


Análise Multivariada de Imagem Digital e Espectro UV de Méis de Abelhas Nativas para Estimar Teores Totais de Fenólicos e Flavonoides

Multivariate Analysis of Digital Images and UV Spectrum of Native Bee Honeys to Estimate Total Phenolic and Flavonoid Contents

Maidelen Del Carmen Lozano Guerrero,^a  Luiz Gustavo Barankievicz Martins,^a Camila Acorone,^a  Eliane Sloboda Rigobello,^b  Patrícia Valderrama,^{b,*}  Yohandra Reyes Torres^{a,*} 

^aUniversidade Estadual do Centro Oeste (UNICENTRO), Departamento de Química, CEP 85040-080, Guarapuava-PR, Brasil

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

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

Recebido: 4 de Dezembro de 2023

Aceito: 10 de Junho de 2024

Publicado online: 27 de Junho de 2024

Honey from stingless bees is widely consumed in tropical and subtropical regions of Brazil. However, few studies have been carried out aiming to address its quality standards regarding its physicochemical parameters, bioactive components, and nutritional and pharmacological potential. To contribute to the knowledge about these honeys, in this context, 87 honey samples from 16 species of stingless bees had their total phenolic content (TPC) and flavonoid content (FC) evaluated using the Folin Ciocalteu and AlCl₃ complexation spectrophotometric methods, respectively. Additionally, the applicability of multivariate calibration by Partial Least Squares (PLS) to estimate TPC and FC from UV spectra and digital imaging of honey samples without any pretreatment was investigated. This approach aims to enable a quick evaluation of these honeys without the use of chemical reagents or organic solvents, thus contributing to an environmentally friendly analytical protocol. The results demonstrated that the PLS models effectively represented the levels of total phenolics, expressed in terms of gallic acid equivalents, and flavonoid content, expressed in terms of quercetin equivalents, in stingless bee honey samples. Therefore, the chemometric approach of PLS regression proves to be a suitable and efficient tool to rapidly estimate TPC and FC in honey samples from various species of stingless bees and different geographic origins.

Keywords: Stingless bees; honey; phenolics; flavonoid; PLS models.

1. Introdução

O mel de abelha tem sido utilizado desde a antiguidade como fonte nutricional e medicinal, devido a suas diversas propriedades benéficas para a saúde como sua atividade antibacteriana, antiviral, antimicrobiana, anti-inflamatória e antioxidante.¹ O mel é constituído principalmente por açúcares como a glicose e a frutose, além de quantidades traço de outros compostos como ácidos orgânicos, enzimas, vitaminas, flavonoides e minerais, que contribuem para suas características como cor, odor e sabor.²

Compostos fenólicos e flavonoides também são encontrados no mel, sendo estes constituintes importantes para a aparência e propriedades nutracêuticas do mel.³ Esses compostos agem como potentes antioxidantes naturais e são amplamente distribuídos nas sementes, cascas, folhas e flores das plantas.⁴ Quando as abelhas coletam o néctar, os compostos bioativos são transferidos das plantas para o mel.⁴ Os compostos bioativos têm sido objeto de investigação devido aos seus potenciais benefícios e comprovados efeitos positivos em doenças crônicas, tais como doenças cardiovasculares, câncer, obesidade e diabetes.⁵

O mel mais consumido e também acerca do qual se tem mais estudos científicos é o da espécie de abelhas *Apis mellifera*. Entretanto, além das espécies *Apis* existem outros tipos de abelhas que também produzem mel, conhecidas como *meliponinas* ou abelhas sem ferrão. No Brasil existem catalogadas aproximadamente 196 espécies de abelhas nativas ou abelhas sem ferrão.⁶

De acordo ao *STANDARD FOR HONEY CODEX STAN 12-1981*,⁷ e a Instrução Normativa nº 11 do ano 2000,⁸ os parâmetros de qualidade do mel incluem o sabor, que é determinado pela quantidade e tipos de açúcares e ácidos presentes; a taxa de umidade, que indica a quantidade de água presente no mel e deve variar entre 16,8% a 20%; o teor de açúcares redutores que devem predominar no mel, sendo que para o mel floral seu teor deve ser de no mínimo 65 g/100 g, enquanto que para o mel de melato e sua mistura com mel floral deve ser no mínimo 60 g/100 g; e a taxa à qual a cristalização ocorre no mel, que depende da razão entre os conteúdos de glicose e água (G/A).

Entretanto, na literatura científica encontram-se reportados valores superiores de umidade para o mel de abelhas sem ferrão. Um estudo realizado por Abid Nordin *et al.*⁹ reportou teor de umidade de 30% em mel de abelha de *Trigona itama* e *Trigona thoracica*. Lemos *et al.*¹⁰ encontraram teor de umidade de 35,11% em méis produzidos por *Melipona flavolineata*. O estudo realizado por Biluca *et al.*,¹¹ para méis de abelhas sem ferrão do estado de Santa Catarina, Brasil, encontrou valores de umidade que variaram de 23,1 a 43,5%. Por outro lado, o estudo realizado por Theng Choon Ooi *et al.*¹² determinou valores de frutose de $19,39 \pm 0,01$ g/100 g e de glicose $14,03 \pm 0,03$ g/100 g para mel de abelhas da espécie *Trigona itama*. Dessa forma, verifica-se que as normas de qualidade descritas para o mel de abelhas sem ferrão, que apresenta uma maior variabilidade natural de suas propriedades físico-químicas. Ademais, a ausência de uma norma de controle de qualidade específica para o mel de abelhas sem ferrão tem como consequência a fácil adulteração. Geralmente, a adulteração de méis envolve a adição de glicose, xaropes, melados ou extratos de cana-de-açúcar comprometendo sua composição e propriedades físico-químicas, e gerando incerteza em relação à segurança no consumo desse mel.

Por outro lado, diversos estudos vêm reportando que o mel da abelha sem ferrão apresenta capacidade antioxidante que deriva da presença de compostos como ácido ascórbico, carotenoides, ácidos orgânicos, fenólicos e flavonoides. Os teores de fenólicos e de flavonóides em produtos naturais, como extratos de plantas ou alimentos como o mel, são usualmente determinados através de métodos espectrofotométricos. O ensaio com o reagente de Folin-Ciocalteu (Figura 1), que é composto por uma mistura de ácido fosfomolibdico e ácido fosfotúngstico, é o ensaio padrão para determinação de compostos fenólicos totais. No entanto, o mais correto seria entender os resultados do ensaio como uma medida da capacidade redutora da amostra, já que outros compostos de natureza não fenólica também reduzem o reagente de Folin-Ciocalteu em meio alcalino.¹³ A mudança do estado de oxidação do molibdênio e tungstênio torna a solução azul, permitindo a medição colorimétrica e a determinação da concentração dos compostos redutores, como os compostos fenólicos.¹⁴ Já a determinação de compostos flavonoides é realizada através do método que usa o cloreto de alumínio (AlCl_3), em que o cátion do alumínio em solução metanólica forma complexos estáveis com os flavonoides (Figura 2).¹⁵

Os solventes e reagentes químicos utilizados nesses ensaios apresentam algum grau de toxicidade ao ser humano e ao meio ambiente. Os ensaios envolvem várias etapas de manipulação com exposição do analista, bem como, alto consumo de tempo quando o número de amostras é elevado.

Recentemente, diversos autores têm relatado a aplicação de ferramentas quimiométricas como PLS para a identificação de origem botânica, origem geográfica

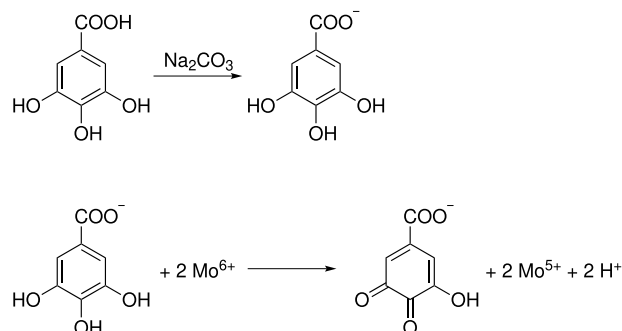


Figura 1. Reação redox do ácido gálico com íon molibdênio, componente do reagente de Folin - Ciocalteu

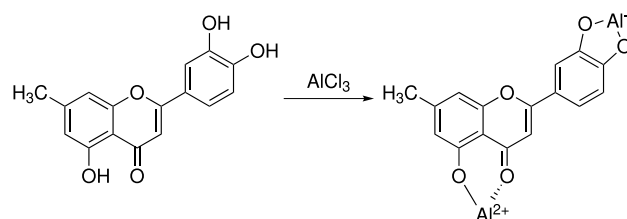


Figura 2. Reação de formação do complexo Flavonoide-Al

e para detecção de adulteração de amostras de mel. Valinger *et al.*¹⁶ commercially available sugar syrups with similar chemical composition. Adulterated honeys are frequently marked as natural and are valued in the same way as pure honeys and as a result, there is a growing need for rapid, simple, and accurate analytical methods to evaluate their characteristics and authenticity. In this work potential of UV-VIS and NIR spectroscopy coupled with PLS modelling and ANN modelling was analysed for the detection of adulteration and quantification of the physical and chemical properties of pure and adulterated honey samples. Acacia honey samples from Krapina-Zagorje County (Croatia estudaram amostras do mel de acácia puras e adulteradas utilizando espectroscopia UV-VIS-NIR para discriminar propriedades físico-químicas como teor de umidade, condutividade e a mudança total de cor utilizando modelagem por PLS. Kumaravelu e Gopal¹⁷ empregaram a técnica de espectroscopia de infravermelho próximo (NIR), juntamente com ferramentas quimiométricas, para detecção e previsão de adulterante no mel. Os modelos desenvolvidos apresentaram resultados satisfatórios concluindo que a implementação de ferramentas quimiométricas pode ser uma alternativa viável para garantir um melhor controle de qualidade na indústria de mel indiana.

Até onde se sabe, a utilização conjunta da espectroscopia UV e da imagem digital, juntamente com ferramentas quimiométricas como a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS), ainda não foi investigada para estimar teores de fenólicos e de flavonoides em amostras de méis de abelhas sem ferrão, embora esta abordagem já tenha sido reportada por nosso grupo de pesquisa como uma ferramenta eficiente para avaliar a capacidade antioxidante e o teor de prolina desses méis.¹⁸

No presente trabalho, investigou-se o uso da espectroscopia UV e de imagem digitais das amostras de mel combinado com calibração multivariada por PLS para gerar modelos preditivos que permitam determinar, de maneira indireta, rápida e sem o uso de reagentes químicos, os teores de compostos fenólicos totais e de flavonoides em amostras de méis de abelha sem ferrão oriundas de diferentes regiões do Brasil. Neste contexto, o método indireto consiste em obter o espectro UV e/ou a imagem digital da amostra de mel que se deseja avaliar. Em seguida, utilizando as equações matemáticas previamente geradas pelos modelos PLS para um conjunto dado de amostras de mel, estima-se o teor de fenólicos totais e de flavonoides em novas amostras de mel sem necessidade de medidas quantitativas.

2. Materiais e Métodos

2.1. Amostras

Neste trabalho foram avaliadas 87 amostras de méis de abelhas sem ferrão de 16 espécies, provenientes de apicultores Brasileiros (Tabela 1). As amostras foram coletadas em diferentes épocas durante os anos de 2014 a 2018. Os méis foram embalados em frascos plásticos e conservados em *freezer* até o momento de serem analisadas.

2.2. Ensaios de referência

2.2.1. Determinação do teor de fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu

O ensaio Folin-Ciocalteu foi realizado seguindo a metodologia descrita por Biluca *et al.*¹⁹ Para isso, foram pesados 0,5 g de cada mel e acrescentou-se 1,0 mL de água deionizada (Milli-Q fornecido pela Millipore Corporation®). A mistura foi homogeneizada durante 1 minuto em vórtex (KASVI basic Campina São José do Pinhais-PR, Brasil). Desta solução foram retiradas três alíquotas de 100 µL e adicionadas em três tubos de ensaios. A cada tubo foram adicionados 5,0 mL de água e 1,5 mL da solução de carbonato de sódio (Na₂CO₃, P.A Anidrol Produtos para Laboratórios Ltda) 20% m/v. As misturas foram homogeneizadas manualmente. Na sequência, adicionou-se 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (Dinâmica Química Contemporânea Ltda) e homogeneizou-se. Então, a solução foi avolumada para 10 mL com água ultrapura, novamente homogeneizada com ajuda de um vórtex por um minuto, protegida da luz e deixada em repouso durante uma hora. Após esse tempo, foi medida a absorvância das soluções em comprimento de onda de 765 nm com um espectrofotômetro UV-Vis (UV-1800, Shimadzu®) (Figura 3 A).

Os teores de fenólicos em mel foram expressos em equivalentes de ácido gálico. Para tal, foram construídas curvas de calibração de ácido gálico (Vetec Química Fina Ltda) na faixa de concentração de 5-1000 µmol/L. As

soluções padrão diluídas foram preparadas a partir de uma solução estoque de 1000 µg/mL de ácido gálico. Para a preparação da curva de calibração foi aplicado o mesmo procedimento descrito para as amostras de méis.

2.2.2. Determinação do teor de flavonoides pelo método de complexação com AlCl₃

A determinação do teor de flavonoides foi realizada através do método espectrofotométrico de complexação com cloreto de alumínio. A solução de cloreto de alumínio foi preparada na concentração AlCl₃ · 6H₂O (Vetec Química Fina Ltda) 2% em metanol (CH₃OH, P.A Química Moderna Barueri-SP, Brasi). Foram pesados, aproximadamente, 0,2 g de mel e diluídos em 2,0 mL de uma solução metanol: água destilada 1:1, v/v. Em seguida, se adicionou 1,0 mL da solução trabalho de AlCl₃ e a mistura foi homogeneizada. Após o tempo reacional de 30 minutos, foi realizada a leitura da absorvância no espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu® UV-1800) em comprimento de onda de 415 nm, contra um branco de metanol. Todas as medidas foram realizadas em triplicata (Figura 3B).

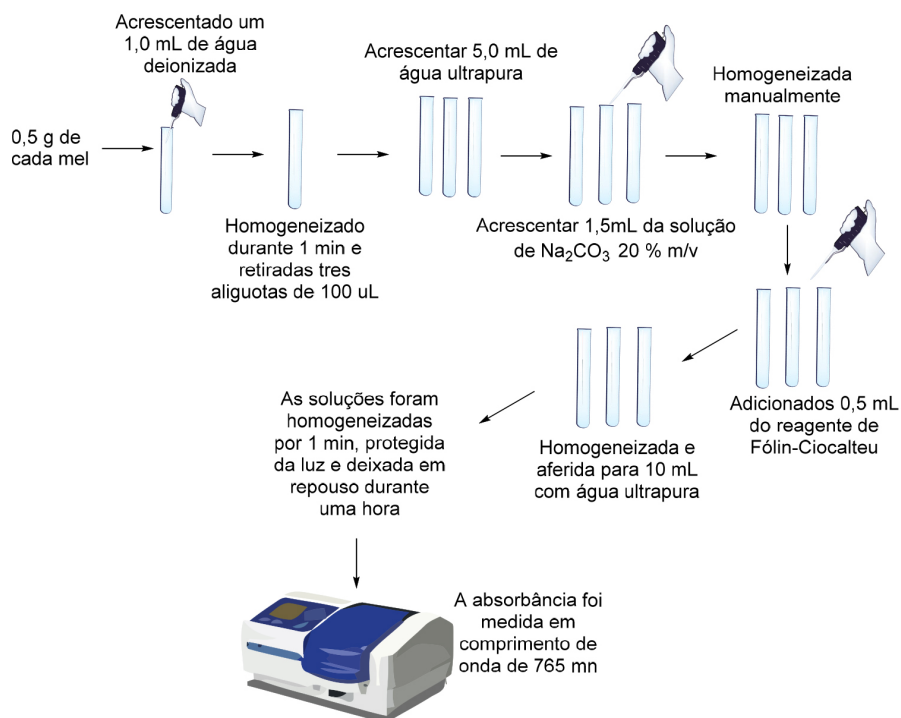
Para expressar o teor de flavonoides em equivalente de quercetina, foi construída para cada dia de análise uma curva de calibração nas concentrações de 5, 15, 25, 40 e 50 µg/mL a partir de uma solução padrão de quercetina (98%, Sigma-Aldrich®, Darmstadt, Alemanha) na concentração de 500 µg/mL em metanol. Para a construção de cada curva analítica todo o procedimento foi realizado em duplicata. Em tubos de ensaio colocou-se 1,0 mL de cada solução de quercetina diluída em 1,0 mL de metanol e 1,0 mL da solução trabalho de cloreto de alumínio. Após transcorrido um tempo de 30 minutos, realizou-se a medida da absorvância no comprimento de onda de 415 nm em um espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu® UV1800) contra um branco de metanol.

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

As imagens digitais foram adquiridas segundo a metodologia descrita por Turco *et al.*²⁰ Multi Imaging Analysis (MIA). Foi utilizado um celular iPhone® 8 Plus cuja câmera dispõe de uma resolução *full* HD 1920 × 1080 pixels. As imagens foram recortadas digitalmente e processadas com o auxílio do 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 que as bordas fossem removidas e apenas a cor da amostra de mel permaneça. O processo foi realizado em triplicata para todas as amostras de méis.

As imagens adquiridas foram transformadas para o sistema RGB utilizando o software de licença livre ChesmoStat®V2²¹, 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.

A



B

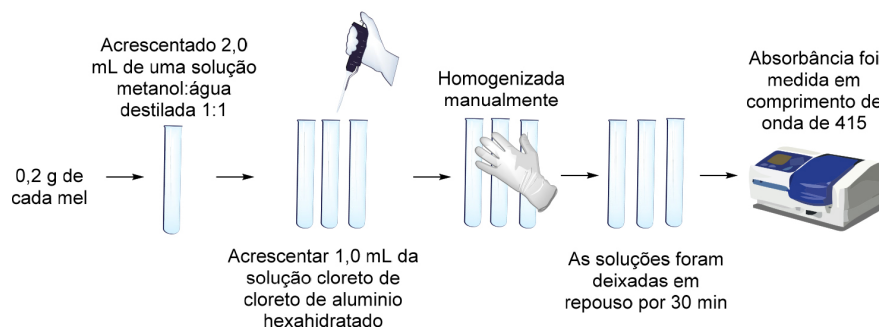


Figura 3. Etapas do ensaio de determinação do teor de fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu (a); etapas do ensaio envolvidas na de determinação do teor de flavonoides pelo método de complexação com AlCl_3 (b)

2.4. Obtenção dos espectros UV das amostras de méis

Os espectros das amostras de méis foram adquiridos preparando-se uma solução com 700 μL dos méis em 50,0 mL de água deionizada, e agitando-se durante um período de 10 minutos com ajuda de um vórtex. Para a aquisição dos espectros utilizou-se um espectrofotômetro UV-Vis da marca Shimadzu® (UV-1800) trabalhando no modo varredura na região de 220 a 400 nm. Utilizou-se como branco a água deionizada e todas as amostras foram lidas em triplicatas.

2.5. Método dos Mínimos Quadrados Parciais – PLS (Partial Least Squares)

Foram obtidos modelos por PLS para relacionar a matriz \mathbf{X} que contém os valores obtidos nos canais RGB ou os espectros UV (faixa de 220 a 400 nm) de cada amostra de

mel e o vetor \mathbf{y} que contém os valores de referência obtidos para cada ensaio (método de Folin-Ciocalteu e método de complexação com AlCl_3).

Os pré-processamentos dos espectros UV e a construção dos modelos PLS foram realizados no 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 das amostras de méis tiveram a linha base corrigida através do algoritmo baseline, incluso no pacote PLS Toolbox 5.2. Os modelos foram construídos com os dados centrados na média.

Os espectros e os histogramas RGB foram separados em um total de 2/3 das amostras de mel para construção do modelo de calibração e 1/3 das amostras foram selecionadas para o conjunto de validação externa. A separação das amostras entre os conjuntos de calibração e de validação foi realizada através do algoritmo Kennard-Stone.²²

A aplicabilidade e desempenho dos modelos PLS foram estimados pelos parâmetros de mérito como a exatidão, representada pelos valores de erro quadrático médio da raiz para calibração (RMSEC), erro quadrático médio da raiz para a validação externa (RMSEP), coeficiente de correlação, desvio de predição residual para a calibração (RPDcal), desvio de predição residual para a validação (RPDval), inverso da sensibilidade analítica, limites de detecção e quantificação.²³⁻²⁴ based on partial least squares (PLS).

3. Resultados e Discussão

Os resultados de fenólicos totais e de flavonoides totais por cada 100 g de mel variaram de 24,67 a 334,33 mg de ácido gálico/100 g e de 2,86 e 74,80 mg de quercetina/100g, demonstrando amplos intervalos de variação (Tabela 1).

A espécie *Scaptotrigona bipunctata* apresentou o máximo valor em equivalente de ácido gálico. Por sua parte, Sousa *et al.*²⁶ revelaram valores de teor de fenólicos

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

ID	Nome científico - Nome comum	Origem geográfica Município/Estado	Fenólicos totais mg EAG/100 g	Flavonoides mg EQ/100 g
1	<i>Tetragonisca angustula</i> - Jataí	Ariquemes / RO	169,33±5,77	13,94 ±0,19
2	<i>Tetragonisca angustula</i> - Jataí	Ariquemes / RO	143,67±2,08	9,84±0,40
3	<i>Tetragonisca angustula</i> - Jataí	Ariquemes / RO	126,67±9,07	6,95±0,03
4	<i>Tetragonisca angustula</i> - Jataí	Ariquemes / RO	163,67±9,24	10,80±0,46
5	<i>Tetragonisca angustula</i> - Jataí	Cacoal / RO	78,33±7,09	5,28±0,14
6	<i>Tetragonisca angustula</i> - Jataí	Cacoal / RO	80,67±4,51	5,15±0,21
7	<i>Tetragonisca weyrauchi</i> - Jataí acreana	Ariquemes / RO	143,00±13,00	8,40±0,17
8	<i>Tetragonisca weyrauchi</i> - Jataí acreana	Ariquemes / RO	91,67±5,13	8,31±0,55
9	<i>Tetragonisca weyrauchi</i> - Jataí acreana	Ariquemes / RO	88,67±2,08	7,36±0,21
10	<i>Tetragonisca angustula</i> - Jataí	Marialva / PR	165,33±2,31	6,46±0,12
11	<i>Tetragonisca angustula</i> - Jataí	Marialva / PR	181,0±9,64	9,27±0,28
12	<i>Tetragonisca angustula</i> - Jataí	Jussara / PR	308,00±2,65	11,60±0,77
13	<i>Tetragonisca angustula</i> - Jataí	M.C. Rondon / PR	106,67±4,04	8,57±0,09
14	<i>Tetragonisca angustula</i> - Jataí	Guaraqueçaba / PR	117,67±6,11	12,46±0,36
15	<i>Melipona quadrifasciata</i> - Mandaçaia	Guaraqueçaba / PR	115,67±1,53	11,78±0,23
16	<i>Scaptotrigona bipunctata</i> - Tubuna	Guaraqueçaba / PR	334,33±5,77	74,80±0,67
17	<i>Melipona quadrifasciata</i> - Mandaçaia	S.J dos Pinhais / PR	152,00±4,36	9,65±0,33
18	<i>Tetragonisca angustula</i> - Jataí	Floresta / PR	112,67±7,77	10,19±0,33
19	<i>Tetragonisca angustula</i> - Jataí	Tuneiras / PR	113,00±2,00	6,19±0,16
20	<i>Tetragonisca angustula</i> - Jataí	Ponta Grossa / PR	78,33±3,51	5,91±0,33
21	<i>Tetragonisca angustula</i> - Jataí	Perobal / PR	323,67±3,21	13,49±0,21
22	<i>Tetragonisca angustula</i> - Jataí	Pérola / PR	63,00±2,00	8,56±0,48
23	<i>Tetragonisca angustula</i> - Jataí	Pérola / PR	226,00±6,08	11,32±0,57
24	<i>Tetragonisca angustula</i> - Jataí	Cambará / PR	117,67±2,08	8,80±0,69
25	<i>Scaptotrigona bipunctata</i> - Tubuna	Cambará / PR	69,67±2,08	7,26±0,34
26	<i>Tetragonisca angustula</i> - Jataí	Mandirituba / PR	57,00±0,00	5,75±0,08
27	<i>Scaptotrigona bipunctata</i> - Tubuna	Mandirituba (PR)	88,00±6,00	11,68±0,28
28	<i>Tetragonisca angustula</i> - Jataí	Mandirituba / PR	124,33±2,52	12,46±0,48
29	<i>Melipona quadrifasciata</i> - Mandaçaia	Mandirituba / PR	52,33±1,15	8,37±0,87
30	<i>Melipona quadrifasciata</i> - Mandaçaia	Mandirituba / PR	47,00±1,00	7,20±0,23
31	<i>Scaptotrigona bipunctata</i> - Tubuna	Mandirituba / PR	126,67±1,53	12,18±0,34
32	<i>Tetragonisca angustula</i> - Jataí	Ortigueira / PR	24,67±0,58	4,34±0,07
33	<i>Scaptotrigona bipunctata</i> - Tubuna	Maringá / PR	122,67±1,53	15,50±0,38
34	<i>Scaptotrigona bipunctata</i> - Tubuna	Maringá / PR	134,33±5,13	6,89±0,26
35	<i>Scaptotrigona bipunctata</i> - Tubuna	Maringá / PR	131,67±0,58	12,52±0,31
36	<i>Scaptotrigona bipunctata</i> - Tubuna	Maringá / PR	125,33±0,58	5,46±0,09
37	<i>Scaptotrigona bipunctata</i> - Tubuna	Maringá / PR	104,33±3,51	11,04±0,58

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

ID	Nome científico - Nome comum	Origem geográfica Município/Estado	Fenólicos totais mg EAG/100 g	Flavonoides mg EQ/100 g
38	<i>Scaptotrigona bipunctata</i> - Tubuna	Maringá / PR	105,00±3,46	13,73±0,29
39	<i>Scaptotrigona bipunctata</i> - Tubuna	Maringá / PR	121,67±2,31	9,09±0,24
40	<i>Scaptotrigona bipunctata</i> - Tubuna	Maringá / PR	108,67±0,58	5,67±0,70
41	<i>Scaptotrigona bipunctata</i> - Tubuna	Maringá / PR	140,33±2,08	4,48±0,32
42	<i>Scaptotrigona bipunctata</i> - Tubuna	Maringá / PR	154,00±2,65	6,94±0,21
43	<i>Scaptotrigona bipunctata</i> - Tubuna	Maringá / PR	133,00±3,00	9,40±0,08
44	<i>Scaptotrigona bipunctata</i> - Tubuna	Maringá / PR	90,33±2,08	11,89±0,14
45	<i>Scaptotrigona bipunctata</i> - Tubuna	Maringá / PR	143,67±6,35	3,90±0,19
46	<i>Scaptotrigona bipunctata</i> - Tubuna	Maringá / PR	99,00±1,73	14,01±0,22
47	<i>Scaptotrigona bipunctata</i> - Tubuna	Maringá / PR	95,00±2,65	12,22±0,13
48	<i>Scaptotrigona bipunctata</i> - Tubuna	Maringá / PR	150,00±2,65	6,16±0,36
49	<i>Scaptotrigona bipunctata</i> - Tubuna	Maringá / PR	157,33±3,21	6,21±0,30
50	<i>Scaptotrigona bipunctata</i> - Tubuna	Maringá / PR	157,67±3,21	5,72±0,40
51	<i>Scaptotrigona bipunctata</i> - Tubuna	Maringá / PR	133,00±1,73	4,52±0,28
52	<i>Scaptotrigona bipunctata</i> - Tubuna	Maringá / PR	123,67±2,31	8,91±0,24
53	<i>Scaptotrigona bipunctata</i> - Tubuna	Maringá / PR	109,00±1,00	16,78±0,30
54	<i>Scaptotrigona bipunctata</i> - Tubuna	Maringá / PR	137,33±2,52	6,96±0,18
55	<i>Scaptotrigona bipunctata</i> - Tubuna	Maringá / PR	121,67±0,58	14,04±0,44
56	<i>Scaptotrigona bipunctata</i> - Tubuna	Maringá / PR	128,67±1,15	13,35±0,19
57	<i>Scaptotrigona bipunctata</i> - Tubuna	Maringá / PR	116,67±2,08	5,46±0,39
58	<i>Scaptotrigona bipunctata</i> - Tubuna	Maringá / PR	145,33±1,53	6,73±0,56
59	<i>Scaptotrigona bipunctata</i> - Tubuna	Maringá / PR	153,00±1,73	10,30±0,06
60	<i>Scaptotrigona bipunctata</i> - Tubuna	Maringá / PR	105,00±2,00	13,38±0,53
61	<i>Scaptotrigona bipunctata</i> - Tubuna	Maringá / PR	177,00±3,46	7,08±0,13
62	<i>Scaptotrigona bipunctata</i> - Tubuna	Maringá / PR	124,33±0,58	9,09±0,18
63	<i>Scaptotrigona bipunctata</i> - Tubuna	Maringá / PR	100,33±2,08	12,13±0,10
64	<i>Scaptotrigona bipunctata</i> - Tubuna	Maringá / PR	142,33±0,58	6,18±0,11
65	<i>Scaptotrigona bipunctata</i> - Tubuna	Maringá / PR	95,67±3,21	10,11±0,14
66	<i>Scaptotrigona bipunctata</i> - Tubuna	Maringá / PR	101,67±0,58	14,05±0,21
67	<i>Scaptotrigona bipunctata</i> - Tubuna	Maringá / PR	93,67±0,58	12,16±0,25
68	<i>Scaptotrigona bipunctata</i> - Tubuna	Maringá / PR	129,67±1,15	7,16±0,08
69	<i>Scaptotrigona bipunctata</i> - Tubuna	Maringá / PR	101,33±2,31	11,01±0,11
70	<i>Scaptotrigona bipunctata</i> - Tubuna	Maringá / PR	81,00±1,73	13,15±0,37
71	<i>Scaptotrigona bipunctata</i> - Tubuna	Maringá / PR	136,67±0,58	9,93±0,22
72	<i>Scaptotrigona bipunctata</i> - Tubuna	Maringá / PR	107,00±1,00	11,50±0,14
73	<i>Scaptotrigona bipunctata</i> - Tubuna	Maringá / PR	159,67±0,58	11,73±0,18
74	<i>Scaptotrigona postica</i> - Mandaguari	Maringá / PR	108,33±2,08	15,93±0,33
75	<i>Scaptotrigona poutsiça</i> - Mandaguari	Maringá / PR	104,67±0,58	9,74±0,19
76	<i>Tetragonisca angustula</i> - Jataí	Maringá / PR	136,33±2,08	8,94±0,73
77	<i>Tetragonisca angustula</i> - Jataí	São Lourenço / PR	156,67±5,77	20,90±0,91
78	<i>Tetragonisca angustula</i> - Jataí	São Lourenço / PR	95,00±2,65	10,69±0,79
79	<i>Tetragonisca angustula</i> - Jataí	Foz do Iguaçu / PR	123,33±0,58	8,48±0,41
80	<i>Tetragonisca angustula</i> - Jataí	Santa Helena / PR	95,33±2,31	11,39±0,47
81	<i>Tetragonisca angustula</i> - Jataí	Guaraqueçaba / PR	95,67±2,08	14,62±0,09
82	<i>Melipona marginata</i> – Guarapu-miúdo	Guaraqueçaba / PR	60,67±1,15	5,19±0,04
83	<i>Tetragona clavipes</i> - Borá	Guaraqueçaba / PR	77,67±0,58	12,38±0,22
84	<i>Melipona quadrifasciata</i> - Mandaçaia	- Bahia	134,00±0,00	10,50±0,14

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

ID	Nome científico - Nome comum	Origem geográfica Município/Estado	Fenólicos totais mg EAG/100 g	Flavonoides mg EQ/100 g
85	<i>Tetragona clavipes</i> - Borá	- Goiás	30,33±1,15	2,86±0,11
86	<i>Tetragonisca angustula</i> - Jataí	Nova Tebas / PR	137,67±1,15	10,07±0,14
87	<i>Melipona marginata</i> - Guarapu-miúdo	Guarapuava / PR	131,33±2,08	9,58±0,28

^aFenólicos Totais expressos em mg EAG/100 g (mg ácido gálico/100g). Flavonoides expressos como mg EQ/100 g (mg quercetina/100 g). Estado: Paraná /PR, Rondônia /RO, (-) dado não disponível.

em equivalente de ácido gálico que variaram de 31,5 a 126,6 mg ácido gálico /100 g do mel, para quatro diferentes méis monoflorais produzidos por duas espécies de abelhas sem ferrão na região semiárida do nordeste brasileiro. A determinação de compostos fenólicos no mel de abelhas sem ferrão da espécie *Trigona itama* também foi relatada por Ooi *et al.*¹² Neste estudo, foi identificado um teor de 15,38 mg ácido gálico /100 g do mel.

Já em relação ao conteúdo de flavonoides, um estudo realizado com mel de abelhas sem ferrão na região semiárida do nordeste brasileiro identificou valores de 4,2 a 1,9 mg de quercetina por 100 g de mel²⁶. No entanto, Agussalim *et al.*,²⁷ que estudaram mel de abelha de *Tetragonula laeviceps* da Indonésia, encontraram valores entre 28 e 100 mg quercetina/100 g. Já Mokaya *et al.*,²⁸ que analisaram méis produzidos por espécies de abelhas sem ferrão afrotropicais (*Hymenoptera, Meliponini*), revelaram valores que variaram entre 28,7 e 73,0 mg em equivalente de quercetina /100 g.

De maneira geral, verifica-se ampla variabilidade dos teores de compostos bioativos avaliados nas amostras de mel de abelhas sem ferrão. É bem sabido que as principais limitações desses métodos espectrofotométricos são a baixa seletividade e exatidão. Por exemplo, o método de Folin-Ciocalteu pode levar a falsos positivos na presença de proteínas, aminoácidos, ácido ascórbico, açúcares redutores e outros redutores de natureza não fenólica.²⁹ Por outro lado, Shraimet *et al.*³⁰ testaram a exatidão do ensaio de complexação com $AlCl_3$ para determinação de flavonoides em extratos de plantas enriquecidos com catequina, quercetina e rutina e concluíram que as recuperações obtidas dos flavonoides adicionados foram inaceitáveis.³⁰

Apesar das limitações citadas, os ensaios colorimétricos são amplamente utilizados em determinações rápidas e de menor custo, se comparados aos métodos cromatográficos. Neste trabalho, verificamos por meio do método dos mínimos quadrados parciais a correlação entre os resultados de fenólicos e flavonoides totais obtidos pelos métodos espectrofotométricos clássicos e o perfil de absorção UV e/ou as fotografias digitais das amostras de mel.

3.1. Modelos PLS

Na Figura 4A são apresentados os espectros UV de todas as amostras utilizadas na construção do modelo PLS para estimar o teor de fenólicos totais e teor de flavonoides nas amostras de méis de abelhas sem ferrão.

Antes da construção dos modelos PLS, os espectros UV (Figura 4A) foram avaliados para verificar a presença de espectros com comportamento anômalo ou extremo (*outliers*). Os *outliers* foram identificados e eliminados, como mostra a Figura 4B com auxílio do gráfico de *Leverage* e dos resíduos da variável independente. A identificação e eliminação de *outliers* permite a construção de modelos PLS com maior capacidade preditiva.⁹

Na Figura 4C são apresentados os espectros UV das amostras de méis após a eliminação das amostras anômalas. O número total de *outliers* eliminados para cada um dos modelos computados é apresentado na Tabela 2.

Tabela 2. Número de *outliers* eliminados para cada um dos modelos construídos

Atributos (Matrix X-Y)	Quantidade total de <i>outliers</i> eliminados antes da construção dos modelos por PLS
Espectro UV-Fenólicos	3
Imagem-Fenólicos	0
Espectro UV-Flavonoides	3
Imagem-Flavonoides	1

Na Figura 5 são apresentados os histogramas RGB obtidos para as amostras dos méis, as quais foram divididas em 2/3 do total das amostras para o conjunto da calibração e 1/3 do total das amostras para a validação externa usando o algoritmo Kennard-Stone. Posteriormente foram investigados os modelos PLS correlacionando os histogramas RGB e os valores de referência de teores de fenólicos e de flavonoides.

O objetivo deste trabalho foi investigar uma alternativa para determinar o teor de fenólicos, expresso em termos de equivalente de ácido gálico, e o teor de flavonoides, expresso em equivalente de quercetina, utilizando a espectroscopia UV e imagem digital com o auxílio da modelagem por PLS. As figuras de mérito dos modelos PLS para estimar esses parâmetros são apresentadas nas Tabelas 3 e 4. Um dos parâmetros para avaliar a exatidão dos modelos PLS é considerar os valores de RMSEC e RMSEP.³¹ Valores próximos de RMSEC e RMSEP dos modelos mostrados nas Tabelas 3 e 4 indicam que o número escolhido de variáveis latentes foi adequado e que os modelos não apresentam falta de ajuste ou super ajuste.²⁹⁻³⁰ high cost, and lack of reproductive results. This study investigates the feasibility to determine roasting degrees in coffee beans and ground

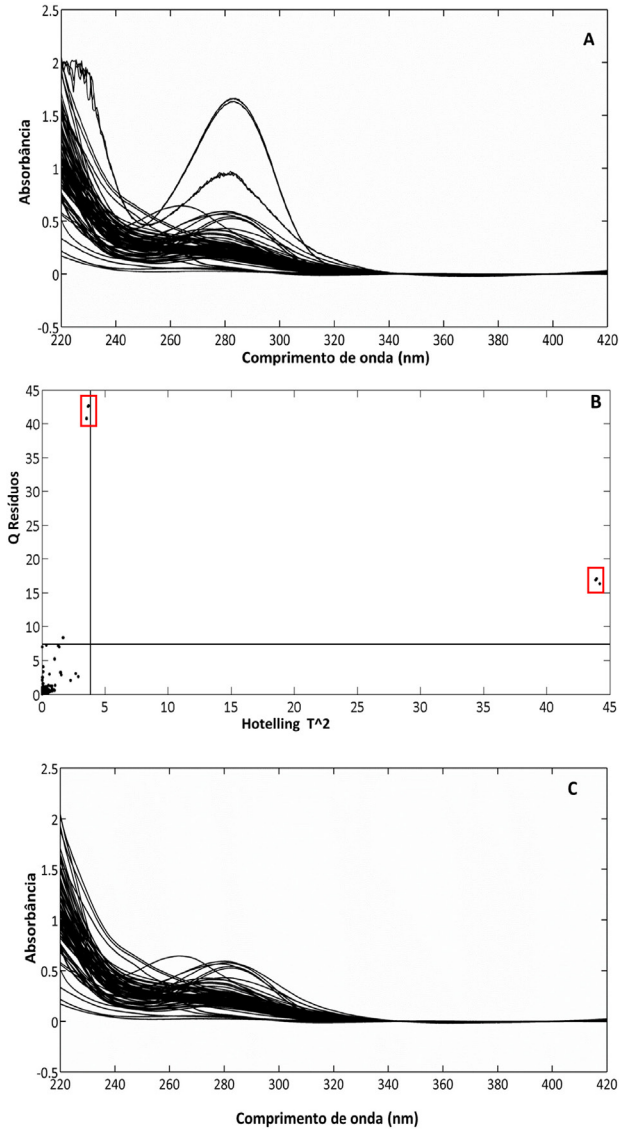


Figura 4. Espectro UV das amostras de mel antes da avaliação de outliers (a); avaliação de outliers (b); espectros de UV após a remoção de outliers (c)

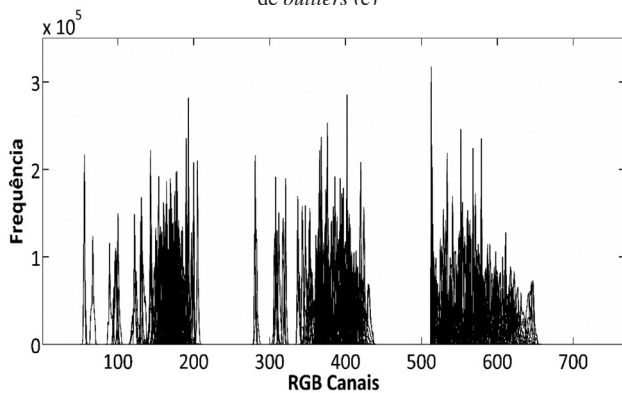


Figura 5. Histogramas RGB para todas as amostras de mel

specialty coffees using near-infrared (NIR).

A linearidade dos modelos PLS desenvolvidos foi avaliada com base no gráfico de resíduos obtidos a partir dos valores preditos do modelo na calibração e validação

contra o erro absoluto (Figuras 8 e 9). Os gráficos de resíduos apresentaram um comportamento de aleatoriedade, indicando que os modelos desenvolvidos se ajustam a um modelo linear como PLS.²⁹⁻³¹ high cost, and lack of reproductive results. This study investigates the feasibility to determine roasting degrees in coffee beans and ground specialty coffees using near-infrared (NIR).

Outro parâmetro para avaliar a capacidade preditiva e qualidade dos modelos PLS é o desvio de previsão residual (RPD), que é obtido pela razão entre os desvios padrão dos valores de referência e o erro padrão de predição.³⁵ O desvio de predição residual foi calculado para os conjuntos de dados de calibração e validação (Tabelas 3 e 4). No conjunto de dados, o modelo que apresentou maior capacidade preditiva foi o modelo UV-PLS para o teor de fenólicos. Segundo a literatura, valores de RPD devem oscilar entre 1,5 e 2,4 para que sejam considerados satisfatórios.³⁶ Em relação às figuras de mérito, os modelos UV-PLS flavonoides e imagem-PLS para compostos fenólicos e flavonoides demonstraram capacidades preditivas inferiores. No entanto, todos os modelos são adequados se temos em conta a alta variabilidade do conjunto de dados, com méis de diversas espécies de abelhas sem ferrão e regiões de origem geográfica diferentes. Essas características contribuem para um modelo mais vigoroso ou completo e, portanto, de maior aplicabilidade.

O inverso da sensibilidade analítica (sensibilidade analítica⁻¹) permite estabelecer a menor diferença de concentração que o modelo PLS é capaz de distinguir, considerando os erros aleatórios de origem instrumental como a principal fonte de erro.³³ As Tabelas 3 e 4 mostram os valores do inverso da sensibilidade analítica para cada um dos modelos, observando que, baseado nesse parâmetro, os modelos que apresentaram melhor sensibilidade são os modelos construídos com as imagens digitais das amostras de mel, o que resulta em um método extremamente conveniente para o controle de qualidade do mel, uma vez que a imagem digital é facilmente obtida utilizando um dispositivo celular e não requer nenhum pré-tratamento da amostra.

O limite de detecção (LD) refere-se à concentração mínima da substância de interesse que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada. Por outro lado, o limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância de interesse que pode ser medida com precisão e confiabilidade. Foram empregadas as equações indicadas para estimativa de LD e LQ em calibrações com dados de primeira ordem, sendo:³⁴

$$LD = 3,3 \frac{\delta x}{\|b\|}$$

$$LQ = 10 \frac{\delta x}{\|b\|}$$

em que: corresponde ao desvio padrão do ruído instrumental; b é o vetor de coeficientes de regressão do modelo PLS.

Tabela 3. Parâmetros de Mérito para Modelos PLS baseados nas imagens de mel

Parâmetros de mérito	Fenólicos totais	
	Equivalente ácido gálico	Equivalente quercetina
Faixa do modelo	0,2400 - 3,4100 (mg/g)	0,0270 - 0,2180 (mg/g)
N# de variáveis latentes	4	6
Predição	RMSEC	0,2172
	RMSEP	0,2339
Coeficiente de correlação	0,8304	0,824
RPDcal	1,37	1,16
RPDval	1,95	2,65
Inverso da sensibilidade analítica ¹	0,2523	0,0128
Limite de detecção	0,8326	0,0424
Limite de quantificação	2,5231	0,1284

Outro parâmetro empregado para avaliar a exatidão dos modelos PLS é o coeficiente de correlação, que está representado por uma regressão linear entre os resultados experimentais obtidos nos ensaios de referência e as respostas previstas pelo modelo PLS Figura 6 e 7. Os valores obtidos de coeficiente de correlação são apresentados nas Tabelas 3 e 4, onde se pode observar que os valores estão na faixa entre 0,7 e 0,8 indicando que os modelos PLS obtidos apresentam capacidade preditiva para as propriedades avaliadas dos méis.

Tabela 4. Parâmetros de Mérito para Modelos PLS baseados em espectros UV de méis

Parâmetros de mérito	Fenólicos totais	
	Equivalente ácido gálico	Equivalente quercetina
Faixa do modelo	0,2400 - 3,260 (mg/g)	0,0270 - 0,2180 (mg/g)
N# de variáveis latentes	13	17
Predição	RMSEC	0,2228
	RMSEP	0,2360
Coeficiente de correlação	0,804	0,773
RPDcal	1,6	1,03
RPDval	1,4	1,53
Inverso da sensibilidade analítica ¹	0,2928	0,0876
Limite de detecção	0,0966	0,02890
Limite de quantificação	0,9278	0,08759

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) para os modelos imagem-PLS *versus* teores de fenólicos totais foram de 0,8326 e 2,5231 respectivamente. Para o modelo PLS das imagens *versus* teores de flavonoides o LD e o LQ foram de 0,0424 e 0,1284 respectivamente. Os LD e LQ para os modelos UV-PLS, construídos com os espectros UV *versus* teores de fenólicos totais e flavonoides foram de 0,0966, 0,9278 e 0,0289, 0,08759 respectivamente. Os resultados obtidos com os modelos UV-PLS e imagem-PLS apresentaram limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) satisfatórios, levando em conta as faixas modeladas para os teores de fenólicos e flavonoides.

O gráfico de *Vip scores* fornece identificação importante das variáveis mais relevantes envolvidas na modelagem.³⁷ Na Figura 10, as variáveis que apresentam valores de VIP maiores que '1' são as mais importantes na modelagem. Dessa forma, na Figura 10A os comprimentos de ondas mais significativos na modelagem e que permitem a estimativa eficiente de compostos fenólicos foram as regiões espectrais

de 220 – 240 nm e 260 - 290 nm, que são precisamente as faixas de comprimentos de onda onde as amostras de mel apresentam absorção considerável da radiação UV.

Um estudo realizado por Pasini *et al.*³⁸ identificou a presença de compostos fenólicos no mel na mesma faixa de absorção que, na qual nossos teste de *VIP score* mostraram a maior influência. Um dos compostos determinados foi o ácido p-hidroxibenzóico, com uma absorção máxima em torno de 254 nm. Além disso, o composto ácido p-cumárico apresentou uma banda de absorção entre 232 nm e 310 nm, enquanto o ácido ferúlico apresentou uma absorção máxima próxima de 280 nm no espectro UV. Esses compostos fenólicos são conhecidos por suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias e são comuns em várias plantas, incluindo aquelas utilizadas pelas abelhas para a produção de mel.³⁸

Por outro lado, na Figura 10B pode-se observar que a faixa espectral que apresentou maior importância para a estimativa de flavonoides nos méis de abelhas nativas vai de 220 a 310 nm. Nesta faixa espectral flavonoides

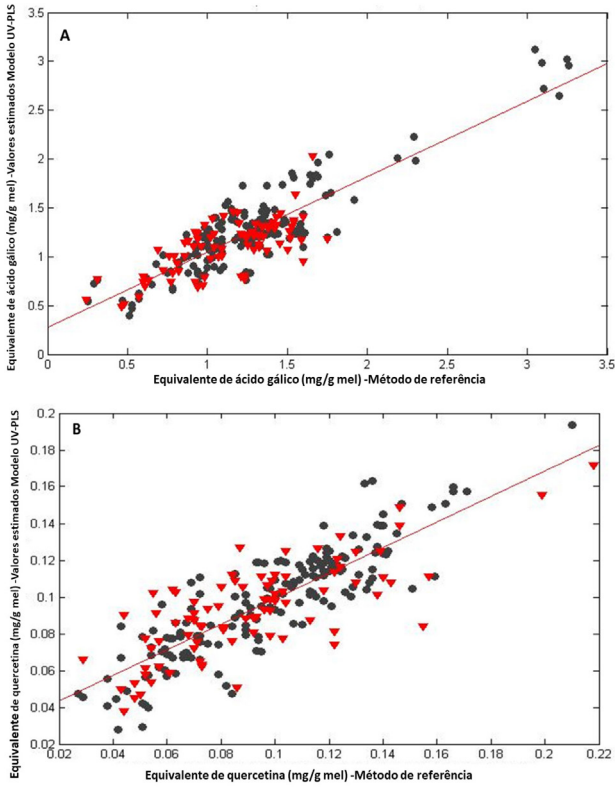


Figura 6. Ajuste para os modelos baseados em Espectro UV-PLS. (a) Fenólicos totais, (b) Flavonoides. (•) amostras no conjunto de calibração; (Δ) amostras no conjunto de validação externa

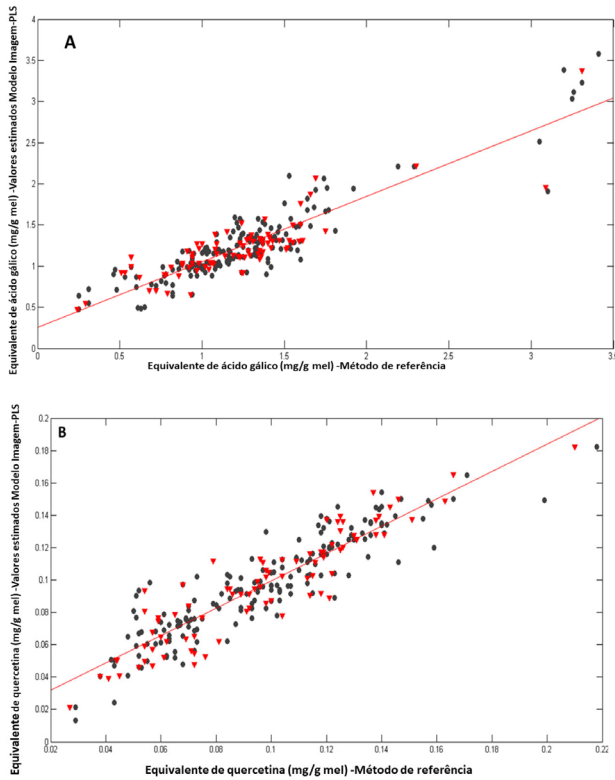


Figura 7. Ajuste para os modelos baseados em Imagem-PLS. (a) Fenólicos totais, (b) Flavonoides. (•) amostras no conjunto de calibração; (Δ) amostras no conjunto de validação externa

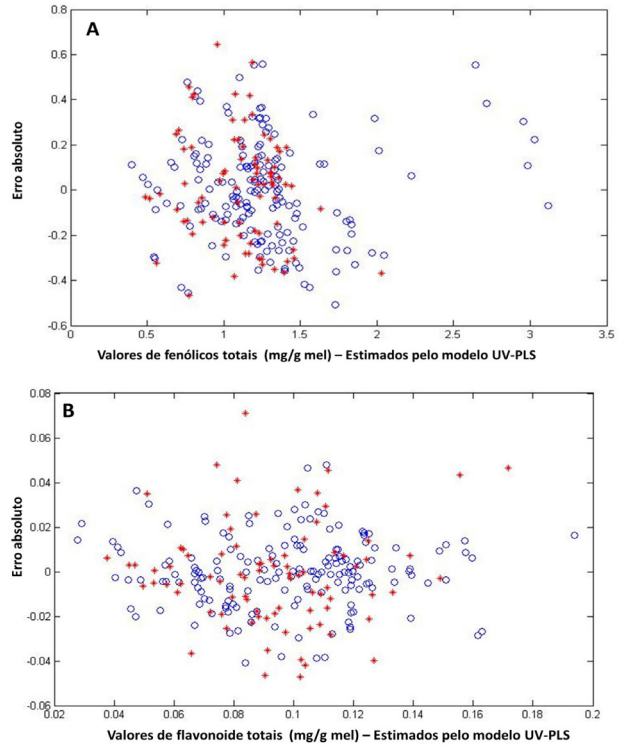


Figura 8. Resíduos para os modelos UV-PLS. (a) Fenólicos totais, (b) Flavonoides (•) amostras no conjunto de calibração; (*) amostras no conjunto de validação externa

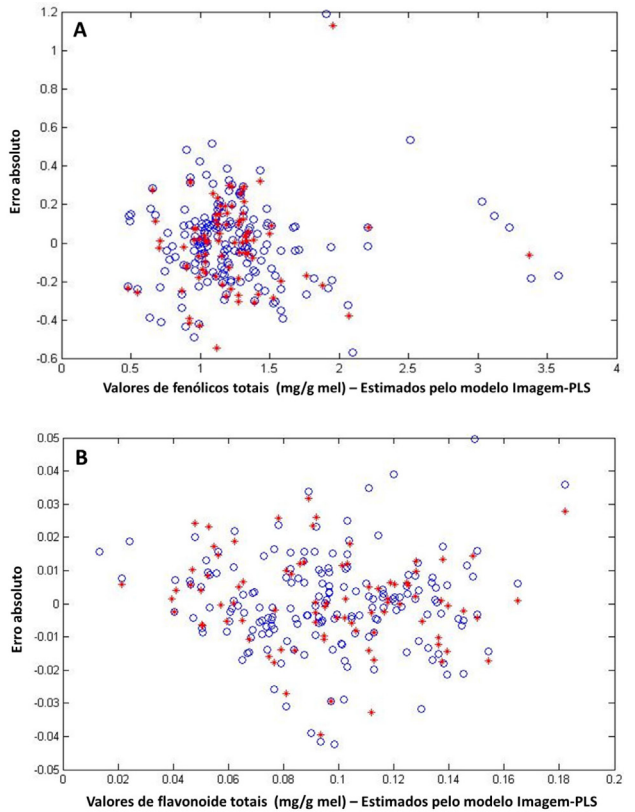


Figura 9. Resíduos para os modelos Imagem-PLS. (a) Fenólicos totais, (b) Flavonoides (•) amostras no conjunto de calibração; (*) amostras no conjunto de validação externa

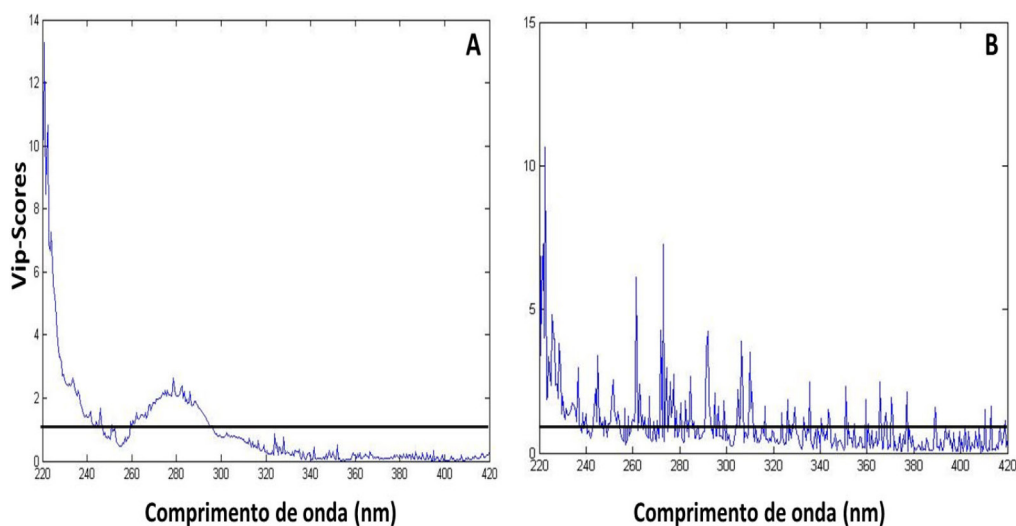


Figura 10. VIP scores modelos UV-PLS. (a) Fenólicos totais, (b) Flavonoides

como quercetina, apigenina e galangina apresentam ampla absorção de radiação UV.³⁸ Outros compostos fenólicos, tais como ácido caféico, ácido cinâmico e derivados, apresentaram um perfil de absorção na região do ultravioleta entre os comprimentos de onda de 279 e 302 nm.³⁹

4. Conclusões

Pode-se apreciar, tanto nos resultados obtidos neste estudo com méis brasileiros quanto em trabalhos já existentes na literatura para méis de abelhas sem ferrão de diferentes regiões do mundo, que há uma ampla faixa de variabilidade nos teores de fenólicos totais e de flavonoides em méis de abelhas sem ferrão. Portanto, parâmetros mínimos de qualidade devem ser estabelecidos para esse tipo de mel, o que implica em realizar uma ampla amostragem e classificação dos méis segundo a espécie de abelha sem ferrão produtora e sua região de origem, inclusive verificando o efeito desses fatores nos teores de compostos bioativos do mel. Tal esforço poderá levar à certificação de origem do mel de diferentes espécies de *meliponinas*, quando estabelecidas suas características peculiares vinculadas a um modo de manejo, região de origem e espécie de abelha.

O controle de qualidade é realizado através de métodos físico-químicos, espectrofotométricos e/ou cromatográficos, que são custosos e utilizam grandes quantidades de solventes e reagentes químicos. Dessa forma, ressalta-se a importância de métodos indiretos para a estimativa de propriedades de interesse. Os resultados obtidos mostraram que os modelos PLS conseguiram modular e capturar de maneira apropriada a relação entre os espectros UV e/ou imagens digitais das amostras de mel do conjunto de calibração e os teores de fenólicos totais expressos em equivalente de ácido gálico e de flavonoides em equivalente de quercetina do referido conjunto de amostras.

A validação dos modelos foi avaliada pelos parâmetros de mérito evidenciando sua sensibilidade para estimar

as propriedades desejadas. Dessa forma, a abordagem quimiométrica de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) demonstra ser apropriada como ferramenta rápida e implícita para estimar o teor de compostos fenólicos e flavonoides em amostras de mel de abelhas sem ferrão de diferentes espécies e origens geográficas, principalmente para amostras produzidas no Estado do Paraná, já que o conjunto de amostras analisadas é representativa de méis das regiões apícolas do estado de Paraná. Como limitação para essa abordagem podemos citar a necessidade de verificar a aplicabilidade do modelo para amostras coletadas em outras regiões do Brasil.

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, 306606/2020-8, 422130/2023-0); Programa Institucional de Pesquisa Básica e Aplicada da Fundação Araucária 297/2022 PDI, [PBA2022011000008].

Contribuições dos Autores

Contribuições dos autores: Maidelen Del Carmen Lozano Guerrero - Conceituação, Pesquisa, Curadoria de dados, Software, Redação do rascunho original, Redação-revisão e edição. Luiz Gustavo Barankievicz Martins - Conceituação, Curadoria de dados, Pesquisa. Camila Acorone - Curadoria de dados, Pesquisa. Eliane Sloboda Rigobello - Visualização, Pesquisa. Patrícia Valderrama - Curadoria de dados, Pesquisa, Software, Validação, Visualização, Redação-revisão e edição. Yohandra Reyes Torres - Conceituação, Curadoria de dados, Aquisição de financiamento para análise formal, Pesquisa, Administração

de projetos, Recursos, Software, Validação, Visualização, Redação-revisão e edição.

Referências Bibliográficas

1. 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](#)]
2. Oliveira, P. S.; Müller, R. C. S.; Dantas, K. G. F.; Alves, C. N.; Ácidos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante em méis de *Melipona fasciculata*, *M. flavolineata* (Apidae, Meliponini) e *Apis mellifera* (Apidae, Apini) da Amazônia. *Química Nova* **2012**, *35*, 1728. [[Crossref](#)]
3. Escuredo, O.; Silva, L. R.; Valentão, P.; Seijo, M. C.; Andrade, P. B.; Assessing *Rubus* honey value: Pollen and phenolic compounds content and antibacterial capacity. *Food Chemistry* **2012**, *130*, 671. [[Crossref](#)]
4. Da Silva, P. M.; Gauche, C.; Gonzaga, L. V.; Costa, A. C. O.; Fett, R.; Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry* **2016**, *196*, 309. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
5. 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](#)]
6. Da Costa, A. C. V.; Sousa, J. M. B.; Da Silva, M. A. A. P.; Garruti, D. dos S.; Madruga, M. S.; Sensory and volatile profiles of monofloral honeys produced by native stingless bees of the brazilian semiarid region. *Food Research International* **2018**, *105*, 110. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
7. Hlavacek, R. J.; Codex alimentarius commission. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **1981**, *58*, 232. [[Crossref](#)]
8. 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](#)]
9. 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](#)]
10. 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](#)]
11. 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](#)]
12. 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](#)] [[PubMed](#)]
13. Naczki, M.; Shahidi, F.; Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A* **2004**, *1054*, 95. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
14. Rover, M. R.; Brown, R. C.; Quantification of total phenols in bio-oil using the Folin-Ciocalteu method. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **2013**, *104*, 366. [[Crossref](#)]
15. Al-matani, S. K.; Al-Wahaibi, R. N. S.; Hossain, M. A.; *In vitro* evaluation of the total phenolic and flavonoid contents and the antimicrobial and cytotoxicity activities of crude fruit extracts with different polarities from *Ficus sycomorus*. *Pacific Science Review A: Natural Science and Engineering* **2015**, *17*, 103. [[Crossref](#)]
16. Valinger, D.; Longin, L.; Grbeš, F.; Benković, M.; Jurina, T.; Kljusic, 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. Kumaravelu, C.; Gopal, A.; Detection and Quantification of Adulteration in Honey through Near Infrared Spectroscopy. *International Journal of Food Properties* **2015**, *18*, 1930. [[Crossref](#)]
18. Guerrero, L. M.; Lima, F. S. M. D.; Acórone, C.; Rigobello, E. S.; Valderrama, P.; Reyes T. Y.; Espectroscopia UV e Imagens Digitais para Estimar a Capacidade Antioxidante e o Conteúdo de Prolina em Méis de Abelhas Nativas. *Revista Virtual de Química* **2023**, *1*. [[Crossref](#)]
19. 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](#)]
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. Helfer, G. A.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de Santa Cruz do Sul, 2014. [[Link](#)]
22. Kennard, R. W.; Stone, L. A.; Computer Aided Design of Experiments. *Technometrics* **1969**, *11*, 137. [[Crossref](#)]
23. 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](#)]
24. 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](#)]
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* **2020**, *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. Agussalim; Umami, N.; Nurliyani; Agus, A.; Stingless bee honey (*Tetragonula laeviceps*): Chemical composition and their potential roles as an immunomodulator in malnourished rats. *Saudi Journal of Biological Sciences* **2022**, *29*, 103404. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
28. 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](#)]
29. Karadag, A.; Ozcelik, B.; Saner, S.; Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analytical Methods* **2009**, *2*, 41. [[Crossref](#)]
30. Shraim, A. M.; Ahmed, T. A.; Rahman, M. M.; Hijji, Y. M.; Determination of total flavonoid content by aluminum chloride assay: A critical evaluation. *Lwt* **2021**, *150*, 111932. [[Crossref](#)]
31. Valderrama, P.; Braga, J. W. B.; Poppi, R. J.; Validation of multivariate calibration models in the determination of sugar cane quality parameters by near infrared spectroscopy. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2007**, *18*, 259. [[Crossref](#)]
32. 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](#)]
33. 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](#)]
34. 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](#)]
35. 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](#)]
36. Botelho, B. G.; De Assis, L. P.; Sena, M. M.; Development and analytical validation of a simple multivariate calibration method using digital scanner images for sunset yellow determination in soft beverages. *Food Chemistry* **2014**, *159*, 175. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
37. Vitale, R.; Bevilacqua, M.; Bucci, R.; Magrì, A. D.; Magrì, A. L.; Marini, F.; A rapid and non-invasive method for authenticating the origin of pistachio samples by NIR spectroscopy and chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **2013**, *121*, 90. [[Crossref](#)]
38. Pasini, F.; Gardini, S.; Marazzan, G. L.; Caboni, M. F.; Buckwheat honeys: Screening of composition and properties. *Food Chemistry* **2013**, *141*, 2802. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
39. Castro, M. L.; Cury, J. A.; Rosalen, P. L.; Alencar, S. M.; Ikegaki, M.; Duarte, S.; Koo, H.; Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. *Química Nova* **2007**, *30*, 1512. [[Crossref](#)]