

GLICÍDIOS NO MEL

Ricardo Felipe Alves Moreira

Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, UFRJ, Rio de Janeiro - RJ

Carlos Alberto Bastos De Maria*

Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto Biomédico, UNIRIO, Rua Frei Caneca 94, 4^o andar, 20211-040 Rio de Janeiro - RJ

Recebido em 28/7/00; aceito em 31/10/00

SUGARS IN THE HONEY. A review about composition, origin and importance of carbohydrates in honey is presented. Fructose and glucose are the major carbohydrates, ranging from 65-85 % of the total soluble solids. Other minor carbohydrates, chiefly di- and trisaccharides, have been also identified. Fructose, glucose and sucrose are mainly originated from nectar. Oligosaccharides are mainly formed by *trans*- α -D-glucosylation reactions catalysed by honeybee α -D-glucosidase. The profile of carbohydrates can be useful for the identification of the Brazilian region in which honey was produced and may also be useful for testing Brazilian honey authenticity.

Keywords: honey; carbohydrates; nectar.

INTRODUÇÃO

O mel é um produto viscoso, adocicado e geralmente de aroma agradável, apreciado, segundo alguns relatos, desde a Grécia antiga¹. Sua qualidade nutricional (vitaminas, minerais, valor energético elevado), suas propriedades medicinais (ação antioxidante e antisséptica relacionada aos compostos fenólicos) e suas propriedades sensoriais tem atraído milhares de consumidores². A matéria-prima para produção do mel pelas abelhas é o néctar ou a excreção de afídios ou o exsudato de plantas ou mesmo frutas. O néctar é a matéria-prima para a produção de méis florais que são os mais apreciados e alcançam os maiores preços no mercado. O mel floral pode ser monofloral, quando o néctar é coletado de uma única espécie vegetal; polifloral, se mais de uma espécie de planta contribui com o néctar; silvestre, que se caracteriza por ser um mel polifloral produzido em vegetação primária e, portanto, espécies nativas contribuem com o néctar. O mel extrafloral não é produzido a partir do néctar e, sim, de exsudato de plantas ou de restos de frutas ou outra fonte de matéria-prima. Os méis florais são caracterizados por análise microscópica que identifica e quantifica os grãos de pólen. Atualmente, existe um grande interesse em se caracterizar o mel através da análise polínica juntamente com a físico-química. A análise polínica depende de grande experiência por parte do analista já que é desenvolvida através da comparação da morfologia do pólen com descrições da literatura. A matéria-prima para produção dos méis de melato é oriunda da excreção de artrópodes (insetos) da ordem Homoptera conhecidos como afídeos (ex. pulgões) que sugam o fluído do floema (vaso condutor de material orgânico nas plantas)³. Esses insetos excretam um líquido adocicado na forma de gotas através do canal alimentar. Esse líquido se deposita na parte externa das folhas e em outras partes da planta. A abelha coleta esse líquido e o utiliza como matéria-prima para produção de mel. Frequentemente, os méis de melato são classificados em 2 tipos: aqueles ricos em melezitose que são sujeitos à granulação, e os ricos em erlose que não sofrem granulação⁴. Geralmente, as abelhas preferem coletar o néctar como matéria-prima, utilizando outras fontes no período de baixa disponibilidade de néctar. Os méis de melato só apresentam valor de mercado na Europa Central; em outras

regiões são considerados inferiores, do ponto de vista estético, aos méis florais. Portanto, o enfoque principal desta revisão é o mel floral. Neste trabalho é abordada a composição de glicídios, sua origem e sua aplicação na avaliação da qualidade do mel.

MONOSSACARÍDIOS

INTRODUÇÃO

A fração monossacarídica do mel é composta basicamente pelos açúcares simples frutose e glicose. A presença desses monossacarídios no mel foi descrita em uma série de trabalhos^{5,6,7}. Em 1954⁸, por exemplo, 21 amostras de mel que representavam 19 fontes florais diferentes foram analisadas através da cromatografia de adsorção seletiva e de métodos analíticos descritos anteriormente na literatura (p. ex. polarimetria)⁹. Os resultados obtidos demonstraram que a fração monossacarídica desses méis consistia de glicose e frutose. Em 1975¹⁰, foi descrito um método simples para a detecção e quantificação da frutose e da glicose em amostras de mel empregando-se a cromatografia gasosa (CG). Nesse método, alíquotas secas de mel eram tratadas com o ácido n-butanoborônico em piridina de modo que os monossacarídios eram convertidos em derivados n-butanoborônicos cíclicos. Subseqüentemente, a trimetilsililação produzia derivados voláteis separáveis pela CG. A grande vantagem desse método era fornecer picos únicos para a frutose e a glicose das amostras de mel e néctar estudadas. Os métodos de CG que utilizavam apenas a trimetilsililação geravam picos múltiplos para esses compostos, o que prejudicava consideravelmente sua quantificação^{11,12,13,14,15}. Apesar da vantagem mencionada acima e da boa reprodutibilidade do método em questão, ainda é necessário estabelecer a exatidão do mesmo. A determinação de frutose e glicose por CG também pode ser realizada de modo vantajoso transformando esses monossacarídios em seus derivados de trimetilsililoxima com base em uma técnica desenvolvida em 1977¹⁶ e modificada posteriormente¹⁷. Pela aplicação dessa técnica modificada, a frutose e a glicose renderam (cada uma separadamente) apenas um pico, já que os isômeros de cada um desses glicídios não foram separados pela coluna usada no estudo (coluna empacotada OV-17). A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) também pode ser empregada de modo eficaz para a análise dos dois monossacarídios em questão. Nesse contexto,

* e-mail: cabm@acd.ufrj.br/ricardo@acd.ufrj.br

podemos destacar o emprego da cromatografia de troca aniônica em conjunto com um detector amperométrico¹⁸ e da cromatografia de fase normal (Supelcosil-NH₂, Lichrosphere-5-NH₂, etc.) com uma mistura de acetonitrila e água como eluente e um detector de índice de refração (IR)^{19,20}.

Além da frutose e da glicose, a presença do monossacarídeo D-galactose, em quantidades traços, também já foi relatada em amostras de mel²¹. Entretanto, é importante ressaltar que esse monossacarídeo quando na sua forma livre é considerado um composto tóxico para as abelhas³.

COMPOSIÇÃO

Há vários estudos sobre a composição da fração monossacarídica do mel. Em um trabalho, 21 amostras de mel dos EUA foram examinadas e os valores médios encontrados para glicose e para frutose foram, respectivamente, 32,29g %* 39,28g %⁸. White e colaboradores²², acreditando que maiores conhecimentos à respeito das fontes florais, idade, área de produção e ano de colheita de amostras de mel poderiam ser úteis para os produtores, realizaram um amplo estudo com 504 amostras de mel (82 tipos florais simples e 93 combinações de composição conhecida) de 47 estados norte-americanos. Os teores médios de glicose e frutose encontrados nesse estudo para méis florais foi de 31,28g % e 38,19g %, respectivamente. Já para os 14 méis de melato presentes, os teores médios de glicose e frutose foram 26,08g % e 31,80g %, respectivamente. Em 1968²³, experimentos que empregavam a CG foram conduzidos com o intuito de verificar a reprodutibilidade desse método na análise quantitativa de glicídios do mel. Para a realização desses experimentos os glicídios tiveram que ser convertidos em seus derivados voláteis de per(trimetilsilil). Quatro determinações diferentes em uma amostra de melato forneceram os seguintes valores para a D-frutose: 36,7g %; 37,0g %; 36,8g % e 37,2g %. Já para a D-glicose os valores relatados foram os seguintes: 27,8g %; 28,0g %; 27,5g % e 28,0g %. Em um outro estudo, vários méis de diferentes partes do Canadá foram avaliados com o intuito de se padronizar os méis desse país³. As análises foram conduzidas separando-se os glicídios através de cromatografia em papel, eluindo-se quantitativamente e determinando-se seus teores espectrofotometricamente por um método descrito previamente^{24,25}. Os dados obtidos para 95 amostras analisadas mostraram que apenas 4,2 % dos méis possuíam o teor de monossacarídios abaixo de 65g %, 32,6 % entre 65g % e 70g % e 63,2 % acima de 70g %. Nesses méis o teor médio de frutose (37,1g %) foi significativamente maior do que o teor médio de glicose (33,7g %). Alguns autores¹⁰ empregaram a CG e uma técnica de derivatização na qual os monossacarídios eram tratados com o ácido butanoborânico em piridina antes da etapa de trimetilsililação. Valores apreciavelmente mais elevados do que os normalmente citados na literatura³, foram encontrados. Por exemplo, em três das quatro amostras de mel analisadas o conteúdo de frutose foi relatado como sendo superior a 40g % e, em um caso, o conteúdo de glicose foi de 40,6g %. Segundo Siddiqui, o limite de 65g % para o teor de açúcar invertido (D-glicose + D-frutose) abrange todos ou, pelo menos, a maioria dos méis originários de néctar³. Nesse contexto, os méis poliflorais apresentam conteúdos de D-frutose e D-glicose em proporções quase iguais. Por outro lado, méis monoflorais como o mel de sálvia e de castanha doce contêm, de modo significativo, mais D-frutose do que D-glicose^{26,22}. Já os méis de melato são pobres em ambas as hexoses²². Méis ricos em D-glicose são raros, p. ex., o mel de colza^{26,22}. Os teores de frutose e glicose são os principais responsáveis pelo tipo de desvio que o mel produz no plano da luz polarizada. De modo geral, como nos méis florais há

predominância de frutose, estes devem ser levorotatórios. Já o melato e alguns méis adulterados são geralmente dextrorotatórios. No estudo de Perez-Arquillué e colaboradores²⁷, a maior parte das amostras (85,2 %) foi classificada como levorotatória e apenas quatro amostras com teores elevados de sacarose (3,21g % em média), foram classificadas como dextrorotatórias. Usando uma técnica de CG-DIC, baseada originalmente em um método descrito na literatura¹⁶ que foi posteriormente modificado²⁸, no qual derivados de trimetilsililoximas de glicídios eram separados e quantificados, esses mesmos autores²⁷ determinaram que os valores médios para os teores de frutose e glicose de 27 amostras de mel de alecrim da Espanha foram de 36,6g % e 31,2g %, respectivamente. Para esses méis, a razão frutose/glicose (F/G) foi de 1,17, uma proporção que estava levemente fora da faixa proposta anteriormente²⁹ para méis do tipo alecrim (1,06 - 1,13). Em um outro trabalho¹⁸, usando a cromatografia de troca aniônica em conjunto com um detector amperométrico, foram encontrados valores médios de 36,2-38,5g % e 33,2-40,0g % para frutose e glicose, respectivamente, em quatro tipos diferentes de mel. Um estudo realizado com diferentes méis (p. ex., acácia, tília, castanha doce, girassol, eucalipto, sálvia, asclépsia e melato), utilizando um sistema de CLAE composto de uma coluna de gel de sílica ligada a grupos amino (Supelcosil-NH₂, 250 x 4.6 mm, partículas de 5 µm de tamanho), acetonitrila:água (83:17 - v/v) como fase móvel e um detector de IR, mostrou que o mel de acácia possuía o maior teor de frutose (49,59g %) e o menor teor de glicose (30,44g %) entre os méis estudados¹⁹. Consequentemente, o mel de acácia se caracteriza por uma razão F/G elevada¹⁹. Esses dados estão em concordância com estudos descritos previamente na literatura³⁰. Em outro estudo, a composição de glicídios dos méis monoflorais mais importantes da Espanha (alecrim, flor de laranjeira, alfazema, girassol, eucalipto, urze e melato) foi analisada³¹. Os monossacarídios foram determinados por CG após a obtenção de derivados de trimetilsililoxima seguindo uma técnica descrita anteriormente¹⁶ o qual foi modificada alguns anos depois¹⁷. Os méis de melato apresentaram concentrações baixas de frutose (34,3g %). Em compensação, os níveis de frutose foram elevados nos méis de eucalipto, alfazema e, especialmente, nos méis de girassol (média = 39,4g %). Já os méis de flor de laranjeira, alecrim e urze apresentaram níveis de frutose intermediários. Com relação ao teor de glicose, os méis de melato apresentaram um valor médio baixo (25,8g %), o mel de girassol apresentou um valor elevado (35,4g %) e os demais tipos de mel ficaram em situação intermediária. A observação de que os méis de girassol apresentavam os maiores conteúdos para ambas as hexoses estava em concordância com a composição de monossacarídios dos néctares da família Asteraceae³². O conteúdo de monossacarídios foi analisado em 74 méis de diferentes tipos florais correspondentes a 14 estados brasileiros²⁰. Nesse estudo, a CLAE foi utilizada conforme um trabalho anterior, sendo composta de uma coluna de fase amino e detector de IR³³. Os conteúdos de frutose e glicose das amostras analisadas estavam na faixa de 22,8 - 47,2g % e 24,0 - 38,7g %, respectivamente. Esses valores foram considerados similares aos valores encontrados para méis de outras origens geográficas^{4,27}. A soma da frutose com a glicose mostrou que 97% dos méis analisados estavam dentro do limite (> 60 g/100 g) sugerido anteriormente para a "Europe Union and Codex Alimentarius Standards"³⁴.

ORIGEM

O mel é uma solução concentrada de dois monossacarídios: D-frutose e D-glicose. Para entender a origem desses monossacarídios nos méis florais é necessário conhecer a composição de glicídios do néctar. Em 1886³⁵, já se tinha evidências da presença de D-frutose, D-glicose e sacarose no néctar. Além

* g% significa gramas do glicídeo em cada 100 gramas da amostra.

de se conhecer a composição de glicídios do néctar usado pelas abelhas para produzir o mel, é também necessário entender a ação da enzima invertase que catalisa a hidrólise da sacarose liberando frutose e glicose.

Percival³⁶ examinou 889 espécies de plantas e encontrou três padrões de composição de glicídios para o néctar: (a) néctar com alto teor de sacarose, (b) néctar com quantidades aproximadamente iguais de glicose, frutose e sacarose e (c) néctar com alto teor de glicose e frutose. O néctar com sacarose dominante foi associado a flores de tubos longos nos quais o néctar era protegido (trevos), enquanto as flores abertas continham geralmente apenas glicose e frutose. Essas descobertas confirmaram estudos anteriores^{37,38,26} que sugeriram uma relação entre a taxa desses três glicídios e as diferentes espécies de flor. Em um outro estudo, os néctares foram divididos em quatro classes diferentes em função da razão sacarose/hexose (S/H): sacarose dominante (S/H > 0,999), rico em sacarose (0,5 < 0,999), rico em hexose (0,1 < 0,499) e hexose dominante (S/H < 0,1)³².

No caso dos méis de melato, devemos conhecer a composição de glicídios da excreção dos insetos que sugam o fluido do floema (vaso condutor de material orgânico nas plantas)³. Os depósitos das excreções de afídios usados para a produção de melato foram analisados por vários grupos e foram sugeridas evidências de que esses depósitos são misturas de glicídios um pouco mais complexas do que aquelas do néctar. Sabe-se que a glicose, a frutose, a sacarose e a melezitose são constituintes dessas excreções de afídios^{39,40,22}.

Com base no que foi relatado acima, é fácil perceber que a frutose e a glicose existentes no mel podem já estar presentes, em maior ou menor grau, nos substratos utilizados para gerar esse produto ou podem ser produzidos pela inversão da sacarose através da ação da enzima invertase.

IMPORTÂNCIA

Os teores de frutose e glicose são extremamente importantes para o estabelecimento de uma série de características do mel. A glicose, por exemplo, é o monossacarídeo responsável pela granulação do mel. O maior problema resultante dessa precipitação de glicose é o aumento do teor de umidade da fase líquida que permite que células de leveduras osmofílicas (microorganismos que se desenvolvem em condições desfavoráveis: atividade de água baixa e concentração de glicídios alta), que ocorrem naturalmente no mel, se multipliquem e provoquem a fermentação do produto. Em um trabalho, foram obtidos resultados em relação à solubilidade da glicose em soluções de frutose⁴¹. As concentrações dos glicídios foram similares às encontradas no mel. Foi verificado que a glicose se tornava mais solúvel a medida que a concentração de frutose aumentava. A explicação fornecida para essa observação foi baseada em um equilíbrio entre a glicose anidra e a glicose monoidratada (a forma encontrada no mel granulado). Foi sugerido que em níveis de frutose elevados, o equilíbrio favorece a forma anidra da glicose, que apresenta uma maior solubilidade em água⁴¹. A importância desse equilíbrio para a granulação foi sustentada por um outro autor que observou que em soluções saturadas com frutose, a temperatura de transição da glicose monoidratada para a glicose anidra estava abaixo de 30°C⁴². Pode-se concluir, então, que méis com teores de frutose elevados e baixos teores de glicose são menos suscetíveis à granulação, fenômeno este que diminui a aceitação desses produtos naturais por parte dos consumidores. Outros autores²² demonstraram estatisticamente que a tendência de granulação poderia ser estimada através da razão glicose/água (G/A), descrita em um trabalho anterior⁴³, ou da razão G-A/F (G, glicose; F, frutose; A, água). Foi demonstrado que a razão G/A fornece a relação mais significativa com a tendência de granulação. Além disso, a obtenção desse índice necessitava apenas da

determinação do teor de glicose e do teor de umidade. Razões G/A de 1,70 e inferiores estavam associadas a não granulação do mel, enquanto valores de 2,10 e superiores indicavam uma rápida granulação. Entretanto, um estudo com 54 amostras de mel de todo o mundo sugeriu que existe apenas uma correlação vaga entre a razão G/A ou F/A e a tendência de granulação¹⁵. Foi descoberto que em apenas 40 - 50% das amostras a granulação podia ser prognosticada a partir dessas razões. Um outro autor, trabalhando com uma grande quantidade de amostras do Canadá (95 amostras), confirmou a ineficácia desses índices para o prognóstico da granulação em méis³. Expressando os resultados obtidos por cromatografia em papel através das razões F/G, (G-A)/F e G/A e comparando esses dados com a taxa de granulação observada para cada amostra durante 6 meses através de um método descrito na literatura²², não foi encontrada para essas amostras uma relação entre a taxa de granulação e qualquer um dos índices usados³. Foi sugerido, então, que o fator verdadeiramente envolvido com a granulação seria a presença ou ausência de germens de cristalização.

A acidez do mel também está fortemente associada ao monossacarídeo D-glicose. Esse monossacarídeo é convertido, através da ação da enzima D-glicose oxidase, no ácido glicônico⁴⁴. Esse ácido constitui de 70 a 90% dos ácidos orgânicos do mel^{45,46}. A acidez do mel é regida pela presença desse ácido e de sua lactona. Durante o processo de conversão da D-glicose no ácido D-glicônico ocorre, também, a formação do peróxido de hidrogênio (H₂O₂)⁴⁴. Sabe-se agora que a inibina, nome dado a uma substância com propriedades antibacterianas no mel, é na realidade o peróxido de hidrogênio.

Outra importante função encontrada para os monossacarídeos do mel é a utilização, de modo complementar à análise polínica, na identificação de determinados tipos de méis. Com esse intuito o teor de frutose, o teor de glicose e a relação F/G podem ser empregados. Földházi¹⁹, por exemplo, estudou a composição de vários méis através de um sistema de CLAE e percebeu que os méis em estudo poderiam ser classificados em 5 grupos em função do teor de frutose: mel de acácia (≅ 49g %), asclépsia, sálvia, castanha doce e méis florais misturados (45 - 46g %), tília, girassol e méis de eucalipto (42 - 43g %), mel de crista de galo (≅ 36g %) e mel de melato (≅ 32g %). Ao estudar alguns méis de alecrim da Espanha, alguns autores sugeriram que a razão F/G poderia ser utilizada para distinguir méis de diferentes origens botânicas²⁷. Esse parâmetro apresentou uma variação consideravelmente baixa entre as amostras (DP = ± 0,05). Em um outro trabalho, foram estudados os principais méis uniflorais da Espanha (alecrim, flor de laranjeira, alfazema, girassol, eucalipto, urze e melato)³¹. Utilizando o Teste de Tukey (P = 0,95) os autores organizaram os méis em uma variedade de padrões que dependia do glicídeo sob consideração. Com base no teor de frutose, o teste de Tukey forneceu um grupo único para os méis de melato. De acordo com o conteúdo de glicose três grupos foram bem separados pelo teste de Tukey: méis de melato, méis de girassol e demais tipos de mel em estudo. A razão F/G dividiu a população de méis estudados em quatro grupos de acordo com o método de Tukey, embora cada um tenha se sobreposto com pelo menos dois outros grupos devido a ampla distribuição desse parâmetro. Nesse caso, os méis de melato e de urze, com as maiores razões F/G, formaram um grupo que não se sobrepôs ao grupo dos méis de girassol e alecrim, com razões F/G menores. As razões F/G para os méis de flor de laranjeira e eucalipto da Espanha foram superiores aos valores noticiados para os méis florais italianos⁴⁷, mas estão em concordância com os dados publicados previamente para os méis de eucalipto australianos⁴⁸. A razão G/A forneceu três grupos de acordo com o teste de Tukey. O grupo dos méis de eucalipto e girassol apresentou valores que foram significativamente superiores aos valores dos outros tipos de méis. Os méis de alfazema formaram um grupo único, com razões G/A intermediárias. As

razões G/A elevadas dos méis de girassol da Espanha se correlacionaram bem com seus níveis elevados de glicose e suas umidades baixas, uma vez que eles são méis de verão, reunidos e colhidos em áreas quentes da Espanha. A razão G/A elevada dos méis de eucalipto é devido principalmente a seu baixo conteúdo de água. Dentre outros parâmetros, o teor de frutose, glicose e a razão G/A foram selecionados, pelo programa de análise de discriminação usado neste trabalho, como os índices mais valiosos para estabelecer uma classificação acurada das amostras de mel em função de sua origem. Esses mesmos autores³¹ publicaram um segundo trabalho que mostrou que o teor de frutose foi um dos principais parâmetros discriminadores dos sete tipos de amostras de méis monoflorais comerciais da Espanha⁴⁹. Alguns autores estudaram 74 méis de diferentes tipos florais correspondentes a 14 estados brasileiros²⁰. Dessa vez, o teor de frutose, o teor de glicose e a razão F/G foram os índices mais importantes para a caracterização dos méis em função de suas regiões de origem. Por exemplo, entre as regiões brasileiras o maior conteúdo de frutose foi encontrado nos méis de eucalipto do sudeste. De modo contrário, foi relatado que os méis de eucalipto da Zona da Mata (estado de Minas Gerais - região sudeste) apresentavam um nível de frutose baixo⁵⁰. Em relação ao valor médio de frutose, glicose e à razão F/G, não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as regiões brasileiras²⁰. Entretanto, os méis de eucalipto do estado de São Paulo apresentaram um valor médio para a frutose (44,2g %) consideravelmente maior do que aqueles de outros estados brasileiros (40,2 - 41,3g %) e daqueles produzidos na Espanha (37,0 - 39,2g %)³¹. Consequentemente, os autores sugeriram que os méis de eucalipto do estado de São Paulo poderiam ser caracterizados com base em seu conteúdo de frutose²⁰. Apenas duas amostras do estado da Paraíba apresentaram a razão F/G abaixo de 1, fato que foi associado ao baixo teor de frutose (< 30g %). Como estabelecido em um trabalho anterior, as amostras de mel com uma razão F/G menor do que 1 poderiam ser classificadas como méis adulterados⁵¹. Por outro lado, uma atividade metabólica peculiar de leveduras osmofílicas é que, quando elas crescem em alimentos que contêm alguns glicídios simples como uma fonte de carbono, a frutose é preferencialmente assimilada; essa propriedade é denominada de frutofilia⁵². Uma vez que esse tipo de levedura cresce em méis com umidade acima de 20 % e, também, em regiões de clima favorável (temperaturas anuais altas), foi sugerido que esses microrganismos foram responsáveis pela diminuição da razão F/G nos dois méis da Paraíba²⁰. De fato, durante a análise microscópica para a identificação polínica, foi evidenciada a presença de leveduras nesses méis. Portanto, uma razão F/G abaixo de 1 poderia ser originária de adulteração com açúcar comercial queimado ou do crescimento de leveduras osmofílicas. Além disso, reações não enzimáticas como p. ex., a de reversão (condensação de monossacarídios por catálise ácida) poderiam ocorrer à temperatura ambiente e em pH baixo, favorecendo a formação de oligossacarídios com concomitante perda de frutose²². No mesmo trabalho foi ressaltado que em pH baixo também pode ocorrer a formação de anidridos difrutosídicos.

OLIGO- E POLISSACARÍDIOS

INTRODUÇÃO

No início do século 20, a composição de glicídios no mel era considerada como uma mistura de glicose, frutose e sacarose. A partir da década de 20, foram obtidas evidências da presença de maltose em méis florais através da formação de sua osazona característica⁵³. Entretanto, outros autores^{54,55} concluíram que as evidências obtidas por Elser⁵³ não eram suficientes para se considerar a maltose como um constituinte do mel. Mais tarde, foi demonstrado a presença de pelo menos 15

componentes, entre eles: maltose, turanose, isomaltose e melibiose⁵⁶. Outros autores, baseados nos resultados obtidos por eletroforese em papel e espectroscopia por infravermelho, confirmaram a presença de maltose e a ocorrência de outros dissacarídeos (ex. maltulose, turanose)^{21,57}. Em um outro trabalho, os glicídios foram isolados em coluna de carvão e 22 componentes foram detectados, dos quais 15 foram classificados como cetoses⁵⁸. A identificação inequívoca de oligossacarídios foi conduzida em um outro estudo, através da formação de octacetatos cristalinos, no qual a maltose, a nigerose, a isomaltose e a kojibiose (sugerida pela primeira vez como um dos oligossacarídios do mel) foram detectadas⁵⁹. A presença de leucrose também já foi descrita⁵⁹, porém, não foi confirmada em trabalhos subsequentes^{18,19,31,60,61,62}.

Um fracionamento em larga escala foi conduzido através do uso de coluna de carvão-celite, separação por cromatografia em papel e, em menor grau, por eletroforese em papel, revelação com reagentes específicos, identificação das osazonas características e, em alguns casos, obtenção de espectros na região do infravermelho^{60,63}. Estes autores identificaram 24 oligossacarídios, com a descrição pela primeira vez de 2 β -dissacarídeos: gentiobiose e laminaribiose. A presença desses 2 dissacarídeos foi confirmada em estudos subsequentes^{18,61}. Em um trabalho, foi sugerida a presença de α,β -trealose (neotrealose)⁶⁰, entretanto, nenhum outro autor detectou até o momento esse dissacarídeo no mel. Nem a α,α -trealose (trealose) nem a neotrealose foram detectadas de maneira inequívoca no mel, embora, a trealose seja um constituinte importante da fração glicídica do fluido circulante de abelhas operárias, rainhas e zangões⁶⁴. A identificação de oligossacarídios com resíduos de galactose (α -galactosídeos) tem sido motivo de controvérsia na literatura. Alguns autores não encontraram vestígios da presença de α -galactosídeos^{13,18,60,61,63}. Apesar disto, a melibiose tem sido identificada por diferentes autores^{23,56,62,65}.

A CG-DIC foi usada para o estudo de oligossacarídios do mel através da combinação das reações de redução com boroidre de sódio e trimetilsililação com N-trimetilsilimidazol⁶¹ ou formação de um derivado éter trimetilsililoxima dos glicídios a partir da reação com hexametildisilazano e hidroxilamina³¹. As maiores limitações para o uso desta técnica são: a formação de espécies tautoméricas dos glicídios redutores e a necessidade de formação de um derivado volátil do glicídeo. Mesmo assim, foram identificadas pela primeira vez a celobiose e a palatinose, esta última confirmada por ressonância magnética nuclear-carbono 13⁶¹. Enquanto a celobiose não foi detectada por outros autores, a palatinose foi detectada em uma amostra de mel de alfafa¹⁸. A CLAE foi usada a partir da década de 90 para análise de oligossacarídios no mel^{18,19,62}. Alguns autores usaram coluna de fase amino e detector de IR. As maiores limitações foram: a resolução dos oligossacarídios e a sensibilidade do detector^{19,62}. Em um outro trabalho, foram utilizadas duas colunas de troca aniônica acopladas em série e um detector amperométrico, o qual é mais sensível que o de IR, para analisar oligossacarídios¹⁸. Esta última técnica mostrou-se mais adequada para análise de glicídios no mel porém, o custo é bem mais elevado em comparação com a metodologia de CLAE composta de fase amino e detector de IR. Além do mais, embora a resolução tenha melhorado bastante com o uso das 2 colunas de troca aniônica em série, os autores não conseguiram separar os pares isomaltose/maltulose, maltose/1-cestose e turanose/gentiobiose¹⁸.

Ao todo 15 dissacarídeos foram descritos na literatura como constituintes da matriz mel. Alguns dissacarídeos, entretanto, ainda carecem de estudos mais detalhados para sua confirmação como glicídios do mel. Na Tabela 1 é apresentada uma listagem dos dissacarídeos do mel descritos na literatura.

As primeiras evidências da presença de trissacarídeos em méis florais foram sugeridas por diferentes autores^{21,66,67,68}. Somente a partir de um trabalho executado em larga escala é

Tabela 1. Listagem de di- e trissacarídeos descritos no mel.

| nome trivial | nome sistemático |
|-------------------------|--|
| <i>dissacarídeos</i> | |
| celobiose | O-β-D-glicopiranosil-(1 → 4)-D-glicopiranosose |
| gentiobiose | O-β-D-glicopiranosil-(1 → 6)-D-glicopiranosose |
| isomaltose | O-α-D-glicopiranosil-(1 → 6)-D-glicopiranosose |
| isomaltulose | O-α-D-glicopiranosil-(1 → 6)-D-frutofuranose |
| kojibiose | O-α-D-glicopiranosil-(1 → 2)-D-glicopiranosose |
| laminaribiose | O-β-D-glicopiranosil-(1 → 3)-D-glicopiranosose |
| leucrose | O-α-D-glicopiranosil-(1 → 5)-D-frutopiranosose |
| maltose | O-α-D-glicopiranosil-(1 → 4)-D-glicopiranosose |
| maltulose | O-α-D-glicopiranosil-(1 → 4)-D-frutose |
| melibiose | O-α-D-galactopiranosil-(1 → 6)-D-glicopiranosose |
| neotrealose | O-α-D-glicopiranosil-β-D-glicopiranosídeo |
| nigerose | O-α-D-glicopiranosil-(1 → 3)-D-glicopiranosose |
| palatinose | O-α-D-glicopiranosil-(1 → 6)-D-frutose |
| sacarose | O-α-D-glicopiranosil-β-D-frutofuranosídeo |
| turanose | O-α-D-glicopiranosil-(1 → 3)-D-frutose |
| <i>trissacarídeos</i> | |
| centose | O-α-D-glicopiranosil-(1 → 4)-O-α-D-glicopiranosil-(1 → 2)-D-glicopiranosose |
| 1-cestose | O-α-D-glicopiranosil-(1 → 2)-β-D-frutofuranosil-(1 → 2)-β-D-frutofuranosídeo |
| erlose | O-α-D-glicopiranosil-(1 → 4)-α-D-glicopiranosil-β-D-frutofuranosídeo |
| 4-α-gentiobiosilglicose | O-β-D-glicopiranosil-(1 → 6)-O-α-D-glicopiranosil-(1 → 4)-D-glicopiranosose |
| 3-α-isomaltosilglicose | O-α-D-glicopiranosil-(1 → 6)-O-α-D-glicopiranosil-(1 → 3)-D-glicopiranosose |
| isomaltotriose | O-α-D-glicopiranosil-(1 → 6)-O-α-D-glicopiranosil-(1 → 6)-D-glicopiranosose |
| isopanose | O-α-D-glicopiranosil-(1 → 4)-O-α-D-glicopiranosil-(1 → 6)-D-glicopiranosose |
| laminaritriose | O-β-D-glicopiranosil-(1 → 3)-O-β-D-glicopiranosil-(1 → 3)-D-glicopiranosose |
| maltotriose | O-α-D-glicopiranosil-(1 → 4)-O-α-D-glicopiranosil-(1 → 4)-D-glicopiranosose |
| melezitose | O-α-D-glicopiranosil-(1 → 3)-O-β-D-frutofuranosil-(2 → 1)-α-D-glicopiranosídeo |
| panose | O-α-D-glicopiranosil-(1 → 6)-O-α-D-glicopiranosil-(1 → 4)-D-glicopiranosose |
| rafinose | O-α-D-galactopiranosil-(1 → 6)-O-α-D-glicopiranosil-β-D-frutofuranosídeo |
| teanderose | O-α-D-glicopiranosil-(1 → 6)-α-D-glicopiranosil-β-D-frutofuranosídeo |

Informações extraídas da literatura: celobiose e palatinose⁶¹, laminaritriose¹⁸, rafinose⁶² e outros glicídios^{3,4}.

que houve a confirmação da presença de trissacarídeos no mel⁶³. Foi noticiada a identificação inequívoca de 9 trissacarídeos e sugerida a presença de outros dois: a 3-α-isomaltosilglicose e a 4-α-gentiobiosilglicose as quais não receberam nomes triviais. A concentração em coluna de carvão-celite, a separação por cromatografia e eletroforese em papel e a cromatografia em camada fina combinada com hidrólise ácida e enzimática foram os procedimentos usados. A melezitose, 3-α-isomaltosilglicose, maltotriose e isomaltotriose foram caracterizadas como β-undecacetatos cristalinos⁶³. A melezitose e a maltotriose têm sido identificadas por diferentes autores^{18,19,27,31,61,62,69}. Após a identificação de isomaltotriose em um estudo prévio⁶³, somente Swallow e Low¹⁸, usando CLAE composta de detector amperométrico e coluna de troca aniônica, foram capazes de detectar esse trissacarídeo em méis de alfafa e trevo híbrido. A identificação de 3-α-isomaltosilglicose e 4-α-gentiobiosilglicose carece de outros estudos para sua confirmação ou não como trissacarídeos presentes no mel.

Em um trabalho pioneiro⁶⁷, a erlose foi caracterizada pela primeira vez em méis florais e confirmada em várias publicações subsequentes^{18,19,27,31,61,63}. Siddiqui e Furgala⁶³ identificaram a 6-α-glicosil-sacarose (teanderose) ao verificarem que o trissacarídeo isolado do mel, quando submetido à hidrólise parcial com ácido sulfúrico e amiloglicosidase, apresentava um perfil de dissacarídeos idêntico a um padrão autêntico de teanderose sujeito as mesmas condições de hidrólise. Um derivado peracetilado foi obtido para cada um e, ambos os derivados apresentaram comportamentos similares quando submetidos à cromatografia em camada fina. A teanderose foi assim denominada em homenagem ao Dr. O. Theander que foi o primeiro a isolar este trissacarídeo em *Aspergillus Niger*⁷⁰. A teanderose foi detectada em diferentes amostras de méis

monoflorais por outros autores^{18,61}. Tanto a 2α-maltosilglicose (centose) como a 1-cestose foram identificadas e descritas somente uma vez no mel⁶³. As ligações entre os monossacarídeos foram estabelecidas pela caracterização dos ésteres metílicos de glicídios obtidos após as reações de metilação e hidrólise dos trissacarídeos. No caso da 1-cestose, a utilização da CLAE não permitiu a sua separação da maltose¹⁸; enquanto, que pela CG, um padrão deste trissacarídeo foi bem separado⁶¹. Entretanto, os últimos autores não identificaram 1-cestose em amostras de mel. Tanto a panose como a isopanose foram detectadas e identificadas em trabalhos diferentes^{18,61,62,63}, sendo que na penúltima referência⁶² somente a panose foi identificada. As vantagens e desvantagens da CLAE e CG para análise de trissacarídeos em mel são as mesmas das encontradas para determinação de dissacarídeos.

A presença de laminaritriose no mel foi descrita na literatura¹⁸. Foi encontrado somente traços deste trissacarídeo em mel de alfafa. Não há qualquer outra menção na literatura sobre a identificação deste trissacarídeo em amostras de mel. A rafinose foi sugerida pela primeira vez em uma publicação⁵⁶ e descrita em trabalhos subsequentes^{68,71}. Entretanto, a presença de rafinose no mel foi contestada devido à ausência de galactose como um monossacarídeo constituinte do mel⁶³. O argumento usado nesse último trabalho foi que a cromatografia em papel usada para identificar a rafinose não seria suficiente para confirmar a presença deste trissacarídeo, já que ele tem comportamento similar a teanderose. Como já mencionado na seção dissacarídeos, alguns autores não identificaram α-galactosídeos no mel^{13,18,61}. Entretanto, em um outro trabalho, foram analisados 87 méis provenientes de várias regiões dos EUA onde constatou-se a presença de resíduos de galactose em todas as amostras⁷². Esses autores usaram galactose oxidase para

oxidar resíduos de galactose terminal com a hidroxila da posição 6 livre o qual é característico da rafinose. Além do mais, a rafinose tem sido identificada por diferentes autores através da CLAE usando coluna amino e detector de IR⁶² e da CG-DIC^{31,73}.

Um total de 13 trissacarídeos foi detectado no mel, porém, alguns necessitam de estudos adicionais para sua confirmação como constituintes do mel. Na Tabela 1 é apresentada uma listagem dos trissacarídeos do mel descritos na literatura.

Além de di- e trissacarídeos já identificados no mel, alguns autores tem sugerido a presença de outros oligossacarídeos e também de polissacarídeos. Foi noticiada a presença de um tetrassacarídeo e de um pentassacarídeo em uma amostra de mel do Canadá⁶³. As evidências para identificação da isomaltotetraose e da isomaltopentose foram baseadas no perfil de tri-, di- e monossacarídeos obtidos após hidrólise parcial com ácido sulfúrico e com amiloglicosidase e na determinação das rotações específicas de cada um.

Embora os componentes coloidais do mel sejam pouco estudados seus efeitos indesejáveis são descritos desde a década de 30^{74,75,76}. A tendência do mel à turbidez, caramelização e cristalização seria aumentada pela presença de colóides. Essas substâncias foram identificadas como cêras, agregados de proteínas e polissacarídeos. Helvey⁷⁷, usando eletroforese em papel e análise de sedimentação em mel de trigo sarraceno obteve três polímeros: duas proteínas e um polissacarídeo, sendo este último o componente minoritário com massa molecular de cerca de 9.000Da. Um estudo detalhado da fração polissacarídica de um mel do Canadá foi descrita na literatura⁷⁸. A hidrólise ácida do polissacarídeo rendeu três monossacarídeos: D-manose, D-galactose e L-arabinose (razão 1,0:4,04:2,04). A hidrólise parcial seguida de reação de metilação rendeu 7 fragmentos que foram caracterizados por completo. Foi concluído que o polissacarídeo era constituído de 22-23 resíduos de monossacarídeos que consistiam de 6 resíduos terminais não redutores compostos de: 3 D-manose, 2 D-galactose e 1 L-arabinose; 5 a 6 resíduos de D-galactose compoem a parte ramificada do polissacarídeo através das ligações O-3 e O-6; 11 unidades não terminais consistindo de 6 resíduos de D-galactose unidos pela ligação (1 -> 6); 5 resíduos de L-arabinose onde 4 foram unidos pela ligação (1 -> 5) e/o (1 -> 4) e 1 unido pela ligação (1 -> 3)⁶⁸. A rápida difusão do polissacarídeo em uma ultracentrífuga possibilitou estimar a sua massa molecular em menos de 10.000. Infelizmente, nenhum estudo foi realizado para formular a estrutura química deste polissacarídeo. Foi noticiada a presença de outros polissacarídeos, contudo, o isolamento e a caracterização não foi possível devido as pequeníssimas quantidades destes componentes no mel³.

COMPOSIÇÃO

Embora a fração dissacarídica seja complexa no mel, não existem muitos estudos sobre a sua composição nessa matriz alimentícia. Em um outro estudo, foram examinados 21 méis monoflorais dos EUA onde foram encontrados 7,11 % de maltose, 1,62 % de sacarose e 1,03 % de uma fração glicídica desconhecida⁸. Os glicídios foram adsorvidos em coluna de carvão-celite e seletivamente eluídos a partir de um gradiente de etanol. Nesse trabalho, a maltose foi expressa pelo conteúdo de dissacarídeos redutores determinados pela redução do íon cúprico a cuproso e a sacarose foi estimada através do aumento do poder redutor da fração após hidrólise ácida. Portanto, esses resultados superestimaram o conteúdo de maltose e sacarose em méis dos EUA. A composição de dissacarídeos individuais só foi melhor desvendada a partir de um trabalho que foi mencionado anteriormente⁶⁰. Foi estimada a distribuição percentual de dissacarídeos a partir do conteúdo total de oligossacarídeos (3,65 %) em base seca e obtido os seguintes resultados para méis do Canadá: 29,4 % de maltose; 8,2 % de

kojibiose; 4,7 % de turanose; 4,4 % de isomaltose; 3,9 % de sacarose; 3,1 % de maltulose + isomaltulose; 1,7 % de nigerose; 1,1 % de neotrealose; 0,4 % de gentiobiose e 0,09 % de laminariobiose. Outros autores, analisando 54 méis comercializados na Suíça através da técnica de CG, identificaram a sacarose e a maltose e sugeriram a presença de outros 4 dissacarídeos os quais não foram caracterizados⁷³. O conteúdo médio de sacarose e maltose foi 0,64 % e 9,07 %, respectivamente. Um estudo envolvendo 490 amostras de mel foi realizado nos EUA²². Esses autores encontraram valores médios de 2,74-15,98 % para maltose, 0,25-7,57 % para sacarose e uma fração desconhecida de oligossacarídeos foi estimada ao redor de 0,13-8,49 %.

A distribuição de dissacarídeos em 6 méis do Canadá foi estudada através da CG⁶¹. Nesse trabalho, os glicídios foram expressos em relação a maltose, o qual foi o oligossacarídeo majoritário. Foi obtida a seguinte ordem decrescente: maltose (100 %), turanose (49 %), kojibiose (45 %), palatinose (36 %), sacarose (34 %), laminariobiose (28 %), gentiobiose (22 %), celobiose (19 %), isomaltose (16 %), neotrealose (15 %), nigerose (10 %). Comparando esse trabalho⁶¹ com um outro estudo⁶³, ambos analisando méis do Canadá, pode-se inferir que dos 5 dissacarídeos mais abundantes 4 (maltose, turanose, kojibiose e sacarose) foram consensuais, embora, o tamanho da amostragem e a metodologia tenham sido bastante diferentes. Em um trabalho⁶¹ foram identificados e quantificados 11 dissacarídeos enquanto em um outro⁷³ apenas 2, ambos usaram a técnica de CG. O cromatograma pobre obtido no último trabalho seria devido a formação de oximas por reação dos glicídios com hidroxilamina, antes da reação de siliilação, o qual reduz apreciavelmente a resolução dos glicídios⁷³. Em contrapartida, no outro trabalho⁶¹, os glicídios foram reduzidos com boroidreto de sódio, obtendo-se os alditóis correspondentes antes da reação de trimetilsililação. A mesma limitação na resolução de glicídios, com a formação de derivados oxímicos, foi obtida por Mateo e Bosch-Reig³¹ ao analisarem 85 méis monoflorais oriundos de diferentes regiões da Espanha. Neste trabalho, a composição média de dissacarídeos foi: 4,62g % de maltose; 2,23g % de kojibiose; 1,43g % de maltulose; 1,22g % de sacarose e 0,72g % de isomaltose. A maltose eluiu juntamente com a turanose e nigerose e, portanto, incluiu a contribuição desses 2 dissacarídeos. Nem a trealose nem a melibiose foram detectadas³¹. Em trabalho anterior²⁷, foi usado CG para analisar derivados de éter trimetilsililoxima, obtendo-se valores médios de 7,2g % para maltose e 1,97g % para sacarose em 27 amostras de mel de alecrim da Espanha. A média para maltose foi maior do que a obtida por outros autores (3,9g %) ^{31,65}.

Em um estudo, foi usado CLAE com detector amperométrico e coluna de troca aniônica para estudar os oligossacarídeos de 4 méis monoflorais do Canadá¹⁸. Foram obtidos os seguintes resultados médios: maltose/1-cestose (1,01g %), sacarose (0,67g %), kojibiose (0,40g %), nigerose (0,32g %), isomaltose/maltulose (0,27g %), laminariobiose (0,1g %), palatinose e neotrealose (traços) e melibiose (não detectado). No caso do mel de canola, a sacarose apresentou um valor médio muito baixo (0,046g %); somente traços de laminariobiose foram achados no mel de trevo híbrido; no mel alfafa foi achado 0,067g % de palatinose. Como já observado em trabalhos anteriores^{31,61,63}, a maltose, a kojibiose e a sacarose foram os dissacarídeos predominantes¹⁸. A CLAE com detector de IR e coluna de fase amino foi usada para análise de 34 méis monoflorais da Hungria¹⁹. Foram encontrados valores médios de 3,78g % para maltose, 2,17g % para turanose, 0,86g % para sacarose e 0,68g % para isomaltose. Em um outro trabalho, empregou-se a mesma técnica para quantificar 6 dissacarídeos em 70 méis de diferentes estados brasileiros⁶². A maltose (média = 3,05g %) foi o dissacarídeo majoritário com valores similares aos dos méis da Espanha (média = 3,96g %) ³¹ e aos

dos méis da Hungria (média = 3,36g %) ¹⁹, porém, com valores superiores aos dos méis do Canadá (média = 1,07g %) ⁶⁰ e aos dos méis dos EUA (média = 1,01g %) ¹⁸. Nesse estudo realizado no Brasil, foram achados valores médios de 0,78-2,03g % e 1,11-2,81g % para turanose e nigerose, respectivamente ⁶². Os valores médios de melibiose ficaram no limite de 0,05-0,15g %, bem inferiores aos dos outros dissacarídeos. A distribuição de sacarose e isomaltose foi ampla, alcançando valores médios de 0,07-0,77g % e 0,18-0,71g %, respectivamente. O conteúdo de sacarose dos méis brasileiros ficou dentro dos limites impostos pelo "European Codex Honey Standards" ($\leq 5\text{g}/100\text{g}$ para méis em geral; até $10\text{g}/100\text{g}$ para mel de flor de laranjeira) e pela Legislação Brasileira ($\leq 10\text{g}/100\text{g}$) ⁶².

O estado atual do conhecimento permite classificar os dissacarídeos do mel em 4 grupos, com base na identificação inequívoca e na distribuição quantitativa:

- 1-majoritário: maltose, kojibiose, turanose, sacarose
- 2-minoritário: isomaltose, maltulose, nigerose, palatinose, gentiobiose, celobiose
- 3-traços: laminaribiose, neotrealose
- 4-carece de confirmação: leucrose, isomaltulose, melibiose

Apesar da fração trissacarídica estar em menor concentração no mel sua complexidade é equivalente a da fração dissacarídica. O primeiro trabalho que apresentou dados quantitativos sobre trissacarídeos foi publicado no final da década de 60 ⁶³. Esses autores, a exemplo do que fizeram na análise de dissacarídeos, expressaram o conteúdo dos trissacarídeos individuais, em 95 méis canadenses, em relação ao total de oligossacarídeos (3,65g %), apresentando os seguintes resultados: erlose (4,5 %), teanderose (2,7 %), panose (2,5 %), maltotriose (1,9 %), 1-cestose (0,9 %), isomaltotriose (0,6 %), melezitose (0,3 %), isopanose (0,24 %), centose (0,05 %), 3- α -isomaltosilglicose e 4- α -gentiobiosilglicose (traços). Em um estudo realizado com 54 amostras de mel suíço, 20 apresentaram de 0,1-2,1g % de rafinose e 14 apresentaram de 0,1-1,26g % de melezitose ⁷³. Também usando CG, outros autores ⁶¹ foram capazes de identificar 5 trissacarídeos que foram expressos em relação ao dissacarídeo maltose (100 %). A seguinte ordem foi obtida: erlose (48 %), isopanose (15 %), panose (4 %), teanderose (2 %), maltotriose (0,3 %). O perfil mais rico em trissacarídeos obtido por alguns autores ⁶¹ com relação ao obtido em um trabalho anterior ⁷³ foi devido a diferenças no método de derivatização, já mencionadas anteriormente. Outros autores ²⁷, usando CG, detectaram erlose (média de 0,61g %) e melezitose (média de 0,05g %) em 27 amostras de mel de alecrim. A mesma metodologia foi usada em um outro trabalho para determinar trissacarídeos em 85 méis monoflorais da Espanha. Neste trabalho, a rafinose ficou ao redor de não detectado (nd) a 0,96g %, a erlose de nd a 2,1g % e a melezitose de nd a 3,9g % ³¹.

Cerca de 9 trissacarídeos foram investigados em 4 méis monoflorais dos EUA ¹⁸. Neste trabalho, foi usada a técnica de CLAE com detector amperométrico e 2 colunas de troca aniônica. A seguinte distribuição foi encontrada: erlose (0,26-3,97g %), teanderose (0,067-0,38g %), melezitose (0,038-0,056g %), maltotriose (0,023-0,10g %), isopanose (nd-0,10g %), panose (traços-0,08g %), melezitose (0,038-0,056g %), isomaltotriose (traços-0,038g %), laminaritríose (nd-traços). É importante ressaltar que altos teores de erlose foram encontrados em méis de trevo híbrido (3,97g %) e alfafa (3,46g %); foi encontrada uma pequena quantidade de teanderose (0,067g %) em mel de canola; a isopanose (0,10g %) só foi detectada em mel de trevo híbrido; somente traços de panose foram encontrados em mel de trevo híbrido; a laminaritríose foi identificada somente em mel de alfafa e em quantidades traços ¹⁸. Lamentavelmente, esses autores não foram capazes de analisar a 1-cestose devido a sua co-eluição com a maltose. Em outro estudo, usou-se CLAE com detector de IR e coluna amino para analisar trissacarídeos em 34 amostras de méis da Hungria ¹⁹.

Esse autor quantificou a erlose (média de 0,18-3,0g %), maltotriose (0-0,24g %), melezitose e rafinose (traços). O conteúdo médio de erlose ficou ao redor de 3g % para méis de acácia e sálvia. Em um outro trabalho ⁶², foi usada metodologia semelhante a do trabalho anterior ¹⁹ para analisar-se 4 trissacarídeos de 70 méis brasileiros. Os valores médios de maltotriose alcançaram de 0,24-1,03g %, sendo considerados mais elevados do que os valores encontrados em outros países (0,02-0,23g %) ^{18,19}. Em geral, os méis brasileiros apresentaram pequenas quantidades de panose (0,03-0,08g %). Esses resultados foram similares aos encontrados em méis canadenses (traços-0,09g %) ^{18,61}. A melezitose ficou no limite de 0,21-0,37g % ⁶² o qual foi mais alto do que os valores médios noticiados em outros países (0,03-0,06g %) ^{18,19,31,73}. Para rafinose, foram achados valores médios de 0,10-0,25g % ⁶² que foram similares aos méis de origem espanhola (0,16-0,34g %) ³¹.

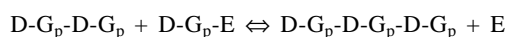
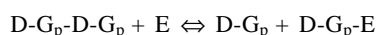
Com base em resultados da literatura, os trissacarídeos do mel podem ser classificados em 3 grupos, conforme a identificação inequívoca e a distribuição quantitativa:

- 1-majoritário: erlose
- 2-minoritário: teanderose, isopanose, panose, maltotriose, melezitose, rafinose, isomaltotriose
- 3-carecem de confirmação: centose, 1-cestose, 3- α -isomaltosilglicose, 4- α -gentiobiosilglicose, laminaritríose

O conteúdo de isomaltotetose e de isomaltopentose foi estimado em 0,33 % e 0,16 %, respectivamente ⁶³. Com respeito aos polissacarídeos, foram isoladas duas frações que perfizeram 0,002 % do mel ⁷⁸.

ORIGEM

Em 1886 foi noticiado que o néctar continha glicose, frutose e sacarose ⁵⁵. Mais tarde, detectou-se rafinose e melibiose em alguns néctares ⁷⁹. Outros autores examinaram algumas variedades de néctar de trevo e constataram a presença de maltose, porém, sugeriram que este dissacarídeo poderia ser um contaminante oriundo da ação de afídios ⁸⁰. Em um outro estudo, foi usada a CG para analisar alguns néctares ¹¹. Encontrou-se somente frutose, glicose e sacarose. Outros autores, usando a mesma técnica, encontraram além desses 3 glicídios, também, rafinose e melezitose ¹⁴. Maurizio ⁸¹ detectou maltose em pequenas quantidades no néctar de algumas plantas, porém a maioria das plantas continha somente glicose, frutose e sacarose. Embora a composição de glicídios do néctar seja ainda pouco estudada, a origem dos diversos oligossacarídeos presentes no mel não pode ser explicada somente pela coleta de néctares de diferentes variedades de plantas realizada por abelhas operárias. A formação de oligossacarídeos no mel seria principalmente devido as reações de *trans*-D-glicosilação e, em menor extensão, se é que existe alguma, as de *trans*-D-frutosilação. Neste processo, grupos D-glicopiranosila ou D-frutofuranosila são transferidos para uma molécula receptora que pode ser um mono-, oligo- ou polissacarídeo. A ocorrência da reação de *trans*-D-glicosilação foi descrita previamente na série oligossacarídica ^{82,83}. Essas reações seriam catalisadas pelas mesmas enzimas envolvidas em reações de hidrólise de glicídios ⁸⁴. Esses autores postularam o seguinte esquema para a reação de *trans*-D-glicosilação:



O mesmo foi postulado para reação de *trans*-D-frutosilação.

Foi mostrado que em relação a α -glicosidases de fungos a *trans*-D-glicosilação ocorreria preferencialmente para hidroxilas primárias de aldoses ⁸⁵. As reações de *trans*-D-glicosilação e *trans*-D-frutosilação ocorreriam no aparelho digestivo das abelhas e seriam a principal rota de formação de oligossacarídeos. Outros autores demonstraram a atividade de *trans*-D-glicosilação

em uma fração, rica em invertase, isolada do mel⁶⁷. Nesse trabalho, foi constatada a grande atividade de α -glicosidase, traços de frutosidase e nenhuma atividade de β -glicosidase. Essa atividade de α -glicosidase seria oriunda da própria invertase. Os indícios para a presença de α -glicosidase foram: a inatividade na presença de rafinose, grande atividade na presença de sacarose e maltose, formação de erlose a partir da incubação da sacarose com a fração contendo α -glicosidase, inibição pela glicose. Esta enzima apresenta a peculiaridade de transferir glicose da sacarose para uma molécula receptora sem a necessidade de formação de um derivado fosforilado da glicose. Esses autores não foram capazes de obter uma evidência direta da presença de uma enzima com atividade de *trans*-D-frutossilação⁶⁷.

Existe uma grande variação na distribuição de sacarose nas amostras de mel o qual foi noticiada por diferentes autores^{19,31,62}. O motivo para os níveis variáveis de sacarose poderia ser devido à reação de *trans*-D-glicosilação que é iniciada pela transferência da unidade α -D-glicopiranosil da sacarose para uma molécula receptora⁶². Já o alto conteúdo de erlose poderia ser explicado pelo fato deste trissacarídeo ser um intermediário durante a reação de *trans*-D-glicosilação no mel⁶⁷. A erlose seria formada pela transferência do grupo α -D-glicopiranosila de uma molécula de sacarose para a quarta posição do resíduo de glicose de uma outra molécula de sacarose. Seus níveis aumentariam inicialmente e, em seguida, diminuiriam o que seria acompanhado pela formação de novos oligossacarídeos. Isso explicaria por exemplo as baixas concentrações de sacarose e de erlose em méis de canola¹⁸ e em méis de girassol³¹. Embora alguns néctares contenham maltose, a grande proporção deste dissacarídeo no mel seria oriunda da reação de *trans*-D-glicosilação. Portanto, a maltose, a erlose e vários outros oligossacarídeos presentes no mel como p. ex., a maltotriose, a isomaltose e a kojibiose seriam produtos secundários, originários da reação de *trans*-D-glicosilação catalisada principalmente pela invertase. Como já mencionado anteriormente, a ocorrência da reação de *trans*-D-frutossilação no mel não foi comprovada até o momento. Com relação a melezitose e a 1-cestose, alguns autores consideraram estes trissacarídeos como constituintes da seiva de várias espécies de plantas⁸⁶ enquanto, outros^{21,87} têm sugerido que esses glicídios seriam carregados para colméia através de coleta das excreções adocicadas de afídeos, as quais estão presentes na superfície das plantas. De fato o mel de melato que é produzido através de excreções de afídeos é rico nesses 2 trissacarídeos enquanto, méis monoflorais têm somente quantidades ínfimas desses compostos⁴. Outros autores⁸⁶ também sugeriram que a presença de erlose poderia ser devida a ação de afídeos, porém, a erlose é encontrada em bem maior quantidade que a melezitose em méis monoflorais. Portanto, a origem da erlose estaria principalmente associada à reação de *trans*-D-glicosilação no mel.

Os α -galactosídeos, particularmente a rafinose, poderiam ser oriundos da excreção de afídeos⁴. Por outro lado, foi noticiado que as plantas poderiam ser divididas em 3 grupos, com base na composição de glicídios da seiva do floema (vaso condutor de água e substâncias orgânicas produzidas pelas plantas: 1- sacarose (maioria das plantas), 2- α -galactosídeos, 3- alditóis⁸⁸). As abelhas operárias ocasionalmente poderiam coletar néctar dos 2 últimos grupos. Outros autores sugeriram que tanto o néctar como a excreção de afídeos poderiam contribuir como fontes de α -galactosídeos no mel⁷². Uma conjectura interessante seria a utilização desses oligossacarídeos como um "deposição" de galactose por ação de mecanismo de desintoxicação. A galactose livre é considerada um composto tóxico para as abelhas³. Com respeito aos β -D-dissacarídeos (celobiose, gentiobiose e laminaribiose), alguns autores não acharam atividade de β -glicosidase na fração bruta da invertase e concluíram que esses dissacarídeos seriam constituintes do néctar⁶⁷. Entretanto, outros autores têm descrito a ocorrência de uma enzima com atividade de β -glicosidase no mel⁸⁹. O fato é que

os β -D-dissacarídeos são encontrados em quantidades ínfimas no mel. A origem dos β -D-dissacarídeos no mel ainda carece de estudos mais detalhados.

Em um outro estudo, foi demonstrado que o perfil de glicídios se altera mesmo quando o mel é estocado a $26 \pm 3^\circ\text{C}$ ⁹⁰. Durante 2 anos os autores observaram uma conversão de 9 % ao ano de mono- para oligossacarídeos. A D-glicose livre desapareceu mais rapidamente do que a D-frutose livre, portanto, a razão F/G aumentou consideravelmente. Um outro autor achou uma redução apreciável de sacarose, uma pequena perda de erlose e um aumento no conteúdo de maltose durante 10 meses de estocagem à temperatura ambiente⁹¹.

A composição de oligossacarídeos no mel pode ser alterada pela ação de enzimas de leveduras osmofílicas. Como já mencionado anteriormente, essas leveduras podem crescer em alimentos com atividade de água baixa e teores elevados de glicídios³. Algumas preparações enzimáticas isoladas de fungos e leveduras têm mostrado atividade de *trans*-D-glicosilação e *trans*-D-frutossilação em alguns substratos como glicose⁹², maltose⁹³, sacarose⁹⁴. O resultado dessa atividade foi a formação de oligossacarídeos como a nigerose, a kojibiose, a isomaltotriose, a turanose e a isomaltose. A reação de *trans*-D-frutossilação foi observada em frações enzimáticas isoladas de fungos que foram capazes de sintetizar trissacarídeos como a panose a partir da maltose⁹³ e a 1-cestose a partir da sacarose^{95,96}.

Um outro fator pouco estudado é a alteração do perfil de oligossacarídeos durante o armazenamento do mel à temperatura ambiente, através de reações não enzimáticas²². Esses autores sugeriram que o pH baixo do mel monofloral (média de 3,91) poderia promover reversão (condensação de monossacarídeos por catálise ácida) e formação de compostos como anidridos difrutosídicos. A alta concentração de glicídios e o pH baixo dos méis monoflorais favoreceria a reação de reversão. Embora o papel da reação de reversão na formação de glicídios do mel seja uma matéria especulativa, esta via poderia ser responsável pela formação de oligossacarídeos não comumente achados na natureza, como p. ex. os β -D-dissacarídeos: laminaribiose e gentiobiose.

A origem de polissacarídeos no mel seria devida³: ao transporte, para colméia, de grãos de pólen que contêm polissacarídeos ou ao processo de desintoxicação que neutralizaria os efeitos tóxicos da D-galactose, D-manose, L-arabinose para a abelha.

A composição de glicídios do néctar ainda carece de estudos mais detalhados. A dificuldade em se obter néctar em quantidade suficiente é a principal razão para o número restrito de trabalhos sobre o assunto. Um outro problema seria a ação das enzimas da própria abelha sobre a matéria-prima e também sobre o mel durante o seu armazenamento e amadurecimento. A atividade dessas enzimas é afetada pelas condições climáticas e variações na composição da matéria-prima. Já a presença de leveduras osmofílicas bem como as reações não enzimáticas poderiam contribuir para modificações na composição de glicídios. Todas essas variáveis tornam o estudo da origem bioquímica dos oligossacarídeos um grande desafio para os especialistas. Se a ocorrência dessa variedade de oligossacarídeos no mel é fruto do capricho do acaso ou se tem relevância para o metabolismo da abelha e, portanto, essencial para sua existência, ainda é um enigma a ser desvendado.

IMPORTÂNCIA

A utilização do perfil de oligossacarídeos como um dos parâmetros na identificação da origem botânica do mel tem sido objeto de estudo por diferentes autores. Já no início do século, grandes quantidades de melezitose foram detectadas em mel de melato^{39,40}. Mais tarde, em outro trabalho, empregando a técnica de CG, também foi encontrado um alto teor de melezitose e sugerido que esta propriedade distinguiria méis florais de méis

de melato⁷³. Vários autores, usando CLAE^{18,19,62} e CG^{27,31}, também encontraram quantidades menores de melezitose em méis florais. Portanto, o conteúdo de melezitose é um parâmetro importante na caracterização de méis de melato. Em um outro estudo, foi sugerido que o perfil de oligossacarídeos poderia ser importante na determinação da idade e da autenticidade de méis florais⁶¹. Swallow e Low¹⁸ acharam pequena quantidade de sacarose e traços de erlose em mel de canola o que diferenciou este de outros méis monoflorais. Estes autores concluíram que o perfil de oligossacarídeos poderia servir como uma "impressão digital" para caracterização da origem botânica do mel.

Mateo e Bosch-Reig³¹ realizaram um trabalho extenso de avaliação do perfil de oligossacarídeos de 7 variedades de méis monoflorais da Espanha, obtidos por CG, como um método de caracterização desses méis. Os resultados foram testados estatisticamente através de análise mono- e multivariada. A distribuição de sacarose foi significativamente maior em mel de flor de laranjeira quando comparado aos méis de alfazema, girassol, eucalipto, alecrim e urze. O conteúdo de maltose pareceu ser útil na diferenciação do mel de girassol, do eucalipto, sendo o último rico neste dissacarídeo. Segundo esses autores, a kojibiose e a maltulose serviram para distinguir o mel de flor de laranjeira e girassol (baixo teor) do mel de alecrim (alto teor), uma vez que houve diferença estatisticamente significativa entre as médias ($p < 0,05$). Ainda nesse trabalho, foi concluído que o conteúdo de glicose, frutose, sacarose e maltose e a relação G/A foram os melhores parâmetros para classificação correta das amostras de mel. No cômputo geral, foi obtido um valor de 77,9 % de classificações certas; no caso de cada mel foram obtidos: 100 % para mel de melato, 92,9 % para girassol, 83,3 % para urze e 75 % para eucalipto. Para os outros méis (flor de laranjeira, alecrim, alfazema) a percentagem de acerto alcançou o limite de 53,8-69,2 %³¹. Os mesmos autores publicaram um outro trabalho, usando as mesmas amostras de mel do estudo realizado em 1997, onde a análise multivariada foi aplicada para os parâmetros condutividade elétrica, cor, conteúdo de água, frutose e sacarose⁴⁹. O percentual geral de acerto foi de 95,7 %. No caso dos méis de girassol, eucalipto e melato houve 100 % de acerto.

Alguns autores realizaram um trabalho extenso de identificação de oligossacarídeos em méis brasileiros⁶². Foi sugerido que o perfil de oligossacarídeos poderia ser útil na identificação da região brasileira produtora de mel. Entre as regiões brasileiras estudadas, o conteúdo médio de maltose na região sudeste foi significativamente menor ($p < 0,05$) do que àquele da regiões sul, centro-oeste e nordeste. Os méis de eucalipto apresentaram valores médios de maltose significativamente menores do que àqueles da região sul. As amostras de mel da região nordeste mostraram valores médios de turanose e maltotriose significativamente menores do que os encontrados para as regiões sul, sudeste e centro-oeste. Consequentemente, o conteúdo de maltose, turanose e maltotriose poderia ser útil na identificação da região produtora de mel⁶². Com respeito aos estados brasileiros, os méis do estado de São Paulo mostraram um conteúdo de melibiose significativamente menor do que o obtido a partir dos estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais. Com base nos teores de maltose e nigerose, os méis do estado de Mato Grosso poderiam ser distinguidos daqueles oriundos dos estados do Mato Grosso do Sul e Goiás. O valor de maltotriose foi significativamente maior no estado do Paraná quando comparado ao estado do Rio Grande do Sul. As amostras de mel do estado do Piauí mostraram valores médios de rafinose e maltotriose significativamente maiores do que os obtidos no estado da Paraíba. Portanto, o conteúdo de melibiose, maltose, nigerose, maltotriose e rafinose poderiam auxiliar na identificação do estado brasileiro produtor de mel⁶². Um trabalho estatístico com uma amostragem maior de méis monoflorais representativa de cada área produtora de mel em cada estado seria necessário antes da utilização do perfil de

oligossacarídeos como um dos parâmetros para identificação da região produtora de mel.

A análise microscópica do mel, principalmente do sedimento para identificação e contagem de grãos de pólen é ainda a principal ferramenta usada para analisar a origem botânica do mel. Entretanto, a interpretação da análise polínica apresenta algumas dificuldades como: a baixa ou alta representatividade dos grãos de pólen de algumas plantas e a determinação do gênero e da espécie. Considera-se, por exemplo, que os grãos de pólen da alfazema apresentam baixa representatividade. Portanto, para que o mel seja considerado de alfazema basta conter de 10-13 % deste tipo de pólen. Portanto, o perfil de glicídios apresenta-se como um parâmetro complementar à análise microscópica do mel, no que diz respeito a identificação do tipo floral. O perfil de oligossacarídeos poderia ser também útil na caracterização da região em que o mel foi produzido. Este tipo de caracterização seria útil para os consumidores que estivessem interessados em consumir apenas méis de regiões com legislações mais rigorosas em relação a utilização de agrotóxicos bem como ao cultivo de plantas transgênicas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo a Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERÊNCIAS

- Dustmann, J. H.; *Am. Bee J.* **1993**, *133*, 648.
- Zumlai, A.; Lulat, A.; *J. Royal Soc. Med.* **1989**, *83*, 384.
- Siddiqui, I. R.; *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1970**, *25*, 285.
- Doner, L. W.; *J. Sci. Food Agric.* **1977**, *28*, 443.
- Wiley, H. W.; *US Dept. of Agric. Chem. Bull.* **1892**, *13*, 744.
- Browne, C. A.; *US Dept. of Agric. Chem. Bull.* **1908**, *110*, 1.
- Ellegood, J.; Fischer, L.; *Food Res.* **1940**, *5*, 559.
- White, J. W., Jr.; Maher J.; *J. Assoc. Off. Agric. Chem.* **1954**, *37*, 466.
- Eckert, J. E.; Allinger, H. W.; *Calif. Agric. Exp. St. Bull.* **1939**, *631*, 1.
- Wood, P. J.; Siddiqui, I. R.; Weisz, J.; *J. Apic. Res.* **1975**, *14*, 41.
- Kleinschmidt, M. G.; Dobrenz, A. K.; McMahan, V.A.; *Plant Physiol.* **1968**, *43*, 665.
- Echigo, T.; *Bull. Fac. Agric.*, Tamagawa University (Japan). **1970**, *10*, 3.
- Battaglini, M.; Bosi, G.; *Apiacta* **1972**, *7*, 5.
- Battaglini, M.; Bosi, G.; *Apic. Abstr.* **1974**, *25*, 110.
- Hadorn, H.; Zürcher, K.; Strack, C.; *Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg.* **1974**, *65*, 198.
- Pourtallier, J.; Rognone, C.; *Symp. Int. Technol. Apic. (Bologna)* **1977**, 74.
- Mateo, R.; Bosch, F.; *Proc. 2nd Nat. Congr. Apic. (Gijón)* **1984**, 358.
- Swallow, K. W.; Low, N. H.; *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *38*, 1828.
- Földházi, G.; *Acta aliment.* **1994**, *23*, 299.
- Costa, L. S. M.; Albuquerque, M. L. S.; Trugo, L. C.; Quinteiro, L. M. C.; Barth, O. M.; Ribeiro, M.; De Maria, C. A. B.; *Food Chem.* **1999**, *65*, 347.
- Goldschmidt, S.; Burkert, H.; *Z. Physiol. Chem.* **1955**, *300*, 188.
- White Jr., J.W.; Riethof, M.L.; Subers M.H., Kushnir, I.; *US Dept. Agric. Tech. Bull.* **1962**, 1.
- Pourtallier, J.; *Z. Bienforsch.* **1968**, *9*, 217.
- Nelson, N.; *J. Biol. Chem.* **1944**, *153*, 375.

25. Somogyi, M.; *J. Biol. Chem.* **1945**, *160*, 61.
26. Maurizio, A.; *Bee World* **1959**, *40*, 275.
27. Perez-Arquillué, C.; Conchello, P.; Ariño, A.; Juan, T.; Herrera, A.; *Food Chem.* **1994**, *51*, 207.
28. Serra, J.; Bosch, J.; *Anales de Química* **1989**, *1*, 37.
29. Pourtallier, J.; Taliercio, Y.; *Bull. Apic. Doc. Sci. Technol.* **1970**, *13*, 58.
30. Krauze, A.; Zalewski, R. I.; *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1991**, *192*, 19.
31. Mateo, R.; Bosch-Reig, F.; *Food Chem.* **1997**, *60*, 33.
32. Baker, H. G.; Baker, I.; In *The Biology of Nectaries*; Bentley, B. & Elias T., Eds.; Columbia University Press; New York, 1983, p. 126.
33. Trugo, L. C.; Farah, A.; Cabral, L.; *Food Chem.* **1995**, *52*, 385.
34. Bogdanov, S.; Martin, P. & Lullmann, C.; *Apidologie*, **1997**, *extra issue*, 1.
35. Planta, A.; *Z. Physiol. Chem.* **1886**, *10*, 227.
36. Percival, M.; *New Phytol.* **1961**, *60*, 235.
37. Wykes, G. R.; *Biochem. J.* **1953**, *53*, 294.
38. Bailey, M. E.; Fieger, E. A.; Oertel, E.; *Glean. Bee Cult.* **1954**, *82*, 401.
39. Hudson, C. S.; Sherwood, S. F.; *J. Am. Chem. Soc.* **1918**, *40*, 1456.
40. Hudson, C. S.; Sherwood, S. F.; *J. Am. Chem. Soc.* **1920**, *42*, 116.
41. Lothrop, R. E.; In Doner, L. W.; *J. Sci. Fd. Agric.* **1977**, *28*, 443. (The original work is a Thesis developed at George Washington University in 1943).
42. Kelly, F. H. J.; *J. Appl. Chem.* **1954**, *4*, 409.
43. Austin, G. H.; *Proc. Intern. Congr. Entomol 10th* (Montreal) **1956**, 1001.
44. White, J. W., Jr.; Subers, M. H.; Schepartz, A. I.; *Biochem. Biophys. Acta* **1963**, *73*, 57.
45. Stinson, E. E.; Subers, M. H.; Petty, J.; White Jr, J. W.,. *Arch. Biochem. Biophys.* **1960**, *89*, 6.
46. Maeda, S.; Mukai, A.; Kosugi, N.; Okada, Y.; *J. Food Sci. Technol.* **1962**, *9*, 270.
47. Battaglini, M.; Bosi, G.; *Sci. Technol. Aliment.* **1973**, *4*, 217.
48. Petrov, V.; *Am. Bee J.*, **1972**, *112*, 10.
49. Mateo, R.; Bosch-Reig, F.; *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 393.
50. Bastos, E. M.; Dayrell, I. O.; Sampaio, I. B.; Jolk, L.; *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **1996**, *16*, 146.
51. Auerbach, F.; Bodlander, E. Z.; *Unters. Nahr. Genussum*, **1924**, *47*, 233; In *The chemical analysis of foods* (7^a ed.); D. Pearson, Ed.; Churchill Livingstone; London, 1976, p. 141.
52. Tilbury, R. H.; In *Biology and activities of yeasts* (1^a ed.); Skinner, F. A.; Passmore, S. M. & Davenport, R. R.; Eds; Academic Press; London, 1980, p. 153.
53. Elser, E.; *Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg.* **1924**, *25*, 92.
54. Van Voorst, F. T.; *Chem. Weekbl.* **1941**, *38*, 538.
55. Hurd, C. D.; Englis, D. T.; Bonner, W. A.; Rogers, M. A.; *J. Amer. Chem. Soc.* **1944**, *66*, 2015.
56. Keup, N.; *Institute of Grand-Ducal of Luxembourg, Sect. Sci. Nat. Phys. Math. Arch.* **1957**, *24*, 91.
57. White Jr., J. W.; Hoban, N.; *Arch. Biochem. Biophys.* **1959**, *80*, 386.
58. Aso, K.; Watanabe, T.; Yamau, K.; *Hakko Kogaku Zasshi* **1958**, *36*, 39.
59. Watanabe, T.; Aso, K.; *Tohoku J. Agr. Res.* **1960**, *11*, 109.
60. Siddiqui, I. R.; Furgala, B.; *J. Apic. Res.* **1967**, *6*, 139.
61. Low, N. H.; Sporns, P.; *J. Food Sci.* **1988**, *53*, 558.
62. Da Costa Leite, J. M.; Trugo, L. C.; Costa, L. S. M.; Quinteiro, L. M. C.; Barth, O. M.; Dutra, V. M. L.; De Maria, C. A. B.; *Food Chem.* **2000**, *70*, 93.
63. Siddiqui, I. R.; Furgala, B.; *J. Apic. Res.* **1968**, *7*, 51.
64. Maurizio, A.; *J. Inst. Physiol.* **1965**, *11*, 745.
65. Serra, J.; Gómez, A.; Gonell, J.; *Alimentaria* **1987**, *24*, 61.
66. Gray, H.; Fraenkel, G.; *Science* **1953**, *118*, 304.
67. White Jr., J. W.; Maher J.; *Arch. Biochem. Biophys.* **1953**, *42*, 360.
68. Pourtallier, J.; *Bull. Apic. Inf. Docum. Scient. tech.* **1964**, *7*, 197.
69. Zürcher, K.; Hadorn, H.; Strack, C. H.; *Mitt. Geb. Lebensm. Hyg.* **1975**, *66*,
70. Barker, S. A.; Bourne, E. J.; Theander, O.; *J. Chem. Soc.* **1957**, 2064.
71. Flechtmann, C. H.; Caldas Filho, C. F.; Amaral, E.; Arzolla, J. D. P.; *Bolm. Ind. Anim.* **1963**, *21*, 65.
72. White, J. W.; Meloy, R.; Probst, J.; Huser, W.; *J. Apic. Res.* **1986**, *25*, 182.
73. Zürcher, K.; Maurizio, A.; Hadorn, H.; *Apidologie* **1975**, *6*, 59.
74. Lothrop, R. E.; Paine, H. S.; *Amer. Bee J.* **1931**, *71*, 28.
75. Lothrop, R. E.; Paine, H. S.; *Amer. Bee J.* **1932**, *72*, 444.
76. Paine, H. S.; Lothrop, R. E.; *Amer. Bee J.* **1933**, *73*, 53.
77. Helvey, T. C.; *Food Res.* **1953**, *18*, 197.
78. Siddiqui, I. R.; *Can. J. Chem.* **1965**, *43*, 421.
79. Wykes, G. R.; *New Phytol.* **1952**, *51*, 210.
80. Furgala, B.; Gochnauer, T.A.; Holdaway, F.G.; *Bee World* **1958**, *39*, 203.
81. Maurizio, A.; *Bee World* **1962**, *43*, 66.
82. Pigman, W. W.; *J. Res. Nat. Bur. Stand.* **1944**, *33*, 105.
83. Blair, M. G.; Pigman, W. W.; *Arch. Biochem. Biophys.* **1954**, *48*, 17.
84. Fischer, E. H.; Kohtes, J.; Fellig, J.; *Helv. Chim. Acta* **1951**, *34*, 1132.
85. Edelman, J.; *Adv. Enzymol.* **1956**, *17*, 189.
86. Bacon, J. S. D.; Dickinson, B.; *Biochem. J.* **1957**, *66*, 289.
87. Hudson, C. S.; *Advan. Carbohydr. Chem.* **1946**, *2*, 1.
88. Maurizio, A.; In *Honey: a comprehensive survey*; Crane, E., Ed.; Heinemann in co-operation with International Bee Research Association; London, 1975, p. 77.
89. Low, N. H.; Vong, K. V.; Sporns, P.; *J. Apic. Res.* **1986**, *25*, 178.
90. White Jr., J. W.; Riethof, M. L.; Kushner, J.; *J. Food Sci.* **1961**, *26*, 63.
91. Deifel, A.; Gierschner, K.; Vorwohl, G.; *Deut. Lebensm. Rundschau* **1985**, *81*, 356.
92. Shibasaki, K.; *Tohoku J. Agr. Res.* **1955**, *6*, 171.
93. Pan, S. C.; Nicholson, L. W.; Kolacho, P.; *J. Amer. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 2547.
94. Yasumura, A.; *Seikagaku* **1954**, *26*, 200.
95. Pazur, J. H.; *J. Biol. Chem.* **1952**, *199*, 217.
96. Barker, S. A.; Bourne, E.J.; Carrington, T.R.; *J. Chem. Soc.* **1954**, 2125.