

Espectroscopia UV e Imagens Digitais para Estimar a Capacidade Antioxidante e o Conteúdo de Prolina em Méis de Abelhas Nativas

UV Spectroscopy and Digital Image to Estimate the Antioxidant Capacity and Proline Content of Honeys Produced by Native Bees

Maidelen Del Carmen Lozano Guerrero,^a Marina Duarte Fernandes de Souza Lima,^a Camila Acorone,^a Eliane Sloboda Rigobello,^b Patrícia Valderrama,^{b,*} Yohandra Reyes Torres^{a, #}

^a Universidade Estadual do Centro Oeste, Departamento de Química, CEP 85040-080, Guarapuava-PR, Brasil;

^b Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Via Rosalina Maria Dos Santos 1233, CEP 87301-899 Campo Mourão-PR, Brasil

*E-mail: patriciav@utfpr.edu.br
yohandra@unicentro.br

Recebido em: 12 de Setembro de 2022

Aceito em: 15 de Março de 2023

Publicado online: 26 de Abril de 2023

The honey produced by the stingless bees has been used by indigenous communities in Brazil as a nutritional and medicinal source. In accordance with this traditional knowledge, anti-inflammatory, antiviral, healing, and antioxidant properties have been recently described for this natural product. Despite its widely use, there is no specific quality control regulation for this peculiar honey; therefore, its quality is verified by taking into consideration the parameters already standardized to the honey produced by *Apis mellifera* bees. Among other parameters, antioxidant activity, phenolic and proline contents are tested for quality control following analytical protocols via spectrophotometric methods. Although simple, these methods involve several steps and the use of organic reagents and solvents, then causing some analyst exposure and environmental impact. Looking for environment-friendly methods to estimate important parameters for the quality control of honeys, in the current research, we investigated the application of multivariate calibration models to indirectly estimate the antioxidant capacity and total amino acid content of honeys produced by stingless bees. Then, partial least squares regression (PLS) was applied to UV spectra and digital images of honeys as predictive variables to predict the target properties. The PLS models showed coefficients of calibration and prediction $R^2 > 0.7$ and errors of the same magnitude in both the calibration and validation sets of honey samples, indicating that PLS models are robust and have a good prediction capacity of the study properties. In other words, it is possible to predict accurately the antioxidant capacity and proline content of honeys produced by stingless bees by a simple acquisition of a UV spectrum or a digital photo. Additionally, the information reported in this paper on the antioxidant capacity and proline content of stingless bee honey contributes to the knowledge of the properties of this honey and supports the need to develop adequate technical regulation for this type of honey.

Keywords: Stingless bees; antioxidant capacity; honey; PLS models.

1. Introdução

As abelhas *meliponinas*, também conhecidas como abelhas nativas, indígenas, ou abelhas sem ferrão, produzem um mel muito apreciado por consumidores naturalistas por ser um produto de sabor suave e menos adocicado que o mel de *Apis mellifera*. Esse mel, conhecido como mel de abelhas sem ferrão, tem sido tradicionalmente utilizado por comunidades indígenas como adoçante e como fonte nutricional e medicinal.^{1,2} Além de açúcares, o mel contém outros nutrientes em quantidades traços como vitaminas, proteínas, enzimas, minerais, compostos fenólicos, ácidos orgânicos, aminoácidos livres e carotenoides²⁻⁴ que lhe conferem propriedades benéficas, tais como, antimicrobianas, antissépticas, anticancerígenas, anti-inflamatórias, antivirais, cicatrizantes e antioxidantes.² A composição fitoquímica do mel pode variar de acordo com sua origem botânica, espécie de abelha, origem geográfica e condições climáticas do local da produção.^{2,4}

No que se refere ao mel de *Apis mellifera*, a norma Codex Alimentarius (CODEX STAN 12-1981) estandardizou entre seus parâmetros de qualidade que o mel deve ter um teor de umidade não maior que 20%, a soma do conteúdo de frutose e glicose não inferior a 60 g/100 g, conteúdo de sacarose não maior que 5 g/100 g, conteúdo de sólidos insolúveis em água não maior de 0,1 g/100 g, acidez livre não maior a 50 miliequivalentes ácido/kg e teor de hidroximetilfurfural (HMF) não superior a 40 mg/kg (para méis de países de origem tropical o teor de HMF não deve ser superior a 80 mg/kg).⁵

O mel das abelhas sem ferrão não está incluído na lista de produtos naturais controlados

pelas normas internacionais de controle de qualidade de alimentos, mas artigos científicos indicam divergência entre os parâmetros físico-químicos do mel de *Apis mellifera* e mel de nativas, o que torna necessário uma maior ênfase na determinação de parâmetros de qualidade desse mel buscando informação e segurança para o consumidor. Por exemplo, diversos estudos demonstram que o mel de abelha sem ferrão tipicamente contém um teor de umidade maior que 20 %, superior ao estabelecido pela norma Codex Alimentarius e legislação brasileira.³ Abid Nordin *et al.*⁶ revelaram um teor de umidade de 30% em mel de abelha sem ferrão das espécies *Trigona itama* e *Trigona thorasica*; Bajaree Chuttong⁷ reportou valores que variaram entre 25 e 47 %; Lemos *et al.*⁸ encontraram teor de umidade médio de 35,11% em méis da região amazônica produzidos por *M. flavolineata*. Teores de umidade que variaram de 23,1 a 43,5% foram reportados por Biluca *et al.*,⁹ em trinta e três amostras de méis de abelhas sem ferrão do estado de Santa Catarina, Brasil. Santos do Nascimento *et al.*¹⁰ avaliaram o teor de umidade para mel de abelhas sem ferrão do município de Guaraqueçaba, Paraná, Brasil. Os resultados mostraram que o mel da espécie *Melipona Bicolor* apresentou um teor de umidade de 25,99% enquanto o da espécie *Melipona quadrifasciata* apresentou um teor de umidade de 36,89%, o que indica que o teor de umidade para mel de abelhas sem ferrão tende a ser maior se comparado ao mel de *Apis mellifera*.

Outro parâmetro de qualidade em que o mel de abelhas sem ferrão diverge do de *Apis mellifera* é o conteúdo de frutose e glicose, que somados não deve ser inferior a 60 g/100 g de mel. Estudo realizado por Ooi *et al.*,¹¹ que avaliou o conteúdo de açúcar para mel de abelhas sem ferrão da espécie *Trigona itama*, encontrou valores de frutose de $19,39 \pm 0,01$ g/100 g e de glicose $14,03 \pm 0,03$ g/100 g. Outro estudo realizado por Abid Nordin *et al.*⁶ reportou valores médios de frutose de 28,6 g/100 g e de glicose de 32,0 g/100 g em mel das espécies *Trigona itama* e *Trigona thorasica*.

Em relação à acidez livre, Lemos *et al.*,⁸ que avaliaram parâmetros físico-químicos e constituintes inorgânicos em méis da região amazônica de quatro espécies diferentes de abelhas (*Scaptotrigona sp.*, *M. fasciculata*, *M. flavolineata* e *A. mellifera*), encontraram um alto valor de acidez para a maioria dos méis *M. flavolineata* (acidez média de 143,67 meq/kg) e *Scaptotrigona sp.* (acidez média de 60,98 meq/kg), não atendendo o valor estabelecido pela legislação brasileira para o mel de *Apis mellifera*.³

A maior umidade e acidez do mel de abelha sem ferrão resulta numa maior suscetibilidade para sua fermentação e deterioração. Por outro lado, ao não dispor de uma normativa que regulamente os requisitos mínimos de qualidade do mel de abelhas sem ferrão, ele é fatível de adulteração, muitas vezes por adição de xaropes e melados, aumentando assim o teor de sacarose nesse produto, bem como alterando sua composição mineral e fitoquímica.

Em decorrência os consumidores não tem a garantia da autenticidade dos méis adquiridos.¹² A adulteração junto com seu menor tempo de prateleira alteram as propriedades nutracêuticas do mel, diminuindo sua concentração de produtos bioativos.

Entre as propriedades benéficas do mel temos seu poder antioxidante; que é a capacidade de reduzir ou retardar a ação deletéria de radicais livres nocivos no corpo.¹³ Em nossa pesquisa na literatura encontramos diferentes métodos químicos para a determinação da capacidade antioxidante em méis, dentre os que se destacam, o método pela inibição do radical estável DPPH e o método pela redução do íon férrico (FRAP). O teor do aminoácido prolina é usado como critério para medir o conteúdo de aminoácido livre totais¹⁴ e é um indicador da autenticidade do mel.

Análises rotineiras de atividade antioxidante e teores de compostos bioativos, são usualmente realizadas através de ensaios espectrofotométricos que utilizam reagentes caros, solventes orgânicos e que resultam em certo grau de exposição insalubre para o analista, ademais de gerar resíduos contaminantes ao meio ambiente. Na busca por uma metodologia ambientalmente amigável, que minimize os gastos com procedimentos analíticos e a redução na utilização dos solventes orgânicos, métodos indiretos e rápidos foram procurados como alternativas aos métodos analíticos tradicionais. Dessa forma, nesta pesquisa foram desenvolvidos modelos de calibração multivariada, baseados em espectros UV e imagem digital combinando a ferramenta quimiométrica de mínimos quadrados parciais (PLS), para a estimar a capacidade antioxidante e o teor de prolina em méis das abelhas sem ferrão.

Estratégias similares, principalmente utilizando modelagem por PLS, tem sido aplicada a méis de *Apis mellifera* com propósitos diferentes, como por exemplo, a identificação da origem botânica ou geográfica, detecção de adulteração, predição de propriedades físico-químicas, etc. Valinger *et al.*¹⁶ investigaram o potencial de UV-NIS e NIR associado a modelagem por PLS e por redes neurais (ANN) para a detecção de adulteração e predição de teor de umidade, condutividade, cor, teor de fenólicos e atividade antioxidante FRAP de méis de Acácia puros e adulterados da província de Krapina-Zagorje na Croácia.

Em outro estudo, Tahir *et al.*¹⁷ aplicaram espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier e refletância total atenuada (FTIR-ATR) e espectroscopia Raman combinada a PLS para estimar o teor de fenólicos totais e a atividade antioxidante de méis Sudaneses. Escuredo *et al.*¹⁸ aplicaram NIR e regressão modificada dos mínimos quadrados para obter modelos de calibração para estimar teores de fenólicos, flavonoides, vitamina C, cobre e atividade antioxidante de méis do noroeste da península ibérica.

No entanto, o nosso estudo é o primeiro a aplicar esse enfoque para estimar propriedades de méis de abelhas sem ferrão, bem como, realizar a estimativa do ter de prolina a partir de espectros UV e de imagens digitais dos méis.

2. Experimental

2.1. Amostras do mel

Neste trabalho foram analisadas 94 amostras do mel de abelhas sem ferrão, de 16 espécies distintas e oriundas de 21 municípios de quatro estados do Brasil. As amostras codificadas do número 1 ao 89 foram coletadas em diferentes épocas ao longo dos anos de 2014 a 2018, e as amostras 90 - 95 foram coletadas no ano de 2021 e cedidas pelo professor João Marcelo da Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO). Todas as amostras de mel foram preservadas em freezer até o momento de serem utilizadas para análise (Tabela 1).

2.2. Determinação da capacidade antioxidante

2.2.1. Ensaio DPPH

Foi preparada uma solução de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazina, 99,9%, Sigma-Aldrich®, Darmstadt, Alemanha) na concentração de 1,3 mM em metanol (CH₃OH, P.A Química Moderna Barueri-SP, Brasil). Aproximadamente 1 g de cada amostra de mel foram adicionados 10 mL de água deionizada e a solução homogeneizada em vórtex (KASVI basic Campina São José do Pinhais-PR, Brasil) por 10 min. Desta solução foram retirados 100 µL e misturados com 150 µL de solução de DPPH e 2750 µL de metanol. A mistura foi homogeneizada com ajuda de um vórtex, protegida da luz com papel alumínio e estocada no escuro a temperatura ambiente por 25 minutos. Após esse tempo, a absorbância das soluções foi medida em comprimento de onda de 517 nm com um espectrofotômetro UV-Vis (UV-1800, Shimadzu® Quioto, Japão) contra um branco de metanol. A solução controle para leitura da absorbância inicial foi constituída de 100 µL de água deionizada, 150 µL de a solução de DPPH e 2750 µL de metanol. A capacidade antioxidante de cada mel foi expressa em porcentagem de inibição do DPPH calculada pela seguinte equação:

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

sendo: I (%): porcentagem de inibição; A_{controle} : absorbância da solução controle, A_{amostra} : absorbância na presença da amostra.

A capacidade antioxidante de cada mel também foi expressa em termos de equivalente de quercetina e equivalentes de ácido ascórbico. Para tal, foram elaboradas curvas analíticas com cada antioxidante padrão, quercetina (98%, Sigma-Aldrich®, Darmstadt, Alemanha) e ácido ascórbico (99,9%, F. Maia®, Belo Horizonte, Brasil), ambas soluções na concentração de 1000 µg/mL em 10 mL de metanol (CH₃OH, P.A Barueri-SP, Brasil). As soluções padrão de quercetina foram preparadas nas concentrações de 50, 40, 20, 10, 5, 1 µg/mL, e as de ácido ascórbico de 80, 50, 40, 20, 10, 5 µg/mL. As absorbâncias para estas

curvas foram lidas nas mesmas condições descritas para as amostras de mel.

2.2.2. Ensaio FRAP

A solução do reagente FRAP foi preparada diariamente pela mistura de 25 mL de solução tampão de acetato 0,3 M, com 2,5 mL de uma solução 10 mM de TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina, 99%, Sigma-Aldrich®, San Luis, USA), e 2,5 mL de uma solução aquosa de cloreto férrico 20 mM (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil) segundo a metodologia de Rufino *et al.*¹⁹

Amostras de 0,2 g de cada mel foram diluídas em 1,0 mL de água deionizada e homogeneizadas durante 5 minutos em vórtex. Em seguida, uma alíquota de 100 µL da solução do mel foi misturada com 400 µL da solução do reagente FRAP e 2500 µL de água deionizada para completar um volume de 3 mL. As misturas foram homogeneizadas em vórtex e protegidas da luz com papel alumínio em banho Maria à temperatura de 37 °C durante 10 minutos. Na sequência, a mistura foi transferida para uma cubeta de quartzo e analisada em espectrômetro UV-Vis (Shimadzu® UV-1800) no comprimento de onda de 593 nm. O branco foi preparado com 100 µL de água deionizada, 400 µL de solução do reagente FRAP e mais 2500 µL de água deionizada.

Foi construída uma curva de calibração de sulfato ferroso heptahidratado nas concentrações 100, 300, 500, 700, 900, 1.100, 1.300, 1.500 µM as quais foram obtidas pela diluição de uma solução estoque de 2 mM de sulfato ferroso heptahidratado (FeSO₄ .7H₂O, 99,0 %, Sigma-Aldrich®, India). O ensaio foi realizado misturando 100 µL de cada uma das soluções padrão, 400 µL da solução do reagente FRAP, e 2500 µL de água deionizada. Cada mistura foi homogeneizada em vórtex e mantida em banho-Maria a 37 °C. Após 10 minutos, a solução obtida foi transferida para uma cubeta de quartzo e a absorbância foi medida no comprimento de onda de 593 nm. Os resultados foram calculados em função da massa inicial do mel e expressados em µmol/100 g do mel. Todas as medidas foram realizadas em triplicatas.

2.3. Determinação de teor de aminoácidos totais

O teor de aminoácidos totais em amostras de mel, expresso como equivalente de prolina, foi determinado segundo a metodologia descrita por Truzzi *et al.*,¹⁴ com algumas modificações. Primeiramente foram construídas curvas analíticas utilizando como aminoácido padrão a prolina (C₅H₉NO₂, 98%, Sigma-Aldrich®, Japão), nas concentrações 50, 40, 30, 20, 15, 10, 5 mg/L em água deionizada. As soluções padrão foram preparadas a partir de uma solução estoque de 50 mg/L. A uma alíquota de 0,5 mL de cada solução padrão foram adicionados 0,25 mL de ácido fórmico P.A (Synth, Diadema SP, Brasil) e 1,0 mL de ninidrina (CRQ, Diadema-SP, Brasil) (3% em etilenoglicol (Synth, Diadema SP, Brasil). A mistura foi homogeneizada durante 1 minuto em vórtex, em seguida colocada em banho

Maria fervente por 15 minutos e posteriormente resfriada durante 5 minutos em banho de água de resfriamento a uma temperatura 22 °C. Na sequência adicionaram-se 5,0 mL de 2-propanol (1:1) e após nova homogeneização em vórtex durante 1 minuto, a solução foi transferida para uma cubeta de quartzo. A absorbância foi medida a 520 nm em espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu® UV- 1800). A solução utilizada como branco foi preparada com 0,5 mL de água deionizada, 0,25 mL de ácido fórmico, 1,0 mL de ninidrina e 5,0 mL de 2-propanol (1:1).

O procedimento descrito para a análise das soluções padrão de prolina foi repetido para a determinação de aminoácidos nas amostras de mel. Para tal, aproximadamente 0,62±0,1 g de cada amostra foram dissolvidos em 12,5 mL de água deionizada e homogeneizados durante 5 minutos em vórtex. Após transcorrido esse tempo foi tomada uma alíquota de 0,5 mL da solução de mel e misturada com 0,25 mL de ácido fórmico e 1,0 mL de ninidrina (3% em etilenoglicol). As etapas de homogeneização acima descritas foram repetidas e a absorbância (A2) foi medida a 520 nm em espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu® UV- 1800).

Para determinar o sinal dos interferentes, que podem conferir cor às soluções dos méis, tomou-se uma alíquota de 0,5 mL da solução de cada mel, 2,0 mL de água deionizada e o procedimento descrito foi executado na íntegra com exceção da adição de ácido fórmico e ninidrina. Para estas análises todas as soluções foram preparadas em triplicatas e a absorbância (A1) foi medida a 520 nm em espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu® UV- 1800). O valor A1 foi subtraído do valor A2 e o valor resultante foi interpolado na curva analítica do aminoácido padrão prolina.

2.4. Aquisição e tratamento das imagens digitais das amostras de méis

As imagens digitais foram obtidas segundo a metodologia descrita por Turco *et al.*,²⁰ e utilizando um celular iPhone 8 plus com resolução full HD 1920 x 1080 pixels. As imagens das amostras de méis foram recortadas digitalmente utilizando o software livre editor de imagens Gimp® V.2.10.4. Utilizou-se um tamanho padrão de 409 pixels de largura por 870 pixels de altura de modo a excluir as bordas e deixando somente a cor da amostra de mel. O processo foi realizado em triplicata para todas as amostras do mel.

As imagens foram transformadas para o sistema RGB utilizando o software de licença livre ChesmStat® V2, obtendo-se uma matriz (**X**) de dados composta por 264 linhas, sendo uma para cada amostra, e 768 colunas que corresponde a 256 canais para R, G e B dispostos lado a lado.

2.5. Obtenção dos espectros UV das amostras do mel

Para a obtenção dos dados espectrais preparou-se uma solução com 700 µL do mel em 50 mL de água deionizada. A solução foi homogeneizada em vórtex durante 10 minutos. A mistura foi então transferida para uma cubeta de quartzo

para a obtenção dos espectros de varredura das amostras nas regiões espectrais de 220 a 400 nm em um espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu® UV-1800). Utilizou-se como branco água deionizada. Todas as amostras foram lidas em triplicatas.

2.6. Análise estatística

Para investigar a influência do fator espécie de abelha foi realizada uma análise de variância ANOVA de um fator com nível de significância de 0,05 (5%) seguido de um teste de Tukey para a comparação de média por média dos softwares Minitab e Statistica. Foi aplicado o teste de coeficiente de correlação de Pearson (r) no nível de significância de 0,05, para estimar a correlação entre os conjuntos de dados obtidos nos ensaios DPPH, FRAP e o ensaio de prolina, utilizando o software Statistica. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas e expressos em valores médios e o desvio padrão (DP).

2.6.1. Modelos PLS

Com o objetivo de encontrar uma correlação entre uma matriz (**X**) contendo as imagens digitais e os espectros UV de cada amostra do mel e com o vetor (**y**) contendo os valores obtidos em cada ensaio de referência (FRAP, DPPH e prolina) empregou-se a calibração multivariada através da regressão por mínimos quadrados parciais (PLS). Para tanto foi utilizado o software Matlab versão R2007b (The MathWorks Inc., Natick, EUA) e o pacote computacional PLS-Toolbox versão 5.2 (Eigenvector Technologies, Manson, Washington).

Os espectros UV tiveram a linha base corrigida através do algoritmo baseline, incluso no pacote PLS Toolbox 5.2. Um total de 2/3 das amostras de mel foram utilizadas para construir os modelos de calibração e 1/3 das amostras foram utilizadas para realizar a validação externa dos modelos. A distribuição das amostras entre os conjuntos de calibração e de validação foi realizada utilizando-se do algoritmo de Kennard-Stone.²¹

A otimização e desempenho dos modelos PLS foram verificadas com base a os dados obtidos nos parâmetros de méritos como a exatidão representada pelos valores de RMSEC (Raiz quadrada do erro médio quadrático de calibração), RMSEP (raiz quadrada do erro médio quadrático de validação externa), coeficiente de correlação, RPDcal (desvio de predição residual para a calibração), RPDval (desvio de predição residual para a validação), inverso da sensibilidade analítica, limites de detecção e quantificação.²²⁻²³

3. Resultados e Discussão

3.1. Resultados de ensaio da capacidade antioxidante (DPPH e FRAP) e conteúdo de prolina

Os resultados obtidos nos ensaios de DPPH e FRAP são uma estimativa da capacidade antioxidante das amostras de mel, enquanto o conteúdo de aminoácidos no mel,

especialmente de prolina, é um indicativo da pureza e qualidade do mel. A análise de variância ANOVA (Tabela 1) indicou que a espécie de abelha que produz o mel é um fator que influencia sua qualidade.

A capacidade de inibir o radical DPPH variou significativamente entre méis produzidos por abelhas de espécies diferentes ($p = 0,0008$) e o teste de Tukey evidenciou que o mel da espécie *Tetragona clavipes* apresentou diferenças significativas (p -valor calculado $< 0,05$) nesse parâmetro se comparado aos méis de *Melipona quadrifasciata*, *Scaptotrigona bipunctata* e *Scaptotrigona postica*. Da mesma forma, o mel da espécie *Tetragonisca angustula* apresentou diferenças significativas (p -valor calculado $< 0,05$) na % de Inibição do DPPH quando comparado aos méis das espécies *Scaptotrigona bipunctata* e *Scaptotrigona postica*.

Em relação aos resultados obtidos no ensaio FRAP, o teste de ANOVA apresentou que existem diferenças significativas entre os méis de espécies de abelhas diferentes com um p valor $0,042 < 0,05$. Também foi aplicado um teste Tukey, o qual não mostrou entre quais espécies existe diferença, devido à proximidade que existe entre os p valor obtidos no teste de ANOVA.

O teste ANOVA de um fator para os resultados de prolina indicou que há diferenças significativas entre os teores de prolina dos méis produzidos por diferentes espécies de abelhas sem ferrão (p -valor $0,04 < 0,05$) o que sugere que nos méis analisados a espécie de abelha influenciou os níveis de concentração de prolina. Um estudo realizado por Menezes *et al.*,²⁴ que avaliou a qualidade de méis de abelhas africanizadas e sem ferrão nativas do nordeste do estado do Pará, reportou que os méis de *Apis mellifera*, *Melipona fasciculata* e *Melipona flavolineata* mostraram-se diferentes entre si em quase todas os parâmetros físico-químicos.

Os resultados de equivalente de ácido ascórbico e quercetina (ensaio DPPH) (Tabela 1) apresentaram valores máximos e mínimos que variam de 6,12 a 36,49 mg ácido ascórbico/100 g e de 0,3 a 30,89 mg quercetina/100 g nas amostras de mel, respectivamente. A espécie *Tetragonisca angustula*, apresentou o máximo valor em equivalente de ácido ascórbico e quercetina e, portanto, o melhor potencial antioxidante.

Biluca *et al.*²⁵ relataram valores de equivalentes de ácido ascórbico entre 0,8 a 28,2 mg /100 g em méis de abelhas sem ferrão (*Meliponinae*). Adicionalmente, no estudo de Sousa *et al.*,²⁶ com méis de espécies de abelhas sem ferrão da região semiárida do Nordeste brasileiro, esses valores variaram entre 4,3 a 23,6 mg /100 g e os valores equivalentes de quercetina entre 1,6 a 10,8 mg/100 g. Por sua parte, Duarte *et al.*²⁷ revelaram valores de atividade antioxidante em equivalente de quercetina de 0,30-8,85 mg/100g para espécie *Melipona scutellaris*, e para as espécies *Melipona quadrifasciata*, *Melipona subnitida* e *Plebeia spp* variaram entre 6,32-15,00, 5,66-6,79 e 5,09-17,60 mg/100 g, respectivamente.

Os resultados da análise do poder redutor férrico (FRAP) foram expressos em equivalente de FeSO_4 (Tabela 1) e variaram entre 10,07 a 519,33 $\mu\text{mol Fe}^{2+}$ /100 g. Um estudo de Biluca *et al.*,²⁵ com amostras de mel de abelhas sem ferrão *Meliponinae* encontrou valores para a capacidade de redução no ensaio FRAP que variaram entre 67,5 a 734,5 $\mu\text{mol Fe}^{2+}$ /100 g. Em outro trabalho de Biluca *et al.*,⁹ foi relatado valores de 61,1 $\mu\text{mol Fe}^{2+}$ /100g para o mel da espécie abelha *Melipona bicolor* e 624 $\mu\text{mol Fe}^{2+}$ /100 g para o mel da espécie *Melipona Marginata*. Shamsudin *et al.*²⁸ também analisaram mel de abelha sem ferrão da espécie *Heterotrigona itama* e encontraram valores que variam entre 77,8 e 164,88 $\mu\text{mol Fe}^{2+}$ /100g. É possível concluir que méis de espécies distintas de abelha sem ferrão apresentam alta variabilidade em seu poder antioxidante.

O teor de prolina nos méis estudados variou de 9,78 e 565,5 mg/kg (Tabela 1). A *Harmonised methods of the international honey Commission*²⁹ estabelece que o conteúdo de prolina em mel de *Apis mellifera* não deve ser inferior a 180 mg/kg. No entanto, De Sousa *et al.*³⁰ revelaram teor de prolina que variou de 4,6 a 20,5 mg/kg em méis abelhas sem ferrão do semiárido brasileiro. Outro estudo com amostras de mel tanto de abelha com ferrão e sem ferrão do estado do Pará na região Amazônica relatou um teor de prolina de 6,00 a 130,00 mg/kg.³¹ Por sua parte estudo realizado por Mokaya *et al.*³² relatou um teor de prolina em mel da espécie *Meliponula togoensis* de 379 mg/kg.

Dessa forma, verifica-se a partir dos resultados do nosso trabalho e de dados reportados na literatura a alta variabilidade do teor de prolina nos méis de abelha sem ferrão, inclusive em algumas amostras abaixo do limite de quantificação. Ademais cerca de 50% das amostras de mel analisadas não satisfazem a normativa da *Harmonised methods of the international honey Commission*²⁹ em relação ao teor mínimo de prolina em mel. No entanto, como mencionado anteriormente essa regulamentação foi estabelecida para o mel de *Apis mellifera*, portanto, o teor de prolina em amostras de mel de abelhas nativas deve ser verificado e relacionado com a espécie produtora e região de origem, uma vez que, o conteúdo de prolina está vinculado também com a fonte floral e a quantidade de pólen presente no mel.³²

Adicionalmente, neste trabalho foi investigada a possível correlação entre os ensaios de referência utilizados para o mel de abelhas nativas. O coeficiente de correlação de Pearson foi avaliado de acordo a critério descrito por Figueiredo e Silva,³³ onde um valor de r entre $0,10 < r < 0,30$ indica uma correlação fraca; $0,40 < r < 0,60$ correlação moderada; $0,70 < r < 1$ correlação forte. Os resultados apresentaram uma correlação linear significativa de moderada a forte entre a capacidade antioxidante do mel de abelhas sem ferrão, determinada pelo método DPPH e a determinada pelo método FRAP com $r = 0,68$ ($p = 0,000$). Já os resultados para a concentração de prolina não tiveram correlação significativa com a atividade antioxidante segundo o método DPPH ($r = 0,190$, $p_{\text{valor}} = 0,325$) ou o método FRAP ($r = 0,226$, p_{valor}

Tabela 1. Código das amostras de mel, espécie de abelha produtora, origem geográfica e resultados obtidos nos ensaios de referência^a

Amostras	Abelha produtora	Origem geográfica		% de inibição	DPPH		FRAP	Aminoácidos PE
		Estado	Município		QE	AAE		
1	<i>Tetragonisca angustula</i>	Rondônia	Ariquemes	20,76±3,09	16,51±2,81	22,67±2,74	456,67±42,28	217,99±16,15
2	<i>Tetragonisca angustula</i>	Rondônia	Ariquemes	16,50±0,86	13,06±0,81	19,52±0,79	304,67±33,06	109,71±4,85
3	<i>Tetragonisca angustula</i>	Rondônia	Ariquemes	13,60±2,70	10,26±2,52	16,72±2,46	189,41±23,37	193,58±11,10
4	<i>Tetragonisca angustula</i>	Rondônia	Ariquemes	18,94±2,25	16,82±2,31	23,85±2,26	339,09±12,91	234,00±9,17
5	<i>Tetragonisca angustula</i>	Rondônia	Cacoal	13,48±3,07	9,32±2,63	15,26±2,58	90,41±13,54	243,50±17,52
6	<i>Tetragonisca angustula</i>	Rondônia	Cacoal	13,70±2,02	11,31±2,06	18,38±2,01	84,04±3,36	261,64±11,46
7	<i>Tetragonisca weyrauchi</i>	Rondônia	Ariquemes	25,56±1,43	19,83±1,23	25,59±1,21	304,80±18,62	356,49±24,31
8	<i>Tetragonisca weyrauchi</i>	Rondônia	Ariquemes	12,63±0,94	9,69±0,91	16,41±0,89	147,40±5,71	276,41±14,63
9	<i>Tetragonisca weyrauchi</i>	Rondônia	Ariquemes	14,33±0,55	11,25±0,52	17,89±0,51	154,41±3,69	253,43±2,42
10	<i>Tetragonisca angustula</i>	Paraná	Marialva	22,78±3,73	18,51±3,43	24,69±3,35	323,07±6,88	154,94±11,96
11	<i>Tetragonisca angustula</i>	Paraná	Marialva	19,90±3,37	16,17±3,15	22,52±3,08	364,54±65,19	202,93±3,85
12	<i>Tetragonisca angustula</i>	Paraná	Jussara	29,19±4,61	22,89±3,97	28,56±3,88	486,31±20,73	270,26±18,23
13	<i>Tetragonisca angustula</i>	Paraná	Marechal Candido Rondon	17,95±2,29	13,44±2,00	19,43±1,96	271,12±6,97	140,07±1,46
14	<i>Tetragonisca angustula</i>	Paraná	Guaraqueçaba	10,39±1,64	6,52±1,37	12,38±1,34	138,22±16,99	n. d.
15	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Paraná	Guaraqueçaba	10,60±1,98	6,67±1,65	12,50±1,62	154,58± 9,37	n. d.
16	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Paraná	Guaraqueçaba	10,50±2,14	6,54±1,77	12,34±1,73	418,32±25,55	n. d.
17	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Paraná	São José dos Pinhais	18,99±0,88	13,98±0,75	19,80±0,74	331,21±32,61	n. d.
18	<i>Melipona bicolor schencki</i>	Paraná	São José dos Pinhais	6,69±0,49	-	-	282,14±29,23	176,31±10,19
19	<i>Tetragonisca angustula</i>	Paraná	Floresta	21,94±0,33	17,10±0,30	23,07±0,29	255,32±51,90	195,46±8,10
20	<i>Tetragonisca angustula</i>	Paraná	Tuneiras	17,96±3,84	14,07±3,52	20,33±3,44	211,74±21,08	108,21±2,52
21	<i>Tetragonisca angustula</i>	Paraná	Ponta Grossa	13,99±3,11	9,98±2,73	16,05±2,67	269,47±4,02	94,77±1,33
22	<i>Tetragonisca angustula</i>	Paraná	Perobal	37,89±3,85	30,89±3,37	36,49±3,29	519,33±9,92	218,83±3,50
23	<i>Tetragonisca angustula</i>	Paraná	Pérola	12,22±1,45	8,17±1,24	14,08±1,21	165,03±15,98	144,98±9,17
24	<i>Tetragonisca angustula</i>	Paraná	Pérola	16,76±0,63	10,59±0,47	15,72±0,46	342,69±26,58	565,53±34,29
25	<i>Tetragonisca angustula</i>	Paraná	Cambará	11,38±1,39	8,33±1,32	14,96±1,29	209,78±20,25	236,57±8,67
26	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Paraná	Cambará	8,20±1,61	4,73±1,36	10,70±1,33	119,28±13,23	390,50±9,55
27	<i>Tetragonisca angustula</i>	Paraná	Mandirituba	4,13±2,22	1,30±1,90	7,39±1,85	100,20±9,70	n. d.
28	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Paraná	Mandirituba	7,21±1,80	4,21±1,65	10,69±1,61	172,34±4,58	362,98±37,29
29	<i>Tetragonisca angustula</i>	Paraná	Mandirituba	19,21±1,52	15,05±1,38	21,22±1,35	224,64±5,94	269,42±14,04
30	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Paraná	Mandirituba	5,18±1,71	2,14±1,43	8,08±1,40	66,06±1,79	52,61±6,88
31	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Paraná	Mandirituba	10,31±1,84	6,68±1,60	12,75±1,56	118,28±21,28	n. d.
32	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Paraná	Mandirituba	11,80±1,50	7,60±1,24	13,36±1,21	190,40±6,77	216,30±30,45
33	<i>Tetragonisca angustula</i>	Paraná	Ortigueira	11,44±2,59	7,38±2,16	13,20±2,11	49,89±4,81	n. d.
34	<i>Scaptotrigona Bipunctata</i>	Paraná	Maringá	13,12±1,22	8,97±1,04	14,89±1,02	302,59±36,91	257,92±15,66
35	<i>Tetragonisca angustula</i>	Paraná	Nova Tebas	12,46±2,27	9,67±2,23	16,50±2,18	257,21±46,69	373,97±16,87
36	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Paraná	Maringá	7,99±2,64	4,74±2,33	10,97±2,27	148,00±4,82	116,16±3,68
37	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Paraná	Maringá	18,96±1,64	13,94±1,39	19,75±1,36	249,27±8,47	383,25±16,91
38	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Paraná	Maringá	10,71±1,82	6,88±1,55	12,82±1,51	122,94±9,75	131,10±3,67
39	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Paraná	Maringá	16,06±2,26	11,39±1,91	17,21±1,87	254,03±4,83	441,32±7,75
40	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Paraná	Maringá	6,56±2,78	3,35±2,35	9,34±2,30	189,96±8,47	550,35±11,05
41	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Paraná	Maringá	16,96±2,13	12,23±1,81	18,08±1,77	210,95±6,56	326,21±16,85
42	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Paraná	Maringá	4,30±0,90	1,43±0,76	7,47±0,74	125,90±13,77	79,97±5,02
43	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Paraná	Maringá	8,78±3,19	5,26±2,72	11,26±2,66	261,74±59,68	n. d.
44	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Paraná	Maringá	2,97±0,42	0,30±0,34	6,12±0,34	228,47±8,43	90,48±3,93
45	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Paraná	Maringá	4,49±0,73	1,50±0,58	7,19±0,57	147,45±6,60	49,24±2,57
46	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Paraná	Maringá	3,78±1,06	1,11±1,01	7,88±0,98	168,78±5,34	81,00±11,59
47	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Paraná	Maringá	8,31±1,93	4,72±1,59	10,55±1,56	228,19±15,35	131,34±11,57

Tabela 1. Código das amostras de mel, espécie de abelha produtora, origem geográfica e resultados obtidos nos ensaios de referência^a (cont.)

Amostras	Abelha produtora	Origem geográfica		DPPH			FRAP	Aminoácidos PE
		Estado	Município	% de inibição	QE	AAE		
48	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Paraná	Maringá	19,44±3,82	13,91±3,16	19,54±3,09	128,90±6,15	n. d.
49	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Paraná	Maringá	13,27±1,65	8,83±1,36	14,57±1,33	137,08±4,55	n. d.
50	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Paraná	Maringá	15,25±0,86	10,77±0,74	16,65±0,72	112,70±9,99	n. d.
51	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Paraná	Maringá	15,01±2,78	10,38±2,33	16,15±2,27	107,29±3,28	n. d.
52	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Paraná	Maringá	21,36±4,16	15,50±3,43	21,09±3,36	158,25±7,96	15,00±3,92
53	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Paraná	Maringá	14,35±2,53	9,66±2,08	15,35±2,04	145,82±4,71	378,30±53,82
54	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Paraná	Maringá	21,04±1,92	15,21±1,59	20,79±1,55	133,00±10,29	n. d.
55	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Paraná	Maringá	16,14±3,90	11,07±3,19	16,70±3,12	201,41±19,22	221,13±15,52
56	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Paraná	Maringá	19,20±0,36	13,06±0,28	18,41±0,27	214,51±21,21	180,46±7,90
57	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Paraná	Maringá	13,22±1,20	8,24±0,93	13,62±0,91	88,62±6,24	n. d.
58	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Paraná	Maringá	13,71±3,76	9,29±3,14	15,09±3,07	130,66±4,59	27,15±7,77
59	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Paraná	Maringá	15,37±0,61	10,62±0,51	16,35±0,50	192,16±20,98	n. d.
60	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Paraná	Maringá	16,83±2,95	12,08±2,51	17,91±2,45	260,94±14,28	175,98±28,75
61	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Paraná	Maringá	15,47±2,24	11,32±1,97	17,38±1,92	149,31±6,60	57,96±10,42
62	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Paraná	Maringá	13,21±0,80	9,87±0,75	16,34±0,73	163,50±9,88	182,98±7,89
63	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Paraná	Maringá	10,74±1,53	6,83±1,29	12,72±1,26	193,81±14,24	218,23±9,78
64	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Paraná	Maringá	12,10±1,32	7,54±1,05	13,07±1,03	134,63±1,64	124,93±9,37
65	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Paraná	Maringá	16,89±1,40	12,70±1,24	18,80±1,21	206,56±14,32	265,35±10,43
66	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Paraná	Maringá	17,39±0,92	12,85±0,80	18,81±0,79	206,43±31,17	386,51±18,74
67	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Paraná	Maringá	13,91±1,62	9,97±1,43	16,08±1,39	106,94±11,83	277,34±13,03
68	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Paraná	Maringá	15,02±1,59	11,18±1,43	17,40±1,40	137,97±18,40	246,97±13,03
69	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Paraná	Maringá	17,64±1,89	12,65±1,59	18,41±1,56	178,02±17,95	312,71±11,74
70	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Paraná	Maringá	12,20±1,01	8,17±0,86	14,11±0,84	98,51±6,14	314,05±10,51
71	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Paraná	Maringá	19,56±4,66	15,17±4,17	21,26±4,07	171,74±14,97	264,10±9,15
72	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Paraná	Maringá	15,78±1,93	12,55±1,84	19,12±1,80	214,77±9,11	328,39±5,42
73	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Paraná	Maringá	17,69±1,22	13,88±1,12	20,17±1,10	233,26±29,27	128,85±9,40
74	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Paraná	Maringá	13,65±1,05	10,54±1,00	17,16±0,98	119,82±13,62	326,20±11,95
75	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Paraná	Maringá	14,80±1,37	10,29±1,16	16,11±1,13	224,31±11,90	256,69±24,19
76	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Paraná	Maringá	14,44±2,05	9,57±1,66	15,17±1,62	159,67±26,97	193,94±6,88
77	<i>Scaptotrigona postica</i>	Paraná	Maringá	5,05±0,92	2,13±0,80	8,31±0,78	111,41±0,98	87,82±2,41
78	<i>Scaptotrigona postica</i>	Paraná	Maringá	3,59±1,32	0,82±1,10	6,78±1,07	115,25±5,45	n. d.
79	<i>Tetragonisca angustula</i>	Paraná	Maringá	21,99±1,05	17,24±0,93	23,25±0,91	188,39±17,01	145,14±30,97
80	<i>Tetragonisca angustula</i>	Paraná	São Lourenço	18,01±3,36	14,80±3,23	21,37±3,16	131,67±8,60	120,92±16,89
81	<i>Tetragonisca angustula</i>	Paraná	São Lourenço	23,99±1,61	19,24±1,45	25,28±1,42	191,69±21,73	102,15±6,89
82	<i>Tetragonisca angustula</i>	Paraná	Foz do Iguaçu	16,43±0,66	11,16±0,53	16,70±0,52	153,06±7,87	46,52±3,97
83	<i>Tetragonisca angustula</i>	Paraná	Santa Helena	21,05±2,77	15,57±2,34	21,29±2,29	243,91±19,82	156,08±11,75
84	<i>Tetragonisca angustula</i>	Paraná	Guaraqueçaba	13,12±2,38	8,43±1,91	14,00±1,87	160,99±4,75	n. d.
85	<i>Melipona marginata</i>	Paraná	Guaraqueçaba	11,02±2,85	6,22±2,10	11,38±2,06	137,32±6,29	n. d.
86	<i>Tetragona clavipes</i>	Paraná	Guaraqueçaba	24,67±2,60	18,48±2,18	24,08±2,13	241,75±23,96	248,85±10,33
87	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Bahia	-	12,91±2,76	8,23±2,20	13,79±2,16	10,07±9,64	9,79±3,90
88	<i>Tetragona clavipes</i>	Goiás	-	30,34 ±1,77	23,50±1,50	29,06±1,47	349,20±1,66	521,68±16,02
89	<i>Tetragonisca angustula</i>	Paraná	Nova Tebas	28,29±2,32	21,52±1,95	27,06±1,90	243,62±11,86	294,52±19,86
90	<i>Melipona marginata</i>	Paraná	Guarapuava	-	-	-	180,76±8,78	52,64±3,91
91	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Paraná	Guarapuava	-	-	-	122,72±20,11	114,52±14,07
92	<i>Melipona mondury</i>	Paraná	Guarapuava	-	-	-	172,79±42,56	231,18±37,73
93	<i>Melipona bicolor schencki</i>	Paraná	Guarapuava	-	-	-	118,97±3,84	n. d.
94	<i>Tetragonisca angustula</i>	Paraná	Guarapuava	-	-	-	124,88±14,50	73,07±13,70

^a Ensaio DPPH: resultados expressos como porcentagem de inibição, equivalente de quercetina (mg Quercetina/100g) e equivalente ácido ascórbico (mg Ácido ascórbico/100g). Ensaio FRAP: resultados expressos como equivalente de FeSO₄ (μmol FeSO₄/100g). Aminoácidos totais: resultados expressos como equivalente de prolina (mg Prolina/kg). n.d. = não detectado, (-) dado indisponível.

de 0,192), sugerindo que a atividade antioxidante desses méis não está diretamente relacionada ao teor total de aminoácidos e que outras classes de compostos fitoquímicos bioativos como os compostos fenólicos devem influenciar em maior extensão essa atividade. Nesse sentido, nossos resultados se diferenciam dos reportados por Mokaya *et al.*,³² que estudaram mel de abelhas sem ferrão afrotropical (*Hymenoptera, Meliponini*) e relataram correlação moderada entre atividade de eliminação de radicais DPPH e o teor de prolina ($r = 0,486$). Também, Islam *et al.*³⁴ analisaram amostras de mel da espécie *Apis dorsata* em diferentes áreas de Bangladesh e os valores de prolina apresentaram correlação moderada com os resultados do ensaio DPPH ($r = 0,6430$) e FRAP ($r = 0,4730$). Outro estudo para mel de Burkina encontrou correlação forte entre o teor de prolina e a atividade sequestradora do radical DPPH ($r = 0,75$).³⁵

Possível correlação entre os resultados desses ensaios para méis de abelhas africanizadas e sem ferrão produzidos em Alagoas (Brasil) também foi investigada por Duarte *et al.*²⁷. Os pesquisadores encontraram uma correlação moderada entre os resultados do ensaio FRAP e do DPPH (expresso como ácido gálico $r = 0,584$ e expresso como quercetina $r = 0,568$). Adicionalmente, D'Oliveira Sant'Ana *et al.*,³⁶ que estudaram méis silvestres e de laranjeira, verificaram uma forte correlação entre os resultados de capacidade antioxidante dos ensaios FRAP e DPPH ($r \geq 0,75$; $p < 0,05$).

Por outro lado, Nayaka *et al.*³⁷ analisaram méis multiflorais da espécie de abelha *Apis cerana* coletados em três distritos da província de Bali, Indonésia: BH (Badung honey), KH (Karangasem honey) e SH (Singaraja honey). Para cada amostra de mel foi determinada a capacidade antioxidante pelos ensaios de DPPH e do FRAP e investigada a correlação entre os ensaios, sendo elevada para as amostras BH ($r = 0,996$) e SH ($r = 0,943$), mas moderada ($r = 0,454$) para as amostras KH.

3.2. Modelos PLS

Considerando a possibilidade de propor um método mais rápido, de menor custo, sem emprego de reagentes e solventes (uma vez que o modelo esteja estabelecido), e, portanto, sem a geração de resíduos que necessitem de descarte apropriado, realizou-se uma calibração multivariada dos espectros na região do UV e das imagens digitais em função dos resultados obtidos pelos métodos de referência. Ainda, devido ao número de variáveis contidas na faixa de comprimento de onda de 200 a 400 nm no espectro UV e no sistema RGB de imagens, são geradas matrizes com grande quantidade de variáveis. Assim, a análise multivariada a partir da regressão por PLS torna-se apropriada.

Para a construção dos modelos PLS para estimar a capacidade antioxidante expressa pelos resultados dos ensaios DPPH e FRAP foram consideradas 88 amostras (1 a 89, com exceção da amostra 18 que apresentou valores de equivalente de quercetina abaixo do limite de quantificação).

Nos modelos para a estimativa do teor de prolina empregou-se um total de 70 amostras (18 amostras apresentaram valores de prolina abaixo do limite de quantificação).

Antes da construção dos modelos por PLS, os dados espectroscópicos (Figura 1A) foram inspecionados na procura por espectros com comportamentos anômalos (outliers), que poderiam interferir na qualidade dos modelos PLS. A inspeção dos outliers (Figura 1B) indicou a presença de 9 espectros UV com anomalias. Essas amostras foram excluídas do conjunto de dados para a análise PLS. A Figura 1C apresenta os espectros UV das amostras de mel após a remoção dos outliers, com perfis mais homogêneos, e máximos de absorção entre 260 e 300 nm, com $I_{\text{máxima}}$ entorno de 290 nm.

Para estimativa da capacidade antioxidante em termos de equivalente de quercetina (ensaio DPPH) e equivalente FeSO_4 (ensaio FRAP), bem como, conteúdo de aminoácidos (ensaio prolina) foram construídos modelos PLS utilizando os espectros UV e as imagens das amostras de mel (Tabelas 2 e 3).

A exatidão dos modelos PLS foi avaliada considerando-se os valores de RMSEC e RMSEP. A proximidade dos valores RMSEC e RMSEP em todos os modelos indica que o número escolhido de variáveis latente foi adequado e não houve super ajuste ou falta de ajuste nos modelos.³⁸⁻³⁹

O ajuste dos modelos PLS é um outro indicativo de exatidão. O ajuste é representado por uma regressão linear entre os resultados de referência e os resultados previstos pelo modelo PLS.⁴⁰ Nas Figuras 4 e 5 os ajustes dos modelos PLS podem ser observados em relação às imagens digitais e aos espectros UV, enquanto os coeficientes de correlação são apresentados nas Tabelas 2 e 3. Os resultados alcançados foram da ordem de 0,7 e considerados satisfatórios devido à complexidade da composição química das matrizes de mel. Na calibração multivariada é comum encontrar valores de coeficiente de determinação em torno de 0,7, principalmente, quando o método de referência é laborioso.²²⁻²³ Além disso, resultados semelhantes foram obtidos por Valinger *et al.*,¹⁶ que correlacionaram por PLS dados espectroscópicos de UV-VIS de mel de acácia adulterada e sua atividade antioxidante medida pelo método FRAP.

A linearidade dos modelos PLS foi avaliada com base nos gráficos de resíduos, obtidos a partir dos valores preditos na calibração e validação (Figuras 4 e 5). A distribuição aleatória dos resíduos indica a linearidade nos modelos, ou seja, o modelo linear é adequado para modular a correlação entre os dados espectroscópicos de UV, bem como as imagens digitais, e as propriedades estudadas para as amostras mel.⁴⁰

O desvio de predição residual (RPD) relaciona-se à capacidade preditiva dos modelos e é obtido pela razão entre os desvios padrão dos valores de referência e o erro padrão de previsão.⁴¹ Neste estudo os valores de RPD foram calculados para os conjuntos de calibração e validação (Tabelas 2 e 3). Segundo a literatura,²³⁻⁴² os modelos com boa capacidade preditiva devem ter um valor de RPD

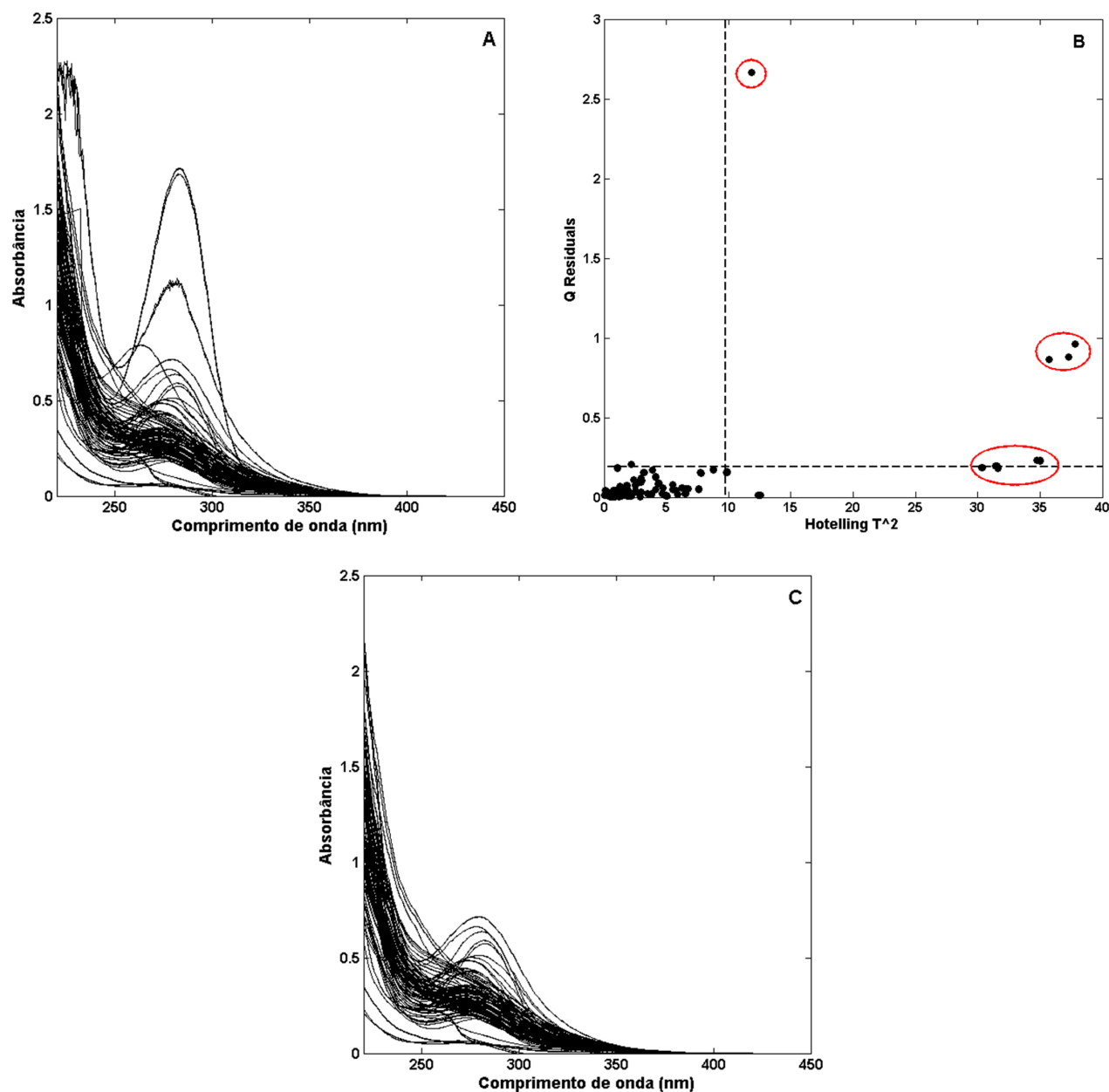


Figura 1. Espectro UV das amostras de mel antes da avaliação de outliers (A); avaliação de outliers (B); espectros de UV após a remoção de outliers (C)

Tabela 2. Parâmetros de Mérito para Modelos UV/PLS

Parâmetros de méritos		DPPH quercetina	FRAP	PROLINA
Faixa do modelo		0.0010 - 0.3300 mg/g de mel	0.0040 – 1.4730 mg Fe ²⁺ /g de mel	0.0050-0.6050 mg/g de mel
Número de variáveis latentes		14	8	16
Predição	RMSEC	0.0322	0.1469	0.0647
	RMSEP	0.0395	0.1593	0.0942
Coeficiente de correlação		0.72	0.70	0.73
RPDcal		1.5	1.7	1.2
RPDval		1.5	1.4	1.4
Inverso da sensibilidade analítica ⁻¹		0.0074	0.0029	0.0311
Limite de detenção		0.0244	0.0097	0.1027
Limite de quantificação		0.0740	0.0293	0.3112

Tabela 3. Parâmetros de Mérito para Modelos Imagem/PLS

Parâmetros de méritos		DPPH quercetina	FRAP	PROLINA
Faixa do modelo		0.0010 - 0.3300 mg/g de mel	0.0040 - 1.4730 mg Fe ²⁺ /g de mel	0.0050-0.6050 mg/g de mel
Número de variáveis latentes		6	3	8
Predição	RMSEC	0.0299	0.1263	0.0584
	RMSEP	0.0375	0.1398	0.0695
Coeficiente de correlação		0.74	0.79	0.78
RPDcal		1.1	1.5	0.9
RPDval		1.4	1.7	1.8
Inverso da sensibilidade analítica ⁻¹		0.0201	0.0566	0.0515
Limite de detenção		0.0663	0.1868	0.1700
Limite de quantificação		0.2008	0.5662	0.5150

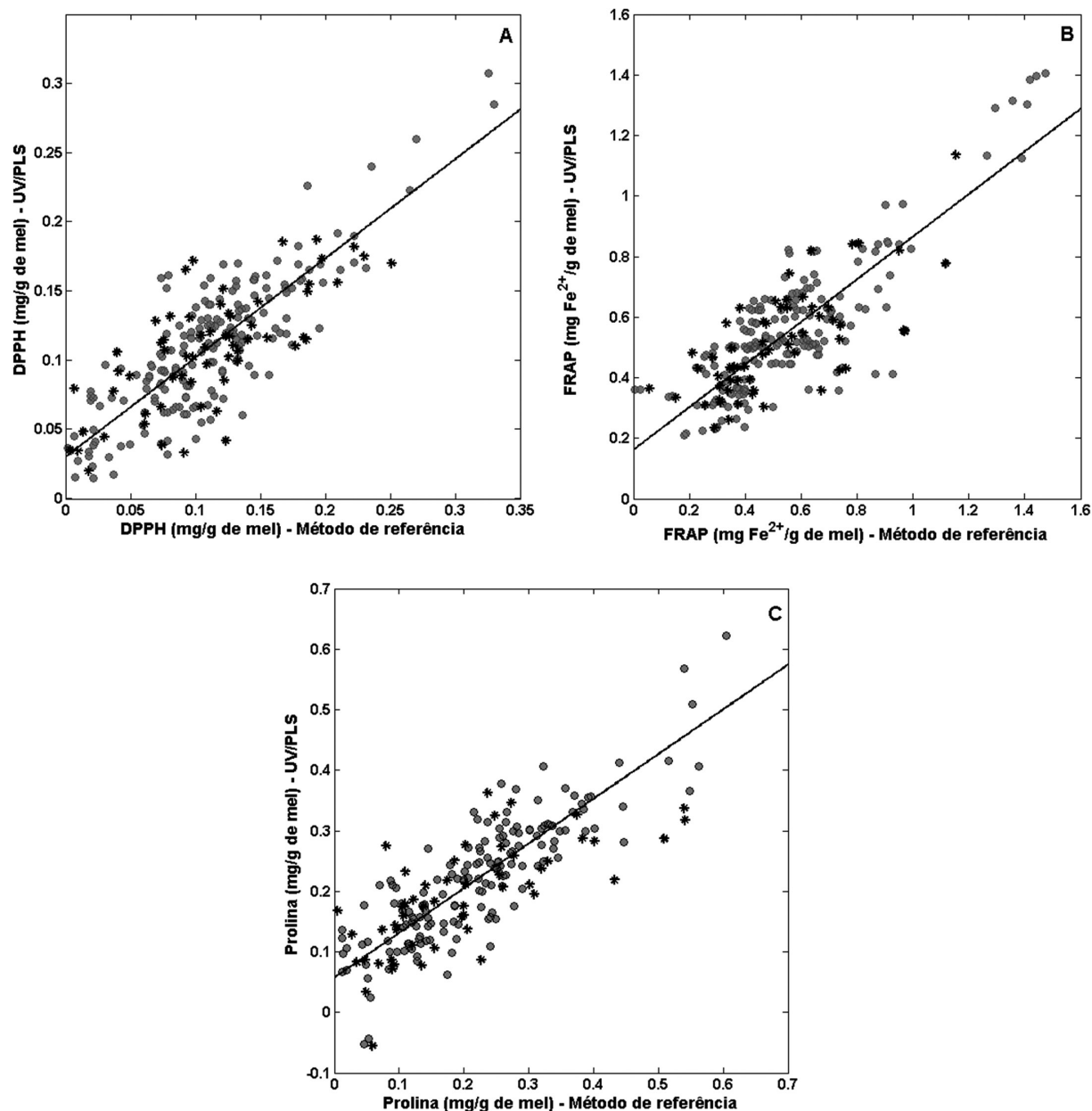


Figura 2. Ajuste para os modelos UV-PLS. (A) DPPH, (B) FRAP, (C) prolina. (•) amostras no conjunto de calibração; (*) amostras no conjunto de validação externa

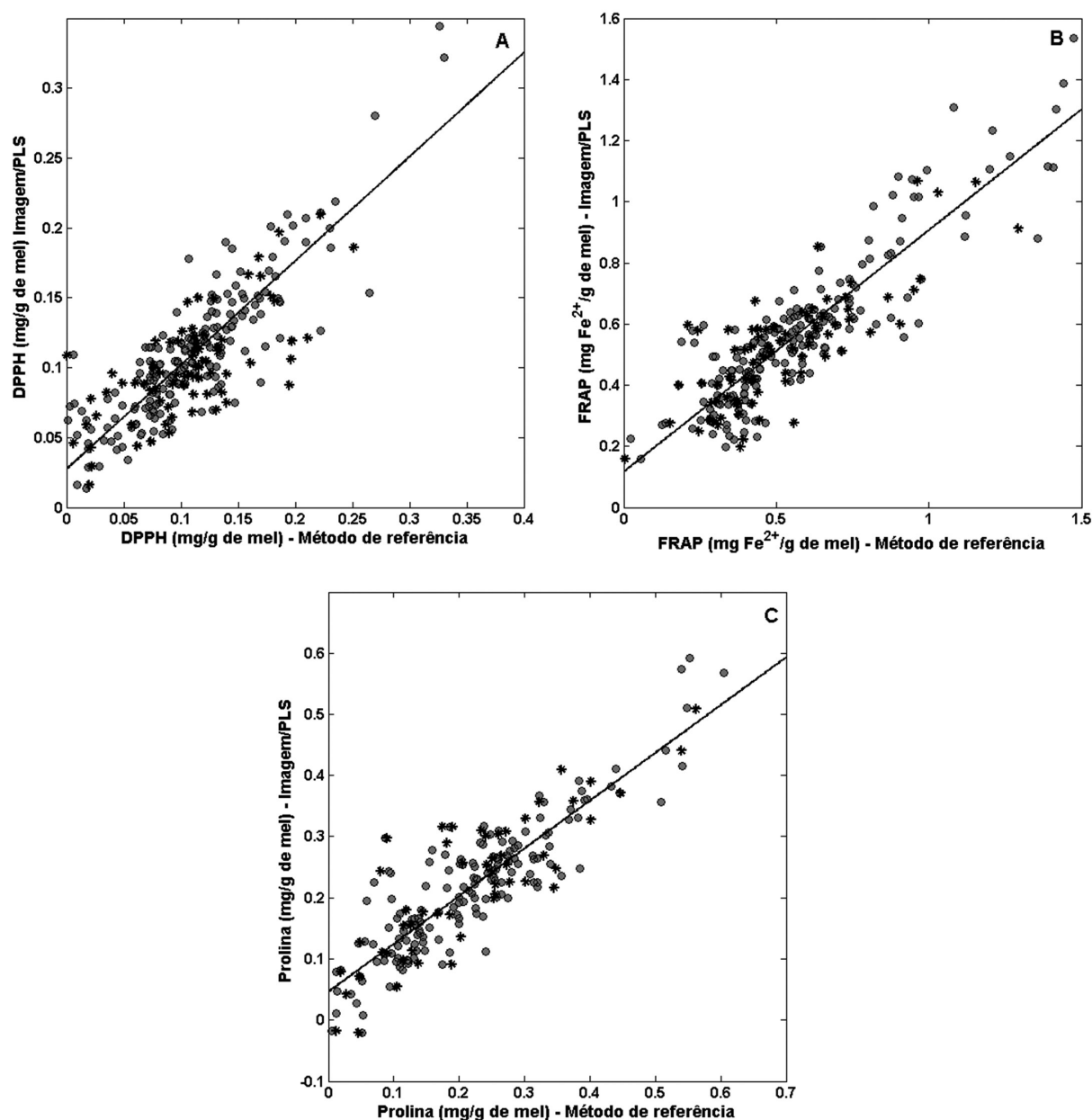


Figura 3. Ajuste para os modelos baseados em imagem-PLS. (A) DPPH, (B) FRAP, (C) prolina. (•) amostras no conjunto de calibração; (*) amostras no conjunto de validação externa

entre 2,4 e 1,5 para que sejam considerados satisfatórios. Em relação a essa figura de mérito, os modelos UV-PLS e imagem-PLS apresentam excelente capacidade preditiva da capacidade antioxidante dos méis de abelhas nativas. Por outro lado, em relação à predição da prolina, os modelos apresentaram capacidade inferior.

Entretanto, há de se ressaltar que dentre os ensaios de referência, a determinação de prolina é mais complexa, por envolver numerosas etapas de homogeneização, aquecimento, resfriamento, o que resulta em maior tempo de análise e maior probabilidade de erros durante sua realização. Além disso, é preciso ressaltar que os modelos incluem diferentes espécies de abelhas, bem como diferentes regiões de produção do mel e época de coleta, o que corrobora para um modelo mais

robusto, porém mais complexo. Nesse sentido, a obtenção de modelos multivariados que permitam a estimativa dessa propriedade no mel contribui significativamente para a diminuição de custos de análise, exposição do analista e impacto no meio ambiente.

O inverso da sensibilidade analítica (sensibilidade analítica⁻¹) é a razão entre a sensibilidade e o desvio padrão do ruído instrumental, e permite determinar a menor concentração distinguível pelos modelos PLS.¹⁹⁻³⁷ Nas Tabelas 2 e 3 são apresentados os resultados obtidos para a sensibilidade analítica⁻¹ para cada um dos modelos, os quais para os modelos UV-PLS foram 0,0074 mg/g, 0,0029 mg/g e 0,0311 mg/g para DPPH, FRAP e prolina, respectivamente. Por outro lado, os modelos baseados na

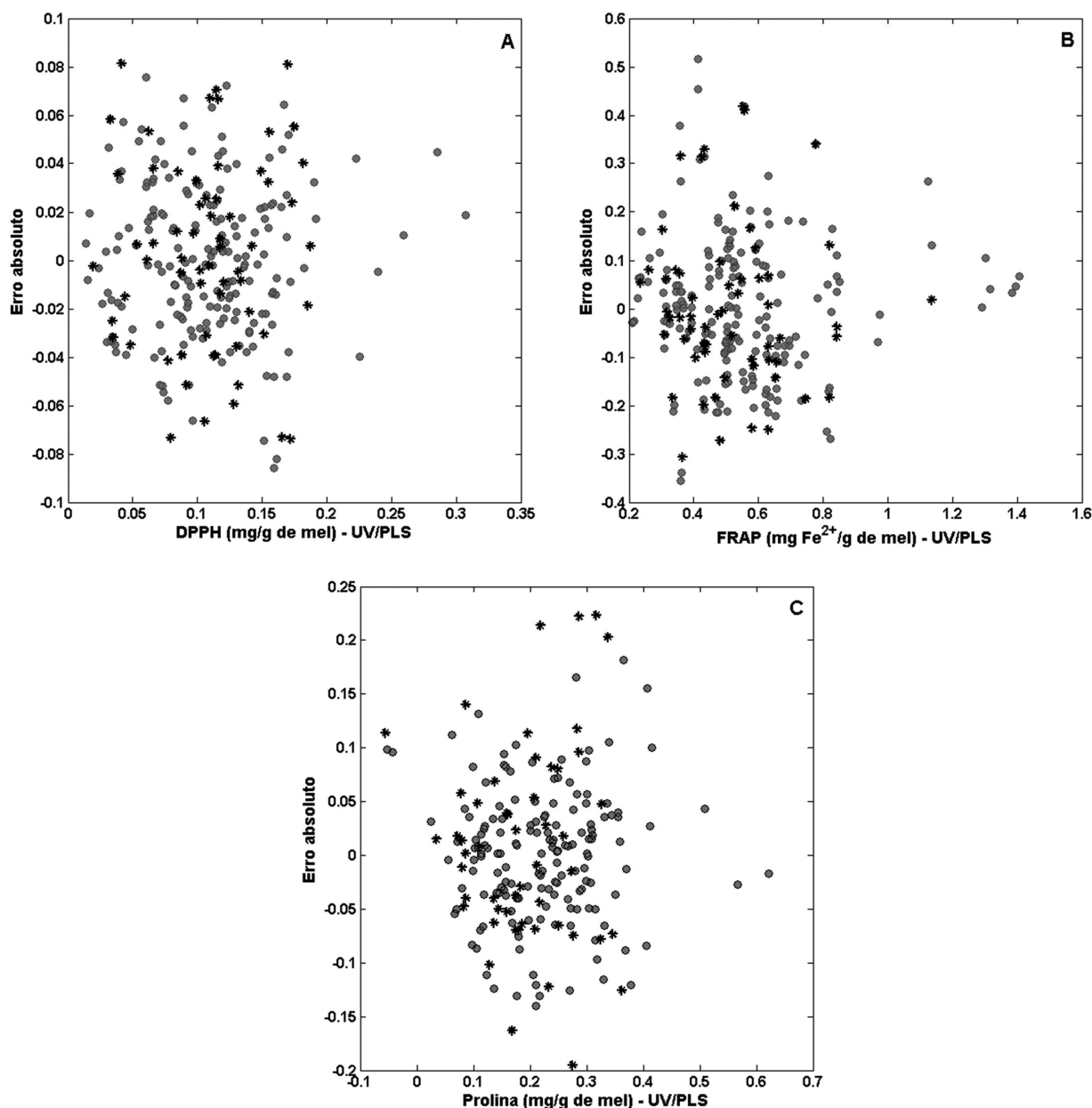


Figura 4. Resíduos para os modelos UV-PLS. (A) DPPH, (B) FRAP, (C) prolina. (•) amostras no conjunto de calibração; (*) amostras no conjunto de validação externa

imagem-PLS apresentaram resultados para o inverso da sensibilidade analítica um pouco superior: 0,0201 mg/g, 0,0566 mg/g e 0,0515 mg/g para DPPH, FRAP e prolina, respectivamente. Isso significa que os modelos baseados em imagem-PLS possuem uma capacidade inferior para a distinção de amostras com concentrações próximas.

O limite de detecção (LD) é a menor concentração que pode ser detectada, mais não precisamente quantificada, enquanto o limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração que pode ser quantificada com confiabilidade.⁴⁰ Os resultados alcançados com os modelos UV-PLS e baseados em imagem-PLS mostram resultados de LD e LQ satisfatórios, considerando-se as faixas modeladas para DPPH, FRAP e prolina.

4. Conclusões

Os modelos PLS modularam adequadamente a capacidade antioxidante obtida nos ensaios DPPH e FRAP, e o teor de aminoácidos totais, expresso como teor de prolina, em amostras de mel de abelhas sem ferrão.

As figuras de mérito obtidas indicam que os modelos apresentaram adequada capacidade de predição da capacidade antioxidante e do teor de prolina nos méis de abelha sem ferrão. Portanto, a ferramenta quimiométrica de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) é adequada como uma ferramenta auxiliar para estimar de forma rápida e indireta a capacidade antioxidante

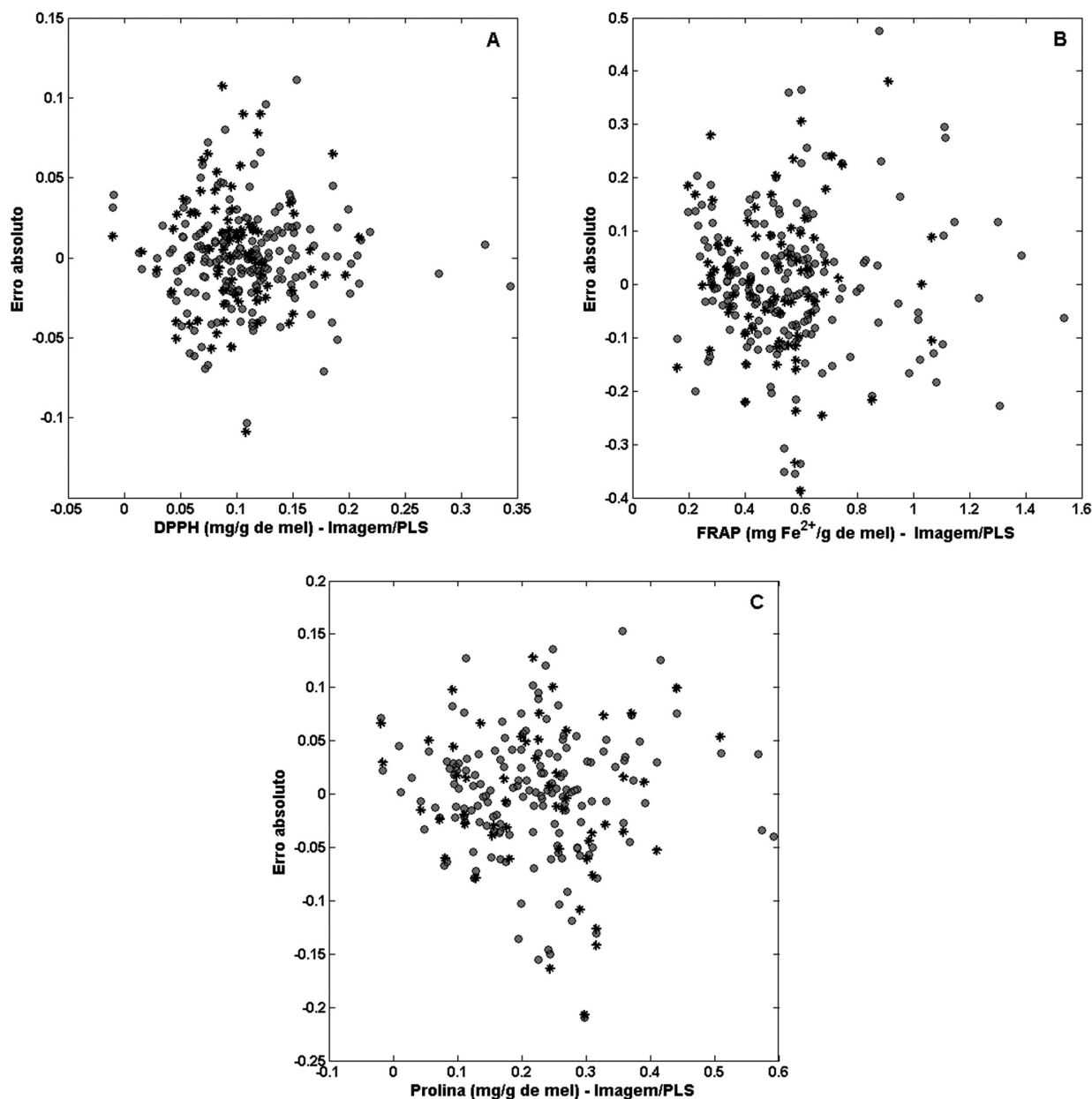


Figura 5. Resíduos para os modelos baseados em imagem-PLS. (A) DPPH, (B) FRAP, (C) prolina. (•) amostras no conjunto de calibração; (*) amostras no conjunto de validação externa

e teor de aminoácidos totais em méis de abelhas sem ferrão.

As informações compiladas sobre a capacidade antioxidante e teor de prolina dos méis de abelhas sem ferrão contribuem para o conhecimento das propriedades desses méis e esclarecimento quanto à necessidade de elaborar um regulamento técnico adequado para esse tipo de mel.

Agradecimentos

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Código de Financiamento 001); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

(CNPq, Códigos 407979/2018-2 e 306606/2020-8); Programa Institucional de Pesquisa Básica e Aplicada da Fundação Araucária (17/17FA); Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

Referências Bibliográficas

1. Domingos, S. C. B.; Clebis, V. H.; Nakazato, G.; De Oliveira, A. G.; Takayama, K. R. K.; Peruquetti, R. C.; Pereira, C. D.; Tielly, S. R. M.; Dos Santos, M. L.; Antibacterial activity of honeys from Amazonian stingless bees of *Melipona* spp. and its effects on bacterial cell morphology. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2021**, *101*, 2072. [[Crossref](#)]

2. Biluca, F. C.; Della, B. F.; De Oliveira, G. P.; Pereira, L. M.; Gonzaga, L. V.; Costa, A. C. O.; Fett, R.; 5-HMF and carbohydrates content in stingless bee honey by CE before and after thermal treatment. *Food Chemistry* **2014**, *159*, 244. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
3. Brasil; *Ministério Da Agricultura E Abastecimento, Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000* Regulamento técnico de identidade e qualidade do mel, 2000. [[Link](#)]
4. Do Nascimento, K. S.; Gasparotto, S. J. A.; Lauer, M. L. F.; Serna, G. C. V.; Pereira, De M. I. L.; Da Silva, A. E.; Granato, D.; Sattler, A.; De Almeida, M. L. B.; Phenolic compounds, antioxidant capacity and physicochemical properties of Brazilian *Apis mellifera* honeysc. *LWT - Food Science and Technology* **2018**, *91*, 85. [[Crossref](#)]
5. Hlavacek, R. J.; Codex alimentarius commission. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **1981**, *58*, 232. [[Crossref](#)]
6. Nordin, A.; Sainik, N. Q. A. V.; Chowdhury, S. R.; Saim, A. Bin; Idrus, R. B. H.; Physicochemical properties of stingless bee honey from around the globe: A comprehensive review. *Journal of Food Composition and Analysis* **2018**, *73*, 91. [[Crossref](#)]
7. Chuttong, B.; Chanbang, Y.; Sringarm, K.; Burgett, M.; Physicochemical profiles of stingless bee (Apidae: Meliponini) honey from South East Asia (Thailand). *Food Chemistry* **2016**, *192*, 149. [[PubMed](#)]
8. Lemos, M. S.; Venturieri, G. C.; Dantas, F. H. A.; Dantas, K. G. F.; Evaluation of the physicochemical parameters and inorganic constituents of honeys from the Amazon region. *Journal of Apicultural Research* **2018**, *57*, 135. [[Crossref](#)]
9. Biluca, F. C.; Braghini, F.; Gonzaga, L. V.; Costa, A. C. O.; Fett, R.; Physicochemical profiles, minerals and bioactive compounds of stingless bee honey (Meliponinae). *Journal of Food Composition and Analysis* **2016**, *50*, 61. [[Crossref](#)]
10. Do Nascimento, S. A.; Marchini, L. C.; De Carvalho, A. L. C.; Dias, A. F. D.; De Olinda, A. R.; Da Silveira, A. T.; Physical-Chemical Parameters of Honey of Stingless Bee (Hymenoptera: Apidae). *Chemical Science Journal* **2015**, *7*, 139. [[Crossref](#)]
11. Ooi, T. C.; Yaacob, M.; Rajab, N. F.; Shahar, S.; Sharif, R.; The stingless bee honey protects against hydrogen peroxide-induced oxidative damage and lipopolysaccharide-induced inflammation *in vitro*. *Saudi Journal of Biological Sciences* **2021**, *28*, 2987. [[Crossref](#)]
12. Sarmiento, S. T. M.; Dos Santos, P. F.; Evangelista, R. A.; Da Silva, E. M. S.; Da Silva, G. S.; De Novais, J. S.; Dos Santos, F. de A. R.; Camara, C. A.; Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaíra (*Melipona subnitida*) honey. *Journal of Food Composition and Analysis* **2013**, *29*, 10. [[Crossref](#)]
13. Frankel, S.; Robinson, G. E.; Berenbaum, M. R.; Antioxidant capacity and correlated characteristics of 14 unifloral honeys. *Journal of Apicultural Research* **1998**, *37*, 27. [[Crossref](#)]
14. Truzzi, C.; Annibaldi, A.; Illuminati, S.; Finale, C.; Scarponi, G.; Determination of proline in honey: Comparison between official methods, optimization and validation of the analytical methodology. *Food Chemistry* **2014**, *150*, 477. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
15. Brar, D. S.; Pant, K.; Krishnan, R.; Kaur, S.; Rasane, P.; Nanda, V.; Saxena, S.; Gautam, S.; A comprehensive review on unethical honey: Validation by emerging techniques. *Food Control* **2023**, *145*, 109482. [[Crossref](#)]
16. Valinger, D.; Longin, L.; Grbeš, F.; Benković, M.; Jurina, T.; Kljurić, G. J.; Tušek, A. J.; Detection of honey adulteration- The potential of UV-VIS and NIR spectroscopy coupled with multivariate analysis. *LWT-Food Science and Technology* **2021**, *145*, 111316. [[Crossref](#)]
17. Tahir, H. E.; Xiaobo, Z.; Zhihua, L.; Jiyong, S.; Zhai, X.; Wang, S.; Mariod, A. A.; Rapid prediction of phenolic compounds and antioxidant activity of Sudanese honey using Raman and Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy. *Food Chemistry* **2017**, *226*, 202. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
18. Escuredo, O.; Seijo, M. C.; Salvador, J.; González-Martín, M. I.; Near infrared spectroscopy for prediction of antioxidant compounds in the honey. *Food Chemistry* **2013**, *141*, 3409. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)].
19. Rufino, M. do S. M.; Alves, R. E.; Brito, E. S. de; Morais, S. M. de; Sampaio, C. de G.; Pérez-Jiménez, J.; Saura-Calixto, F. D.; FRAP Embrapa. *Comunicado Técnico*, 125 Embrapa **2006**, 3. [[Link](#)]
20. Turco, J. F.; do Nascimento, C. L.; De Lima, V. A.; Torres, Y. R.; Could antioxidant capacity and flavonoid content of ethanolic extracts of geopropolis from Brazilian native bees be estimated from digital photos and NIR Spectra? *Microchemical Journal* **2020**, *157*, 105031. [[Crossref](#)]
21. Kennard, R. W.; Stone, L. A.; Computer Aided Design of Experiments. *Technometrics* **1969**, *11*, 137. [[Crossref](#)]
22. Santos, D. A.; Lima, K. P.; Março, P. H.; Valderrama, P.; Vitamin C determination by ultraviolet spectroscopy and multiproduct calibration. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2016**, *27*, 1912. [[Crossref](#)]
23. Baqueta, M. R.; Coqueiro, A.; Março, P. H.; Valderrama, P.; Quality Control Parameters in the Roasted Coffee Industry: a Proposal by Using MicroNIR Spectroscopy and Multivariate Calibration. *Food Analytical Methods* **2020**, *13*, 50. [[Crossref](#)]
24. Menezes, B. do A. D.; Mattietto, R. de A.; Lourenço, L. de F. H.; Avaliação da Qualidade de Méis de Abelhas Africanizadas e Sem Ferrão Nativas do Nordeste do Estado do Pará. *Ciência Animal Brasileira* **2018**, *19*, 1. [[Crossref](#)].
25. Biluca, F. C.; da Silva, B.; Caon, T.; Mohr, E. T. B.; Vieira, G. N.; Gonzaga, L. V.; Vitali, L.; Micke, G.; Fett, R.; Dalmarco, E. M.; Costa, A. C. O.; Investigation of phenolic compounds, antioxidant and anti-inflammatory activities in stingless bee honey (Meliponinae). *Food Research International* **2019**, *129*, 108756. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
26. Sousa, J. M.; De Souza, E. L.; Marques, G.; Meireles, B.; De Magalhães Cordeiro, Â. T.; Gullón, B.; Pintado, M. M.; Magnani, M.; Polyphenolic profile and antioxidant and antibacterial activities of monofloral honeys produced by Meliponini in the Brazilian semiarid region. *Food Research International* **2016**, *84*, 61. [[Crossref](#)]
27. Duarte, A. W. F.; Dos Santos Vasconcelos, M. R.; De Menezes, A. P. D.; Da Silva, S. C.; Oda-Souza, M.; López, A. M. Q.; Composition and antioxidant activity of honey from Africanized

- and stingless bees in Alagoas (Brazil): A multivariate analysis. *Journal of Apicultural Research* **2012**, *51*, 23. [[Crossref](#)]
28. Shamsudin, S.; Selamat, J.; Abdul, S. M.; Ab Aziz, M. F.; Haque Akanda, M. J.; Antioxidant Properties and Characterization of Heterotrigona itama Honey from Various Botanical Origins according to their Polyphenol Compounds. *Journal of Food Quality* **2022**. [[Crossref](#)].
 29. Bogdanov, S.; Martin, P.; Lullmann, C.; Harmonised methods of the international honey commission. *Swiss Bee Research Centre, FAM, Liebefeld* **2002**, *5*, 1. [[Link](#)]
 30. De Sousa, J. M. B.; De Souza, E. L.; Marques, G.; Benassi, M. De T.; Gullón, B.; Pintado, M. M.; Magnani, M.; Sugar profile, physicochemical and sensory aspects of monofloral honeys produced by different stingless bee species in Brazilian semi-arid region. *LWT Food Science and Technology* **2016**, *65*, 645. [[Crossref](#)]
 31. Da Costa, I. F.; Toro, M. J. U.; Evaluation of the antioxidant capacity of bioactive compounds and determination of proline in honeys from Pará. *Journal of Food Science and Technology* **2021**, *58*, 1900. [[Crossref](#)].
 32. Mokaya, H. O.; Nkoba, K.; Ndunda, R. M.; Vereecken, N. J.; Characterization of honeys produced by sympatric species of Afrotropical stingless bees (Hymenoptera, Meliponini). *Food Chemistry* **2022**, *366*, 130597. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
 33. Figueiredo, F. D. B.; Da Silva, J. J. A.; Desvendando os mistérios do coeficiente de correlação de Pearson (r). *Revista Política Hoje* **2009**, *18*, 115. [[Link](#)]
 34. Islam, A.; Khalil, I.; Islam, N.; Moniruzzaman, M.; Mottalib, A.; Sulaiman, S. A.; Gan, S. H.; Physicochemical and antioxidant properties of Bangladeshi honeys stored for more than one year. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **2012**, *12*, 177. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
 35. Meda, A.; Lamien, C. E.; Romito, M.; Millogo, J.; Nacoulma, O. G.; Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry* **2005**, *91*, 571. [[Crossref](#)]
 36. D'Oliveira Sant'Ana, L.; Barbosa Salgueiro, F.; Mello, J. P. L. de S.; Nora Castro, R.; Pelachim Lianda, R. L.; *34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Brasil, **2010**.
 37. Nayaka, N. M. D. M. W.; Fidrianny, I.; Sukrasno; Hartati, R.; Singgih, M.; Antioxidant and antibacterial activities of multiflora honey extracts from the Indonesian Apis cerana bee. *Journal of Taibah University Medical Sciences* **2020**, *15*, 211. [[Crossref](#)]
 38. Pires, F. de C.; Pereira, R. G. F. A.; Baqueta, M. R.; Valderrama, P.; Da Rocha, A. R.; Near-infrared spectroscopy and multivariate calibration as an alternative to the Agtron to predict roasting degrees in coffee beans and ground coffees. *Food Chemistry* **2021**, *365*, 130471. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
 39. Baqueta, M. R.; Coqueiro, A.; Valderrama, P.; Brazilian Coffee Blends: A Simple and Fast Method by Near-Infrared Spectroscopy for the Determination of the Sensory Attributes Elicited in Professional Coffee Cupping. *Journal of Food Science* **2019**, *84*, 1247. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
 40. Valderrama, P.; Braga, J. W. B.; Poppi, R. J.; Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada. *Química Nova* **2009**, *32*, 1278. [[Crossref](#)]
 41. Damasceno, D.; Toledo, T. G.; Godinho, M. S.; Da Silva, C. P.; De Oliveira, S. B.; De Oliveira, A. E.; Análise multivariada de imagens na química: um experimento para determinação do pH de águas potáveis. *Química Nova* **2015**, *38*, 836. [[Crossref](#)]
 42. Botelho, B. G.; Mendes, B. A. P.; Sena, M. M.; Implementação de um método robusto para o controle fiscal de umidade em queijo minas artesanal. Abordagem metrológica multivariada. *Química Nova* **2013**, *36*, 1416. [[Crossref](#)]