

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO

Luana Luviza Bombardelli
Thanise Teston Paganini

Avaliação da presença de espécies botânicas no mel através de
cromatografia

Passo Fundo

2016

Luana Luviza Bombardelli
Thanise Teston Paganini

Avaliação da presença de espécies botânicas no mel através de
cromatografia

Projeto de pesquisa apresentado à disciplina de
Trabalho de Síntese I, como um dos requisitos para a
aprovação na disciplina.
Orientadora: Prof. Dra. Maria Tereza Friedrich

Passo Fundo

2016

RESUMO

O mel é um alimento de elevado valor energético, possuindo várias propriedades importantes para o metabolismo humano, como a atividade antioxidante. O perfil fenólico, as condições climáticas e as espécies botânicas presentes no mel contribuem para a variabilidade desta atividade. As substâncias com características antioxidantes são de grande importância para a saúde humana e auxiliam o organismo a ter uma ação protetora contra os processos oxidativos que ocorrem de forma natural. Os flavonoides pertencem ao grupo dos antioxidantes que possuem características diversas e variam em relação as fontes de obtenção, não são sintetizados pelo organismo, sendo necessária a ingestão através dos alimentos. Algumas espécies botânicas ao florescerem são muito atrativas às abelhas e de acordo com as características químicas dos pólenes e néctares coletados, serão gerados méis com diferenças sensoriais como aroma, sabor, cor e composição, variando também em cada estação do ano. Para isso, é necessário fazer a extração das espécies botânicas e do mel por meio de extração em fase sólida, após será realizada a análise cromatográfica. A partir da determinação dos flavonoides será confirmada se há presença das espécies botânicas canola, eucalipto e citros em amostras de mel da região de Passo Fundo.

Palavras-chave: Saúde. Compostos fenólicos. SPE. HPLC. Tipificação.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exportação brasileira de mel natural – 2014.....	12
Tabela 2 - Exportação brasileira de mel natural – 2015.....	13
Tabela 3 – Gradiente da fase móvel que será utilizado.....	27
Tabela 4 - Materiais de uso permanente.....	29
Tabela 5 - Recursos e materiais de consumo.....	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sistema de defesa dos antioxidantes.....	18
Figura 2 – Estrutura base dos flavonoides.....	19
Figura 3 - Estrutura química do flavonol.....	20
Figura 4 – Estrutura química das flavonas.....	21
Figura 5 – Estrutura química das flavanonas.....	22
Figura 6 – Estrutura química das antocianinas.....	23
Figura 7 – Estrutura química das isoflavonas.....	24

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Algumas espécies reativas do oxigênio.....	17
Quadro 2 – Radicais presentes nos componentes do flavonol.....	20
Quadro 3 – Radicais presentes nos componentes da flavona.....	21
Quadro 4 – Radicais presentes nos componentes das flavanonas.....	22
Quadro 5 – Radicais presentes nos componentes das antocianinas.....	23
Quadro 6 – Radicais presentes nos componentes das isoflavonas.....	24
Quadro 7 – Cronograma de atividades.....	28

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Representação da exportação brasileira de mel natural - 2014.....	12
Gráfico 2 - Representação da exportação brasileira de mel natural - 2015.....	13

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	6
1.1	PROBLEMA DE PESQUISA	6
2	JUSTIFICATIVA.....	8
3	OBJETIVOS.....	9
3.1	OBJETIVO GERAL	9
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
4	REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	10
4.1	MEL.....	10
4.2	ESPÉCIES BOTÂNICAS.....	13
4.2.1	Citros	13
4.2.2	Canola.....	15
4.2.3	Eucalipto.....	15
4.3	ANTIOXIDANTES	16
4.4	FLAVONOIDES	18
4.4.1	Flavonol.....	20
4.4.2	Flavonas.....	21
4.4.3	Flavanonas	21
4.4.4	Antocianinas	22
4.4.5	Isoflavonas.....	23
5	MATERIAL E MÉTODOS	24
5.1	EQUIPAMENTOS, MATERIAIS E VIDRARIAS	24
5.2	REAGENTES	25
5.3	AMOSTRAS DE MÉIS	25
5.4	PADRÕES DOS FLAVONOIDES	25
5.5	PROCEDIMENTO ANALÍTICO	25
5.5.1	Preparação dos cartuchos de SPE com fase estacionária ciano.....	25
5.6	CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS.....	26
5.6.1	Condições cromatográficas para flavonoides em estudo.....	27
6	CRONOGRAMA	28
7	ORÇAMENTO.....	29
7.1	RECURSOS HUMANOS.....	29

7.2	RECURSOS FÍSICOS	29
7.3	MATERIAIS PERMANENTES.....	29
7.4	RECURSOS E MATERIAIS DE CONSUMO	30
	REFERÊNCIAS	31

1 INTRODUÇÃO

Considerando a crescente busca por alternativas benéficas ao ser humano, o presente estudo relacionará a presença de flavonoides em diferentes espécies botânicas presentes no mel, alimento diretamente associado ao cotidiano populacional, com ênfase no Rio Grande do Sul.

O mel é o produto mais importante da atividade apícola brasileira, do ponto quantitativo e econômico, geralmente este alimento é administrado pelos pequenos agricultores. Possui grande demanda o que o torna um produto caro, especialmente quando a produção decai. É encontrado nos supermercados, feiras e vendido diretamente sem qualquer especificação de qualidade. Ao especificar sua composição química agregará valor ao produto, beneficiando o produtor e o consumidor que terá conhecimento do que irá ingerir.

Esse produto apícola é consumido mundialmente, porém sua composição química irá variar em cada país. É acessível a qualquer consumidor sendo que cada local irá gerar um mel com características diferentes como aroma, cor, sabor e consistência. É produzido em todas as estações do ano, possibilitando uma produção ininterrupta.

As diversidades de características químicas do mel estão relacionadas com as diferentes espécies botânicas, onde ocorre a polinização em épocas de floração. Neste estudo será abordado três espécies botânicas sendo elas: canola, citros e eucalipto.

As propriedades do mel, dentre elas as antioxidantes são de grande importância, posto que retardam e previnem o processo oxidativo que ocorre naturalmente. A atividade antioxidante está relacionada com a estrutura do flavonoide, que a partir deste será detectado por métodos cromatográficos as diferentes espécies botânicas do mel.

1.1 PROBLEMA DE PESQUISA

Como os flavonoides desempenham um papel fundamental na proteção contra agentes oxidantes, há necessidade de buscar maiores informações sobre alimentos que contenham flavonoides naturais, posto que este não pode ser sintetizado pelo organismo, sendo apenas absorvido na ingestão de alimentos em que se faz presente.

O consumidor atual prefere ingredientes de origem natural, como o mel que oferece a funcionalidade ao alimento ao invés de origem artificial. Dentre as substâncias funcionais o grupo amplamente estudado é o dos antioxidantes.

O mel brasileiro é exportado na forma de misturas, deixando de ser apreciado e valorizado por seus tipos diferenciados de origens florais, que garantem méis de qualidade superior com boa aceitação no mercado externo.

A partir dos flavonoides é possível detectar as diferentes espécies botânicas presentes no mel por meio de cromatografia líquida de alta eficiência, sendo necessário padrões cromatográficos para essa possível detecção.

2 JUSTIFICATIVA

Desde a antiguidade o mel é utilizado por suas propriedades terapêuticas, seu consumo acontecia prioritariamente para fins medicinais. Atualmente a população está se preocupando em ingerir alimentos naturais de qualidade, destacando-se o mel, por sua elevada característica antioxidativa.

Os antioxidantes são substâncias presentes em baixas concentrações sobre um substrato oxidável que retardam e previnem sua oxidação, prevenindo a proliferação de radicais livres. Dos quais são obtidos em alimentos encontrados na maioria dos vegetais, frutas, legumes, hortaliças e cereais.

As diferentes características do mel são explicadas devido sua origem botânica, neste estudo será analisada a presença de citros, canola e eucalipto no mel, devido a sua forte presença na região Sul, por meio dos extratos destas espécies e do mel pela extração em fase sólida. Esta extração possibilita menor consumo de solvente orgânico, menor formação de emulsão e de resíduos tóxicos. Após obter os extratos, as amostras serão introduzidas no cromatógrafo, sendo detectado os picos dos diferentes padrões de flavonoides por cromatografia líquida de alta eficiência possibilitando maior certificação das características do mel.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e aplicar uma metodologia para determinar a presença de flavonoides no mel, possibilitando a identificação da origem floral e agregando valor ao produto, utilizando extração em fase sólida de cada amostra por meio de análise em cromatografia líquida de alta eficiência.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Obter perfis cromatográficos de méis da região de Passo Fundo, de diferentes floradas.
- b) Avaliar a presença de flavonoides, tais como: quercitina, hesperidina, miricetina, rutina, luteolina e canferol nos extratos das espécies botânicas citros, eucalipto e canola, por cromatografia líquida de alta eficiência.
- c) A partir da determinação dos flavonoides, identificar e confirmar a origem botânica do mel.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 MEL

A apicultura é uma das atividades que consegue satisfazer três aspectos, tais como: sociais, econômicos e produtivos. É uma atividade que pode ser desenvolvida por associações/organizações sem fins lucrativos, ou por produtor rural/agricultor familiar, gerando renda para quem a desenvolve e principalmente destaca-se por não poluir o meio ambiente quando produzida, isto deve-se a capacidade polinizadora das abelhas. (EMBRAPA, 2007).

A apicultura brasileira desenvolveu-se por meio de enxames trazidos por imigrantes, porém, obteve-se grande revolução com a inserção de abelhas africanas, tendo-se um cruzamento das duas espécies (europeia e africana), sendo então conhecidas como abelhas africanizadas (SILVA, 2008). Estas abelhas são altamente produtivas e mais resistentes às doenças, conferindo-lhes um grande potencial. Produzem mel, cera, própolis, pólen apícola, geleia real e apitoxina, que servem de matéria-prima para indústrias farmacêuticas, alimentícias e cosméticas como também para o consumo *in natura*.

Segundo a legislação brasileira de 20 de outubro de 2000, mel é

[...] 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 de plantas, que as abelhas recolhem, transformam, combinam com substâncias específicas próprias, armazenam e deixam madurar nos favos da colmeia.

O mel é um alimento de elevado valor energético consumido mundialmente, sendo de grande importância para a saúde quando puro por constituir várias propriedades, tais como: antimicrobiana, curativa, calmante, regenerativa de tecidos, estimulante, antibacteriana, entre outros. (SILVA et al., 2006). É constituído essencialmente por água (17%), glicídios (80%) e substâncias diversas (3%) como enzimas, ácidos orgânicos, carboidratos, matérias minerais e compostos fenólicos, dentre eles os flavonoides.

O produto apícola mais fácil de ser explorado é o mel, sendo o mais conhecido e com maior possibilidade de comercialização. A coloração, o sabor, o aroma e a consistência do mel dependem da região, clima e origem floral, tendo em vista que a manipulação do mel pelo

apicultor pode interferir nas características quando mal administrada (EMBRAPA, 2007). Quanto mais escura a coloração do mel, maior é a presença de minerais. Pode ser classificado por sua origem, pelo procedimento de obtenção de mel do favo e segundo sua apresentação ou processamento.

Pela origem pode ser classificado em dois grupos: mel de origem floral e mel de melato. O mel de origem floral é obtido dos néctares das flores, e o mel melato é obtido a partir das secreções de partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores. O mel de origem floral pode ser monofloral e multifloral (SILVA, 2006).

A delimitação da origem floral do mel é um dos objetivos da indústria apícola, posto que é de grande importância econômica, o consumidor aprecia diferentes variedades de mel e cada uma destas possuirá um valor de mercado diversificado pelas suas propriedades (SILVA, 2006).

Existe um conjunto de procedimentos analíticos que podem ser utilizados na análise da composição química e biológica das propriedades do mel, tais como: cromatografia gasosa (GC, do inglês *Gas Chromatography*), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) e eletroforese capilar (CE, do inglês *Capillary Electrophoresis*) que ao combinarem-se com arranjos de diodo e detecção de espectrofotometria em massas garantem melhor grau de eficiência (SUAREZ et al., 2009).

Segundo a Anvisa (Resolução – CNNPA nº12, de 1978) não é permitido que o mel contenha substâncias estranhas em sua composição normal. Pode ser parcialmente cristalizado, porém sem caramelização e espuma superficial. O limite máximo de aquecimento permitido é 70°C contanto que seja mantida a sua atividade enzimática. É proibida a adição de corantes, aromatizantes, espessantes, conservadores, corretivos de acidez e edulcorantes tanto naturais como sintéticos.

O mel apresenta atividade antioxidante por meio dos compostos fenólicos, como os ácidos fenólicos e os flavonoides. A atividade antioxidante do mel varia com a composição do perfil fenólico obtido de diferentes fontes florais e condições climáticas (CIULU et al., 2016). Substâncias antioxidantes consumidas diariamente são de grande importância pois auxiliam o organismo a ter uma ação protetora contra os processos oxidativos que ocorrem naturalmente (ARRUDA, 2013). O mel é considerado uma ótima fonte de antioxidantes, possuindo efeitos benéficos a saúde por apresentar diversas propriedades, dentre elas a atividade antibacteriana, na qual tem papel fundamental no desenvolvimento do estudo das propriedades antioxidantes do mel.

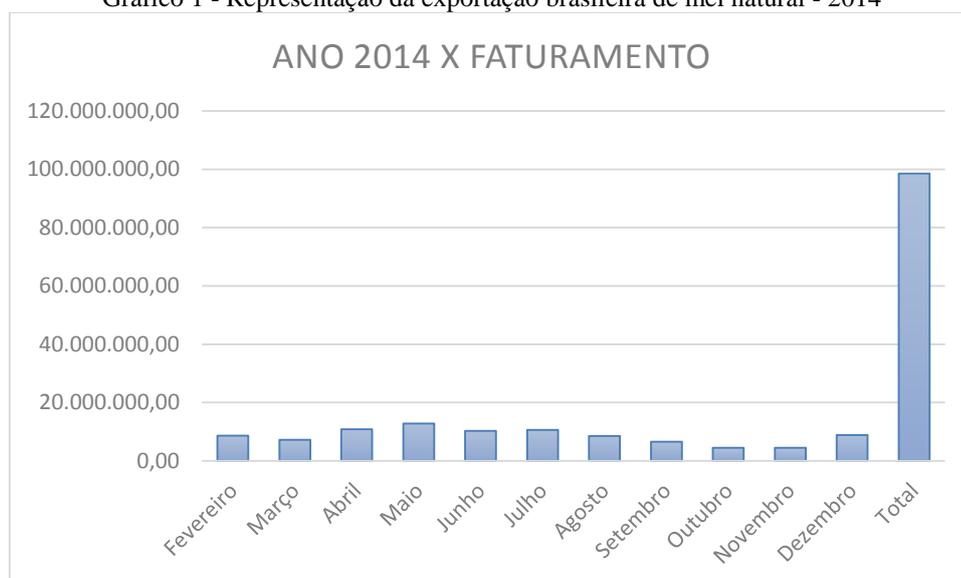
A região que possui o maior percentual de produção de mel no Brasil é o Rio Grande do Sul, com 48,59% do total. (REZENDE, et al., 2015). Em 2014, houve um crescimento significativo de exportações de mel, no qual possibilitou o Brasil subir de posição no ranking mundial, estando classificado na 8ª posição segundo dados da ABEMEL (Associação Brasileira de Exportadores de Mel). Abaixo, na tabela 1 e tabela 2 seguem os dados da exportação brasileira de mel natural, onde notou-se um decaimento não significativo da exportação de mel em 2015 devido as condições climáticas e economia política.

Tabela 1 - Exportação brasileira de mel natural – 2014

ANO	2014		
Meses	US\$	kg	Valor kg
Janeiro	5.412.930,00	1.498.310	3,61
Fevereiro	8.590.675,00	2.322.285	3,70
Março	7.211.402,00	1.939.681	3,72
Abril	10.843.455,00	2.844.609	3,81
Maiο	12.822.682,00	3.313.321	3,89
Junho	10.257.574,00	2.607.027	3,93
Julho	10.617.198,00	2.653.049	4,00
Agosto	8.461.058,00	2.137.515	3,96
Setembro	6.554.402,00	1.647.301	3,98
Outubro	4.499.294,00	1.121.636	4,01
Novembro	4.450.948,00	1.108.070	4,02
Dezembro	8.794.439,00	2.125.459	4,14
Total	98.576.057,00	25.317.263	3,89

Fonte: Adaptado de ABEMEL, 2016.

Gráfico 1 - Representação da exportação brasileira de mel natural - 2014



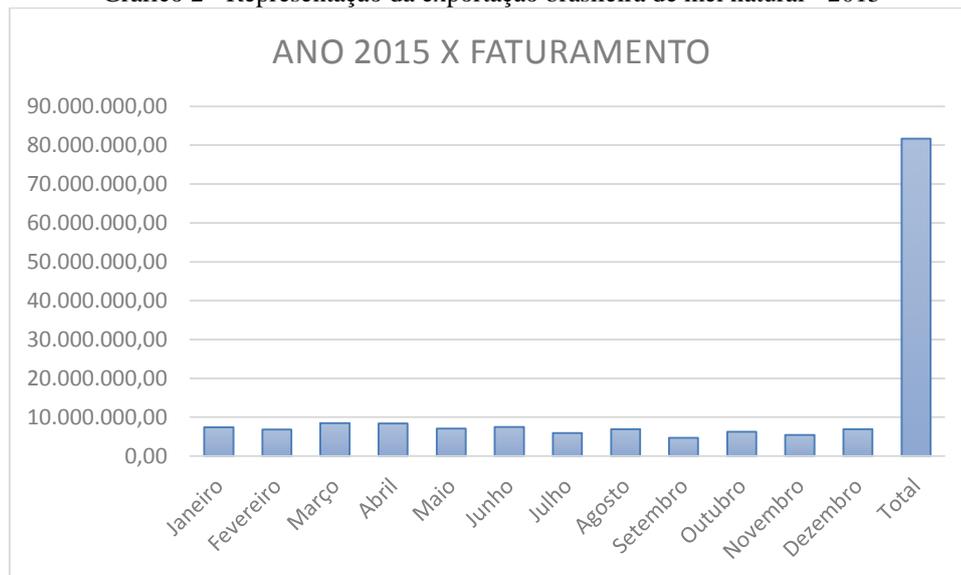
Fonte: Adaptado de ABEMEL, 2016.

Tabela 2 - Exportação brasileira de mel natural – 2015

ANO	2015		
Meses	US\$	kg	Valor kg
Janeiro	7.391.190,00	1.858.648	3,98
Fevereiro	6.834.551,00	1.714.329	3,99
Março	8.440.837,00	2.164.253	3,90
Abril	8.367.901,00	2.177.339	3,84
Mai	7.077.586,00	1.872.859	3,78
Junho	7.473.749,00	1.992.259	3,75
Julho	5.942.559,00	1.669.504	3,56
Agosto	6.908.287,00	1.946.784	3,55
Setembro	4.720.538,00	1.351.656	3,49
Outubro	6.218.781,00	1.851.571	3,36
Novembro	5.460.037,00	1.607.113	3,40
Dezembro	6.883.952,00	1.999.449	3,44
Total	81.719.968,00	22.205.764	3,68

Fonte: Adaptado de ABEMEL, 2016.

Gráfico 2 - Representação da exportação brasileira de mel natural - 2015



Fonte: Adaptado de ABEMEL, 2016.

4.2 ESPÉCIES BOTÂNICAS

4.2.1 Cítricos

As plantas cítricas possuem origem asiática, desenvolvidas em locais úmidos, tropicais e subtropicais. Por meio das primeiras expedições colonizadoras foram introduzidas no Brasil,

inicialmente na Bahia e, por apresentarem ótima adaptação nesta região houve uma expansão de sua produção em todo país. (NASCIMENTO et al, 2011).

O gênero *Citrus* é característico de diversos frutos, tais como: laranjas, tangerinas, limões, limas, entre outros. Os citros são plantas perenes, possuem porte médio e atingem cerca de quatro metros de altura. A produção mundial de *Citrus* é cerca de 102 milhões de toneladas por ano sendo ampla a área cultivada com 7,3 milhões de hectares. O principal fruto cultivado no Brasil é a laranja. (MATOS et al, 2005).

As frutas cítricas são as mais consumidas pelos brasileiros, sendo o Brasil o maior produtor mundial, com cerca de 250 milhões de plantas distribuídas em uma área de 940 mil hectares, cerca de 20 milhões de toneladas de fruta são produzidas por ano. Os Estados de Minas Gerais, Bahia, Sergipe, Rio Grande do Sul e São Paulo são responsáveis por cerca de 90% da produção nacional. (EMBRAPA, 2008).

Na região Sul, que apresenta clima subtropical, os citros florescem em um único ciclo, na primavera, resultando em uma colheita por ano. Nestas regiões, o início do florescimento está diretamente ligado as variações de temperaturas do inverno, assim as temperaturas baixas durante o período de pré-florescimento causam um florescimento tardio, na qual as condições térmicas nesta época são adequadas para a polinização e para a fixação do fruto. (VITTI et al, 2003). O mel proveniente dos citros é caracterizado como um mel de verão, posto que, sua produção inicia-se na primavera.

A polinização de frutas cítricas pode ocorrer por autopolinização ou por polinização cruzada, em que consiste no transporte do pólen por insetos, neste caso as abelhas que correspondem por cerca de 80% dessa polinização ou ventos, porém sem grande importância pois o pólen dos citros é viscoso e pesado. (NASCIMENTO et al, 2011). A polinização, principalmente por abelhas *Apis mellifera L.* na laranjeira é de grande importância pois irá produzir frutos maiores e de melhor qualidade. A laranjeira possui importância medicinal, muito utilizada na indústria farmacêutica por sua essência e a partir da polinização gera um mel com excelente aroma e sabor. (TOLEDO et al, 2013).

As frutas cítricas possuem vitaminas C, ácido fólico, fibra dietética e demais componentes bioativos, como os carotenoides e os flavonoides. São de grande importância pois auxiliam na prevenção de câncer e doenças degenerativas. As cascas e sementes de frutos cítricos são ricas em compostos fenólicos como os flavonoides. (TRIPOLI et al, 2006). Geralmente é encontrada a hesperidina como flavonoide nas frutas cítricas, a classe de flavonoides predominante nessas frutas são as flavononas.

4.2.2 Canola

A canola foi desenvolvida por pesquisadores canadenses em 1974 na Universidade de Manitoba, a partir do melhoramento genético da colza. O nome canola foi criado em 1978 para distinguir o produto da colza comum que era mais utilizado em ração animal (DORNALES, 2014). Em 1977 na Europa foi desenvolvido outras duas variedades que preenchem os mesmos padrões de qualidade que a anterior, após a nova descoberta o óleo de canola passou a ser definido como “um óleo que deve conter menos de 2% de ácido eurúico, e menos que 30 micromoles de glucosinolatos por grama”.

Planta herbácea anual da família das crucíferas, a canola (*Brassica napus* L. e *Brassica rapa* L.) produz uma substância chamada glucosinato, que através de ação enzimática se transformam em isotiocianatos (ITC), sendo estas substâncias muito eficientes como biocidas naturais.

A canola é a terceira oleaginosa mais produzida mundialmente, seu maior consumo ocorre em países mais desenvolvidos. No Brasil os grãos de canola possuem de 24 a 27 % de proteínas e em média 38% de óleo. Além do óleo é possível extrair o farelo, que possui 34 a 38% de proteínas.

Essa cultura de inverno é incluída como uma alternativa de renda, nos sistemas de produção de grãos, seu principal uso é para produção de biocombustíveis e óleo para consumo humano (EMBRAPA, 2015). As flores amarelas de canola, seu perfume e sua abundância de recursos alimentares são muito atrativas a abelhas da família *Syrphidae* e *A. melífera*. O mel de canola apresenta sacarose em pequenas quantidades (WITTER et al, 2001).

Cartea (2010), afirma que há 17 flavonoides presentes na canola (*Brassica napus* L.), e detectou uma presença superior de canferol. Outros flavonoides detectados foram: quercetina, ácido sinápico, cianidina, hesperidina, mircetina e pelargonidina.

4.2.3 Eucalipto

O eucalipto é originário da Austrália, Indonésia e ilhas próximas. Os primeiros plantios ocorreram no Rio Grande do Sul por volta de 1868, sendo que os primeiros estudos dessa espécie foram iniciados por volta de 1904. O gênero *Eucalyptus* pertence à família das *Myrtaceas* compreendendo cerca de 600 espécies e subespécies na qual podem ser utilizadas para diversas finalidades por adaptação de diferentes climas e solos. (EMBRAPA, 2001).

O plantio de eucalipto no Brasil é de grande importância, pois este é destinado a produção de papel, celulose, lenha, carvão, óleos para indústrias farmacêuticas, mel, entre outros. A espécie botânica mais plantada no Brasil é o eucalipto possuindo 5,56 milhões de hectares em 2014. (BORA et al, 2016).

O eucalipto é considerado um dos melhores e mais abundantes fornecedores de alimento para as abelhas, que dependendo do néctar das flores do eucalipto são capazes de produzir diferentes tipos de mel em relação ao aroma e sabor gerando diferentes qualidades para o mel. (MARCHINI et al, 2003). É possível afirmar que onde existe plantação de eucalipto conseqüentemente, terá a apicultura.

O mel de eucalipto é designado pelo aroma e sabor provenientes do néctar das flores de eucalipto. Quando o aroma e o sabor predominam as características da origem do néctar, o mel é caracterizado como silvestre, de plantas nativas ou de flores de campos como plantas rasteiras e arbustos, entre outros. (ALVIM, 2004).

A miricitina, tricetina, quercitina, luteolina e canferol geralmente são os flavonoides presentes no mel de eucalipto. Este é pertencente a classe dos méis monoflorais que são os mais apreciados comercialmente, mantendo as mesmas características físico-químicas e sensoriais, muito atrativos e com um sabor agradável (BARROS, 2011).

4.3 ANTIOXIDANTES

Os antioxidantes são caracterizados como a defesa do corpo humano, posto que, combatem e previnem o efeito dos radicais livres. O desequilíbrio entre o excesso da produção de radicais livres e a remoção destes pelos agentes antioxidantes é chamado de estresse oxidativo.

A oxidação se faz presente no metabolismo dos organismos vivos. Desta maneira os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica (OLIVEIRA, 2014). Os radicais livres podem ser gerados nas mitocôndrias, na membrana, no citoplasma e em outras organelas. São moléculas altamente reativas que possuem um ou mais elétrons desemparelhado em sua camada orbital externa, explicando assim a sua instabilidade.

Quando os radicais livres são gerados, procuram estabilizar-se capturando elétrons das espécies químicas próximas, gerando uma alteração na conformação, estrutura e função dos componentes celulares do organismo, podendo atingir várias moléculas como DNA/RNA, carboidratos, lipídios e proteínas. Ao atingi-las, não conseguem mais desempenhar suas funções

básicas impossibilitando o processo de regeneração e reprodução celular. Deste modo, os radicais livres contribuem para o processo de envelhecimento, também podendo desenvolver diferentes tipos de câncer, doenças cardiovasculares, diabetes, neoplasias e doenças autoimunes. Todavia, nem todos os radicais livres são maléficos a saúde, posto que, o sistema imunitário os utiliza para matar bactérias e vírus (MARTINELLI, 2014). Algumas espécies de radicais livres serão mostradas no Quadro 1.

Quadro 1- Algumas espécies reativas do oxigênio.

ESPÉCIES	REATIVIDADE
Radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$)	Produzido na mitocôndria, em sistema cardiovascular, entre outros.
Radical peroxila (ROO^{\cdot})	Reativo e formado de lipídios, proteínas, DNA, açúcares, etc, durante o dano oxidativo.
Radical hidroxila (OH^{\cdot})	Altamente reativo, produzido durante sobrecarga de ferro e situações semelhantes em nosso corpo.
Peróxido de hidrogênio ($H_2 O_2$)	É produzido em nosso corpo pelo amplo número de reações, formando radicais potentes como OH^{\cdot}
Oxigênio singlet (1O_2)	Altamente reativo formado por fotosensibilidade e reações químicas.

Fonte: Adaptado de GONÇALVES, 2008.

Existem dois fatores que influenciam a formação de radicais livres, tais como: os fatores exógenos (formação dos radicais livres por fatores externos) como a exposição a radiações ionizantes, contaminação atmosférica, radiações eletromagnéticas, consumo de fármacos e alimentos. E os fatores endógenos (formação dos radicais livres pelo organismo) como exercício físico de alta intensidade, processos oxidativos metabólicos, respiração celular, ação de enzimas oxidativas, reações inflamatórias, estresse e excesso de íons metálicos (AGUSTÍ, 2013).

Com o intuito de evitar os danos gerados pelos radicais livres, o organismo desenvolveu diversos mecanismos de defesa, sendo estes os potenciais de neutralização dos radicais livres que são chamados de antioxidantes. Estes têm como função eliminar os radicais livres ou impedir a sua transformação em produtos mais agressivos para as células.

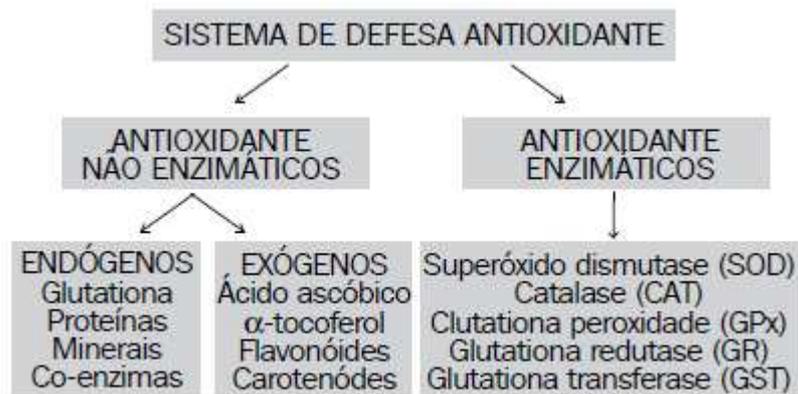
Segundo Bianchi (1999), os sistemas de defesa dos antioxidantes podem atuar em diferentes formas na proteção do organismo, tais como:

- a) Impedir a formação de radicais livres;

- b) Interceptar os radicais livres, impedindo o ataque sobre os lipídios, os aminoácidos das proteínas, a dupla ligação dos ácidos graxos poli-insaturados e as bases do DNA, evitando produção de lesões e perda da integridade celular;
- c) Repara as lesões causadas pelos radicais por meio da remoção de danos da molécula de DNA e a reconstituição das membranas celulares danificadas.

Existem dois sistemas de defesa dos antioxidantes, como apresentado na Figura 1.

Figura 1 - Sistema de defesa dos antioxidantes.



Fonte: BERNAUD; FUNCHAI, 2011.

O sistema de defesa antioxidante atua deixando a sua própria integridade molecular para evitar possíveis alterações nas moléculas. O sistema enzimático é composto pelas enzimas superóxido dismutase, catalase, glutathiona peroxidase, glutathiona redutase e glutathiona transferase, que consistem na redução ou até mesmo impedindo a formação dos radicais livres reagindo com os compostos oxidantes, protegendo os tecidos e as células do estresse oxidativo (BARBOSA et al, 2010).

O sistema não enzimático protege as células da oxidação por desempenhar capacidade de eliminação da formação dos radicais livres ou desativação destes. É separado em endógenos e exógenos, nos quais as substâncias presentes na classificação endógena representa a produção de alguns antioxidantes no próprio corpo, já na classificação exógena são substâncias obtidas por fatores externos, como exemplo, por meio de alimentos que contenham espécies antioxidantes, em especial os que apresentam flavonóides.

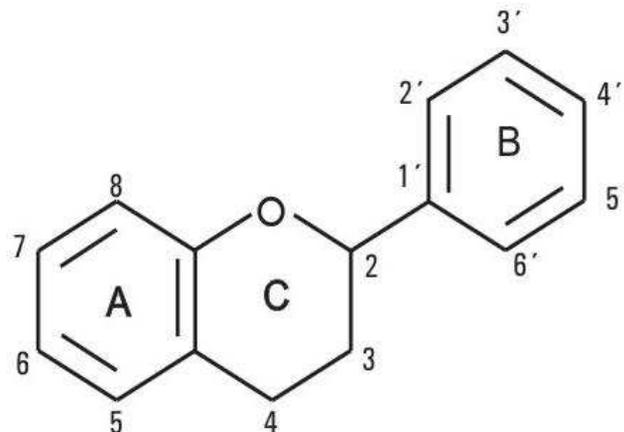
4.4 FLAVONOIDES

Os flavonoides foram descobertos em 1530 por Szent-Gyorgy. Ele extraiu a citrina da casca do limão, a substância possuía a capacidade de regular a permeabilidade dos capilares. Assim, essa classe de produtos naturais ficou denominada como vitamina P e vitamina C₂. Ao longo do tempo foi dada a confirmação que tais substâncias não eram vitaminas, logo essa classificação foi abandonada em 1950 (SANTOS, 2010).

Os componentes podem ser definidos como uma classe de metabolitos secundários de plantas, que derivam da condensação de uma molécula de ácido cinâmico participando da fase dependente de luz da fotossíntese, durante a qual, catalisam o transporte de elétrons.

O grupo dos fenóis incluem os flavonoides, que são substâncias de origem natural, onde a síntese não ocorre na espécie humana e são encontrados em diversos alimentos. Quimicamente, os flavonoides constituem substâncias aromáticas com 15 átomos de carbono no seu esqueleto básico, seu peso molecular é baixo, possui dois anéis benzênicos ligados através de um anel pirano (LOPES, 2000), conforme mostra a figura 2.

Figura 2 – Estrutura base dos flavonoides.



Fonte: TRUEBA, 2003.

Há mais de 8000 diferentes flavonoides, que podem ser divididos em subclasses. A explicação para a existência de uma grande variedade estrutural de flavonoides se explica pelas modificações que o composto sofre, dependendo da substituição e do nível de oxidação nos anéis (AVELAR, 2016). Somente no anel C₃ há quatorze subclasses onde as principais são: os flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanas, isoflavonoides e antocianinas.

As diferentes classes de flavonoides podem ser isoladas mediante técnicas cromatográficas e identificados por espectrofotometria em massa, ao isolar cada flavonoide é possível comparar as diferentes características do mel nas espécies botânicas em estudo.

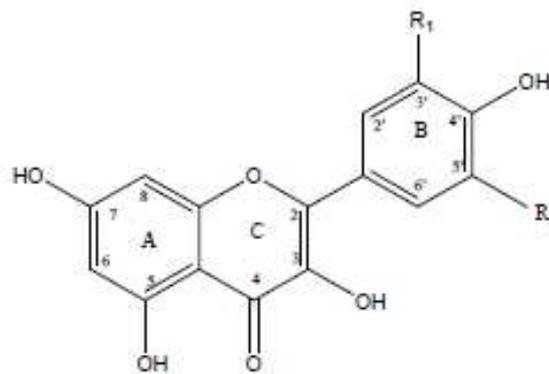
4.4.1 Flavonol

O flavonol é um fito químico encontrado em altas concentrações em uma variedade de plantas, alimentos e bebidas. É uma das classificações dos flavonoides e incluem os componentes quercetina, canferol, miricetina e rutina. Sendo a quercetina a principal representante desta classe. A coloração desta é amarelo pálido.

A quercetina é um potente antioxidante, capaz de reduzir congestão nasal, espirros e irritação nos olhos ocasionado pelas alergias. Seu poder antioxidante ajuda na estabilidade da membrana celular, também funciona como um eficaz anti-inflamatório natural (AGUSTÍ, 2013).

O consumo do flavonol tem sido associado com uma variedade de efeitos benéficos incluindo o aumento da atividade de superóxidos dismutase de eritrócitos (uma enzima antioxidante encontrado nas células sanguíneas), uma diminuição no dano de DNA de linfócitos e há um aumento na capacidade antioxidativa (HENEMAN, 2008). A figura 3 mostra a estrutura química do flavonol e o quadro 2 informa os radicais presentes.

Figura 3 - Estrutura química do flavonol.



Fonte: BHAGWAT *et al.*, 2011.

Quadro 2 – Radicais presentes nos componentes do flavonol.

FLAVONOL	R1	R2
Canferol	H	H
Miricetina	OH	OH
Quercetina	OH	H

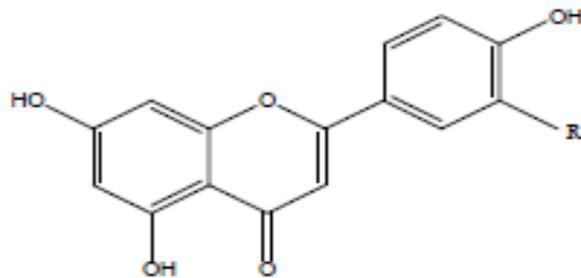
Fonte: Adaptado de Bhagwat *et al.*, 2011.

4.4.2 Flavonas

As flavonas são protetores químicos naturais, que absorvem luz em comprimentos de ondas mais curtos, ultravioleta. Desta maneira protegem as células vegetais dos danos causados pela foto-oxidação, confere o pigmento amarelo em flores.

As flavonas são essenciais na alimentação, podendo ser encontradas em frutas cítricas, cereais, vegetais e ervas. Possuem propriedades antioxidantes, anticarcinogênica, anti-inflamatória, antiestrogênica (SILVA, 2009). A figura 4 mostra a estrutura química da flavona e o quadro 3 informa os radicais presentes.

Figura 4 – Estrutura química das flavonas.



Fonte: Bhagwat *et al.*, 2011.

Quadro 3 – Radicais presentes nos componentes da flavona.

FLAVONA	R1
Apigenina	H
Luteolina	OH

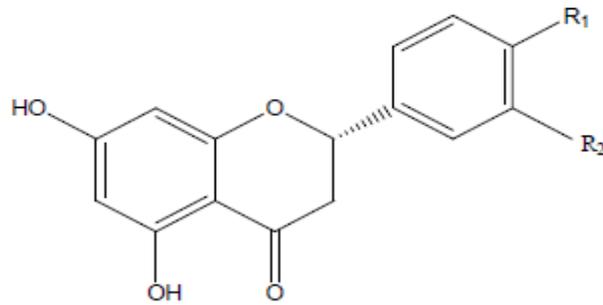
Fonte: Adaptado de Bhagwat *et al.*, 2011.

4.4.3 Flavanonas

Encontradas em frutas cítricas como a laranja, é o principal agente causador do sabor amargo. A flavanona é um flavonoide de coloração amarelo pálido que desempenha um papel muito importante no organismo humano.

A ingestão diária de flavanonas, de acordo com estudos epidemiológicos, apresenta propriedades antioxidantes, anti-inflamatória, antialérgica, inibidores de enzimas, influência sobre o sistema sensorial, efeito analgésico, anestésico local e atividade antiviral. A figura 5 mostra a estrutura química das flavanonas e o quadro 4 informa os radicais presentes.

Figura 5 – Estrutura química das flavanonas.



Fonte: Bhagwat *et al.*, 2011.

Quadro 4 – Radicais presentes nos componentes das flavanonas.

FLAVANONAS	R1	R2
Hesperitina	OMe	OH
Naringenina	OH	H
Eriodictiol	OH	OH

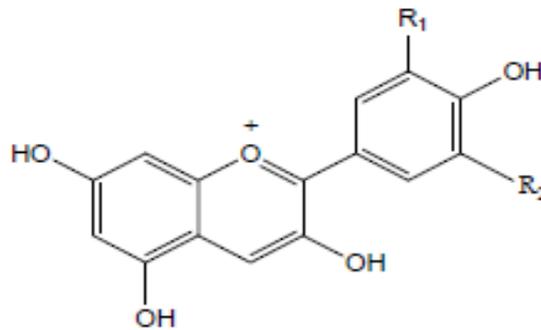
Fonte: Adaptado de Bhagwat *et al.*, 2011.

4.4.4 Antocianinas

É um pigmento vegetal responsável por uma grande variedade de cores observadas em flores, frutos, algumas folhas, caules e raízes de plantas (CASTAÑEDA, 2009). A coloração varia desde o vermelho (condição ácida) até o azul ou amarelo (condição alcalina). Podem ser encontradas em uma variedade de frutas vermelhas como cereja, morango e amora.

Possui muitas funções, dentre elas está a atração de polinizadores de sementes, proteção contra danos provocados pela luz UV na folha, atuando como filtro e melhorando e regulando a fotossíntese. Na dieta humana pode ser considerada uma importante aliada na prevenção e/ou retardamento de doenças cardiovasculares, do câncer e doenças neurodegenerativas, devido ao seu poder antioxidante. A figura 6 mostra a estrutura química das antocianinas e o quadro 5 informa os radicais presentes.

Figura 6 – Estrutura química das antocianinas.



Fonte: Bhagwat *et al.*, 2011.

Quadro 5 – Radicais presentes nos componentes das antocianinas.

ANTOCIANINAS	R1	R2
Cianidina	H	OH
Delfinidina	OH	OH
Malvidina	OMe	OMe
Peonidina	H	OMe
Petunidina	OH	OMe

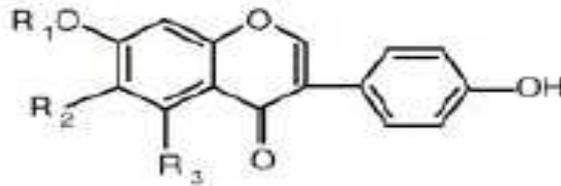
Fonte: Adaptado de Bhagwat *et al.*, 2011.

4.4.5 Isoflavonas

Representam uma classe de compostos químicos conhecidos como fito estrógenos. Esses compostos são encontrados de forma natural em leguminosas e são abundantes nos grãos de soja. Dentre as classificações das isoflavonas destacam-se a daidzina e a genisteína.

Elas agem de três diferentes formas: como estrógenos e antiestrógenos, como inibidores de enzimas e como antioxidantes. Na presença dos estrogênios elas funcionam como antiestrógenos, competindo com eles pelos sítios de ligação nos receptores de estrógenos presentes na célula, evitando que este hormônio exerça seus efeitos negativos, como aumentar o risco de câncer de mama nas mulheres (EMBRAPA, 2006). A figura 7 mostra a estrutura química das isoflavonas e o quadro 6 informa os radicais presentes.

Figura 7 – Estrutura química das isoflavonas.



Fonte: Bhagwat *et al.*, 2011.

Quadro 6 – Radicais presentes nos componentes das isoflavonas.

ISOFLAVONOIDES	R1	R2	R3
Daidzina	H	H	H
Genisteina	H	H	OH

Fonte: Adaptado de Flambó, 2013.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 EQUIPAMENTOS, MATERIAIS E VIDRARIAS

- Cromatógrafo líquido S200 PUMP Perkin Elmer;
- Balança analítica de precisão, modelo SV-200 (Shimadzu, Japão);
- Sistema de purificação de água Milli-Q® (Millipore, EUA);
- Agitador magnético;
- Manifold;
- Cartuchos de SPE (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*), com fase estacionária CN (ciano);
- Micropipetadores automáticos com capacidade variável (Brand, Alemanha e Eppendorf, Canadá);
- Copos plásticos descartáveis;
- Béquer;
- Bastão de vidro;
- Pipeta de Pasteur;
- Pipeta;
- Espátula;
- Frascos para amostras.

5.2 REAGENTES

- Metanol, grau HPLC;
- Ácido Fórmico, p.a.;
- Padrão de Miricetina, com pureza entre 97 a 99%
- Padrão de Luteolina, com pureza entre 97 a 99%;
- Padrão de Canferol, com pureza entre 97 a 99%;
- Padrão de Crisina, com pureza entre 97 a 99%;
- Água Milli-Q.

5.3 AMOSTRAS DE MÉIS

As amostras utilizadas neste trabalho serão obtidas de apicultores da região de Passo Fundo de diversas estações do ano de 2015/2016. Relacionando as amostras com os extratos das espécies botânicas através de flavonoides presentes em cada amostra.

5.4 PADRÕES DOS FLAVONOIDES

Os padrões de flavonoides que serão analisados são: quercetina, canferol, rutina, crisina, miricetina, hesperidina e luteolina.

5.5 PROCEDIMENTO ANALÍTICO

Primeiramente será medida a massa de 10 g de amostra em copinhos plásticos, enumerando de acordo com o número da amostra. Posteriormente a amostra será solubilizada em 10 mL de água de Milli-Q (pH=3, ajustado com ácido fosfórico) aquecida a aproximadamente 40 °C. Após segue para o procedimento analítico.

5.5.1 Preparação dos cartuchos de SPE com fase estacionária ciano

- a) Enumerar cada cartucho de acordo com o número da amostra e colocar no Manifold (equipamento para movimentação de fluidos).
- b) Acoplar, o Manifold, à bomba a vácuo.

- c) Checar se todas as válvulas de saída, do Manifold, estão fechadas.
- d) Para ativar a fase estacionária dos cartuchos, adicionar 3 mL de metanol.
- e) Ligar a bomba à vácuo e abrir aos poucos as válvulas de saída do Manifold. Cuidando sempre para que a fase estacionária do cartucho não fique seca. Deve-se fechar a válvula antes que todo o metanol passe pela fase estacionária.
- f) Adicionar 3 mL de água de Milli-Q.
- g) Ligar a bomba à vácuo e abrir aos poucos as válvulas de saída do Manifold. Cuidando sempre para que a fase estacionária do cartucho não fique seca. Deve-se fechar a válvula antes que toda a água passe pela fase estacionária.
- h) Após todos os cartuchos terem sido ativados com metanol e água de Milli-Q, adicionar aos poucos as amostras em estudo nos seus respectivos cartuchos, cuidando sempre para não deixar secar a fase estacionária do cartucho.
- i) Quando toda a amostra for transferida do copinho plástico para o cartucho de SPE, deixar que toda a amostra passe pela fase estacionária e após isso, deixar sob vácuo, por aproximadamente 1 minuto. Fechar a válvula de saída do Manifold.
- j) Lavar o cartucho de SPE adicionando 3 mL de água de Milli-Q, abrir as válvulas de saída e deixar que toda a água passe pela fase estacionária. Após isso, deixar sob vácuo por aproximadamente 1 minuto. Fechar a válvula de saída do Manifold.
- k) Desligar a bomba à vácuo e tirar o vácuo do Manifold.
- l) Abrir o Manifold e colocar dentro o rack com os tubos de ensaio.
- m) Fechar o Manifold cuidando para que cada agulha deste fique dentro do seu respectivo tubo de ensaio.
- n) Acoplar novamente a bomba à vácuo ao Manifold.
- o) Adicionar em cada cartucho de SPE 2 mL de metanol
- p) Ligar a bomba à vácuo e abrir aos poucos as válvulas de saída do Manifold.
- q) Após todo o metanol passar pelo cartucho, fechar as válvulas e desligar a bomba à vácuo.
- r) Transferir as amostras dos tubos de ensaio  para os seus respectivos frascos.
- s) Injetar no cromatógrafo.

5.6 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

5.6.1 Condições cromatográficas para flavonoides em estudo

As condições cromatográficas serão as seguintes:

- Coluna cromatográfica: C18, devido sua compatibilidade para análise de diversos compostos;
- Volume de injeção da amostra na coluna será de 10 μL ;
- Fase móvel: Solução de água 0,3% ácido fórmico (Canal A) e solução de metanol 0,3% ácido fórmico (Canal B);
- Vazão da fase móvel será de 0,8 mL min⁻¹;
- Comprimento de onda: 360 nm;

O gradiente da fase móvel que será utilizado se encontra na Tabela 3:

Tabela 3 – Gradiente da fase móvel que será utilizado.

Tempo (min)	Água 0,3 % Ác. Formico	Metanol 0,3% Ác. Fórmico
0,5	25	75
1,5	35	65
3	45	55
3,5	25	75

Fonte: autoria própria

6 CRONOGRAMA

Quadro 7 – Cronograma de atividades.

Etapas	2016					2017					
	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun
Escolha do tema	Realizado										
Revisão de literatura	Realizado	Realizado					Previsto	Previsto	Previsto	Previsto	
Entrega a orientadora		Realizado	Realizado						Previsto	Previsto	Previsto
Ajustes finais			Realizado							Previsto	
Entrega do projeto				Realizado							Previsto
Defesa do projeto				Realizado							
Selecionar amostras de méis da região de Passo Fundo							Previsto	Previsto			
Preparar os extratos de espécies botânicas para análise cromatográfica							Previsto	Previsto			
Preparo das amostras de méis para análise cromatográfica							Previsto	Previsto			
Análise cromatográfica dos extratos das espécies botânicas									Previsto		
Análise cromatográfica das amostras de méis									Previsto		
Resultados obtidos									Previsto	Previsto	
Conclusão do projeto										Previsto	
Defesa do projeto final											Previsto



Fonte: autoria própria

7 ORÇAMENTO

7.1 RECURSOS HUMANOS

Orientadora: Dr. Maria Tereza Friedrich– Professora do curso de Química do ICEG-UPF.

Executoras: Luana Luviza Bombardelli e Thanise Teston Paganini – acadêmicas de Engenharia Química FEAR-UPF.

7.2 RECURSOS FÍSICOS

Laboratório Cromatografia do Centro de Pesquisa em Alimentação (CEPA)-UPF e Laboratório de Aulas Práticas do Curso de Engenharia de Alimentos e Engenharia Química.

7.3 MATERIAIS PERMANENTES

Não a nada há adquirir.

Tabela 4 - Materiais de uso permanente

ITEM	CUSTO (R\$)
01 Computador	1.800,00
01 Impressora	300
01 Mesa tipo escrivaninha	200
01 Cadeira	150
01 Balança analítica	5.000,00
01 Agitador magnético	450
01 Cromatógrafo líquido com detector UV	100.000,00
01 Capela de exaustão de gases	6.000,00
05 Pipetas Volumétricas	250
05 Micropipetas	1.000,00
Ponteiras para micropipetas	100
Vidraria Básica	400
Estufa	3.000,00
TOTAL	120.650,00

Fonte: autoria própria

7.4 RECURSOS E MATERIAIS DE CONSUMO

Não a nada há adquirir.

Tabela 5 - Recursos e materiais de consumo

ITEM	CUSTO (R\$)
01 Pacote de folhas A4 para impressão	16
01 Cartucho de tinta preto para impressora	90
01 Cartucho de tinta colorido para impressora	120
01 Caneta azul ou preta	3
01 Avental de algodão	60
01 Caixa de luvas de procedimento	16
Reagentes	500
TOTAL	805

Fonte: autoria própria.

REFERÊNCIAS

- ALVIM, Nivaldo C. O mel e suas características. Revista científica eletrônica de medicina veterinária, Garça, 3 ed., 2004.
- ARRUDA Vanilda A. S. **Pólen apícola desidratado: composição físico-química, qualidade microbiológica, compostos fenólicos e flavonoides, atividade antioxidante e origem botânica.** Tese (Doutorado em farmácia). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2013.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE EXPORTADORES DE MEL (ABEMEL). Setor Apícola Brasileiro em Números. Disponível em <
http://brazilletsbee.com.br/inteligencia_comercial_abemel_agosto_2016.pdf > Acesso em 03 out. 2016.
- AUGUSTI, Adolfo P. **Antioxidantes y enzimas.** 1. ed. Madrid: Editora Masters 2013.
- AVELAR Deusielly S. **Atividade antioxidantes e isolamento de flavonoides glicosilados de *Waltheria ferrugínea*.** Monografia (Graduação em Química), Instituto de Química Universidade Federal do Rio Grande do Norte 2016.
- BARBOSA, Kiriaque B. F.; COSTA Neusa M.; ALFENAS Rita G.; DE PAULA Sergio O.; MININ Valeria P.; BRESSAN Josefina. **Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios.** Revista de Nutrição, Vol. 23, No. 4, p.629-643, 2010.
- BERNAUD, Fernanda S. R.; FUNCHAL Cláudia, D. Sc. Atividade antioxidante do açaí. **Nutrição Brasil**, Vol. 10, No.5, 2011.
- BARROS, Laís B. **Perfil sensorial e de qualidade do mel de abelha (*Apis mellifera*) produzido no estado do Rio de Janeiro.** Tese (Pós-Graduação em Medicina Veterinária). Univerisidade Federal Fluminense, 2011.
- BHAGWAT, Seema; HAYTOWITZ David B.; HOLDEN Joanne M.; USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods. Agricultural Research Service, 2014.
- BIANCHI, Maria L. P.; ANTUNES, Lusânia M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Vol.12, No.2, p. 123-130, 1999.
- BORA, Karen C.; BRITO Gabriela S.; AUER Celso G.; SANTOS Alvaro F.; WREGE Marcos S. Favorabilidade climática para a ferrugem do eucalipto no estado do Paraná. **Summa Phytopathol**, Vol.42,No.1, p.24-42,2016.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução CNNPA nº12, 1978: **Diário Oficial da União**, Brasília, 24 Jul. 1978.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Resolução MERCOSUL GMC nº11, 1999: **Diário Oficial da União**, Brasília, 20 Out. 2000.

CARTEA, María E.; FRANCISCO Marta; SOENGAS Pilar; VELASCO Pablo. Phenolic Compounds in Brassica Vegetables. **Molecules**, Vol. 1, No. 16, p.251-280, 2011.

CASTAÑEDA, Leticia M. F. Antocianinas: O Que São? Onde Estão? Como Atuam?. In: SEMINÁRIO DO PPG-FITOTECNIA, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. **Seminário...** Porto Alegre, 2009.

CIULU, Marco; SPANO Nadia; PILO Maria I.; SANNA Gavino; Recent Advances in the Analysis of Phenolic Compounds in Unifloral Honeys. **Molecules** 2016

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA. **ABC da Agricultura Familiar**. 1 ed. Embrapa Meio-Norte, 2007.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Canola: Planta que traz muitos benefícios á saúde humana, e cresce em importância no Brasil e no mundo. Rio Grande do Sul: Passo Fundo, 2007.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Cultivares apirênicas de citros recomendadas para o Rio Grande do Sul. Pelotas, 2008.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA Doenças do eucalipto no sul do Brasil: identificação e controle. Paraná: Colombo, 2001.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA. QUEIROZ Importância Dos Fitoestrógenos Presentes Na Soja, Para A Saúde Humana. São Paulo: Jaguariúna, 2006.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA Polinização pode aumentar em 17% a produção de canola. Rio Grande do Sul, 2015.

FLAMBÓ, Diana A. L. P. **Atividades Biológicas dos Flavonoides: Atividade Antimicrobiana**. Tese (Mestrado em Farmácia), Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa 2013.

GONÇALVEZ, Any. E. S. S. **Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonoides e vitamina C**. Dissertação (mestrado), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2008.

HENEMAN, Karrie. Some Facts About Flavonols. **Nutrition and Health Info-Sheet For Health Professionals**, Departamento de Nutrição, University of California, 2008.

LIANDA Regina L. P. **Perfil de Substâncias Fenólicas de Méis Brasileiros Por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Avaliação do Potencial Antioxidante**. Tese (Doutorado em química), Departamento de Química, Universidade Federal Rural Do Rio De Janeiro, 2009.

LOPES, Renato M.; OLIVEIRA Tânia T.; NAGEM Tanus J.; PINTO Aloísio S.: Flavonoides. **Revista Biotecnologia ciência & Desenvolvimento**, 2000.

MARCHINI, Luís C.; MORETI, Augusta C.C.C.; NETO, Sinval S. Características físico-químicas de amostras de mel e desenvolvimento de enxames de *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera, Apidae), em cinco diferentes espécies de Eucaliptos. **Sistema Eletrônico de Revistas-SER**, Vol. 21, No.1, 2003.

MARTELLI, Felipe; NUNES, Francis. Radicais livres: em busca do equilíbrio. **Ciência e Cultura**, Vol.66, No. 3, São Paulo, set. 2014.

MATOS Dirceu J.; DE NEGRI José D.; DE FIGUEIREDO José O.; POMPEO Jorgino J. CITROS: Principais informações e recomendações de cultivo. **Boletim Técnico 200 (IAC)**. 17 mar. 2005.

NASCIMENTO, Eduardo T.; MALUF Raquel P.; GUIMARÃES Rosimeire A.; CASTELLANI Maria A. Diversidade de abelhas visitantes das flores de Citrus em pomares de laranja e tangerina. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Vol. 33, No.1, p.111-117, mar. 2011.

OLIVEIRA, Alane C.; VALENTIM Iara B.; GOULART Marília F.; SILVA Cicero A.; BECHARA Etelvino H.; TREVISAN Maria S.; Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, Vol. 32, No. 3, 689-702, 2009.

REZENDE Julio D.; NETO, Antonio J.; FREITAS Kality D.; COSTA José M.; Inovação em processos apícolas: A experiência de um apicultor do Sítio Cacimbinha no município de Rafael Godeiro-RN. In: XXXV ENCONTRO NACIONAL DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO, Fortaleza, 2015.

SANTOS, Leisiane M.B. **Caracterização química das substâncias fenólicas de diferentes coberturas florestais**. Tese (Mestrado em Produção Vegetal), Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darci Ribeiro, fev. 2010.

SILVA, Ana Claudia L. **Tipificação de méis brasileiros por micro-extração em fase sólida combinada com cromatografia gasosa**. Tese (Doutorado em Química Analítica). Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, dez. 2006.

SILVA, Ludércia C.R.C. **Desenvolvimento de estratégias analíticas para a determinação de flavanonas e psoraleno por CLAE/DAD em sucos de laranjas de diferentes procedências**. Tese (Pós- Graduação em Química), Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Jul. 2009.

SILVA, Roberto A. **Apicultura**. Disponível em: <www.seab.pr.gov.br>. Acesso em: 31 ago. 2016.

SILVA Robson A.; MAIA Geraldo A.; SOUZA Paulo M.; COSTA José C. Composição e propriedades terapêuticas do mel de abelha. **Alimentos e Nutrição Araraquará**, Vol.17, No.1, p.113-120, 2006 .

SUAREZ Jose M. A.; TULIPANI Sara; ROMANDINI Stefania; VIDAL Alexis; BATTINO Maurizio;. Methodological Aspects about Determination of Phenolic Compounds and In Vitro Evaluation of Antioxidant Capacity in the Honey: A Review. *Current Analytical Chemistry*, Vol.5, p. 293-302, 2009.

TOLEDO, Vagner A.; TAKASUSUKI Maria C.; BAITALA Tatiane V.; MAIA Fabiana N.; PEREIRA Heber L.; HALAK André L.; CHAMBÓ Emerson D.; SOUZA Darcler T.; Polinização por abelhas (*Apis mellifera* L.) em laranjeira (*Citrus sinensis* L. Osbeck). **Scientia Agraria Paranaensis-SAP**, Vol.12, No.4, p.236-246,2013.

TRIPOLI, Elisa.. GUARDIA Maurizio L.;GIAMMANCO Santo; MAJO Danila D.; GIAMMANCO Marco. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. **Food Chemistry**, Vol.104,No2, p.466-479, 2007.

VITTI, Maurício R.; DE ROSSI Andrea; RUFATTO Léo; VISENTIN Milton; Martha H.G Época e intensidade de florescimento da laranja valência enxertada sobre dois porta-enxertos de acordo com a distribuição pelos quadrantes em três ciclos produtivos. **Revista Brasileira de Agrociência**, Vol. 9, No.4, p.343-346, 2003.

WITTER, Sidia; SILVA Patricia N.;BLOCHTEIN Betina. **As abelhas na polinização da canola** . Porto Alegre: Editora EDIPUCRS, 2014.