



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

ALINE RABELLO COSTA ALVES

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA DESIDRATAÇÃO POR
SPRAY DRYER NOS PARÂMETROS DE QUALIDADE E
PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DO MEL**

Salvador – BA

2011

ALINE RABELLO COSTA ALVES

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA DESIDRATAÇÃO POR
SPRAY DRYER NOS PARÂMETROS DE QUALIDADE E
PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DO MEL**

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da
Universidade Federal da Bahia, como parte das
exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência
de Alimentos, para obtenção do título de Mestre

Orientadora: Maria da P. Spínola Miranda

Salvador-BA

2011

Ficha Catalográfica

A474 Alves, Aline Rabello Costa

Avaliação dos Efeitos da Desidratação por *Spray Dryer* nos
Parâmetros de Qualidade e Propriedades Antioxidantes do Mel.
/ [manuscrito] por Aline Rabello Costa Alves. 2011.

100 f.: il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia,
2011.

Orientação: Prof^a. Dr^a. Maria da Pureza Spínola Miranda.

1. Mel 2. Pó 3. *Spray Dryer* 4. Antioxidantes 5. Secagem
I. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Farmácia
II. Miranda, Maria da Pureza Spínola III. Título.

CDD — 664.1 —22. ed



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

TERMO DE APROVAÇÃO

ALINE RABELLO COSTA

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA DESIDRATAÇÃO POR SPRAY DRYER NOS PARÂMETROS DE QUALIDADE E NAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DO MEL

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (nível Mestrado Acadêmico) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em ciência de alimentos.

Aprovada em 29 de julho de 2011.

BANCA EXAMINADORA

Maria da Pureza Spínola Miranda
Universidade Federal da Bahia
Orientadora

Clícia Maria de Jesus Benevides
Universidade do Estado da Bahia

Marcelo Andrés Umsza Gues
FATEC

DEDICATÓRIA

Para meus pais William e Nanci Alves por todas as renúncias em prol da minha educação.

E também ao meu marido, Rodrigo Marano, por seus incentivos, paciência e disposição para cozinhar, jantar fora...

AGRADECIMENTOS

Ao SENAI, pela disponibilização das instalações, materiais e tempo para realização deste trabalho, em especial a Cleide Miranda de Castro Guedes pelo total apoio, compreensão, incentivos e principalmente por acreditar;

À Prof^a Dra. Maria Spínola pela orientação, confiança e por estar sempre disponível para ajudar, fazendo parecer que o dia tem um número infinito de horas;

Aos Professores do PGALI que direta ou indiretamente contribuíram para a minha formação;

À grande amiga Isabela Aragão pela paciência e pelos diversos almoços de incentivos fortalecedores;

Ao grande amigo Jorenilson pela sincera preocupação, atenção e incentivos;

Aos Técnicos de alimentos Alexandre Ramos e Ingrid Souza pela torcida e colaboração durante os trabalhosos processos de secagem;

A todos os colegas de trabalho que torceram e que de alguma forma se sobrecarregaram com minha ausência durante os últimos meses, em especial a Isabel Oliveira, Luciana Saraiva e Luana Neponuceno;

A toda a minha família pela compreensão às ausências e privações durante este processo;

Ao “acaso” por me proteger enquanto andei distraída...

EPÍGRAFE

"O homem, cada homem, tem que decidir em cada instante o que vai fazer o que vai ser no dia seguinte. Esta decisão é intransferível: ninguém pode substituir-me na tarefa de decidir-me, de decidir a minha vida. Quando me ponho em mãos de outros, sou eu que decidi e sigo decidindo que ele me dirija: não transfiro, pois, a decisão, mas somente o seu mecanismo."

Ortega y Gasset

RESUMO

O mel é um produto natural, complexo, reconhecido por apresentar na sua constituição compostos como ácidos fenólicos e flavonóides que lhe conferem propriedades antioxidantes que combatem o estresse oxidativo do organismo humano. Apesar dos excelentes atributos, o mel enfrenta problemas de utilização em escala industrial, como dificuldades de manuseio, armazenamento, perda por aderência em contentores e falta de padronização do produto final. Muitos estudos têm concentrado esforços para converter o mel líquido em um pó de fluxo livre, e apresentam a secagem por *spray-dryer* como um dos processos mais promissores para este fim. Quanto aos compostos antioxidantes, não foram encontrados estudos que reportem seu comportamento perante o tratamento térmico para obtenção do pó. Para outras matérias-primas os autores divergem, sendo reportado tanto degradações como aumento da atividade. Com intuito de eliminar esta lacuna, o presente trabalho tem como objetivo produzir o pó de mel por desidratação em *spray dryer* utilizando maltodextrina comercial 20 DE como carreador e avaliar o efeito do tratamento térmico no seu potencial antioxidante, através da análise de seqüestro do radical DPPH, da avaliação do teor de compostos fenólicos pelo método de Folin-Ciocalteu e dos flavonóides totais por espectrofotometria com AlCl_3 . Os resultados obtidos demonstram que os parâmetros físico-químicos do mel se apresentaram dentro do estabelecido pela legislação e o teor de compostos fenólicos ficou entre 34,89 e 39,49 mg de AGE. 100^{-1} g de mel, o teor de flavonóides entre 0,99 e 1,28 mg de QE. 100^{-1} g e a capacidade antioxidante medida através do CE50 entre 47,44 e 52,43 mg. mL^{-1} . O pó foi obtido com um rendimento em torno de 37%, apresentou 75% das partículas entre 1400 e 600 micras e uma proporção de sólidos de mel de 50,30% ($\pm 0,26$) do total de sólidos. A umidade encontrou-se em $1,78 \pm 0,20\%$, a densidade aparente em $0,45 \pm 0,01$ g/mL, a Higroscopicidade em 19 ± 3 g/100g, a Molhabilidade em 2 ± 1 s e a cor em $80,66 \pm 1,23$ para L^* , $-0,42 \pm 0,04$ para a^* e $9,28 \pm 0,48$ para b^* . O teor de compostos fenólicos do pó de mel apresentou um intervalo de confiança entre 25,47 e 30,32 mg de AGE. 100^{-1} g (b.s.) e em comparação com a solução alimentação, também em base seca, percebeu-se que estatisticamente não houve diferença significativa; já o teor de flavonóides, que se encontrou entre 2,01 e 2,63 mg de QE. 100^{-1} g, apresentou um incremento significativo em relação a solução alimentação (b.s.). A atividade antioxidante do pó de mel, expresso em CE50, resultou em um intervalo de confiança entre 57,84 e 65,88mg. mL^{-1} , apontando para um incremento médio de 15% em relação a solução alimentação (b.s.). Os incrementos se justificam pelo desencadeamento das reações de Maillard e demonstram a possibilidade de aproveitamento do pó de mel desidratado por *spray-dryer* como fonte de compostos antioxidantes.

Palavras-chaves: Mel; pó; *spray-dryer*; secagem; antioxidantes; compostos fenólicos; flavonóides.

ABSTRACT

Honey is a natural and complex product, and has been recognized for having in its constitution compounds such as phenolic acids and flavonoids which give it antioxidant properties that combat oxidative stress in the human body. Despite the excellent qualities attributed to honey, its use in industry is facing problems such as difficulties in handling and storage, loss of adhesion in containers and lack of standardization of the final product. Many studies have concentrated efforts to convert liquid honey in a free flowing powder, and have the spray-drying as a dryer of the most promising for this purpose. As for the antioxidant compounds, no studies were found to report their behavior before the heat treatment to obtain the powder. For other materials the authors diverge, having been reported either degradation or enlargement of the activity. In order to eliminate this gap, the present work aims to produce honey powder spray dryer for drying using maltodextrin DE 20 as a carrier and to evaluate the effect of heat treatment on antioxidant potential, by analyzing the capturing the DPPH radical, the evaluation of content of phenolic compounds by the method of Folin-Ciocalteu and flavonoids by spectrophotometrically with AlCl_3 . The results show that the physico chemical parameters of honey were within the established by legislation and the phenolic content was between 34,89 and 39,49 $\text{mg AGE} \cdot 100^{-1} \text{g}$ honey, the flavonoid content between 0,99 and 1,28 $\text{mgQE} \cdot 100^{-1} \text{g}$ and antioxidant capacity measured by the EC50 between 47.44 and 52.43 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. The powder was obtained with a yield of around 37%, showed 75% of the particles between 1400 and 600 microns and a proportion of honey solids 50.30% (± 0.26) of total solids. Moisture found in $1,78 \pm 0.20\%$, the apparent density of $0.45 \pm 0.01 \text{ g/mL}$, $19 \pm 3 \text{ g/100g}$ of Hygroscopicity, $2 \pm 1 \text{ s}$ of Wettability in color and $80,66 \pm 1,23$ for L^* , to $-0,42 \pm 0,04$ for a^* and $9,28 \pm 0,48$ for b^* . The content of phenolic compounds in honey powder showed a confidence interval between 25,47 and 30,32 $\text{mg AGE} \cdot 100^{-1} \text{g}$ (d.b.) and compared with the feeding solution, also on a dry basis, it was noted that statistically no significant difference, whereas the content of flavonoids, which are found between 2,01 and 2,63 $\text{mg QE} \cdot 100^{-1} \text{g}$, showed a significant increase in relation to feeding solution (b.s.). The antioxidant activity of honey powder, expressed as EC50, resulted in a confidence interval between 57,84 and 65,88 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, indicating an average increase of 15% compared to feeding solution (b.s.). The increases are justified by triggering the Maillard reactions and demonstrate the possibility of using the honey powder dehydrated by spray-dryer as a source of antioxidant compounds.

Keywords: Honey; powder, spray-dryer, drying, antioxidants, phenolic compounds, flavonoids.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros físico-químicos de mel de abelha por diferentes autores.....	20
Tabela 2 - Propriedade física dos açúcares e comportamento stickiness durante o processo de <i>spray drying</i>	38
Tabela 3 – Temperatura de transição vítrea de Maltodextrinas de diferentes pesos moleculares.....	39
Tabela 4 - Valores Médios de parâmetros físico-químicos do Mel.....	60
Tabela 5 - Teste de hipótese utilizando o F de Snedcor para a curva de Ác. Gálico.....	63
Tabela 6 - Resultados obtidos para o teor de compostos fenólicos totais em três ensaios na amostra de mel pelo método Folin-Ciocalteu.....	63
Tabela 7 - Teste de hipótese utilizando o F de Snedcor para a curva de quercetina	65
Tabela 8 - Resultados obtidos para o teor de Flavonóides totais em três ensaios da amostra de mel	65
Tabela 9 – Valores médios de CE50 obtidos para os méis nos ensaios de atividade antioxidante pelo método do DPPH e F de significação dos modelos matemáticos utilizados	67
Tabela 10 - Teores de fenóis, flavonóides totais e CE50 do mel	67
Tabela 11 - Valores Médios de parâmetros físico do pó de mel.....	86
Tabela 12 - Teste de hipótese utilizando o F de Snedcor para a curva de Ác. Gálico.....	88
Tabela 13 - Resultados obtidos para o teor de compostos fenólicos totais em três ensaios de amostra de solução alimentação e pó de mel obtido por secagem em <i>spray-dryer</i>	88
Tabela 14 - Teste de hipótese utilizando o F de Snedcor para a curva de quercetina	90
Tabela 15 - Resultados obtidos para o teor de Flavonóides totais em três ensaios de amostra da solução alimentação e pó de mel obtido por secagem em <i>spray-dryer</i>	90

Tabela 16 - Valores de CE50 obtidos para a solução alimentação e pó de mel nos ensaios de atividade antioxidante pelo método do DPPH e o F de significação dos modelos matemáticos utilizados92

Tabela 17 - Resultados dos teores de fenóis totais, flavonóides e CE50 para amostra de solução de alimentação e pó de mel92

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura básica de um flavonóide	24
Figura 2 - Estrutura química dos principais grupos de flavonóides.....	24
Figura 3 - Estrutura química dos ácidos benzóicos	25
Figura 4 - Estrutura química dos ácidos cinâmicos	25
Figura 5 - Estrutura química das cumarinas	26
Figura 6 - Esquematização do seqüestro de EROs (R*) por flavonóides (FL).....	28
Figura 7 - Sítios de ligação de Metais em flavonóides	28
Figura 8 - Características estruturais que contribuem para a atividade antioxidante dos polifenóis.....	29
Figura 9 - Complexo Flavonóide-Al	31
Figura 10 - Perfil espectrofotométrico do DPPH radical e DPPH inativado	32
Figura 11 – Secagem por Nebulização.....	36
Figura 12 - Curva padrão de ácido gálico.....	62
Figura 13 - Curva Padrão de Quercetina.....	64
Figura 14 - Poder de resgate de radicais de DPPH por parte do ácido gálico (µg/mL)	66
Figura 15 - Percentual de seqüestro do radical DPPH e a concentração de mel em três ensaios independentes.	66
Figura 16 – Processo de obtenção do pó de mel.....	85
Figura 17 - Curva padrão de ácido gálico.....	87
Figura 18 - Curva Padrão de Quercetina.....	89
Figura 19 - Poder de resgate de radicais de DPPH por parte do ácido gálico (µg/mL)	91
Figura 20 - Gráfico que relaciona o percentual de seqüestro do radical DPPH e a concentração de sólidos da solução alimentação e no mel em pó (b.s) nos três ensaios.	91

Figura 21 - Análise de igualdade entre as variâncias para o teste de fenólicos totais.....	93
Figura 22 - Análise de igualdade entre as variâncias para o teste de flavonóides.....	93
Figura 23 - Análise de igualdade entre as variâncias para valores de CE50 no teste de DPPH.....	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

% - Por cento

µg - micrograma

µl – microlitro

Al - Alumínio

AlCl₃ – Cloreto de Alumínio

A.O.A.C - *ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS*

AGE – Equivalente de ácido gálico

A.S.T.M. - *AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIAL*

b.s – Base seca

b.u – Base úmida

°C - Graus Celsius

DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

CE50 - Concentração efetiva mínima da substância antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do DPPH

EROs - Espécies Reativas de Oxigênio

FL - Flavonóides

g - Gramas

mg - miligramas

nm - nanômetro

¹O₂ - Oxigênio singlete

O^{2•-} - Radical superóxido

OH• - Radical hidroxil

PRM – Produtos da reação de Maillard

QE –Equivalente de quercetina

RL – Radical livre

RO• - Alcoxila

ROO• - Peroxila

USDA - *United States Department of Agriculture*

SUMÁRIO

RESUMO.....	VI
ABSTRACT.....	VII
LISTA DE TABELAS	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	XII
INTRODUÇÃO GERAL	15
OBJETIVOS.....	17
OBJETIVO GERAL.....	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
1. MEL	19
2. COMPOSTOS FENÓLICOS	23
3. ESTRESSE OXIDATIVO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	26
4. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE COMPOSTOS FENÓLICOS	27
5. DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE EM PRODUTOS NATURAIS	29
6. COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO MEL	33
7. SECAGEM EM <i>SPRAY DRYER</i>	35
8. SECAGEM DO MEL	39
REFERÊNCIAS	43
CAPÍTULO 2 - CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DO MEL	51
RESUMO.....	52
ABSTRACT	53
1. INTRODUÇÃO	54
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	55
2.1 Matéria-Prima	55
2.2 Umidade, pH, Acidez Livre, Cinzas, viscosidade e Cor	55
2.3 Determinação de Fenólicos Totais	56
2.3.1 Preparo da curva analítica com ácido gálico	56
2.4 Determinação de Flavonóides	57
2.4.1 Preparo da curva analítica de quercetina	57
2.5 Determinação da Atividade Antioxidante com DPPH	57
2.5.1 Capacidade de resposta do método DPPH	59
2.6 Análise Estatística	59
3. RESULTADO E DISCUSSÃO	60

3.1	Umidade, pH, acidez livre, cinzas, viscosidade e cor.....	60
3.2	Determinação de fenólicos totais.....	62
3.3	Determinação de flavonóides totais.....	64
3.4	Validação do método DPPH.....	65
3.5	Intervalos de Confiança.....	67
4.	CONCLUSÕES.....	69
	REFERÊNCIAS.....	70

CAPÍTULO 3 - DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA SECAGEM POR *SPRAY DRYER* NAS PROPRIEDADES DE COMPOSTOS BIOATIVOS E ANTIOXIDANTES DO MEL..... 73

	RESUMO.....	74
	ABSTRACT.....	75
1.	INTRODUÇÃO.....	76
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	77
2.1	Matéria-Prima.....	77
2.2	Obtenção da Solução de Secagem.....	77
2.3	Caracterização da Solução de Secagem.....	78
2.3.1	Teor de sólidos totais.....	78
2.3.2	Determinação de fenólicos totais.....	78
2.3.2.1	Preparo da curva analítica com ácido gálico.....	78
2.3.3	Determinação de flavonóides.....	79
2.3.3.1	Preparo da curva analítica de quercetina.....	79
2.3.4	Determinação da atividade antioxidante com DPPH.....	80
2.3.4.1	Capacidade de resposta do método DPPH.....	81
2.4	Secagem do Mel.....	81
2.5	Caracterização do Mel em Pó.....	82
2.5.1	Umidade.....	82
2.5.2	Densidade compactada.....	82
2.5.3	Molhabilidade.....	82
2.5.4	Higroscopicidade.....	82
2.5.5	Granulometria.....	82
2.5.6	Cor.....	83
2.5.7	Determinação de fenólicos totais.....	83
2.5.8	Determinação de flavonóides.....	83
2.5.9	Determinação da atividade antioxidante com DPPH.....	84
2.5.10	Análise Estatística.....	84
3.	RESULTADO E DISCUSSÃO.....	85
3.1	Secagem e caracterização do mel em pó.....	85
3.2	Determinação de Fenólicos totais.....	87
3.3	Determinação de Flavonóides totais.....	89
3.4	Determinação da atividade antioxidante por DPPH.....	90
3.5	Intervalo de confiança.....	92
4.	CONCLUSÕES.....	96
	REFERÊNCIAS.....	97
	CONCLUSÕES GERAIS.....	99

INTRODUÇÃO GERAL

O mel é considerado um fluido viscoso, aromático, doce e elaborado principalmente a partir do néctar das flores no qual abelhas melíferas coletam, transformam, combinam e maturam nos favos das colméias. Por isso, sua composição e características como sabor, cor e aroma podem sofrer grandes variações de acordo com a origem botânica da região, clima, solo, umidade, altitude, entre outros.

É composto principalmente por frutose e glicose, mas é reconhecido por sua diversidade em compostos com propriedades antioxidantes, como os flavonóides, ácidos fenólicos, determinadas enzimas, compostos derivados da reação de Maillard, ácido ascórbico, carotenóides e outros.

Os compostos antioxidantes possuem comprovada ação contra o estresse oxidativo no organismo humano, principalmente pelo mecanismo de seqüestro dos radicais livres e tem sido relacionado a vários efeitos preventivos contra diferentes doenças como câncer, doenças coronarianas, inflamatórias, doenças degenerativas, neurológicas e envelhecimento precoce.

Com os atributos sensoriais e tantas propriedades o mel é largamente utilizado pela indústria alimentícia na formulação de produtos como biscoitos, pães, bolos, farinhas lácteas, iogurtes, sorvetes e também pela indústria cosmética, na composição de produtos como hidratantes, xampus, condicionadores, creme anti idade e esfoliantes.

Entretanto, a manipulação desta matéria-prima pela indústria é dificultada pela forma que se apresenta, na maioria das vezes, como fluido viscoso, pseudoplástico, que exige especificações e dimensionamentos diferenciados para bombas, tubulações, decantadores, homogeneizadores e dosadores. São referidas dificuldades com incorporação de ar, formação de espuma, dificuldade na dosagem, padronização do produto final, desperdícios e aumento do tempo operacional. O mel ainda pode apresentar-se na forma cristalizada exigindo cuidadosa estocagem, descristalização (aquecimento) e homogeneização para garantir o sabor e aroma original.

Com o objetivo de sanar estas dificuldades, a transformação do mel líquido em um pó de fluxo livre tem sido o foco de muitos pesquisadores. Diversos processos de secagem do mel já foram patenteados, entre eles a secagem por

cilindros (*drum dryer*) e liofilização, mas o que se apresenta mais promissor devido à viabilidade e qualidade do produto final é o por atomização em *spray dryer*.

Os estudos nesta área têm se concentrado na melhoria dos parâmetros de processo visando o rendimento, aumento do teor de mel no pó, propriedades e fatores, como a temperatura de transição vítrea (tg), que interfere nas características físicas do produto seco, causando adesividade (*stickiness*), problema comum na secagem de produtos ricos em açúcares.

Por ser um segmento de pesquisa relativamente recente, não foram encontrados, até o momento, trabalhos que reportem o efeito do processo de secagem por *spray dryer* nas propriedades antioxidantes do mel. Tendo isso em vista, o presente trabalho propõe estudar o efeito do processo de secagem por atomização na atividade antioxidante, no teor de compostos fenólicos totais e nos flavonóides do mel.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do processo de secagem por *spray dryer* nas propriedades antioxidantes do mel, nos teores de compostos fenólicos totais e nos teores de flavonóides.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar as propriedades físico-químicas de umidade, pH, acidez, cinzas, viscosidade e cor do mel a ser submetido ao processo de secagem;

Quantificar o teor de compostos fenólicos totais, flavonóides e a atividade antioxidante do mel;

Quantificar o teor de compostos fenólicos totais, flavonóides e a atividade antioxidante da solução de mel e maltodextrina a ser submetida ao processo de secagem por atomização (solução alimentação);

Realizar o processo de secagem do mel por *spray dryer* utilizando maltodextrina como carreador;

Realizar análises físicas de umidade, higroscopia, molhabilidade, granulometria e cor para caracterizar o pó de mel obtido;

Quantificar o teor de compostos fenólicos totais, flavonóides e a atividade antioxidante do pó de mel obtido;

Analisar estatisticamente os resultados obtidos nos experimentos da solução alimentação e do pó de mel em base seca.

CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. MEL

Segundo a legislação brasileira, entende-se por Mel o produto alimentício produzido pelas abelhas melíferas a partir do néctar das flores ou das secreções procedentes de partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas, que ficam sobre partes vivas das mesmas, que as abelhas recolhem, transformam, combinam com substâncias específicas próprias e deixam maturar nos favos da colmeia (BRASIL, 1997).

O mel é constituído essencialmente por vários açúcares, predominantemente D-frutose e D-glicose, como também por outros componentes como enzimas, ácidos orgânicos e partículas sólidas coletadas pelas abelhas. Pode ser fluido, viscoso ou até mesmo sólido. A aparência do mel pode variar de quase incolor a marrom escuro (RYBAK-CHMIELEWSKA; SZCZÊSNA, 2004).

Méis chamados monoflorais ou uniflorais, são aqueles procedentes, principalmente, do néctar de uma só espécie vegetal, por exemplo, mel de laranjeira, mel de eucalipto, etc. De outro lado estão os méis multiflorais, ou poliflorais, ou heteroflorais, também chamados de silvestres, por serem originados de várias espécies vegetais. Há ainda, os méis extraflorais, chamados de méis de melato, são méis obtidos a partir de excreção de insetos sugadores de plantas, além dos méis de seiva (cana) (SAWYER, 1975).

Características como concentração de açúcares, minerais, vitaminas, compostos antioxidantes, entre outros, estão relacionadas à sua origem. Conforme pode ser observado na tabela 01, é comum existirem variações na composição física e química do mel, tendo em vista variados fatores que interferem na sua qualidade, como o clima, espécie de abelha, processamento, armazenamento, além do tipo de florada (SILVA; QUEIROZ; FIGUEIREDO, 2004).

A legislação brasileira estabelece para o mel que será destinado ao consumo humano padrões mínimos de qualidade, sendo exigido para cada 100g de amostra na maturidade: um valor de açúcares redutores (calculados como açúcar invertido) para mel floral de no mínimo 65g e para melato ou mel de melato e sua mistura com mel floral um mínimo 60g; para umidade de ambos o máximo 20g; sacarose aparente para mel floral o máximo 6g e para melato ou mel de melato e

sua mistura com mel floral o máximo 15g; sólidos insolúveis em água o máximo 0,1g, exceto no mel prensado, que se tolera até 0,5g, unicamente em produtos acondicionados para sua venda direta ao público; minerais (cinzas) o máximo 0,6g e no melato ou mel de melato e suas misturas com mel floral, se tolera até 1,2g. Além destes, o mel deve ter no máximo 50 miliequivalentes por quilograma de acidez, 60mg/Kg de hidroximetilfurfural; uma função diastásica mínima de 8 na escala de Göthe, não ter indícios de fermentação e necessariamente apresentar grãos de pólen (BRASIL, 2000).

Tabela 1 - Parâmetros físico-químicos de mel de abelha por diferentes autores.

Parâmetros	Sodré et al. (2003)	Alves et al. (2005)	Souza et al. (2004)	Silva, Queiroz e Figueiredo (2004)
Umidade (%)	19,00 – 20,54	23,14-32,50	26,80-32,00	17,6-19,7
Hidroximetilfurfural (mg.Kg ⁻¹)	5,56 – 43,10	0,52-16,54	0,52-7,93	0,30-8,96
Açúcares redutores (%)	67,38 – 71,02	64,29-82,10	66,00-76,20	68,92-85,49
Sacarose (%)	0,98-3,82	0,61-6,19	1,13-8,35	1,57-3,07
Viscosidade (mPa.s)	n.d.	24,00-116,00	36,00-168,00	n.d.
Condutividade (S.cm ⁻¹)	n.d.	267,50- 462,00	287,50- 525,00	n.d.
pH	3,52- 4,02	3,16-3,54	3,14-3,40	3,54-5,30
Acidez (meq.kg ⁻¹)	22,06 – 36,14	18,50-62,50	21,50-80,50	10,10-31,03
Proteína	0,13 – 0,39	n.d.	n.d.	n.d.
Índice de formol (mL.Kg ⁻¹)	5,38 – 13,06	3,16-3,54	3,50-10,00	n.d.
Cinzas (%)	0,2 – 0,4	n.d.	n.d.	n.d.

n.d. = não determinado

Os açúcares redutores (frutose e glicose) representam cerca de 85 a 95% dos carboidratos presentes no mel (WHITE, 1979). A proporção de frutose em relação à glicose é geralmente de 1,2/1. A alteração nessa proporção afeta o sabor do mel, pois a frutose tem maior poder de doçura e a glicose por sua vez é menos solúvel em água, favorecendo a formação de cristais (RODRÍGUEZ et al., 2004). O teor de sacarose, ocasionalmente, excede 1% do conteúdo de açúcares totais; já o

nível de maltose, é freqüentemente, três vezes mais alto que o de sacarose (SILVA et al., 2006). Também são encontrados outros açúcares como isomaltotetraose, maltulose, isomaltulose, nigerose, turanose, cojibiose, rafinose, dextrantriose, maltotriose (CRANE, 1985).

A água é o segundo componente em quantidade no mel. Normalmente quando maduro possui menos de 18,6% de umidade (HORN et al., 1996). A atividade da água varia entre 0,5 e 0,6 (IURLINA; FRITZ, 2005). O conteúdo de água influencia também a viscosidade, e seu teor excessivo leva a dificuldades na preservação e armazenamento (OLAITAN; ADELEKE; CANINI, 2007).

Os ácidos orgânicos compreendem uma pequena porção do mel (cerca de 0,5 %) e um valor elevado de acidez total pode ser um indicativo de fermentação. O ácido glucônico e o cítrico estão presentes em grandes quantidades e em menores quantidades podem-se encontrar ácidos como: fórmico, acético, benzóico, butírico, láctico, succínico, fólico, málico, oxálico, pirúvico, glicólico, fenilacético, tartárico, maléico, piroglutâmico e valérico (PEREIRA, 2003; WHITE, 1979; SUÁREZ-LUQUE et al., 2002).

Segundo Lianda (2009), é importante destacar também os derivados de ácidos fenólicos, visto que muitos deles são importantes por conferir aroma e sabor. Os compostos fenólicos de méis podem ser divididos em três grupos: ácidos benzóicos e seus ésteres; ácidos cinâmicos e seus ésteres e flavonóides livres. A proporção desses três grupos varia enormemente nos méis conforme as origens florais.

Segundo Frías e Hardisson (1992), o pH também é influenciado pela origem botânica, sendo que, méis florais geralmente possuem pH menor que 4,0 e méis de melato pH superior a 4,5. Os méis Brasileiros de *Apis* apresentam uma faixa de pH entre 3,95 e 4,09 e méis de meliponídeos 3,39 a 4,63. Este parâmetro não está diretamente relacionado com a acidez livre devido à ação de tampão dos ácidos e minerais presentes no mel (RODRÍGUEZ et al., 2004)

Existe uma relação inversa entre acidez livre e teor de cinzas, que se justifica, considerando que um aumento do teor de minerais corresponde a uma maior fração de ácidos salinizados presentes (FINOLA; LASAGNO; MARIOLI, 2007). Já foram identificados inúmeros elementos químicos como: K, Na, Ca, Mg, Mn, Ti, Co, Mo, Fe, Cu, Li, Ni, Pb, Sn, Zn, Os, Ba, Ga, Bi, Ag, Au, Ge, Sr, Be, Va e Zn (WHITE, 1979). Os minerais interferem na coloração dos méis, sendo os escuros os

que possuem maior concentração (ORTIZ-VALBUENA, 1988). O mel de origem floral tem menos cinzas do que o não floral, sendo este um parâmetro de qualidade relacionado à origem botânica (BOGDANOV, 1999).

O teor de proteínas do mel é de aproximadamente 0,2%, proveniente de abelhas e de plantas. Uma pequena quantidade das proteínas são enzimas, entre elas estão a invertase, diastase, glucose oxidase e catalase (ANKLAM, 1998). Os compostos nitrogenados são essencialmente alcalóides, derivados da clorofila, aminoácidos e aminas (AL-MAMARY; AL-MEERI; AL-HABORI, 2002). A prolina é o aminoácido predominante, mas também já foram identificados a arginina, triptofano e cisteína (ANKLAM, 1998). O índice de formol é uma análise realizada no mel para avaliar a presença de compostos nitrogenados (SIMAL; HUIDOBRO, 1984). Os menores e maiores índices, 1,67 e 29mL/Kg, foram encontrados por Sodré, Marchini e Carvalho (2002), analisando méis do litoral norte do Estado da Bahia.

A maioria dos méis possui propriedade de fluido newtoniano, e quando estes fluem estão sujeitos a fricção interna caracterizado por sua viscosidade. Esta se relaciona com o conteúdo de água, assim está consequentemente ligada à densidade relativa e a temperatura (ABU-JDAYIL et al., 2002). Alves et al. (2005), reportaram o menor valor de viscosidade, 24 mPa.s em méis da região da região semi-árida da Bahia e Marchini (2001), o maior valor em méis de *Eucalyptus camaldulenses* do Estado de São Paulo, 19.200 mPa.s.

O mel é pobre em vitaminas, mas foram identificadas concentrações ínfimas de: B1, B2, B3, B5, B6, B8, B9, C e D, sendo facilmente assimiláveis pela associação a outras substâncias como os carboidratos, sais minerais, oligoelementos, ácidos orgânicos e outros (CRANE, 1985).

Ao conjunto de plantas em cujas flores as abelhas coletam o néctar e o pólen se denomina flora apícola. O estudo desta flora é importante para identificar as espécies que contribuíram para a formação do mel de uma determinada região (MORETI et al., 2000).

Sodré et. al. (2003), estudaram as características de 36 amostras de mel da região litoral norte do Estado da Bahia, dentre elas, Alagoinhas, mesma região de procedência do mel do presente trabalho e identificou dois gêneros predominantes como planta apícola, *Eucalyptus* e *Mimosa*. Moreti et al. (2000), encontraram a mesma predominância de grupos polínicos para os Municípios de Cruz das Almas e Rio Real equidistantes 114km do município de Alagoinhas.

2. COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos são uma mistura complexa de produtos originados do metabolismo secundário das plantas, possuem diferentes estruturas químicas e reatividades. São constituídos por anéis aromáticos com um ou mais grupos hidroxil substituintes no anel, incluindo seus derivados funcionais (SHAHIDI; NACZK, 1995). Apresentam uma grande variedade de propriedades fisiológicas, como antiinflamatória, antialérgica, antiarteriogênica, antitrombótica, cardioprotetiva, vasodilatadora e antimicrobiana, mas o principal efeito desses compostos tem sido atribuído à sua ação antioxidante em alimentos (BALASUNDRAM; SUNDRAN; SAMMAN, 2006).

Ribéreau-Gayon (1968) adotou uma classificação para estes compostos, dividindo-os em polímeros, compostos pouco distribuídos na natureza e largamente distribuídos na natureza.

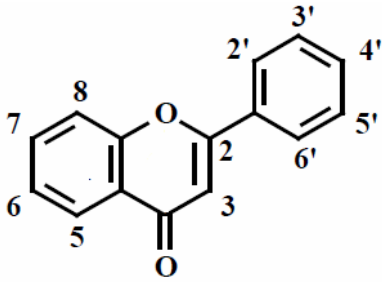
Os classificados como polímeros não se encontram na forma livre nos tecidos vegetais, entre eles estão os taninos e as ligninas. Os taninos são compostos de alto peso molecular, que conferem ao alimento a sensação de adstringência e as ligninas são polímeros complexos de grande rigidez e resistência mecânica, e sua hidrólise alcalina libera uma grande variedade de derivados dos ácidos benzóicos e cinâmicos (SOARES, 2002).

Na família dos pouco distribuídos na natureza estão os fenóis simples, o pirocatecol, a hidroquinona, resorcinol e a família dos aldeídos derivados dos ácidos benzóicos, que são constituintes de óleos essenciais como a vanilina (SOARES, 2002).

Na família dos compostos largamente distribuídos na natureza estão os flavonóides e os ácidos fenólicos (SOARES, 2002).

Os flavonóides possuem uma estrutura básica constituída por 15 átomos de carbono, que formam dois anéis aromáticos associados através de um segmento de 03 carbonos que, comumente cicliza com o oxigênio formando um anel heterocíclico como pode ser observado na figura 1 (CRUZ, 2007).

Figura 1 - Estrutura básica de um flavonóide

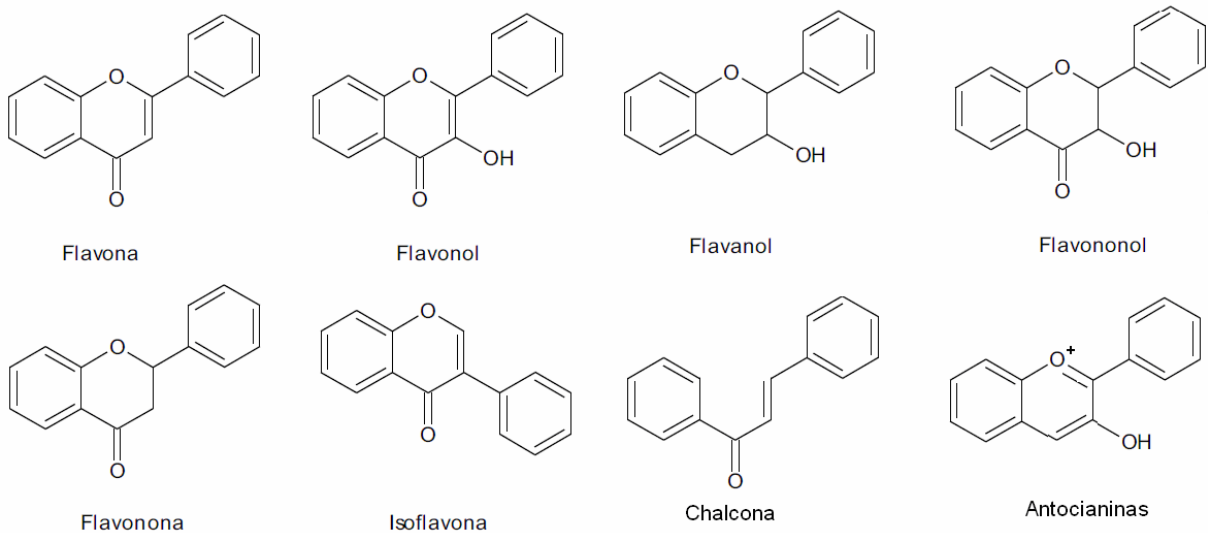


Fonte: Lianda (2009).

Cook e Samman (1996) classificaram os flavonóides em 8 grandes grupos (Figura 2): flavona, flavanona, isoflavona, flavonol, flavanol, flavonolol, chalcona e antocianinas.

O termo flavonóide é derivado do latim *flavus*, que significa amarelo, porem o grupo flavanona é incolor e as antocianinas possuem substâncias que variam de verde a azul (LOPES et. al., 2000)

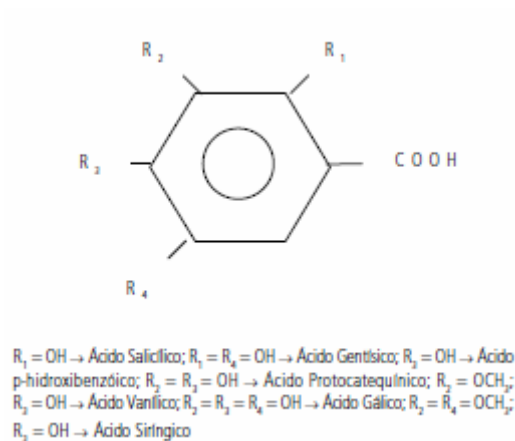
Figura 2 - Estrutura química dos principais grupos de flavonóides



Fonte: Cook e Samman (1996).

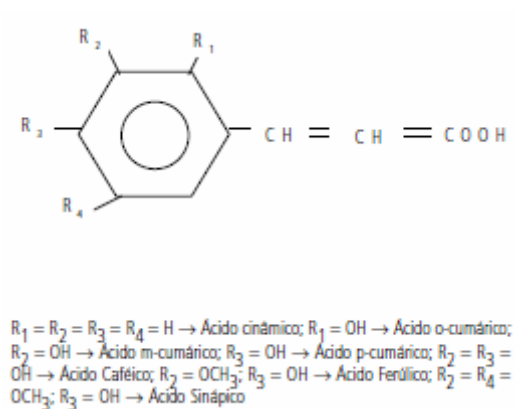
Os ácidos fenólicos por sua vez são divididos em três grupos: o dos ácidos benzóicos, que são os ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza, com sete átomos de carbono (C6-C1). Suas fórmulas gerais e denominações estão representadas na Figura 3; o formado pelos ácidos cinâmicos, que possuem nove átomos de carbono (C6-C3) representado na Figura 4 e as cumarinas, derivadas do ácido cinâmico por ciclização da cadeia lateral do ácido o-cumárico, conforme Figura 5 (SOARES, 2002).

Figura 3 - Estrutura química dos ácidos benzóicos



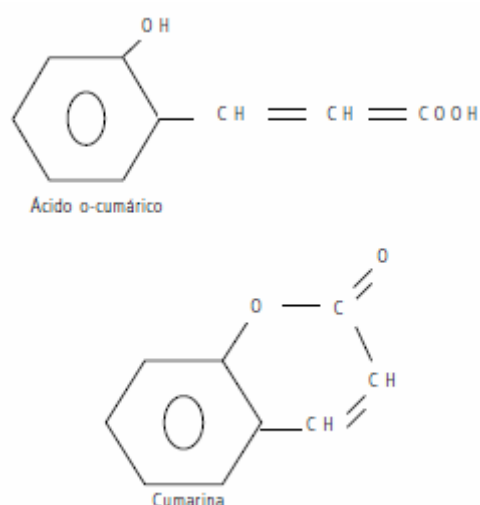
Fonte: Soares (2002)

Figura 4 - Estrutura química dos ácidos cinâmicos



Fonte: Soares (2002)

Figura 5 - Estrutura química das cumarinas



Fonte: Soares (2002)

3. ESTRESSE OXIDATIVO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os radicais livres (RL) são compostos cuja estrutura química possui um ou mais elétrons desemparelhados, o que os torna muito instáveis e altamente reativos (SOARES, 2002). Estas moléculas necessitam adquirir elétrons para estabilizarem, por isso reagem com a maioria dos compostos, oxidando-os (SANCHEZ-MORENO, 2002).

A formação de radicais livres pelo organismo em condições normais é inevitável, pois são necessários no processo de respiração celular a fim de gerar o ATP e no mecanismo de defesa usado pelos glóbulos brancos contra invasão de microrganismos (KUSS, 2005).

Fisiologicamente, os radicais livres de maior importância são conhecidos como espécies reativas de oxigênio (ERO), incluindo também nesta categoria, as substâncias capazes de reagir quimicamente e gerar novos radicais livres (YAMAMOTO, 2001). Sies (1991) relatou o ânion superóxido (O_2^-), radical perhidroxil ($HO_2\cdot$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($OH\cdot$), radical alcóxil ($RO\cdot$), radical peróxil ($ROO\cdot$), hidroperóxido orgânico ($ROOH$); oxigênio singlet (1O_2); carbonila excitada ($RO\cdot$), como as espécies reativas de oxigênio comumente geradas durante os processos metabólicos.

Radicais livres e espécies reativas de oxigênio desempenham papel fundamental no metabolismo celular. No entanto, podem gerar estresse oxidativo, quando estão em quantidades excessivas, levando a alterações teciduais responsáveis por diversas doenças, como o câncer (DRÖGE, 2002). Existem substâncias que reagem com esses radicais livres impedindo ou diminuindo o estresse oxidativo e a consequente destruição dos tecidos e são conhecidas como antioxidantes (HALLIWELL, 1992).

Inicialmente o termo antioxidante era aplicado para a descrição de inibidores de processos oxidativos, capazes de reagir com o radical peróxido. Agora este termo é aplicado a todos os inibidores de radicais livres (DENISOV; AFANAS, 2005).

Passos (2010) descreveu os antioxidantes como um conjunto heterogêneo de substâncias formadas por vitaminas, minerais, pigmentos naturais e outros compostos vegetais e, ainda, enzimas com capacidade de impedir a oxidação de substâncias químicas, formadas nas reações metabólicas ou por fatores exógenos como às radiações ionizantes.

Segundo Benavente-Garcia et al. (2000), a capacidade de um composto de ser antioxidante deriva de seu potencial de redução, da sua reatividade e efeito sinérgico com outros compostos, da sua habilidade de estabilização do elétron desemparelhado, da sua capacidade de quelar metais de transição e de sua capacidade de formação de rearranjos estruturais.

4. ATIVIDADE ANTOXIDANTE DE COMPOSTOS FENÓLICOS

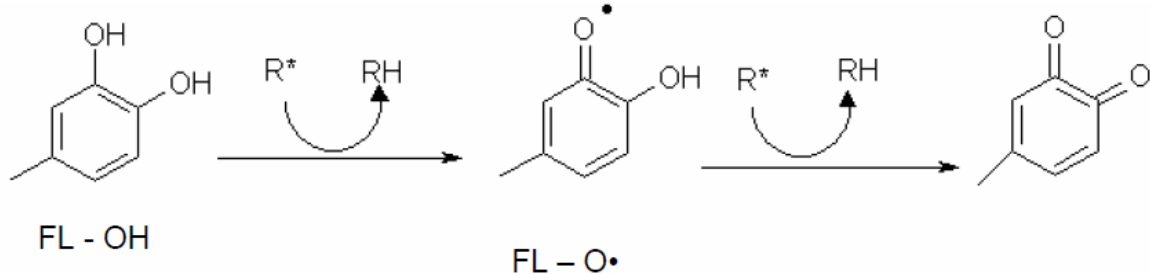
Geralmente, alimentos contêm antioxidantes naturais que podem seqüestrar radicais livres, como vitamina E, vitamina C e carotenóides, que têm gerado particular interesse como defensores contra doenças degenerativas. Entretanto, substâncias fenólicas, tais como ácidos fenólicos e flavonóides, são apontadas como antioxidantes consideravelmente mais potentes que a vitamina E e C, além de estudos ainda mostrarem uma alta correlação entre a atividade antioxidante total de algumas frutas e seu conteúdo fenólico (PRIOR, 2003).

Compostos fenólicos presentes em maior concentração não é necessariamente sinônimo de maior poder antioxidante das amostras, pois cada

composto possui um poder oxidante diferente de acordo com sua estrutura química (ALONSO et al., 2004).

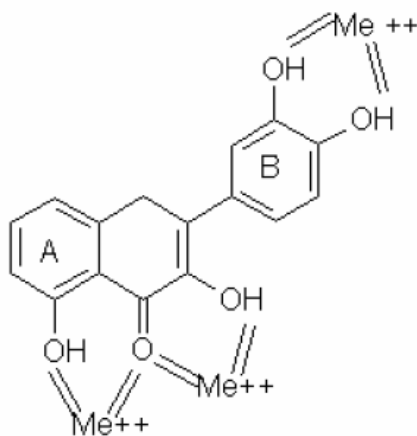
A atividade antioxidante dos polifenóis ocorre principalmente por meio de doação de elétrons ou átomos de hidrogênio aos radicais livres (Figura 6), ou como quelantes de metais, inibindo a formação de radicais livres catalisados por metais de transição (Figura 7). Os radicais fenólicos são intermediários bastante estáveis, pois reagem com outros radicais livres interrompendo as reações de propagação (SANCHEZ-MORENO, 2002).

Figura 6 - Esquemática do seqüestro de EROs (R^*) por flavonóides (FL)



Fonte: Pietta (2000).

Figura 7 - Sítios de ligação de Metais em flavonóides



Fonte: Pietta (2000).

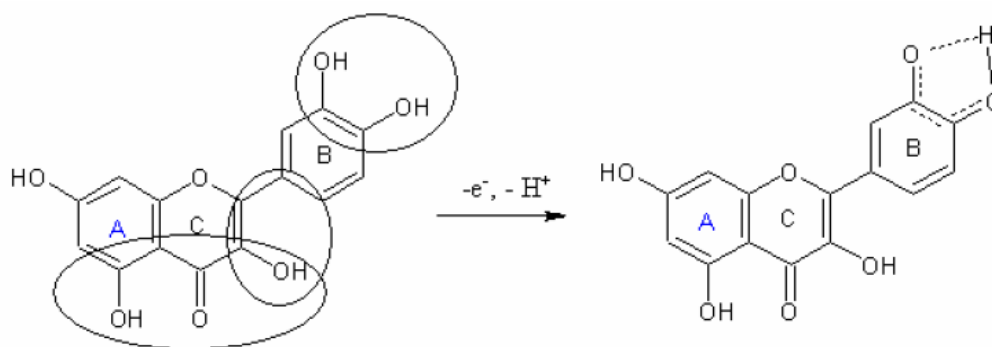
A maioria dos estudos de bioatividade dos compostos fenólicos relaciona sua atividade antioxidante, principalmente às propriedades redox de seus grupos hidroxil, atrelado as características estruturais das moléculas, como a presença ou

ausência de glicosídeos, número e posição das hidroxilas livres e esterificadas e das relações estruturais entre partes diferentes de sua estrutura química (BENAVENTE-GARCIA et al., 1999).

Na atividade antioxidante dos compostos fenólicos, a posição do segundo e terceiro grupo hidroxil são consideravelmente importantes. Os que possuem o segundo grupo hidroxil nas posições *orto* ou *para* tem alta atividade antioxidante, enquanto que, na posição *meta* esta é reduzida. A eficiência nas posições *orto* e *para* ocorre em parte pela estabilização do radical ariloxil pela dupla ligação de hidrogênio ou pela regeneração de outro difenol (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

Uma série de características estruturais (Figura 8) conferem aos polifenóis sua capacidade antioxidante: presença de uma estrutura o-dihidroxi no anel B garantindo alta estabilidade ao radical formado; a conjugação entre o anel B e o grupo 4-oxo através da dupla ligação entre os carbonos 2 e 3; a presença de grupos hidroxilo nos carbonos 3 e/ou 5 em conjunção com o grupo 4-oxo (SERRA, 2006).

Figura 8 - Características estruturais que contribuem para a atividade antioxidante dos polifenóis.



Fonte: Pietta (2000).

5. DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE EM PRODUTOS NATURAIS

Diversos métodos têm sido desenvolvidos, para avaliar a capacidade antioxidante de amostras biológicas. A determinação de fenóis totais e de flavonóides de amostras naturais (plantas, alimentos e mel), reflete, em alguma extensão, a capacidade total antioxidante dessas amostras (MEDA et al., 2005).

Segundo Salunkhe et al. (1982), os métodos Folin-Denis e Folin-Ciocalteu são exemplos de métodos utilizados para a determinação de fenólicos totais. O ensaio de Folin e Ciocalteu (1927) tem sido utilizado para mensurar os fenólicos totais em produtos naturais e seu mecanismo básico é uma reação de oxirredução. Embora não deva caracterizar a atividade antioxidante, este método é um dos melhores para estimar a atividade antioxidante de amostras de alimentos (ROGINSK; LISSI, 2005). Este ensaio não é específico e detecta todos os grupos fenólicos encontrados, incluindo os encontrados nas proteínas extraídas. A desvantagem do método é a interferência de substâncias redutoras como ácido ascórbico (SHAHIDI; NACZK, 1995).

O método envolve a redução do reagente (ácidos fosfotúngstico e fosmomolibdico) pelos compostos fenólicos das amostras com concomitante formação de um complexo azul (óxido de tungstênio e molibdênio) cuja intensidade aumenta linearmente a 765 nm (SWAIN; HILLIS, 1959).

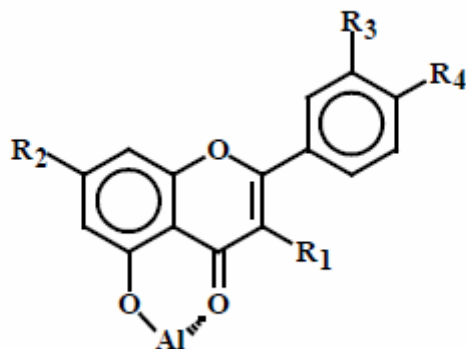
Existem controvérsias sobre o que tem sido detectado no método de Folin-Ciocalteu, se somente fenóis ou fenóis de agentes redutores adicionados de quelatos de metal. No entanto o método de Folin-Ciocalteu é simples e pode ser útil na caracterização e padronização de amostras naturais (RIBEIRO, 2007).

A análise por cromatografia líquida de alta eficiência é a forma mais precisa e exata para identificar e quantificar flavonóides em produtos biológicos, contudo, uma das técnicas que se enquadra bem para a determinação de flavonóides totais é a espectrometria no ultravioleta (MEDA et al., 2005).

O uso do cloreto de alumínio (AlCl_3) no diagnóstico de alguns grupamentos químicos foi realizado inicialmente no estudo de antocianinas. Em 1954, Harbone sugeriu o uso do cloreto de alumínio para a determinação espectrofotométrica de flavonóides. Em 1959, Dowd descreveu o método para a determinação da quercetina e desde então passou a ser largamente empregado para este fim, sendo considerado um reagente de deslocamento (*shift reagent*) (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970).

O alumínio, como cátion, forma complexos estáveis com os flavonóides em metanol, ocorrendo na análise espectrofotométrica um desvio para maiores comprimentos de onda e uma intensificação da absorção. A formação de um anel de seis membros com o átomo de alumínio, a hidroxila em C-5 e o grupo carbonila em C-4 garante a estabilidade do complexo obtido (Figura 9) (MEDA et al., 2005).

Figura 9 - Complexo Flavonóide-Al



Fonte: Lianda (2009).

A leitura é feita em espectrofotômetro a 415 nm, utilizando-se cloreto de alumínio em metanol (MEDA et al., 2005). Nessas condições, o complexo flavonóide-Al absorve mais intensamente e em comprimento de onda maior do que o flavonóide sem a presença do agente complexante (LIANDA, 2009).

Os ácidos fenólicos, mesmo os que formam complexos com $AlCl_3$, absorvem em comprimentos de onda muito inferiores, evitando-se dessa maneira interferências nas medidas de absorbância (LIANDA, 2009).

O uso do cloreto de alumínio para a determinação da quantidade de flavonóides totais não é, no entanto, um procedimento isento de limitações. O método é preciso, fornece desvios muito pequenos entre ensaios de mesma amostra, no entanto, ele pode ser pouco exato, os valores obtidos podem ser diferentes (geralmente inferior) em relação à quantidade de flavonóides total realmente presente na amostra analisada. Essa alteração pode ocorrer devido às diferentes bandas de absorção de cada classe de flavonóide. O comprimento de onda selecionado (415 nm) corresponde à banda de absorção do complexo quercetina-Al e os demais flavonóis absorvem bem próximo, porém os complexos derivados das flavonas, absorvem em comprimentos de onda inferiores, o que causa uma subestimativa nas determinações de misturas muito ricas em flavonas (LIANDA, 2009).

A mensuração da atividade antioxidante propriamente dita de uma substância não pode ser realizada diretamente. Somente os efeitos sobre um substrato ou sistema são passíveis de ser monitorado. A maioria dos métodos usa processos oxidativos, que envolvem a adição de um agente iniciador, como a

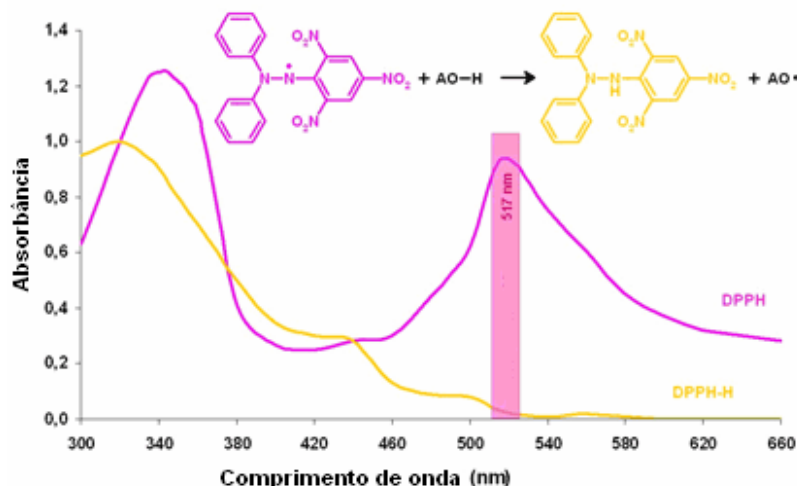
temperatura, agitação, pressão parcial de O₂, um metal de transição e exposição à luz para acelerar o processo (ANTOLOVICH et al., 2002).

Alguns autores propuseram testes que não recorrem à oxidação de substratos, mas à redução de radicais livres estáveis gerados in vitro, como resultado da atividade antioxidante das amostras em avaliação. Entre esses, destaca-se o método original de Blois (1958), adaptado por vários autores, no qual se utiliza o radical DPPH (2,2-difenil-1-picril hidrazil) que pode ser reduzido formando difenil picrilhidrazina (KOLEVA et al., 2002).

A molécula de DPPH é considerada um radical livre estável por apresentar um elétron livre que pode deslocar-se por toda a sua estrutura, e além do mais, não dimeriza facilmente como ocorre usualmente com os demais radicais livres. Esse efeito de ressonância que a molécula de DPPH apresenta resulta em uma coloração violeta escura, que é caracterizada por apresentar uma banda de absorção a cerca de 517 a 520 nm em solução etanólica ou metanólica. Quando a solução de DPPH é misturada com alguma substância que pode doar um radical hidrogênio, então a reação gera a sua forma reduzida (Figura 10) e ocorre a perda da coloração violeta e aparecimento de coloração amarela em virtude da presença do grupamento picril (LIANDA, 2009).

Os métodos espectrofotométricos resultam na eficiência do antioxidante, expressa como CE50, determinada como concentração equivalente do substrato que causa 50 % de perda na absorvência do DPPH (SANCHEZ-MORENO et al., 2002).

Figura 10 - Perfil espectrofotométrico do DPPH radical e DPPH inativado



Fonte: Passos (2010).

O método do DPPH mostra-se como uma alternativa rápida, pois ocorre em aproximadamente 30 min, de custo praticável por utilizar reagentes acessíveis e por não necessitar de equipamentos sofisticados. Além disso, nesse método, a eficiência antioxidante é mensurada em temperatura ambiente, eliminando-se o risco potencial de degradação térmica de algumas das substâncias analisadas (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

6. COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO MEL

O mel é um produto alimentar rico tanto em antioxidantes enzimáticos (glucose oxidase e catalase) como não enzimáticos (ácido ascórbico, flavonóides, ácidos fenólicos, derivados de carotenóides, ácidos orgânicos, produtos das reações de Maillard, aminoácidos e proteínas) (MEDA et al., 2005).

Recentemente, têm sido publicados inúmeros estudos sobre a avaliação da atividade antioxidante do mel, como o de Al-Mamary, Al-Meerri e Al-Habori (2002), Meda et al. (2005), Montagni (2005), Bertoncelej et al. (2007); Küçük et al. (2007), Serra (2008), Estevinho et al. (2008), Lianda (2009), Pichichero, Canuti e Canini (2009), Silici, Sagdic e Ekici (2010) e estes demonstram que o conteúdo em compostos fenólicos está fortemente correlacionado com a capacidade antioxidante e com a sua origem botânica.

Outra correlação realizada em estudos é entre a atividade antioxidante e a cor do mel. Muitos investigadores verificaram que os méis de cor escura apresentam um teor em compostos fenólicos superior e conseqüentemente, maior atividade antioxidante (SERRA, 2008; BERTONCELJ et al., 2007; ESTEVINHO et al., 2008). A cor escura reflete, em parte, o conteúdo em pigmentos como os carotenóides e flavonóides, muitos dos quais possuem propriedades antioxidantes (SERRA, 2008).

Aljadi e Kamaruddin (2004) no estudo de dois méis malasianos de *Apis mellifera* de origens florais diferentes (*Cocos nucifera* e *Melaleuca spp.*) verificaram não só existir uma correlação entre o conteúdo de fenólicos e o potencial antioxidante, mas também uma correlação significativa entre o teor de água do mel e a sua atividade antioxidante, uma vez que o método reflete apenas a atividade dos antioxidantes solúveis em água. O mel *Melaleuca* mostrou conter atividade antioxidante significativamente maior e foram detectados os ácidos fenólicos, tais

como ácidos gálico, ferúlico, cafeico, benzóico e cinâmico, enquanto o mel de coco apresentou os ácidos gálico, cafeico, benzóico e mais alguns outros compostos fenólicos desconhecidos.

Amostras de mel provenientes de três regiões distintas de Portugal, Lousã, Góis e Figueiró dos Vinhos, foram estudadas por Serra (2008), que verificou boa correlação entre o teor em compostos fenólicos, a intensidade da cor e a capacidade de inibição de radicais livres. Os méis mais escuros foram os que apresentaram maior teor em compostos fenólicos e maior capacidade de resgate de radicais. Em relação aos flavonóides não foram encontradas correlações significativas o que parece estar relacionado com o fato do método de Dowd poder conduzir a uma quantificação parcial dos flavonóides.

O estudo do mel da região nordeste de Portugal por Estevinho et al. (2008) demonstrou que os compostos fenólicos são parcialmente responsáveis pela atividade antibacteriana e antioxidante deste. E também coorelacionou méis escuros com maior teor de compostos fenólicos, maior atividade antioxidante e maior quantidade de substâncias com propriedades inibidora de microorganismos.

Pichichero, Canuti e Canini (2009) analisaram vinte e sete amostras de méis italianos de origens florais diferentes e obtiveram um conteúdo de fenólicos totais e flavonóide entre 6,05 a 27,60 mg AGE/100g e 4,19 a 21,17 mg QE/100g, respectivamente. A atividade antioxidante expressas em DPPH-CE50 variou entre 7,08-64,09 mg.mL⁻¹.

Lianda (2009), avaliou a atividade antioxidante de méis silvestres, de eucalipto e de laranjeira de diferentes regiões do Rio de Janeiro e São Paulo no Brasil e detectou que os teores de flavonóides totais das amostras não eram tão significativos quanto de fenóis, sugerindo que nos méis brasileiros os ácidos fenólicos são bem mais abundantes que os flavonóides. Nas amostras de méis silvestres foram identificados os ácidos protocatecuico, para-hidroxi-benzóico, vanílico, para-cumárico, para-metoxi-benzóico e cinâmico; e os flavonóides morina, quercetina, canferol e isoquercetina. Para as amostras de méis de eucalipto foram identificados os ácidos protocatecuico, para-hidroxi-benzóico e siríngico, além do flavonóide tricetina. E nas amostras de méis de laranjeira foram identificados como os mais representativos os ácidos protocatecuico, para-hidroxibenzóico e para-cumárico, e os flavonóides morina, quercetina, rutina e isoquercetina, sendo a

primeira vez que os flavonóides isoquercetina e canferol foram relatados em méis brasileiros.

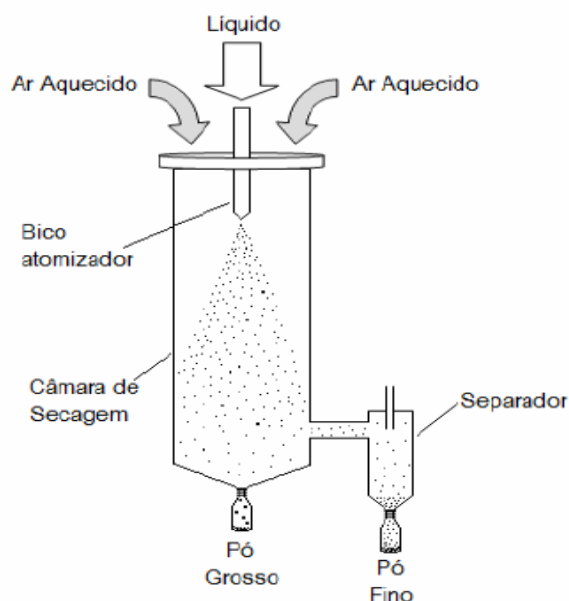
Silici, Sagdic e Ekici (2010) estudaram através do método de Folin-Ciocalteu e do DPPH 50 amostras de mel *Rhododendron* obtidas na região do Mar Negro da Turquia e encontraram um conteúdo de fenólico total que variou entre 0,24-141,83 GAE/100g e uma atividade antioxidante entre 12,76 e 80,80 mgAAE/g de mel.

7. SECAGEM EM *SPRAY DRYER*

A tecnologia *spray-drying* é muito utilizada em diversos segmentos industriais, incluindo o farmacêutico e o alimentício. Embora seja uma tecnologia que necessita de altos investimentos em instalações e operação, muitas são as razões pelas quais a mesma é muito utilizada. Estas vantagens incluem a produção de partículas de qualidade, a facilidade em relação ao uso contínuo, a aplicabilidade da técnica em materiais termossensíveis e termorresistentes, a capacidade de processar diversos tipos de matérias-primas e a flexibilidade para a definição de um projeto com base na formulação. Para fazer uso dessas vantagens, existem diversos aspectos que devem ser considerados. Dentre eles estão à avaliação da formulação e dos parâmetros de processo, o tipo específico de partícula a ser produzida e as propriedades do material utilizado (WENDEL; CELIK, 1998).

Secagem por nebulização (Figura 11) é a transformação de líquidos de baixa ou alta viscosidade, mesmo aqueles que são quase pastosos, em produto seco e pulverizado em uma única operação. O líquido ou pasta são atomizados usando-se um sistema centrífugo ou de alta pressão, onde as gotículas atomizadas imediatamente entram em contato com um fluxo de ar quente. A rápida evaporação permite manter baixa a temperatura do produto. A transferência de calor e de massa é realizada pelo contato direto entre o ar quente e as gotículas dispersas. As partículas finas são separadas do gás em ciclones externos ou em mangas coletoras (Mc CABE; SMITH, 1956; LINOYA; GOTAH; THOMAS, 1991; VAN'T LAND, 1991).

Figura 11 – Secagem por Nebulização



Fonte: Labmaq (2009).

O produto a ser seco passa por bicos de tamanhos que podem variar, influenciando no tamanho das partículas obtidas e a fração líquida é transformada num *spray* atomizado, onde o pó é carregado numa corrente de ar, que o transporta. (PERRY; CHILTON, 1980)

A otimização das características físicas e químicas dos produtos obtidos nessa técnica envolve, geralmente, a avaliação de parâmetros de processo, tais como aquecimento, volume de ar, tipo de bico atomizador, vazão do material a ser seco ou do sistema de atomização e temperatura do ar de secagem. Os parâmetros de formulação são avaliados conjuntamente com os de processo, por exemplo, quando se eleva a temperatura, é importante avaliar se não existe extensa desnaturação protéica, perda de aromas e flavorizantes, assim como comprometimento da solubilidade, estabilidade e compactação do produto (WENDEL; CELIK, 1998).

O aquecimento e a transferência de massa durante a secagem ocorrem com filmes de ar e vapor ao redor das gotículas. Esta proteção do vapor mantém a partícula na temperatura de saturação. Como a partícula não se torna seca, a evaporação continua acontecendo e a temperatura dos sólidos não se aproxima da

temperatura da saída da secagem. Devido a isto, produtos sensíveis podem ser secos em temperaturas relativamente altas (LANNES; MEDEIROS, 2003).

O formato da maior parte das partículas atomizadas deve ser esférico, o que garante fluxo como o de fluidos. Isto auxilia no processo de manuseio, envase e também na diminuição de custos. As partículas devem possuir, ainda, homogeneidade na composição e distribuição de tamanhos, evitando-se as partículas muito finas (LANNES; MEDEIROS, 2003).

Fatores como umidade e atividade de água são de grande importância no estudo do produto obtido. A definição do processo e a adequação dos parâmetros de operação do equipamento são particulares a cada produto final, em função das características que se deseja a ele imprimir (STRAATSMA et al., 1999).

A secagem de alimentos ricos em açúcar por *Spray* é difícil devido à presença de alto teor de açúcares de baixo peso molecular e ácidos orgânicos. Estes compostos apresentam comportamento constantemente pegajoso durante a secagem. Adesividade ou *Stickiness* é o termo usado para descrever os fenômenos de coesão partícula-partícula e adesão partícula-parede no processo de secagem. A adesividade não depende apenas das propriedades do material, mas também das variáveis aplicadas ao sistema de secagem (TRUONG; BHANDARI; HOWES, 2005a).

A adesividade esta relacionada à mudança de estado físico, pois estruturas amorfas ou parcialmente amorfas são formadas durante a rápida remoção de água em processos como a desidratação por *Spray-dryer*. A temperatura onde acontece essa mudança de estrutura é chamada de temperatura de transição vítrea (T_g) (MAGALHAES NETTO, 1997).

O mecanismo de adesividade tem sido explicado pelo fluxo viscoso dessas substâncias amorfas impulsionadas pela energia de superfície. Quando as partículas estão em temperaturas superiores à sua temperatura de adesividade *sticky-point*, os materiais amorfos mudam para um estado líquido-borrachoso e grudam. A temperatura do *sticky-point* é normalmente cerca de 10 a 23°C maior que a T_g (BHANDARI et al., 1997; HENNINGS; HOCKEL; LANGRISH, 2001).

As propriedades físicas como higroscopicidade, solubilidade, ponto de fusão e temperatura de transição vítrea de cada tipo de açúcar, influenciam de forma individual a performance de desidratação de um alimento (BHANDARI et al., 1997).

A tabela 02 ilustra como as propriedades físicas de cada açúcar estão correlacionadas com seu comportamento *stickiness*.

Tabela 2 - Propriedade física dos açúcares e comportamento *stickiness* durante o processo de *spray drying*.

Açúcar	Higroscopicidade (relativo)*	Ponto de fusão(°C)	Solubilidade em H₂O	Tg (°C)	Stickiness (relativo)*
Lactose	+	223	35	101	+
Maltose	++	165	52	87	++
Sacarose	+++	186	71	62	+++
Glicose	+++++	146	72	31	+++++
Frutose	+++++	105	89	5	+++++

*: + (pouco); ++ (baixo); +++ (médio); ++++ (alto); +++++ (muito alto).

Fonte: Bhandari et al. (1997).

A performance de secagem torna-se um fator que afeta a adesividade. Se forem aplicadas temperaturas de secagem onde a partícula atinja temperaturas inferiores a Tg, a adesividade será limitada (TRUONG; BHANDARI; HOWES, 2005b). Métodos como a introdução de ar frio na parte inferior do secador, ou o resfriamento da temperatura da parede e o controle adequado da temperatura do ar de saída da secagem foram descritos por Bhandari et al. (1997) e os modelamentos matemáticos para otimização de processo de secagem por Truong, Bhandari e Howes (2005a e 2005b) apresentam-se como opções para o controle do *stickiness*.

Um dos métodos para reduzir a adesividade dos pós é adição de componentes de maior Tg na solução de alimentação do secador (HEBBAR; RASTOGI; SUBRAMANIAN, 2008). Aditivos têm sido usados para produzir essa alteração física no produto, reduzindo a adesividade e, conseqüentemente, a deposição nas paredes do *spray dryer*. Estes são denominados de agentes carreadores de secagem, ou material de parede, que podem ser carboidratos (amido, maltodextrina, xaropes de milho, dextrana, sacarose e ciclodextrinas); celulose (carboximetilcelulose, metilcelulose e outras); goma (goma acácia, agar, carragena e outras); lipídios (ceras, parafinas, diglicerídeos e outros) e proteínas (glúten, caseínas, gelatinas, albuminas, hemoglobinas e peptídeos) (BARBOSA,2010). Por exemplo, algumas maltodextrinas possuem uma Tg de 205°C, sua adição ao material produz um incremento na Tg e conseqüentemente,

uma redução na diferença entre a temperatura de secagem e a Tg (TRUONG; BHANDARI; HOWES, 2005a).

Os produtos a base de amido parcialmente hidrolizados têm sido bastante utilizados como agentes carreadores de secagem. Possuem sabor neutro, ausência de odor e são facilmente digeríveis. São usualmente classificados de acordo com o seu grau de hidrólise, expresso como (DE) dextrose equivalente (BARBOSA, 2010).

Polímeros de baixo peso molecular apresentam menor Tg. Polímeros que possuem homólogos com diferentes pesos moleculares, como as maltodextrinas, possuem diferentes Tgs conforme apresentado na tabela 3 (BHANDARI; HOWES, 1999).

Tabela 3 – Temperatura de transição vítrea de Maltodextrinas de diferentes pesos moleculares

Maltodextrina	Peso molecular	Tg(°C)
DE 36	500	100
DE 25	720	121
DE 20	900	141
DE 10	1800	160
DE 5	3600	188

Fonte: Adaptado de Bhandari e Howes (1999)

8. SECAGEM DO MEL

Os produtos desidratados de mel são formulados e processados para obter um produto de fluxo livre. O conteúdo de mel, nesses produtos varia entre 50-75%. A maioria dos processos comerciais para converter mel líquido em mel em pó passam por processos de cilindro/rolo ou atomização, mas também foram relatadas outras tecnologias, como microondas, vácuo e liofilização (HEBBAR; RASTOGI; SUBRAMANIAN, 2008).

A maioria destes processos foram patenteados: o processo de liofilização do mel foi descrito inicialmente por Szejtli e Lengyel (1985) em um estudo para a preservação do aroma natural do mel em pó utilizando ciclodextrina como encapsulador; Himmelrich and Company (1989) liofilizou uma mistura de água e mel

e Montesant, (2007), em uma patente brasileira apresenta técnicas de liofilização com encapsuladores na forma de pó, como a maltodextrina, amido de milho, cacau, dióxido de silício, goma e amido de mandioca.

Schanze (1985), em seu estudo propôs uma alternativa para o mel em pó, proveniente dos Estados Unidos, disponível no comércio da época, produzido por liofilização com cerca de 30% de sólidos de mel. Para tanto, o mesmo apresentou um método de produção através da adição de sílica sob intensa agitação até que se obtivesse uma “farofa” que podia variar de 50 a 85% de peso de mel para o produto final.

Ogilvie Mills (1990) patenteou a secagem de mel puro, melaço ou misturas pelo processo de secagem por extrusão ou por aplicação em finas camadas em cilindros.

Bee K CO, LTD. (1994) patenteou a desidratação por evaporação a vácuo, com posterior colocação em formas para cristalização em blocos que permitiam a utilização do produto pela indústria por peso, porém com fracionamento difícil.

Um dos processos de secagem por *Spray Dryer* foi patenteado por Takashi (1984) utilizando a adição de amido 1,2 a 1,4 vezes em relação ao mel. A mistura foi diluída com água até 20-25% p/p e, em seguida, atomizado em uma temperatura de entrada de 140-150 °C e uma temperatura de saída de 90-95 °C. O pó seco de mel teve uma tendência a pegajosidade quando exposto e necessitou de embalagens em papel de alumínio laminado. O teor de mel no produto final foi relatado ser inferior a 50%.

Kazuhiro (1984) sugeriu a adição de ciclodextrina e proteínas, como a caseína, como coadjuvantes no processo de secagem por atomização. A Ciclodextrina provocou algumas mudanças indesejáveis no produto final, além de ser um aditivo proibido para utilização em alimentos em alguns países como Índia, Estados Unidos da América, e alguns países europeus. A adição da proteína caseína se apresentou útil no controle da secagem, mas tornou o produto sem qualquer aroma.

Mitsukatsu, Yoshiaki e Tomoyuki (1985) demonstraram um processo de pulverização utilizando a mistura dos aditivos dextrina, amido e lactose para a produção de mel em pó. A adição de aditivos 5 vezes maior que o teor de mel,

tornaram o produto menos doce e menos solúvel em água, o que resultou em uma desagradável sensação na boca.

Em outro processo patenteado, Takashi et al. (1988) propuseram a utilização de maltitol em pó polvilhado com mel concentrado. A concentração do mel foi realizada em evaporador a vácuo em temperatura inferior a 60°C. O mel foi polvilhado com maltitol em ambiente com umidade relativa menor que 45% e o conteúdo de mel no pó foi relativamente alto 68 a 75%. O processo se apresentou tedioso e requeria a mistura em baixa umidade relativa, além da necessidade de concentrar o mel. Devido às limitações dessa abordagem, o método de secagem de mel por *spray* ainda permaneceu como perspectiva para a produção de mel em pó (HEBBAR; RASTOGI; SUBRAMANIAN, 2008).

Nobuhiko, Katsuya e Nagataka (1992) relataram um processo que envolve a mistura de fibra alimentar solúvel, mel e água. A secagem da mistura se deu em temperaturas de entrada de 100-180 °C e saída no intervalo de 70-100 °C. O teor de fibra relatado ficou acima de 23%, em termos de sólidos de mel. O produto obtido por esse método caracterizou-se como um alimento funcional, já que a fibra alimentar solúvel é conhecida por facilitar a digestão. No entanto, o maior teor de umidade (72%) na alimentação aumentou o custo de secagem.

Yoshihide e Hideaki (1993) desenvolveram um processo em que dispersantes foram adicionados ao mel e o pH da solução foi mantido entre 6,5-7,5. A mistura foi atomizada com temperaturas na entrada e saída na faixa de 120-200 °C e 70-120 °C, respectivamente. O pH da alimentação foi ajustado para reduzir a termoplasticidade de materiais açucarados durante a secagem. O teor de mel foi de cerca de 50%, em termos de sólidos de mel no pó. O mel em pó obtido não se apresentou higroscópico e possuía sabor agradável, além de vida útil mais longa. No entanto, o baixo teor de sólidos (25%) no material de alimentação requereu maior energia para a secagem.

Um método aperfeiçoado para produção de mel em pó por *spray-dried* foi posteriormente desenvolvido por Hebbar et al. (2002) que eliminou algumas das desvantagens dos processos acima mencionados. O produto obtido tinha conteúdo de mel razoavelmente bom (~ 52%), sabor de mel, cor aceitável (L: 77,87, a: -1,60 e b: 18,71) com uma coloração amarelada e uma natureza fluida. O mel foi misturado com aditivos, como dextrina, maltose e antiaglomerantes e a mistura foi atomizada com temperaturas na entrada e saída no intervalo de 115-125 °C e 80-85 °C,

respectivamente, que são muito mais baixas do que as condições empregadas em outros métodos. Considerando a natureza termolábil de mel, ligeiras condições de secagem foram aplicadas para obter um produto de boa qualidade. O produto foi embalado em bolsas folha de alumínio laminado. O processo acima usou uma nova abordagem de adição de antiaglomerante durante o estágio de preparação, que também serviu para aumentar a pH da solução de alimentação.

Segundo Adhikari et al. (2001) mel em pó puro, fluído com boa qualidade e mantendo suas características pode ser produzido usando secadores de pulverização com características especiais de construção, como sistemas de resfriamento da parede da câmara de secagem.

Além da produção do pó, alguns estudos foram conduzidos com foco na recuperação de aromas, como descrito na patente da Huny Hunks LTD. (2006), onde o mel antes de ser desidratado é submetido a uma evaporação a vácuo e o destilado recolhido é adicionado ao mel em pó que pode ser obtido por vários processos como por *spray dryer* utilizando temperatura de ar de entrada de 120°C a 200°C, e saída de 70 a 120°C. A patente apresenta também uma vasta gama de parâmetros de secagem que podem ser utilizados, dependendo do projeto do secador e que o concentrado de mel também poderá ser adicionado de vários aditivos, como por exemplo maltodextrina e dióxido de silício, antes de ser secado por atomização.

Boonyai, Bhandari e Howes (2006), no estudo da temperatura de transição vítrea e do *Stikiness* de pós alimentícios, utilizaram maltodextrina DE6 incorporada com mel (82% de sólidos) obtendo uma solução de 45% de sólidos totais, onde 50% desse total correspondiam a sólidos de mel. O mel utilizado no estudo foi Mel de eucalipto australiano *Napunyah*. A solução foi aquecida a 45-50°C para sua preparação, e foi mantida a esta temperatura durante todo o processo de secagem. A solução foi atomizada 150 ± 1°C e 65 ± 2°C na temperatura do ar de entrada e saída respectivamente.

Considerando as temperaturas de secagem adotadas na obtenção de pó de mel, a utilização de um carreador, que de certa forma pode contribuir para a proteção de compostos sensíveis, o presente trabalho se propõe a elucidar o comportamento da atividade antioxidantes do mel sob estas condições de processo.

REFERÊNCIAS

- ABU-JDAYIL, B. et al. Heat effect on rheology of light and dark-colored honey. **Journal of Food Engineering**, New York, v.51, n.1, p.33-38, 2002.
- ADHIKARI, B. et al. Stickiness in foods: A review of mechanisms and test methods. **International Journal of Food Properties**, v. 4, n.1, p. 1-33. 2001.
- AL-MAMARY, M.; AL-MEERI, A.; AL-HABORI, M. Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. **Nutrition Resaearch**, v. 22, n. 9, p. 1041-1047, sep. 2002.
- ALJADI, A. M.; KAMARUDDIN, M. Y. Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. **Food Chemistry**, v. 85, n. 4, p. 513–518, may 2004.
- ALONSO, A. M. et al. Study of the antioxidant power of brandies and vinegars derived from Sherry wines and correlation with their content in polyphenols. **Food Research International**, v. 37, n. 7, p. 715-721, aug. 2004.
- ALVES, R. M. O. et al. Características físico-químicas de amostras de mel de *Melipona mandacaia* Smith (Hymenoptera: Apidae). **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 4, p. 644-650, out./dez. 2005.
- ANKLAM, E. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. **Food Chemistry**, v. 64, n. 4, p. 549–562, 1998.
- ANTOLOVICH, M. et al. Methods for testing antioxidant activity. **The Analyst**, v.127, n.1, p.183-98, jan. 2002.
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191-203, 2006.
- BARBOSA, S. J. **Qualidade de suco em pó de mistura de frutas obtido por spray drying**. 122 f. 2010. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal). Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba-MG, 2010.
- BEE K CO, LTD. (Tokyo, JP). Taizo Kanayama. Process for producing solid honey. **United States Patent** n. 5,356,650, 27 nov. 1991, 18 oct. 1994.
- BENAVENTE-GARCIA, O. et al. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. **Food Chemistry**, v. 68, N. 4, p. 457-462, mar. 1999.
- BERTONCELJ, J. et al. Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. **Food Chemistry**, v. 105, n. 2, p. 822-828, 2007.
- BHANDARI, B. R. et al. A semi-empirical approach to optimise the quantity of drying aids required to spray dry sugar-rich foods. **Drying Technology**, v. 15, n. 10, p. 2509-2525, 1997.

BHANDARI, B. R.; HOWES, T. Implications of glass transition for the drying and stability of dried foods. **Journal of Food Engineering**, London, v. 40, p. 71–79, 1999.

BLOIS, M.S, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v.181, p. 1199-1200, apr. 1958.

BOGDANOV, S. Honey quality and international regulatory standards: review by the international honey commission. **Bee world**, v. 80, n. 2, p. 61-69, 1999.

BOONYAI, P.; BHANDARI, B.; HOWES, T. Applications of thermal mechanical compression tests in food powder analysis. **International Journal of Food Properties**, v. 9, n. 1, p. 127-134, 2006

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA** (aprovado pelo decreto 30.691 de 29 de mar. de 1952, alterado pelos decretos 1. de 25 de jun. de 1962, 1.236 de 02 de set. de 1994, 1.812 de 08 de fev. de 1996 e 2.244 de 04 de jun. de 1997). Diário Oficial da União. Brasília, DF, 1997. Seção 1, 217p.

BRASIL. Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000. **Regulamento técnico de identidade e qualidade do mel**. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 2000. Seção 1, p.16-17.

COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids—Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **Journal of Nutrition and Biochemistry**, v. 7, n. 2, p. 66-76, feb. 1996.

CRANE, E. **O livro do mel**. 2 ed. São Paulo: Nobel, 1985. 226 p.

CRUZ, D. S. M. G. **Chá Verde dos Açores**: Caracterização química e determinação da actividade antioxidante. 57 f. 2007. Monografia (Graduação em Química). Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2007.

DENISOV, E.; AFANAS EV I. **Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology**. Boca Raton: CRC Taylor & Francis Group, 2005. 981 p.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, n. 1, p. 47-95, jan. 2002.

ESTEVINHO, L. et al. Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 12, p. 3774–3779, dec. 2008.

- FINOLA, M. S., LASAGNO, M. C., MARIOLI, J. M. Microbiological and chemical characterization of honeys from central Argentina. **Food Chemistry**, v. 100, n. 4, p. 1649-1653, 2007.
- FOLIN, C.; CIOCALTEAU, V. Tyrosine and tryptophan determination in proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 73, p. 627-650, 1927.
- FRÍAS, I.; HARDISSON, A. Estudio de los parámetros analíticos de interés en la miel. II: Azúcares, cenizas y contenido mineral y color. **Alimentaria**, v. 28, n. 235, p. 41-43, 1992.
- HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **Journal of Neurochemistry**, v. 59, n. 5, p. 1609-1623, nov. 1992.
- HEBBAR, U.; RASTOGI, N. K; SUBRAMANIAN, R. Properties of dried and intermediate moisture honey products: a review. **International Journal of Food Properties**, v. 11, n. 4, p. 804–819, abr. 2008.
- HEBBAR, U. et al. An improved process for the preparation of spray dried honey powder. **Indian Patent**, 1562/DEL/02, 2002.
- HENNINGS, C., KOCKEL, T. K., LANGRISH, T. A. G. New measurements of the sticky behavior of skim milk powder. **Drying Technology**, v. 19, n. 3, p. 471–484, 2001.
- HIMMELRICH AND COMPANY (Deerfield Beach, FL). Malcolm Slifkin. Method of crystallization of honey. **United States Patent** n. 4,885,035, 05 dez.1989, 26 jan.1989.
- HORN, H. Méis Brasileiros: resultados de análises físico-químicas e palinológicas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 11., 1996, Teresina. **Anais...** Teresina: Confederação Brasileira de Apicultura, 1996. P. 403-429.
- HUNY HUNKS LTD. (Regina Saskatchewan, CA). Rick Green. Dried honey enriched with volatile honey compounds. **United States Patent** n. 7,101,582. 12 jan. 2001, 05 sep. 2006.
- IURLINA, M. O.; FRITZ, R. Characterization of microorganisms in Argentinean honeys from different sources. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105, p. 297-304, 2005.
- KAZUHIRO, K. Method for pulverizing honey or honey-containing liquid food. **Japanese Patent**, JP59002663, 29 jun. 1982, 09 jan. 1984.
- KOLEVA, I. I. et al. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. **Phytochemical Analysis**, v.13, n.1, p.8-17, jan./fev. 2002.
- KÜÇÜK, M. et al. Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 526-534, 2007.

- KUSS, F. Agentes oxidantes e antioxidantes. 10 p. 2005. Disponível em: <http://www6.ufrgs.br/bioquimica/posgrad/BTA/ag_oxid_antioxid.pdf. 2005>. Acesso 15 abr. 2011.
- LANNES, S. C. S.; MEDEIROS, M. L. Processamento de achocolatado de cupuaçu por spray-dryer. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.39, n.1, jan./mar. 2003.
- LIANDA, R. L. P. **Perfil de substâncias fenólicas de méis brasileiros por cromatografia líquida de alta eficiência e avaliação do potencial antioxidante**. 142 f. 2004. Tese (Doutorado em química). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.
- LINOYA, K.; GOTAH, K.; HIGOSHITANI, K. **Powder technology handbook**. 2 ed. New York: Wiley, 1991. 794 p.
- LOPES, R. M. et al. Flavonóides. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.17, p. 18-22, 2000.
- MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **Systematic identification of flavonoids**. New York (USA): Springer-Verlag, 1970. 354 p.
- MAGALHÃES NETTO, F. Influência da atividade de água, na temperatura vítrea. In: JARDIM, D. C. P.; GERMER, S. P. M. **Atividade de água em alimentos**. Campinas: ITAL, p. 4-14, 1997.
- MARCHINI, L. C. **Caracterização de amostras de méis de Apis mellifera L., 1758 (Hymenoptera: Apidae) do Estado de São Paulo, baseada em aspectos físico-químicos e biológicos**. 2001. 83f. Tese (Livre Docência) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- McCABE, W. L.; SMITH, J. C. **Unit operations of chemical engineering**. New York: Mc-rav-Hill, 1956. 945 p.
- MEDA, A. et al. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkin Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry** 2005, 91(3), 571-577.
- MITSUKATSU, S.; YOSHIKI, Y.; TOMOYUKI, I. Powder honey composition. **Japanese Patent**, JP60186256, 1985.
- MONTAGNI, S. M. S. **Identificação de substâncias fenólicas em mel e pólen apícola de diferentes origens botânicas e geográficas**. 2005. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2005.
- MONTESANT, R. (São Paulo, BR) Processo de fabricação de mel desidratado. 2008. **Instituto Nacional de Propriedade Intelectual**, PI0700364-1A, 15 jan. 2007, 02 set. 2008.

MORETI, A. C. C. C. et al. Espectro polínico de amostras de mel de *Apis mellifera* L., coletadas na Bahia. **Bragantia**, v.59, n. 1, p.1-6, 2000.

NOBUHIKO, A.; KATSUYA, N.; NAGATAKA, Y. Honey containing powder and its production. **Japanese Patent**, JP4148654, 12 oct. 1990, 21 may 1992.

OGILVIE MILLS, Inc. (Keokuk, IA). George F. Bateson; Charles A. Morris; Glenn C. Heuer. Methods for drying honey and molasses. **United States Patent** n. 4,919,956, 17 jan. 1985, 24 apr.1990.

OLAITAN, P. B., ADELEKE, O. E., OLA, I. O. Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. **African Health Sciences**, v. 7, n. 3, p. 159-165, 2007.

ORTIZ-VALBUENA, A. The ash content of 69 honey samples from La Alcarria and neighbouring areas, collected in the period 1985-87. **Cuadernos de Apicultura**, n. 5, p. 8-9, 1988.

PASSOS, L. S. C. **Avaliação da atividade antioxidante e perfil cromatográfico de extratos do Jaborandi (*Piper aduncum*)**. 88 f. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade do Vale do Rio Doce, Governador Valadares, 2010.

PEREIRA, F. M. et al. **Produção de mel**. Teresina: Embrapa Meio – Norte, 2003 (Sistema de produção n° 3). Disponível em: <<http://www.cpamn.embrapa.br/pesquisa/apicultura/mel.htm>>. Acesso em: 12 mar. 2011.

PERRY, R. H.; CHILTON, C. H. **Manual de engenharia química**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1980. 1250 p.

PICHICHERO, E.; CANUTI, L.; CANINI, A. Characterisation of the phenolic and flavonoid fractions and antioxidant power of Italian honeys of different botanical origin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, n. 4, p. 609-616, mar. 2009.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v.63, p.1035-1042, 2000.

PRIOR, R. L. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 78, (suppl.). p. 570S-578S, 2003.

RIBEIRO, E. T. S. **Emprego de Técnicas de Extração a Alta e Baixa Pressão para Obtenção de Polifenóis Antioxidantes do Subproduto Agroindustrial de Maçã**. 118 f. 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

RIBÉREAU-GAYON, P. **Les Composés Phénoliques des Végétaux**. Paris : Dunod, 1968. 254p.

RODRÍGUEZ, G. O. et al. Characterization of honey produced in Venezuela. **Food Chemistry**, v. 84, n. 4, p. 499-502, mar. 2004.

ROGINSK, Y. V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v. 92, n. 2, p. 235-254, sep. 2005.

RYBAK-CHMIELEWSKA, H.; SZCZÊSNA, T. HPLC study of chemical composition of honeybee (*apis mellifera* L.) venom. **Journal of Apicultural Science**, v. 42, n.2, p.103-109, dez. 2004.

SALUNKHE, D. K. et al. Chemical, biochemical and biological significance of polyphenols in cereals and legumes. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 17, n. 3, p. 277-305, 1982.

SANCHEZ-MORENO, C. Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in food and biological systems. **Food Science and Technology International**, v.8, n.3, p.121-137, jun. 2002.

SAWYER, R. W. Melissopalynology in the determination of the geographical and floral origin of honey. **Journal of the Association of Public Analysis**, v. 13, p. 64-71, 1975.

SCHANZE, R. Method for the preparation of powderized honey products, the products obtained according to the method and their use. **United States Patent** n. 4,504,516, 08 feb. 1983, 12 mar.1985.

SERRA, A. S. **Extractos de plantas com aplicações terapêuticas**: Contribuição para a sua caracterização química e determinação da actividade antioxidante. 2006. Dissertação (Mestrado em Química Analítica Aplicada). Universidade de Lisboa, Lisboa, 2006.

SERRA, M. C. C. **As propriedades antioxidantes do mel**. Centro de Estudos de Engenharia Química do Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, 2008. Disponível em: <<http://www.oapicultor.com/artigos/Propriedades%20anti%20Oxidante.pdf>>. Acesso em 20 fev. 2011.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Food phenolics**: souces, chemistry, effects and applications. Lancaster: Technomic Publishing, 1995. 331 p.

SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. **The American Journal of Medicine**, v.91, sup. 3C, p.31S-38S, 1991.

SILICI, S.; SAGDIC, O.; EKICI, L. Total phenolic content, antiradical, antioxidant and antimicrobial activities of *Rhododendron* honeys. **Food Chemistry**, v. 121, n. 1, p. 238-243, jul. 2010.

SILVA, C. L.; QUEIROZ, A. J. M.; FIGUEIREDO, R. M. F. Caracterização físico-química de méis produzidos no Estado do Piauí para diferentes floradas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 8, n. 2/3, p.260-265, 2004.

SILVA, R. A. et al. Composição e propriedades terapêuticas do mel de abelha. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 17, n.1, p. 123-120, jan./mar. 2006.

SIMAL, J.; HUIDOBRO, J. Parámetros de calidad de la miel. III. Acidez (pH libre, láctónica & total) e índice de formol. **Offarm**, v. 3, n. 9, p. 532, 1984.

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

SODRÉ, G. S.; MARCHINI, L. C.; CARVALHO, C. A. L. Características físico-químicas de amostras de méis de abelha *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera; Apidae) da região litoral norte do Estado da Bahia. **Revista de Agricultura**, v. 77, n. 2, p. 243-256, 2002.

SODRÉ, G. S. et al. Análises multivariadas com base nas características físico-químicas de amostras de méis de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) da região litoral norte do Estado da Bahia. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, v. 11, n. 3, p. 129-137, 2003.

SOUZA, B. A. et al. Características físico-químicas de amostras de mel de *Melipona asilvai* (Hymenoptera: Apidae). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 5, p. 1623-1624, set./out. 2004.

SUÁREZ-LUQUE, S. et al. Rapid determination of minority organic acids in honey by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 95, n. 2, p. 207-214, may 2002.

SWAIN, T.; HILLIS, W. E.; The phenolic constituents of *Prunus domestica*. The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal Science Food Agricultural**, v. 10, n. 1, p. 63-68, jan. 1959.

SZEJTLI, J.; LENGYEL, T. M. Honey powder preserving its natural aroma components. **United States Patent** n. 4529608, 04 nov. 1983, 16 jul. 1985.

TAKASHI, I. Preparation of powder of honey or honey containing liquid food. **Japanese Patent**, JP59085262, 05, nov. 1982, 17 may 1984.

TAKASHI, E. et al. Honey Powder composition and preparation thereof. **Japanese Patent**, JP63157943, 1988.

TRUONG, V.; BHANDARI, B. R.; HOWES, T. Optimization of co-current spray drying process of sugar-rich foods. Part I—Moisture and glass transition temperature profile during drying. **Journal of Food Engineering**, v. 71, n. 1, p. 55–65, nov. 2005.

TRUONG, V.; BHANDARI, B. R.; HOWES, T. Optimization of co-current spray drying process of sugar-rich foods. Part II— Optimization of spray drying process based on glass transition concept. **Journal of Food Engineering**, v. 71, n. 1, p. 66–72, nov. 2005.

VAN'T LAND, C. M. **Industrial drying equipment**: Selection and application. New York: Marcel Dekker, 1991. 362 p.

WENDEL, S.; CELIK, M. Uma visão geral sobre o uso da tecnologia de spray-drying. **Pharmaceutical Technology**, Ames, v. 2, n. 2, p. 129-134, abr. 1998.

WHITE, J. W. et al. Composition of honey. In: CRANE, E. **Honey**. A comprehensive survey. London: Heinemann, 1979. p. 157-207.

YAMAMOTO, Y. Role of active oxygen species and antioxidants in photoaging. **Journal of Dermatological Science**, v.27, sup. 1, p.S1-S4, aug. 2001.

YOSHIHIDE, H.; HIDEAKI, H. Production of honey powder. **Japanese Patent**, JP5049417, 15 aug. 1991, 02 mar. 1993.

**CAPÍTULO 2 - CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS
PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DO MEL**

RESUMO

O mel é um produto natural, complexo e tem sido reconhecido por apresentar na sua constituição compostos como ácidos fenólicos e flavonóides que lhe conferem propriedades antioxidantes que podem contribuir no combate ao estresse oxidativo do organismo humano. O presente trabalho teve objetivo de avaliar a atividade antioxidante do mel (*Apis mellifera L*) proveniente da região de Alagoinhas-BA, através da análise de seqüestro do radical DPPH, da avaliação do teor de compostos fenólicos pelo método de Folin-Ciocalteau e dos flavonóides por espectrofotometria com $AlCl_3$. Também foram avaliadas as características físico-químicas de umidade, acidez livre, pH, cinzas, viscosidade e cor com o objetivo de favorecer comparações em futuros estudos. Em relação aos resultados da caracterização físico-química, observou-se a atividade antioxidante do mel em base úmida, expresso em CE50 em um intervalo de confiança de 47,44 a 52,43 $mg \cdot mL^{-1}$, o teor de compostos fenólicos entre 34,89 e 39,49 mg de AGE. $100^{-1}g$ e o teor de flavonóides entre 0,99 e 1,28 mg de QE. $100^{-1}g$ com 95% de certeza.

Palavras-chaves: Mel; antioxidantes; compostos fenólicos; flavonóides; DPPH

ABSTRACT

Honey is a natural and complex product, and has been recognized for having in its constitution compounds such as phenolic acids and flavonoids which give it antioxidant properties that combat oxidative stress in the human body. The aim of this work was to evaluate the antioxidant activity of honey (*Apis mellifera L*) from the region of Alagoinhas in Bahia, through the analysis of capturing the DPPH radical, the evaluation of the content of phenolic compounds by Folin-Ciocalteu method and the flavonoids by spectrophotometry with AlCl_3 . Physico-chemical characteristics of moisture, free acidity, pH, ash, viscosity and color were also evaluated in order to facilitate comparisons in future studies. It was also observed antioxidant activity of honey on a wet matter, expressed in EC50 in a reliable interval from 57.84 to 65.88 $\text{mg.mL}^{-1}\text{g}$, the content of phenolic compounds between 25.47 and 30.32 mg of GAE. 100^{-1}g , and flavonoids content between 2.01 and 2.63 mg of QE. 100^{-1}g with 95% of certainty.

Keywords: Honey; antioxidants, phenolic compounds, flavonoids.

1. INTRODUÇÃO

O mel é considerado um fluido viscoso, aromático, doce e elaborado principalmente a partir do néctar das flores no qual abelhas melíferas coletam, transformam, combinam e maturam nos favos das colméias. Por isso, sua composição e características como sabor, cor e aroma podem sofrer grandes variações de acordo com a origem botânica da região, clima, solo, umidade, altitude, entre outros.

É composto principalmente por frutose e glicose, mas é reconhecido por sua diversidade em compostos com propriedades antioxidantes, como os flavonóides, ácidos fenólicos, determinadas enzimas, compostos derivados da reação de Maillard, ácido ascórbico, carotenóides e outros.

Os compostos antioxidantes possuem comprovada ação contra o estresse oxidativo no organismo humano, principalmente pelo mecanismo de seqüestro dos radicais livres e tem sido relacionado a vários efeitos preventivos contra diferentes doenças como câncer, doenças coronarianas, inflamatórias, doenças degenerativas, neurológicas e envelhecimento precoce.

Diversos estudos demonstram grande variação no arranjo e concentração dos fenólicos no mel, sendo utilizados como marcadores de origem. Já foram reportados diversos correlacionamentos entre a atividade antioxidante, o teor de compostos fenólicos totais e a coloração escura do mel. Nos méis brasileiros identificou-se uma grande contribuição dos ácidos fenólicos em comparação aos flavonóides e já foram identificados diferentes constituintes entre eles o ácido cinâmico, cafeico, ferúlico, gálico e cumárico, a quercetina, a crisina e o canferol.

Neste trabalho pretende-se caracterizar a capacidade antioxidante, o teor de compostos fenólicos totais e os flavonóides de uma amostra de mel proveniente da região de Alagoinhas-BA, que em pesquisa posterior, será submetido a um processo de secagem. Também será avaliada a umidade, pH, acidez, cinzas, viscosidade e cor como análises de apoio a caracterização.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Matéria-Prima

A amostra de mel de abelha (*Apis mellífera L*) para este estudo foi adquirida do Entrepósito de Mel e Cera de Abelhas, Florativa Ind. e Com. de Produtos Naturais Ltda. na região de Alagoinhas-BA. Sua predominância floral foi declarada pelo produtor como silvestre, sendo estimada uma predominância de 20% de eucalipto e 80% de Candeia, Ingaussu, Pau pombo e outros. Foram obtidos 20 litros através da seleção de méis com tonalidades mais escuras que foram extraídos, filtrados e homogeneizados compondo um único lote (n.03) de fabricação no dia 05 de abril de 2011. O mel foi envasado fracionadamente em garrafas de polietileno de 1.400g, para facilitar a manipulação e para proteção contra a luz, as garrafas foram revestidas com papel alumínio e armazenadas em caixa térmica até o momento da análise.

2.2 Umidade, pH, Acidez Livre, Cinzas, viscosidade e Cor

A umidade foi determinada por secagem à pressão atmosférica em estufa a $(105\pm 2)^{\circ}\text{C}$ até peso constante e as cinzas por incineração da amostra em temperatura entre $(550-570)^{\circ}\text{C}$ (A.O.A.C., 2000).

O pH foi medido diretamente em pHmetro digital modelo 2100P Instrutherm, previamente calibrado com tampões pH 4,0 e 7,0 e a acidez livre foi determinada por titulação com hidróxido de sódio (A.O.A.C., 2000).

A viscosidade foi determinada em viscosímetro digital (BROOKFIELD, modelo DV-I Prime), à temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, com spindler 64; 50 rpm (A.S.T.M., 1998).

A coloração do mel foi determinada pela escala pfund em espectrofotômetro a 650nm (MONTENEGRO et al., 2005) e pelo método CIE LAB em colorímetro Konica Minolta CR400, no espaço de cor L^* (luminosidade), a^* (contribuição do vermelho) e b^* (contribuição do amarelo).

2.3 Determinação de Fenólicos Totais

A concentração dos fenóis totais no mel foi determinado pelo método espectrofotométrico descrito por Swain e Hillis (1959) adaptado por Roesler et al. (2007) utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu. O método envolve a redução do reagente pelos compostos fenólicos das amostras com concomitante formação de um complexo azul cuja intensidade aumenta linearmente a 765 nm.

Para a quantificação preparou-se uma solução de mel $100\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ homogeneizada em vortex por 5 minutos e filtrada em papel Whatman nº1. Para a reação colorimétrica, uma alíquota de 0,5 mL da solução foi adicionada de 2,5 mL de solução aquosa do reagente Folin-Ciocalteu a 10% e 2,0 mL de solução recém-preparada de carbonato de sódio a 7,5%. A mistura foi incubada por 5 minutos em banho-maria a 50 °C e, posteriormente, a absorbância foi medida a 765 nm contra um branco de água destilada em substituição a amostra. A quantidade total de fenóis do mel foi determinada por meio de uma curva padrão preparada com ácido gálico, onde a média das absorbâncias foi substituída no y da equação obtida, para determinar x (concentração). Foram efetuados três ensaios em triplicata, sendo apresentado o intervalo de confiança obtido pelo teste T de Student, expresso em mg de equivalentes de ácido gálico (AGE)/100 g de mel.

2.3.1 Preparo da curva analítica com ácido gálico

Foi preparada uma curva analítica a partir do padrão de ácido gálico em solução aquosa utilizando concentrações que variaram entre 4,5 e 45 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

O volume de 0,5mL de cada solução padrão foi misturado com 2,5mL do reagente de Folin-Ciocalteu 10% e 2,0 mL de solução recém-preparada de carbonato de sódio 7,5%. A mistura foi incubada por 5 minutos em banho-maria a 50 °C. As leituras foram feitas contra um branco de água destilada em substituição ao padrão, no comprimento de onda de 765nm em espectrofotômetro FEMTO 700 Plus, e foi plotados o gráfico relacionando concentração de ácido gálico e a média das absorbâncias.

2.4 Determinação de Flavonóides

O teor de flavonóides totais foi determinado segundo metodologia descrita na literatura (MEDA et al., 2005) utilizando como reagente o cloreto de alumínio. Preparou-se uma solução $300\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de mel em solução metanol/água (1:1) realizando homogeneização em vortex por 5 minutos e filtração em papel Whatman nº1. A 3,0 ml da solução de mel em metanol/água adicionou-se 3,0 mL de solução metanólica a 2% de cloreto de alumínio hidratado. Após 30 minutos em repouso, leram-se as absorvâncias das soluções no comprimento de onda de 415 nm em espectrofotômetro FEMTO 700 Plus, contra o branco consistindo de 3 mL de solução de mel misturados a 3 mL de metanol sem cloreto de alumínio (MEDA et al., 2005; LIANDA et al., 2009).

A quantidade total de flavonóides do mel foi obtida por meio de uma curva padrão preparada com quercetina, onde a média das absorbâncias foi substituída no y da equação obtida, para determinar x (concentração). Foram efetuados três ensaios em triplicata, sendo apresentado o intervalo de confiança obtido pelo teste T de Student, expresso em mg equivalentes de quercetina (QE)/100 g de mel.

2.4.1 Preparo da curva analítica de quercetina

Foi preparada uma curva analítica a partir do padrão quercetina em solução metanólica utilizando concentrações que variaram entre 1,5 e $10\mu\text{g}/\text{mL}$.

Em seguida foram coletadas alíquotas de 3,0 mL as quais foram acrescentadas 3,0 mL de solução de cloreto de alumínio 2%. Após 30 minutos em repouso, leram-se as absorbâncias das soluções no comprimento de onda de 415 nm em espectrofotômetro FEMTO 700 Plus, contra o branco consistindo de 3,0 mL de metanol misturados a 3,0 mL de solução de cloreto de alumínio. Foi plotado o gráfico relacionando concentração de quercetina e a média das absorbâncias.

2.5 Determinação da Atividade Antioxidante com DPPH

A capacidade antioxidante do mel foi determinada pelo radical estável 2,2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH) pelo método descrito por Roesler et al., (2007). Preparou-se soluções aquosas de mel em diversas concentrações que variaram

entre 100 e 300 mg.mL⁻¹ que foram homogeneizadas em vortex e filtradas e papel Whatman no.1 (PICHICHERO; CANUTI; CANINI, 2009). Uma alíquota de 1mL de cada uma das soluções foi submetida à reação com 3,0mL de solução etanólica de DPPH 0,004% m.v⁻¹. Cada amostra foi incubada 30 minutos à temperatura ambiente no escuro. Foi preparado um controle conforme procedimento acima, utilizando água destilada em substituição a amostra. Foi determinado um branco para cada uma das concentrações de mel utilizando etanol em substituição a solução de DPPH.

As absorvâncias foram medidas em triplicata para cada concentração e a capacidade de seqüestrar radicais livres foi calculada com base na média das absorvâncias observada a 517 nm em espectrofotômetro FEMTO 700 Plus.

A porcentagem de atividade seqüestrante (%AA) foi determinada segundo a fórmula de Mensor et al. (2001) (Equação 03) e foi plotado o gráfico relacionando cada concentração da amostra a sua capacidade de seqüestro.

$$\%AA = 100 - [(Abs amostra - Abs branco) \times 100] / Abs controle \quad (03)$$

Onde,

Abs amostra = absorvância da solução de DPPH e a amostra de mel

Abs branco = absorvância da solução de mel e etanol.

Abs controle = absorvância da solução de DPPH e água

A atividade antioxidante da amostra foi expressa em termos de CE50 (concentração efetiva em mg/mL necessária para o antioxidante reduzir em 50% a concentração inicial do DPPH), através da equação da reta obtida por regressão linear, considerando 50%AA. Desta forma, quanto menor o seu valor, maior é a capacidade antioxidante das substâncias presentes.

O teste foi realizado em triplicata e o resultado expresso através do intervalo de confiança obtido com o teste T de Student.

2.5.1 Capacidade de resposta do método DPPH

Com o objetivo de validar a capacidade de resposta do método nas referidas condições de análise, determinou-se, o poder de resgate de radicais de DPPH por parte do padrão de ácido gálico. Foram preparadas soluções com diferentes concentrações que variaram entre 2 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e determinou-se a capacidade de inibição de radicais de DPPH por cada uma delas conforme procedimento descrito no item 2.5.

2.6 Análise Estatística

Todos os resultados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade de Anderson-Darling, para verificar se os dados apresentavam uma distribuição Gaussiana ($p\text{-valor} > 0,05$).

Após verificar a normalidade das distribuições foi realizada uma análise de regressão para desenvolver o modelo matemático que expressasse o relacionamento entre as variáveis. Para verificar a significância do modelo matemático foi realizado um teste de hipótese utilizando o F de Snedcor através da ANOVA.

Após obtenção dos resultados em triplicata, para estimar a média populacional da distribuição foi realizado um estudo de intervalo de confiança utilizando o T de Student. O nível de significância adotado foi 5%. Utilizou-se o programa MINITAB® 14.

3. RESULTADO E DISCUSSÃO

3.1 Umidade, pH, acidez livre, cinzas, viscosidade e cor

Com relação às características físico-químicas do mel, os resultados obtidos para os parâmetros analisados, estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Valores Médios de parâmetros físico-químicos do Mel

	Média ± Desvio Padrão
Umidade (%)	16,40 ± 0,12
pH (%)	3,92 ± 0,05
Acidez livre (meq.Ac/Kg)	40,8 ± 0,5
Cinzas (%)	0,36 ± 0,02
Viscosidade (mPa.s)	5459 ± 5
Cor (mmPFund)	32 ± 1
Cor (L*; a*; b*)	(27,69 ± 0,09; -0,13±0,12; 11,39±0,03)

O conteúdo de água do mel depende de vários fatores, como por exemplo, da época da colheita, do grau de maturação do mel alcançado na colmeia e de fatores climáticos (RODRÍGUEZ et al., 2004). O teor de umidade da amostra de mel foi inferior a 20%, valor máximo permitido na legislação (BRASIL, 2000). Os valores obtidos indicam um grau de maturidade e um período de extração do mel adequado, sugerindo que a amostra de mel analisada é de qualidade.

O pH do mel apresentou-se dentro do limite proposto por Iurlina e Fritz (2005) (3,4 – 6,1) e também dentro do encontrado por Sodré et. al.(2003) no estudo de 36 amostras do litoral norte da Bahia (3,52 e 4,02). No entanto, como referido por Rodríguez et al. (2004), o pH do mel não está diretamente relacionado com a acidez livre devido à ação tampão dos ácidos e minerais presentes, não permitindo conclusões quanto a sua qualidade.

Por outro lado, o valor de acidez da amostra (40,8± 0,5 meq.Ac/Kg) dentro do limite estabelecido na legislação (50 meq.Ac/Kg), indica ausência de fermentações indesejáveis. Segundo Küçük et al. (2007) os valores de acidez também são atribuídos à sua origem botânica. Silva et al. (2006) encontrou uma faixa de 10 a 42 meq.Kg-1 para amostras do Ceará e de 10 a 30 meq.Kg-1 para amostras do Piauí.

Quanto ao teor de cinzas, o mel apresentou valores dentro do máximo de 0,06% estabelecido pela legislação vigente (BRASIL, 2000). Segundo Anklam (1998), os méis de cor clara têm normalmente um teor de cinzas mais baixo que os méis de cor escura, relacionado principalmente ao teor de minerais que em méis claros varia entorno de 0,04% e nos méis escuros de 0,2%. No estudo de Pereira (2008) comparando duas amostras de mel da região de Trás-os-Montes, obteve-se para a amostra clara 0,17% de cinzas e para a escura 0,55%, estando a amostra deste trabalho em posição intermediária quanto ao teor de cinzas.

O resultado obtido de viscosidade fortalece o indicativo da presença de espécies de eucalipto na amostra analisada. Como observado por Marchini (2001), a fonte de néctar explorada pelas abelhas também pode influenciar a viscosidade, e em seu estudo com amostras de méis de diferentes espécies de *Eucalyptus*, obteve valores altos como 9.050,0 mPa.s para méis de *Eucalyptus citriodora*, 10.700,0 mPa.s para *E. urophylla*, 17.900,0 mPa.s para *E. grandis*, 19.200,0 mPa.s para *E. camaldulensis* e 11.550,0 mPa.s para *E. tereticornis*.

Mendonça et al. (2008) obtiveram valores variando de 1.070,0 a 4.546,7 mPa.s em méis de Itirapina-SP. E faixa de viscosidade similar também foi encontrado em méis do Ceará, de 536,0 a 6770,0 mPa.s (SODRÉ, 2005)

Em relação a cor o valor obtido em mm PFund (32 ± 1) caracteriza o mel como de cor branca dentro da escala padrão do mel que é composta pelas denominações branco água (0-8); extra branco (8-16,5); branco (16,5-34); âmbar extra claro (34-50); âmbar claro (50-85); âmbar (85-114) e escuro (>114).

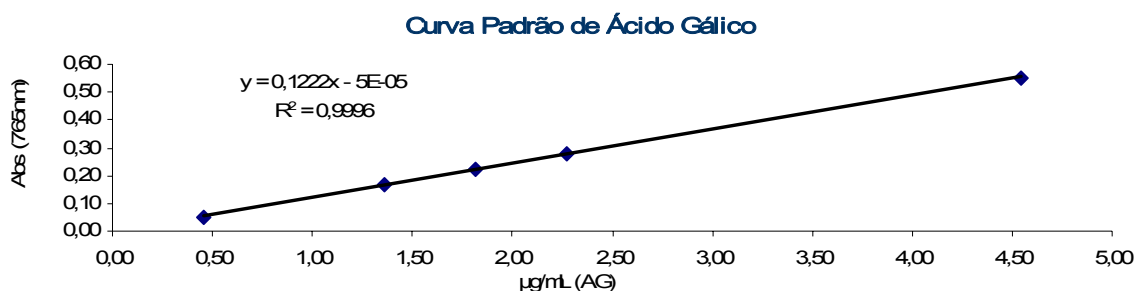
Para efeito de comparação, a cor também foi medida pelo método CIE LAB, no qual são realizadas mensurações de três espaços de cor L^* , a^* e b^* , onde L^* representa a luminosidade da superfície, e determina a posição do ponto sobre o eixo vertical que quantifica a cor preta ($L^* < 0$) e registra o branco ($L^* > 0$). O parâmetro a^* quantifica a cor vermelha ($a^* > 0$) e verde ($a^* < 0$) e b^* registra o amarelo ($b^* > 0$) ou azul ($b^* < 0$) (JOSHI, 2001). A amostra apresentou portanto uma tendência de $27,69 \pm 0,09$ para o branco; $0,13 \pm 0,12$ para o verde e $11,39 \pm 0,03$ para o amarelo.

3.2 Determinação de fenólicos totais

As análises de fenólicos totais e flavonóides foram escolhidos em adição ao método do DPPH para avaliação do potencial antioxidante do mel por serem substâncias reconhecidas, previamente, por suas atividades antioxidantes, antitumorais, antimicrobianas e antibacterianas (AL-MAMARY; AL-MEERI; AL-HABORI, 2002; PRIOR, 2003; ALJADI; KAMARUDDIN, 2004; LIANDA, 2009).

O ácido gálico foi o padrão utilizado na construção da curva para a determinação de fenólicos totais (Figura 12), conforme procedimento descrito no item 2.3.1

Figura 12 - Curva padrão de ácido gálico



Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade de Anderson-Darling, sendo verificado que apresentavam uma distribuição normal, demonstrado pelo p-value > 0,05 que foi o nível de significância adotado.

Após verificar a normalidade das distribuições foi realizada uma análise de regressão para desenvolver o modelo matemático que expressasse o relacionamento entre as variáveis (Equação 01).

$$y = 0,122(\mp 0,005)x - 0,000005(\pm 0,0115) \quad (01)$$

A função linear foi a que melhor se ajustou ao modelo matemático, apresentando um coeficiente de determinação (R^2) de 99%, ou seja, um poder de estimação fortíssimo.

Para verificar a significância no modelo matemático foi realizado um teste de hipótese utilizando o F de Snedcor através da ANOVA (Tabela 5), onde foi

possível verificar que o F de significação ($3,67 \times 10^{-6}$) ficou menor que o nível de significância pré-determinado, de 5%, demonstrando assim a confiabilidade do modelo matemático adotado.

Tabela 5 - Teste de hipótese utilizando o F de Snedcor para a curva de Ác. Gálico

ANOVA					
	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	0,139168	0,139168	7113,27228	3,67407E-06
Resíduo	3	5,87E-05	1,96E-05		
Total	4	0,139227			

Os valores das absorbâncias (média da triplicata, desvios padrão) obtidas nos três Ensaio de Folin-ciocalteau com a amostra de mel foram utilizadas para o cálculo do teor de fenóis totais da amostra. Para tanto utilizou-se a equação 01 fornecida pelo gráfico a partir do padrão de ácido gálico (Figura 12). Assim obteve-se as respectivas concentrações (μg) em equivalentes de ácido gálico (AGE). mL^{-1} , conforme demonstrado abaixo com os dados obtidos para o primeiro ensaio:

$$Y = 0,122(\pm 0,005)X - 0,000005(\pm 0,0115)$$

$$0,455 = 0,122(\pm 0,005)X - 0,000005(\pm 0,0115)$$

$$X = 3,72 \mu\text{g AGE} \cdot \text{mL}^{-1}$$

Considerando-se a concentração inicial da solução de mel, a alíquota de 0,5mL ensaiada e o volume final de 5mL na cubeta, converteu-se os valores para mg de equivalentes de ácido gálico(AGE)/100 g de mel e os valores obtidos para cada um dos ensaios são apresentados na tabela 6.

Tabela 6 - Resultados obtidos para o teor de compostos fenólicos totais em três ensaios na amostra de mel pelo método Folin-Ciocalteau

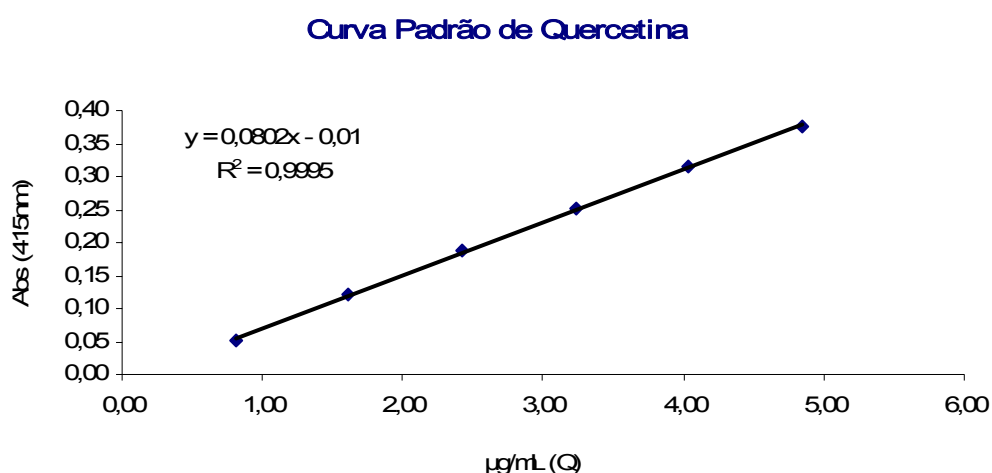
	Absorbância*	mgAGE.100 ⁻¹ g**
Ensaio 01	0,455±0,003	36,56
Ensaio 02	0,469±0,019	38,10
Ensaio 03	0,450±0,006	36,16

* Média das triplicatas e Desvio das médias; ** Referente a valores em base úmida;

3.3 Determinação de flavonóides totais

A quercetina foi o padrão utilizado na construção da curva para a determinação de flavonóides totais (Figura 13), conforme procedimento descrito no item 2.4.1.

Figura 13 - Curva Padrão de Quercetina



Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade de Anderson-Darling, sendo verificado que apresentam uma distribuição normal, demonstrado pelo p-value > 0,05 que foi o nível de significância adotado.

Após verificar a normalidade das distribuições foi realizada uma análise de regressão para desenvolver o modelo matemático que expressa o relacionamento entre as variáveis (Equação 02).

$$y = 0,080(\pm 0,003)x - 0,01(\pm 0,0080) \quad (02)$$

A função linear foi a que melhor se ajustou ao modelo matemático, apresentando um coeficiente de determinação (R^2) de 99%, ou seja, um poder de estimação fortíssimo.

Para verificar a significância do modelo matemático foi realizado um teste de hipótese utilizando o F de Snedcor através da ANOVA (Tabela 7), onde foi possível verificar que o F de significação ($1,06 \times 10^{-7}$) ficou menor que o nível de

significância pré-determinado, de 5%, demonstrando assim a confiabilidade do modelo matemático adotado.

Tabela 7 - Teste de hipótese utilizando o F de Snedcor para a curva de quercetina ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	0,07344	0,07344	7526,386075	1,05826E-07
Resíduo	4	3,9E-05	9,76E-06		
Total	5	0,073479			

Os valores das absorbâncias (média da triplicata, desvios padrão) obtidas nos três ensaios de flavonóides totais realizados na amostra de mel foram substituídos na equação 02 fornecida pelo gráfico com o padrão de quercetina (Figura 13). Obtiveram-se assim, as respectivas concentrações (μg) em equivalentes de quercetina (QE). mL^{-1} . Considerando a concentração inicial da solução de mel, a alíquota de 3mL ensaiada e o volume final de 6mL na cubeta, converteu-se os valores para mg de equivalentes de quercetina (QE)/100 g de mel e os valores obtidos para cada um dos três ensaios são apresentados na tabela 8.

Tabela 8 - Resultados obtidos para o teor de Flavonóides totais em três ensaios da amostra de mel

	Absorbância*	mgQE.100⁻¹g**
Ensaio 01	0,130±0,003	1,19
Ensaio 02	0,126±0,003	1,13
Ensaio 03	0,116±0,004	1,08

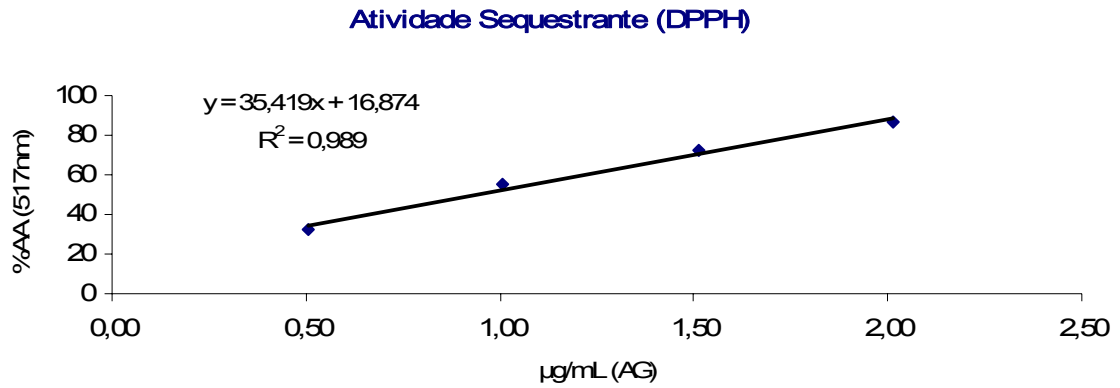
* Média das triplicatas e Desvio das médias; ** Referente a valores em base úmida;

3.4 Validação do método DPPH

Na validação do método do DPPH através do padrão de ácido gálico obteve-se o gráfico de atividade sequestrante (Figura 14) com valor de R^2 igual 0,989.

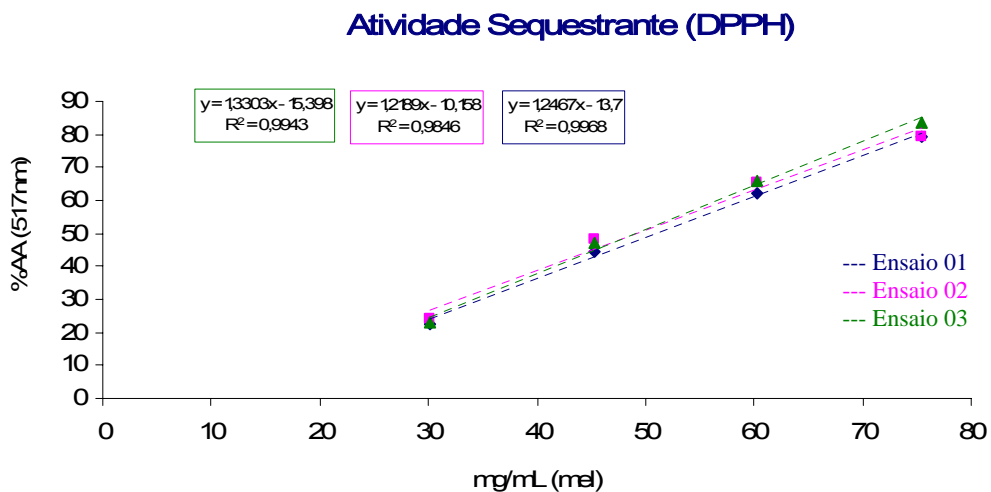
O valor médio de CE50 obtido foi de 0,94 mg.mL^{-1} e este resultado representa uma boa concordância com o referenciado por outros autores (LIANDA, 2009; SERRA, 2008) demonstrando a confiabilidade do método e sua validade para a análise das amostras de mel.

Figura 14 - Poder de resgate de radicais de DPPH por parte do ácido gálico ($\mu\text{g/mL}$)



Na análise da amostra de mel, foram realizados três ensaios independentes do método DPPH, com intuito de estabelecer um intervalo de confiança. As curvas e equações obtidos nos referidos ensaios são apresentados na figura 15.

Figura 15 - Percentual de seqüestro do radical DPPH e a concentração de mel em três ensaios independentes.



Os valores de CE50 dos três ensaios foram determinados obtendo-se o valor de x (concentração de mel em mg/mL) no ponto y igual a 50%AA, os valores são apresentados na tabela 9.

Tabela 9 – Valores médios de CE50 obtidos para os méis nos ensaios de atividade antioxidante pelo método do DPPH e F de significação dos modelos matemáticos utilizados

	F de Significação*	DPPH-CE50 (mg.mL⁻¹)**
Ensaio 01	0,0016	51,09
Ensaio 02	0,0077	49,35
Ensaio 03	0,0009	49,35

* Valores de F menores que o nível de significância pré-determinado de 5% demonstra a boa confiabilidade do modelo matemático adotado (teste de hipótese utilizando o F de Snedcor – ANOVA);

** Referente à base úmida

3.5 Intervalos de Confiança

Com os dados de compostos fenólicos, flavonóides, e atividade antioxidante dos três ensaios determinaram-se os intervalos de confiança dos resultados com 95% de certeza (Tabela 10).

Tabela 10 - Teores de fenóis, flavonóides totais e CE50 do mel

	Intervalo de Confiança**
Fenólicos Totais (mgAGE.100⁻¹g)*	34,89 - 39,49
Flavonóides Totais (mgQE.100⁻¹g)*	0,99 - 1,28
DPPH-CE50 (mg.mL⁻¹)*	47,44 - 52,43

* Referente à base úmida

**Obtido pelo teste T de Student ($p < 0,05$)

O teor de compostos fenólicos encontrados para a amostra (34,89 – 39,49 mgAGE.100⁻¹g) se enquadra com os valores observados por Lianda, (2009) em seu estudo de méis de eucalipto e de laranjeira de diferentes regiões do Rio de Janeiro e São Paulo, 34,0 a 78,2 mg AGE/100g de mel. As referências bibliográficas mostram grande variação no teor de compostos fenólicos, relacionado principalmente a sua origem geográfica e floral, como foi demonstrado recentemente por Silici, Sagdic e Ekici (2009) no estudo de méis de rhododendron obtidos de diferentes regiões do

Mar Negro da Turquia (0.24 to 141.83 mg AGE/100 g); por Serra (2008) para méis de três regiões de Portugal (48 e 207 mg ácido gálico/100g) e por Beretta et al. (2005) em méis de diferentes origens florais e geográficas da África (5,25 a 78,96 mgAGE/100 g).

Os resultados obtidos nos testes para flavonóides (0,99 – 1,28 mg QE.100⁻¹g) estão de acordo com os relatos da literatura que sugerem que nos méis brasileiros, os ácidos fenólicos são mais abundantes que os flavonóides, estando os valores encontrados próximos do teor obtido por Lianda (2009), para o mel de Laranjeira brasileiro (1,6mg QE/100g), e diferente do obtido por Pichichero, Canuti e Canini (2009) para os méis Italianos 4,19 a 21,17 mgQE/100g.

O uso do cloreto de alumínio para a determinação da quantidade de flavonóides totais não é, no entanto, um procedimento isento de limitações, pode ser pouco exato, ou seja, o valor que ele fornece pode ser diferente (geralmente inferior) em relação à quantidade de flavonóides totais realmente presente na amostra. Por outro lado é um método rápido e barato que se torna eficiente quando utilizado como ferramenta para avaliação entre grupos ou entre processos, no lugar de uma simples caracterização.

Quanto a atividade antioxidante, Estevinho et al. (2008), comparando méis claros com escuros, obtiveram 68,17mg/mL e 27,24mg/mL respectivamente para o CE50 no ensaio de DPPH. Comparando-se a amostra deste trabalho (47,44 - 52,43 mg.mL⁻¹) observa-se que a mesma encontra-se em um valor intermediário. O resultado obtido também se aproximou da atividade encontrada para o mel de acácia Esloveno (33.9–63.9mg/mL) por Bertoneclic et al. (2007) e do mel de sulla Italiano (54.74 ± 3.28mg/mL) por Pichichero, Canuti e Canini (2009).

4. CONCLUSÕES

Conclui-se que a atividade antioxidante do mel em base úmida, encontra-se com 95% de certeza dentro de um intervalo de confiança de 57,84 a 65,88mg.mL⁻¹ expresso em CE50. O teor de compostos fenólicos entre 25,47 e 30,32 mg de AGE.100⁻¹g e o teor de flavonóides entre 2,01 e 2,63 mg de QE.100⁻¹g. Esses valores se encontram de acordo com as faixas já reportadas por outros autores considerando os mesmos métodos de ensaio e os diversos fatores que interferem na composição de cada mel.

REFERÊNCIAS

- AL-MAMARY, M.; AL-MEERI, A.; AL-HABORI, M. Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. **Nutrition Resaearch**, v. 22, n. 9, p. 1041-1047, sep. 2002.
- ALJADI, A. M.; KAMARUDDIN, M. Y. Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. **Food Chemistry**, v. 85, n. 4, p. 513–518, may 2004.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIAL (A.S.T.M.). Standard Test Methods for Rheological Properties of Non-Newtonian Materials by Rotational (Brookfield type) Viscometer. **Barr Harbor: ASTM Standards, s.d.p., p. 1-4.**
- ANKLAM, E. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. **Food Chemistry**, v. 64, n. 4, p. 549–562, 1998.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (A.O.A.C.). Official Methods of Analysis of AOAC International. 17ed. v. II., 2000.
- BERETTA, G. et al. Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. **Analytica Chimica Acta** 2005, 533, 185–191.
- BERTONCELJ, J. et al. Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. **Food Chemistry**, v. 105, n. 2, p. 822-828, 2007.
- BRASIL. Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000. **Regulamento técnico de identidade e qualidade do mel**. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 2000. Seção 1, p.16-17.
- ESTEVINHO, L. et al. Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 12, p. 3774–3779, dec. 2008.
- IURLINA, M. O.; FRITZ, R. Characterization of microorganisms in Argentinean honeys from different sources. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105, p. 297-304, 2005.
- JOSHI, P. Physical aspects of color in foods. In: AMES, J.M.; HOFMANN, T.(Eds.). **Chemistry and physiology of selected food colorants**. Oxford: Oxford University Press, cap.3, p. 43-53, 2001.
- KÜÇÜK, M.; KOLAYH, S.; KARAO L.U.; ULUSOY, E.; BALTACI, C.; CANDAN, F. Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 526-534, 2007.
- LIANDA, R. L. P. **Perfil de substâncias fenólicas de méis brasileiros por cromatografia líquida de alta eficiência e avaliação do potencial antioxidante.**

142 f. 2004. Tese (Doutorado em química). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

MARCHINI, L.C. **Caracterização de amostras de méis de Apis mellifera L., 1758 (Hymenoptera: Apidae) do Estado de São Paulo, baseada em aspectos físico-químicos e biológicos.** 83 f. 2001. Tese (Livre Docência) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 2001.

MEDA, A. et al. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkin Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v.91, n. 3, p. 571-577, 2005.

MENDONÇA, K. et al. Caracterização físico-química de amostras de méis produzidas por Apis mellifera L. em fragmento de cerrado no município de Itirapina, São Paulo. **Ciencia Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 6, Sept. 2008.

MENSOR, L.L. et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v.15 n.2, p. 127-130, 2001.

MONTENEGRO, S.B. et al. Variación Del color en miel de abejas (Apis melifera), **Comunicaciones Científicas y Tecnológicas**, Universidad Nacional del Nordeste, Resumen: T-070, 2005.

PEREIRA, A. P. R. **Caracterização de mel com vista à produção de hidromel.** 81 F. 2008. Dissertação (Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar). Escola Superior Agrária de Bragança, Bragança, 2008.

PICHICHERO, E.; CANUTI, L.; CANINI, A. Characterisation of the phenolic and flavonoid fractions and antioxidant power of Italian honeys of different botanical origin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, n. 4, p. 609-616, mar. 2009.

PRIOR, R. L. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 78, (suppl.). p. 570S-578S, 2003.

RODRÍGUEZ, G. O. et al. Characterization of honey produced in Venezuela. **Food Chemistry**, v. 84, n. 4, p. 499-502, mar. 2004.

ROESLER, R. et al. Atividade Antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas. v. 27, n.1, p. 53-60, jan./mar. 2007.

SERRA, M. C. C. **As propriedades antioxidantes do mel.** Centro de Estudos de Engenharia Química do Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, 2008. Disponível em: <<http://www.oapicultor.com/artigos/Propriedades%20anti%20Oxidante.pdf>>. Acesso em 20 fev. 2011.

SILICI, S.; SAGDIC, O.; EKICI, L. Total phenolic content, antiradical, antioxidant and antimicrobial activities of Rhododendron honeys. **Food Chemistry**, v. 121, n. 1, p. 238-243, jul. 2010.

SILVA, R. A. et al. Composição e propriedades terapêuticas do mel de abelha. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 17, n.1, p. 123-120, jan./mar. 2006.

SODRÉ, G. S. et al. Análises multivariadas com base nas características físico-químicas de amostras de méis de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) da região litoral norte do Estado da Bahia. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, v. 11, n. 3, p. 129-137, 2003.

SODRÉ, G. S. **Características físico-químicas, microbiológicas e polínicas de amostras de méis de *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera: Apidae) dos estados do Ceará e Piauí.** 127f. 2005. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

SWAIN, T.; HILLIS, W. E.; The phenolic constituents of *Prunus domestica*. The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal Science Food Agricultural**, v. 10, n. 1, p. 63-68, jan. 1959.

**CAPÍTULO 3 - DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA
SECAGEM POR *SPRAY DRYER* NAS PROPRIEDADES DE COMPOSTOS
BIOATIVOS E ANTIOXIDANTES DO MEL**

RESUMO

Apesar da excelente qualidade atribuída ao mel, sua utilização a nível industrial enfrenta problemas, como dificuldades de manuseio e armazenamento, perda por aderência em contentores e falta de padronização do produto final. Muitos estudos atualmente concentram esforços para converter o mel líquido em um pó de fluxo livre, sendo a secagem por spray-dryer o processo que obteve maior sucesso. Alguns autores divergem quanto ao comportamento dos antioxidantes perante o tratamento térmico em diferentes matérias-primas, sendo reportado tanto degradações como aumento da atividade. O presente trabalho tem o objetivo de produzir o pó de mel por secagem em spray-dryer e avaliar o efeito do tratamento térmico no potencial antioxidante, através da análise de seqüestro do radical DPPH, da avaliação do teor de compostos fenólicos pelo método de Folin-Ciocalteu e dos flavonóides por espectrofotometria com $AlCl_3$. Também foram avaliadas as características físicas de umidade, higroscopicidade, molhabilidade, granulometria e cor com o objetivo de favorecer comparações em futuros estudos. A atividade antioxidante do pó de mel em base seca, expresso em CE50 obtido nesse estudo, encontra-se no intervalo de confiança entre 57,84 e 65,88mg.mL⁻¹, o teor de compostos fenólicos entre 25,47 e 30,32 mg de AGE.100⁻¹g e o teor de flavonóides entre 2,01 e 2,63 mg de QE.100⁻¹g com 95% de certeza. Os resultados demonstraram um aumento significativo ($p < 0,05$) na atividade antioxidante e no teor de flavonóides no pó de mel em relação à solução de alimentação do secador.

Palavras-chaves: Mel; pó; spray-dryer; secagem; antioxidantes; compostos fenólicos; flavonóides.

ABSTRACT

Despite the excellent qualities attributed to honey, its use in industry is facing problems such as difficulties in handling and storage, loss of adhesion in containers and lack of standardization of the final product. Nowadays many studies have concentrated efforts to convert liquid honey in free flowing powder, and the drying by spray-drying process has had the highest success. Some authors differ about the behavior of antioxidants in relation to the heat treatment in different raw materials, having been reported either degradation or enlargement of the activity. The present work had the aim to develop and evaluate the effect of the heat treatment in relation to the antioxidant potential of honey after drying in spray-dryer, through the analysis of capturing the DPPH radical, the evaluation of flavonoids by spectrophotometry with AlCl_3 . Physico characteristics of moisture, hygroscopicity, wettability, granulometry and color were also evaluated in order to facilitate comparisons in future studies. The antioxidant activity of honey powder on a dry matter, expressed in EC_{50} obtained in this study, lies in the reliable interval of 57.84 to 65.88 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, the content of phenolic compounds between 25.47 and 30.32 $\text{mg GAE}\cdot 100^{-1}\text{g}$, and flavonoids content between 2.01 and 2.63 $\text{mg QE}\cdot 100^{-1}\text{g}$ with 95% of certainty. The results showed a significant increase ($p < 0.05$) in the antioxidant activity and in flavonoids content in honey powder, if compared to the feeding solution of the dryer.

Keywords: Honey; powder, spray-dryer, drying, antioxidants, phenolic compounds, flavonoids.

1. INTRODUÇÃO

O mel é reconhecido por seus atributos sensoriais e por sua riqueza em compostos com propriedades antioxidantes e por estes motivos é largamente utilizado pela indústria alimentícia e cosmética, na formulação de produtos com este apelo, como biscoitos, pães, bolos, farinhas lácteas, iogurtes, hidratantes, xampus, condicionadores, creme anti idade e esfoliantes.

Entretanto o trabalho com esta matéria-prima na indústria é dificultado pela forma que se apresenta, na maioria das vezes, como fluido viscoso, pseudoplástico, que exige especificações e dimensionamentos diferenciados para bombas, tubulações, decantadores, homogeneizadores e dosadores. São referidas dificuldades na linha de processo como incorporação de ar, formação de espuma, dificuldade na dosagem, padronização do produto final, desperdícios e aumento do tempo operacional. O mel ainda pode apresentar-se na forma cristalizada, exigindo cuidadosa estocagem, descristalização (aquecimento) e homogeneização para garantir o sabor e aroma original.

Com o objetivo de sanar estas dificuldades, a transformação do mel líquido em um pó de fluxo livre tem sido o foco de muitos pesquisadores. Diversos processos de secagem do mel já foram patenteados, entre eles a secagem por cilindros (*drum dryer*) e liofilização, mas o que se apresenta mais promissor devido à viabilidade e qualidade do produto final é o por atomização em *spray dryer*.

Os estudos nesta área têm se concentrado na melhoria dos parâmetros de processo visando o rendimento, aumento do teor de mel no pó, propriedades e fatores como a temperatura de transição vítrea (t_g), que interfere nas características físicas do produto seco, causando adesividade (*stickiness*), problema comum na secagem de produtos ricos em açúcares.

Por serem pesquisas relativamente recentes, não foram encontrados até o momento o efeito do processo de secagem por *spray dryer* nas propriedades antioxidantes do mel. Tendo isso em vista, o presente trabalho se propõe a produzir o pó de mel e estudar o comportamento da atividade antioxidante, do teor de compostos fenólicos totais e dos flavonóides após o processo de secagem por atomização. Também serão avaliadas a umidade, a higroscopia, molhabilidade, granulometria e cor para caracterização do pó obtido.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Matéria-Prima

A amostra de mel de abelha (*Apis mellífera L*) para este estudo foi adquirida do Entrepasto de Mel e Cera de Abelhas, Florativa Ind. e Com. de Produtos Naturais Ltda. na região de Alagoinhas-BA. Sua predominância floral foi declarada pelo produtor como silvestre, sendo estimada uma predominância de 20% de eucalipto e 80% de Candeia, Ingaussu, Pau pombo e outros.

A caracterização físico-química prévia identificou-o com 16,40% de umidade; pH de 3,92; acidez de 40,8meq.Ac/Kg, cinzas 0,36%; cor branca e no método CIE LAB, 27,69±0,09 para L*; -0,13±0,12 para a* e 11,39±0,03 para b*; teor de compostos fenólicos entre 34,89 e 39,49 mg de AGE.100⁻¹g de mel e o teor de flavonóides entre 0,99 e 1,28 mg de QE.100⁻¹g e capacidade antioxidante medida através do CE50 entre 47,44 a 52,43 mg.mL⁻¹ com 95% de certeza

Foram adquiridos 20 litros de um único lote (n.03) de fabricação no dia 05 de abril de 2011. O mel foi envasado fracionadamente em garrafas de polietileno de 1.400g para facilitar a manipulação, as embalagens foram revestidas em papel alumínio e armazenadas em caixa térmica até o momento da análise, a fim de evitar qualquer tipo de alteração.

Foi utilizada maltodextrina comercial como agente carreador de secagem na forma de pó branco, com dextrose equivalente de 20(DE) e sólidos totais de 95,81±0,17% da Cargill Agrícola S.A. Embalagens de polietileno de alta densidade foram utilizadas para o acondicionamento da amostra obtida.

2.2 Obtenção da Solução de Secagem

Para obtenção da solução de mel a ser submetida ao secador (solução alimentação), Maltodextrina DE20 (95,8% de sólidos) foi incorporada como 50% do total de sólidos com mel (83,6% de sólidos) em uma solução final de aproximadamente 45°.Brix. A solução foi homogeneizada por 20 minutos em homogeneizador de amostra BOIT-ST01, foi aquecida à temperatura 45-50 ° C.

2.3 Caracterização da Solução de Secagem

2.3.1 Teor de sólidos totais

O teor de sólidos totais foi determinado por secagem à pressão atmosférica em estufa a $(105\pm 2)^\circ\text{C}$ até peso constante (A.O.A.C., 2000).

2.3.2 Determinação de fenólicos totais

A concentração dos fenóis totais na solução alimentação foi determinada pelo método espectrofotométrico descrito por Swain e Hillis (1959) adaptado por Roesler et al. (2007) utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu. Este método envolve a redução do reagente pelos compostos fenólicos das amostras com concomitante formação de um complexo azul cuja intensidade aumenta linearmente a 765 nm.

Para a quantificação preparou-se uma solução partindo de uma alíquota de 10mL da solução alimentação que foi avolumada para 50mL. Para a reação colorimétrica, uma alíquota de 0,5 mL dessa diluição foi adicionada de 2,5 mL de solução aquosa do reagente Folin-Ciocalteu a 10% e 2,0 mL de solução recém-preparada de carbonato de sódio a 7,5%. A mistura foi incubada por 5 minutos em banho-maria a 50°C e, posteriormente, a absorbância foi medida a 765 nm contra um branco de água destilada em substituição a amostra. A quantidade total de fenóis da solução alimentação foi determinada por meio de uma curva padrão preparada com ácido gálico, onde a média das absorbâncias foi substituída no y da equação obtida, para determinar x (concentração). Foram efetuados três ensaios em triplicata, sendo apresentado o intervalo de confiança obtido pelo teste T de Student, expresso em mg de equivalentes de ácido gálico (AGE)/100 g de amostra da solução alimentação em base seca (b.s.).

2.3.2.1 Preparo da curva analítica com ácido gálico

Foi preparada uma curva analítica a partir do padrão de ácido gálico em solução aquosa utilizando concentrações que variaram entre 4,5 e $45\mu\text{g/mL}$.

O volume de 0,5mL de cada solução padrão foi misturado com 2,5mL do reagente de Folin-Ciocalteu 10% e 2,0 mL de solução recém-preparada de carbonato de sódio 7,5%. A mistura foi incubada por 5 minutos em banho-maria a 50 °C. As leituras foram feitas contra um branco de água destilada em substituição ao padrão, no comprimento de onda de 765nm em espectrofotômetro FEMTO 700 Plus, e foi plotado o gráfico relacionando concentração de ácido gálico e a média das absorbâncias.

2.3.3 Determinação de flavonóides

O teor de flavonóides totais foi determinado segundo metodologia descrita na literatura (MEDA et al., 2005) utilizando como reagente o cloreto de alumínio. Preparou-se uma solução partindo de uma alíquota de 25mL da solução alimentação que foi avolumada para 50mL com álcool metílico. A 3,0 ml da solução adicionou-se 3,0 mL de solução metanólica a 2% de cloreto de alumínio hidratado. Após 30 minutos em repouso, leram-se as absorvâncias das soluções no comprimento de onda de 415 nm em espectrofotômetro FEMTO 700 Plus, contra o branco consistindo de 3 mL de solução alimentação misturados a 3 mL de metanol sem cloreto de alumínio (MEDA et al., 2005; LIANDA et al., 2009).

A quantidade total de flavonóides da solução alimentação foi obtida por meio de uma curva padrão preparada com quercetina, onde a média das absorbâncias foi substituída no y da equação obtida, para determinar x (concentração). Foram efetuados três ensaios em triplicata, sendo apresentado o intervalo de confiança obtido pelo teste T de Student, expresso em mg equivalentes de quercetina (QE)/100 g de amostra da solução em base seca (b.s.).

2.3.3.1 Preparo da curva analítica de quercetina

Foi preparada uma curva analítica a partir do padrão quercetina em solução metanólica utilizando concentrações que variaram entre 1,5 e 10µg/mL.

Em seguida foram coletadas alíquotas de 3,0 mL as quais foram acrescentadas 3,0 mL de solução de cloreto de alumínio 2%. Após 30 minutos em repouso, leram-se as absorbâncias das soluções no comprimento de onda de 415

nm em espectrofotômetro FEMTO 700 Plus, contra o branco consistindo de 3,0 mL de metanol misturados a 3,0 mL de solução de cloreto de alumínio. Foi plotado o gráfico relacionando concentração de quercetina e a média das absorvâncias.

2.3.4 Determinação da atividade antioxidante com DPPH

A capacidade antioxidante da solução alimentação foi determinada pelo radical estável 2,2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH) pelo método descrito por Roesler et al., 2007. Preparou-se quatro diluições da solução alimentação de modo a se obter concentração de sólidos totais entre 195 e 500mg.mL⁻¹. Uma alíquota de 1mL de cada uma das soluções foi submetida à reação com 3,0mL de solução etanólica de DPPH 0,004% m.v⁻¹. Cada amostra foi incubada 30 minutos à temperatura ambiente no escuro. Foi preparado um controle conforme procedimento acima, utilizando água em substituição a amostra. Um branco foi determinado para cada uma das concentrações utilizando etanol em substituição a solução de DPPH.

O percentual de decréscimo na absorvância foi medido em triplicata para cada concentração e a capacidade de seqüestrar radicais livres foi calculada com base no decréscimo da absorvância observada a 517 nm.

A porcentagem de atividade seqüestrante (%AA) foi determinada segundo a fórmula de Mensor et al. (2001) (Equação 03) e foi plotado o gráfico relacionando cada concentração da amostra a sua capacidade de seqüestro.

$$\%AA = 100 - [(Abs amostra - Abs branco) \times 100] / Abs controle \quad (03)$$

Onde,

Abs amostra = absorvância da solução de DPPH e a amostra de solução alimentação

Abs branco = absorvância da solução alimentação e etanol.

Abs controle = absorvância da solução de DPPH e água

A atividade antioxidante da amostra foi expressa em termos de CE50 (concentração efetiva em mg/mL necessária para o antioxidante reduzir em 50% a concentração inicial do DPPH), através da equação da reta obtida por regressão linear, considerando 50%AA. Desta forma, quanto menor o seu valor, maior é a capacidade antioxidante das substâncias presentes.

O teste foi realizado em triplicata e o resultado expresso através do intervalo de confiança de CE50 em mg/mL (b.s.) obtido com o teste T de Student.

2.3.4.1 Capacidade de resposta do método DPPH

Com o objetivo de validar a capacidade de resposta do método nas referidas condições de análise, determinou-se, o poder de resgate de radicais de DPPH por parte do padrão de ácido gálico. Foram preparadas soluções com diferentes concentrações que variaram entre 2 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e determinou-se a capacidade de inibição de radicais de DPPH por cada uma delas conforme procedimento descrito no item 2.3.4.

2.4 Secagem do Mel

Foram utilizados 300mL da solução de mel 50:50 (sólidos Mel:sólidos maltodextrina 20DE) a 45° Brix para cada uma das três repetições de secagem no atomizador, conforme metodologia descrita por Boonyai, Bhandari e Howes (2006) com modificações. As amostras foram submetidas à secagem em mini *spray-dryer* modelo MSDi 1.0 da Labmaq utilizando como parâmetros de processo: vazão de alimentação 1L/h; temperatura da alimentação de 50°C; temperatura do ar de entrada $150 \pm 2^\circ\text{C}$; temperatura do ar de saída de $95 \pm 5^\circ\text{C}$; Vazão do ar do soprador de 4,5 m³/min e diâmetro do bico atomizador 1,2 μm . O produto foi recolhido na forma de pó, acondicionado em frasco coletor de vidro com fechamento hermético e armazenado em dessecador até o momento de análise.

2.5 Caracterização do Mel em Pó

2.5.1 Umidade

A umidade foi determinado por secagem à pressão atmosférica em estufa a $(105\pm 2)^{\circ}\text{C}$ até peso constante (A.O.A.C., 2000).

2.5.2 Densidade compactada

Foram pesados 20g de produto em pó e colocados em uma proveta graduada de 100mL. A amostra é delicadamente compactada por 10 batidas em manta de borracha de uma altura de 15cm (BHANDARI et al. 1997).

2.5.3 Molhabilidade

Foi estabelecida colocando-se 12 gr do material em pó na superfície de um becher de 600mL contendo 400mL de água a 20°C e mediu-se o tempo em segundos, até o desaparecimento do pó na superfície (BHANDARI et al. 1997).

2.5.4 Higroscopicidade

Amostras do pó de mel foram pesadas em cápsulas de alumínio (2g) e mantidas em dessecador contendo solução saturada de NaCl à temperatura ambiente (URE igual a 75%) até que o equilíbrio fosse atingido. Para isso, realizou-se a pesagem em intervalos de 24 horas até que se obtivesse peso constante. A higroscopicidade foi expressa como o conteúdo de água absorvido por 100g de pó em base seca (g/100g em b.s.) (BHANDARI et al., 1997).

2.5.5 Granulometria

Para este teste, utilizou-se peneiras com diferentes aberturas (1400, 1000, 850, 600, 500, 425 micras) mais o fundo. A quantidade de amostra utilizada foi

de 100 g e as peneiras com a amostra foram levadas ao equipamento Granutest, com o reostato na posição 10, por um período de 5 min. Na quantificação da massa retida nas peneiras, foi utilizada uma balança semi-analítica com precisão de $\pm 0,01$ g. Os resultados apresentados são a média de três determinações (BHANDARI et al., 1997).

2.5.6 Cor

A coloração foi determinada pelo método CIE LAB em colorímetro Konica Minolta CR400, no espaço de cor L* (luminosidade), a* (contribuição do vermelho) e b* (contribuição do amarelo), utilizando-se aproximadamente 15mL de amostra em cubeta circular.

2.5.7 Determinação de fenólicos totais

A concentração dos fenóis totais para o pó de mel foi determinado pelo método espectrofotométrico descrito por Swain e Hillis (1959) adaptado por Roesler et al. (2007) utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu. Para a quantificação preparou-se uma solução aquosa do pó de mel de 100mg.mL^{-1} e procedeu-se a reação colorimétrica conforme descrito para análise de fenólicos da solução de alimentação em 2.3.2. O ensaio foi realizado em triplicata para cada uma das três secagens realizadas no atomizador, sendo apresentado o intervalo de confiança, expresso em mg de equivalentes de ácido gálico (AGE)/100 g de amostra de pó de mel em base seca (b.s).

2.5.8 Determinação de flavonóides

O teor de flavonóides totais foi determinado segundo metodologia descrita na literatura utilizando como reagente o cloreto de alumínio (MEDA et al., 2005). Preparou-se uma solução 200mg.mL^{-1} com o pó em metanol/água (1:1) e procedeu-se a reação conforme descrito na análise da solução alimentação em 2.3.3. O ensaio foi realizado em triplicata, sendo apresentado o intervalo de confiança,

expresso em mg de equivalentes de quercetina (QE)/100 g de amostra de pó de mel em base seca (b.s).

2.5.9 Determinação da atividade antioxidante com DPPH

A capacidade antioxidante da solução alimentação foi determinada pelo radical estável 2,2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH) pelo método descrito por Roesler et al. (2007). Preparou-se quatro diluições do pó de mel de modo a se obter concentração de sólidos totais entre 120 e 300mg.mL⁻¹. Uma alíquota de 1mL de cada uma das soluções foi submetida à reação com 3,0mL de solução etanólica de DPPH 0,004% m.v⁻¹, conforme procedimento descrito na análise da solução alimentação em 2.3.4. Desta forma, são apresentado os valores correspondentes ao intervalo de confiança de CE50 em mg.mL⁻¹(b.s.).

2.5.10 Análise Estatística

Todos os resultados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade de Anderson-Darling, para verificar se os dados apresentavam uma distribuição Gaussiana (p-valor > 0,05).

Após verificar a normalidade das distribuições foi realizada uma análise de regressão para desenvolver o modelo matemático que expressasse o relacionamento entre as variáveis. Para verificar a significância do modelo matemático foi realizado um teste de hipótese utilizando o F de Snedcor através da ANOVA.

Após obtenção dos resultados em triplicata, para estimamos a média populacional da distribuição foi realizado um estudo de intervalo de confiança utilizando o T de Student.

Para verificar a existência mudança significativa da solução alimentação para o Pó, foi primeiramente verificado se as duas distribuições possuíam variâncias iguais com um estudo do teste F de Snedcor e depois uma comparação de médias através da One Way ANOVA. O nível de significância adotado foi 5%. Utilizou-se o programa MINITAB® 14.

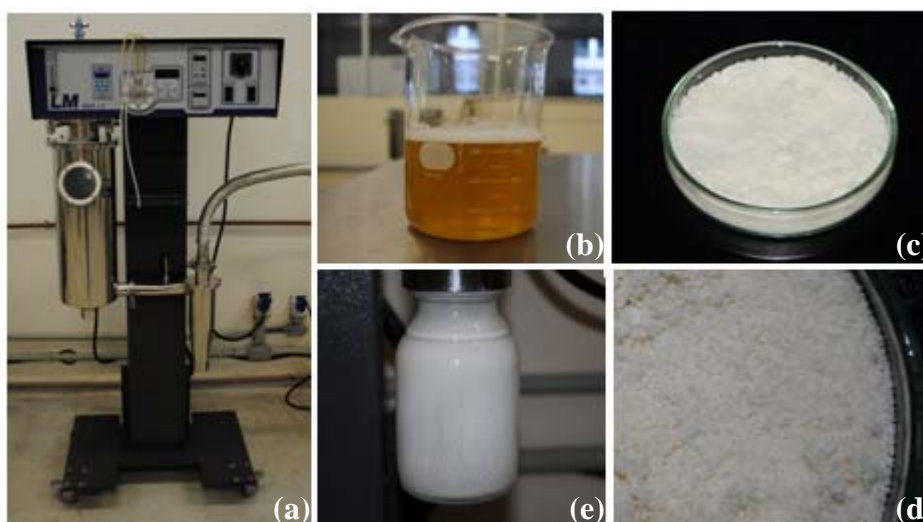
3. RESULTADO E DISCUSSÃO

3.1 Secagem e caracterização do mel em pó

O pó analisado (Figura 16) foi obtido em três repetições nas mesmas condições de secagem, sendo alcançado um rendimento em torno de 37% e proporção de sólidos de mel de 50,30% ($\pm 0,26$), a partir de uma solução de alimentação com 49,16% ($\pm 0,45$) de sólidos totais e viscosidade de 10,5mPa.s.

Na avaliação de granulometria do pó observou-se que 75% das partículas encontram-se entre 1400 e 600 micras o que demonstra a característica de coesão partícula/partícula proporcionando um maior número de partículas de tamanho grande. Muitas patentes reportam metodologias para o processo de secagem do mel, mas poucos estudos apresentam dados sobre a qualidade do pó obtido. Os parâmetros analisados são apresentados na tabela 11 e visam fornecer dados que subsidiem a comparação dos resultados de atividade antioxidante em futuros estudos.

Figura 16 – Processo de obtenção do pó de mel



* (a) - *spray dryer*; (b) - solução alimentação; (c) - pó de mel; (d) - grânulos do pó de mel; (e) - pó na saída do ciclone

Tabela 11 - Valores Médios de parâmetros físico do pó de mel

	Pó***
Umidade (%)**	1,78 ± 0,20
Densidade aparente (g/mL)**	0,45 ± 0,01
Higroscopicidade (g/100g)**	19 ± 3
Molhabilidade (s)	2 ± 1
Cor (L*; a*; b*)	(80,66 ± 1,23; -0,42 ± 0,04; 9,28 ± 0,48

** base seca

***Valores médios e Desvio Padrão da Média

O valor de umidade foi inferior ao reportado para o mel em pó por Boonyai, Bhandari e Howes (2006) de $2,68 \pm 0,36\%$, justificável pela menor temperatura de saída (65 ± 2 °C) utilizada por estes autores em comparação ao utilizado neste estudo (95 ± 2 °C). Esta constatação é reforçada pela umidade obtida por Tonon, Brabet e Hubinger (2009) no estudo do pó de açaí ($1,78 \pm 0,22\%$) em uma temperatura de saída de 99 ± 2 °C, semelhante a utilizada neste trabalho.

A densidade aparente está diretamente relacionada à umidade e a granulometria do pó (DAYÚTO; CEREDA, 2006). A título de comparação o pó de mel apresentou uma densidade aparente próxima à obtida por Grabowski, Truong e Daubert (2006) para o pó de purê de batata (0,55g/mL).

A higroscopicidade obtida no pó de mel é semelhante à obtida por Barbosa (2010) para o pó de suco de mistura de frutas (20,85g/100g) e por Tonon, Brabet e Hubinger (2009) para o pó de açaí (17,56g/100g). A higroscopicidade está relacionada, principalmente, a fatores como umidade do pó e a temperatura de transição vítrea (T_g) de seus componentes (BHANDARI; HOWES, 1999). Conseqüentemente, diferentes carreadores de secagem e concentrações empregadas provocarão diferenças nesse parâmetro.

A molhabilidade está relacionada, principalmente, ao conteúdo e características da gordura presente no pó, bem como fatores físicos, como tamanho e forma das partículas (MAIA; GOLGHER, 1983). Portanto já era esperada uma grande capacidade de penetração da água, dada a fração elevada de partículas grandes e o baixo teor de gordura no mel.

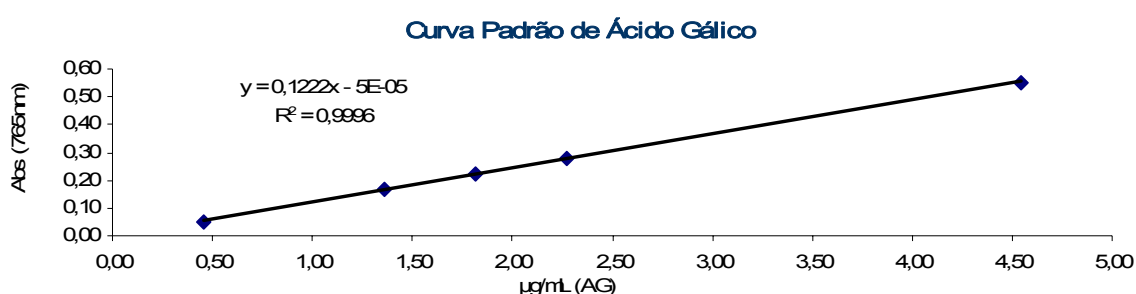
A cor obtida por Hebbbar et al. (2002) para o pó com 52% de sólidos de mel foi de L^* igual a 77.87; a^* de -1.60 e um b^* de 18.71. Comparadamente, o pó obtido sofreu um pequeno incremento na luminosidade, manteve a tendência ao tom

verde com o valor negativo de a^* e amarelo para os valores de b^* . As pequenas diferenças podem ser decorrentes de fatores como coloração inicial do mel; temperatura de secagem além de quantidade e característica do carreador. Kha et al. (2010), estudando os efeitos das condições de secagem de *gac aril*, observaram um aumento no valor de luminosidade de acordo com o incremento na concentração de maltodextrina. O que justifica também, o incremento em L^* obtido no presente estudo (80,66) com 50% de maltodextrina, comparado ao obtido por Hebbar et al. (2002), $L^*77,87$ para 48% de maltodextrina.

3.2 Determinação de Fenólicos totais

Na análise de compostos fenólicos totais, a curva padrão foi obtida através do ácido gálico (Figura 17).

Figura 17 - Curva padrão de ácido gálico



Os resultados foram submetidos ao teste de normalidade de Anderson-Darling, sendo verificado que apresentavam uma distribuição normal, demonstrado pelo p -value $> 0,05$ que foi o nível de significância adotado.

Após verificar a normalidade das distribuições foi realizada uma análise de regressão para desenvolver o modelo matemático que expressasse o relacionamento entre as variáveis (Equação 01).

$$y = 0,122(\pm 0,005)x - 0,000005(\pm 0,0115) \quad (01)$$

A função linear foi a que melhor se ajustou ao modelo matemático, apresentando um coeficiente de determinação (R^2) de 99%, ou seja, um poder de estimação fortíssimo.

Para verificar a significância no modelo matemático foi realizado um teste de hipótese utilizando o F de Snedcor através da ANOVA (Tabela 12), onde foi possível verificar que o F de significação ($3,67 \times 10^{-6}$) ficou menor que o nível de significância pré-determinado, de 5%, demonstrando assim a confiabilidade do modelo matemático adotado.

Tabela 12 - Teste de hipótese utilizando o F de Snedcor para a curva de Ác. Gálico

ANOVA					
	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	0,139168	0,139168	7113,27228	3,67407E-06
Resíduo	3	5,87E-05	1,96E-05		
Total	4	0,139227			

Os valores das absorbâncias obtidos na análise da amostra da solução alimentação do *spray dryer* e do pó nos três ensaios de Folin-ciocalteau foram utilizadas para o cálculo do teor de fenóis totais, substituindo a média das triplicatas na equação 01, fornecida pelo gráfico com o padrão de ácido gálico (Figura 17).

Obtiveram-se os respectivos valores dos teores ensaiados em μg equivalentes de ácido gálico por mL e converteu-se os valores para mg de equivalentes de ácido gálico (AGE)/100 g de sólidos da alimentação ou sólidos do pó de mel em base seca). Os valores obtidos para cada um dos três ensaios são apresentados na tabela 13.

Tabela 13 - Resultados obtidos para o teor de compostos fenólicos totais em três ensaios de amostra de solução alimentação e pó de mel obtido por secagem em *spray-dryer*

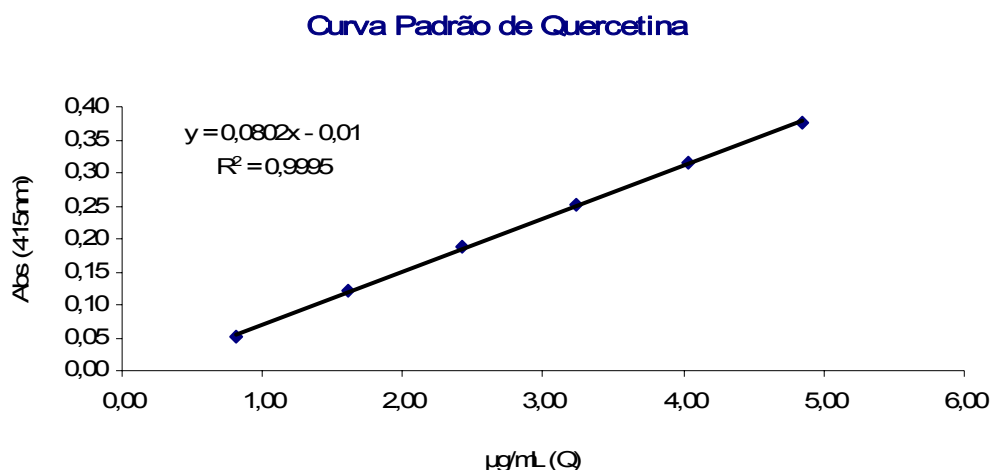
	Absorbância*	mqAGE.100 ⁻¹ g**
Alimentação		
Ensaio 01	0,318±0,015	26,42
Ensaio 02	0,330±0,017	27,30
Ensaio 03	0,309±0,011	25,99
Pó		
Ensaio 01	0,354±0,014	28,83
Ensaio 02	0,344±0,008	27,98
Ensaio 03	0,333±0,010	26,88

* Média das triplicatas e Desvio das médias; ** Referente a valores em base seca; AGE –Equivalente em ácido gálico

3.3 Determinação de Flavonóides totais

A quercetina foi o padrão utilizado na construção da curva para a determinação de flavonóides totais (Figura 18).

Figura 18 - Curva Padrão de Quercetina



Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade de Anderson-Darling, sendo verificado que apresentam uma distribuição normal, demonstrado pelo p-value > 0,05 que foi o nível de significância adotado.

Após verificar a normalidade das distribuições foi realizada uma análise de regressão para desenvolver o modelo matemático que expressa o relacionamento entre as variáveis (Equação 02).

$$y = 0,080(\pm 0,003)x - 0,01(\pm 0,0080) \quad (02)$$

A função linear foi a que melhor se ajustou ao modelo matemático, apresentando um coeficiente de determinação (R^2) de 99%, ou seja, um poder de estimação fortíssimo.

Para verificar a significância do modelo matemático foi realizado um teste de hipótese utilizando o F de Snedcor através da ANOVA (Tabela 14), onde foi possível verificar que o F de significação ($1,06 \times 10^{-7}$) ficou menor que o nível de significância pré-determinado, de 5%, demonstrando assim a confiabilidade do modelo matemático adotado.

Tabela 14 - Teste de hipótese utilizando o F de Snedcor para a curva de quercetina
ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	0,07344	0,07344	7526,386075	1,05826E-07
Resíduo	4	3,9E-05	9,76E-06		
Total	5	0,073479			

Os valores das absorbâncias (média da triplicata, desvios padrão) obtidas nos três ensaios de Flavonóides totais da solução alimentação e do pó de mel foram substituídos na equação 02 fornecida pelo gráfico com o padrão de quercetina (Figura 18). Os valores obtidos são referentes às respectivas concentrações ensaiadas em μg equivalente de quercetina (QE). mL^{-1} , e converteu-se os valores para mg de equivalentes de quercetina (QE)/100 g de sólidos da alimentação ou sólidos do pó de mel em base seca. Os valores obtidos para cada um dos três ensaios são apresentados na tabela 15.

Tabela 15 - Resultados obtidos para o teor de Flavonóides totais em três ensaios de amostra da solução alimentação e pó de mel obtido por secagem em *spray-dryer*

	Absorbância*	mg de QE.100 ⁻¹ **
Alimentação		
Ensaio 01	0,135±0,004	1,46
Ensaio 02	0,175±0,003	1,86
Ensaio 03	0,181±0,003	1,95
Pó		
Ensaio 01	0,182±0,006	2,43
Ensaio 02	0,177±0,005	2,35
Ensaio 03	0,164±0,003	2,18

* Média das triplicatas e Desvio das médias; ** Referente a valores em base seca;

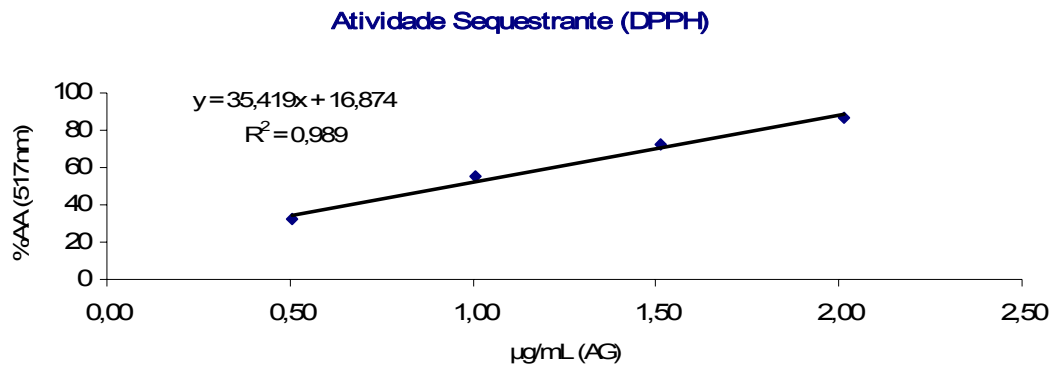
3.4 Determinação da atividade antioxidante por DPPH

O método do DPPH foi validado através do padrão de ácido gálico, resultando no gráfico de atividade sequestrante (Figura 19) com valor de R^2 igual 0,989.

O valor médio de CE50 obtido foi de 0,94 mg.mL^{-1} e este resultado representa uma boa concordância com o referenciado por outros autores (LIANDA,

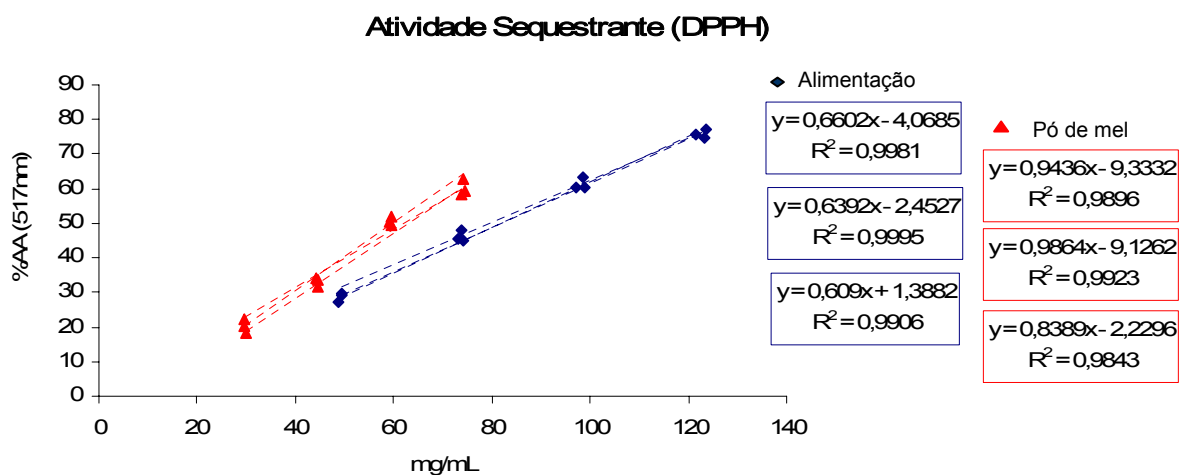
2009; SERRA, 2008) demonstrando a confiabilidade do método para a realização das análises com a solução alimentação e com o pó de mel.

Figura 19 - Poder de resgate de radicais de DPPH por parte do ácido gálico ($\mu\text{g/mL}$)



Na figura 20 são apresentadas as curvas e equações obtidas nos três ensaios independentes realizados na amostra da solução alimentação e no pó de mel com intuito de avaliar as atividades antioxidantes através do método do DPPH.

Figura 20 - Gráfico que relaciona o percentual de seqüestro do radical DPPH e a concentração de sólidos da solução alimentação e no mel em pó (b.s) nos três ensaios.



Após a obtenção das curvas os valores de CE50 foram determinados obtendo-se o valor de x (concentração em mg/mL) no ponto y igual a 50%AA. Os valores são apresentados na tabela 16.

Tabela 16 - Valores de CE50 obtidos para a solução alimentação e pó de mel nos ensaios de atividade antioxidante pelo método do DPPH e o F de significação dos modelos matemáticos utilizados

	F de significação*	DPPH-CE50 (mg.mL⁻¹)**
Alimentação		
Ensaio 01	0,0009	81,90
Ensaio 02	0,0047	79,82
Ensaio 03	0,0002	82,06
Pó		
Ensaio 01	0,0079	62,26
Ensaio 02	0,0039	59,94
Ensaio 03	0,0052	62,88

* Valores de F menores que o nível de significância pré-determinado de 5% demonstra a boa confiabilidade do modelo matemático adotado (teste de hipótese utilizando o F de Snedcor – ANOVA);

** Referente à base seca

3.5 Intervalo de confiança

Com os dados de compostos fenólicos, flavonóides, e atividade antioxidante dos três ensaios para a solução alimentação e pó de mel determinou-se o intervalo de confiança dos resultados com 95% de certeza (Tabela 17).

Tabela 17 - Resultados dos teores de fenóis totais, flavonóides e CE50 para amostra de solução de alimentação e pó de mel

	Intervalo de Confiança**	
	Alimentação	Pó
Fenólicos Totais (mgAGE.100⁻¹g)*	24,91 - 28,23 ^a	25,47 - 30,32 ^a
Flavonóides Totais (mgQE.100⁻¹g)*	1,11 - 2,40 ^a	2,01 - 2,63 ^b
DPPH-CE50 (mg.mL⁻¹)*	78,17 - 84,36 ^a	57,84 - 65,88 ^b

* Valores em base seca

** Referente a três repetições em triplicata analisados pelo teste T de Student com probabilidade de 95%.

^{a,b} Letras diferentes em uma mesma linha apresentam diferença estatística entre si (One-way ANOVA; p < 0,05).

Realizando a análise de igualdade de variância dos resultados obtidos para o teor de compostos fenólicos totais (figura 21) não foi possível identificar diferença significativa entre os resultados da solução alimentação e o pó de mel, observando-se um p-valor maior que 0,05 (0,124). Para os flavonóides (figura 22)

observou-se diferença significativa com p-valor menor que 0,05 (0,028), havendo um incremento no seu teor. Da mesma forma, a análise da atividade antioxidante (figura 23) apresentou diferença significativa com p-valor menor que 0,0005 e intervalo de confiança apontando um incremento médio na ordem de 15%.

Figura 21 - Análise de igualdade entre as variâncias para o teste de fenólicos totais

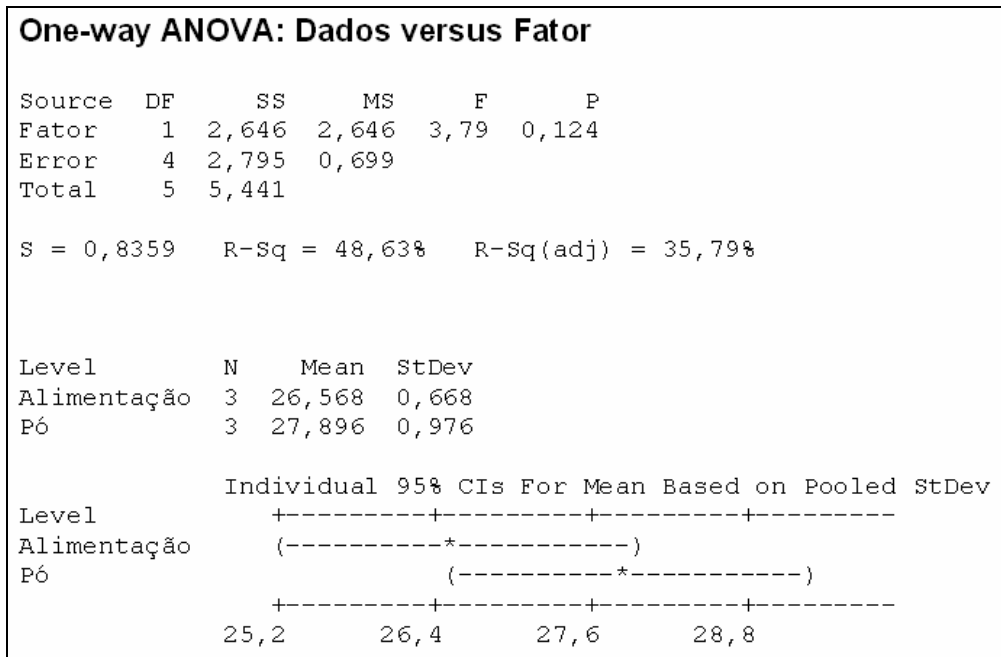


Figura 22 - Análise de igualdade entre as variâncias para o teste de flavonóides

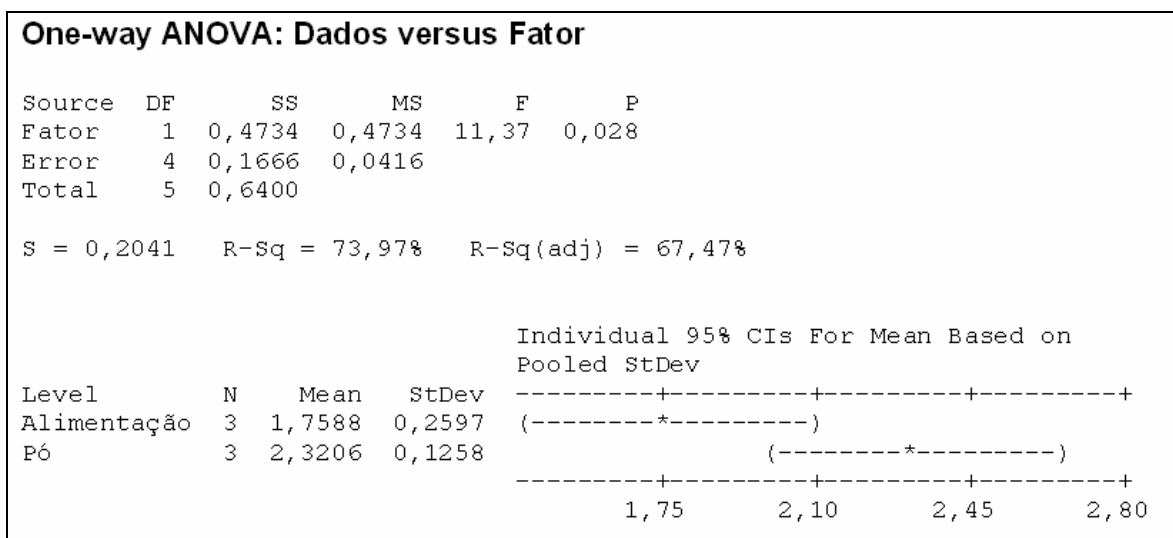
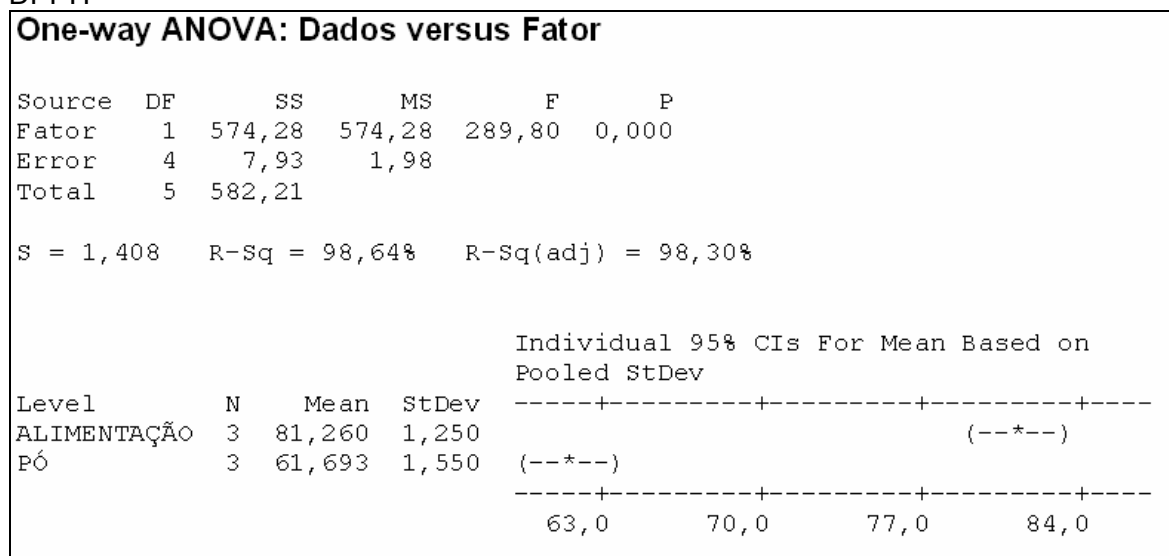


Figura 23 - Análise de igualdade entre as variâncias para valores de CE50 no teste de DPPH



Alguns autores relatam que a depender do processamento podem ocorrer degradações de antioxidantes naturais na matéria-prima, com perda de cor, sabor e quantidade. O tratamento térmico intenso ou prolongado pode ser responsável por perda de antioxidantes instáveis (MOURE et al., 2001).

Entretanto, há autores que afirmam que o processamento melhore as propriedades de antioxidantes naturais ou induza a formação de combinações novas que têm propriedades antioxidantes, de forma que a atividade antioxidante global do produto permaneça inalterada ou possa aumentar apesar da perda eventual de ingredientes ativos (HALLIWELL et al., 1992). O efeito dos parâmetros de secagem no incremento da atividade antioxidante no pó de mel obtido neste trabalho corrobora com estes autores.

Turkmen et al., (2006) no estudo sobre o efeito do aquecimento prolongado na atividade antioxidante e na cor do mel, atribuiu esse aumento aos produtos da reação de Maillard (PRM). Nas condições de processamento, polifenóis, ácido ascórbico e outros compostos carbonilados podem tomar parte na reação de Maillard (MANZOCCO et al., 2001) e formar compostos heterocíclicos, como pirróis e furanos que são capazes de inibir compostos hexanais em considerável escala (YANAGIMOTO et al., 2002). Anese et al. (1999) reportou este mesmo comportamento para o tratamento de suco de tomate aquecido a 95°C por 30 h;

Queiroz et al. (2009) pesquisando os grãos de amaranto, obtiveram incremento na atividade antioxidante e redução no teor de fenólicos totais no

processo de cozimento a 100°C por 10 minutos; Santos et al. (2007), também constatou que a torrefação dos grãos de café pode levar à perda de polifenóis, devido à degradação térmica progressiva, contudo, este efeito pode ser minimizado pela formação de produtos antioxidantes da reação de Maillard, o que apóia os valores incrementados para o CE50 e flavonóides e não para o teor de fenólicos totais. É possível também que alguns produtos de oxidação, mesmo permanecendo como compostos fenólicos, não possam ser detectados por esta metodologia (YAO et al., 2006).

4. CONCLUSÕES

Pode-se concluir que o pó de mel obtido por *spray dryer* a uma temperatura de entrada de $150^{\circ}\text{C} \pm 1$ e saída de $95^{\circ}\text{C} \pm 5$, com 50% de maltodextrina 20DE como carreador de secagem, apresentou características importantes com aumento no teor de flavonoides e incremento significativo da atividade antioxidante. Deste modo se apresenta como produto promissor, fonte de antioxidante e com alto valor agregado.

REFERÊNCIAS

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIAL (A.S.T.M.). Standard Test Methods for Rheological Properties of Non-Newtonian Materials by Rotational (Brookfield type) Viscometer. **Barr Harbor: ASTM Standards, s.d.p., p. 1-4.**

ANESE, M. et al. Antioxidant properties of tomato juice as affected by heating. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.79, p.750–754, 1999.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (A.O.A.C.). Official Methods of Analysis of AOAC International. 17ed. v. II., 2000.

BARBOSA, S. J. **Qualidade de suco em pó de mistura de frutas obtido por *spray drying***. 122 f. 2010. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal). Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba-MG, 2010.

BHANDARI, B. R. et al. A semi-empirical approach to optimise the quantity of drying aids required to spray dry sugar-rich foods. **Drying Technology**, v. 15, n. 10, p. 2509-2525, 1997.

BHANDARI, B. R.; HOWES, T. Implications of glass transition for the drying and stability of dried foods. **Journal of Food Engineering**, London, v. 40, p. 71–79, 1999.

BOONYAI, P.; BHANDARI, B.; HOWES, T. Applications of thermal mechanical compression tests in food powder analysis. **International Journal of Food Properties**, v. 9, n. 1, p. 127-134, 2006

DAYÚTO, E. R.; CEREDA, M. P. Influência da granulometria de grânulos de amido sobre a densidade aparente de extratos atomizados. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 27, n.1, p.51-56, 2006.

GRABOWSKI, J. A.; TRUONG, V.-D.; DAUBERT, C. R. Spray-drying of amylase hydrolyzed sweetpotato puree and physicochemical properties of powder. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 5, p. E209-E217, jun./jul. 2006.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **Jornal of Neurochemistry**, v. 59, n. 5, p. 1609-1623, nov. 1992.

HEBBAR, U. et al. An improved process for the preparation of spray dried honey powder. **Indian Patent**, 1562/DEL/02, 2002.

KHA, T. C. et al. Effects of spray drying conditions on the physicochemical and antioxidant properties of the Gac (*Momordica cochinchinensis*) fruit aril powder. **Journal Food Eng.** v. 98 p. 385-92, 2010.

LIANDA, R. L. P. **Perfil de substâncias fenólicas de méis brasileiros por cromatografia líquida de alta eficiência e avaliação do potencial antioxidante.**

142 f. 2004. Tese (Doutorado em química). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

MAIA, A. B. R.; GOLGHER, M. Parâmetros para Avaliação da Qualidade de Reconstituição do Leite em pó desidratado em Secador de Aspersão *Spray-Drier*. **Boletim SBCTA**, Campinas, v. 17, n. 3, p. 235-254. jul/set,1983.

MANZOCCO, L. et al. Review of non-enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. Trends in **Food Science and Technology**, v.11, p.340–346, 2001.

MEDA, A. et al. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkin Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v.91, n.3, p.571-577, 2005.

MENSOR, L.L. et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v.15, n.2, p.127-130, 2001.

MOURE, A. et al. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry - Review** – n.72, p.145-171, 2001.

QUEIROZ, Y. S. et al. Efeito do processamento na atividade antioxidante do grão de amaranto (*Amaranthus cruentus* L. BRS-Alegria). **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 59, n.4, p.419-424, 2009.

ROESLER, R. et al. Atividade Antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas. v. 27, n.1, p. 53-60, jan./mar.2007.

SANTOS, M. H. et al. Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade antioxidante do café (*Coffea arabica*). **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 604-610, 2007.

SWAIN, T.; HILLIS, W. E.; The phenolic constituents of *Prunus domestica*. The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal Science Food Agricultural**, v. 10, n. 1, p. 63-68, jan. 1959.

TONON, R. V.; BRABET, C.; HUBINGER, M. D. Influência da temperatura do ar de secagem e da concentração de agente carreador sobre as propriedades físico-químicas do suco de açaí em pó. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n.2, p. 444-450, abr/jun. 2009.

TURKMEN, N. et al. Effects of prolonged heating on antioxidant activity and colour of honey. **Food Chemistry**, v. 95, n. 4, p. 653–657, apr. 2006.

YANAGIMOTO, K. et al. Antioxidative activities of heterocyclic compounds formed in Maillard reaction products. **International Congress Series**, v.1245, p.335–340, 2002.

YAO, L.H. et al. Phenolic compounds in tea from Australian supermarkets. **Food Chemistry**. V.96, n.4, p. 614–620, 2006.

CONCLUSÕES GERAIS

Conclui-se que os métodos utilizados de seqüestro do radical DPPH, de teor de fenólicos totais por Folin-Ciocalteu e flavonóides pelo complexo com cloreto de alumínio são interessantes para obtenção de resultados preliminares e para comparação entre diversos processos de uma mesma amostra. Apesar de pouco exatos possuem repetibilidade e baixo custo.

A atividade antioxidante do mel utilizado no processo de secagem, encontrava-se com 95% de certeza dentro de um intervalo de confiança de 57,84 a 65,88mg.mL⁻¹ expresso em CE50. O teor de compostos fenólicos entre 25,47 e 30,32 mg de AGE.100⁻¹ g e o teor de flavonóides entre 2,01 e 2,63 mg de QE.100⁻¹g, todos em base úmida. Esses valores se encontram de acordo com os valores já reportadas por outros autores considerando os mesmos métodos de análise e as diferenças de origem de cada mel.

No estudo foi observado que o pó de mel obtido por *spray dryer* a uma temperatura de entrada de 150°C± 1 e saída de 95°C±5 com 50% de maltodextrina 20DE como carreador de secagem, apresenta um incremento significativo na atividade antioxidante. Esse aumento pode ser justificável pelo desencadeamento das reações de Maillard e podem variar de acordo com as condições de processo, principalmente pela temperatura de saída, concentração de carreador e tempo de secagem. São Necessários mais estudos que detalhem e confrontem os produtos das reações de Maillard (PRMs) com a identificação dos compostos responsáveis pela elevação da atividade antioxidante durante o processo de secagem para a maior compreensão das reações desencadeadas e efeitos no teor de flavonóides e compostos fenólicos totais.