicata), adicionando 2 mL de água destilada e 0,15 mL de nitrito de sódio (5%). Após 6 min, foi adicionado 0,15 mL de cloreto de alumínio (10%), deixando em repouso por 6 min, na sequência foram adicionados 2 mL da solução de hidróxido de sódio (4%) e água destilada até o volume final de 5 mL. A leitura da solução foi realizada em espectrofotômetro a 510 nm de absorvância. O conteúdo de compostos fenólicos na amostra foi obtido a partir da construção de uma curva de calibração (0,1 – 10 µg.mL<sup>-1</sup>, utilizando a quercetina como padrão. Os resultados foram expressos em miligrama equivalente de quercetina por 100 g de amostra de mel (mg QE g<sup>-1</sup>) (WOISKY; SALATINO, 1998). As análises foram realizadas em triplicatas.

### **3.5 Composição química por ESI-FT-ICR MS**

Para a preparação dos extratos, amostras de mel (1 g) foram adicionadas a 1 mL de solução de cloreto de sódio 2% m/v. Após, a solução de mel diluída foi agitada de forma constante por 1 minuto no Vortex, em seguida, foi particionada cinco vezes com 2 mL de acetato de etila, totalizando 10 mL de fase orgânica, as quais foram filtradas em papel filtro, concentradas em evaporador rotativo (40°C) até secagem total e, posteriormente o resíduo foi suspenso em 1 mL de metanol:água (70:30) e analisado (TRAUTVETTER *et al.*, 2009).

O espectrômetro FT-ICR MS (modelo 9.4 T Solarix, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) foi utilizado na análise da composição química. Os espectros foram obtidos no modo negativo em uma faixa de massa m/z 150-1500. As condições da fonte de ESI foram: pressão de gás nebulizador de 1,5 Bar, voltagem capilar de 4,0-4,4 kV, e a temperatura de transferência capilar de 200°C. O tempo de acumulação dos íons foi de 0,010-0,030 s. Cada espectro foi adquirido pela acumulação de 16 varreduras (scans), no qual os espectros foram obtidos com alta resolução (4 M) e erros de massas menores do que 1 ppm, fornecendo fórmulas moleculares inequívocas para os íons moleculares de carga única. Todos os espectros de massa foram calibrados externamente usando arginina (m / z de 150 a 1500). Os espectros de massa foram



processados usando o software Data Analysis (Bruker Dantonic, Bremen, Alemanha) (OLIVEIRA *et al.*, 2019). As fórmulas estruturais dos compostos foram obtidas pelo software Chemspider Database ([www.chemspider.com](http://www.chemspider.com)). As análises foram realizadas em triplicatas.

### **3.6 Determinação da atividade antioxidante**

#### **3.6.1 DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)**

A determinação da capacidade antioxidante pelo método DPPH foi realizada de acordo com Bobo-García *et al.* (2015). Preparou-se uma solução metanólica de DPPH (200  $\mu\text{M}$ ) para apresentar, aproximadamente, 0,9 de absorvância, no comprimento de onda de 517 nm. Adicionou-se na microplaca 80  $\mu\text{L}$  de controle da solução de mel (0,5  $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) com metanol 80% e água. Posteriormente, adicionou uma alíquota de 160  $\mu\text{L}$  da solução DPPH e incubou por 1 h e 30 min, à temperatura ambiente e depois realizou a leitura a 517 nm. O resultado da atividade antioxidante foi expresso como a capacidade de sequestrar/reduzir o radical DPPH, ( $\text{IC}_{50}$ ), ou seja, a quantidade de compostos antioxidantes necessários para reduzir em 50% a concentração inicial do DPPH. As análises foram realizadas em triplicatas.

#### **3.6.2 FRAP (Poder antioxidante de redução férrica)**

A atividade antioxidante foi avaliada pelo método que se baseia na medida da capacidade dos antioxidantes (redutores) da amostra em reduzirem, em meio ácido (pH 3,6), o complexo  $\text{Fe}^{3+}$  / tripiridiltriazina (TPTZ), para formar  $\text{Fe}^{2+}$ , de intensa cor azul (BENZIE; STRAIN, 1996). Os resultados calculados com base na equação de reação do padrão aquoso de  $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (25-600  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e expressos em  $\mu\text{mols}$  equivalentes a Fe (II) por 100  $\text{g}^{-1}$  de mel. As análises foram realizadas em triplicatas.

### **3.7 Determinação da atividade citotóxica**

Para investigar a viabilidade celular foi utilizado o método do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) proposto por MOSMANN (1983). Neste estudo foram empregadas culturas de células fibroblastos (L929) e RAW264.7. As

culturas foram incubadas com diferentes concentrações das amostras por 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período a cultura foi incubada com o MTT por 2 h e em seguida adicionou-se 100µL de dimetilsulfóxido (DMSO) por 30 min com agitação para dissolução dos cristais de formazana. A leitura da absorbância das placas foi realizada em leitor de ELISA - Ensaio Imunoenzimático (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay- Elisa Spectracount Packad* – EUA), utilizando-se filtros de 595 nm. As análises foram realizadas em triplicatas.

### **3.8 Avaliação da atividade quimiopreventiva de câncer**

#### **3.8.1 Ensaio in vitro de indução da quinona redutase**

O ensaio de indução da quinona redutase foi realizado segundo método descrito por Pezzuto *et al.* (2005). Para a avaliação de amostras como indutores da enzima quinona redutase, foi empregada cultura de hepatoma de rato, Hepa1c1c7, ATCC CRL 2026™. As células foram semeadas em duas placas estéreis, transparentes, de 96 poços a uma densidade de  $1 \times 10^4$  células. mL<sup>-1</sup>, marcadas como “Proteína” e “QR ensaio”, respectivamente. Após pré-incubação de 24 h, o meio de cultura inicial foi removido e adicionado nova alíquota (190 µL) de meio de cultura. Em cada placa foram adicionados 10 µL da solução da amostra, na concentração de 20 µg. mL<sup>-1</sup>, 10 µL das soluções da curva de diluição de 4'-bromoflavona (concentrações finais de 50,0 µM a 0,4 µM) (controle positivo) e 10 µL de solução de DMSO a 10% em PBS (controle negativo). As placas foram incubadas, por 48 h, em estufa de CO<sub>2</sub>.

Após a incubação, o meio de cultura foi removido da placa “Proteína”, em seguida, foi adicionado 200 µL de cristal violeta a 2% em etanol e foi incubado à temperatura ambiente, por 10 min. Em seguida, a placa foi lavada em água corrente, com fluxo baixo, por 2 min, seca em capela e após, foi adicionado à cada poço da placa “Proteína”, 200 µL de SDS a 0,5% em 50% de etanol. A incubação foi à temperatura ambiente, sob agitação, 10 ciclos/min, por 5 a 10 min. Em seguida, a absorbância foi determinada em 595 nm. O valor de absorbância do controle negativo foi de 1,0.

De maneira semelhante, após a 48 h de incubação, o meio de cultura foi removido da microplaca “QR ensaio” e foram adicionados 50 µL de solução de digitonina a 0,8%. A placa foi incubada em estufa comum, a 37°C, por 10 min, seguida de incubação à temperatura ambiente, sob agitação, 10 ciclos/min, por 10 min. Em

seguida, foi adicionada a mistura reacional (200  $\mu$ L) composta por 28 ml de H<sub>2</sub>O; 1,5 mL de Tris-HCl, 0,5 M, pH 7,4; 200  $\mu$ L Tween 20 a 1,5% V/V; 20  $\mu$ L FAD 7,5 mM; 200  $\mu$ L G-6-P 150 mM; 18  $\mu$ L NADP 50 mM; 20 mg BSA; 9 mg MTT; 60 U G-6-PH; e 30  $\mu$ L Menadiona 50 mM. A incubação foi realizada em temperatura ambiente, a placa “QR ensaio” foi agitada com 10 ciclos/min, no período de 5 min. A absorbância foi determinada em leitor de microplacas no comprimento de onda de 595 nm. O valor de absorbância controle foi de 0,4, obtido para o controle negativo.

A atividade indutora da QR foi expressa como DC (dobro da concentração requerida para a atividade específica da QR). Para o cálculo de DC foi aplicado, a cada valor de absorbância lido na placa “QR ensaio”, a seguinte equação:

$$DC = [(A1 \times 5) / AT] \times 3.247$$

Onde:

A1= absorbância da solução na presença do indutor, lido na placa “QR ensaio” (AAmostra - ABranco)

AT= absorbância da solução na presença do indutor, lido na placa “Proteína” (AAmostra - ABranco)

O denominador 5 refere-se ao tempo de incubação à temperatura ambiente e o denominador 3,247 é a razão entre a constante de proporcionalidade do cristal violeta pelo coeficiente de extinção do MTT no comprimento de onda 595 nm.

Os resultados foram apresentados como média. Foram consideradas ativas as amostras que apresentaram valor DC superior a 2. As análises foram realizadas em triplicatas.

### **3.8.2 Ensaio de atividade inibitória de NF- $\kappa$ B**

O ensaio inibição de NF- $\kappa$ B foi realizado segundo descrito por (HOMHUAL et al., 2006). Para o ensaio foi empregada a linhagem celular 293-NF- $\kappa$ B (linha celular 293 derivada de rim humano, 293, 12-PTA-5554), transfectada com o gene repórter de NF- $\kappa$ B luciferase, foram semeadas em uma placa de 96 poços a uma densidade de  $1 \times 10^4$  células por 48 h. Os méis foram testados na concentração de 100  $\mu$ g. mL<sup>-1</sup>. Após o tratamento, as células foram incubadas por mais 6 h com TNF- $\alpha$  (5 ng. mL<sup>-1</sup>). Em seguida, o ensaio de luciferase foi realizado usando o sistema de ensaio Luc da Promega® de acordo com as instruções do fabricante. A atividade da luciferase foi monitorada empregando o leitor de microplacas, com absorção a 515 nm. Os

resultados foram expressos como porcentagem da atividade inibitória do NF- $\kappa$ B. Natosil-L-fenilalanina clorometil cetona (TPCK) foi usada como um controle positivo; IC<sub>50</sub>= 3,8 nM.

Para o cálculo da porcentagem de inibição de NF- $\kappa$ B, a cada valor de luminescência lido foi aplicado a equação representada abaixo:

$$\% \text{ Inibição NF-}\kappa\text{B} = 100 - (LA \times 100/LT)$$

Onde:

LA= luminescência da solução na presença do inibidor

LT= média do valor de luminescência da solução do controle negativo.

Os resultados foram expressos como porcentagem da atividade inibitória do NF- $\kappa$ B. As análises foram realizadas em triplicatas.

### 3.9 Análise dos dados

Os resultados descritivos foram expressos como valores mínimo e máximo, mediana, média, desvio padrão e abundância relativa. Para a avaliação das comparações das amostras nesse estudo, antes verificou-se as premissas de normalidade, pelo teste Shapiro-Wilk, e homogeneidade das variâncias, pelo teste de Levene. Ao verificar que tais premissas não foram corroboradas, análises não paramétricas de Kruskal-Wallis e *post-hoc* de Dunn a 95% de significância foram realizadas para as avaliações interespecíficas das características físico-químicas (exceto para açúcar redutor), atividade antioxidante, polifenóis, flavonoides, quinona redutase e NF- $\kappa$ B. Para a análise de sazonalidade, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney e ANOVA (*post-hoc* de Tukey) a 95% de significância. A variável que seguiu as premissas supracitadas foi o açúcar redutor, no qual foi utilizado o teste paramétrico ANOVA e a significância da diferença entre as médias foi determinada pelo teste *post-hoc* de Tukey, ajustado para múltiplas comparações onde valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativo. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o Programa Past versão 4.05.

Regressão polinomial foi feita utilizando o Microsoft Excel, para avaliar a relação entre as variáveis polifenóis e flavonoides com DPPH e FRAP e, a força dessa relação por meio da observação do R<sup>2</sup> de acordo com Vieira (1980).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Características físico-químicas

#### 4.1.1 Açúcar redutor e total e Sólidos Solúveis Totais

##### *Análise Interespecífica*

Para açúcar redutor e total, os valores médios encontrados para as diferentes espécies variaram de 36,22%  $\pm$  2,71 a 66,85%  $\pm$  1,40 e 39,18%  $\pm$  0,87 a 68,92%  $\pm$  2,42, respectivamente, apresentando diferença significativa entre as espécies ( $p=2,7E-10$ ;  $p=1,425E-05$ ) (**Tabela 6**). Dentre as espécies, o mel de TC apresentou o menor valor de açúcar em relação às outras espécies ( $p=1,49E-10$ ). Vit *et al.* (1998) também encontraram menores valores de açúcar redutor para a tribo Trigonini. De acordo com Nogueira-Neto (1997), a maioria das espécies pertencentes à tribo Trigonini evitam colher néctar ricos em açúcar, comportamento de forrageio do grupo que pode justificar esse resultado.

Nesse contexto, AM apresentou maior valor de açúcar total (72,13%) quando comparado com TA (59,49%) e TC (39,18%) ( $p=0,003$ ;  $p=5,361E-05$ ). De acordo com Marchini *et al.* (2007), o mel de abelha *Apis mellifera* apresentou valores de açúcar total de 76,56%, indicando que os valores de açúcar deste mel são maiores às abelhas sem ferrão.

Dentre as abelhas sem ferrão, 60% apresentaram valor médio de açúcar redutor acima de 60%. De acordo com o IDAF (2019), os méis de abelha sem ferrão devem atingir um valor mínimo de 60% de açúcar redutor. Desta forma, a maioria das amostras de méis de ASF avaliadas neste estudo está em conformidade com a legislação estadual. Contudo, *Tetragona clavipes* apresentou valor de açúcar redutor abaixo do recomendado desta legislação, esse resultado pode ser devido às características físico-químicas deste mel, como o elevado teor de umidade observado nas amostras. Valores de açúcar redutor menores para mel da tribo Trigonini comparado à tribo Meliponini são observados na literatura (BOGDANOV *et al.*, 1996; DE ALMEIDA ANACLETO *et al.*, 2009; ECHEVERRIGARAY *et al.*, 2021). No entanto, mais estudos sobre avaliação de açúcar redutor em mel de *Tetragona clavipes* são necessários para a compreensão de um padrão de valores e de fatores que influenciam nessa dinâmica. Desta forma, compreender com mais clareza essa

característica do mel desta espécie poderá possibilitar de sugerir que para este mel, o valor mínimo de 60% de açúcar redutor recomendado talvez não seja adequado.

Quanto às amostras de mel de *Apis mellifera*, obteve-se uma média de 64,58%, que está de acordo com a legislação que preconiza o valor mínimo recomendado (65%) de açúcar redutor (BRASIL, 2000). Em estudo, Kadri *et al.* (2016) identificaram maiores valores de açúcares redutores em méis de *Apis mellifera* do Estado do Espírito Santo com média de 73,49%.

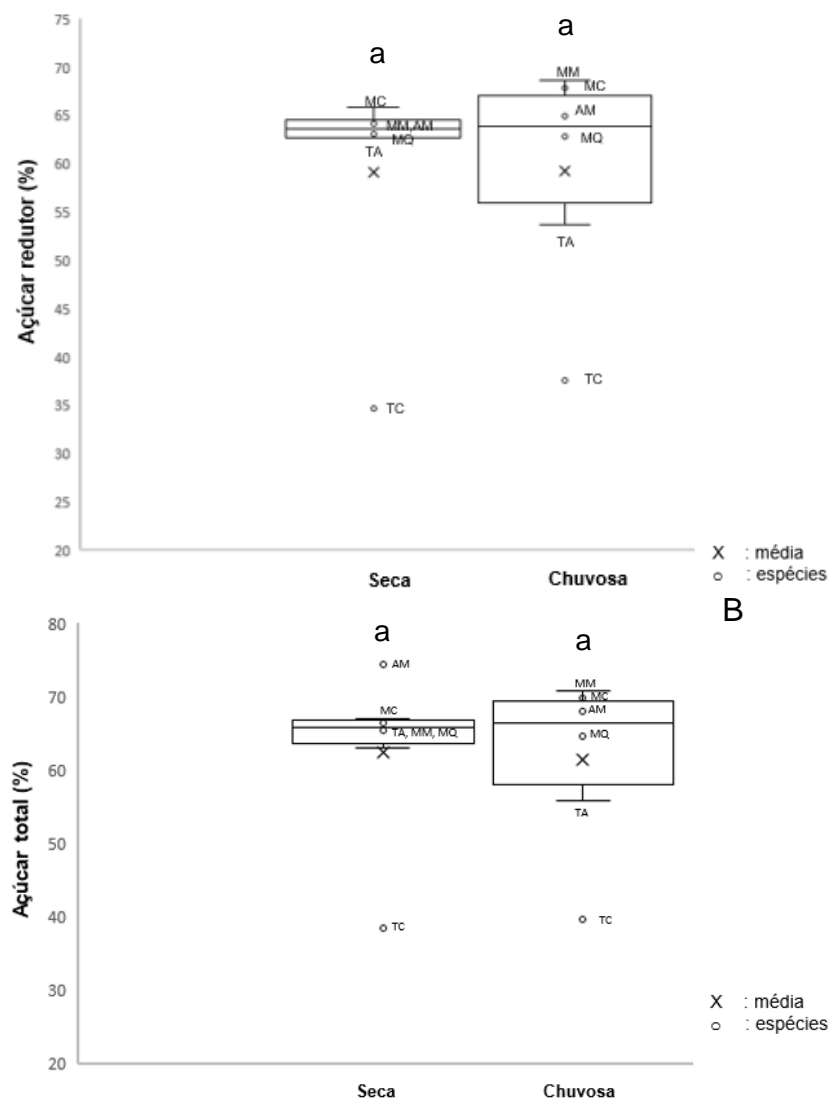
Os valores médios de SST encontrados para as espécies de ASF foram de 68,20 (TA) a 70,63 (MM) °Brix ( $p=0,0007$ ), com destaque para TA e TC que apresentaram menor valor comparativamente à AM (75,43 °Brix) ( $p=0,002$ ;  $p=0,00008$ ) (**Tabela 6**). Esses resultados do SST maior em AM podem estar relacionados com o teor de umidade, visto que o mel desta espécie obteve menor umidade e, conseqüentemente, maior valor de SST. O SST (°Brix) é encontrado em maior concentração em méis com menor umidade (BILUCA *et al.*, 2016). Os valores de SST corroboraram com os estudos realizados em Santa Catarina (BILUCA *et al.*, 2016) e na Bahia (SOUZA *et al.*, 2006) para as ASF e no Rio Grande do Sul para *Apis mellifera* (MARCOLIN *et al.*, 2021).

### **Sazonalidade**

As médias do açúcar redutor entre as estações foram próximas, 59,20% na estação seca e 59,27% na chuvosa, assim como as médias do açúcar total, 61,64% na chuvosa e 62,47% na seca, no qual esses elementos não apresentaram diferença significativa entre as estações (reductor  $p=0,812$ ; total  $p=0,824$ ) (**Figura 10**). Ao analisar as espécies de ASF separadamente entre as estações, 60% dos méis apresentaram maiores valores de açúcar redutor na estação chuvosa (**Tabela 7**). Esses resultados do açúcar redutor difere dos resultados de Duarte *et al.* (2012, 2018), cujo autores observaram que o mel de ASF coletado em Alagoas durante a estação seca, apresentou maior valor de açúcar redutor (66,73%) comparado à estação chuvosa (59%). Resultado semelhante foi encontrado no estudo de François *et al.* (2018), que justificam esta observação indicando possivelmente que os açúcares redutores e total podem estar mais acessíveis em plantas na estação seca comparada à chuvosa.

No entanto, AM mesmo apresentando valores próximos entre as estações, a estação chuvosa também apresentou valor médio de açúcar redutor maior (64,93%)

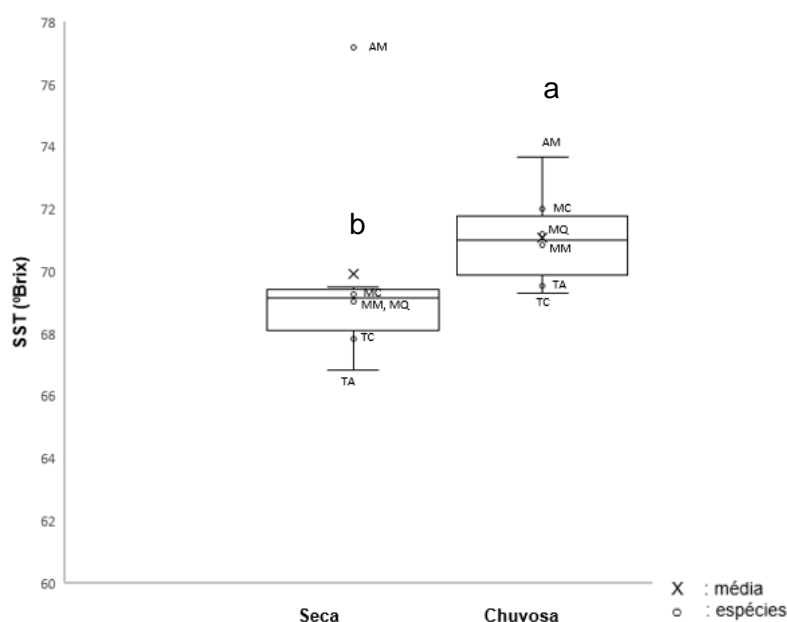
comparado à seca (64,23%) (**Tabela 7**). Esse resultado corrobora com o estudo de Jacob (2014) e Marcolin *et al.* (2021), cujo autores observaram que o mel *Apis mellifera* apresentou maiores valores de açúcar redutor na estação chuvosa.



**Figura 10.** Porcentagem de açúcar redutor (A) e total (B) para méis de abelhas avaliados nas estações seca e chuvosa, no Espírito Santo. Letras iguais indicam diferenças não significativas entre as médias de acordo com teste de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ). TA= *Tetragonisca angustula*; TC= *Tetragona clavipes*; MC= *Melipona capixaba*; MM= *Melipona mondury*; MQ= *Melipona quadrifasciata*; AM= *Apis mellifera*.

Os méis coletados na estação chuvosa obtiveram maiores valores de SST (71,10 °Brix), sendo significativamente diferentes dos méis coletados na estação seca (69,74 °Brix) ( $p=0,003$ ) (**Figura 11**). Dentre as espécies, os valores de SST dos méis de ASF também foram maiores na estação chuvosa comparada à seca, contudo, os méis de *Apis mellifera* apresentaram maiores valores de SST na estação seca (77,20 °Brix) em relação à estação chuvosa (73,70 °Brix) (**Tabela 7**). Maiores valores de SST

em méis de ASF na estação chuvosa e em méis de AP na estação seca foram relatados por Marcolin *et al.* (2021) no Rio Grande do Sul.



**Figura 11.** Valores de sólidos solúveis totais (°Brix) para méis de abelhas avaliados nas estações seca e chuvosa, no Espírito Santo. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as médias de acordo com teste de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ). TA= *Tetragonisca angustula*; TC= *Tetragona clavipes*; MC= *Melipona capixaba*; MM= *Melipona mondury*; MQ= *Melipona quadrifasciata*; AM= *Apis mellifera*.

#### 4.1.2 Umidade

##### **Análise Interespecífica**

Os valores médios de umidade encontrados para os méis das diferentes espécies variaram de 22,93% (AM) a 31,10% (TC) ( $p=0,000164$ ), no qual as abelhas sem ferrão apresentaram maiores valores comparados à AM (**Tabela 6**). Importante ressaltar que, os méis de TA e TC foram os de maior umidade observados (valores acima de 30%) e significativamente diferente de AM (22,93%) ( $p=0,006$ ;  $p=0,00005$ ). Batiston *et al.* (2020) também encontraram resultados semelhantes de umidade no mel da *Tetragona clavipes* (30%). Esses resultados comprovam que o mel produzido pelas diferentes espécies de abelhas pode conter teores de umidade distintos. Vargas (2006) disserta que umidade acima de 20% em méis pode aumentar o processo fermentativo desse produto. Portanto, quando o mel tem um alto teor de umidade, ocorre a proliferação da levedura que fermenta açúcares e conseqüentemente, auxilia na formação de álcool, dióxido de carbono e ácido acético e, desta forma, podendo



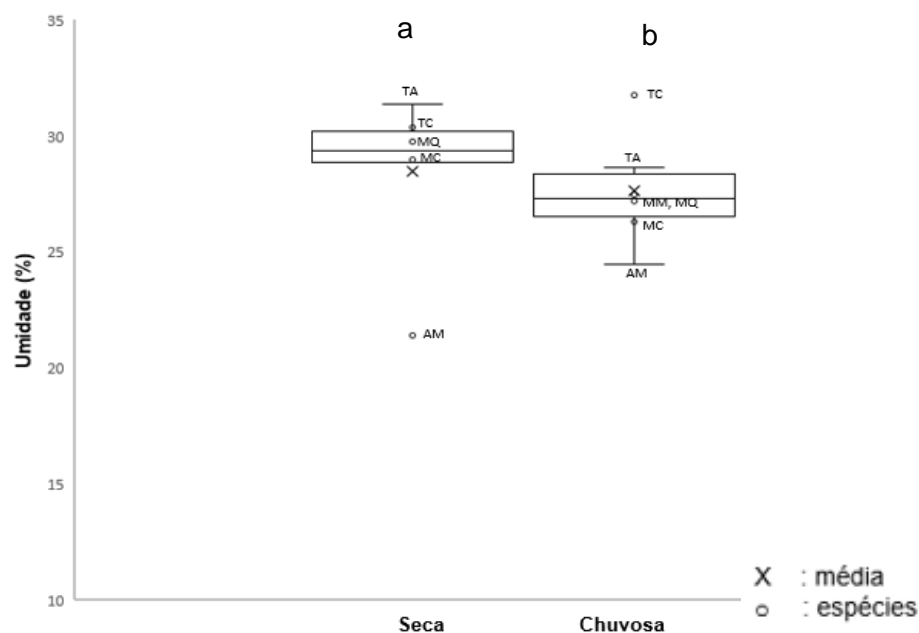
aumentar a acidez do mel e a possível alteração no sabor do mel (VILLACRÉS-GRANDA *et al.*, 2021).

A variação de 27,67% a 31,10% de umidade do mel observada nas ASF foi adequada segundo a determinação do IDAF (2019). Visto que, esse órgão regulamentador pontua que a umidade dos méis de ASF deve ter valores máximos de até 40%. Portanto, as amostras das ASF desse trabalho estão em conformidade com a legislação estadual, visto que valores acima do recomendado podem aumentar a proliferação de microrganismos, fermentação e assim, o mel pode se tornar inadequado para o consumo (SILVA *et al.*, 2013). Essa variação da umidade dos méis de ASF observada neste estudo, também foi relatada em outros trabalhos (ALMEIDA SOUZA *et al.*, 2004; CARVALHO *et al.*, 2009; BILUCA *et al.*, 2016).

Nesse contexto, o mel de AM obteve umidade média (22,93%) acima do recomendado pela legislação brasileira (20%). Essa umidade observada neste estudo também foi maior comparada ao estudo de Kadri *et al.* (2016), que encontraram valores variando de 16,4% a 19,4% para méis de AM em Muqui, no estado do Espírito Santo.

### **Sazonalidade**

A umidade média foi maior estatisticamente na estação seca (28,6%) comparada à estação chuvosa (27,46%) ( $p=0,055$ ) (**Figura 12**). Ao analisar separadamente as espécies, os valores de umidade dos méis de ASF, exceto para TC foram maiores na estação seca comparada à chuvosa (**Tabela 7**). Duarte *et al.* (2012, 2018) também observaram mel de ASF com maior umidade na estação seca (30,50%) comparativamente à chuvosa (27%). Contudo Marcolin *et al.* (2021) encontraram maiores valores de umidade para o mel coletado na estação chuvosa. Para *Apis mellifera*, observou-se que o mel amostrado na estação chuvosa (24,46%) foi maior comparativamente à estação seca (21,4%) (**Tabela 7**). Resultado semelhante foi encontrado por François *et al.*, (2018) em méis de abelha *Apis mellifera*. A influência da estação sobre essa variação da umidade nos méis das abelhas sem ferrão e africanizadas em região tropical é relatada na literatura (LAGE *et al.*, 2012; PENG KEK *et al.*, 2017; KUMAR *et al.*, 2018; YEGGE *et al.*, 2021).



**Figura 12.** Porcentagem da umidade para méis de abelhas avaliados nas estações seca e chuvosa, no Espírito Santo. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as médias de acordo com teste de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ). TA= *Tetragonisca angustula*; TC= *Tetragona clavipes*; MC= *Melipona capixaba*; MM= *Melipona mondury*; MQ= *Melipona quadrifasciata*; AM= *Apis mellifera*.

#### 4.1.3 pH

##### **Análise Interespecífica**

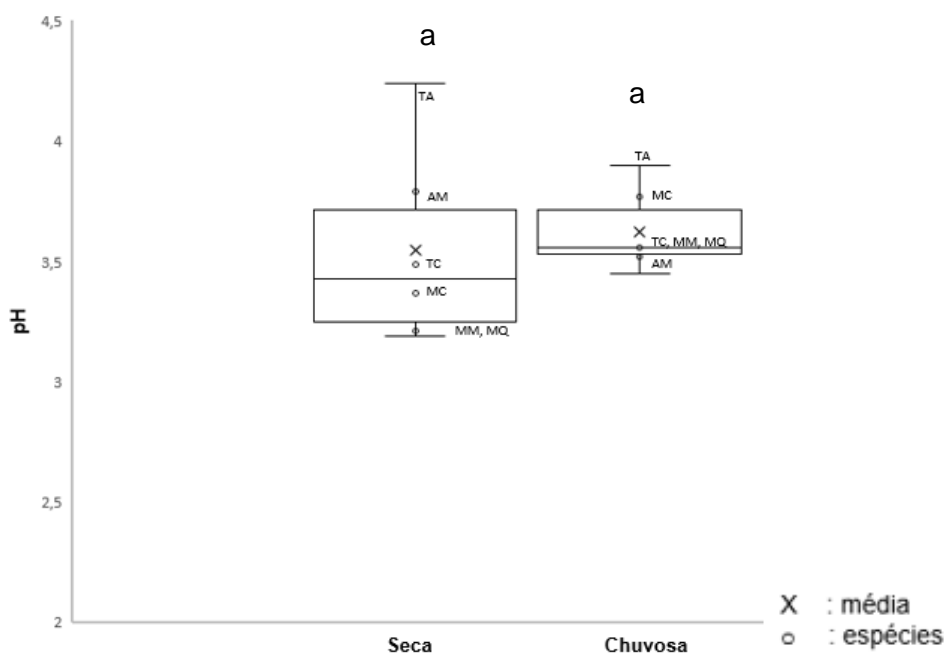
Os valores médios de pH encontrados para méis das diferentes espécies variaram de 3,37 (MM) a 4,07 (TA) ( $p=0,005$ ) (**Tabela 6**), ou seja, todas as amostras apresentaram acidez. Dentre as espécies, o mel de MM e MQ apresentaram menores valores em relação às outras espécies ( $p=0,007$ ;  $p=0,007$ ). De acordo com Aroucha *et al.* (2019), o pH de méis de *Melipona* geralmente é menor comparado ao mel da *Apis mellifera*. Nesse cenário, o pH baixo observado para as abelhas sem ferrão e africanizada pode aumentar a vida útil do mel durante seu armazenamento, devido ao controle no crescimento de microrganismos e, conseqüentemente, no aumento de sua estabilidade (NASCIMENTO *et al.*, 2015; GELA *et al.*, 2021).

As amostras de ASF apresentaram valor médio de pH 3,59. Valores semelhantes também foram encontrados por Pucciarelli *et al.* (2014) para méis de *Tetragonisca angustula* na Argentina (pH médio= 3,72), por Silva *et al.* (2013) para *Melipona subnitida* (3,33) na Paraíba, Brasil. De acordo com o IDAF (2019), os méis devem apresentar valores de pH entre 2,9 e 4,5, portanto, os resultados desse estudo estão de acordo com a legislação estadual. Nesse contexto, o mel da AM apresentou

valor médio de 3,62. Os valores de pH para AM não são padronizados pela legislação nacional e internacional.

### Sazonalidade

O valor médio de pH dos méis amostrados foi maior na estação chuvosa (3,63) comparativamente à seca (3,55), contudo não apresentou diferença significativa ( $p=0,837$ ) (**Figura 13**). Ao avaliar separadamente, os méis de 80% das espécies de abelha sem ferrão apresentaram maiores valores de pH na estação chuvosa (**Tabela 7**). Marcolin *et al.* (2021) corroboram com esse estudo por também observarem maior valor de pH na estação chuvosa para mel de ASF na estação seca e para mel de *Apis mellifera*. Mahmoudi *et al.* (2012), que avaliaram o mel de abelha *Apis mellifera* em diferentes estações, também observaram maior pH na estação seca.



**Figura 13.** Valores de pH para méis de abelhas avaliados nas estações seca e chuvosa, no Espírito Santo. Letras iguais indicam diferenças não significativas entre as médias de acordo com teste de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ). TA= *Tetragonisca angustula*; TC= *Tetragona clavipes*; MC= *Melipona capixaba*; MM= *Melipona mondury*; MQ= *Melipona quadrifasciata*; AM= *Apis mellifera*.

#### 4.1.4 Acidez livre

##### Análise Interespecífica

O valor médio de acidez livre encontrado nos méis das diferentes espécies variou de 20,96 (MQ) a 171,84 (TC) mEq kg<sup>-1</sup> ( $p=6,344E-05$ ) (**Tabela 6**). Em ASF, os

valores de acidez encontrados para méis no Brasil variaram de 2,07 a 139 mEq kg<sup>-1</sup> (ALMEIDA *et al.*, 2004; LAGE *et al.*, 2012; BILUCA *et al.*, 2016). Dentre as espécies, o mel de TC apresentou um valor maior significativo de acidez livre comparado às espécies TA, MM e MQ (p=0,02; p=0,001; p= 0,0002). No estudo de Vit *et al.* (1998), maiores valores de acidez foram observados para os méis da tribo Trigonini.

Dentre as espécies de ASF, 60% apresentaram valor médio de acidez adequado segundo o órgão regulamentador. De acordo com o IDAF (2019), os méis de ASF devem apresentar um valor de acidez máximo de 50 mEq kg<sup>-1</sup>. Observa-se que o mel de TC apresentou valor de acidez cerca de 3 vezes (171,84 mEq kg<sup>-1</sup>) ao designado pela legislação estadual. Batiston *et al.* (2020) relataram valores cerca de 2 vezes (112,87 mEq kg<sup>-1</sup>) ao valor de referência e em relação às outras espécies avaliadas no estudo. Estes dados indicam que é necessário uma revisão dos valores por espécie e que para TC, claramente o valor é superior ao recomendado atualmente. O mel de TC também apresentou maiores teores de umidade e, portanto, pode contribuir na acidez, devido à maior produção de ácido glucônico pela atividade da glicose oxidase quando o mel está com maior teor de umidade (NOGUEIRA-NETO, 1997; MOREIRA; DE MARIA, 2001; PUCCIARELLI *et al.*, 2014).

Comparativamente à TC, a amostra de mel de AM, também apresentou uma acidez média (56,86 mEq kg<sup>-1</sup>) superior ao recomendado (50 mEq kg<sup>-1</sup>) de acordo com legislação brasileira. Importante destacar que um estudo do Espírito Santo encontrou valores de acidez em méis de AM variando de 16,8 a 19,2 mEq kg<sup>-1</sup>, ou seja, variação compreendida pela legislação (KADRI *et al.*, 2016).

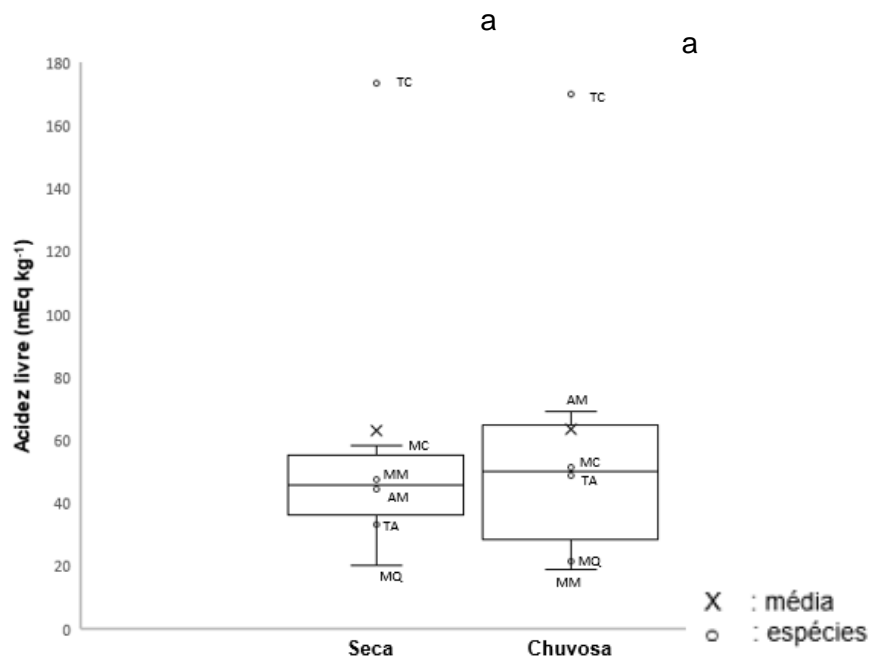
### **Sazonalidade**

Os valores médios de acidez para méis foi de 62,93 e 63,37 mEq kg<sup>-1</sup> para a estação seca e chuvosa, respectivamente, não apresentando diferença significativa (p=0,837) (**Figura 14**).

Dentre os méis de ASF, as espécies MC, MM e TC apresentaram maiores valores na estação seca (**Tabela 7**), semelhante ao encontrado por Duarte *et al.* (2012; 2018), que observaram que méis de *Melipona* coletados em Alagoas durante a estação seca, apresentaram maiores valores de acidez comparado à estação chuvosa. No entanto, para mel de abelha *Apis mellifera*, maiores valores de acidez foram encontrados para a estação chuvosa (64,24 mEq kg<sup>-1</sup>) comparado à estação

seca (45,48 mEq kg<sup>-1</sup>), corroborando com o padrão encontrado também por Marcolin *et al.* (2021).

Essas variações nos valores de acidez de méis dentre as espécies encontradas nesse estudo, também são descritas na literatura. Mudanças na acidez livre podem ser devido às diferentes fontes de néctar disponíveis em cada estação sazonal (ODDO *et al.*, 2008; FEÁS *et al.*, 2010).



**Figura 14.** Valores de acidez livre (mEq kg<sup>-1</sup>) para méis de abelhas avaliados nas estações seca e chuvosa, no Espírito Santo. Letras iguais indicam diferenças não significativas entre as médias de acordo com teste de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ). TA= *Tetragonisca angustula*; TC= *Tetragona clavipes*; MC= *Melipona capixaba*; MM= *Melipona mondury*; MQ= *Melipona quadrifasciata*; AM= *Apis mellifera*.

**Tabela 6.** Características físico-químicas nas amostras de méis de abelhas avaliadas por espécie no Espírito Santo (TA= *Tetragonisca angustula*; TC= *Tetragona clavipes*; MC= *Melipona capixaba*; MM= *Melipona mondury*; MQ= *Melipona quadrifasciata*; AM= *Apis mellifera*).

Espécie	Açúcar redutor % (m/m)	Açúcar Total % (m/m)	SST (°Brix)	Umidade % (m/m)	pH	Acidez livre (mEq kg <sup>-1</sup> )
TA	58,18± 5,02 <sup>b</sup>	59,49 ±4,28 <sup>b, c</sup>	68,20 ± 1,51 <sup> b</sup>	30,01 ± 1,50 <sup> a</sup>	4,0± 0,34 <sup> a</sup>	41,19± 11,51 <sup> b</sup>
TC	36,22± 2,71 <sup>c</sup>	39,18 ± 0,87 <sup>c</sup>	68,57 ± 0,89 <sup> b</sup>	31,10 ± 0,85 <sup> a</sup>	3,53± 0,08 <sup> a</sup>	171,84± 3,7 <sup> a</sup>
MC	66,85± 1,40 <sup>a</sup>	67,24± 1,41 <sup> a,b</sup>	70,18± 0,80 <sup> a,b</sup>	27,67 ± 1,48 <sup>a, b</sup>	3,57± 0,26 <sup> a</sup>	54,88± 3,25 <sup> a,b</sup>
MM	66,61± 4,74 <sup>a</sup>	68,92 ± 2,42 <sup> a,b</sup>	70,63± 1,51 <sup> a,b</sup>	28,16 ± 0,80 <sup> a,b</sup>	3,37 ± 0,22 <sup> b</sup>	33,19± 15,79 <sup> b</sup>
MQ	63,00± 2,52 <sup>a, b</sup>	65,0 ± 2,03 <sup> a,b,c</sup>	70,12± 1,19 <sup> a,b</sup>	28,48 ± 1,40 <sup> a,b</sup>	3,38 ± 0,21 <sup> b</sup>	20,96± 1,16 <sup> b</sup>

AM 64,58± 3,62<sup>a</sup> 72,13 ± 2,83<sup>a</sup> 75,43± 1,94<sup>a</sup> 22,93 ± 1,68<sup>b</sup> 3,62 ± 0,21<sup>a</sup> 56,86± 13,66<sup>a,b</sup>

Valores expressos como média ± desvio padrão. <sup>a-c</sup> Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as médias de acordo com teste de Dunn ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 7.** Características físico-químicas nas amostras de méis de abelhas avaliadas por espécie e estação sazonal no Espírito Santo (TA= *Tetragonisca angustula*; TC= *Tetragona clavipes*; MC= *Melipona capixaba*; MM= *Melipona mondury*; MQ= *Melipona quadrifasciata*; AM= *Apis mellifera*).

Espécie/E estação	Açúcar redutor % (m/m)	Açúcar total % (m/m)	SST (°Brix)	Umidade % (m/m)	pH	Acidez livre (mEq kg <sup>-1</sup> )
TA seca	62,68 ± 1,17 <sup>a</sup>	63,06 ± 0,0 <sup>b</sup>	66,9 ± 0,30 <sup>e</sup>	31,36 ± 0,25 <sup>a</sup>	4,1 ± 0,43 <sup>a</sup>	37,29 ± 11,22 <sup>d</sup>
TA chuvosa	53,68 ± 0,9 <sup>b</sup>	55,92 ± 2,76 <sup>c</sup>	69,6 ± 0,05 <sup>d</sup>	28,64 ± 0,15 <sup>d</sup>	3,88 ± 0,09 <sup>a</sup>	48,92 ± 3,5 <sup>c,d</sup>
TC seca	34,77 ± 2,93 <sup>c</sup>	38,54 ± 0,1 <sup>d</sup>	67,6 ± 0,58 <sup>e</sup>	30,4 ± 0,58 <sup>b</sup>	3,48 ± 0,88 <sup>a</sup>	175,42 ± 3,88 <sup>a</sup>
TC chuvosa	37,67 ± 1,86 <sup>c</sup>	39,78 ± 0,87 <sup>d</sup>	69,3 ± 0,08 <sup>d</sup>	31,79 ± 0,12 <sup>a</sup>	3,6 ± 0,08 <sup>a</sup>	170,18 ± 1,78 <sup>a</sup>
MC seca	65,87 ± 1,3 <sup>a</sup>	66,4 ± 1,7 <sup>a,b</sup>	69,4 ± 0,23 <sup>d</sup>	29,01 ± 0,2 <sup>c,d</sup>	3,44 ± 0,15 <sup>a</sup>	58,16 ± 0,11 <sup>c</sup>
MC chuvosa	67,84 ± 0,57 <sup>a</sup>	68,07 ± 0 <sup>a</sup>	71,9 ± 0,15 <sup>c</sup>	26,32 ± 0,1 <sup>f</sup>	3,7 ± 0,15 <sup>a</sup>	51,59 ± 1,25 <sup>c</sup>
MM seca	64,6 ± 5,96 <sup>a</sup>	66,99 ± 0,28 <sup>a,b</sup>	69,4 ± 0,26 <sup>d</sup>	28,85 ± 0,26 <sup>d</sup>	3,31 ± 0,2 <sup>a</sup>	47,63 ± 2,4 <sup>c,d</sup>
MM chuvosa	68,62 ± 2,91 <sup>a</sup>	70,85 ± 1,84 <sup>a</sup>	70,9 ± 0,28 <sup>c</sup>	27,46 ± 0,32 <sup>e</sup>	3,5 ± 0,07 <sup>a</sup>	18,85 ± 0,65 <sup>e</sup>
MQ seca	63,09 ± 3,33 <sup>a</sup>	65,37 ± 2,6 <sup>a,b</sup>	69 ± 0,057 <sup>d</sup>	29,74 ± 0,35 <sup>b,c</sup>	3,32 ± 0,11 <sup>a</sup>	19,9 ± 1,25 <sup>e</sup>
MQ chuvosa	62,91 ± 2,19 <sup>a</sup>	64,67 ± 1,79 <sup>a,b</sup>	71,2 ± 0 <sup>c</sup>	27,21 ± 0 <sup>e</sup>	3,56 ± 0,01 <sup>a</sup>	21,4 ± 1 <sup>e</sup>
AM seca	64,23 ± 5,59 <sup>a</sup>	74,48 ± 0,87 <sup>a</sup>	77,2 ± 0,2 <sup>a</sup>	21,4 ± 0 <sup>h</sup>	3,78 ± 0,11 <sup>a</sup>	45,48 ± 2,06 <sup>c,d</sup>
AM chuvosa	64,93 ± 1,08 <sup>a</sup>	69,76 ± 1,66 <sup>a</sup>	73,7 ± 0,05 <sup>b</sup>	24,46 ± 0,11 <sup>g</sup>	3,46 ± 0 <sup>a</sup>	69,24 ± 1,57 <sup>b</sup>

Valores expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as médias de acordo com teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## 4.2. Compostos fenólicos e atividade antioxidante

### 4.2.1 Polifenóis e flavonoides

#### *Análise Interespecífica*

Para o conteúdo fenólico, os valores médios encontrados para as diferentes espécies de mel variaram de 14,68 (MC) a 99,97 (TC) mg EAG.100 g<sup>-1</sup> e foram diferentes estatisticamente ( $p=0,00001$ ) (**Tabela 8**). Entre as espécies de abelhas, o mel de TC apresentou maior valor de polifenóis comparado à MC, MM e MQ ( $p=0,0002$ ;  $p=0,008$ ;  $p=0,0005$ ). Os valores de polifenóis obtidos nesse estudo são semelhantes aos encontrados por Biluca *et al.* (2016), 10,3 a 98,0 mg EAG 100 g<sup>-1</sup>.

Para os flavonoides, os resultados médios variaram de 4,52 a 13,27 mgQE.100g<sup>-1</sup> entre as espécies ( $p=0,0005$ ) (**Tabela 8**). Semelhante ao resultado de

polifenóis observou-se que para flavonoides, o mel da espécie TC também apresentou maior valor comparado à MC, MM e AM ( $p=0,0002$ ;  $p=0,012$ ;  $p=0,042$ ). De maneira similar, DUARTE *et al.* (2018) analisaram os teores de polifenóis e flavonoides de mel de ASF e observaram que o mel da *Tetragona clavipes* obteve maiores valores comparados às outras espécies.

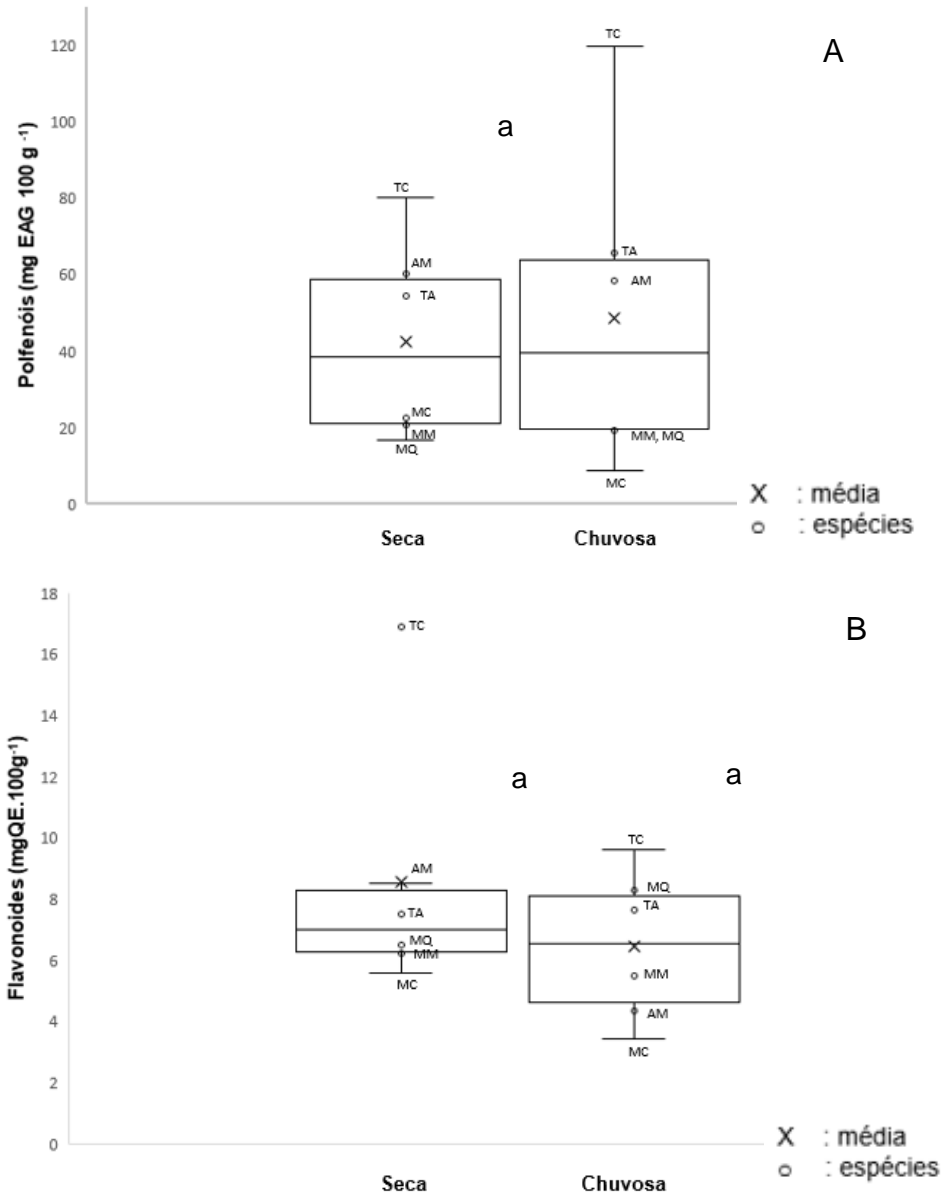
Esse resultado do mel da espécie *Tetragona clavipes* ter maiores valores de polifenóis e flavonoides, comparado às demais espécies de abelhas avaliadas, pode estar relacionado à própolis contida nos ninhos desta espécie. Os materiais contidos nos potes que armazenam o mel são própolis e cera (NOGUEIRA-NETO, 1997). Pyrzynska e Biesaga (2009) apontaram que variações no conteúdo fenólico entre as amostras de mel podem ser devido às diferentes fontes de néctar da composição de plantas distintas geograficamente.

### **Sazonalidade**

Os valores médios de polifenóis foram de 42,48 e 48,72 mgEAG.100 g<sup>-1</sup> para a estação seca e chuvosa e de flavonoides foram de 6,47 e 8,55 mgQE.100g<sup>-1</sup> para a estação chuvosa e seca, não houve diferença estatística ( $p=0,886$ ;  $p=0,205$ ) (**Figura 15**). 60% dos méis de abelha sem ferrão apresentaram maiores valores de polifenóis na estação chuvosa e para flavonoides na estação seca. Para o mel de *Apis mellifera*, polifenóis e flavonoides foram maiores na estação seca (**Tabela 9**). As abelhas coletam resinas, seiva e substratos de plantas para a nidificação principalmente no período de chuvas, podendo influenciar na variação de polifenóis presentes no mel entre as estações sazonais, pois este elemento está em contato direto com os potes feitos de resina (NASCIMENTO *et al.*, 2019). François *et al.* (2018), ao analisarem méis coletados na estação seca e chuvosa, também constataram maiores valores de polifenóis no período chuvoso. Estes autores também encontraram maiores teores de flavonoides na estação seca. O estresse hídrico pode aumentar os metabólitos secundários, principalmente os flavonoides e assim, contribui na abundância de metabólitos, pois os flavonoides são conhecidos por protegerem as plantas (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Neste sentido, essa variação dos polifenóis e flavonoides na composição do mel entre as estações pode ser devido às diferenças dos fatores abióticos existentes em cada estação e suas relações com a biossíntese de plantas visitadas pelas abelhas, pois, fatores como intensidade de luz, temperatura, umidade, precipitação podem

influenciar diretamente na concentração de polifenóis e flavonoides na planta (NASCIMENTO *et al.*, 2019). Fatores bióticos como a composição florística entre as estações também podem estar influenciando nos valores de polifenóis e flavonoides do mel (GODFREY, 2018).



**Figura 15.** Valores de polifenóis (A) e flavonoides (B) para méis de abelhas avaliados nas estações seca e chuvosa, no Espírito Santo. Letras iguais indicam diferenças não significativas entre as médias de acordo com teste de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ). TA= *Tetragonisca angustula*; TC= *Tetragona clavipes*; MC= *Melipona capixaba*; MM= *Melipona mondury*; MQ= *Melipona quadrifasciata*; AM= *Apis mellifera*.



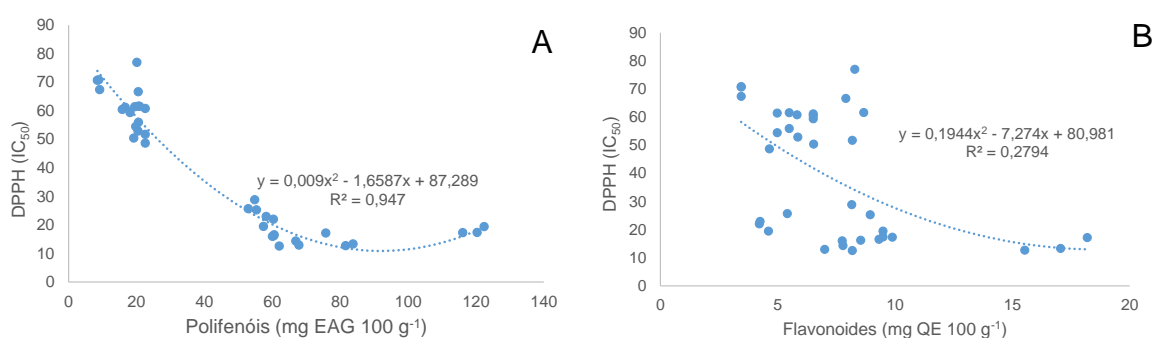
## 4.2.2 DPPH

### **Análise Interespecífica**

Para os resultados de DPPH, o valor de IC<sub>50</sub> para o mel das diferentes espécies variou de 16,36 (TC) a 64,4 mg.mL<sup>-1</sup> (MQ) (p=0,00003) (**Tabela 8**). Essa variação também foi relatada por outros estudos (OLIVEIRA *et al.*, 2012; KHONGKWANMUEANG *et al.*, 2020). Dentre as espécies avaliadas, os valores de DPPH em méis de TC, TA e AM foram significativamente menores de MC e MQ (p=0,018; p=0,005; p=0,024). No estudo de Aroucha *et al.* (2019), também foi identificado que o mel de *Apis mellifera* apresentou maior atividade antioxidante para DPPH quando comparado com o mel de *Melipona*.

Uma forte relação entre DPPH e teor total de polifenóis foi observada para as amostras de méis (R<sup>2</sup>= 0,94), no qual menores valores de DPPH estão relacionados com maiores valores de polifenóis obtidos (**Figura 16A**). O mel da espécie TC, por exemplo, apresentou maior atividade antioxidante no método de DPPH e também apresentou maiores valores de polifenóis. Esses resultados estão em concordância com o trabalho de Boussaid *et al.* (2018) e Degirmenci *et al.* (2020), que observaram uma correlação entre a atividade de eliminação do radical DPPH e a quantidade de polifenóis totais. A atividade antioxidante do mel pode ser atribuída aos seus compostos fenólicos (DEGIRMENCI *et al.*, 2020). Além disso, sabe-se que uma maior atividade antioxidante é encontrada em méis escuros, pela maior quantidade de polifenóis (WILCZYŃSKA, 2014), e foi observado nesse estudo que o mel de TC e AM são mais escuros comparado à MC e MQ.

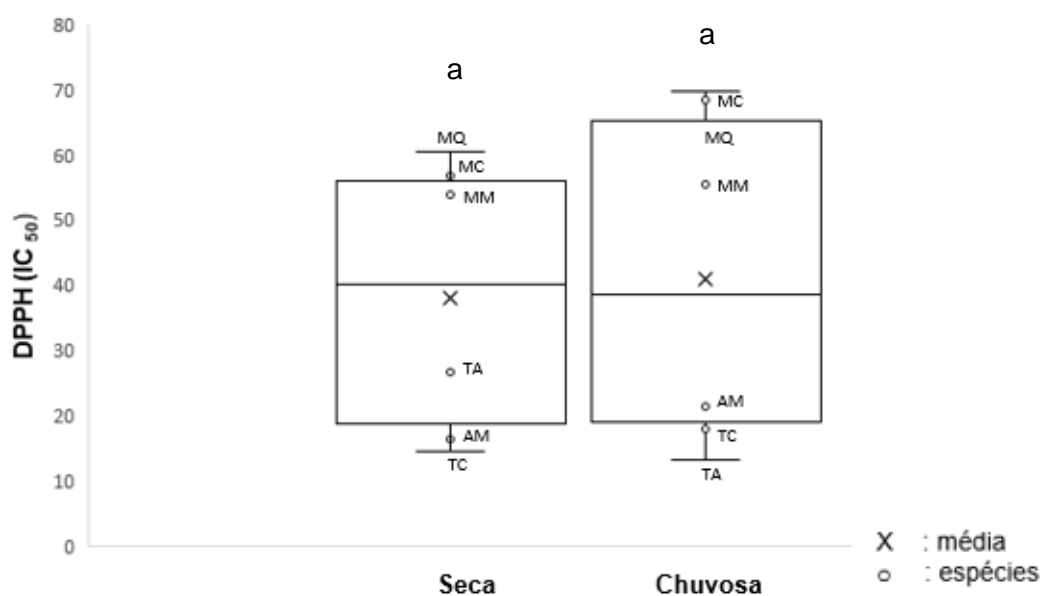
De acordo com os valores de flavonoides totais e DPPH, foi observada uma baixa relação (R<sup>2</sup>= 0,27) (**Figura 16B**). Esse resultado, sugere que os flavonoides não são os principais componentes que exercem a atividade antioxidante dos méis estudados.



**Figura 16.** Relação dos polifenóis (A) e flavonoides (B) com DPPH dos méis de abelhas avaliados, no Espírito Santo.

### Sazonalidade

O valor médio do mel de IC<sub>50</sub> para DPPH foi de 41,07 mg.mL<sup>-1</sup> na estação chuvosa e 38,05 mg.mL<sup>-1</sup> na estação seca e não houve diferença significativa entre as estações (p=0,457) (**Figura 17**). 80% dos méis de abelha sem ferrão e o mel da *Apis mellifera* apresentaram maior atividade antioxidante de DPPH na estação seca (**Tabela 9**). A atividade antioxidante pode modificar de acordo com os fatores sazonais e ambientais (BIESAGA; PYRZYŃSKA, 2013; WILCZYŃSKA, 2014).



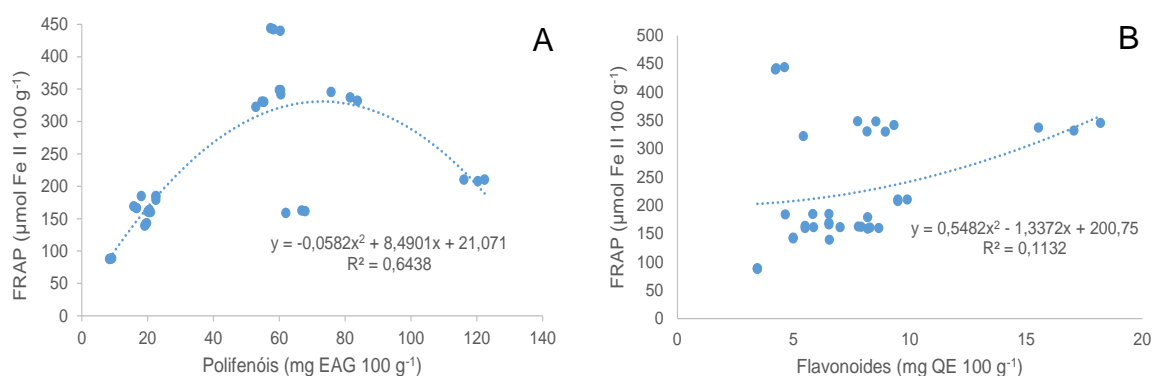
**Figura 17.** Valores de DPPH para méis de abelhas avaliados nas estações seca e chuvosa, no Espírito Santo. Letras iguais indicam diferenças não significativas entre as médias de acordo com teste de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ). TA= *Tetragonisca angustula*; TC= *Tetragona clavipes*; MC= *Melipona capixaba*; MM= *Melipona mondury*; MQ= *Melipona quadrifasciata*; AM= *Apis mellifera*.

### 4.2.3 FRAP

#### Análise Interespecífica

Para FRAP, os valores médios encontrados para méis de diferentes espécies de abelhas variaram de 125,2 (MC) a 394,36 (AM)  $\mu\text{mol Fe II } 100\text{g}^{-1}$  ( $p=0,0001$ ) (**Tabela 8**). Dentre as espécies, o mel de AM foi significativamente maior comparado à MC, MM e MQ ( $p=0,0002$ ;  $p=0,009$ ;  $p=0,019$ ).

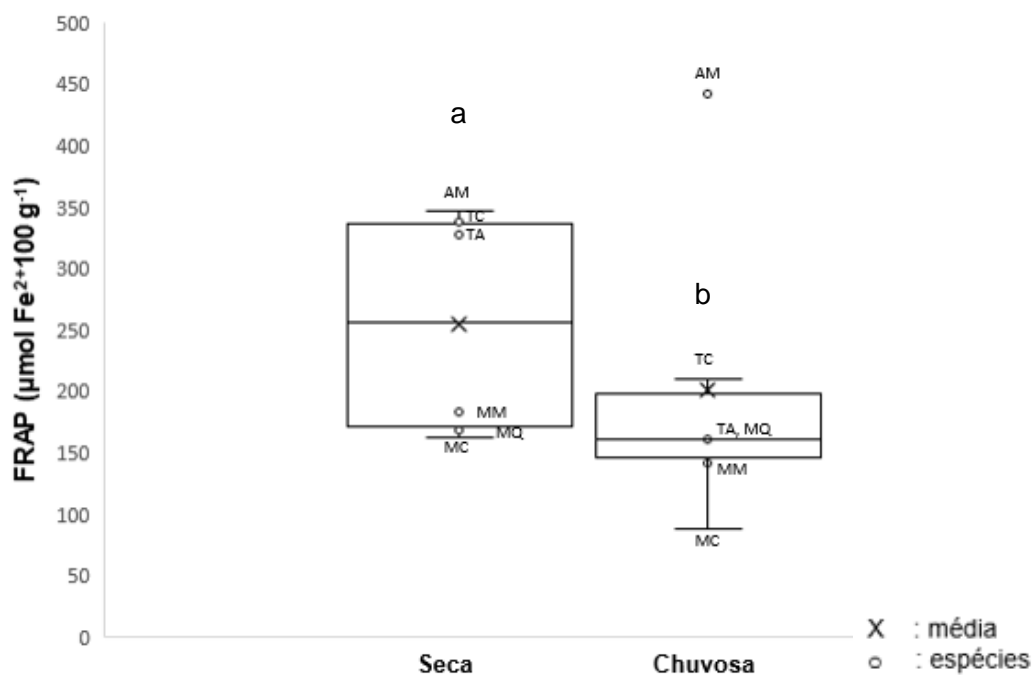
Uma relação moderada foi observada entre os valores de FRAP e o teor total de polifenóis obtidos para as amostras de mel ( $R^2=0,64$ ) (**Figura 18A**). No entanto, para o conteúdo de flavonoides totais e FRAP foi observada uma relação baixa ( $R^2=0,11$ ) (**Figura 18B**). De acordo com os resultados, os compostos fenólicos contribuíram para a capacidade antioxidante dos méis avaliados e os flavonoides podem não ser considerados os principais componentes que exercem a atividade antioxidante dos méis estudados.



**Figura 18.** Relação dos polifenóis (**A**) e flavonoides (**B**) com FRAP dos méis de abelhas avaliados, no Espírito Santo.

### **Sazonalidade**

Os valores médios de FRAP para méis foi de 200,7 e 254,19  $\mu\text{mol Fe II } 100\text{g}^{-1}$  para a estação chuvosa e seca, respectivamente, apresentando diferença significativa entre as estações ( $p=0,019$ ) (**Figura 19**). Todas os méis de ASF apresentaram maiores valores de FRAP para a estação seca, contudo para o mel de *Apis mellifera* o maior valor foi na estação chuvosa (**Tabela 9**). Na estação seca, o estresse hídrico pode aumentar a concentração e a composição de metabólitos secundários como forma de proteção das plantas, e conseqüentemente aumentar a atividade antioxidante deste mel (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).



**Figura 19.** Valores de FRAP para méis de abelhas avaliados nas estações seca e chuvosa, no Espírito Santo. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as médias de acordo com teste de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ). TA= *Tetragonisca angustula*; TC= *Tetragona clavipes*; MC= *Melipona capixaba*; MM= *Melipona mondury*; MQ= *Melipona quadrifasciata*; AM= *Apis mellifera*.

**Tabela 8.** Polifenóis, flavonoides, capacidade antioxidante por captura de radical (DPPH) e redução férrica (FRAP) em amostras de mel de abelhas avaliadas no Espírito Santo (TA= *Tetragonisca angustula*; TC= *Tetragona clavipes*; MC= *Melipona capixaba*; MM= *Melipona mondury*; MQ= *Melipona quadrifasciata*; AM= *Apis mellifera*).

Espécie	Polifenóis (mg EAG 100 g <sup>-1</sup> )	Flavonoides (mgQE.100g <sup>-1</sup> )	DPPH (IC <sub>50</sub> )	FRAP (µmol Fe <sup>2+</sup> ·100 g <sup>-1</sup> )
TA	59,94 ± 6,52 <sup>a,b</sup>	7,58 ± 1,23 <sup>a,b</sup>	19,99 ± 7,41 <sup>b</sup>	244,62 ± 91,46 <sup>a,b</sup>
TC	99,97 ± 21,74 <sup>a</sup>	13,27 ± 4,09 <sup>a</sup>	16,25 ± 2,62 <sup>b</sup>	274,02 ± 70,74 <sup>a,b</sup>
MC	14,68 ± 6,48 <sup>b</sup>	4,52 ± 1,20 <sup>b</sup>	63,23 ± 7,66 <sup>a</sup>	125,20 ± 40,28 <sup>b</sup>
MM	20,97 ± 1,70 <sup>b</sup>	5,85 ± 1,33 <sup>b</sup>	54,60 ± 5,39 <sup>a,b</sup>	162,18 ± 22,83 <sup>b</sup>
MQ	18,59 ± 2,07 <sup>b</sup>	7,40 ± 1,00 <sup>a,b</sup>	64,40 ± 6,66 <sup>a</sup>	164,30 ± 3,49 <sup>b</sup>
AM	59,45 ± 1,35 <sup>a,b</sup>	6,44 ± 2,35 <sup>b</sup>	18,00 ± 3,08 <sup>b</sup>	394,36 ± 52,54 <sup>a</sup>

Valores expressos como média ± desvio padrão. <sup>a-b</sup> Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as médias de acordo com teste de Dunn ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 9.** Polifenóis, flavonoides, capacidade antioxidante por captura de radical (DPPH) e redução férrica (FRAP) em amostras de mel de espécies de abelhas avaliadas de acordo com a estação sazonal no Espírito Santo (TA= *Tetragonisca angustula*; TC= *Tetragona*

*clavipes*; MC= *Melipona capixaba*; MM= *Melipona mondury*; MQ= *Melipona quadrifasciata*; AM= *Apis mellifera*).

Espécie/ Estação	Polifenóis (mg EAG 100 g <sup>-1</sup> )	Flavonoides (mgQE.100g <sup>-1</sup> )	DPPH (IC <sub>50</sub> )	FRAP (μmol Fe <sup>2+</sup> 100 g <sup>-1</sup> )
TA seca	54,31 ± 1,27 <sup>f</sup>	7,5 ± 1,85 <sup>b</sup>	26,64 ± 1,94 <sup>c</sup>	328,05 ± 4,73 <sup>c</sup>
TA chuvosa	65,55 ± 3,12 <sup>c,d</sup>	7,65 ± 0,6 <sup>b</sup>	13,33 ± 0,92 <sup>d</sup>	161,18 ± 1,89 <sup>f</sup>
TC seca	80,34 ± 4,15 <sup>b</sup>	16,92 ± 1,33 <sup>a</sup>	14,42 ± 2,39 <sup>d</sup>	338,46 ± 6,91 <sup>b</sup>
TC chuvosa	119,58 ± 3,2 <sup>a</sup>	9,61 ± 0,23 <sup>b</sup>	18,06 ± 1,22 <sup>c,d</sup>	209,57 ± 1,36 <sup>d</sup>
MC seca	20,58 ± 0,23 <sup>g</sup>	5,61 ± 0,21 <sup>b,c</sup>	56,81 ± 4,41 <sup>b</sup>	165,95 ± 1,71 <sup>f</sup>
MC chuvosa	8,77 ± 0,33 <sup>h</sup>	3,43 ± 0 <sup>c</sup>	69,65 ± 1,94 <sup>a</sup>	88,44 ± 0,53 <sup>h</sup>
MM seca	22,51 ± 0 <sup>g</sup>	6,21 ± 1,8 <sup>b,c</sup>	53,76 ± 6,30 <sup>b</sup>	182,9 ± 3,1 <sup>e</sup>
MM chuvosa	19,42 ± 0,28 <sup>g</sup>	5,49 ± 0,89 <sup>b,c</sup>	55,43 ± 5,55 <sup>b</sup>	141,44 ± 1,92 <sup>g</sup>
MQ seca	16,82 ± 1,14 <sup>g</sup>	6,51 ± 0,00 <sup>b,c</sup>	60,36 ± 0,90 <sup>a,b</sup>	167,28 ± 1,53 <sup>f</sup>
MQ chuvosa	20,35 ± 0,24 <sup>g</sup>	8,28 ± 0,37 <sup>b</sup>	68,43 ± 7,81 <sup>a</sup>	161,32 ± 1,16 <sup>f</sup>
AM seca	60,3 ± 0,25 <sup>d,e</sup>	8,53 ± 0,78 <sup>b</sup>	16,29 ± 0,27 <sup>d</sup>	346,36 ± 3,85 <sup>b</sup>
AM chuvosa	58,6 ± 1,51 <sup>e,f</sup>	4,35 ± 0,21 <sup>c</sup>	21,51 ± 1,78 <sup>c,d</sup>	442,25 ± 2 <sup>a</sup>

Valores expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as médias de acordo com teste de Tukey (p<0,05).

### 4.3 Composição química pelo ESI (-) FT-ICR MS

De acordo com a **Tabela 10**, compreende-se que a composição do mel pode variar de acordo com a espécie de abelha e a sazonalidade. Observa-se que a glicose, íon [C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>ClO<sub>6</sub>] de m/z 215 e sacarose, íon [C<sub>12</sub>H<sub>21</sub>O<sub>11</sub>] de m/z 341 foram identificados em todas as amostras analisadas. O 3,4,5-Trimethoxycinnamic acid íon [C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>O<sub>5</sub>] de m/z 237, 2',3,4,5'-Tetramethoxychalcone íon [C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>O<sub>5</sub>] de m/z 327, Sinapinic acid-O-glucuronide isomer íon [C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>O<sub>11</sub>] de m/z 399, Ethyl 3-[3-hydroxy-6-(hydroxymethyl)-4-oxo-4H-pyran-2-yl]-3-(3-isobutoxy-4-methoxyphenyl)propanoate íon [C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>O<sub>8</sub>] de m/z 419, Lethedoside A íon [C<sub>24</sub>H<sub>25</sub>O<sub>11</sub>] de m/z 489, Methyl 3-[2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4-oxo-4H-chromen-8-yl]-3-[4-hydroxy-3,5-bis(2-methyl-2-propanyl)phenyl]propanoate íon [C<sub>33</sub>H<sub>35</sub>O<sub>10</sub>] de m/z 591 e 5',6'-

Dihydroxy-2,2',4,4'-tetramethoxy-5,6-dioxo-5,6-dihydro-1,1'-binaphthalene-7,7'-diyl)di(2R)-1,2-propanediyl diacetate íon [C<sub>34</sub>H<sub>35</sub>O<sub>12</sub>] de m/z 635 foram identificados apenas na amostra TA seca. E o composto 3,4,5-Trimethoxycinnamic acid é um ácido fenólico com propriedades antitumorais, analgésicas e anti-inflamatória descritas na literatura (ABD EL-GHANY, 2017). O Sinapinic acid-O-glucuronide isomer, comumente encontrado em alimentos, também possui atividades antioxidantes e antimicrobianas (NIU *et al.*, 2020). O composto 2',3,4,5'-Tetramethoxychalcone pertence à classe das chalconas, que são moléculas conhecidas pelas propriedades anticâncer e antioxidantes (SIIMA *et al.*, 2020). Os compostos Lethedoside A e Methyl 3-[2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4-oxo-4H-chromen-8-yl]-3-[4-hydroxy-3,5-bis(2-methyl-2-propanyl)phenyl]propanoate pertencem à classe dos flavonoides. Portanto, considerando a presença desses compostos no mel TA seca, pode-se observar que a atividade antioxidante ligeiramente aumentada dessa amostra esteja relacionada à composição química diferente das demais amostras analisadas.

O composto 2-(2,3-Dihydroxy-4-methoxyphenyl)-5,7-dihydroxy-3,6-dimethoxy-2,3-dihydro-4H-chromen-4-one, íon [C<sub>18</sub>H<sub>17</sub>O<sub>9</sub>] de m/z 377, um flavonoide, foi identificado em todas as amostras testadas, enquanto o composto 5-Hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-8,8-dimethyl-6-(3-methyl-2-buten-1-yl)-2,3-dihydro-4H,8H-pyrano[2,3-f]chromen-4-one íon [C<sub>25</sub>H<sub>25</sub>O<sub>5</sub>] de m/z 405, só não foi identificado na amostra TC seca. Para o mel de TA chuvosa, foram encontrados o composto 2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-3,5-dihydroxy-10-isopropyl-9,10-dihydro-4H,8H-pyrano[2,3-f]chromene-4,8-dione, íon [C<sub>21</sub>H<sub>17</sub>O<sub>8</sub>] de m/z 397, que também é um flavonoide, e o composto 2-Acetyl-8-hydroxy-1,7-bis(3-methylbutyl)-9-oxo-9H-xanthene-3,6-diyl dibenzoate, íon [C<sub>39</sub>H<sub>37</sub>O<sub>8</sub>] de m/z 633, uma xantona que tem propriedades antioxidantes e pode auxiliar no tratamento do câncer (SANTOS *et al.*, 2003). O composto 3-(4-Hydroxyphenyl)-5-methoxy-8,8-dimethyl-10-(3-methyl-2-buten-1-yl)-2-oxo-2H,8H-pyrano[3,2-g]chromen-4-yl acetate, íon [C<sub>28</sub>H<sub>27</sub>O<sub>7</sub>] de m/z 475 é uma cumarina com propriedades anticoagulante, anticâncer, antioxidante e anti-inflamatório (FRANCO *et al.*, 2020). O composto 6-O-[(2E)-3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-propenoyl]-β-D-fructofuranosyl 6-O-acetyl-α-D-glucopyranoside é um ácido fenólico que foi encontrado na espécie TC nas duas estações.

Também foram identificados quercetina, cumarina, ácido cafeico, Kaempferol, Catequina, naringina. Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de Biluca *et al.* (2020), apresentando os compostos como, ácido cafeico, narigenina e quercetina

em méis de abelha sem ferrão. Sousa et al. (2016) encontrou compostos como, 2,4-dihidroxibenzóico, ferúlico, elagênico, miricetina, catequina, rutina, kaempferol, hesperetina e crisina. Portanto, compostos como flavonóides encontrados nos méis avaliados, contribui para afirmar que o mel pode ser importante na dieta e pode ajudar a prevenir possíveis efeitos adversos à saúde (NASCIMENTO et al., 2018).

Os flavonoides são metabólitos secundários encontrados em produtos naturais e auxiliam no controle de doenças inflamatórias crônicas, além de possuírem propriedades antioxidantes (SILVA *et al.*, 2021). Considerando que o mel é produzido a partir da coleta pelas abelhas de diferentes néctares de acordo com a variedade de plantas da região, é esperada que haja uma grande variação no perfil de flavonoides entre as amostras de mel, principalmente pelas diferentes condições climáticas e espécies avaliadas (SILVA *et al.*, 2021).

**Tabela 10.** Compostos químicos identificados pelo ESI (-) FT-ICR MS dos méis das espécies de abelhas sem ferrão e acordo com a estação sazonal no Espírito Santo (TA= *Tetragonisca angustula*; TC= *Tetragona clavipes*; MC= *Melipona capixaba*; MM= *Melipona mondury*; MQ= *Melipona quadrifasciata*; AM= *Apis mellifera*).

[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	Fórmula Molecular [M-H] <sup>-</sup>	DBE	Erro (ppm)	Possível Composto químico	Méis											
					TA 2	TA 9	TC 2	TC 9	MC 2	MC 9	MM 2	MM 9	MQ 2	MQ 9	AM 2	AM 9
163.04016	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub>	6	-0,56	Ácido p-cumárico	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	D
179.03505	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>4</sub>	6	-0,40	Ácido cafeico	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	ND
179.05617	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub>	1	-1,40	Glicose	ND	ND	ND	ND	D	ND	ND	D	D	ND	ND	D
195.05133	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>7</sub>	1	-1,53	Ácido gluconico	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	ND	D	D
215.03299	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> ClO <sub>6</sub>	-	-0,95	Glicose	D	D	D	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
237.07703	C <sub>12</sub> H <sub>13</sub> O <sub>5</sub>	6	-0,77	3,4,5-Trimethoxycinnamic acid	ND	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
285.04057	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>6</sub>	11	-0,86	Kaempferol	ND	ND	D	ND	ND	ND	ND	D	ND	D	ND	D
289.07206	C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> O <sub>6</sub>	9	-1,03	Catequina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D
293.10343	C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> O <sub>6</sub>	7	-1,25	Cumarina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	ND
301.03574	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>7</sub>	11	-1,04	Quercetina	ND	D	D	D	ND	ND	ND	D	D	D	D	D
327.12405	C <sub>19</sub> H <sub>19</sub> O <sub>5</sub>	10	-0,76	2',3,4,5'-Tetramethox chalcone	D	ND	D	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
345.11966	C <sub>15</sub> H <sub>21</sub> O <sub>9</sub>	5	-1,61	4-Hydroxy-3,5- dimethoxybenzyl α-L- galactopyranoside	D	ND	D	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
377.08594	C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> O <sub>9</sub>	8	1,87	Ácido c salvianico	ND	ND	ND	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
377.08628	C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> O <sub>9</sub>	10	4,05	2-(2,3-Dihydroxy-4- methoxyphenyl)-5,7- dihydroxy-3,6-dimethoxy- 2,3-dihydro-4H-chromen-4-	D	D	D	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND



				one													
395.09688	C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> O <sub>10</sub>	9	3,77	Methyl 4-(β-L-glucopyranosyloxy)-1,5-dihydroxy-2-naphthoate	D	D	D	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
397.09398	C <sub>21</sub> H <sub>17</sub> O <sub>8</sub>	13	-2,74	2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-3,5-dihydroxy-10-isopropyl-9,10-dihydro-4H,8H-pyrano[2,3-f]chromene-4,8-dione	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
399.09376	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> O <sub>11</sub>	8	-1,18	Sinapinic acid-O-glucuronide isomer	ND	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
405.17129	C <sub>25</sub> H <sub>25</sub> O <sub>5</sub>	13	-1,34	5-Hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-8,8-dimethyl-6-(3-methyl-2-buten-1-yl)-2,3-dihydro-4H,8H-pyrano[2,3-f]chromen-4-one	D	D	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
419.17168	C <sub>22</sub> H <sub>27</sub> O <sub>8</sub>	9	-1,28	Ethyl 3-[3-hydroxy-6-(hydroxymethyl)-4-oxo-4H-pyran-2-yl]-3-(3-isobutoxy-4-methoxyphenyl)propanoate	ND	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
475.17699	C <sub>28</sub> H <sub>27</sub> O <sub>7</sub>	15	-1,62	3-(4-Hydroxyphenyl)-5-methoxy-8,8-dimethyl-10-(3-methyl-2-buten-1-yl)-2-oxo-2H,8H-pyrano[3,2-g]chromen-4-yl acetate	ND	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
489.14102	C <sub>24</sub> H <sub>25</sub> O <sub>11</sub>	12	-1,60	Lethedoside A	ND	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
539.13903	C <sub>24</sub> H <sub>27</sub> O <sub>14</sub>	11	1,60	Flavonol hexosídeo hidratado	ND	ND	ND	ND	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
539.13981	C <sub>24</sub> H <sub>27</sub> O <sub>14</sub>	11	1,52	4-Hydroxy-7-methoxy-3-oxo-1,3-dihydronaphtho[2,3-c]furan-5-yl 6-O-β-D-xylopyranosyl-β-D-glucopyranoside	D	ND	D	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
559.16515	C <sub>24</sub> H <sub>31</sub> O <sub>15</sub>	9	3,03	-O-[(2E)-3-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-propenoyl]-β-D-fructofuranosyl 6-O-acetyl-α-	ND	ND	D	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

				D-glucopyranoside													
579.17154	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> O <sub>14</sub>	12	0,67	Naringina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	ND	ND	ND
591.22487	C <sub>33</sub> H <sub>35</sub> O <sub>10</sub>	16	-2,20	Methyl 3-[2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4-oxo-4H-chromen-8-yl]-3-[4-hydroxy-3,5-bis(2-methyl-2-propanyl)phenyl]propanoate	ND	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
615.10839	C <sub>39</sub> H <sub>19</sub> O <sub>8</sub>	30	0,15	Quercetina galoiil hexosídeo isômero	ND	ND	ND	ND	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
633.24919	C <sub>39</sub> H <sub>37</sub> O <sub>8</sub>	21	0,32	2-Acetyl-8-hydroxy-1,7-bis(3-methylbutyl)-9-oxo-9H-xanthene-3,6-diyl dibenzoate	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
635.21464	C <sub>34</sub> H <sub>35</sub> O <sub>12</sub>	17	-1,95	5',6'-Dihydroxy-2,2',4,4'-tetramethoxy-5,6-dioxo-5,6-dihydro-1,1'-binaphthalene-7,7'-diyl)di(2R)-1,2-propanediyl diacetate	ND	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
713.1141	C <sub>36</sub> H <sub>25</sub> O <sub>16</sub>	24	0,99	(2R,2'R)-2,2'-[(6,9,10-Trihydroxybenzo[kl]xanthene-1,2-diyl)bis(carbonyloxy)]bis[3-(3,4-dihydroxyphenyl)propanoic acid]	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

\*DBE: número de instauração da molécula

\*\*ND: não detectado

\*\*\*D: detectado

## 4.4 Viabilidade celular e atividade quimiopreventiva

### 4.4.1 Viabilidade celular (MTT)

O efeito das amostras sobre a viabilidade celular, pelo método MTT, nas linhagens de fibroblastos (L929) e macrófagos (RAW 264.7), indicou que todos os méis não apresentaram citotoxicidade nas concentrações avaliadas ( $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (**Tabela 11**). No estudo de Biluca *et al.* (2020), os méis de abelha sem ferrão também não foram citotóxicos.

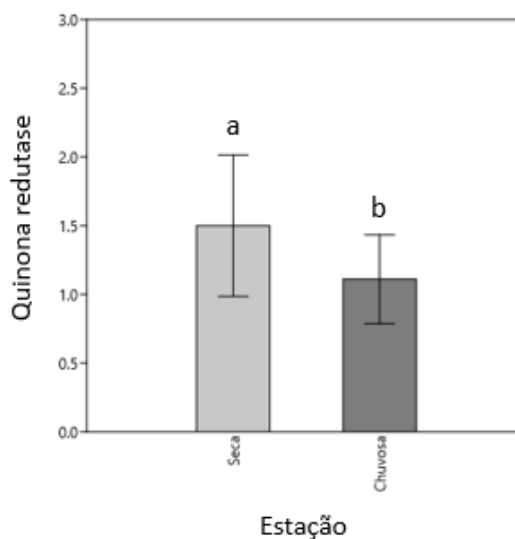
### 4.4.2 Indução da Quinona Redutase

#### ***Análise Interespecífica***

As amostras de méis, independente da sazonalidade, foram avaliadas *in vitro* quanto ao seu potencial para induzir a quinona redutase, uma enzima quimioprotetora de fase II representativa. Os valores encontrados para méis das diferentes espécies apresentaram DC médio de 1 ( $p=0,71$ ) (**Tabela 11**). Diante desses resultados, nenhuma amostra de mel, avaliada em conjunto, apresentou DC maior que 2, quando avaliados de acordo com a espécie.

#### ***Sazonalidade***

Os valores médios da indução da quinona redutase foram de DC igual a  $1 \pm 0,2$  e  $1 \pm 0,3$ , para a estação seca e chuvosa ( $p=0,013$ ) (**Figura 20**). De acordo com a estação coletada, o mel da espécie MQ e TC coletados na estação seca, foram ativos, com DC igual a 2 (**Tabela 12**). Esse resultado do mel da espécie *Tetragona clavipes*, pode estar relacionado aos maiores valores de polifenóis e flavonoides (FAHEY; STEPHENSON, 2002).



**Figura 20.** Valores de indução da quinona redutase para méis de abelhas avaliados nas estações seca e chuvosa, no Espírito Santo.

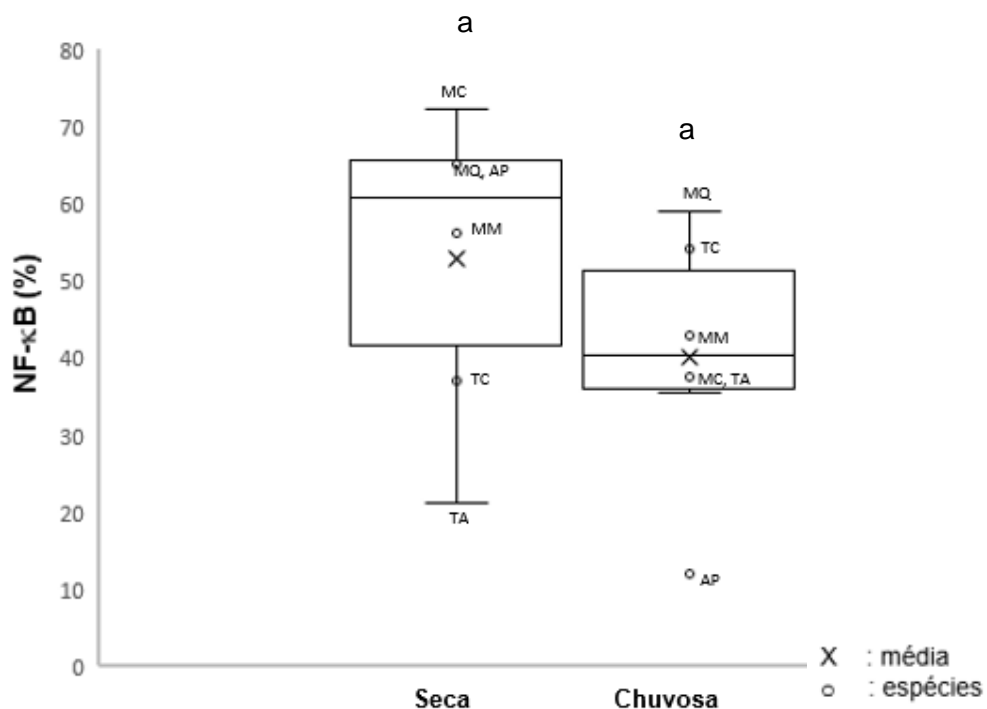
#### 4.4.3 Atividade inibitória de NF- $\kappa$ B

##### *Análise Interespecífica*

Para a inibição da ativação de NF- $\kappa$ B, os valores médios encontrados para os méis das diferentes espécies variaram de 29,5 a 63%, contudo não foram significativamente diferentes ( $p=0,087$ ). Os resultados demonstram que todos os méis têm potencial atividade anti-inflamatória (**Tabela 11**). As amostras não apresentaram resposta dose dependente.

##### *Sazonalidade*

Os valores médios da inibição do NF- $\kappa$ B dos méis foram de 39,8% a 51,5%, para a estação chuvosa e seca, respectivamente, contudo não apresentaram diferença significativa ( $p=0,08$ ) (**Figura 21**). Os méis amostrados nesse estudo são considerados inibidores moderados do NF- $\kappa$ B, sendo a espécie MC da estação seca considerada forte inibidora por ter apresentado inibição de 72,33% (**Tabela 12**). Essa maior inibição do NF- $\kappa$ B no mel a estação seca, pode ser justificado pela maior produção de metabólitos secundários na estação seca (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).



**Figura 21.** Valores de inibição do NF- $\kappa$ B para méis de abelhas avaliados nas estações seca e chuvosa, no Espírito Santo. Letras iguais indicam diferenças não significativas entre as médias de acordo com teste de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ). TA= *Tetragonisca angustula*; TC= *Tetragona clavipes*; MC= *Melipona capixaba*; MM= *Melipona mondury*; MQ= *Melipona quadrifasciata*; AM= *Apis mellifera*.

**Tabela 11.** Viabilidade celular, indução da Quinona Redutase e inibição do NF- $\kappa$ B em amostras de mel de espécies de abelhas avaliadas no Espírito Santo: TA= *Tetragonisca angustula*; TC= *Tetragona clavipes*; MC= *Melipona capixaba*; MM= *Melipona mondury*; MQ= *Melipona quadrifasciata*; AM= *Apis mellifera*.

Espécie	Viabilidade celular (L929) (%)	Viabilidade celular (RAW 264.7) (%)	Quinona Redutase (DC)	NF- $\kappa$ B (%)
TA	107,19 $\pm$ 8,01	100,3 $\pm$ 2,33	1 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	29,50 $\pm$ 17,43 <sup>a</sup>
TC	98,93 $\pm$ 4,80	107,2 $\pm$ 4,73	1 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	47,4 $\pm$ 14,15 <sup>a</sup>
MC	110,34 $\pm$ 5,98	98,81 $\pm$ 6,12	1 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	57,6 $\pm$ 23,14 <sup>a</sup>
MM	116,64 $\pm$ 7,37	103,71 $\pm$ 6,43	1 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	49,6 $\pm$ 14,68 <sup>a</sup>
MQ	115,59 $\pm$ 14,17	104,96 $\pm$ 2,91	1 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	63 $\pm$ 10,49 <sup>a</sup>
AM	97,77 $\pm$ 4,31	96,32 $\pm$ 3,95	1 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	38,6 $\pm$ 30,87 <sup>a</sup>

Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão. <sup>a</sup> Letras iguais na mesma coluna indicam não diferenças significativas entre as médias de acordo com teste de Dunn ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 12.** Viabilidade celular, indução da Quinona Redutase e inibição do NF-κB em amostras de mel de espécies de abelhas avaliadas no Espírito Santo: TA= *Tetragonisca angustula*; TC= *Tetragona clavipes*; MC= *Melipona capixaba*; MM= *Melipona mondury*; MQ= *Melipona quadrifasciata*; AM= *Apis mellifera*, de acordo com as estações sazonais.

Espécie/ Estação	Viabilidade celular (L929) (%)	Viabilidade celular (RAW 264.7)(%)	Quinona Redutase (DC)	NF-κB (%)
TA seca	108,75 ± 0,98	101,7 ± 2,68	1 ± 0,3	21,33 ± 23,43
TA chuvosa	100,35 ± 1,09	98,85 ± 1,06	1 ± 0,1	37,70 ± 3,21
TC seca	102,70 ± 2,12	111,05 ± 0,91	<b>2 ± 0,1</b>	37,00 ± 14,14
TC chuvosa	95,15 ± 2,75	103,35 ± 2,61	1 ± 0,0	54,30 ± 10,96
MC seca	107,75 ± 8,98	103,40 ± 0,42	1 ± 0,2	72,33 ± 13,57
MC chuvosa	113,40 ± 0,98	91,85 ± 8,69	1 ± 0,0	35,50 ± 12,02
MM seca	116,20 ± 12,58	108,10 ± 1,13	1 ± 0,3	56,33 ± 7,50
MM chuvosa	116,80 ± 2,12	99,30 ± 6,78	1 ± 0,1	43,00 ± 18,68
MQ seca	126,80 ± 9,75	97,20 ± 11,59	<b>2 ± 0,4</b>	65,70 ± 8,50
MQ chuvosa	104,40 ± 2,12	106,85 ± 0,63	1 ± 0,2	59,00 ± 9,19
AM seca	94,85 ± 3,04	97,30 ± 6,50	1 ± 0,3	65,33 ± 14,57
AM chuvosa	100,65 ± 3,60	95,35 ± 0,35	1 ± 0,0	12,00 ± 6,08

Valores expressos como média ± desvio padrão.

## 5. CONCLUSÃO

As características físico-químicas dos méis variaram entre as espécies de abelhas avaliadas. Neste sentido, algumas das características do mel para as abelhas sem ferrão foram distintas comparadas aos valores determinados pela legislação estadual do Espírito Santo.

Diante desse contexto, considerando o valor do açúcar redutor, umidade e acidez avaliado em mel da espécie *Tetragona clavipes* abaixo do recomendado, são necessários mais estudos para a compreensão desta característica e avaliar a possibilidade de sugerir que para o mel desta espécie seja alterado o limite mínimo recomendado desses parâmetros. Para a determinação do novo valor, um maior volumes de determinações deve ser realizado.

O mel de TC apresentou maiores valores de polifenóis e flavonoides e maior atividade antioxidante pelo método de DPPH, comparativamente às outras espécies. O conteúdo fenólico e a atividade antioxidante (DPPH e FRAP) dos méis indicam uma variação entre as espécies. Observa-se uma alta relação entre polifenóis, DPPH e FRAP, porém, para flavonoides não foi observada essa relação, sugerindo que podem não ser os principais componentes que exerceram a atividade antioxidante dos méis.

Os méis não apresentaram citotoxicidade. Em relação à indução da Quinona Redutase e NF- $\kappa$ B, os resultados desse trabalho caracterizaram o mel de MQ e TC, quando coletados em época seca, como indutor de quinona redutase e MC como maior inibidor do NF- $\kappa$ B. Portanto, os resultados apresentados indicam que o mel destas espécies de abelhas tem uso potencial na quimioprevenção do câncer, e seu consumo deve ser incentivado.

No geral, o período sazonal (seca e chuvosa) influenciou as características físico-químicas, SST e umidade, FRAP e Quinona Redutase. Contudo, essa avaliação sazonal apresentou outras distinções ao observar diferentes espécies de abelhas.

Portanto, deve-se estabelecer parâmetros exclusivos para os méis de cada espécie de abelha sem ferrão, além de considerar os efeitos das variáveis ambientais como a sazonalidade, para proporcionar uma maior qualidade e comercialização deste produto.

De maneira geral, algumas variáveis das características físico-químicas, conteúdo fenólico, viabilidade celular e atividades quimiopreventivas não apresentaram padrões entre espécies ou entre as estações sazonais. Portanto, importante ressaltar que é necessária uma amostragem maior (maior abundância de amostras, outros meses compreendidos nos períodos sazonais e outras espécies) para compreender melhor a existência de algum padrão sobre os méis de abelhas sem ferrão e africanizada no estado do Espírito Santo.

É necessária uma compilação e verificação de todas as características físico-químicas em diversas regiões do Brasil e de diferentes espécies para a validação de parâmetros para méis de abelha sem ferrão. Essa compilação também deve levar em consideração os diferentes períodos sazonais, pois essa variável pode mudar de acordo com a umidade, temperatura, precipitação e composição florística do local e assim, modificar essas características.

## 6 REFERÊNCIAS

ABD EL-GHANY, Z. M. **Evaluation of Antibacterial Activity, Gas Chromatography Analysis and Antioxidant Efficacy of Artichoke (Cynara scolymus L. ). J. Agric.Chem.and Biotechn.** [S.l: s.n.], 2017.

AHMED, S. et al. Honey as a Potential Natural Antioxidant Medicine: An Insight into Its Molecular Mechanisms of Action. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.

2018, p. 1–19, 2018. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/omcl/2018/8367846/>>.

AL-HATAMLEH, M. A. I. et al. Antioxidant-based medicinal properties of stingless bee products: Recent progress and future directions. **Biomolecules**, v. 10, n. 6, p. 1–28, 1 jun. 2020. Disponível em: <[pmc/articles/PMC7356725/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/356725/)>. Acesso em: 1 maio 2021.

ALIMENTARIUS, C. **Codex standard 12, revised Codex Standard for Honey. Standards and Standard Methods**. [S.l: s.n.], 2001

ALVAREZ-SUAREZ, José M. et al. Apis mellifera vs Melipona beecheii Cuban polyfloral honeys: A comparison based on their physicochemical parameters, chemical composition and biological properties. **LWT**, v. 87, p. 272–279, 1 jan. 2018.

\_\_\_\_\_. Phenolics from monofloral honeys protect human erythrocyte membranes against oxidative damage. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 5, p. 1508–1516, 2012.

ALVAREZ-SUAREZ, Jose Miguel et al. Contribution of honey in nutrition and human health: A review. **Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism**, v. 3, n. 1, p. 15–23, 2010.

ANAND, P. et al. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 9, p. 2097–2116, 2008.

AOAC. **Official Methods of Analysis**. 20th Edition. [S.l: s.n.], 2016.

ARAÚJO, E. D. et al. Tamanho do corpo em Meliponini (Hymenoptera: Apidae): inferência do raio de vôo e possíveis implicações ecológicas. **Brazilian Journal of Biology**, v. 64, n. 3B, p. 563–568, 2004.

AROUCHA, E. et al. Physicochemical, Antioxidants and Sensorial Properties of Melipona subnitida Honey after Dehumidifying. **J Food Process Technol**, v. 10, n. 3, p. 781, 2019.

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, 1 set. 2019.

\_\_\_\_\_. Stingless bee honey: Quality parameters, bioactive compounds, health-promotion properties and modification detection strategies. **Trends in Food Science and Technology**, v. 81, n. March, p. 37–50, 2018.

BABARINDE, G. O. et al. Effects of harvesting methods on physicochemical and microbial qualities of honey. **Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 5, p. 628–634, 2011.



BADOLATO, M. et al. From the hive: Honey, a novel weapon against cancer. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 142, p. 290–299, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.07.064>>.

BASTOS, D. H. M.; SAMPAIO, G. R. Antioxidant Capacity of Honey. **Bioact. Food as Diet. Interv. Diabetes**. [S.l.]: Elsevier, 2013. p. 609–619. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-397153-1.00025-1>>.

BATISTA DE SOUSA, J. M. 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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.058>>. Acesso em: 13 abr. 2021.

BATISTON, T. F. T. P. et al. Physicochemical composition and antimicrobial potential of stingless honey: a food of differentiated quality. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 10, 2020.

BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidante power”: the FRAP assay. **Analytical biochemistry**, v. 239, n. 1, 1996.

BERGAMO, G. et al. Physicochemical characteristics of bracatinga honeydew honey and blossom honey produced in the state of Santa Catarina: An approach to honey differentiation. **Food Research International**, v. 116, p. 745–754, 1 fev. 2019.

BIESAGA, M.; PYRZYŃSKA, K. Stability of bioactive polyphenols from honey during different extraction methods. **Food Chemistry**, v. 136, n. 1, p. 46–54, 1 jan. 2013.

BILUCA, F. C. et al. Investigation of phenolic compounds, antioxidant and anti-inflammatory activities in stingless bee honey (Meliponinae). **Food Research International**, v. 129, 1 mar. 2020a.

\_\_\_\_\_. Investigation of phenolic compounds, antioxidant and anti-inflammatory activities in stingless bee honey (Meliponinae). **Food Research International**, v. 129, p. 108756, 1 mar. 2020b.

\_\_\_\_\_. Physicochemical profiles, minerals and bioactive compounds of stingless bee honey (Meliponinae). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 50, p. 61–69, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2016.05.007>>.

BOBO-GARCÍA, G. et al. Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 1, p. 204–209, 2015.

BOGDANOV, S; VIT, P.; KILCHENMANN, V. Sugar profiles and conductivity of

stingless bee honeys from Venezuela. **Apidologie**, v. 27, p. 445–450, 1996.

BOGDANOV, Stefan et al. Honey for nutrition and health: A review. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 27, n. 6, p. 677–689, 2008.

BORSATO, D. M. 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, n. 7, p. 817–825, 1 jul. 2014.

BOUSSAID, A. et al. Physicochemical and bioactive properties of six honey samples from various floral origins from Tunisia. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 11, n. 2, p. 265–274, 1 fev. 2018.

BRAGHINI, F. et al. Impact of short-term thermal treatment on stingless bee honey (*Meliponinae*): Quality, phenolic compounds and antioxidant capacity. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 43, n. 7, 1 jul. 2019.

BRASIL. Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do Espírito Santo (IDAF) IN nº 001, de 17 de abril de 2019, Aprova o Regulamento Técnico que fixa a identidade e os requisitos de qualidade que deve apresentar o mel de abelhas sem ferrão. . [S.l: s.n.]. , 2019

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel. MAPA, Brasília. . [S.l: s.n.]. , 2000

BROWN, J. C.; DE OLIVEIRA, M. L. The impact of agricultural colonization and deforestation on stingless bee (*Apidae: Meliponini*) composition and richness in Rondônia, Brazil. **Apidologie**, v. 45, n. 2, p. 172–188, 2014.

CAMARGO, R. R.; OLIVEIRA, K. K. L.; BERTO, M. I. Stingless bee honey: technical regulation proposal. **J. Food Technol**, 2017. Disponível em: <<http://dx.>>. Acesso em: 5 jun. 2021.

CANO, C. B.; FELSNER, M. L.; BRUNS, R. E. Precisão dos métodos refratométricos para análise de umidade em mel. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, v. 27, n. 2, p. 328–332, 2007.

CARDOSO, P. H. et al. **Verbenaceae in Espírito Santo, Brazil: Richness, patterns of geographic distribution and conservation**. *Phytotaxa*. [S.l.]: Magnolia Press. , 15 fev. 2021

CARVALHO, C. A. L. et al. Physicochemical characteristics and sensory profile of honey samples from stingless bees (*Apidae: Meliponinae*) submitted to a dehumidification process. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, n. 1, p.

143–149, 2009. Disponível em: <[www.scielo.br/aabc](http://www.scielo.br/aabc)>. Acesso em: 20 abr. 2021.

CELLA, I.; AMANDIO, D.; FAITA, M. R. Meliponicultura . 2017.

CHANG, S. K.; ALASALVAR, C.; SHAHIDI, F. Review of dried fruits: Phytochemicals, antioxidant efficacies, and health benefits. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 113–132, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.11.034>>.

CHIRIFE, J.; ZAMORA, M. C.; MOTTO, A. The correlation between water activity and % moisture in honey: Fundamental aspects and application to Argentine honeys. **Journal of Food Engineering**, v. 72, n. 3, p. 287–292, 1 fev. 2006.

CHUTTONG, B. et al. Physicochemical profiles of stingless bee ( Apidae : Meliponini ) honey from South East Asia ( Thailand ). **Food Chemistry**, v. 192, p. 149–155, 2016a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.089>>.

\_\_\_\_\_. Physicochemical profiles of stingless bee (Apidae: Meliponini) honey from South East Asia (Thailand). **Food Chemistry**, v. 192, p. 149–155, 9 jul. 2016b.

CIANCIOSI, D. et al. Phenolic Compounds in Honey and Their Associated Health Benefits: A Review. **Molecules**, v. 23, p. 2322, 2018. Disponível em: <[www.mdpi.com/journal/molecules](http://www.mdpi.com/journal/molecules)>.

CORREIA, F. C. da S. et al. DISTÂNCIA DE VOO PARA FORRAGEAMENTO DA ABELHA URUÇU BEIÇO (Melipona eburnea Friese, 1900). **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 20, n. 3, p. 143–146, 23 nov. 2017. Disponível em: <<https://www.revistas.unipar.br/index.php/veterinaria/article/view/5838>>. Acesso em: 28 jun. 2021.

COSTA, A. C. V. da et al. Sensory and volatile profiles of monofloral honeys produced by native stingless bees of the brazilian semiarid region. **Food Research International**, v. 105, n. October 2017, p. 110–120, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.043>>.

CRISTINA, R. et al. **Valor nutricional do mel e pólen de abelhas sem ferrão da região amazônica**. . [S.l: s.n.], 2004.

DE ALMEIDA ANACLETO, D. et al. Composition of the honey of samples originated from Jataí bees (Tetragonisca angustula latreille, 1811). **Ciênc. Tecnol. Aliment**, v. 29, n. 3, p. 535–541, 2009.

DE ALMEIDA SOUZA, B. et al. Características físico-químicas de amostras de mel de Melipona asilvai (Hymenoptera: Apidae). **Ciência Rural**, v. 34, n. 5, p. 1623–1624, 2004a. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/sda/dipoa/anexo\\_](http://www.agricultura.gov.br/sda/dipoa/anexo_)>. Acesso em: 21 maio 2021.

\_\_\_\_\_. Características físico-químicas de amostras de mel de *Melipona asilvai* (Hymenoptera: Apidae). **Ciência Rural**, v. 34, n. 5, p. 1623–1624, 2004b. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/sda/dipoa/anexo\\_](http://www.agricultura.gov.br/sda/dipoa/anexo_)>. Acesso em: 13 abr. 2021.

DE OLIVEIRA, F. A. et al. Evaluation of matrix effect on the determination of rare earth elements and As, Bi, Cd, Pb, Se and In in honey and pollen of native Brazilian bees (*Tetragonisca angustula* – Jataí) by Q-ICP-MS. **Talanta**, v. 162, n. August 2016, p. 488–494, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2016.10.058>>.

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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.058>>. Acesso em: 13 abr. 2021.

DEGIRMENCI, A. et al. Honeys from some different regions of Azerbaijan: bioactive characteristics based on phenolic profile and antioxidant activity. **Journal of Apicultural Research**, v. 59, n. 4, p. 390–397, 7 ago. 2020.

DO NASCIMENTO, T. G. et al. Comprehensive multivariate correlations between climatic effect, metabolite-profile, antioxidant capacity and antibacterial activity of Brazilian red propolis metabolites during seasonal study. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC6893030/](https://doi.org/10.1038/s41598-019-53030-0)>. Acesso em: 27 maio 2021.

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, n. 1, p. 23–35, 1 fev. 2012.

\_\_\_\_\_. Honey and bee pollen produced by meliponini (Apidae) in alagoas, brazil: Multivariate analysis of physicochemical and antioxidant profiles. **Food Science and Technology**, v. 38, n. 3, p. 493–503, 2018.

EREJUWA, O. O.; SULAIMAN, S. A.; AB WAHAB, M. S. **Effects of honey and its mechanisms of action on the development and progression of cancer. Molecules**. [S.l.]: Multidisciplinary Digital Publishing Institute. Disponível em: <[www.mdpi.com/journal/molecules](http://www.mdpi.com/journal/molecules)>. Acesso em: 26 mar. 2021. , 21 fev. 2014

ESCUREDO, O. et al. Contribution of botanical origin and sugar composition of honeys on the crystallization phenomenon. **FOOD CHEMISTRY**, v. 149, p. 84–90, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.097>>.

ESCUREDO, O.; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M.; SEIJO, M. C. Nutritional value and antioxidant activity of honeys produced in a European Atlantic area. **FOOD**

**CHEMISTRY**, v. 138, n. 2–3, p. 851–856, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.015>>.

EVANGELISTA-RODRIGUES, A. et al. Análise físico-química dos méis das abelhas *Apis mellifera* e *Melipona scutellaris* produzidos em duas regiões no Estado da Paraíba. **Ciência Rural**, v. 35, n. 5, p. 1166–1171, 2005.

FADZELLY, M. et al. Pakistan Journal of Nutrition Short Communication Physicochemical and Antioxidant Potential of Raw Unprocessed Honey From Malaysian Stingless Bees. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 16, p. 888–894, 2017.

FAHEY, J. W.; STEPHENSON, K. K. Pinostrobin from honey and Thai ginger (*Boesenbergia pandurata*): A potent flavonoid inducer of mammalian phase 2 chemoprotective and antioxidant enzymes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 25, p. 7472–7476, 4 dez. 2002.

FEÁS, X. et al. Palynological and physicochemical data characterisation of honeys produced in the Entre-Douro e Minho region of Portugal. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, n. 6, p. 1255–1262, 2010.

FRANCO, D. et al. a Importância Das Cumarinas Para a Química Medicinal E O Desenvolvimento De Compostos Bioativos Nos Últimos Anos. **Química Nova**, v. X, n. 00, p. 1–18, 2020.

FRANÇOIS, E. A.; PARAÏSO, A.; et al. Physicochemical Characteristics and Microbiological Quality of Honey Produced in Benin. **Journal of Food Quality**, v. 2018, 2018.

FRANÇOIS, E. A.; BERTIN, G.; et al. Polyphenolic profile, and antioxidant and antifungal activities of honey products in Benin. **African Journal of Microbiology Research**, v. 12, n. 1, p. 9–18, 7 jan. 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, n. 1, p. e05875, 1 jan. 2021.

GHELDOF, N.; ENGESETH, N. J. Antioxidant Capacity of Honeys from Various Floral Sources Based on the Determination of Oxygen Radical Absorbance Capacity and Inhibition of in Vitro Lipoprotein Oxidation in Human Serum Samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 10, p. 3050–3055, maio 2002. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf0114637>>.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007.

GODFREY, N. Anthropogenic and climatic factors affecting honey production: The case of selected villages in Manyoni District, Tanzania. **Journal of Agricultural Biotechnology and Sustainable Development**, v. 10, n. 3, p. 45–57, 31 mar. 2018.

GUERRINI, A. et al. Ecuadorian stingless bee (Meliponinae) honey: A chemical and functional profile of an ancient health product. **Food Chemistry**, v. 114, n. 4, p. 1413–1420, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.023>>.

HAVSTEEN, B. H. **The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacology and Therapeutics**. [S.l.]: Elsevier Inc. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12453566/>>. Acesso em: 3 maio 2021. , 2002

HOMHUAL, S. et al. Bioactive dammarane triterpenes from the mangrove Plant *Bruguiera gymnorrhiza*. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 3, p. 421–424, mar. 2006. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np058112x>>. Acesso em: 5 abr. 2021.

HRNCIR, M.; JARAU, S.; BARTH, F. G. Stingless bees (Meliponini): senses and behavior. **Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology**, v. 202, n. 9–10, p. 597–601, 2016.

IBGE. **Pesquisa da Pecuária Municipal**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/74>>.

ICMBIO. **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume VII – Invertebrados**. 1. ed. [S.l: s.n.], 2018. v. 7.

INCA. **Câncer**.

INCAPER. **Precipitação total observada em 2019**. Disponível em: <<https://meteorologia.incaper.es.gov.br/mapas-de-chuva-acumulado-mensal-e-anual-2019#prettyPhoto>>. Acesso em: 6 abr. 2021.

\_\_\_\_\_. **Precipitação total observada em 2020**. Disponível em: <<https://meteorologia.incaper.es.gov.br/mapas-de-chuva-acumulado-mensal-e-anual-2020#prettyPhoto>>. Acesso em: 6 abr. 2021.

INMA. **Lista da fauna e flora ameaçadas de extinção no estado do Espírito Santo, in Fauna e Flora Ameaçadas de Extinção no Estado do Espírito Santo**. [S.l: s.n.], 2019.

JACOB, M. A. M. **Compostos fenólicos, atividade antioxidante e características físico-química de mel e pólen coletados por *Apis mellifera* Linneaus, 1758 (Hymenoptera: Apidae)**. 2014. 86 f. Universidade Federal de Lavras, 2014.

JAFFÉ, R. et al. Bees for Development: Brazilian Survey Reveals How to Optimize

Stingless Beekeeping. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0121157, 31 mar. 2015. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0121157>>.

KADRI, S. M. et al. Characterization of Coffea arabica monofloral honey from Espírito Santo, Brazil. **Food Chemistry**, v. 203, p. 252–257, 15 jul. 2016.

KAMAL, M. M. et al. **Physicochemical and microbiological characteristics of honey obtained through sugar feeding of bees**. **Journal of Food Science and Technology**. [S.l.: s.n.], 2019

KARABAGIAS, I. K. et al. Characterisation and classification of Greek pine honeys according to their geographical origin based on volatiles , physicochemical parameters and chemometrics. **Food Chemistry**, v. 146, p. 548–557, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.105>>.

KAVANAGH, S. et al. Physicochemical properties and phenolic content of honey from different floral origins and from rural versus urban landscapes. **Food Chemistry**, v. 272, p. 66–75, jan. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814618314365>>.

KEDARE, S. B.; SINGH, R. P. **Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay**. **Journal of Food Science and Technology**. [S.l.]: Springer. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s13197-011-0251-1>>. Acesso em: 3 maio 2021. , 25 ago. 2011

KEK, S. P. et al. Classification of entomological origin of honey based on its physicochemical and antioxidant properties. **International Journal of Food Properties**, v. 0, n. 0, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/10942912.2017.1359185>>.

KERR, W. E. **Biologia, manejo e genética de Melipona fasciculata Smith (Hymenoptera Apidae)**. 1987. 141 f. Universidade Federal do Maranhão, 1987.

KERR, W. E.; CARVALHO, G. A.; NASCIMENTO, V. A. **Abelha Uruçu: Biologia, Manejo e Conservação**. Belo Horizonte– MG: [s.n.], 1996.

KISHORE, R. K. et al. Tualang honey has higher phenolic content and greater radical scavenging activity compared with other honey sources. **Nutrition Research**, v. 31, n. 4, p. 322–325, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nutres.2011.03.001>>.

KUHN-NETO, B. et al. Long distance foraging and recruitment by a stingless bee, Melipona mandacaia Long distance foraging and recruitment by a stingless bee, Melipona mandacaia\*. **Apidologie**, v. 40, n. 4, p. 472–480, 2009. Disponível em: <[www.apidologie.org](http://www.apidologie.org)>. Acesso em: 28 jun. 2021.

- KUMAR, A. et al. Sensorial and physicochemical analysis of Indian honeys for assessment of quality and floral origins. **Food Research International**, v. 108, p. 571–583, 1 jun. 2018.
- KUSTIAWAN, P. M. et al. In vitro cytotoxicity of Indonesian stingless bee products against human cancer cell lines. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, n. 7, p. 549–556, 2014.
- LAGE, L. G. A. et al. **Honey physicochemical properties of three species of the brazilian Melipona. An Acad Bras Cienc.** [S.l: s.n.], 2012. Disponível em: <[www.scielo.br/aabc](http://www.scielo.br/aabc)>. Acesso em: 13 abr. 2021.
- LAVINAS, F. C. et al. Brazilian stingless bee propolis and geopropolis: promising sources of biologically active compounds. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 2018.
- LAZAREVIĆ, K. B.; JOVETIĆ, M. S.; TEŠIĆ, Ž. L. Physicochemical Parameters as a Tool for the Assessment of Origin of Honey. **Journal of AOAC INTERNATIONAL**, v. 100, n. 4, p. 840–851, 1 jul. 2017. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jaoac/article/100/4/840-851/5654325>>.
- LIU, J. R. et al. Effect of floral sources on the antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory activities of honeys in Taiwan. **Food Chemistry**, v. 139, n. 1–4, p. 938–943, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.02.015>>.
- MAHMOUDI, R. et al. Biochemical properties and microbial analysis of honey from North-Western regions of Iran: Seasonal effects on physicochemical properties of honey. **AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY**, v. 11, n. 44, 31 maio 2012.
- MARCHINI, L. C. et al. Physicochemical composition of Apis mellifera honey samples from São Paulo State, Brazil. **Quimica Nova**, v. 30, n. 7, p. 1653–1657, 2007. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422007000700029&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422007000700029&lng=en&nrm=iso&tlng=en)>. Acesso em: 24 maio 2021.
- MARCOLIN, cavagnoli L. et al. Meliponinae and Apis mellifera honey in southern Brazil: physicochemical characterization and determination of pesticides. **Food Chemistry**, p. 130175, 24 maio 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030881462101181X>>. Acesso em: 27 maio 2021.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.



- MOURE, J. S. **Catálogo de abelhas Moure**. Disponível em: <<http://moure.cria.org.br/catalogue?id=1>>.
- NAILA, A. et al. Classical and novel approaches to the analysis of honey and detection of adulterants. **Food Control**, v. 90, p. 152–165, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.02.027>>.
- NAIR, S.; LI, W.; KONG, A.-N. T. Natural dietary anti-cancer chemopreventive compounds: redox-mediated differential signaling mechanisms in cytoprotection of normal cells versus cytotoxicity in tumor cells 1. **Acta Pharmacol Sin**, v. 28, n. 4, p. 459–472, 2007.
- NASCIMENTO, A. et al. Physical-Chemical Parameters of Honey of Stingless Bee (Hymenoptera: Apidae). **American Chemical Science Journal**, v. 7, n. 3, p. 139–149, 2015.
- NASCIMENTO, K. S. do et al. Phenolic compounds, antioxidant capacity and physicochemical properties of Brazilian *Apis mellifera* honeys. **LWT - Food Science and Technology**, v. 91, p. 85–94, 1 maio 2018.
- NAYIK, G. A.; DAR, B. N.; NANDA, V. Physico-chemical, rheological and sugar profile of different unifloral honeys from Kashmir valley of India. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 12, n. 8, p. 3151–3162, 1 dez. 2019.
- NIMSE, S. B.; PAL, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. **RSC Advances**, v. 5, n. 35, p. 27986–28006, 2015.
- NIU, K. M. et al. Optimization of Chinese chive juice as a functional feed additive. **Applied Sciences (Switzerland)**, v. 10, n. 18, p. 6194, 1 set. 2020. Disponível em: <[www.mdpi.com/journal/applsci](http://www.mdpi.com/journal/applsci)>. Acesso em: 14 jun. 2021.
- NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e Criação de Abelhas Indígenas Sem Ferrão**. [S.l.: s.n.], 1997. v. 34. Disponível em: <<http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsid=110219>>.
- NORDIN, A. et al. Low dose stingless bee honey increases viability of human dermal fibroblasts that could potentially promote wound healing. **Wound Medicine**, v. 23, n. September, p. 22–27, 2018.
- ODDO, L. P. et al. Composition and antioxidant activity of *Trigona carbonaria* honey from Australia. **Journal of Medicinal Food**, v. 11, n. 4, p. 789–794, 1 dez. 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19012514/>>. Acesso em: 13 abr. 2021.
- OLIVEIRA, B. G. et al. Controlling the quality of grape juice adulterated by apple juice

using ESI(-)FT-ICR mass spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 149, n. April, p. 104033, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104033>>.

OLIVEIRA, M. L. de; CUNHA, J. A. Abelhas africanizadas *Apis mellifera scutellata* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Apidae: Apinae) exploram recursos na floresta amazônica? **Acta Amazonica**, v. 35, n. 3, p. 389–394, 2005.

OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do dpph•: Estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p. 36–44, 2015. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-05722015000100036&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722015000100036&lng=en&nrm=iso&tlng=pt)>. Acesso em: 3 maio 2021.

OLIVEIRA, P. S. et al. Ácidos Fenólicos, Flavonoides e Atividade Antioxidante em méis *Melipona fasciculata*, *M. flavolineata* (Apidae, Meliponini) E *Apis mellifera* (Apidae, Apini) Da Amazônia. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1728–1732, 2012.

OUCHEMOUKH, S.; LOUAILECHE, H.; SCHWEITZER, P. Physicochemical characteristics and pollen spectrum of some Algerian honeys. **Food Control**, v. 18, n. 1, p. 52–58, 2007.

ÖZCAN, M.; ARSLAN, D.; ALI CEYLAN, D. Effect of inverted saccharose on some properties of honey. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 24–29, 1 jan. 2006.

PENG KEK, S. et al. Classification of Honey from Its Bee Origin via Chemical Profiles and Mineral Content. **Food Anal. Methods**, v. 10, p. 19–30, 2017.

PEZZUTO, J. M. et al. Characterization of Natural Product Chemopreventive Agents. **Cancer Chemoprevention**. [S.l.]: Humana Press, 2005. p. 3–37. Disponível em: <[https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-59259-768-0\\_1](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-59259-768-0_1)>. Acesso em: 5 abr. 2021.

PIZZINO, G. et al. **Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. [S.l.]: Hindawi Limited. , 2017

PUCCIARELLI, A. B. et al. Microbiological and physicochemical analysis of yateí ( *Tetragonisca angustula* ) honey for assessing quality standards and commercialization. **Revista Argentina de Micrología**, v. 46, n. 4, p. 325–332, 2014a. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0325-7541\(14\)70091-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70091-4)>.

PUCCIARELLI, A. B. et al. Microbiological and physicochemical analysis of yateí ( *Tetragonisca angustula* ) honey for assessing quality standards and commercialization. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 46, n. 4, p. 325–332, 1 out. 2014b.

PYLER, E. . **Baking science & technology**. 2<sup>a</sup> ed ed. [S.I.]: Elsevier Inc., 1982. v. 1.

PYRZYNSKA, K.; BIESAGA, M. **Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey**. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**. [S.I.]: Elsevier. , 1 ago. 2009

RAMÓN-SIERRA, J. M.; RUIZ-RUIZ, J. C.; ORTIZ-VÁZQUEZ, E. D. L. Electrophoresis characterisation of protein as a method to establish the entomological origin of stingless bee honeys. **Food Chemistry**, v. 183, p. 43–48, 2015.

RAO, P. V. et al. Biological and therapeutic effects of honey produced by honey bees and stingless bees: A comparative review. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 26, n. 5, p. 657–664, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2016.01.012>>.

REDDY, G. M. et al. Evaluation of antioxidant activity index (AAI) by the 2, 2-diphenyl-1-picryl hydrazyl method of 40 medicinal plants. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 24, 28 jun. 2012.

RESENDE, H. C. et al. Visitação de orquídea por *Melipona capixaba* Moure & Camargo (Hymenoptera: Apidae), abelha ameaçada de extinção. **Neotropical Entomology**, v. 37, n. 5, p. 609–611, set. 2008.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. **Biochemical Society Transactions**, v. 24, n. 3, p. 790–795, 1996.

ROUBIK, D. **Ecol. Nat. Hist. Trop. Bees**. [S.I.]: Cambridge University Press, 1989. Disponível em: <<https://www.cambridge.org/core/books/ecology-and-natural-history-of-tropical-bees/01B9D0798E5CBA8A68865ED0CC166A4A>>. Acesso em: 28 jun. 2021.

SABBAG, O. J.; NICODEMO, D. Viabilidade Econômica Para Produção De Mel Em Propriedade Familiar. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 41, n. 1, p. 94–101, 2011.

SANT'ANA, L. D. O. et al. Characterization of monofloral honeys with multivariate analysis of their chemical profile and antioxidant activity. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 1, 2012.

SANTOS, L. C. et al. Atividade antioxidante de xantonas isoladas de espécies de *Leiothrix* (Eriocaulaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 2, 2003.

SAUNDERS, F. R.; WALLACE, H. M. On the natural chemoprevention of cancer. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 7, p. 621–626, 1 jul. 2010.

SIIMA, A. A. et al. Ameliorative effects of flavonoids and polyketides on the rotenone induced *Drosophila* model of Parkinson's disease. **NeuroToxicology**, v. 81, p. 209–

215, 1 dez. 2020.

SILVA, A. G. et al. Foraging distance of *Melipona subnitida* Ducke (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, v. 61, n. 4, p. 494–501, 1 dez. 2014. Disponível em: <<http://periodicos.uefs.br/ojs/index.php/sociobiology>>. Acesso em: 28 jun. 2021.

SILVA, B. et al. In vitro anti-inflammatory properties of honey flavonoids: A review. **Food Research International**, v. 141, n. January 2021, p. 110086, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.110086>>.

SILVA, I. A. A. et al. Thermal degradation of honeys and evaluation of physicochemical properties. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 114, n. 1, p. 353–358, out. 2013.

SILVA, L. R. et al. Honey from Luso region (Portugal): Physicochemical characteristics and mineral contents. **Microchemical Journal**, v. 93, n. 1, p. 73–77, 1 set. 2009.

SILVA, R. do N. et al. Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. **Food Science and Technology**, v. 23, n. 3, p. 337–341, dez. 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.br/j/cta/a/fsfZj35NNBsVXkTfHJWrRQG/>>. Acesso em: 21 set. 2021.

SILVA, T. M. S. et al. Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaíra (*Melipona subnitida*) honey. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 29, n. 1, p. 10–18, 1 fev. 2013.

SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R.; ALMEIDA, E. A. B. **Abelhas Brasileiras: Sistemática e identificação**. [S.l: s.n.], 2002.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152–178, 1 jan. 1999.

SOUSA, J. et al. Polyphenolic profile and antioxidant and antibacterial activities of monofloral honeys produced by Meliponini in the Brazilian semiarid region. **Food Research**, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996916300886>>. Acesso em: 28 set. 2021.

SOUZA, B. A.; CARVALHO, C. A. L.; ALVES, R. M. O. Flight activity of *Melipona asilvai* moure (Hymenoptera: Apidae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, n. 2 B, p. 731–737, 2006. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1519-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-)

69842006000400017&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 13 abr. 2021.

SPORN, M. B.; SUH, N. **Chemoprevention of cancer. Carcinogenesis**. [S.l.]: Oxford University Press. , 2000

TOMÁS-LORENTE, F. et al. Flavonoids from *Cistus ladanifer* bee pollen. **Phytochemistry**, v. 31, n. 6, p. 2027–2029, jun. 1992. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0031942292803551>>.

TRAUTVETTER, S.; KOELLING-SPEER, I.; SPEER, K. Confirmation of phenolic acids and flavonoids in honeys by UPLC-MS. **Apidologie**, v. 40, n. 2, p. 140–150, mar. 2009. Disponível em: <[www.apidologie.org](http://www.apidologie.org)>. Acesso em: 26 maio 2021.

TUKSITHA, L. et al. Antioxidant and antibacterial capacity of stingless bee honey from Borneo (Sarawak). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 21, n. 2, p. 563–570, 1 jun. 2018.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, 2007.

VAN NIEUWSTADT, M. G. L.; RUANO IRAHETA, C. E. Relation between size and foraging range in stingless bees (Apidae, Meliponinae). **Apidologie**, v. 27, n. 4, p. 219–228, 1996. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1051/apido:19960404>>. Acesso em: 28 jun. 2021.

VARGAS, T. **Caracterização da qualidade do mel produzido nos Campos Gerais**.

VIEIRA, S. **Introdução à bioestatística**. 3. ed. ed. Rio de Janeiro: Campus: [s.n.], 1980.

VILLACRÉS-GRANDA, I. et al. Honey quality parameters, chemical composition and antimicrobial activity in twelve Ecuadorian stingless bees (Apidae: Apinae: Meliponini) tested against multiresistant human pathogens. **LWT**, v. 140, 1 abr. 2021.

VILLAS-BÔAS, J. **Manual Tecnológico Mel de Abelhas sem Ferrão**. [S.l.: s.n.], 2012.

VIT, P. et al. Venezuelan stingless bee honeys characterized by multivariate analysis of physicochemical properties. **Apidologie**, v. 29, n. 5, p. 377–389, 1998.

VIT, P.; ROUBIK, D. W.; PEDRO, S. R. M. Pot-Honey: A legacy of stingless bees. **Pot-Honey: A Legacy of Stingless Bees**, n. January, p. 1–654, 2012.

\_\_\_\_\_. **Pot-Honey**. New York, NY: Springer New York, 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-1-4614-4960-7>>.

WANG, H.; CHO, C. H. Effect of NF-κB Signaling on Apoptosis in Chronic Inflammation-Associated Carcinogenesis. **Current Cancer Drug Targets**, v. 10, n. 6,

p. 593–599, 16 jul. 2010.

WILCZYŃSKA, A. Effect of filtration on colour, antioxidant activity and total phenolics of honey. **LWT - Food Science and Technology**, v. 57, n. 2, p. 767–774, 1 jul. 2014.

WINSTON, M. **A biologia da abelha**. Porto Alegre: [s.n.], 2003.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. control Analysis of propolis : some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v. 37, n. 2, p. 99–105, 1998.

YANG, J.; LIU, R. H. Induction of phase II enzyme, quinone reductase, in murine hepatoma cells in vitro by grape extracts and selected phytochemicals. **Food Chemistry**, v. 114, n. 3, p. 898–904, 1 jun. 2009.

YEGGE, M. A. et al. Reduction in moisture content of dehumidified and microwave-heated stingless bee (Kelulut) honey and its quality. **Materials Today: Proceedings**, v. 42, p. 75–79, 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214785320375556>>. Acesso em: 21 abr. 2021.

ZAREI, M.; FAZLARA, A.; TULABIFARD, N. Effect of thermal treatment on physicochemical and antioxidant properties of honey. **Heliyon**, v. 5, n. 6, p. e01894, 1 jun. 2019.

ZULKHAIRI AMIN, F. A. et al. Therapeutic properties of stingless bee honey in comparison with european bee honey. **Advances in Pharmacological Sciences**, v. 2018, 2018.

## 7 ANEXOS

### ANEXO 1- TABELA PARA TRANSFORMAR ÍNDICE DE REFRAÇÃO PARA BRUX (%)

Brix	Densidade ( 20° C)	Brix	Densidade ( 20° C)
1.0	1,0039	49.0	1,22652
2.0	1,0078	50.0	1,23202
3.0	1,01173	51.0	1,23756
4.0	1,01569	52.0	1,24313
5.0	1,01968	53.0	1,24874
6.0	1,02369	54.0	1,25439
7.0	1,02773	55.0	1,26007
8.0	1,03180	56.0	1,26580
9.0	1,03590	57.0	1,27158
10.	1,04003	58.0	1,27736
11.0	1,04418	59.0	1,28320
12.0	1,04837	60.0	1,28908
13.0	1,05259	61.0	1,29498
14.0	1,05683	62.0	1,30093
15.0	1,06111	63.0	1,30694
16.0	1,06542	64.0	1,31297
17.0	1,06976	65.0	1,31905
18.0	1,07413	66.0	1,32516
19.0	1,07853	67.0	1,33129
20.0	1,08297	68.0	1,33748
21.0	1,08744	69.0	1,34371
22.0	1,09194	70.0	1,34997
23.0	1,09647	71.0	1,35627
24.0	1,10104	72.0	1,36261
25.0	1,10564	73.0	1,36900

26.0	1,11027	74.0	1,37541
27.0	1,11493	75.0	1,38187
28.0	1,11963	76.0	1,38835
29.0	1,12436	77.0	1,39489
30.0	1,12913	78.0	1,40146
31.0	1,13394	79.0	1,40806
32.0	1,13877	80.0	1,41417
33.0	1,14364	81.0	1,42138
34.0	1,14855	82.0	1,42810
35.0	1,15350	83.0	1,43486
36.0	1,15847	84.0	1,44165
37.0	1,16349	85.0	1,44848
38.0	1,16853	86.0	1,45535
39.0	1,17362	87.0	1,46225
40.0	1,17874	88.0	1,46919
41.0	1,18390	89.0	1,47616
42.0	1,18910	90.0	1,48317
43.0	1,19434	91.0	1,49022
44.0	1,19961	92.0	1,49730
45.0	1,20491	93.0	1,50442
46.0	1,21026	94.0	1,51157
47.0	1,21564	95.0	1,51876
48.0	1,22106		



## ANEXO 2- TABELA DE CHATAWAY

Índice de Refração a 20°C	Umidade (%)	Índice de Refração a 20°C	Umidade (%)	Índice de Refração a 20°C	Umidade (%)
1,4740	25,0	1,4840	21,0	1,4940	17,0
1,4745	24,8	1,4845	20,8	1,4946	16,8
1,4750	24,6	1,4850	20,6	1,4951	16,6
1,4755	24,4	1,4855	20,4	1,4958	16,4
1,4760	24,2	1,4860	20,2	1,4961	16,2
1,4765	24,0	1,4865	20,0	1,4966	16,0
1,4770	23,8	1,4870	19,8	1,4971	15,8
1,4775	23,6	1,4875	19,6	1,4976	15,6
1,4780	23,4	1,4880	19,4	1,4982	15,4
1,4785	23,2	1,4885	19,2	1,4987	15,2
1,4790	23,0	1,4890	19,0	1,4992	15,0
1,4795	22,8	1,4895	18,8	1,4997	14,8
1,4800	22,6	1,4900	18,6	1,5002	14,6
1,4805	22,4	1,4905	18,4	1,5007	14,4
1,4810	22,2	1,4910	18,2	1,5012	14,2
1,4815	22,0	1,4915	18,0	1,5018	14,0
1,4820	21,8	1,4920	17,8	1,5023	13,8
1,4825	21,6	1,4925	17,6	1,5038	13,2
1,4830	21,4	1,4930	17,4	1,5044	13,0

Fonte: A.O.A.C. (1995)