

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**DISSERTAÇÃO**

**SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS E AVALIAÇÃO DA  
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM MÊIS DE *Apis  
mellifera***

**CARLOS ALBERTO FONSECA JARDIM VIANNA**

**Seropédica, Rio de Janeiro  
2010**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
ANTIOXIDANTE EM MÉIS DE *Apis mellifera***

**CARLOS ALBERTO FONSECA JARDIM VIANNA**

**Sob a Orientação da Professora**

Dra. Rosane Nora Castro

**e Co-Orientação da Professora**

Dra. Maria Cristina Affonso Lorenzon

Dissertação submetida como  
requisito parcial para a  
obtenção do grau de **Mestre  
em Ciências.**

Seropédica, Rio de Janeiro  
Maio de 2010

641.38  
V617s  
T

Vianna, Carlos Alberto Fonseca Jardim, 1981-.  
Substâncias Fenólicas e Avaliação da Atividade Antioxidante em Méis de *Apis mellifera* / Carlos Alberto Fonseca Jardim Vianna - 2010.  
120 f.: il.

Orientador: Rosane Nora Castro.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Química.  
Bibliografia: f. 85-96.

1. Mel - Teses. 2. Abelha africanizada - Teses. 3. Antioxidantes. 4. Substâncias Fenólicas - Teses. I. Castro Rosane Nora, 1965-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS- DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

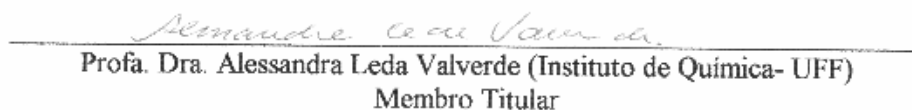
**CARLOS ALBERTO FONSECA JARDIM VIANNA**

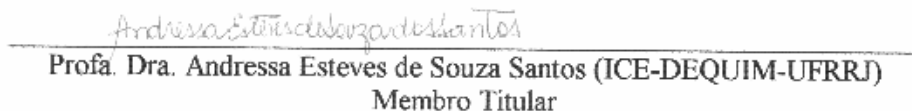
Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Química como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre em Ciências, com área de concentração em Química de Produtos Naturais.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 26/05/2010

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Rosane Nora Castro (ICE-DEQUIM-UFRRJ)  
Orientadora e Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Maria Cristina Affonso Lorenzon (IZ-UFRRJ)  
Co-orientadora

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Alessandra Leda Valverde (Instituto de Química- UFF)  
Membro Titular

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Andressa Esteves de Souza Santos (ICE-DEQUIM-UFRRJ)  
Membro Titular

“Deus escolheu as coisas loucas deste mundo para confundir as sábias; e escolheu as coisas fracas deste mundo para confundir as fortes”... (Paulo aos Coríntios 1: 27 e 28). “Porque dele é a sabedoria e a força; Ele muda os tempos e as horas; Ele remove os reis e estabelece os reis; Ele dá sabedoria aos sábios e ciência aos entendidos”... (Daniel 2: 20 e 21).

(Bíblia Sagrada)

## AGRADECIMENTOS

- Agradeço especialmente a Deus, por sua misericórdia, que se renova a cada manhã, pela vida que me doa a cada dia e pela paz que enche meu coração de alegria;
- Aos meus pais Antonio Carlos e Aliete Fonseca pelos ensinamentos, pela compreensão e pela tolerância durante a jornada desse mestrado;
- Aos meus irmãos Rodrigo e Lilian, pela presença nos momentos difíceis, mesmo de longe me passando segurança;
- Ao tio Alair e as minhas tias Alice e Arlete, que muito contribuíram para minha segurança e tranquilidade;
- À Amanda, minha namorada e grande amiga, por sua paciência, por seu companheirismo e tolerância nos momentos em que estive ausente;
- À Profa. Dra. Rosane Nora Castro pelos ensinamentos, pela atenção e paciência, que teve comigo durante este período de mestrado. Agradeço especialmente pelo incentivo, pela confiança e por sua amizade, durante o desenvolvimento deste trabalho;
- À Profa. Dra. Maria Cristina Affonso Lorenzon pela paciência e por seu bom humor nos momentos de descontração, ao longo do mestrado;
- Aos professores Dr. Carlos Maurício, a Dra. Sonia Regina, Dra. Andressa Esteves e ao Dr. Marco Edilson, pelos ensinamentos e pela simplicidade e bom humor nos momentos de descontração, dos quais não me esquecerei;
- A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Química da UFRuralRJ;
- A todos os alunos do Programa de Pós-Graduação em Química da UFRuralRJ, especialmente aos companheiros e companheiras de laboratório, Breno, Cosme, Damião, Natália, Juliana, Milene e Luiza, pelo convívio e bom humor do dia a dia, e por terem compartilhado seu conhecimento e sua aprendizagem comigo;
- Aos funcionários do Departamento de Química pelos serviços prestados;
- À minha grande amiga Regina pelos ensinamentos e por sua amizade, fundamentais para a execução deste trabalho;
- Aos demais colegas da UFRuralRJ pelo bom relacionamento neste período de mestrado;

- À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pelo privilégio de ter estudado nesta casa e pela oportunidade de realizar este trabalho;
- Aos membros da banca examinadora pelas sugestões e correções sugeridas a esta dissertação;
- A CNPq e CAPES pelos auxílios concedidos;
- Enfim, a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

	<b>Pág.</b>
<b>SUMÁRIO</b>	
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	i
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b>	iii
<b>ÍNDICE DE ESQUEMAS</b>	iv
<b>RESUMO</b>	v
<b>ABSTRACT</b>	vi
<b>1 – INTRODUÇÃO</b>	1
1.1    Algumas Considerações Sobre a História do Mel	1
1.2    Composição Química do Mel	3
1.3    Classificação e Origem Botânica do Mel	7
1.4    Substâncias Fenólicas e a Rota Biossintética	14
<b>2    PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DO MEL</b>	26
2.1    Atividade Antioxidante do Mel	26
2.2    Atividade Antitumoral do Mel	31
2.3    Atividade Antibacteriana do Mel	33
<b>3    OBJETIVOS</b>	36
3.1    Objetivos Gerais	36
3.2    Objetivos Específicos	36
<b>4    PARTE EXPERIMENTAL</b>	37
4.1    Material e Métodos	37
4.2    Amostras de Méis	38
4.3    Determinação de HMF no mel	39
4.3.1  Preparo dos Reagentes	40



4.4	Padrões Utilizados	40
4.5	Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD)	41
4.6	Preparo dos Extratos de Mel	41
4.7	Determinação do Teor de Fenóis Totais no Mel	43
4.7.1	Preparo do Reagente de Folin-Denis	44
4.7.2	Preparo da Curva Analítica com os Ácidos Fenólicos Padrões	44
4.8	Determinação do Teor de Flavonóides Totais nos Méis	44
4.8.1	Preparo da Curva Analítica com Quercetina	45
4.9	Determinação da Atividade Antioxidante na reação com DPPH	45
4.9.1	Atividade Antioxidante dos Méis e dos Extratos	45
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>48</b>
5.1	Teor de 5-hidroximetilfurfural nos Méis	49
5.2	Teor em Fenóis Totais nos Méis	53
5.3	Teor em Flavonóides Totais dos Méis	61
5.4	Atividade Antioxidante dos Méis e seus Extratos	71
5.5.	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência dos extratos de mel	76
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>83</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>85</b>
<b>8</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>97</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Pág.

<b>Figura 1</b>	Estrutura do HMF ( 5-hidroxi metilfurfural)	5
<b>Figura 2</b>	Exemplos de diferentes colorações apresentadas pelo mel	6
<b>Figura 3</b>	Proposta biossintética para a formação do ácido cinâmico (MANN, 1987)	15
<b>Figura 4</b>	Proposta biossintética para derivados do ácido cinâmico ( <b>E1-1</b> : cinamato 2-hidroxilase, <b>E1-2</b> : cinamato 3-hidroxilase, <b>E1-3</b> : cinamato 4-hidroxilase (GEISSMAN & CROUT, 1969; MANN, 1994)	17
<b>Figura 5</b>	Estrutura do ácido clorogênico	18
<b>Figura 6</b>	Ácido benzóico e seus derivados de ocorrência natural	18
<b>Figura 7</b>	Proposta de formação do ácido gálico <b>15</b>	19
<b>Figura 8</b>	Proposta biossintética para derivados do ácido benzóico (STRACK, 1997)	20
<b>Figura 9</b>	Esqueleto básico dos flavonóides	21
<b>Figura 10</b>	Proposta biossintética para flavonóides. E2-1: Chalcona sintase, E2-2: Chalcona isomerase, E2-3: Flavona sintase I (2-hidroxi flavanona sintase), E2-4: Flavona sintase II (2-hidroxi flavanona sintase), E2-5: Isoflavona sintase (2-hidroxi isoflavona sintase), E2-6: Flavanona-3-hidroxilase e E2-7: Flavonol sintase), E2-8: Flavona 3' hidroxilase (adaptada de DEY & HARBONE, 1997; HELDT, 1997)	22
<b>Figura 11</b>	Estrutura química do radical DPPH (2,2-difenil-picril-hidrazil)	27
<b>Figura 12</b>	Formação da <i>orto</i> -quinona no anel <b>B</b> da quercetina	28
<b>Figura 13</b>	Modelo esquemático de preparo e análises das amostras de méis	42
<b>Figura 14</b>	Esquema do ensaio de atividade antioxidante utilizando o espectrofotômetro ELISA	46
<b>Figura 15</b>	Formação de HMF a partir da reação de desidratação de açúcares redutores	50
<b>Figura 16</b>	Valores médios de 5-hidroxi metilfurfural (HMF) encontrados nos méis de <i>Apis mellifera</i>	51
<b>Figura 17</b>	Reação de oxidação do ácido gálico (sal fenolato de sódio) pelo molibdênio	53
<b>Figura 18</b>	Rendimento da absorvância em relação ao ácido gálico e outras substâncias redutoras, adaptado de (SINGLETON e ROSSI, 1965)	54

<b>Figura 19</b>	Teor de ácido gálico equivalente nos méis de assa peixe e eucalipto	57
<b>Figura 20</b>	Teores em ácidos fenólicos individuais para os méis de assa peixe	58
<b>Figura 21</b>	Teores em ácidos fenólicos individuais para os méis de eucalipto	60
<b>Figura 22</b>	Complexo Flavonóide-Al com solução metanólica de cloreto de alumínio	61
<b>Figura 23</b>	Teor de quercetina em equivalente nos méis de assa peixe e eucalipto	64
<b>Figura 24</b>	Teor em flavonóides individuais nos méis de assa peixe	65
<b>Figura 25</b>	Teor em flavonóides individuais para os méis de eucalipto	66
<b>Figura 26</b>	Teor de naringenina em méis de assa-peixe e eucalipto, referente à média de três determinações	68
<b>Figura 27</b>	Estrutura da flavanona naringenina	69
<b>Figura 28</b>	Estrutura do derivado 2,4-fenilidrazona formado através da naringenina e 2,4 dinitrofenilidrazina	69
<b>Figura 29</b>	Microplaca mostrando a mistura das soluções de mel em diferentes concentrações com a solução de DPPH em concentração fixa. A) Após 3 minutos. B) Após 20 minutos	71
<b>Figura 30</b>	Análise espectrofotométrica de uma solução de DPPH com substâncias antioxidantes	72
<b>Figura 31</b>	Atividade antioxidante dos méis de assa peixe e eucalipto, obtida a partir de três determinações	73
<b>Figura 32</b>	Atividade antioxidante dos extratos em éter dos méis de assa peixe e eucalipto, obtida a partir de três determinações	74
<b>Figura 33</b>	Atividade antioxidante dos extratos em acetato dos méis de assa peixe e eucalipto, obtida a partir de três determinações	74
<b>Figura 34</b>	Mistura 1 analisada por CLAE-DAD -coluna analítica C-18 (25 cm x 4,6 mm x 5 µm), fluxo de 1,0 mL.min <sup>-1</sup> , fase móvel metanol: acetonitrila (90:10)-solvente B e água: ácido acético (99:1 - solvente A), 200-400 nm	77
<b>Figura 35</b>	Estruturas das substâncias fenólicas contidas na <b>mistura 1</b> (1-Ácido gálico, 2-Ácido protocatecuíco, 3-Ácido <i>p</i> -hidroxi-benzóico, 4-Ácido cafeico, 5-Ácido vanílico, 6-Ácido 2,4-diOHbenzóico, 7-Ácido <i>p</i> -cumárico, 8-Ácido ferúlico, 9-Ácido <i>o</i> -cumárico, 10-Ácido <i>p</i> -metoxi-benzóico, 11-Tricetina, 12-Ácido cinâmico, 13-Narigenina, 14-Canferol, 15-Apigenina)	78
<b>Figura 36</b>	Curvas de UV dos padrões contidos na <b>Mistura 1</b> adquiridas pela análise por CLAE-DAD	79

## ÍNDICE DE TABELAS

		Pág.
<b>Tabela 1</b>	Composição básica do mel em g/100g de mel (WHITE, 1975; ANON, 1995; <i>apud</i> BOGDANOV, 2009)	5
<b>Tabela 2</b>	Substâncias fenólicas identificadas nos méis de eucalipto e silvestre (DA SILVA, 2004)	12
<b>Tabela 3</b>	Substâncias fenólicas identificadas nos méis silvestre, assa peixe e macieira (MONTAGNI, 2005)	13
<b>Tabela 4</b>	Substâncias identificadas nas amostras de polens apícolas (MONTAGNI, 2005)	13
<b>Tabela 5</b>	Substâncias fenólicas identificadas nos méis silvestres e laranjeira (LIANDA, 2004)	13
<b>Tabela 6</b>	Substâncias fenólicas identificadas nos méis silvestres, laranjeira e eucalipto (LIANDA, 2009)	14
<b>Tabela 7</b>	Estruturas químicas de classes comuns de flavonóides	24
<b>Tabela 8</b>	Amostras de méis de favos e centrifugadas estudadas neste trabalho	38
<b>Tabela 9</b>	Valores das absorvâncias (em triplicata) dos méis de assa peixe e eucalipto para os ensaios realizados com o reagente de Folin-Denis	55
<b>Tabela 10</b>	Resultados obtidos a partir da curva analítica preparada com diferentes ácidos fenólicos padrões	56
<b>Tabela 11</b>	Valores das absorvâncias (triplicata) para os méis de assa peixe e eucalipto e, com suas respectivas médias e desvios padrão	62
<b>Tabela 12</b>	Resultados obtidos a partir da curva analítica preparada com diferentes flavonóides padrões	63
<b>Tabela 13</b>	Bandas de absorção de flavonóides em solução metanólica e na presença de cloreto de alumínio (AlCl <sub>3</sub> )	67
<b>Tabela 14</b>	Comparação entre os valores de CE <sub>50</sub> para os méis de assa peixe e eucalipto, e seus respectivos extratos em acetato e éter, com suas médias e desvios padrões	75
<b>Tabela 15</b>	Substâncias fenólicas identificadas nos extratos de méis de assa peixe e eucalipto nesse trabalho	81

## LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt – Acetato de etila  
CCDA - Cromatografia de Camada Delgada Analítica  
CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência  
DAD – Detector de arranjo de fotodiodo  
CC – Cromatografia em coluna aberta  
DPPH - 2,2 difenil-1-picril-hidrazil  
ELISA - Enzyme Linked Immunoabsorvent Assay  
MeOH - metanol  
min - minutos  
mL - mililitro  
nm - nanômetro  
pag. - página  
R<sub>f</sub> - fator de retenção  
t<sub>R</sub> - tempo de retenção  
µm - micrômetros  
UV - ultravioleta

## RESUMO

VIANNA, Carlos Alberto Fonseca Jardim Vianna. Substâncias Fenólicas e Avaliação da Atividade Antioxidante em Méis de *Apis mellifera*. Seropédica. UFRRJ, 2010. pág.120. Dissertação de Mestrado em Ciências, Química de Produtos Naturais.

O mel é um dos principais produtos produzidos pelas abelhas *Apis mellifera*. Trata-se de um alimento complexo do ponto de vista biológico e também analítico, visto sua composição química variada depender, principalmente da origem floral, entomológica e geográfica. O objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade do mel através da determinação do teor de HMF (5-hidroximetilfurfural), determinar o teor de fenóis e flavonóides totais, além de avaliar a atividade antioxidante de dez amostras de méis monoflorais de *Apis mellifera*, sendo quatro de assa peixe e seis de eucalipto obtidas da região sudeste brasileira (São Paulo, Minas Gerais e Espírito Santo). A quantidade de HMF nos méis foi determinada através de análise físico-química com o uso da espectrofotometria e os resultados obtidos foram comparados com os valores estabelecidos pela legislação brasileira e europeia. Para a determinação do teor de fenóis totais foi utilizado o reagente de Folin-Denis através de método espectrofotométrico, enquanto para o teor de flavonóides totais utilizou-se solução de cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) em metanol. O potencial antioxidante dos méis e dos seus extratos foi avaliado através do método de captura do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH). Os resultados obtidos para HMF mostraram que apenas uma amostra não se encontrava dentro dos limites estipulados pela legislação brasileira (valor máximo de  $60 \text{ kg} \cdot \text{mg}^{-1}$ ) e europeia. Em relação ao teor de fenóis e flavonóides, a média dos resultados foi maior para as amostras de méis de eucalipto quando comparados aos de assa peixe. Verificou-se também, que os méis de eucalipto foram os que apresentaram a maior atividade antioxidante, o que permitiu correlacionar o teor das substâncias fenólicas com esta significativa capacidade de inibição dos radicais livres. Os extratos dos méis, também apresentaram resultados satisfatórios quanto a avaliação da atividade antioxidante. O perfil das substâncias fenólicas por CLAE-DAD confirmou a presença de diversos ácidos fenólicos e de flavonóides previamente identificados por cromatografia de camada delgada analítica (CCDA).

Palavras chaves: Mel, *Apis mellifera*, Substâncias Fenólicas, Atividade Antioxidante.

## ABSTRACT

VIANNA, Carlos Alberto Fonseca Jardim Vianna. Phenolic Compounds and determination of Antioxidant Activity in honey from *Apis mellifera*. Seropédica. UFRRJ, 2010. pag.120. Dissertação de Mestrado em Ciências, Química de Produtos Naturais.

Honey is the main product from *Apis mellifera* bees. It is a complex mixture from both the biological and analytical points of view, since its composition may vary with floral, entomological and geographical origins. The aim of this work was to evaluate the quality of different honey samples through the analysis of HMF (5-hydroxymethylfurfural) content, and to determine the content of total phenols and flavonoids, and finally to determine the antioxidant activity of ten samples of monofloral honeys (six from *Eucalyptus sp* and four from “assa-peixe”) from the southeastern region of Brazil (São Paulo, Minas Gerais e Espírito Santo). The amount of HMF was determined through spectrophotometry and the results were compared with the values established by the brazilian and european legislations. In order to quantify the phenols, the Follin-Dennis reagent was employed whereas for the determination of total flavonoids a methanol solution of aluminium chloride was employed. The antioxidant potential of the honeys and their extracts was evaluated by the method of capture of the 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl free radical (DPPH). The results for HMF show that only one sample is not inside the range stipulated by both the brazilian and european regulations (max value of 60 kg.mg<sup>-1</sup>). Regarding phenol and flavonoid contents, the mean values of the results are higher for eucalyptus when compared with “assa-peixe”. Also, eucalyptus honeys have the higher antioxidant activity, which allowed to correlate the phenolics content with this significant ability of inhibiting free radicals. The honey extracts also showed satisfactory results as to antioxidant activity. The phenolics profile obtained by HPLC-DAD confirmed the presence of several phenolic acids and flavonoids previously identified by TLC.

Keywords: honey, *Apis mellifera*, phenolics compounds, antioxidant activity.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Algumas Considerações Sobre a História do Mel

As abelhas evoluíram de um grupo de vespas que mudaram sua nutrição, e começaram a se alimentar de pólen e néctar, proporcionados por uma nova classe de vegetais surgidos na terra, às plantas fanerógamas (que produzem flores e frutos). Neste sentido, a cooperação entre abelhas e plantas tornou-se fundamental para a sobrevivência e diversificação natural desses organismos, e dessa relação, surgiram diversos produtos que são utilizados pelos homens há mais de 7.000 anos, para fins alimentares e medicinais (NOGUEIRA NETO, 1997; SOUZA, 2007).

Terapias milenares de antigas civilizações já utilizavam os produtos das abelhas como um admirável recurso terapêutico e conservativo. As histórias das medicinas das civilizações tibetana, egípcia e também a greco-romana trazem inúmeras citações ressaltando o uso dos produtos das colméias, entre eles: a própolis, larvas de abelhas, às vezes até as próprias abelhas e o mel principalmente, na cura e também prevenção de enfermidades (PARK *et al*, 2003).

Contudo, a verdadeira apicultura começou de fato, a partir do momento em que o homem transportou os ninhos das colônias selvagens para locais próximos das suas moradias, construindo em seguida as colméias, ou recipientes específicos para as abelhas. Entendendo que para garantir a vida em uma colônia, seriam necessários apenas quatro diferentes recursos, o néctar e o pólen, que são comida das abelhas, sua fonte de carboidratos e proteínas. A água, que serve para diluir o mel servido para as larvas, e para resfriar o interior do ninho, atuando no seu controle térmico. E por fim, a resina, que serve para fechar as aberturas indesejáveis nas paredes do ninho além de reforçá-lo, com a aplicação de uma fina camada sobre os favos de cera, além de protegê-lo contra microorganismos (SEELEY, 2006).

Dentre os produtos oriundos da relação entre abelha e planta, o mel é um dos mais importantes, e há muito tempo, desde a pré-história, ele vem sendo utilizado como alimento pelo homem, sendo obtido de maneira extrativista e predatória. Com o passar dos anos, o homem foi se especializando no manejo e na proteção de enxames e colméias racionais com o objetivo de produzir uma maior quantidade de mel sem causar danos às abelhas (CAMARGO *et al*, 2003).



Na Bíblia Sagrada o mel é citado em mais de dez passagens, a maioria delas no antigo testamento, ou seja, em acontecimentos ocorridos antes de Cristo, sendo relacionado especialmente a alimento, e usado em comparações, como um produto agradável ao homem e de sabor doce.

De acordo com a legislação brasileira, o mel é um produto alimentício produzido pelas abelhas melíferas a partir do néctar das flores ou das secreções procedentes de partes vivas das plantas, ou secreções de insetos sugadores de plantas. As abelhas recolhem, transformam, combinam esses materiais com substâncias específicas próprias, armazenam e deixam maturar nos favos da colméia (BRASIL, 2000). Essa definição é semelhante a do CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (1990), que organiza todas as características necessárias para a comercialização do produto.

O mel, mesmo quando processado para uso comercial, é essencialmente um produto natural, cujas características podem ser alteradas de acordo com a sua origem botânica, condições de clima, solo, umidade, altitude, práticas de apicultura individuais, entre outros, afetando o seu sabor, a sua cor e o seu aroma (FELSNER, 2001).

Considerado como o primeiro adoçante utilizado pelo homem em rituais e momentos festivos, o mel passou por três fases distintas de aquisição: a caça, a criação rústicas das abelhas em cortiços e caixas primitivas, e por último, a criação racional (SOUZA, 2007). E sua utilização como alimento foi aos poucos sendo substituída pelo homem com a chegada dos açúcares refinados manufaturados, como o extraído da cana-de-açúcar (BRANCO NETO, 1986).

A apicultura no Brasil surgiu em 1839, com a introdução de abelhas *Apis mellifera*, de raça européia, no Rio de Janeiro, trazidas da região do Porto em Portugal por iniciativa do padre Antonio Carneiro. Décadas depois, em 1956 a importação da abelha africana *Apis mellifera scutellata* proporcionou uma impulsiva multiplicação de novas variedades (híbridos), devido a um acidente no apiário experimental, dando origem ao que chamamos hoje de abelhas africanizadas (NOGUEIRA NETO, 1997; SOUZA, 2007).

Hoje em dia o Brasil tem onze estados exportando mel, e São Paulo é o campeão com o valor de US\$ 11,98 milhões. Em seguida vem Ceará, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Piauí, Paraná, entre outros estados com, US\$ 8,16; 6,56; 5,70; 4,47; 3,34 milhões, respectivamente. E dentre os principais consumidores estrangeiros do mel brasileiro se encontram os Estados Unidos, com o equivalente a 63,8% de toda

produção com destino internacional, a Alemanha, a Grã-Bretanha e o Canadá ficam com o segundo, terceiro e quarto lugares, com 20,5%, 8,4% e 3,8% da produção, respectivamente (ASN, 2009).

O Brasil já superou a produção de 2008 nos sete primeiros meses de 2009. O preço médio do mel no primeiro semestre de 2009 foi de US\$ 2,48/kg, superior aos US\$ 2,29/Kg, pagos no mesmo período de 2008. O menor preço obtido foi em Minas Gerais (US\$ 2,21) e os maiores por Mato Grosso (US\$ 2,90) e Ceará com US\$ 2,89/kg (ANS, 2009).

No Brasil, a apicultura gera 450 mil ocupações diretas no campo e 16 mil empregos diretos no setor industrial, sendo 9 mil na indústria de processamento (entrepósitos) e 7 mil na indústria de insumos (materiais e equipamentos). Atualmente, nosso país é o 11º produtor mundial de mel, sendo que em 2006, a produção medida pelo IBGE foi de 36,7 mil toneladas de mel. Os 12 maiores Estados produtores são: Rio Grande do Sul (7,82 mil toneladas), Paraná (7,8 mil t), Piauí (4,61 mil t), Santa Catarina (4,20 mil t), Ceará (3,99 mil t), São Paulo (3,05 mil t), Minas Gerais (2,54 mil t), Bahia (2,48 mil t), Pernambuco (2,05 mil t), Rio Grande do Norte (585 t), Maranhão (559 t) e Mato Grosso do Sul (485 t) (RESENDE, 2008).

## **1.2 Composição Química do Mel**

A planta possui a necessidade de se reproduzir e de se defender contra diversos agentes patogênicos, a abelha por sua vez necessita do pólen, de onde obtém os aminoácidos essenciais a sua nutrição, e do néctar, substância produzida pelas plantas vasculares que serve como matéria prima para a produção do mel. Neste sentido, um dos fatores que determinam a composição química do mel é o comportamento fisiológico da planta, frente às diversas situações de estresses que o ambiente lhe impõe, até o momento em que o pólen e o néctar sejam recolhidos pelas abelhas.

O mel pode ainda sofrer várias alterações de diversas naturezas devido à falta de informação do próprio apicultor, quanto à tecnologia de extração, a forma de manejo adequado, equipamentos a serem utilizados e, principalmente à forma de armazenamento e conservação. Neste contexto, algumas análises das características físico-químicas do mel são requeridas, objetivando a sua padronização, e também,

possibilitando obter informações para garantir o seu controle de qualidade, e assim possibilitar a detecção de possíveis adulterações. Essa caracterização é importante, já que o mel é um alimento consumido mundialmente e atua em um mercado cada vez mais exigente (MELO *et al*, 2003).

As características físico-químicas e polínicas do mel ainda são pouco conhecidas, principalmente nas regiões tropicais onde existe elevada diversidade de flora apícola associada às taxas elevadas de umidade e temperatura. Neste sentido, a caracterização dos méis, assume grande importância na criação de padrões, e no estabelecimento de critérios comparativos para as análises e para o controle de possíveis fraudes nesse produto (SODRÉ, 2000; CRANE, 1990).

De um modo geral podemos dizer que o mel é constituído por três grupos de componentes essenciais: água, glicídios e substâncias diversas. Ao todo já foram encontradas mais de 180 substâncias em diferentes tipos de méis. A mistura é complexa, e formada principalmente, de carboidratos, enzimas, aminoácidos, ácidos, minerais, substâncias aromáticas, vitaminas, pigmentos, ceras e grãos de pólen. Alguns dos componentes do mel ainda sofrem algum tipo de modificação durante a sua maturação, outros são adicionados pela própria abelha (CRANE, 1996; WHITE, 1979;).

De um modo geral, a elaboração do mel resulta basicamente de uma modificação física sofrida pelo néctar, a desidratação, através da evaporação na colméia e absorção no papo (vesícula melífera). É uma reação química, que transforma o néctar em sacarose. Ocorrem mais duas reações em escala menor, uma delas que consiste em transformar o amido do néctar, através da enzima amilase, em maltose, e a outra onde a enzima glicose-oxidase, transforma a glicose em ácido glucônico (pentahidroxihexanóico) e peróxido de hidrogênio. Em outras palavras, o néctar sofre no trajeto da boca ao papo da abelha, ação intensiva das enzimas: invertase, amilase e glicose-oxidase, estando após esse processo pronto para ser regurgitado nos alvéolos do favo (LEGLER, 2004).

A Tabela 1 apresenta a composição básica do mel, mas vale destacar que existem outras substâncias e características presentes que não foram mostradas, como por exemplo, a condutividade elétrica que depende da presença de determinados componentes no mel. De acordo com BOGDANOV (1999), a presença de íons no mel está ligada ao teor de cinzas ou minerais, pH, acidez, sais minerais e proteínas, entre outras substâncias.

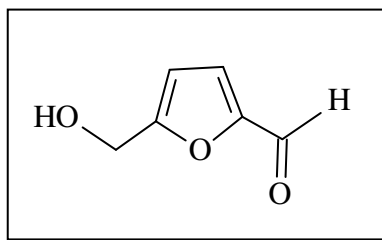
**Tabela 1.** Composição básica do mel em g/100g de mel (WHITE, 1975; ANON, 1995; *apud* BOGDANOV, 2009).

	Mel de Flores		Mel de Melato	
	Média	Mín-Máx	Média	Mín-Máx
<b>Teor de água</b>	17,2	15-20	16,3	15-20
<b>Frutose</b>	38,2	30-45	31,8	28-40
<b>Glicose</b>	31,3	24-40	26,1	19-32
<b>Sacarose</b>	0,7	0,1-4,8	0,5	0,1-4,7
<b>Outros dissacarídeos</b>	5,0	28	4,0	16
<b>Trissacarídeo</b>	0,8	0,56	1,0	0,16
<b>Outros Oligossacarídeos</b>	3,6	0,5-1	13,1	0,1-6
<b>Açúcares totais</b>	79,7	-	80,5	-
<b>Minerais</b>	0,2	0,1-0,5	0,9	0,6-2
<b>Aminoácidos, proteínas</b>	0,3	0,2-0,4	0,6	0,4-0,7
<b>Ácidos</b>	0,5	0,2-0,8	1,1	0,8-1,5
<b>pH</b>	3,9	3,5-4,5	5,2	4,5-6,5

Os principais componentes do mel, em termos quantitativos, são os açúcares frutose e glicose (WHITE, 1975). Essa característica é responsável pela presença de diversas propriedades físicas do produto, tais como: viscosidade, densidade, higroscopicidade, capacidade de granulação (cristalização) e seu valor calórico (CAMPOS, 1987).

O aquecimento de alimentos que contêm açúcares redutores e aminoácidos durante o cozimento ou esterilização desencadeia uma seqüência de reações não-enzimáticas conhecidas coletivamente como reação de Maillard. O composto 5-hidroxiacetilfurfural (HMF), figura 1, é um dos principais produtos intermediários dessa reação química (SURH *et al*, 1994).

O valor nutritivo do mel pode ser indicado pela presença do 5-hidroxiacetilfurfural (HMF), que passou a ser usado como parâmetro no controle de qualidade do mel, podendo sugerir o grau de aquecimento desse alimento, o seu processamento inadequado ou mesmo sua adulteração com xaropes (SALINAS *et al*, 1991; VERÍSSIMO, 1988; WHITE, 1978).



**Figura 1.** Estrutura do HMF (5-hidroxiacetilfurfural).

O teor de HMF no mel determinado pelo Codex Alimentarius e pela norma da União Européia é de 40 mg/kg no máximo. Organizações de apicultura de alguns países da Europa, como Alemanha, Itália, Finlândia, Suíça criaram um teor máximo de 15 mg/kg para uma rotulagem de méis “virgens, chamada por eles “de especial de alta qualidade”. Já o Brasil, por ser um país de clima tropical o valor máximo de HMF é de 60mg/Kg de mel (BRASIL, 2000).

Estudos recentes têm mostrado que o HMF apresenta atividade citotóxica, genotóxica e mutagênica, no entanto, os mecanismos de suas ações tóxicas permanecem obscuros (SURH *et al*, 1994). Já para DURLING *et al* (2009), o DNA de alguns tipos de células, quando submetidas à exposição ao 5-hidroximetilfurfural, pode ser danificado significativamente, em um processo dependente da concentração e do tempo de exposição.

A quantidade de cinzas ou teor de minerais no mel, entre outras utilidades, pode servir como parâmetro para a coloração, quanto mais escuro for o produto mais cinzas ele terá (ORTIZ, 1988). Além disso, LENGLER (2000) destaca que o sabor e o aroma do mel estão diretamente ligados à sua cor: quanto mais escuro for, melhor será o seu sabor e maior será o seu aroma. Méis claros normalmente apresentam baixa quantidade de minerais e um sabor e aroma mais leve. A acidez do mel, devido à presença de alguns ácidos, como: glucônico, cítrico, málico e porções menores de ácidos fórmico, acético, butírico, láctico, entre outros, também influencia em seu paladar, variando do doce suave ou forte até amargo ou ácido.

Os méis brasileiros, de um modo geral, possuem uma grande variação de cor, uma característica muito atribuída à preferência do consumidor, que muitas vezes escolhe o produto pela sua aparência (MARCHINI *et al*, 2005).



**Figura 2.** Exemplos de diferentes colorações admitidas pelo mel.

### 1.3 Classificação e Origem Botânica do Mel

O mel floral é aquele obtido dos néctares das flores, e pode ser classificado em: mel unifloral ou monofloral quando o néctar que o origina, procede principalmente de flores de uma mesma família, gênero ou espécie e possui características sensoriais, físico-químicas e microscópicas próprias; polifloral ou silvestre, quando mais de uma espécie de planta contribui com o néctar (MOREIRA & MARIA, 2001). Além disso, existem os chamados méis de melato (“honeydew”), que são méis obtidos primordialmente, a partir de secreções de insetos sugadores de plantas, que se encontram sobre elas, mas podem também, serem obtidos de secreções produzidas por algumas plantas, de néctar extrafloral nas juntas das folhas (SAWYER, 1975).

A classificação do mel quanto à obtenção pelo favo, pode ser: mel escorrido, obtido por escorrimento dos favos desoperculados; mel prensado, quando os favos são espremidos de modo artesanal, e por último, mel centrifugado, obtido pela centrifugação dos favos para uma produção em grande escala, sem a presença de larvas (CRANE, 1996).

A importância do pólen para as abelhas é indiscutível, pois dele dependem esses insetos para o seu suprimento de aminoácidos, proteínas, sais minerais e outros produtos biológicos necessários a sua nutrição. Sendo assim, a produção de mel e de outros produtos apícolas, está diretamente relacionada com a quantidade de pólen necessária para alimentação das colméias (MARCHINI *et al*, 2006). Neste contexto, uma das maneiras usadas para caracterizar a flora predominante de néctar e pólen, requeridas na produção do mel, é a análise dos tipos polínicos (melissopalínologia) encontrados nos sedimentos dos méis (MORETI *et al*, 1998).

Os estudos dos grãos de pólen são utilizados como indicadores de origem geográfica e botânica dos méis. E para que o nome da planta apícola possa ser citado no rótulo é necessário que tenha no mínimo 45% de dominância e seja colhido, igualmente, de uma região com predominância floral na área de visitação das abelhas do apiário (BARTH, 1984).

O mel é classificado de acordo com as plantas utilizadas na sua elaboração (BARTH, 1989; 2004), e pode ser originado do néctar de mais de 2500 tipos de flores de plantas diferentes; por isso possui características extremamente variáveis (LEGLER, 2004). Além disso, os grãos de pólen predominantes no mel nem sempre são os verdadeiros indicadores da sua origem botânica, pois os mesmos podem ser

adicionados ao acaso no mel, não sendo originados diretamente da flor de onde o néctar foi colhido (BARRETO, 1999). Sendo assim, a determinação da origem botânica deste produto, ou seja, a flora apícola que contribuiu em maior parte para a sua elaboração, torna-se um grande desafio para o pesquisador.

Além do conhecimento sobre a composição química do mel e da melissopalinologia (ou análise do pólen nos méis), conhecer bem o apicultor, ou seja, quem está cultivando as abelhas, vendendo os produtos da colméia; saber se o mesmo tem idéia da melhor maneira para se manipular uma colméia, no sentido de atrair as abelhas para encher as caixas de mel; ter noção da localização geográfica dos ninhos e as floradas que predominam ao seu redor podem ser fatores de fundamental contribuição na identificação da origem botânica do mel.

A busca pelo desenvolvimento de métodos analíticos alternativos que possam contribuir, juntamente com a melissopalinologia, para a determinação da origem botânica do mel, tem sido apresentada nos últimos anos. O uso de técnicas cromatográficas, tais como, a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de fotodiodos (CLAE-DAD), a cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CL-EM) entre outros métodos, tem sido empregados para caracterizar o perfil químico das substâncias presentes nos diferentes méis europeus (TOMÁS-BARBERÁN, *et al*, 2001; PYRZYNSKA & BIESAGA, 2009) e brasileiros (MONTAGNI, 2005; LIANDA, 2005 e 2009).

De acordo com a literatura, a CLAE tem sido apontada nos últimos anos como a técnica preferida para analisar grande parte dos componentes não-voláteis que constituem os méis europeus e brasileiros, e que auxiliam na caracterização da origem floral e geográfica (AMIOT *et al*, 1989; FERRERES *et al*, 1992; SABATIER *et al*, 1992; TOMÁS-BARBERÁN *et al*, 1993; MARTOS *et al*, 2000; FUENTE *et al*, 2007; TRUCHADO *et al*, 2008; LIANDA, 2005 e 2009; VÁZQUEZ *et al*, 2009; LURLINA *et al*, 2009;). Esses estudos relatam a ocorrência de padrões de flavonóides (flavonas e flavonóis) e de derivados dos ácidos benzóico e cinâmico, como sendo importantes marcadores bioquímicos de méis de diferentes regiões e origens botânicas.

Em 1997, Andrade *et al*, compararam dois tipos de méis portugueses, o mel urze *Erica* sp e lavanda (*Lavandula stoechas*), e observaram que as amostras continham um perfil de ácidos fenólicos comum, incluindo os ácidos vanílico, clorogênico, cafeico,

*para*-cumárico, ferúlico, *meta*-cumárico e cinâmico. O ácido gálico apareceu somente no mel lavanda. O mel urze foi caracterizado pela presença dos ácidos *para*-hidroxibenzóico, siríngico, *orto*-cumárico e elágico. A presença do ácido elágico em méis *Erica* spp estava de acordo com relatos anteriores, que o sugerem como marcador de origem floral. Considerando a grande quantidade de ácido *para*-cumárico nas amostras de mel urze (cerca de 39%) e pequena quantidade presente no mel lavanda, este também poderia ser relacionado com a origem floral do mel *Erica* spp. Em outro trabalho com méis de urze foram identificados os flavonóides miricetina, 3-metil miricetina, 3'-metil-miricetina e tricetina (GUYOT *et al*, 1999).

A flavanona hesperetina foi usada como marcador para caracterizar mel citros europeu não tendo sido detectada em nenhum outro tipo de mel estudado anteriormente, incluindo rosmaninho, lavanda, girassol, amêndoa, castanha, trevo branco, eucalipto, *Erisarum*, *Robinia*, *Rhododendron*, *Tília*, *Prosopis*, *Calluna* e méis multiflorais (FERRERES *et al*, 1993; 1994). Enquanto, o flavonol canferol foi descrito para mel rosmaninho (FERRERES *et al*, 1994a; 1998) e a quercetina para mel de girassol (em níveis relativamente altos 125-290 µg/100g mel) (TOMÁS-BARBÉRÁN *et al*, 2001). Além dessas substâncias, alguns ácidos fenólicos também foram encontrados e usados como marcadores químicos. Destacam-se os ácidos cafeico, *para*-cumárico e ferúlico em méis de castanha (ANDRADE *et al*, 1997; FERRERES *et al*, 1996a). Pinocebrina, pinobanksina e crisina que são flavonóides característicos da própolis, foram encontradas na maioria dos méis europeus (TOMÁS-BARBÉRÁN *et al*, 2001).

Com o intuito de analisar o conteúdo de flavonóides presente em méis eucalipto australiano, e determinar se os marcadores encontrados nos méis de eucalipto europeu estavam também presentes nas amostras desses méis, Martos *et al*. (2000) e Yao *et al* (2004) analisaram sete amostras de *Eucalyptus pilligaensis*, duas amostras de *Eucalyptus melliodora* e seis amostras de *Eucalyptus camaldulensis* utilizando cromatografia líquida. Os cromatogramas das três espécies australianas em comparação ao da espécie européia apresentaram perfis similares, no que diz respeito à presença de miricetina, tricetina, quercetina, luteolina e canferol (este minoritário). Porém, os flavonóides pinocebrina, pinobanksina e crisina encontrados no mel europeu, não estiveram presentes no mel australiano; que por sua vez, apresentou a 3-metilquercetina que não havia sido relatada no mel eucalipto europeu.



A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS) foi utilizada para analisar a fração volátil de 22 méis espanhóis de eucalipto, que permitiu identificar a 2-hidroxi-5-metil-3-hexanona e 3-hidroxi-5-metil-2-hexanona como os dois componentes que estiveram presentes em todas as amostras. Estas substâncias não foram encontradas nas outras 165 amostras de méis de dezenove diferentes origens florais, sendo consideradas como bons marcadores para o mel de eucalipto (FUENTE *et al*, 2007).

Com o objetivo de encontrar marcadores de origem botânica para méis de acácia TRUCHADO *et al* (2008), analisaram os fitoquímicos presentes no néctar coletado das flores de acácia. A análise foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência incluindo, também, espectrometria de massas. Oito flavonóides glicosilados foram detectados como sendo derivados do canferol, em seguida foram analisadas amostras de mel de acácia produzidos no mesmo local onde foi coletado o néctar, sendo detectada a presença do flavonóide canferol em todas elas. Estas substâncias não foram encontradas em nenhuma das diferentes amostras que também foram analisadas, sendo considerados como possíveis marcadores para a determinação da origem floral desses méis.

A determinação dos flavonóides quercetina, hesperetina e crisina, como marcadores químicos de mel de citros do norte do Irã, foi otimizada com extração em fase sólida, análise por CLAE-DAD em coluna analítica com fase reversa C18 (octadesil) e eluição isocrática. Este trabalho permitiu um rápido tratamento da amostra, baixo consumo de solventes, além de o método ter tido boa sensibilidade, linearidade, repetibilidade e separação exata dos flavonóides caracterizados (HADJMOHAMMADI *et al*, 2009).

Em trabalho recente, VÁZQUEZ *et al* (2009) analisando o perfil volátil de 49 amostras de méis espanhóis de diferentes origens botânicas por CG-EM, em conjunto com a análise sensorial, propôs uma correlação entre a presença de voláteis e atributos sensoriais específicos para méis de uma mesma procedência floral como alternativa para determinar marcadores exclusivos para méis de citros, eucalipto e urze.

Com o objetivo de determinar a presença de marcadores químicos em méis monoflorais argentinos de três diferentes regiões, de características geoquímicas e de vegetação típica LURLINA *et al*, 2009 investigaram os flavonóides não glicosilados quercetina, luteolina e miricetina. Usando Amberlite XAD-4 para a extração das substâncias fenólicas e a análise por CLAE para a quantificação, foi possível observar

que o conteúdo de flavonóides variou em virtude das origens geográficas dos méis. Com este trabalho os autores consideraram que os três flavonóides avaliados poderiam ser indicados como marcadores químicos para origem fitogeográfica associada a posição dominante dos tipos de pólen nas amostras.

Em recente trabalho TUBEROSO *et al* (2009), analisando o perfil cromatográfico de amostras de mel monofloral de *Asphodelus microcarpus*, um tipo de erva da família das liliáceas, detectou um pico característico, que ainda não havia sido observado em outros méis. Para tanto, amostras de méis de 2005 a 2008 foram monitoradas, e em todas elas foi observada a presença do siringato de metila, um derivado do ácido sirínico. O siringato de metila foi observado no extrato por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), foi isolado, purificado e caracterizado por cromatografia líquida acoplada ao massa (CL-EM/EM) e RMN, em comparação ao seu padrão original. A determinação da origem floral da substância foi confirmada também, a partir da análise da amostra do néctar das flores de asphodel. Com este trabalho os autores concluíram que a melissopalínologia não poderia ser usada para determinar a origem floral do referido mel, pois seria necessário uma média de 80% do néctar, para se alcançar os níveis de siringato de metila observado, e a contribuição do pólen nesta erva, por análise melissopalínológica, foi menor do que 6%.

Para os méis brasileiros, DE MARIA *et al*, 1999, estudaram os principais constituintes não-voláteis de amostras de mel genuíno derivados de diferentes espécies de plantas encontradas em distintos estados brasileiros. Os níveis de água, acidez total, prolina livre, atividade de diastase, HMF, frutose e glicose foram determinados em setenta e quatro diferentes tipos de méis de *Apis mellifera* de quatro regiões do Brasil, porém nenhum composto fenólico foi investigado e relacionado à origem botânica.

Em 2002, o trabalho de tese desenvolvido por Alencar estudou a composição fenólica de méis e própolis oriundos de mesma colméia coletada de várias regiões do Brasil. Este trabalho apresentou a avaliação da composição química de amostras de méis uniflorais de laranja (*Citrus aurantium*), eucalipto (*Eucalyptus* sp.), alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*) (SE5), assa-peixe (*Vernonia polyanthes*), rubim (*Leonurus sibiricus*) e capixingui (*Croton floribundus*), juntamente com as amostras de própolis das respectivas colméias da região sudeste do Brasil. A análise por meio de CLAE com fase reversa e/ou CG-EM permitiu a confirmação dos flavonóides apigenina, crisina, isosakuranetina, canferide e canferol, os quais também já foram

previamente relatados em amostras de méis (SABATIER *et al*, 1992; RIBEIRO-CAMPOS *et al*, 1990; FERRERES *et al*, 1991). Contudo a hesperetina, do mel de laranja, e a quercetina, do mel do alecrim do campo só foram identificados por CLAE. Todavia a presença da hesperetina já foi confirmada em mel de laranja, e sua forma glicosilada (hesperedina) foi confirmada no néctar deste vegetal (FERRERES *et al*, 1993).

O nosso grupo de pesquisa vem estudando e caracterizando por análises cromatográficas e por métodos colorimétricos, os perfis dos polifenóis em amostras de méis e pólen brasileiros de *Apis mellifera*. Até o presente momento, foram estudados méis de eucalipto e silvestre dos estados do Rio de Janeiro e São Paulo (DA SILVA, 2004; Tabela 2), méis e polens silvestre e de assa peixe, mel de macieira de Mato Grosso, Paraná, Pernambuco, São Paulo e Minas Gerais ( MONTAGNI, 2005, Tabelas 3 e 4), méis de laranjeira, silvestre e eucalipto do Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais (LIANDA, 2004 e 2009, Tabelas 5 e 6).

**Tabela 2:** Substâncias fenólicas identificadas nos méis de eucalipto e silvestre (DA SILVA, 2004).

<b>Amostras de méis</b>	<b>Substâncias Fenólicas identificadas por CLAE-DAD</b>
<b>Méis Eucalipto (RJ e SP)</b>	<b>Ácidos:</b> gálico, vanílico, <i>para</i> -cumárico, ferúlico e cinâmico.
<b>Méis Silvestres (RJ)</b>	<b>Ácidos:</b> gálico, vanílico, clorogênico, <i>orto</i> -cumárico, cinâmico e <i>orto</i> -metoxi-cinâmico.

**Tabela 3:** Substâncias fenólicas identificadas nos méis silvestre, assa peixe e macieira (MONTAGNI, 2005).

Amostras de méis	Substâncias Fenólicas identificadas por CLAE-DAD
Méis Silvestre (PR, MT e PB)	<b>Ácidos:</b> gálico, protocatecuico, vanílico, clorogênico, <i>meta</i> -cumárico, <i>para</i> -cumárico cinâmico, <i>para</i> -metoxi-benzóico, <i>para</i> -metoxicinâmico, <i>para</i> -hidroxibenzóico, <b>Flavonóides:</b> quercetina, hesperidina, rutina
Méis Assa peixe (MG, SP e PR)	<b>Ácidos:</b> gálico, protocatecuico, vanílico, <i>meta</i> -cumárico, cinâmico, <i>para</i> -metoxi-benzóico, <i>para</i> -metoxicinâmico, <i>para</i> -hidroxibenzóico, <b>Flavonóides:</b> quercetina, rutina
Mel Macieira (SP)	<b>Ácidos:</b> <i>para</i> -hidroxibenzóico, <i>para</i> -cumárico, <i>para</i> -metoxi-benzóico. <b>Flavonóide:</b> quercetina

**Tabela 4:** Substâncias identificadas nas amostras de polens apícolas (MONTAGNI, 2005).

Amostras de Pólens	Flavonóides Identificados
Silvestre (MT)	trictina, miricetina
Silvestre (PR)	trictina, miricetina
Assa peixe (SP)	miricetina

**Tabela 5:** Substâncias fenólicas identificadas nos méis silvestres e laranjeira (LIANDA, 2004).

Amostras de méis	Substâncias Fenólicas identificadas por CLAE-DAD
Méis Silvestre (RJ e SP)	<b>Ácidos:</b> <i>para</i> -metoxi-benzóico, <i>para</i> -metoxicinâmico, <i>para</i> -hidroxibenzóico, gálico, vanílico, sinápico, protocatecuico, <i>para</i> -cumárico <b>Flavonóides:</b> morina, quercetina
Méis Laranjeira (RJ e SP)	<b>Ácidos:</b> <i>para</i> -hidroxibenzóico, vanílico, <i>para</i> -cumárico, gálico, sinápico, siríngico, protocatecuico, <i>para</i> -cumárico, cinâmico e <i>para</i> -metoxi-cinâmico. <b>Flavonóides:</b> morina, quercetina, rutina

**Tabela 6:** Substâncias fenólicas identificadas nos méis silvestres, laranjeira e eucalipto (LIANDA, 2009).

Amostras de méis	Substâncias Fenólicas identificadas por CLAE-DAD
Méis Silvestre (SP)	<b>Ácidos:</b> protocatecuico, <i>para</i> -hidroxibenzóico, <i>para</i> -cumárico, <i>para</i> -metoxi-benzóico, vanílico e cinâmico. <b>Flavonóides:</b> quercetina, morina, isoquercetina e canferol.
Méis Laranjeira (SP, MG e RJ)	<b>Ácidos:</b> <i>para</i> -hidroxibenzóico, protocatecuico, vanílico, <i>para</i> -cumárico e cinâmico. <b>Flavonóides:</b> isoquercetina e quercetina.
Méis de Eucalipto (MG e SP)	<b>Ácidos:</b> protocatecuico, <i>para</i> -hidroxibenzóico, siríngico, vanílico e cinâmico. <b>Flavonóide:</b> *tricetina.

\* confirmado por CCF

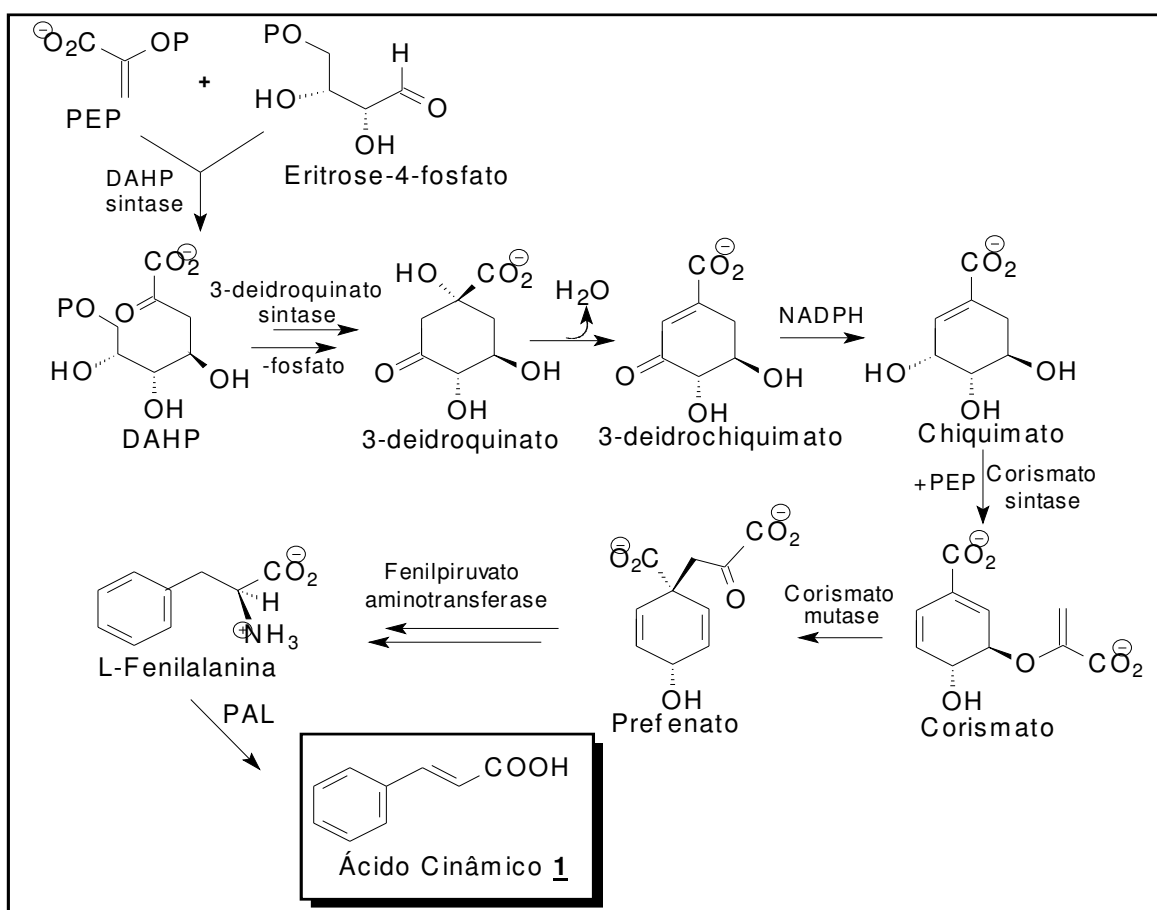
#### 1.4 Substâncias Fenólicas e a Rota Biossintética

Apesar de ser um produto exclusivo das abelhas, a matéria prima para a produção do mel é obtida a partir de uma interação ecológica entre o inseto e a planta. Estima-se que um terço da produção agrícola mundial depende das abelhas *Apis mellifera*, pois elas são capazes de reunir grandes exércitos polinizadores em qualquer época do ano, para exercer intensa atividade polinizadora em curtos períodos de tempo. Essa relação é benéfica para ambas as partes, a abelha ao mesmo tempo em que usa as fontes vegetais para se nutrir de pólen e néctar, participa ativamente do processo reprodutivo das plantas, comportando-se como importantes agentes polinizadores naturais (COX-FOSTER & VANENGELSDORP, 2009).

As plantas respondem aos estímulos ambientais produzindo em maior ou menor intensidade, substâncias do seu metabolismo primário e secundário, deste último, resultam substâncias de baixo peso molecular, como alcalóides, terpenóides e substâncias fenólicas. A composição química da planta é extremamente vasta, e mais de 100 mil substâncias potencialmente ativas, agrupadas nessas três classes, já foram identificadas (ALVES, 2001; CARLINE *et al*, 2007). Neste contexto, todas as vezes que a abelha for visitar uma planta e dela retirar alguns dos seus produtos, necessários a

sua nutrição, as substâncias ativas dos vegetais poderão assim, serem incorporados no mel, como por exemplo, as substâncias fenólicas.

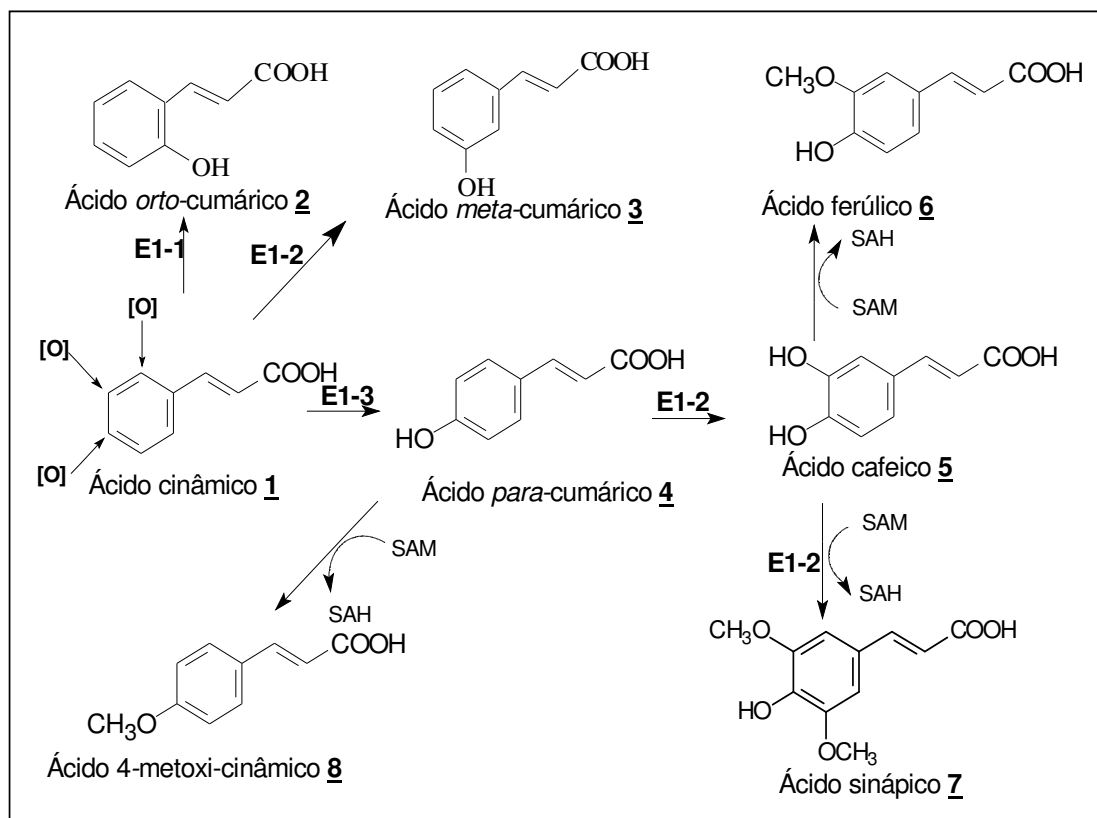
Os metabólitos secundários ou especiais dos vegetais são formados por diversos caminhos biossintéticos (ALVES, 2001). O ácido chiquímico, por exemplo, tem um papel bioquímico muito importante na síntese de diversos constituintes químicos das plantas. O ácido chiquímico é um dos intermediários na via que sintetiza os aminoácidos aromáticos essenciais: L-fenilalanina, L-tirosina e L-triptofano. Ele também é um precursor do ácido benzóico e do ácido cinâmico, de onde resulta uma série de outros ácidos fenólicos (DEWICK, 2001). Este ácido é formado por um precursor de três átomos de carbono o PEP (fosfoenolpiruvato), intermediário da via glicolítica, e por uma molécula de açúcar com quatro átomos de carbono, a eritrose-4-fosfato, via das pentoses fosfato, através de uma série de reações em etapas como mostra a figura 3 (MANN, 1987).



**Figura 3.** Proposta biossintética para a formação do ácido cinâmico (MANN, 1987).

O fosfoenolpiruvato, através de uma reação aldólica com a eritrose-4-fosfato forma o intermediário 3-deoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato (DAHP) que, sob ação da enzima 3-desidroquinato sintase, perde um grupo fosfato e sofre ciclização, formando o 3-desidroquinato. Após eliminação de uma molécula de água forma-se o 3-desidrochiquimato-3-fosfato, este intermediário sofre influência do cofator nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) sofrendo redução e originando o chiquimato. O próximo passo é mediado pela enzima corismato sintase e após a transesterificação do chiquimato com uma molécula de fosfoenolpiruvato forma-se o corismato. O corismato através da ação da enzima corismato mutase, sofre um rearranjo de Claisen para gerar o prefenato. Finalmente, a aminação redutiva do prefenato forma a fenilalanina, que é um aminoácido importante na construção de outras substâncias naturais, tais como as proteínas, alcalóides e o ácido cinâmico **1** (substância com esqueleto C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>). O ácido cinâmico **1** é formado a partir da fenilalanina, pela ação da enzima L-fenilalanina amônialiase (PAL), que é capaz de catalisar a remoção da amônia (MANN, 1987; DEWICK, 2001).

A importância do ácido cinâmico **1**, figura 3, como constituinte natural e como provável progenitor para a formação de outras substâncias contendo esqueleto do tipo C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> tem sido descrita na literatura (GEISSMAN & CROUT, 1969; MANN, 1994).



**Figura 4.** Proposta biossintética para derivados do ácido cinâmico (**E1-1**: cinamato 2-hidroxilase, **E1-2**: cinamato 3-hidroxilase, **E1-3**: cinamato 4-hidroxilase (GEISSMAN & CROUT, 1969; MANN, 1994).

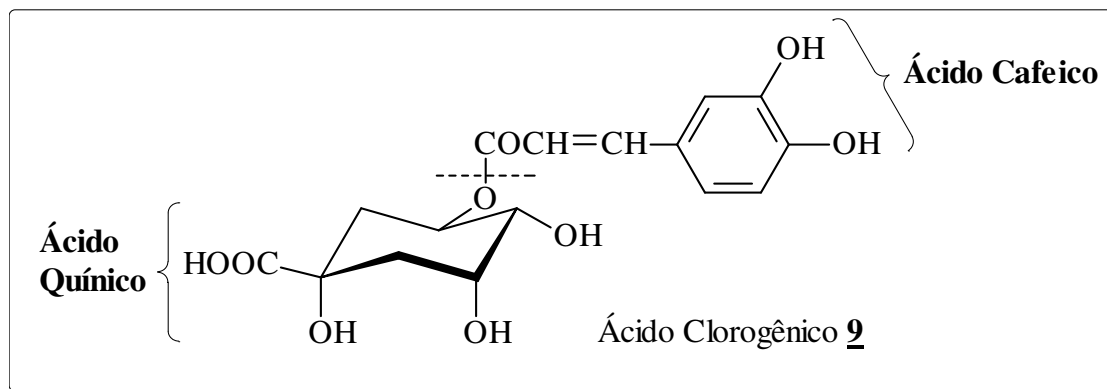
A partir do ácido cinâmico 1 através de processos oxidativos e/ou de reações de metilação (sendo estes derivados formados pela ação do cofator enzimático S-adenosil metionina-SAM), são formados a maioria dos seus derivados, tais como: ácido *orto*-cumárico **2** (2-hidroxicinâmico), ácido *meta*-cumárico **3** (3-hidroxicinâmico), ácido *para*-cumárico **4** (ácido 4-hidroxicinâmico), ácido cafeico **5** (3,4-diidroxi-cinâmico), ácido ferúlico **6** (4-hidroxi,3-metoxi-cinâmico), ácido sinápico **7** (ácido 4-hidroxi, 3,5-dimetoxi-cinâmico) e ácido *para*-metoxi-cinâmico **8** (4-metoxi-cinâmico) (DEY, 1997; DEWCK, 2001; Figura 4).

Essas reações são totalmente dependentes da ação enzimática, cuja participação é de fundamental importância, tanto na velocidade como na especificidade das vias metabólicas envolvidas.

Alguns dos ácidos cinâmicos mais comuns são os ácidos: *para*-cumárico, cafeico, ferúlico e o sinápico. Estes podem ser encontrados em plantas, tanto na sua forma livre, quanto em uma série de compostos esterificados, como exemplo, o ácido



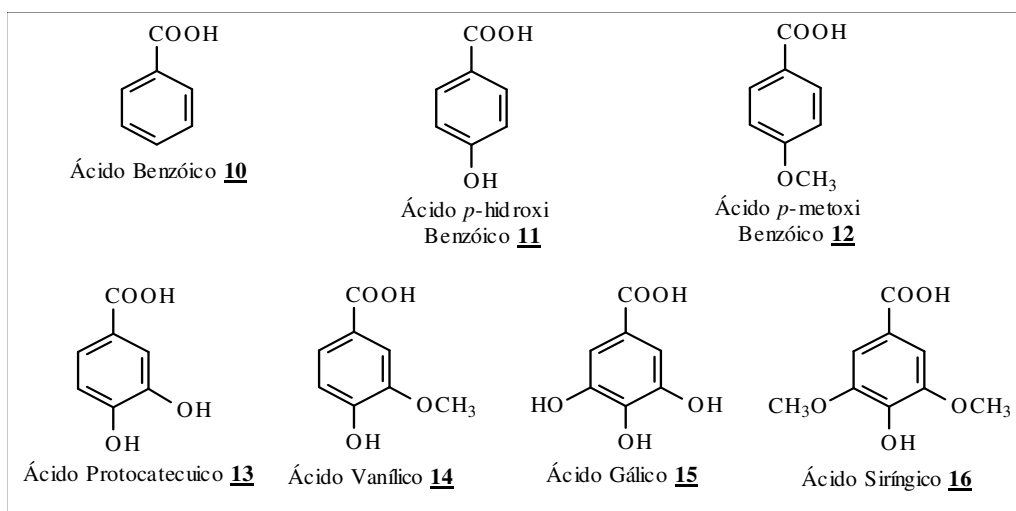
quínico e o cafeico, que juntos formam o ácido clorogênico ou o ácido 3-*O*-cafeiolquínico, figura 5 (DEWICK, 2001).



**Figura 5.** Estrutura do ácido clorogênico.

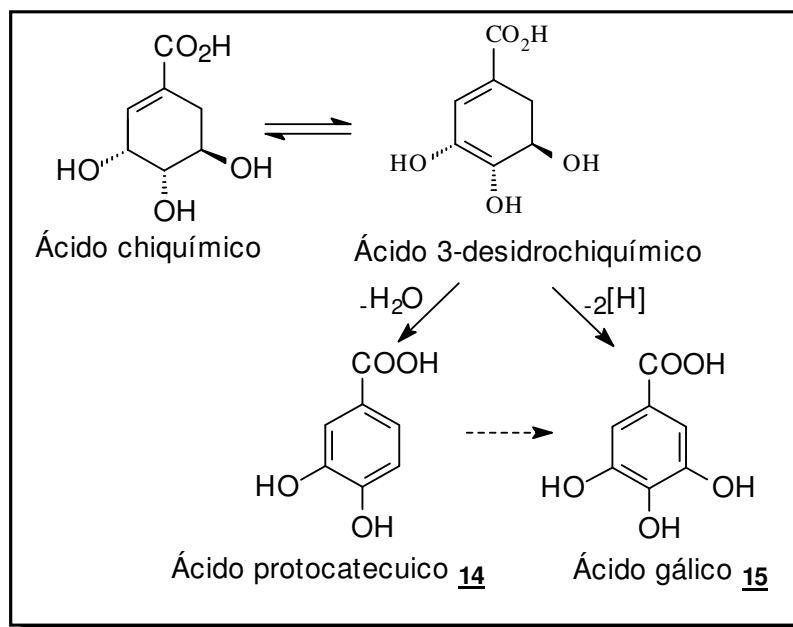
O ácido cafeico é largamente distribuído nas plantas superiores na forma de seu éster com o ácido quínico. A formação do ácido clorogênico nas plantas superiores a partir da fenilalanina (ou ácido cinâmico) foi estabelecida através de experimentos de marcação isotópica dos precursores com carbono quatorze ( $^{14}\text{C}$ ) (MANN, 1994).

O ácido benzóico **10** e seus derivados: ácido *para*-hidroxi-benzóico **11**, ácido *para*-metoxi-benzóico **12**, ácido protocatecuico **13** (3,4-diidroxi-benzóico), ácido vanílico **14** (4-hidroxi-3-metoxi-benzóico), ácido gálico **15** (3,4,5-triidroxi-benzóico) e ácido siríngico **16** (4-hidroxi-3,5-dimetoxi-benzóico) são, assim como os derivados de cinâmico, substâncias fenólicas naturais largamente distribuídas nas plantas superiores (Figura 6), e ocorrem usualmente, como ésteres alquílicos (-COOR) ou glicosídicos (-COO-gli) e apresentam açúcares ligados à hidroxila fenólica (DEWICK, 2001).



**Figura 6.** Ácido benzóico e seus derivados de ocorrência natural.

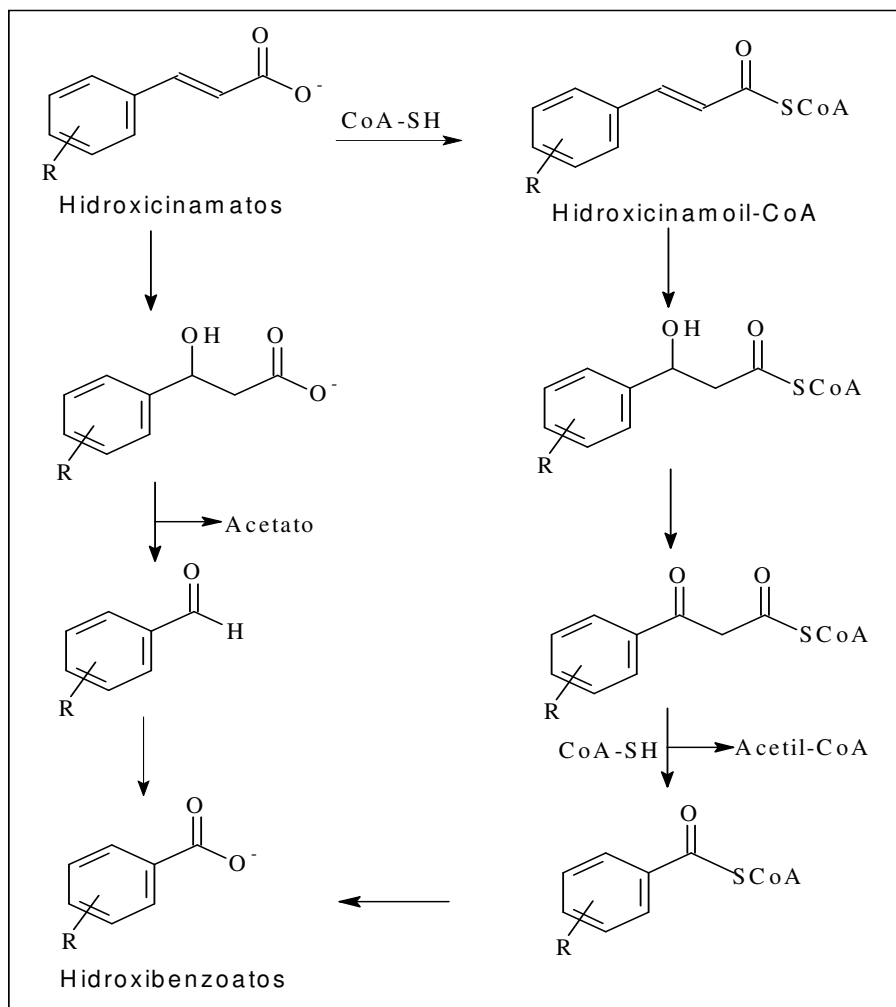
O ácido gálico **15** pode ser formado a partir de um precursor da via do chiquimato, o 3-desidrochiquimato, intermediário do ácido chiquímico, figura 7.



**Figura 7.** Proposta de formação do ácido gálico **15**.

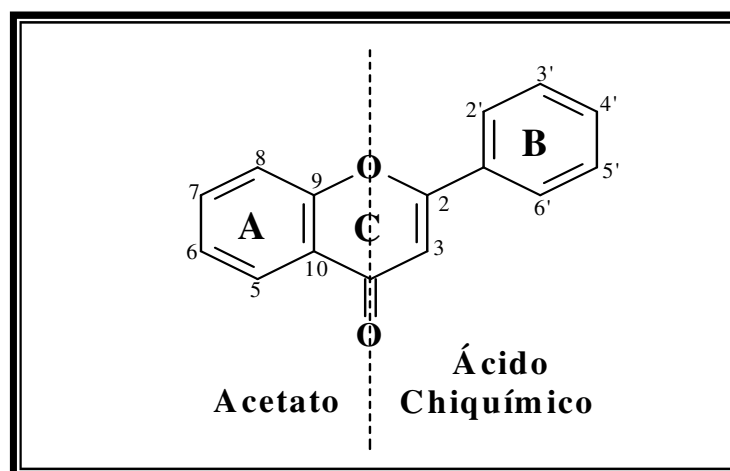
A aromatização direta da forma enólica do 3-desidrochiquimato é provavelmente a rota predominante que leva a formação do ácido gálico nas plantas. A hidroxilação direta do ácido protocatecuico **14** para formar o ácido gálico **15**, embora rara, também é conhecida, figura 7 (GEISSMAN & CROUT, 1969; MANN, 1994).

Existem várias propostas para a biossíntese dos hidroxibenzoatos, sendo que vários caminhos podem levar a estes metabólitos dependendo da planta. A principal rota é a degradação da cadeia dos hidroxicinamatos e remoção de acetato. A seqüência de reações foi proposta através de CoA-éster, entretanto, uma segunda possibilidade, que não requer a CoA não pode ser excluída. A substituição na cadeia do hidroxibenzoato pode ser determinada pelo precursor hidroxicinamato, porém, hidroxilações e metilações podem ocorrer com os hidroxibenzoatos mediados por enzimas específicas e o cofator SAM, Figura 8 (STRACK, 1997).



**Figura 8.** Proposta biossintética para derivados do ácido benzóico (STRACK, 1997).

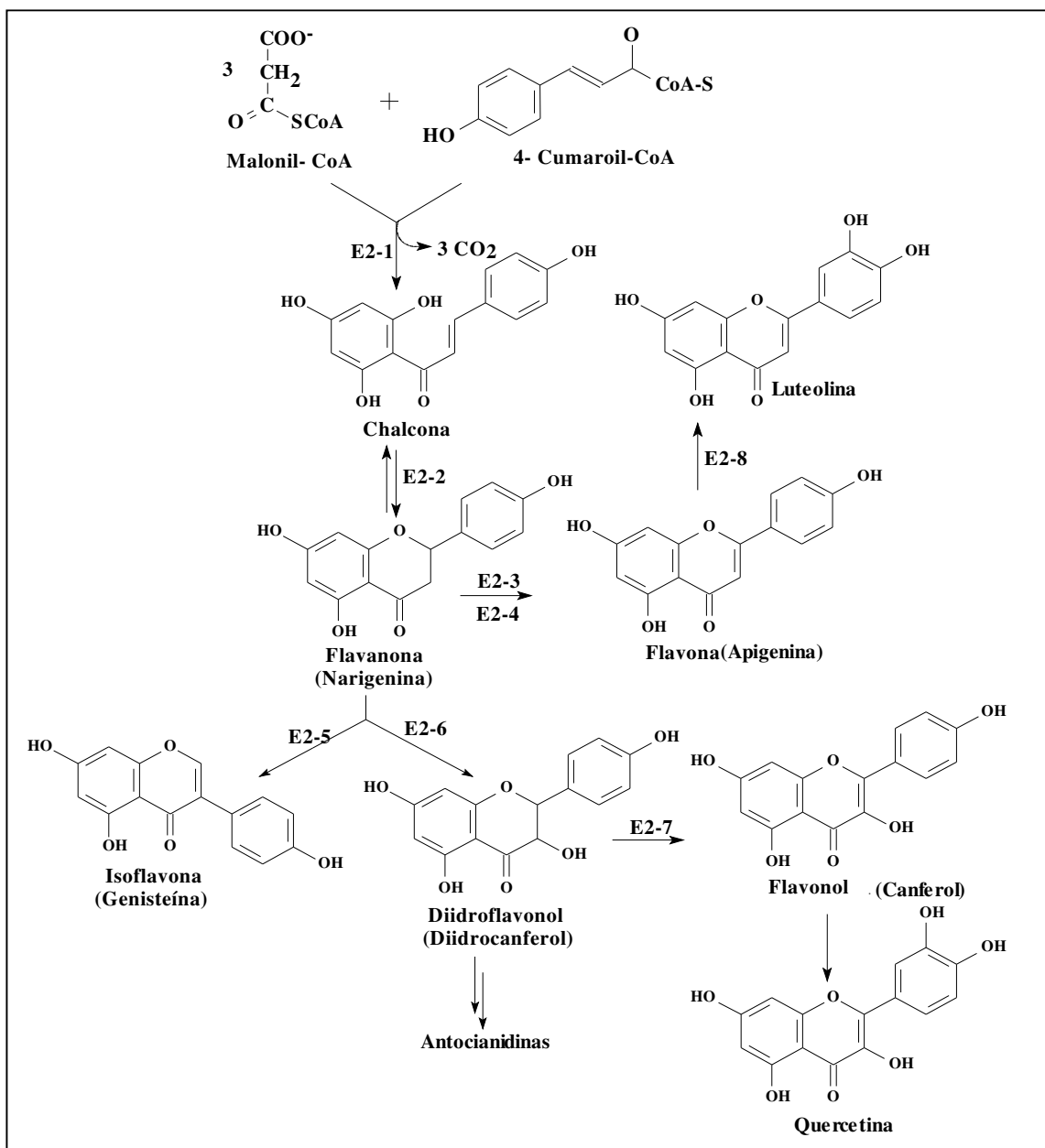
Os flavonóides são em geral, substâncias polifenólicas caracterizadas pela presença de 15 átomos distribuídos em uma estrutura tricíclica (A,B,C) do tipo C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>. Com mais de 8000 substâncias individuais conhecidas, os flavonóides têm origem biossintética mista, com parte da molécula proveniente da rota do ácido chiquímico e parte do ácido mevalônico (Figura 9). Um derivado do ácido cinâmico (fenilpropano), sintetizado a partir do ácido chiquímico, age como precursor na síntese de um intermediário ao qual são adicionados três resíduos de acetato com posterior ciclização da estrutura (DI CARLO *et al*,1999).



**Figura 9.** Esqueleto básico dos flavonóides.

A via do ácido chiquímico origina a fenilalanina, precursor do ácido cinâmico (como mostrado na figura 3), sendo este responsável pelo anel aromático **B** e a ponte de três carbonos. O outro anel aromático, anel **A** do esqueleto básico dos flavonóides é formado pela rota do acetato.

A biossíntese dos flavonóides pode ser vista na figura 10 iniciando com a condensação de 4-cumaril CoA com três moléculas de acetil CoA, mediado pela enzima chalcona sintase, formando-se então a chalcona. A ciclização da chalcona durante a síntese da flavanona é catalisada pela chalcona isomerase encontrada fortemente complexada com a chalcona sintase. A flavanona é precursora de três diferentes classes de flavonóides, isto é; flavonas, isoflavonas e diidroflavonóis. Na formação das flavonas e flavonóis ocorre a introdução de uma dupla ligação entre C<sub>2</sub> e C<sub>3</sub>. Dois passos são necessários para esta conversão onde são necessárias duas flavona sintase: a flavona sintase I (dioxigenase) e a flavona sintase II (monoxigenase). A monoxigenase é dependente da citocromo P-450, que também catalisa a epoxidação para a formação das isoflavonas. Os diidroflavonóis são formados pela ação de uma flavanona-3-hidroxilase. As reações enzimáticas envolvidas na produção de algumas classes de flavonóides são mostradas na figura 10 (adaptada de DEY & HARBONE, 1997; HELDT, 1997),



**Figura 10.** Proposta biossintética para flavonóides. **E2-1:** Chalcona sintase, **E2-2:** Chalcona isomerase, **E2-3:** Flavona sintase I (2-hidroxi-flavanona sintase), **E2-4:** Flavona sintase II (2-hidroxi-flanona sintase), **E2-5:** Isoflavona sintase (2-hidroxiisoflavona sintase), **E2-6:** Flavanona-3-hidroxilase e **E2-7:** Flavonol sintase), **E2-8:** Flavona 3' hidroxilase (adaptada de DEY & HARBONE, 1997; HELDT, 1997).

Em geral, os flavonóides apresentam-se em duas formas: conjugados com açúcares (mono-, di- ou triglicosídeos), formando os *O*-glicosídeos (glicosídeos) ou *C*-glicosídeos (heterosídeos); ou na forma livre (aglicona ou genina).

Por apresentarem uma variada constituição, foram divididos em diferentes classes, tais como flavonóis, flavonas, isoflavonas, chalconas, auronas, e flavanonas (HARBORNE, 1984; HAHLBROCK, 1981), Tabela 7.

Os flavonóis são encontrados como co-pigmentos das antocianidinas nas pétalas e folhas de plantas superiores. Caracterizam-se por apresentar uma hidroxila ligada na posição 3 (como exemplo o canferol, quercetina e miricetina). Alguns flavonóis podem apresentar glicosídeos ligados a sua estrutura, sendo o mais comum a quercetina-3-rutinosídeo, mais conhecido como rutina (HARBORNE, 1984; HAHLBROCK, 1981).

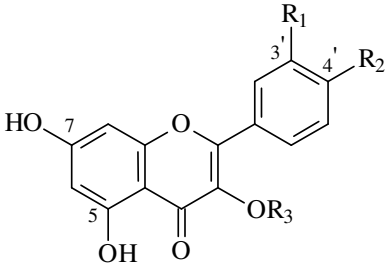
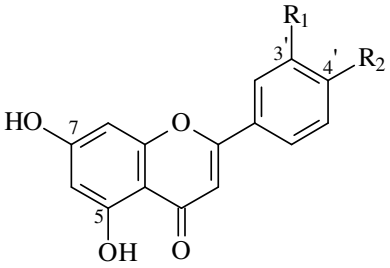
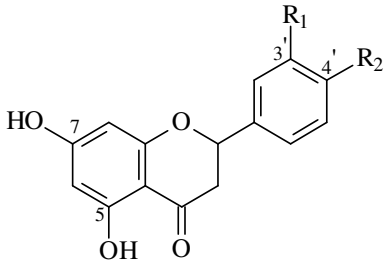
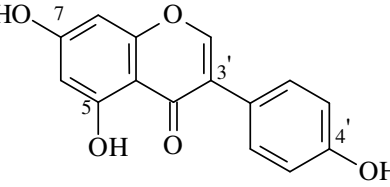
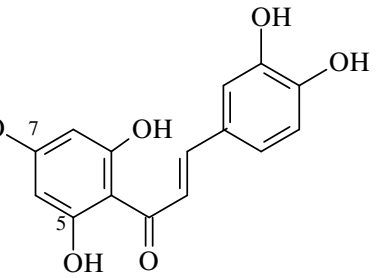
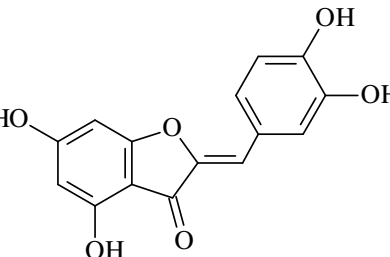
As flavonas diferem dos flavonóis por não apresentarem hidroxila ligada à posição 3, e podem apresentar glicosídeos ligados a molécula. As flavonas mais comuns são luteolina e apigenina.

As isoflavonas são isômeros das flavonas, porém de ocorrência muito mais restrita, em relação à atividade fisiológica, são subdivididas em três grupos, compostos que mimetizam atividade estrogênica, compostos com atividade inseticida e fitoalexinas (HARBORNE, 1984; HAHLBROCK, 1981). A Tabela 7 apresenta as estruturas dos principais flavonóides.

As chalconas e auronas são grupos pequenos de metabólitos que ocorrem especialmente na Família Asteraceae. Possuem coloração amarelada, a qual se torna vermelha quando exposta a vapores alcalinos. Chalconas não apresentam anel central (anel C), enquanto que nas auronas há um, formado por 5 membros (HARBORNE, 1984; HAHLBROCK, 1981).

As flavanonas são isômeros das chalconas, podendo as moléculas apresentar interconversão em estudos *in vitro*. São flavonóides comuns nos frutos de *Citrus*, porém sem a ocorrência da chalcona análoga (HARBORNE, 1984).

**Tabela 7:** Estruturas químicas de classes comuns de flavonóides.

FLAVONÓIDES	ESTRUTURA	EXEMPLOS
<p><b>FLAVONOL</b></p>		<p><b>QUERCETINA</b>  <math>R_1 = R_2 = R_3 = \text{OH}</math>  <b>CANFEROL</b>  <math>R_1 = \text{H}, R_2 = R_3 = \text{OH}</math>  <b>RUTINA</b>  <math>R_1 = R_2 = \text{OH}, R_3 = \text{rutinose}</math></p>
<p><b>FLAVONA</b></p>		<p><b>LUTEOLINA</b>  <math>R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{OH}</math>  <b>APIGENINA</b>  <math>R_1 = \text{H}, R_2 = \text{OH}</math>  <b>CRISINA</b>  <math>R_1 = R_2 = \text{H}</math></p>
<p><b>FLAVANONA</b></p>		<p><b>NARINGENINA</b>  <math>R_1 = \text{H}, R_2 = \text{OH}</math></p>
<p><b>ISOFLAVONA</b></p>		<p><b>GENISTEÍNA</b></p>
<p><b>CHALCONA</b></p>		<p><b>BUTEÍNA</b></p>
<p><b>AURONA</b></p>		<p><b>AURESIDINA</b></p>

Os flavonóides são substâncias fenólicas amplamente encontradas em tecidos vasculares de plantas, incluindo frutas, pólen, raízes e caules (DI CARLO *et al*, 1999; PIETTA, 2000; ANDLAUER & FURST, 1998). Estes grupos de substâncias são responsáveis pelas cores de muitas frutas e vegetais e são encontrados também em grãos, nozes, folhas e flores (COOK & SAMMAN, 1996). Portanto, são constituintes importantes na dieta humana, e embora não sejam considerados nutritivos, o interesse nessas substâncias nasceu por conta dos possíveis efeitos sobre a saúde humana, principalmente, as atividades antimicrobiana, anticâncer e antioxidante (HERTOG *et al*, 1992; KANADASWAMI *et al*, 2005).

De um modo geral, a química dos flavonóides naturais é complexa, pois em sua maioria corresponde a formas conjugadas, ligando-se a açúcares ou mais grupos fenólicos. Os flavonóis e as flavonas ocorrem usualmente como glicosídeos, principalmente, nas folhas e outras partes das plantas acima da superfície do solo, pois sua biossíntese é estimulada pela luz (HERTOG *et al*, 1992). Os flavonóis são os que mais se destacam nos alimentos, sendo os principais representantes a quercetina e o canferol, figura 10. As flavonas são menos comuns em frutas e vegetais e consistem, principalmente, dos glicosídeos de luteolina e apigenina (MANACH *et al*, 2004).



## **2 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DO MEL**

A utilização do mel como alimento funcional tem recebido grande destaque nos últimos anos, porque além dos carboidratos, das proteínas, dos aminoácidos, dos lipídeos e das vitaminas encontrados, o mel apresenta também em sua composição, as substâncias fenólicas, os ácidos e flavonóides, que agrega valor terapêutico a este alimento alternativo e/ou suplemento nutricional.

Os alimentos funcionais são definidos como qualquer substância ou componente de um alimento que proporciona benefícios para a saúde, inclusive na prevenção e no tratamento de doenças. Essas substâncias podem variar de nutrientes isolados, produtos de biotecnologia, suplementos dietéticos, alimentos geneticamente modificados até os que foram processados, além dos derivados de plantas (POLLONIO, 2000). Eles devem exercer um efeito metabólico ou fisiológico que contribua para a saúde física e para a redução do risco de desenvolvimento de doenças crônicas. Nesse sentido, devem fazer parte da alimentação usual e proporcionar efeitos positivos, obtidos com quantidades não tóxicas e que exerçam tais efeitos mesmo após a suspensão da ingestão e que não se destinem a tratar ou curar doenças, estando seu papel ligado à redução do risco de contrair doenças (BORGES, 2001).

Sendo assim, as propriedades biológicas e/ou funcionais do mel devem-se principalmente, pela presença das substâncias fenólicas em sua composição, as mesmas que são produzidas pelo metabolismo secundário dos vegetais e que podem ser incorporadas nos produtos das abelhas.

Neste contexto, torna-se interessante fazer uma breve discussão sobre algumas das diversas propriedades biológicas do mel em virtude, principalmente, da presença das substâncias fenólicas em sua composição.

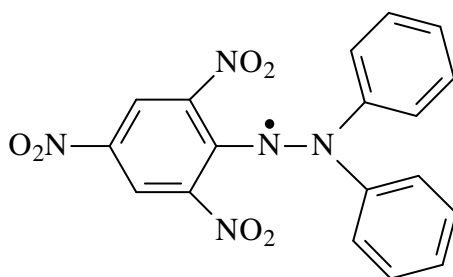
### **2.1 Atividade Antioxidante do Mel**

O estresse oxidativo nas células ocasionados por diversas espécies reativas de oxigênio (ROS) pode interferir diretamente na viabilidade celular. Os danos causados por estes agentes oxidativos, altamente reativos, podem induzir mitose aumentando o risco de danificar a estrutura do DNA e a divisão de células, com danos irreparáveis ou que não podem ser corrigidos durante o processo de divisão celular, resultando em uma série mutações (NIJVELDT *et al*, 2001).

A eficiência das substâncias fenólicas como antioxidantes depende, em grande parte, da sua estrutura química, orientação relativa e do número de grupos hidroxilas ligados ao anel aromático (PAGANGA *et al*, 1996).

Os antioxidantes são classificados de acordo com seu modo de atuação podendo ser primários, quando interrompem a cadeia da reação através da doação de elétrons ou hidrogênio aos radicais livres, convertendo-os em produtos termodinamicamente estáveis e/ou reagindo com os radicais livres, formando complexos que podem reagir com outro radical livre. E secundários, quando retardam a etapa de iniciação da autoxidação, por diferentes mecanismos que incluem complexação de metais, seqüestro de oxigênio, decomposição de hidroperóxidos para formar espécie não radicalar, absorção da radiação ultravioleta ou desativação de oxigênio singlete (ADEGOK *et al*, 1998).

A maioria dos métodos antioxidantes usados envolve a geração de espécies oxidantes, geralmente radicais livres, e sua concentração é monitorada na presença de antioxidantes que os seqüestram. Entre os métodos que empregam radicais livres orgânicos na avaliação de seqüestradores de radicais livres, o método do DPPH (2,2 difenil-1-picril-hidrazil), Figura 11, tem sido exaustivamente utilizado por vários autores, devido principalmente a sua simplicidade e rapidez (BRAND-WILLIAMS *et al*, 1995).

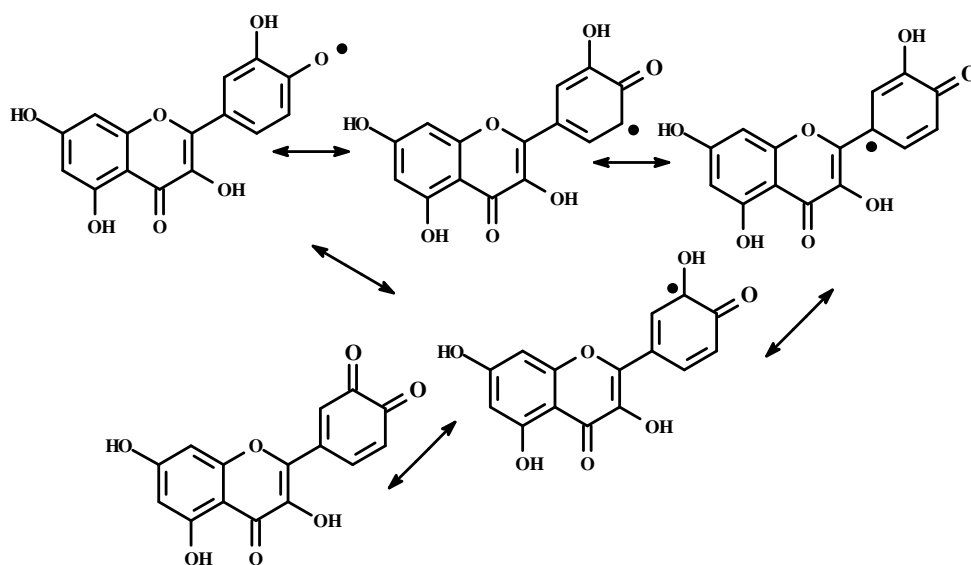


**Figura 11:** Estrutura química do radical DPPH (2,2–difenil-picril-hidrazil).

A molécula de DPPH é considerada um radical livre estável por apresentar um elétron livre que pode deslocalizar-se por toda a sua estrutura, e além do mais, não dimeriza facilmente como ocorre usualmente com os demais radicais livres. Esse efeito de ressonância que a molécula de DPPH apresenta resulta em uma coloração violeta escura, que é caracterizada por apresentar uma banda de absorção em cerca de 520 nm quando em solução de etanol ou metanol.

Sendo assim, quando a solução de DPPH é misturada a uma solução de mel ou dos seus extratos, as substâncias fenólicas ali presentes reagem com o radical livre doando um radical hidrogênio, ocasionando a perda de coloração que vai do violeta até a forma incolor, em uma reação que depende do tempo e da concentração dos polifenóis da amostra.

A Figura 12 mostra um exemplo das estruturas de ressonância do flavonóide quercetina após ter doado para o DPPH o seu radical hidrogênio, gerando assim, a *orto*-quinona.



**Figura 12:** Formação da *orto*-quinona no anel **B** da quercetina.

A quercetina apresenta duas hidroxilas em posição *orto* no anel B, o que garante uma reação mais eficaz, pois deste modo, ela é capaz de seqüestrar um maior número de radicais livres por molécula, com a conseqüente produção de *orto*-quinona no anel B. Além disso, esse flavonóide apresenta duas hidroxilas no anel A e uma ligação dupla entre os carbonos 2 e 3 do anel C, que permite que o radical formado tenha várias estruturas canônicas adicionais diminuindo assim, a sua reatividade como substância radicalar, até que se estabilize gerando a *orto*-quinona. Alguns outros flavonóides, como por exemplo, canferol, miricetina e morina por não apresentarem as mesmas características estruturais da quercetina têm a sua atividade seqüestradora bastante diminuída (TSIMOGIANNIS & OREOPOULOU, 2006).

Diversos trabalhos têm indicado que parte do papel terapêutico do mel é devido à sua atividade antioxidante, e esta propriedade pode estar relacionada à sua origem floral.

A atividade antioxidante dos méis tem sido frequentemente relacionada ao seu conteúdo total de ácidos fenólicos e flavonóides. Na maioria dos trabalhos, são empregados métodos colorimétricos e o uso de cromatografia líquida de alta eficiência para caracterizar o perfil das substâncias presentes nas amostras.

Em trabalhos realizados com méis malasianos de *Apis mellifera* (*Cocos mucifera* e *Melaluca* spp.) foi observado uma alta correlação entre a atividade antioxidante com os conteúdos de fenólicos total presentes, indicando que estas substâncias eram as responsáveis pelos efeitos antioxidantes das amostras ensaiadas, apesar de, obviamente, outros fatores estarem envolvidos. Nesse trabalho, o mel *Melaluca*, que apresentou atividade antioxidante significativamente maior, mostrou conter alguns ácidos fenólicos, tais como ácidos gálico, ferúlico, cafeico, benzóico e cinâmico, enquanto o mel de *Cocos* apresentou apenas os ácidos gálico, cafeico e benzóico (ALJADI & KAMARUDDIN, 2004).

Na Espanha, cinquenta e três amostras de méis, sendo trinta e nove monoflorais, nove silvestres e cinco méis de melato, apresentaram seus conteúdos médios de fenóis totais, variando de 0,66, 0,87 e 1,03 mg/100 g de mel, respectivamente. E o estudo da capacidade seqüestradora de radicais frente ao DPPH para esses méis, mostrou-se crescente nessa mesma ordem (PÉREZ *et al*, 2007).

Entretanto, um estudo com dez amostras de méis da Polônia com florada predominante de ervas (camomila, hortelã, urtiga, pinho, tomilho, framboesa entre outras) revelou diferenças não proporcionais, entre atividade antioxidante e o conteúdo de fenólicos totais. Para essas amostras o teor de fenólicos totais variou de 21,7 a 75,3 mg de equivalentes de ácido gálico por 100g de mel, enquanto o teor de flavonóides totais variou de 6,9 a 28,5 mg de quercetina por 100g de mel. Os perfis dos ácidos fenólicos e flavonóides foram determinados por CLAE, e os ácidos *para*-cumárico e gentísico, além dos flavonóides hesperetina e naringenina foram os principais componentes (SOCHA *et al*, 2009).

Recentemente os méis portugueses também foram estudados quanto a sua capacidade antioxidante, quantidade total de substâncias fenólicas e coloração. Nesse trabalho foi observada uma correlação interessante entre a coloração escura da amostra

com o alto teor de fenóis e a sua alta atividade antioxidante, que foi avaliada por três diferentes métodos (frente ao radical DPPH) através da inibição da peroxidação lipídica pelo sistema do  $\beta$ -caroteno e pelo uso do ácido tiobarbitúrico. Uma análise de variância foi realizada para avaliar a influência da intensidade da cor, o método de extração das substâncias presentes nas amostras de méis, o conteúdo de fenóis e consequentemente, suas propriedades antioxidantes (FERREIRA *et al*, 2009).

Fiorani e colaboradores (2006) avaliaram os teores de flavonóides totais de amostras de méis silvestres da região central da Itália, e compararam os resultados dos extratos etéreos (valores variaram de 0,58 a 2,9 mg/100 g de mel) com os extratos aquosos (valores variaram de 0,5 a 1,52 mg/100 g de mel), e os correlacionaram com a atividade antioxidante, além de outras atividades biológicas.

Em outro trabalho com méis italianos, vinte sete amostras de méis florais de diferentes origens da Itália tiveram seus níveis de substâncias fenólicas determinadas por análise colorimétrica e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV). O teor em equivalentes de ácido gálico variou de 60,50 a 274,04 mg/Kg de mel, o teor de flavonóides totais foi de 41,88 a 211,08 mg equivalente de quercetina/Kg de mel e a atividade antioxidante determinada pelo método do ferro reduzido (FRAP) e pelo radical livre DPPH, com atividades variando de 1,265 a 4,396mmol  $\text{Fe}^{+2}$ /Kg e  $\text{IC}_{50}$  de 7,08 a 64,09mg/mL. Uma correlação estatisticamente positiva ( $P < 0,05$ ) foi observada (PICHICHERO *et al*, 2009).

Bertoncelj e colaboradores (2007) compararam o parâmetro físico-químico relativo à coloração com o teor de fenólicos totais e atividade antioxidante de sete tipos de méis da Eslovênia. Os resultados mostraram que os méis eslovenos, que variaram do amarelo claro ao castanho escuro, tiveram significativa atividade antioxidante, utilizando-se para os ensaios os métodos do radical livre 1,1-difenil-picrilhidrazil e do poder antioxidante do ferro reduzido (FRAP). Os teores de fenólicos totais foram expressos em equivalentes de ácido gálico, variando de 44,8 mg/kg de mel de acácia para 241,4mg/kg de mel de abeto. A atividade antioxidante verificada foi maior para os méis considerados mais escuros de floradas como pinheiros, abeto e heterofloral, e menor para os méis mais claros, como o de acácia.

Um trabalho semelhante foi realizado com vinte e quatro amostras de méis de diferentes regiões da Romênia. Parâmetros como umidade, cor, teor de cinzas e de açúcares foram ou relacionadas às quantidades de ácidos fenólicos e flavonóides totais.

As características físico-químicas determinadas se encontraram dentro dos intervalos limite estabelecidos pela União Européia (EU), e a atividade antioxidante teve uma correlação positiva, sendo muito dependente da quantidade de substâncias fenólicas encontradas nas amostras, que por sua vez, estava relacionada com a origem botânica e geográfica (Al *et al*, 2009).

Diferentes extratos das substâncias fenólicas do mel foram separados por BLASA *et al* (2007), com base nas suas características hidrofóbicas, e tiveram sua capacidade antioxidante avaliada frente a radicais livres gerados na membrana das hemácias. As frações de água e éter obtidas a partir do extrato metanólico bruto do mel apresentaram um teor de substâncias fenólicas de 5,33 e 2,62mg equivalentes de ácido caféico/100g de mel, respectivamente. Esses valores foram correlacionados positivamente com o poder antioxidante total avaliado pelo ensaio FRAP. O conteúdo de flavonóides totais foi de 2,57 e 1,64 mg de equivalentes de catequina/100 g de mel para o extrato etéreo e para as frações aquosas, respectivamente. A fração etérea, devido ao seu caráter lipofílico, pode interagir com a membrana dos glóbulos vermelhos, e seu efeito protetor pode estar associado com a vinculação dos flavonóides a membrana celular. Por sua vez, a fração aquosa, mais hidrofílica, atua apenas a partir do exterior da membrana eliminando os radicais livres antes do ataque a mesma.

## **2.2 Atividade Antitumoral do Mel**

O mel apresenta diversas propriedades terapêuticas que inicialmente foram observadas pelas antigas civilizações, que já utilizavam o mel em algumas de suas terapias, e tais características, como já foi dito se devem em grande parte a presença das substâncias fenólicas em sua composição. A atuação dessas substâncias e a sua biodisponibilidade no organismo pode se dar por diferentes mecanismos.

O tempo foi passando e as idéias sobre a atividade biológica do mel foram sendo amplamente disseminadas pela medicina popular, especialmente pela forma de conhecimento do senso comum, passando de geração em geração, até chegar aos laboratórios e centros de pesquisa atualmente consolidados nas universidades, passando a ser comprovadas cientificamente.

O risco menor de câncer de cólon, de próstata e de mama nos indivíduos asiáticos que consomem regularmente mais vegetais, frutas e chá do que as populações ocidentais têm sinalizado para os estudos dos efeitos protetores dos flavonóides e de

dietas ricas nestes gêneros alimentícios, em sua atuação natural como agentes anticancerígenos (KANADASWAMI *et al*, 2009).

Trabalhos *in vitro* tem se concentrado nas ações diretas e indiretas dos flavonóides em células tumorais, e encontraram uma variedade de efeitos anticancerígenos, tais como o crescimento celular e inibição da atividade quinase, indução de apoptose. O padrão de hidroxilação do anel B de flavonas e flavonóis como a luteolina e quercetina, parece ter uma influência decisiva nas suas atividades, especialmente a inibição da atividade da proteína quinase. Os diferentes mecanismos subjacentes à ação anticâncer, em potencial de flavonóides, aguardam elucidação, sendo necessários muitos outros estudos *in vivo*, a fim de desenvolver estratégias baseadas na administração dessas substâncias a população (KANADASWAMI *et al*, 2005).

O passo inicial para a carcinogênese e o envelhecimento das células pode surgir com as modificações permanentes no material genético, induzidas por radicais livres. Neste contexto, os agentes antioxidantes como os flavonóides, presentes na dieta humana, podem ser úteis na prevenção de doenças associadas ao estresse oxidativo e na prevenção do câncer (MARANO & TAKAHASHI, 2009). A quercetina, por exemplo, é um conhecido flavonóide que ganhou muita atenção nos últimos anos, como uma droga com possível potencial no tratamento do câncer.

Indap e colaboradores (2006) investigaram o efeito da quercetina, após a determinação do seu perfil toxicológico, sobre o crescimento tumoral em camundongos com tumor do tipo S-180 (sarcoma ascítico). Nesse trabalho os pesquisadores observaram que cinquenta por cento dos camundongos com tumor S-180 sobreviveram por mais de 2 anos quando foram tratados com uma dose diária intraperitoneal de 100mg de quercetina /kg para nove doses consecutivas. Este resultado sugeriu a administração da quercetina em ensaios futuros.

Em outro estudo relacionando o uso de flavonóide com atividade antitumoral, realizado por Haghiac e Walle (2005), a quercetina mostrou ação efetiva contra o câncer bucal do tipo SCC-9, induzindo irreversivelmente o crescimento celular e inibindo a síntese de DNA, e com isso provocando apoptose das células sobreviventes, onde o mecanismo mostrou-se dependente da dose e do tempo de exposição das células ao flavonóide.

Os estudos da atividade antitumoral do mel, ainda estão se iniciando, mas os resultados recentes têm mostrado que pesquisas com essa finalidade são muito promissoras. O trabalho de FUKUDA *et al* (2009), por exemplo, com o mel de selva,

produzido por abelhas selvagens que vivem na floresta tropical da Nigéria. Este mel, que é muito utilizado na região como remédio tradicional para resfriados, inflamação de pele e queimaduras, foi capaz de reduzir a incidência de tumores do tipo C57BL em ratos que foram injetados com doses intra-peritoniais com este mel, na concentração de 1mg/dia, durante sete vezes. A atividade do mel provocou, entre outras ações, um aumento da população de neutrófilos que são potentes organismos antitumorais, mediados por espécies reativas de oxigênio que também foram aumentadas nas células tratadas.

Recentemente foram caracterizados por cromatografia líquida de alta eficiência, o perfil fenólico de algumas variedades de mel grego das floradas tomilho, pinho e abeto. Os resultados mostraram que a partir de 1 Kg de mel de tomilho, foi possível obter 30,3g de extrato, a maior quantidade entre todas as amostras. O potencial dos extratos dessas amostras, utilizando-se acetato de etila como solvente, foi testado em três tipos de câncer, o de mama (MCF-7), o de próstata (PC-3) e do endométrio. Entre as amostras ensaiadas, o mel de tomilho reduziu significativamente a viabilidade celular de câncer do endométrio e de próstata, por análise da curva dose x resposta, sinalizando sua utilidade na prevenção desses tumores. O teor de ácidos fenólicos totais para as amostras foi de 990mg, 1160mg e 510mg/100g de mel, para tomilho, abeto e pinho, respectivamente, mostrando a existência de uma correlação entre a atividade antitumoral e a quantidade de ácidos fenólicos. As substâncias fenólicas determinadas por cromatografia líquida no mel de tomilho foram os ácidos *para*-hidróxibenzóico e o vanílico, além de nove substâncias não identificadas na análise (TSIAPARA *et al*, 2009).

### **2.3 Atividade Antibacteriana do Mel**

Além da atividade antitumoral, uma outra característica muito conhecida do mel é a sua capacidade de inibir o crescimento bacteriano. Segundo Molan (1992), o mel apresenta um efeito inibitório sobre aproximadamente 60 espécies de bactérias, incluindo aeróbicas e anaeróbicas, gram-positivas e gram-negativas. Uma ação antifúngica foi também observada em algumas leveduras e espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* (MOLAN, 1992).

Em trabalho recente, CHACON *et al* (2009), avaliaram um total de trinta e uma amostras de mel na inibição do crescimento de vários patógenos bacterianos, entre eles



*Escherichia coli*, *Salmonella entérica*, *Bacillus cereus*, *Shingella sonnei*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Sreptococcus mutans*, dentre outros. Todas as bactérias, exceto *P. aeruginosa*, foram sensíveis as amostras de mel testadas, sendo o patógeno *S. sonnei* o que teve a maior inibição. Esse estudo é de grande importância, pois valoriza a utilização do mel como curativo e também como conservante de alimentos minimamente processados.

Os processos reacionais envolvidos que indicam a sensibilidade das bactérias ao contato com o mel podem apresentar muitas variações. Para BOGDANOV (1997), por exemplo, as substâncias bactericidas são originárias das plantas e por este motivo causam capacidade inibitória dos diferentes méis uniflorais. Já MOLAN (1992) e WAHDAN (1998) afirmam que os responsáveis pela habilidade antimicrobiana do mel são os fatores físicos, como sua alta osmolaridade e acidez, e os fatores químicos relacionados a presença de substâncias inibidoras, como o peróxido de hidrogênio, os flavonóides e ácidos fenólicos.

O peróxido de hidrogênio é um agente antimicrobiano muito conhecido, inicialmente aclamado por suas propriedades bactericidas e desinfetantes quando foi utilizado pela primeira vez em atividades clínicas (TURNER, 1983). E muitos dos patógenos bacterianos são resistentes aos antibióticos sintéticos aplicados nos ferimentos. Neste caso, na maioria dos méis a atividade antibacteriana é devido à produção do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), devido aos mecanismos enzimáticos presentes. No entanto, a atividade da catalase em uma ferida aberta pode diminuir o potencial antibacteriano do mel, o que contribui para a não permissão de sua utilização clínica sistemática (PETER, 2009).

Em geral os produtos da colméia, tais como a própolis, a geléia real e o mel, são ingredientes atraentes como alimentos saudáveis, utilizados desde os tempos antigos, também como parte da medicina tradicional. A própolis que é uma substância resinosa usada pelas abelhas, apresenta atividade antitumoral, antioxidante, antimicrobiana, além de efeitos antiinflamatórios e imunomoduladores. A geléia real por sua vez, apresenta além das atividades, antibacterianas, antiinflamatórias, antioxidante, antitumoral, propriedade hipotensora, antihipercolesterolemia e ação desinfetante. Os atributos terapêuticos dos produtos da colméia são atribuídos às substâncias fenólicas, especialmente os flavonóides, por apresentar uma série de propriedades biológicas, já caracterizados como atividade antibacteriana, antiinflamatória, antialérgica, antiviral e vasodilatadora. Os flavonóides atuam também na inibição da peroxidação lipídica, na

agregação plaquetária, na permeabilidade capilar e na modulação de sistemas enzimáticos, como o ciclo das oxigenases e lipoxigenases (MARTOS *et al*, 2008).

Nesse trabalho serão estudados os méis dos estados do Espírito Santo, São Paulo e Minas Gerais, no que tange a determinação de substâncias fenólicas por análise espectrofotométrica, com a utilização do reagente de fenol de Folin-Denis, e por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

As amostras de méis RLE<sub>7</sub>, RLE<sub>8</sub> e RLE<sub>9</sub>, das regiões de Uberaba (MG), São Carlos e Campinas (SP), estudadas neste trabalho, tiveram seus perfis cromatográficos caracterizados em trabalho anterior por LIANDA (2009).

Os resultados para a caracterização do perfil fenólico dos méis serão comparados com a atividade antioxidante das amostras *in natura*, dos seus respectivos extratos, cujos solventes utilizados foram o acetato de etila e o éter metílico em correlação aos padrões comerciais, de diferentes flavonóides e ácidos fenólicos. A maioria dos dados que serão apresentados estão em conformidade com trabalhos descritos anteriormente por nosso grupo de pesquisa (DA SILVA, 2004; LIANDA, 2004 e 2009; MONTAGNI, 2005).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivos Gerais**

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a qualidade, analisar o perfil cromatográfico das substâncias fenólicas (ácidos e flavonóides) e investigar as propriedades antioxidantes de méis brasileiros de *Apis mellifera*.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Determinar o teor de HMF utilizando método espectrofotométrico.
- Avaliar a composição química, com base no perfil cromatográfico das substâncias fenólicas, dos méis monoflorais de eucalipto e assa peixe.
- Determinar o conteúdo de fenóis e de flavonóides totais das diferentes amostras de méis utilizando métodos espectrofotométricos.
- Avaliar o potencial antioxidante dos diferentes méis e dos seus extratos, utilizando o método de captura do radical livre DPPH (2,2,-difênil-1-picrilhidrazil).
- Correlacionar o perfil cromatográfico das substâncias fenólicas dos méis com os teores de fenóis e flavonóides totais, bem como com a atividade antioxidante.

## 4 PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1 Material e Métodos

Todos os solventes com graus de pureza para análise e espectroscópicos foram obtidos comercialmente da Vetec Química Fina Ltda e da Tedia Brasil, e foram utilizados sem purificação prévia. A água utilizada na cromatografia líquida e nas diluições das amostras de méis foi Milli-Q da Millipore. O ácido acético glacial, grau espectroscópico (Tédia Brasil) foi usado como modificador de pH da fase aquosa nas análises por cromatografia líquida de alta eficiência.

As análises utilizando cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) foram realizadas em cromatofolhas de alumínio com gel de sílica 60 F254 (Merck, Darmstadt, Germany). Foram selecionados, após diversas investigações, dois eluentes, um para ácidos fenólicos e para flavonóides agliconas (hexano: acetato de etila: ácido fórmico – 15: 24: 1) e outro para os flavonóides glicosilados (clorofórmio: metanol: água: ácido fórmico – 30: 18: 1: 1). A visualização das substâncias por CCDA foi feita, quando possível, sob luz UV a 254 e 365 nm e/ou pulverizadas com solução 1% de  $AlCl_3$  em etanol como revelador químico para a avaliação dos flavonóides. As misturas dos solventes utilizados nos processos cromatográficos foram feitas em % v/v. Como parâmetros de avaliação foram utilizados a comparação do  $R_f$  (fator de retenção) e da cor desenvolvida na seqüência de reveladores empregados para a detecção do perfil cromatográfico dos extratos e dos padrões.

As frações contendo as substâncias fenólicas foram separadas por cromatografia em coluna usando resina Amberlite XAD-2 (copolímero de estireno e divinilbenzeno, com poro 9 nm e partícula 0,3–1,2 mm), obtida comercialmente da Supelco (Bellefonte, PA, EUA).

Os solventes e as amostras foram previamente filtrados em membranas de nylon de 0,45  $\mu m$  obtidas da Sartorius antes de serem analisadas por CLAE.

A eliminação dos solventes dos extratos e das frações obtidas das colunas cromatográficas foi feita sob pressão reduzida em evaporadores rotatórios FISATON, mantendo a temperatura do banho de água a 40°C.

O teor de HMF, totais de fenóis e de flavonóides dos méis foram realizadas em espectrofotômetro UV/VIS (Nova 2000 UV).

As leituras espectrofotométricas na região UV realizadas, tanto para os padrões quanto para as amostras, na avaliação da atividade antioxidante foram obtidas no aparelho ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay), modelo 680 microplate reader da Bio Rad, utilizando como solvente metanol grau espectroscópico e/ou água de Milli-Q.

### 4.3 Amostras de Méis

As amostras de méis foram compradas diretamente de apicultores ou entrepostos de distribuição de produtos apícolas do comércio local, Tabela 8. Os méis estudados foram oriundos das seguintes regiões: Boa Esperança, no extremo norte do estado do Espírito Santo; Uberaba, no Triângulo Mineiro, e São Lourenço, no sul do estado de Minas Gerais; São Carlos e Campinas no estado de São Paulo. Os méis analisados foram obtidos na forma centrifugada e/ou com favos, sem passar pela centrifugação.

**Tabela 8:** Amostras de méis de favos e centrifugadas estudadas neste trabalho.

Códigos das Amostras	Origem Floral	Data da Coleta	Data da Chegada	Origem Geográfica
NCA <sub>1</sub>	Assa peixe	31/08/2007	09/2008	São Lourenço-MG
NCA <sub>2</sub>	Assa peixe	06/09/2008	09/2008	São Lourenço-MG
NCA <sub>3</sub>	Assa peixe	15/08/2008	09/2008	São Lourenço-MG
NCA <sub>3</sub> /Favos	Assa peixe	15/08/2008	09/2008	São Lourenço-MG
NCE <sub>4</sub>	Eucalipto	03/01/2009	02/2009	Boa Esperança-ES
NCE <sub>5</sub> /Favos	Eucalipto	19/02/2009	02/2009	Boa Esperança-ES
NCE <sub>6</sub> /Favos	Eucalipto	03/01/2009	02/2009	Boa Esperança-ES
RLE <sub>7</sub>	Eucalipto	*	08/2006	Uberaba-MG
RLE <sub>8</sub>	Eucalipto	*	04/2007	São Carlos-SP
RLE <sub>9</sub>	Eucalipto	*	*	Campinas-SP (entrepasto)

\* sem informação; \*\* LIANDA (2009)

Todas as amostras foram guardadas na geladeira à 4<sup>0</sup> C até o momento da análise, a fim de evitar qualquer tipo de alteração.

### 4.3 Determinação de HMF no mel

A determinação de HMF nos méis de eucalipto e assa peixe foi realizada segundo a metodologia descrita na Instrução Normativa recomendado pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento (BRASIL, 2000).

Solubilizou-se 5 g do mel em um béquer com 25 mL de água destilada, em seguida, transferiu-se a mistura para balão volumétrico de 50 mL. Logo após, foi adicionado e misturado 0,5 mL de solução de Carrez I e depois 0,5 mL de solução de Carrez II, completando-se o volume com água. A mistura foi filtrada em papel filtro qualitativo, descartando-se os primeiros 10 mL do filtrado. Em seguida, 5 mL da solução foi transferida para dois tubos de ensaio, onde foram adicionados 5 mL de água em um dos tubos (amostra) e 5 mL de solução de bissulfito de sódio 0,2% no outro (referência). Após a mistura, a absorvância foi determinada a 284 e 336 nm em cubeta de quartzo de 1 cm. Para cada amostra, o mesmo procedimento foi repetido no mínimo três vezes. OBS: Se a absorvância for maior que 0,6 a solução da amostra deverá ser diluída com água e a solução de referência diluída com solução de bissulfito de sódio 0,10%, na mesma proporção.

A determinação do HMF é calculada pela aplicação da equação abaixo:

$$\text{Equação: } \frac{(A_{284} - A_{336}) \times 149,7 \times 5}{P} = \text{HMF mg/Kg} \quad \text{onde:}$$

$A_{284}$  = leitura da absorvância a 284 nm

$A_{336}$  = leitura da absorvância a 336 nm

P = massa da amostra de mel em g

$149,7 = (126/16830) \times (1000/10) \times (1000/5)$

Onde,

126 = peso molecular do HMF

16830 =absortividade molar do HMF a 284 nm

1000 = conversão de g para mg

10 = diluição de 5 g de mel para 50 mL

1000 = conversão de g para kg

5 = massa nominal da amostra

### 4.3.2 Preparo dos Reagentes

No preparo da solução de Carrez I, foram dissolvidos 15 g de ferrocianeto de potássio em água destilada e o volume completado para 100 mL, em balão volumétrico. Já para a solução de Carrez II, foram dissolvidos 30 g de acetato de zinco em água destilada e o volume completado para 100 mL, em balão volumétrico.

A solução de bissulfito de sódio a 0,2% m/v foi preparada dissolvendo-se 0,2 g de bissulfito de sódio em água destilada, e o volume diluído para 100 mL, em balão volumétrico.

### 4.4 Padrões Utilizados

Os padrões utilizados nas análises cromatográficas foram sempre com grau de pureza elevado (~99%). Os ácidos cinâmico, cafeico, protocatecuico, *orto*-cumárico, *para*-cumárico, siríngico e *meta*-cumárico foram obtidos comercialmente da Sigma Chemical Co. (Saint Louis, MO, EUA) e os ácidos gálico, ferúlico, *para*-metoxibenzóico, *para*-hidroxibenzóico, 2,4-diidroxibenzóico e vanílico da Merck (Darmstadt, Alemanha). Os flavonóides quercetina, morina, isoquercetina, rutina, luteonina, crisina canferol, narigenina e apigenina foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). A tricetina foi doada gentilmente, pelo Prof<sup>o</sup> Dr. Mário Geraldo de Carvalho (DEQUIM-UFRRJ). As soluções dos padrões foram preparadas individualmente ou misturadas. Essas soluções foram feitas a 1% em metanol (grau espectroscópico) e utilizadas como solução estoque padrão. Todas as soluções foram filtradas previamente antes da análise por CLAE, através de membrana de nylon de 0,45 µm.

Os padrões utilizados nas análises espectrofotométricas para o preparo das curvas analíticas de fenóis totais foram os mesmos utilizados nas análises cromatográficas: ácido gálico, protocatecuico, ferúlico, vanílico, *para*-hidroxibenzóico, *para*-cumárico, *orto*-cumárico, cafeico, siríngico e *meta*-cumárico, com exceção do ácido cinâmico. Para as análises dos flavonóides foram usados quercetina, morina, rutina, canferol e narigenina.

Para avaliação da atividade antioxidante foi utilizado o DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) obtido da Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Alemanha) também solubilizado em metanol grau espectroscópico.

#### 4.5 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD)

Paralelamente ao estudo por CCDA procedeu-se as análises dos padrões e dos extratos dos méis em um cromatógrafo líquido equipado com detector de arranjo de díodos (DAD), e sistema controlado por computador, utilizando o programa LCSolution da Shimadzu. As análises foram feitas em coluna analítica de fase reversa C-18 (Shim-pak octadesil-C18, 250 x 4,6 mm, 5 µm de partícula, da Shimadzu), sendo a temperatura da coluna de 35 °C e usando como fase móvel água: ácido acético (99:1, solvente A) e metanol: acetonitrila (90:10, solvente B). A separação foi feita com fluxo constante de 1,0 mL.min<sup>-1</sup> e gradiente de eluição: 35 a 65% de B em 25 min.; 65 a 85% B em 15 min; 85 a 100% B em 5 min, retornando a 35% de B após 10 minutos. As amostras foram solubilizadas em metanol e 10 µL forma injetados através de injetor Rheodyne 7125i com *loop* de 20 µL.

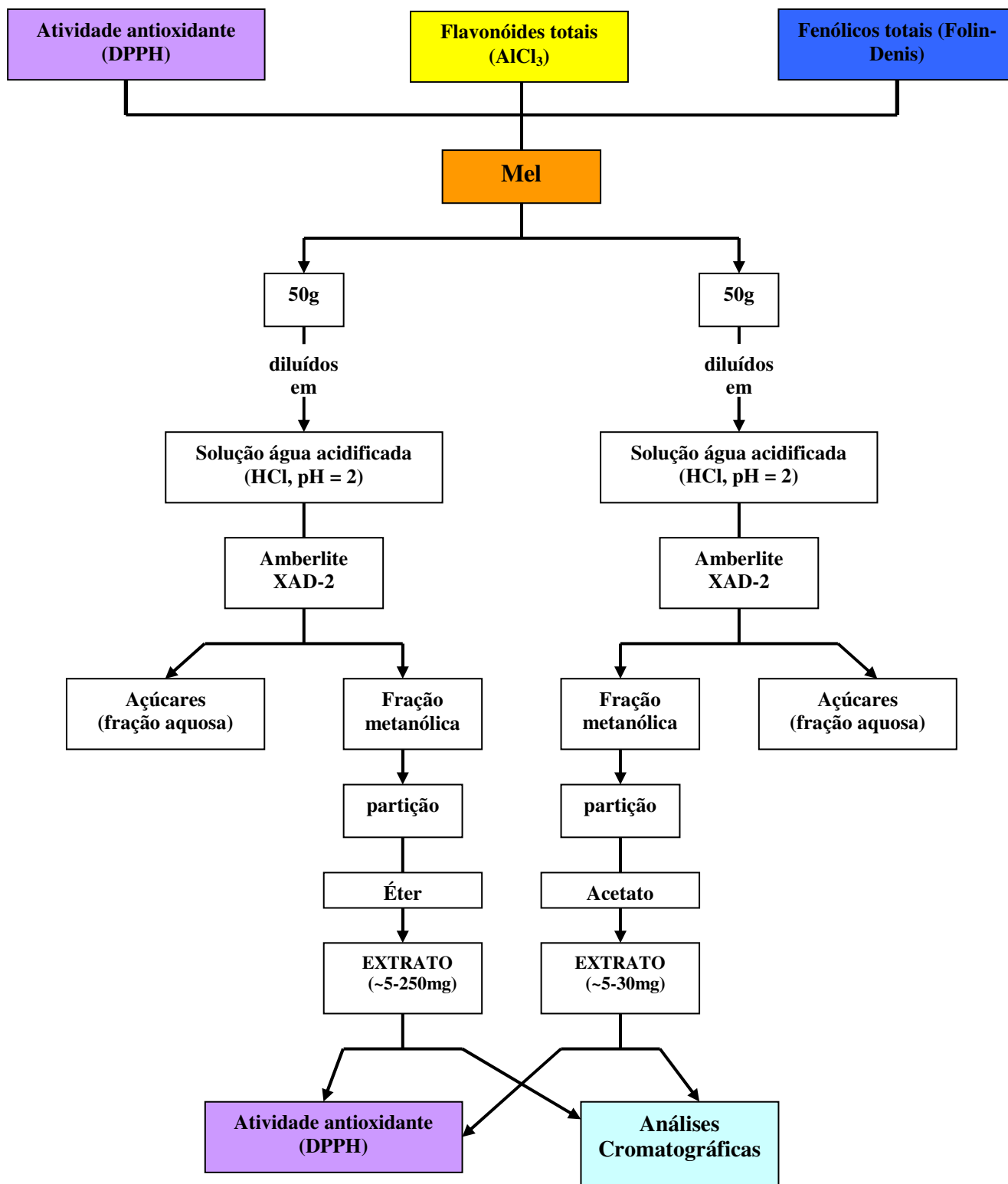
O monitoramento dos cromatogramas foi realizado a 270 e 340 nm, visto que a maioria dos ácidos fenólicos e flavonóides encontrados nos méis mostram suas absorções máximas no ultravioleta, próximos a esses comprimentos de onda (MARTOS *et al*, 1997).

#### 4.6 Preparo dos Extratos de Mel

As substâncias fenólicas foram extraídas do mel segundo metodologia descrita previamente na literatura (FERRERES *et al*, 1994; MARTOS *et al*, 2000; TOMÁS-BARBERÁN, *et al*, 2001) com algumas modificações (LIANDA, 2004). Para o preparo dos extratos do mel foram pesados cerca de 50 gramas, os quais foram misturados com 250 mL de água destilada, ajustada a pH = 2 com ácido clorídrico concentrado e agitada com agitador magnético, a temperatura ambiente, até completa dissolução. Em seguida, a amostra fluida foi filtrada através de algodão para eliminar possíveis partículas sólidas. O filtrado foi então misturado com cerca de 75 gramas de resina Amberlite XAD-2 (poro 9 nm e partícula 0,3-1,2 mm), agitado por 10 minutos e, empacotado em uma coluna de vidro (45 x 3,5 cm). O material contido na coluna foi lavado primeiramente com 100 mL de água acidificada (pH = 2 com HCl concentrado), e depois com 150 mL de água destilada para remover todos os açúcares e outros constituintes polares do mel, enquanto as substâncias fenólicas permaneceram na coluna. A fração fenólica adsorvida na coluna foi então eluída com



350 mL de metanol, concentrada sob pressão reduzida em evaporador rotatório a 40° C. O extrato metanólico foi pesado e armazenado a 4 °C até ser utilizado no processo de extração líquido-líquido com acetato de etila e éter (Figura 13).



**Figura 13:** Modelo esquemático de preparo e análises das amostras de méis.

Para o procedimento de extração líquido-líquido foram adicionados 10 mL de água destilada ao extrato metanólico, em seguida fez-se a partição com dois solventes diferentes: éter (TOMÁS-BARBERÁN *et al*, 2001) e acetato de etila (DA SILVA, 2004; LIANDA, 2009; MONTAGNI, 2005). O extrato metanólico redissolvido em 10 mL de água destilada foi transferido para funil de separação e extraído com éter e acetato de etila (5 x 10 mL). As fases orgânicas foram reunidas, secas com sulfato de sódio anidro, concentradas até *secura* em rotavapor a 40°C e pesadas para obter os extratos etéreos e o de acetato de etila. Em seguida, o extrato foi redissolvido em 5 mL de metanol grau espectroscópico, filtrado em membrana de 0,45 µm e analisado por CLAE. Além do preparo do extrato fenólico, na Figura 13, estão representadas também, as seqüências que foram usadas para os demais ensaios (fenóis e flavonóides totais e atividade antioxidante) realizados nesse trabalho.

#### **4.7 Determinação do Teor de Fenóis Totais no Mel**

A determinação do teor de fenóis totais para os méis de eucalipto e assa peixe, foi feita pelo método espectrométrico descrito previamente na literatura (MEDA *et al*, 2005), utilizando o reagente de Folin-Denis (FOLIN & DENIS, 1912; SILVA, *et al*, 2006).

Solubilizou-se 100 mg do mel em 1 mL de água Milli-Q. A uma alíquota de 0,5 mL (utilizando micropipetas de 1000µL) dessa solução adicionou-se 2,5 mL do reagente de Folin-Denis, e após 5 minutos adicionou-se 2,0 mL de uma solução 14% de carbonato de sódio, recém-preparadas. A mistura reacional foi mantida incubada por 2h e observou-se a mudança da coloração da solução de esverdeada para azul. Em seguida, fez-se a leitura de sua absorvância a 760 nm, utilizando-se cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico e água Milli-Q como branco (MEDA *et al*, 2005; AHN *et al*, 2007; KÜÇÜK *et al*, 2007; PÉREZ *et al*, 2007).

A concentração dos fenóis totais dos méis foi determinada utilizando uma curva analítica estabelecida com soluções de concentração conhecida para diferentes ácidos fenólicos padrões. Os resultados foram expressos, pela média de três determinações, em mg de equivalentes de cada um dos ácidos padrões utilizados por 100g de mel.

#### 4.7.1 Preparo do Reagente de Folin-Denis

Em um balão de fundo redondo de 50 mL, acoplado a um condensador de refluxo, foram solubilizados 5 g de tungstato de sódio diidratado (Sigma-Aldrich), 1 g de ácido fosfomolibdico (Sigma-Aldrich) e 2,5 mL de ácido fosfórico (Sigma-Aldrich) com 38 mL de água Milli-Q. Após duas horas de refluxo, a mistura reacional foi resfriada, transferida para balão volumétrico de 50 mL e seu volume completado com água. A solução apresentou coloração esverdeada, foi mantida no escuro e sob refrigeração até o momento do uso (Official Methods of Analysis of the, AOAC, 1950).

#### 4.7.2 Preparo da Curva Analítica com os Ácidos Fenólicos Padrões

Foi preparada uma curva analítica a partir da solução aquosa padrão de cada um dos ácidos: gálico, siríngico, protocatecuico, ferúlico, vanílico, *para*-hidroxibenzóico, *para*-cumárico, *orto*-cumárico, *meta*-cumárico e cafeico (1 mg/mL  $\equiv$  0,0059 mM). Alíquotas de 2 a 100  $\mu$ L desta última solução, conforme o anexo (pg. 97), foram misturados com 2,5 mL do reagente de Folin-Denis, e após 5 minutos adicionou-se 2,0 mL de solução 14% de carbonato de sódio, recém-preparada. As leituras foram feitas a 760 nm, utilizando-se água Milli-Q como branco. A curva analítica foi construída a partir do programa Origin 6.0 (UFRRJ), onde foi efetuada a regressão linear e obtida a equação da reta [ $y = a + b.x$ ], relacionando concentração de cada ácido *versus* absorvância de cada leitura. Através dessa equação determinou-se indiretamente o teor de fenóis totais nas amostras (concentração,  $x$ ), substituindo  $y$  pela média das absorvâncias de cada amostra de mel.

#### 4.8 Determinação do Teor de Flavonóides Totais nos Méis

O teor de flavonóides totais foi determinado segundo metodologia descrita na literatura (MEDA *et al*, 2005; AHN *et al*, 2007) utilizando como reagente o cloreto de alumínio. A 3,0 ml da solução de mel em metanol (grau espectroscópico) ou em metanol/água (conforme a concentração que variou de 200-800 mg/mL), adicionou-se 3,0 mL de solução 2 % de cloreto de alumínio hidratado (Vetec) em metanol. Após 30 minutos em repouso, foi realizada a leitura espectrofotométrica em 415 nm, utilizando 3 mL de metanol como branco.

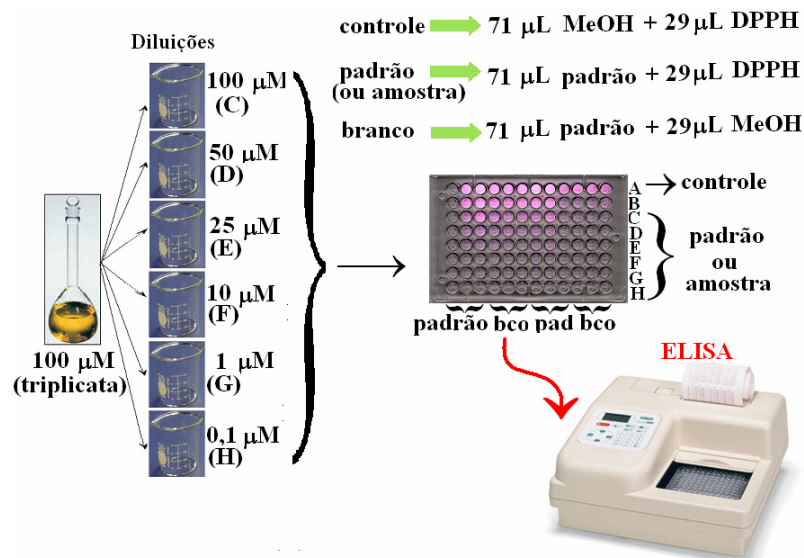
#### **4.8.1 Preparo da Curva Analítica com Quercetina**

Para a construção da curva analítica foi preparada uma solução padrão com cada um dos flavonóides: quercetina, apigenina, morina, isoquercetina, rutina, canferol, luteonina, narigenina, crisina e miricetina em metanol (1,78 mg/mL  $\equiv$  0,0059 mM). Em seguida, alíquotas de 2 a 120  $\mu$ L desta solução original, conforme anexo (pg. 93), foram misturadas com 3,0 mL de solução de cloreto de alumínio 2% em metanol. Após 30 minutos em repouso, foi realizada a leitura espectrofotométrica em 415 nm, utilizando 3 mL de metanol como branco. A curva analítica foi feita a partir do programa Origin 6.0 (UFRRJ), efetuando-se a regressão linear sendo obtida a equação da reta [ $y = a + b.x$ ], relacionando concentração de cada flavonóide contra absorvância de cada leitura. Através dessa equação determinou-se indiretamente o teor de flavonóides totais nas amostras, onde se substituiu y pela média da absorvância de cada amostra de mel para se calcular x (concentração).

#### **4.9 Determinação da Atividade Antioxidante na reação com DPPH**

##### **4.9.1 Atividade Antioxidante dos Méis e dos Extratos**

O potencial de atividade antioxidante dos méis e dos seus extratos (acetato e éter) foi determinada por meio da capacidade seqüestrante da solução do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) (MENSOR *et al*, 2001). Na presença de um antioxidante, a coloração púrpura da solução de DPPH decai, e a mudança de absorvância pode ser lida espectrofotometricamente (PÉREZ *et al*, 2007). Para a determinação da atividade antioxidante dos méis e dos seus extratos foi utilizado solução metanólica 0,3 mM de DPPH. Para a determinação da atividade antioxidante das amostras, as soluções dos extratos (em metanol) foram preparadas na concentração de 0,1 mg/mL (100 mg/mL) e a dos méis (solubilizados em metanol : água – 50:50) na concentração de 100 mg/mL. A partir da concentração inicial dessas soluções foram feitas diluições (50, 25, 10, 1 e 0,1  $\mu$ g/mL do extrato ou mg/mL do mel) para se determinar a faixa de melhor atividade antioxidante. Os ensaios foram realizados em microplacas com 96 poços cada, onde foram adicionados 71  $\mu$ L da amostra ou do padrão e 29  $\mu$ L da solução de DPPH, que correspondeu aos seis pontos nas concentrações de 71; 35,5; 17,75; 7,1; 0,71 e 0,071  $\mu$ g/mL de amostra ou mM de padrão ou mg/mL de mel, como mostra a figura 14.



**Figura 14:** Esquema do ensaio de atividade antioxidante utilizando o espectrofotômetro ELISA.

Após 30 minutos de incubação no escuro, foram realizadas as leituras em espectrofotômetro ELISA a 520 nm. O branco específico para cada amostra foi determinado utilizando-se 29 µL de metanol e 71 µL da amostra (em cada concentração). Para o controle positivo foi utilizado 29 µL de DPPH e 71 µL de metanol. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

A atividade antiradicalar (%AA) foi calculada como a porcentagem de descoloração do radical DPPH, segundo a equação abaixo, adaptada de MENSOR *et al* (2001):

$$\%AA = 100 - [(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100] / Abs_{controle} \quad \text{onde,}$$

(Abs = absorvância lida a 517 nm após 30 minutos de reação)

$Abs_{amostra}$  = absorvância da solução de DPPH + amostra a ser analisada (mel ou extrato).

$Abs_{controle}$  = absorvância da solução de DPPH + metanol (solução controle positivo).

$Abs_{branco}$  = absorvância da solução amostra (mel ou extrato) + metanol.

A atividade seqüestrante do radical livre DPPH também foi expressa em termos de  $CE_{50}$  (concentração mínima necessária para o antioxidante reduzir em 50% da concentração inicial do DPPH), através da média obtida nos gráficos que relacionam o percentual de atividade contra a concentração da substância ensaiada. Desta forma, quanto menor o seu valor, maior é a capacidade antioxidante das amostras.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Desde a antigüidade, os produtos apícolas se encontram entre os elementos naturais empregados pelo homem como complemento alimentar e, ao longo do tempo, para combater e prevenir as doenças. Os principais produtos apícolas considerados pela legislação brasileira como alimento são: mel, geléia real, própolis e pólen apícola. Existem ainda os méis compostos e os méis de abelhas sem ferrão que ainda não foram contempladas pela legislação brasileira.

O mel de abelhas é um produto muito apreciado, no entanto, devido ao seu alto valor comercial está sujeito as adulterações. As análises de rotina, prescritas pela legislação brasileira são fundamentais para o controle de qualidade deste produto. Neste trabalho adotou-se apenas a determinação do conteúdo de hidroximetilfurfural (HMF) para cada um dos méis, dentre as inúmeras análises físico-químicas possíveis de serem realizadas, com o objetivo de se avaliar a qualidade dos méis de assa peixe e eucalipto, e posteriormente comparou-se com os índices estipulados pela legislação brasileira e internacional.

A caracterização de substâncias fenólicas em méis, por cromatografia líquida de alta eficiência, tem se mostrado como uma atividade de pesquisa muito promissora. Especialmente pelo fato dessas substâncias (fenólicos e flavonóides) apresentarem comprovada atividade antioxidante (FERREIRA *et al*, 2009; MĂRGHITAS *et al*, 2009; PICHICHERO *et al*, 2009; SOCHA *et al*, 2009), antitumoral (FUKUDA *et al*, 2009; KANADASWAMI *et al*, 2009; MARANO & TAKAHASHI, 2009; TSIAPARA *et al*, 2009), antibacteriana (MOLAN, 1992; CHACON *et al*, 2009; PETER, 2009), dentre outras propriedades.

Neste contexto, o perfil cromatográfico de polifenóis em méis brasileiros de *Apis mellifera* tem sido estudado por nosso grupo de pesquisa há mais de cinco anos.

O presente trabalho buscou determinar a quantidade de fenólicos e de flavonóides totais em méis monoflorais de *Apis mellifera* (eucalipto e assa peixe).

Os processos clássicos de cromatografia em coluna (CC) e cromatografia de camada delgada analítica (CCDA) foram empregados previamente, para separar, purificar e pré-determinar as substâncias fenólicas presentes nos méis e, que tiveram sua presença confirmada paralelamente pela cromatografia líquida de alta eficiência, acoplada ao detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD).

A atividade antioxidante dos méis, *in natura*, bem como dos seus respectivos extratos, em acetato de etila e em éter, foi avaliada neste trabalho, e possibilitou corroborar a propriedade terapêutica do mel e de seus extratos.

### **5.1 Teor de 5-hidroximetilfurfural nos Méis**

Todos os produtos alimentícios devem se adequar a Rotulagem Nutricional Obrigatória conforme a "Resolução RDC n. 39 de 21 de março de 2001" (BRASIL, 2001b), portanto, é de extrema importância a determinação da composição físico-química e seu valor nutricional.

As características físico-químicas do mel são utilizadas no sentido de fornecer informações que possam contribuir para o conhecimento do produto, dentre elas: os açúcares, umidade, atividade diastásica, hidroximetilfurfural, proteína, cinzas, pH, acidez, índice de formol, condutividade elétrica, viscosidade e cor. Dentre essas análises, adotou-se utilizar apenas o teor de HMF como um dos parâmetros físico-químicos de qualidade.

O hidroximetilfurfural é uma substância formada pela reação de desidratação de hexoses em condições ácidas, fenômeno este que ocorre em uma velocidade que varia de acordo com a temperatura a que o mel é submetido ou estocado. O seu conteúdo pode aumentar com a elevação da temperatura, armazenamento, adição de açúcar invertido, podendo também ser afetado pela acidez, pH, água e minerais no mel (SALINAS *et al*, 1991). É um indicador de qualidade no mel, visto que, quando elevado representa uma queda no seu valor nutritivo, pela destruição, por meio de aquecimento de algumas vitaminas e enzimas que são termolábeis (VERÍSSIMO, 1988). O HMF é utilizado como indicador de qualidade, uma vez que tem origem na degradação de enzimas presentes nos méis e apenas uma pequena quantidade de enzima é encontrada em méis maduros. Teoricamente, méis com maior taxa de frutose darão origem a maiores taxas de HMF, ao longo de processos de armazenagem. Pequenas quantidades de HMF são encontradas em méis recém-colhidos, mas valores mais significativos podem indicar alterações importantes provocadas por armazenamento prolongado em temperatura ambiente alta e/ou superaquecimento (VILHENA & ALMEIDA-MURADIAN, 1999a) ou adulterações provocadas por adição de açúcar invertido. Embora alguns autores reportem aumentos no teor de HMF com o tempo de estocagem (DURAN *et al*, 1996) tais acréscimos seriam em pequena proporção, como observado

por Faria (1993) que relatou aumento de HMF em méis armazenados durante 450 dias, com valor máximo de  $3,5 \text{ mg kg}^{-1}$ .

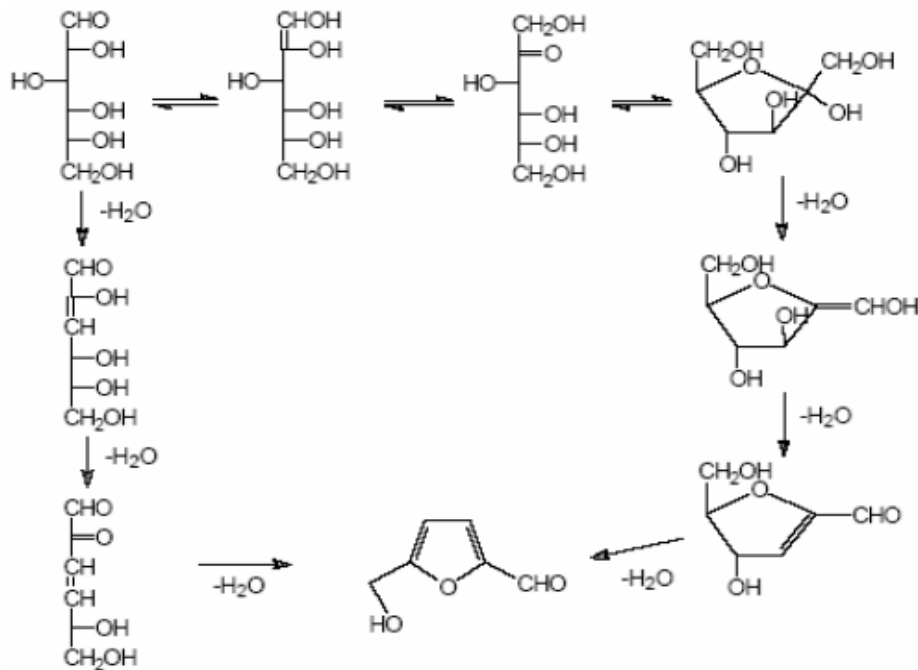
A quantidade de 5-hidroximetilfurfural é um parâmetro físico-químico de grande importância na determinação da qualidade do mel, pois ele pode sugerir se o produto foi processado adequadamente ou mesmo adulterado, até chegar ao consumidor final (SALINAS *et al*, 1991; VERÍSSIMO, 1988; WHITE, 1978). Além disso, estudos recentes têm mostrado uma correlação significativa entre a quantidade de HMF e a atividade citotóxica, genotóxica e mutagênica (SURH *et al*, 1994).

Os trabalhos de análises físico-químicas de méis visam comparar os resultados obtidos com padrões ditados por órgãos oficiais internacionais, ou com os estabelecidos pelo próprio país, deixando claro não só uma preocupação com a qualidade do mel produzido internamente, como também torna possível a fiscalização de méis importados. Segundo as normas brasileiras, o Brasil por ser um país de clima tropical apresenta o teor de HMF como valor máximo de  $60 \text{ mg.kg}^{-1}$  de mel (BRASIL, 2000), enquanto pelo Codex Alimentarius e pela norma da União Européia é de  $40 \text{ mg.kg}^{-1}$ .

O mel, sendo um produto biológico bastante complexo, pode apresentar variações em sua composição a depender da flora de origem, além das condições climáticas e edáficas da região onde foi produzido. No entanto, devido à grande extensão territorial brasileira, são encontrados diferentes ecossistemas, cada um com sua particularidade de clima, solo e composição vegetal. Esta variação, além de tornar possível a produção de mel durante praticamente todo o ano, faz com que exista uma grande variação em relação às características dos méis produzidos nestes diferentes locais do País, seja em relação à sua composição físico-química, às suas características organolépticas (aroma, sabor e a cor) ou em relação a sua composição em substâncias fenólicas.

Tem sido descrito na literatura, que o aquecimento de alimentos que contêm açúcares redutores e aminoácidos durante o cozimento ou esterilização desencadeia uma seqüência de reações não-enzimáticas conhecidas como reação de Maillard, Figura 15, e o HMF (figura 1, pg. 5) é um dos principais produtos intermediários dessa reação química (SURH *et al*, 1994).



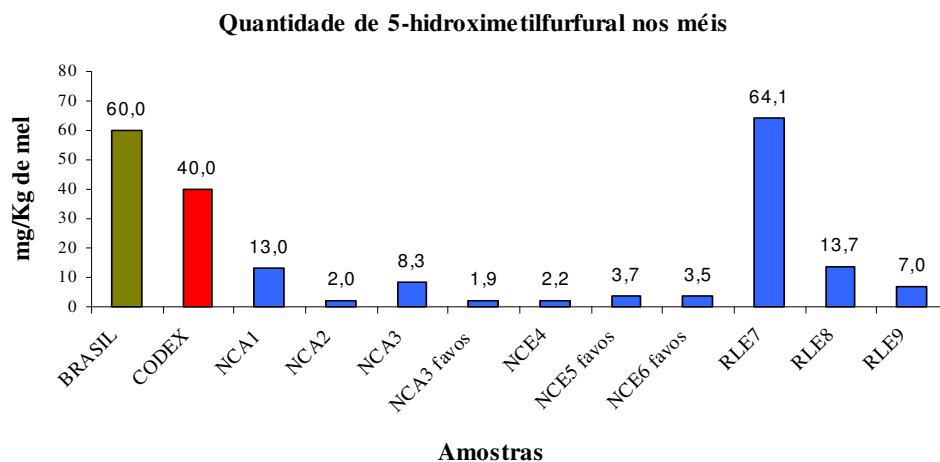


**Figura 15.** Formação de HMF a partir da reação de desidratação de açúcares redutores (LEWKOWSKI, 2001).

Os índices de hidroximetilfurfural dos méis analisados (Figura 16) se enquadraram nos padrões exigidos pela legislação brasileira vigente, que estabelece um valor máximo de  $60 \text{ mg. kg}^{-1}$  (BRASIL, 2000). DAYRELL & VITAL (1991) afirmam que, em países de clima tropical, as amostras de méis costumam apresentar elevado teor de HMF em função do clima quente, sendo a quantificação deste parâmetro fundamental para a verificação da qualidade do produto. Analisando amostras de méis brasileiros, esses autores encontraram valores variando de 1,1 a  $248,2 \text{ mg. kg}^{-1}$ .

Na figura 16 estão apresentados os valores médios de HMF referentes às análises em triplicata, determinadas para as dez amostras de méis estudadas neste trabalho, em comparação aos valores estipulados pela legislação brasileira e européia.

O intervalo de variação de HMF apresentado nas diferentes floradas analisadas foi de 1,9 a  $64,1 \text{ mg.kg}^{-1}$ , sendo que apenas um mel estudado, o de eucalipto RLE<sub>7</sub>, apresentou o valor de  $64,1 \text{ mg.kg}^{-1}$  de mel, ficando acima dos valores estipulados pela legislação brasileira e internacional.



**Figura 16.** Valores médios de 5-hidroxiacetilfurfural (HMF) encontrados nos méis de *Apis mellifera*.

A chegada das amostras ao laboratório variou de 08/2006 a 02/2009, como mostra a Tabela 8, pg. 38. Considerando que entre as amostras de méis de eucalipto, a amostra RLE<sub>7</sub> é a mais antiga entre todas analisadas, esse fato pode contribuir com o mais alto teor de HMF determinado. As amostras mais recentes (NCE<sub>4</sub>, NCE<sub>5</sub> e NCE<sub>6</sub> favos), com chegada em 02/2009 apresentaram os menores valores de HMF, variando entre 2,2 e 3,7 mg.kg<sup>-1</sup> de mel.

Entre os méis de assa peixe (NCA<sub>1</sub>, NCA<sub>2</sub>, NCA<sub>3</sub> e NCA<sub>3</sub> favos), a amostra NCA<sub>1</sub>, a mais antiga a ser coletada (08/2007) também apresentou o mais alto valor de HMF, com 13,0 mg.kg<sup>-1</sup> de mel.

Se os valores de HMF nos méis estiverem acima do permitido pela legislação que regula a qualidade desse alimento, isto pode indicar que ele foi aquecido inadequadamente, sofreu alguma adulteração ou que já teve o seu tempo de envasamento e/ou de prateleira com validade vencida, podendo assim ser desqualificados.

Os valores obtidos de análises, quando confrontados com os pré-estabelecidos (índices de qualidade) por órgãos oficiais internacionais ou pelo próprio país, servem para manutenção da qualidade e fiscalização do mel produzido no País ou mesmo importado. No entanto, devido às diferentes condições climáticas, edáficas e florísticas das regiões onde este mel é produzido, tem sido verificada uma grande variação em suas

características físico-químicas. Assim, têm-se a necessidade de uma reavaliação da legislação vigente, adaptando-a à realidade do país.

Das dez amostras analisadas nesse trabalho apenas uma (eucalipto RLE<sub>7</sub>) estaria reprovada no que diz respeito ao parâmetro de determinação de HMF no que diz respeito ao consumo humano. Entretanto, esta amostra foi mantida no estudo e analisada quanto aos teores das substâncias fenólicas e atividade antioxidante.

## 5.2 Teor em Fenóis Totais nos Méis

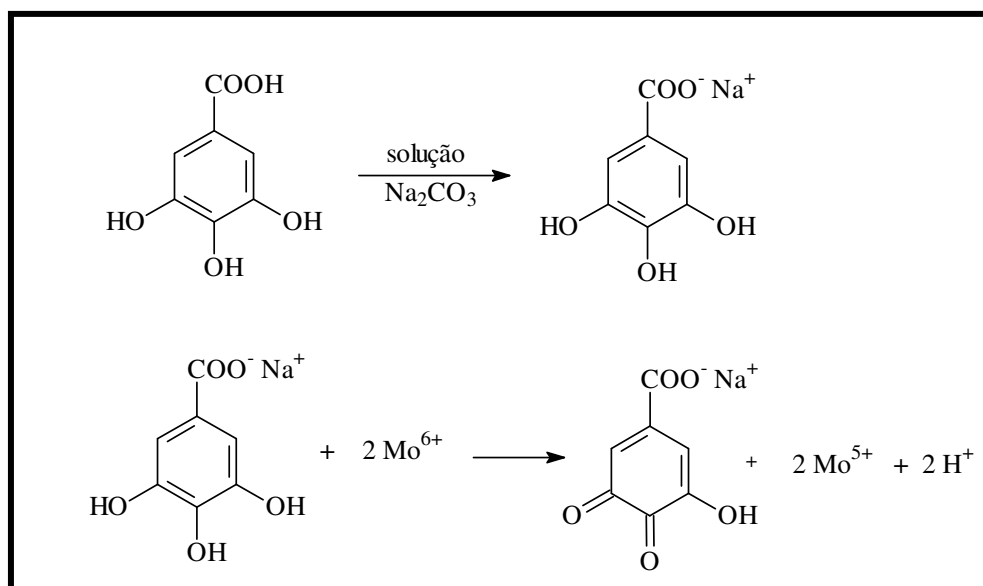
Para a determinação indireta do teor em fenóis totais nos méis de assa peixe e eucalipto foi utilizando o método de Folin-Denis, e o conteúdo foi expresso em concentração de ácido gálico (mg/ 100g de mel, metodologia descrita na pg. 43). Entre os ácidos fenólicos mais utilizados como substância padrão para a determinação dessas substâncias fenólicas nos méis, descritos na literatura, está o ácido gálico (MEDA *et al*, 2005; SOCHA *et al*, 2009; FERREIRA *et al*, 2009; PICHICHERO *et al*, 2009; Al *et al*, 2009).

A análise de polifenóis, com base em reações de oxiredução, surgiu com os trabalhos preliminares de Otto Folin e Macallum, em suas determinações qualitativas de ácido úrico pelo reagente fosfotúngstico. O ensaio era colorimétrico, produzindo uma cor azul, quando o ácido úrico entrava em contato com o reagente (FOLIN e DENIS, 1912).

A partir daí, o reagente original passou a ser utilizado com derivados de fenol. E com uma série de combinações sistemáticas do ácido fosfórico com tungstato de sódio, molibdato de sódio e/ou com várias misturas dos dois, seguido de análise espectrofotométrica dos valores de cada cromóforo oriundo da reação tanto do ácido úrico quanto dos derivados de fenol, foram obtidos dois reagentes distintos. O primeiro (ácido fosfotúngstico) era altamente sensível para o ácido úrico, mas não reagia bem com derivados de fenol, e o segundo (um composto fosfotúngstico-fosfomolibdico), de preparação muito mais delicada do que qualquer outro reagente colorimétrico (FOLIN e DENIS, 1912).

A preparação do reagente de fenol de Folin-Denis está descrita na parte experimental (pg. 44). A presença dos metais de transição molibdênio e tungstênio, em diferentes quantidades, garantem a reação de oxiredução em presença de polifenóis e

carbonato de sódio, uma base fraca que faz a desprotonação do hidrogênio ácido da substância fenólica deixando-a na forma de ânion fenolato, como mostra a Figura 17.



**Figura 17:** Reação de oxidação do ácido gálico (sal fenolato de sódio) pelo molibdênio.

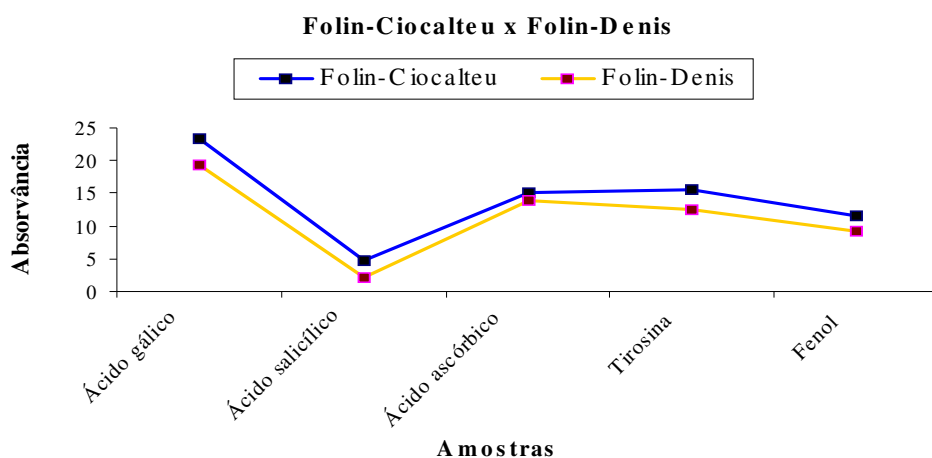
Com isso, ocorre à redução dos metais contidos no reagente, e conseqüente formação de complexos de coloração azul que podem ser quantificados por espectrofotometria (FOLIN e DENIS, 1912; SCALBERT, 1992).

Nos dias de hoje, a determinação de compostos fenólicos em alimentos pode ser realizada por reagentes diferentes baseados no mesmo princípio da oxiredução, entre eles está o reagente de Folin-Ciocalteu. A reação entre os polifenóis e este reagente origina um complexo de cor azul que ao absorver radiação a 765 nm permite a quantificação dessas substâncias (MEDA *et al*, 2005).

Existem algumas diferenças no preparo de ambos os reagentes Folin-Denis e Ciocalteu, que é na verdade uma variação do primeiro. O reagente de Folin-Denis leva duas horas em refluxo contra dez horas do Folin-Ciocalteu. Além disso, uma outra importante diferença entre os dois está na composição química dessas soluções. Além dos elementos presentes no reagente original, o Folin-Ciocalteu leva o sulfato de lítio (LiSO<sub>4</sub>), um sal que atua evitando a formação de precipitado durante a reação. Ainda assim, ambos os reagentes apresentam diversas limitações, especialmente em termos de reação química, pela afinidade das substâncias da solução que serão reduzidas pelos polifenóis. Podendo também, interagir com outros constituintes presentes na amostra analisada, resultando em mudança de coloração e absorção no comprimento de onda

específico, o que pode favorecer a superestimação das quantidades substâncias fenólicas esperadas (SINGLETON e ROSSI, 1965; APPEL *et al*, 2001).

A Figura 18 mostra que a absorção azul do reagente Folin-Ciocalteu mostra-se mais intensa, em termos de absorvidade molar ( $725\mu$ ), do que em amostras preparadas nas mesmas condições com o uso do reagente de fenol de Folin-Denis, como mostra a Figura 18, adaptado de (SINGLETON e ROSSI, 1965). Neste mesmo trabalho, que comparou estes dois reagentes, a absorvância para a análise de vinho em comparação com o ácido gálico nas mesmas condições, também foi superior para o Folin-Ciocalteu.



**Figura 18:** Rendimento da absorvância em relação ao ácido gálico e outras substâncias redutoras, adaptado de (SINGLETON e ROSSI, 1965).

Contudo, não se pode dizer qual dos dois reagentes é mais eficiente, pois uma maior absorvidade molar em reações com diferentes amostras não indica maior ou menor seletividade dos reagentes, pois eles podem ter sido reduzidos por outros constituintes do extrato, e a intensidade da reação, depende também da estrutura dos fenóis, ocasionando maiores ou menores absorvância na análise (APPEL *et al*, 2001).

Em se tratando da determinação do teor de fenóis totais em amostras de méis, não foi encontrado na literatura, nenhum trabalho que compare a utilização desses dois métodos de análise espectrofotométrica, o de Folin-Denis e o de Folin-Ciocalteu. No entanto, o nosso grupo de pesquisa vem utilizando o método de Follin-Denis, que tem se mostrado sensível o bastante para estimar o conteúdo de fenóis totais em méis brasileiros.

Ao aplicar este método, o teor em polifenóis é frequentemente expresso em termos de concentração em ácido gálico, onde é necessário construir uma curva analítica com soluções padrão desta substância.

Para a determinação indireta do teor de fenóis totais em cada amostra de mel, utilizou-se a curva analítica traçada com as concentrações de 0 – 0,025 mg.mL<sup>-1</sup> do ácido gálico, e assim determinou-se a sua equação da reta.

Os dados utilizados para construção da curva analítica do ácido gálico, bem como para a preparação das curvas dos outros ácidos (cafeico, *meta*-cumárico, *orto*-cumárico, *para*-cumárico, *para*-hidroxibenzóico, vanílico, ferúlico, protocatecuico e siríngico), que foram estudados individualmente no mel, estão mostrados mais detalhadamente no anexo (pg. 97).

Inicialmente, serão apresentados os resultados obtidos para os teores em fenóis totais, e depois os teores em ácidos fenólicos individuais determinados em cada mel.

Na Tabela 9 estão apresentados os valores das absorvâncias obtidas nos ensaios realizados com o reagente de Folin-Denis, feitos em triplicatas, para os dez méis estudados nesse trabalho, bem como a média e o desvio padrão obtidos.

**Tabela 9.** Valores das absorvâncias (em triplicata) dos méis de assa peixe e eucalipto para os ensaios realizados com o reagente de Folin-Denis.

Amostras de mel	Absorvância (UV-760nm)			Média Abs. ± D.P*
	1º	2º	3º	
NCA <sub>1</sub>	0,273	0,275	0,285	0,278±0,006
NCA <sub>2</sub>	0,435	0,436	0,423	0,431±0,007
NCA <sub>3</sub>	0,454	0,427	0,456	0,446±0,016
NCA <sub>3</sub> (Favos)	0,579	0,600	0,607	0,595±0,015
NCE <sub>4</sub>	1,011	0,996	1,015	1,007±0,010
NCE <sub>5</sub> (Favos)	1,010	1,146	1,069	1,075±0,068
NCE <sub>6</sub> (Favos)	0,708	0,716	0,767	0,730±0,032
RLE <sub>7</sub>	0,884	0,894	0,943	0,907±0,032
RLE <sub>8</sub>	1,102	1,128	1,164	1,131±0,031
RLE <sub>9</sub>	1,553	1,541	1,548	1,547±0,006

\* DP = desvio padrão

Na Tabela 10 estão apresentados os resultados obtidos a partir da curva analítica, obtida para o ácido gálico e demais ácidos padrões (em anexo pg. 97). A partir da equação da reta obtida para o ácido gálico, foi calculado o teor de fenóis totais (valor de X na equação da reta), substituindo-se o valor das absorvâncias de cada ensaio das amostras de mel (Tabela 9), pelo valor de Y da equação da reta. E a partir das

equações das retas dos demais ácidos padrões foram possíveis determinar, indiretamente, os níveis individuais de cada ácido presente no mel.

**Tabela 10.** Resultados obtidos a partir da curva analítica preparada com diferentes ácidos fenólicos padrões.

Ácidos	Valor ± Erro	Valor ± Erro	R	D.P.*	Equação
	A	B			
gálico	0,0828±0,01521	81,75914±1,34147	0,99892	0,032	Y=0,0828+81,75914X
cafeico	0,1505±0,018	142,82412±2,203	0,99893	0,039	Y=0,1505+142,82412X
<i>m</i> -cumárico	0,23645±0,015	74,16945±1,181	0,99886	0,026	Y=0,23645+74,16945X
<i>o</i> -cumárico	0,23424±0,01014	58,96444±0,811	0,99915	0,018	Y=0,23424+58,96444X
<i>p</i> -cumárico	0,21796±0,01188	70,23431±0,94999	0,99918	0,021	Y=0,21796+70,23431X
<i>p</i> -OH-benzóico	0,25886±0,0253	72,71737±3,38156	0,99357	0,038	Y=0,25886+72,71737X
vanílico	0,14352±0,01791	90,76225±1,39831	0,99893	0,031	Y=0,14352+90,76225X
ferúlico	0,19134±0,00983	72,79119±0,70778	0,99957	0,017	Y=0,19134+72,79119X
protocatecuico	0,15406±0,0207	118,69606±2,18239	0,99882	0,033	Y=0,15406+118,69606X
siríngico	0,15252±0,00739	52,69362±0,48952	0,99961	0,013	Y=0,15252+52,69362X

\* DP = desvio padrão; P <0,0001

Para o cálculo dos teores em fenóis totais de cada amostra, suas absorvâncias foram substituídas na equação fornecida pela reta, cujos valores foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico/100 g de mel, conforme demonstrado abaixo, utilizando a amostra assa peixe NCA<sub>1</sub>, como exemplo:

Amostra	Absorvância (UV-760nm)			Equação reta para ácido gálico
	1°	2°	3°	
NCA <sub>1</sub>	0,273	0,275	0,285	Y= 0,0828 + 81,75914X

Substituindo-se a letra Y da equação pelo valor da 1° absorvância, o valor de X foi calculado:

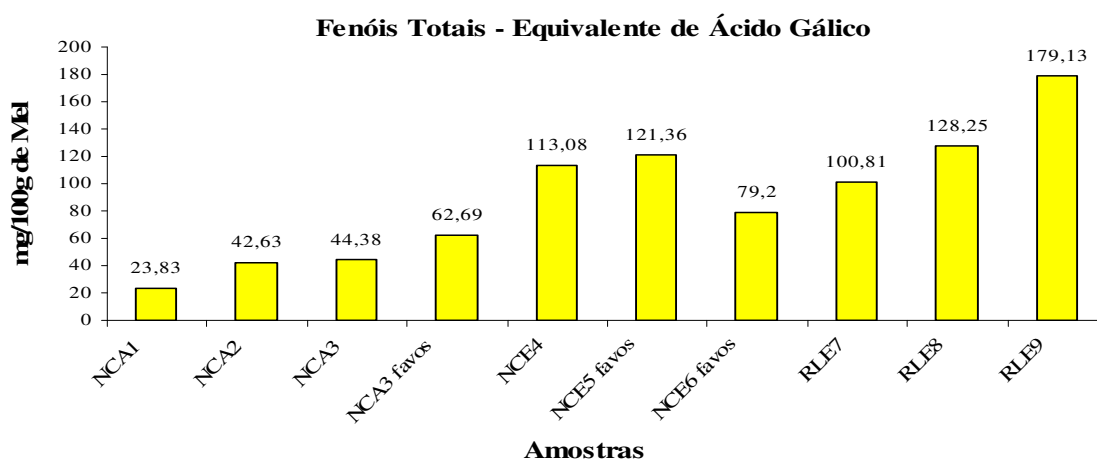
$$0,273 = 0,0828 + 81,75914X$$

$$X = 0,002326345 \text{ mg.mL}^{-1}$$

O valor de 0,002326345 mg (em equivalentes de ácido gálico) foi determinado por mL (solução usada no ensaio), o cálculo final deve considerar que para cada amostra foram utilizados 5,0 mL de solução no ensaio (0,5mL da solução de mel + 2,5 mL do reagente de Folin-Denis + 2,0mL da solução de carbonato de sódio). Sendo assim, a massa de ácido gálico que corresponde a essa solução foi de 0,011631725 mg. Considerando que nesse volume de 5,0 mL de solução só há apenas 0,05g de mel,

conclui-se que em 100g de amostra (NCA<sub>1</sub>) há 23,26345 mg em equivalentes de ácido gálico. Esse mesmo raciocínio foi repetido para cada um dos outros dois valores de absorvâncias do mel de assa peixe (NCA<sub>1</sub>, Tabela 9), bem como para todas as outras amostras.

As médias dos valores calculados para os teores em fenóis totais para cada amostra de mel, tendo como fenólico padrão o ácido gálico, estão reunidas na Figura 19.



**Figura 19.** Teor de ácido gálico equivalente nos méis de assa peixe e eucalipto.

Conforme pode ser observado, o teor em fenóis totais para os méis estudados nesse trabalho variou significativamente com o tipo de mel analisado, apresentado os valores de 23,83 a 62,69 mg ácido gálico/100 g, para os méis de assa peixe, e de 79,2 a 179,13 mg ácido gálico/100 g para os méis de eucalipto (Figura 19). Dos méis analisados, o mel assa peixe (NCA<sub>1</sub>) foi o que apresentou uma menor concentração (23,83 mg ácido gálico/100 g de mel) nestas substâncias.

Ao comparar esses resultados com os estudos realizados com méis heterofloral e monofloral do Rio de Janeiro e São Paulo, onde foi relatado uma faixa entre 42,8 a 78,2 mg/100 g de mel, para méis silvestres e 34,0 a 53,2 mg/100g de mel para méis de laranjeira (LIANDA, 2009), verificou-se que os valores obtidos no presente trabalho foram superiores.

Ao comparar também esses resultados com os determinados em estudos semelhantes realizados com méis de outros países e de diferente origem floral, verificou-se que os valores determinados nesse trabalho são, sem dúvida, superiores.



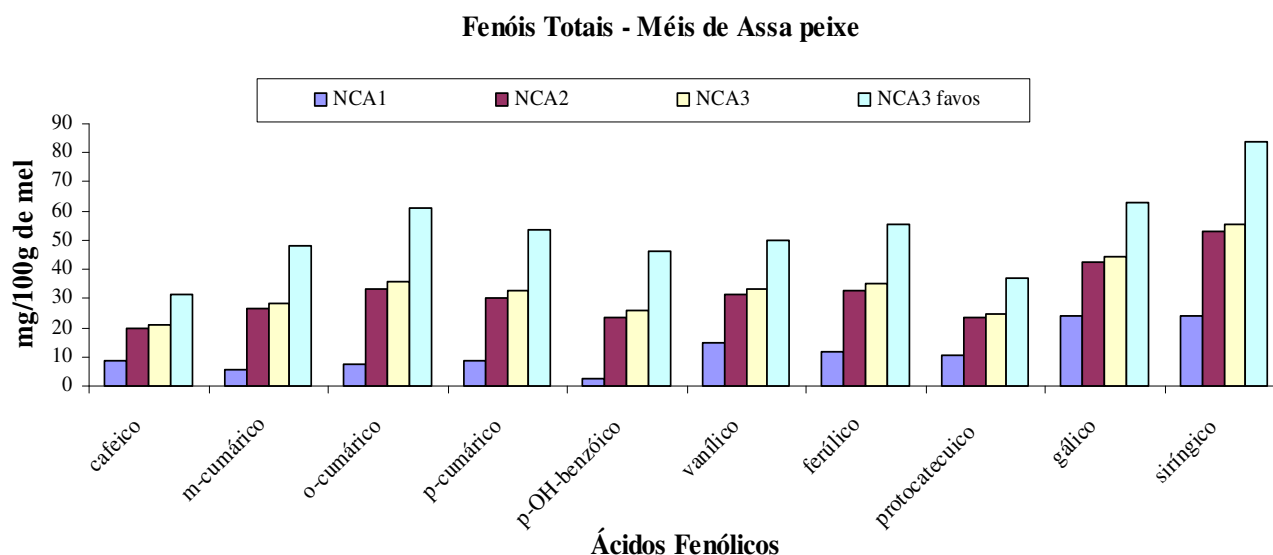
Em comparação aos valores obtidos para méis de ervas da Polônia, SOCHA *et al* (2009) relataram uma variação de 21,7 a 75,3 mg em equivalentes de ácido gálico/100g de mel, estando também abaixo dos conteúdos relatados nesse trabalho.

Para vinte e quatro amostras de méis da Romênia, AL *et al* (2009) relataram uma variação de 2,0 a 39,9 mg; 16,00 a 38,0 mg e de 20,0 a 45,0 mg em equivalentes de ácido gálico/100 g de mel para mel de acácia, limão e girassol, respectivamente.

Em outro trabalho com méis italianos, vinte sete amostras de méis florais de diferentes origens da Itália apresentaram um teor de fenóis totais variando de 60,50 a 274,04 mg/Kg de mel em equivalentes de ácido gálico (PICHICHERO *et al*, 2009), mostrando também que os méis brasileiros de *Apis mellifera* foram superiores quanto aos teores de fenóis totais.

A comparação desses resultados pode sugerir que a concentração e o tipo de substâncias fenólicas encontradas dependem da origem floral e/ou geográfica do mel, e essas substâncias são as principais responsáveis pelas propriedades biológicas (ALMAMARY *et al*, 2002; KUCUKET *et al*, 2007; WEI & ZHIRONG, 2003).

Os teores em ácidos fenólicos individuais obtidos para cada uma das dez amostras de mel estão especificados nas Figuras 20 e 21, sendo estes valores referentes à média para três determinações.



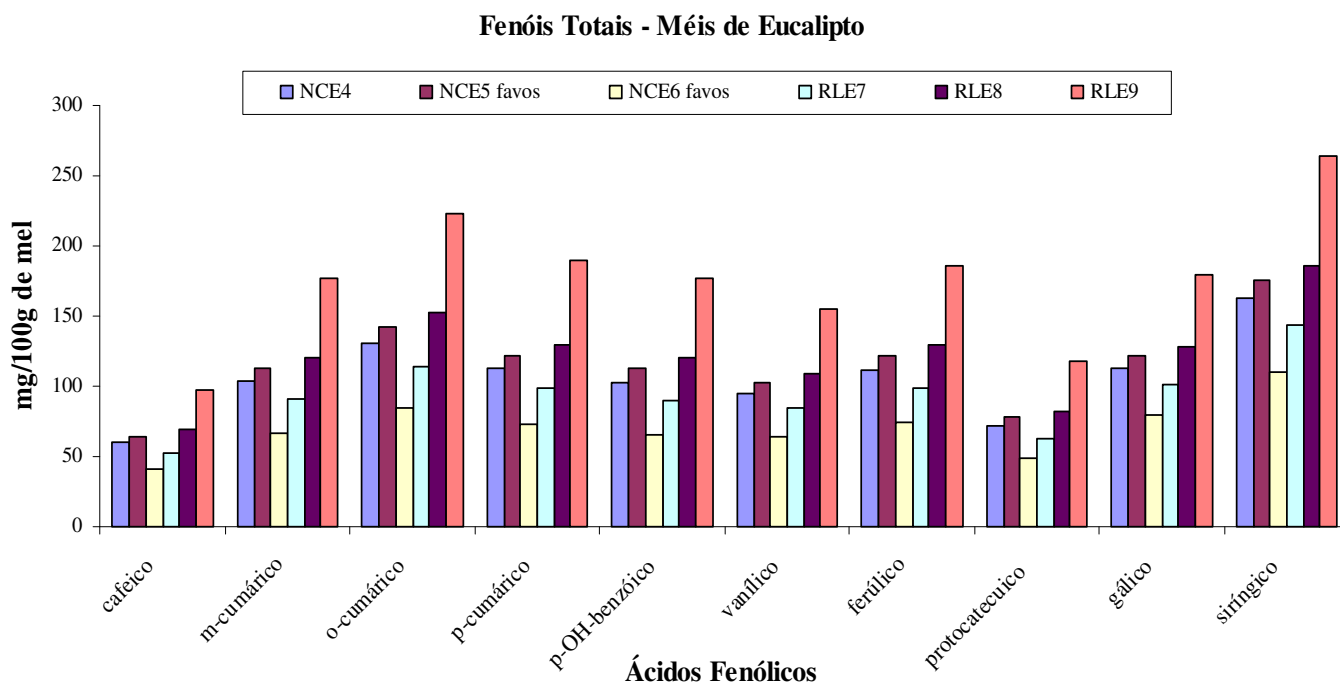
**Figura 20.** Teores em ácidos fenólicos individuais para os méis de assa peixe.

A partir da análise da Figura 20, foi possível observar que entre os resultados obtidos, a amostra NCA<sub>3</sub> (favos) foi a que apresentou os maiores valores em ácidos fenólicos, até mesmo quando comparada com a amostra NCA<sub>3</sub> centrifugada. O teor da amostra NCA<sub>3</sub> (favos) variou de 31,15 mg em equivalentes de ácido cafeico a 84,04 mg em equivalentes de ácido siríngico /100g de mel, enquanto a NCA<sub>3</sub> (centrifugada) variou de 20,67 mg em equivalentes de ácido cafeico a 55,63mg em equivalentes de ácido siríngico /100g de mel.

Entre os ácidos fenólicos avaliados nos méis de assa peixe, a concentração em termos do ácido siríngico foi a maior, com valores médios de 54,08 mg. Seguido pelo ácido gálico e *orto*-cumárico, com 43,38 e 34,47 mg, respectivamente. Já os ácidos cafeico e protocatecuico, com média de 20,10 e 23,88 mg, respectivamente, foram os que apresentaram os menores conteúdos dentre os méis de assa peixe.

A centrifugação do mel, antes do seu envasamento, é um tipo comum de manipulação industrial, para grandes quantidades do produto. Já o mel de favos, ou deles espremidos manualmente, é uma maneira artesanal de manipular o produto. De acordo com SEELEY (2006) as abelhas usam a própolis, que é rica em polifenóis, para reforçar a cera dos favos, fazendo uma espécie de assepsia enquanto são preparados para receber o mel. Esse fato talvez possa ser uma das explicações para a presença de uma maior quantidade de ácidos na amostra de mel de favos (NCE<sub>3</sub> favos), quando comparada à amostra centrifugada (NCA<sub>3</sub>), que é o mesmo mel, porém diferindo apenas no seu processamento.

Na Figura 21 estão apresentados os resultados de ácidos fenólicos individuais obtidos para os seis méis de eucalipto, sendo dois de favos, as amostras NCE<sub>5</sub> e NCE<sub>6</sub>.



**Figura 21.** Teores em ácidos fenólicos individuais para os méis de eucalipto.

Ao analisar os resultados obtidos para os méis de eucalipto, foi observado que a amostra RLE<sub>9</sub> foi a que apresentou os maiores valores em ácidos fenólicos individuais quando comparadas as outras amostras de méis. Os seus conteúdos variaram de 97,8 mg a 264,7mg /100 g de mel em equivalentes de ácido cafeico e ácido siríntrico, respectivamente. Já a amostra NCE<sub>6</sub> favos foi a que apresentou a menor quantidade, variando de 40,6mg/ 100g de mel em equivalentes de ácido cafeico a 109,66mg/100 g de mel em equivalentes de ácido siríntrico /100g de mel.

Entre os ácidos fenólicos avaliados para as amostras de eucalipto, foi também a concentração em termos do ácido siríntrico a maior, com média de 173,43 mg, seguidas dos ácidos *orto*-cumárico e *para*-cumárico com 141,13 e 120,8 mg, sendo basicamente a mesma quantidade de ácido gálico (120,31 mg). E os ácidos cafeico e protocatecuico apresentaram os menores conteúdos, com valores médios de 64,13 e 76,86 mg, respectivamente.

O fato de entre os ácidos estudados, os ácidos siríntrico, *orto*-cumárico, *para*-cumárico e gálico mostrarem mais altos níveis entre as dez amostras, sugere que estes ácidos podem ser considerados característicos dos méis monoflorais estudados.

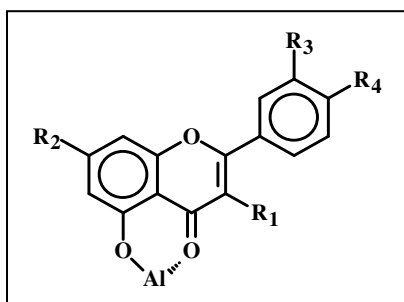
### 5.3 Teor em Flavonóides Totais dos Méis

Um dos métodos para a determinação do teor de flavonóides em méis baseia-se no uso de uma solução metanólica de cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ). Esta solução foi sugerida inicialmente para diagnosticar a presença de antocianinas, uma classe de pigmentos do grupo dos flavonóides que são encontradas principalmente em flores, mas muitas vezes também em frutos, sendo responsável por sua coloração.

A partir de 1954, Harbone sugeriu o uso do cloreto de alumínio para a determinação espectrofotométrica da presença de certos grupamentos químicos em flavonóides (MABRY *et al*, 1970).

Os métodos espectrofotométricos usando  $\text{AlCl}_3$  embora permitam quantificar flavonóides com estruturas similares, são convenientes e apropriados nas determinações de flavonóis e flavonas, porém apresentam limitações na sensibilidade e especificidade.

O princípio dessa análise é a formação de complexos estáveis formados entre o cátion alumínio e os flavonóides, como mostra a Figura 22, originando uma coloração amarela que pode ser avaliada através de uma análise espectrofotométrica a 415nm.



**Figura 22:** Complexo Flavonóide-Al com solução metanólica de cloreto de alumínio.

A formação deste complexo promove um desvio batocrômico (para maiores comprimentos de onda) no espectrofotômetro, além de uma intensificação na absorção. A estabilidade do complexo obtido deve-se à formação de um anel de seis membros estável através do átomo de alumínio com a hidroxila em C-5 e o grupo carbonila em C-4. Dessa maneira, é possível determinar a quantidade de flavonóides, evitando-se a interferência de outras substâncias fenólicas, principalmente os ácidos, que também podem formar complexos com  $\text{AlCl}_3$ , mas absorvem em comprimentos de onda muito inferiores, evitando-se dessa maneira interferências nas medidas de absorbância (WOISKY, 1996; WOISKY & SALATINO, 1998; MEDA *et al*, 2005).

Os flavonóides presentes no mel podem ter origem no pólen, na propólis e no néctar, sendo a propólis a fonte mais rica em flavonóides (FERREIRA *et al.*, 1997).

Para a determinação indireta do teor de flavonóides totais para cada amostra de mel, utilizou-se a quercetina como padrão.

Os dados utilizados para construção da curva analítica da quercetina, bem como para a preparação das curvas dos outros flavonóides (morina, rutina, canferol e narigenina), que foram estudados individualmente no mel, estão mostrados mais detalhadamente no anexo (pg. 97).

Inicialmente, serão apresentados os resultados obtidos para os teores em flavonóides totais, e depois os teores em flavonóides individuais determinados para cada mel.

Na tabela 11 estão apresentados os valores das absorvâncias obtidas para as dez amostras de méis avaliadas na presença de uma solução 2% de AlCl<sub>3</sub> em metanol, como descrito na metodologia (pg. 44).

**Tabela 11.** Valores das absorvâncias (triplicata) para os méis de assa peixe e eucalipto e, com suas respectivas médias e desvios padrão.

Amostras	Absorvância (UV-415nm)			Média Abs. ± D.P.*
	1º	2º	3º	
NCA <sub>1</sub>	0,052	0,041	0,063	0,052±0,011
NCA <sub>2</sub>	0,058	0,041	0,045	0,048±0,009
NCA <sub>3</sub>	0,010	0,014	0,012	0,012±0,002
NCA <sub>3</sub> (Favos)	0,185	0,183	0,187	0,185±0,002
NCE <sub>4</sub>	0,175	0,171	0,173	0,173±0,002
NCE <sub>5</sub> (Favos)	0,104	0,106	0,109	0,106±0,003
NCE <sub>6</sub> (Favos)	0,080	0,098	0,062	0,080±0,018
RLE <sub>7</sub>	0,073	0,048	0,071	0,064±0,014
RLE <sub>8</sub>	0,077	0,091	0,080	0,083±0,007
RLE <sub>9</sub>	0,155	0,148	0,151	0,151±0,004

\* DP = desvio padrão

O teor em flavonóides totais foi expresso em termos de concentração em quercetina sendo por isso necessário a construção de uma curva analítica com soluções padrão de quercetina em diferentes concentrações de 0 – 0,025 mg.mL<sup>-1</sup>.

Na Tabela 12 estão apresentados os resultados obtidos a partir da curva analítica, obtida para quercetina e para os demais flavonóides avaliados (em anexo pg. 97). A partir da equação da reta obtida para quercetina, foi calculado o teor de flavonóides

totais (valor de X na equação da reta), substituindo-se o valor das absorvâncias de cada ensaio das amostras de mel (Tabela 11), pelo valor de Y da equação da reta. E a partir das equações das retas dos demais flavonóides padrões foram possíveis determinar, indiretamente, os níveis individuais de cada flavonóides presentes no mel.

**Tabela 12.** Resultados obtidos a partir da curva analítica preparada com diferentes flavonóides padrões.

Flavonóide	Valor $\pm$ Erro	Valor $\pm$ Erro	R	D.P.*	N**	Equação
	A	B				
Quercetina	0,00482 $\pm$ 0,0140	47,44374 $\pm$ 1,071	0,99797	0,0261	10	Y=0,00482+47,44374X
Morina	-0,03084 $\pm$ 0,013	57,75397 $\pm$ 0,854	0,99891	0,0259	12	Y=-0,03080+ 57,75397X
Rutina	-0,02492 $\pm$ 0,011	28,05653 $\pm$ 0,351	0,99922	0,0215	12	Y=-0,02492+ 28,05653X
Canferol	-0,0324 $\pm$ 0,013	90,34225 $\pm$ 0,918	0,99954	0,026	11	Y=-0,0324+ 90,34225X
Narigenina	3,2.10 <sup>-4</sup> $\pm$ 1,4.10 <sup>-4</sup>	0,5146 $\pm$ 0,002	0,99995	2,3.10 <sup>-4</sup>	9	Y=3,210 <sup>-4</sup> + 0,5146X

\* DP = desvio padrão; N\*\* = número de pontos na curva; p < 0,0001

Para o cálculo dos teores em flavonóides totais de cada amostra, suas absorvâncias foram substituídas na equação fornecida pela reta, cujos valores foram expressos em mg de equivalentes de quercetina/100 g de mel, conforme demonstrado abaixo, utilizando a amostra assa peixe NCA<sub>1</sub>, como mostra o exemplo:

Amostra	Absorvância (UV-760nm)			Equação reta para quercetina
	1°	2°	3°	
NCA <sub>1</sub>	0,052	0,041	0,063	Y= 0,00482 + 47,44374X

Substituindo-se a letra Y da equação pelo valor da 1° absorvância, o valor de X foi calculado:

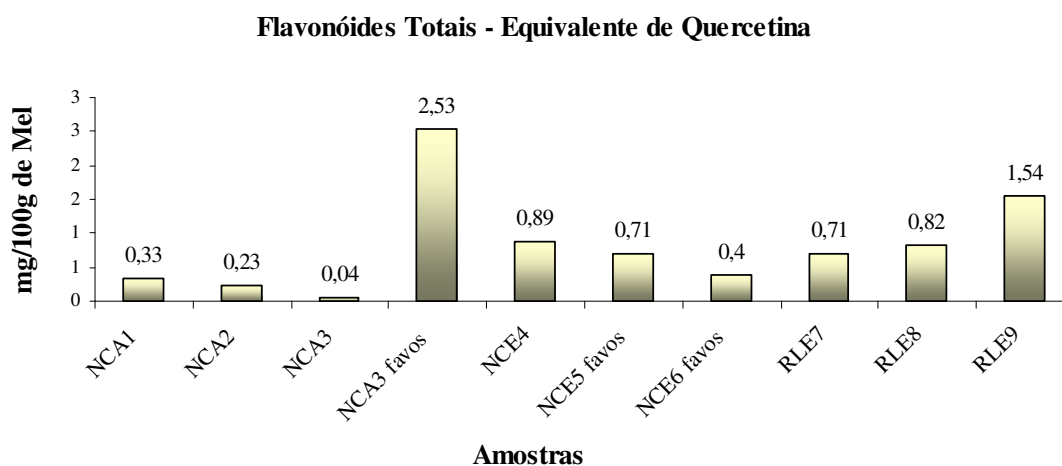
$$0,052 = 0,00482 + 47,44374X$$

$$X = 0,00099444 \text{ mg.mL}^{-1}$$

O valor de 0,00099444 mg (em equivalentes de quercetina) foi determinado por mL (solução usada no ensaio), o cálculo final deve considerar que para cada amostra foram utilizados 6,0 mL de solução no ensaio (3,0mL da solução de mel + 3,0mL da solução de AlCl<sub>3</sub>). Sendo assim, a massa de quercetina que corresponde a essa solução foi de 0,00596664 mg. Considerando que nesse volume de 6,0 mL de solução só há apenas 1,8g de mel, conclui-se que em 100g de amostra (NCA<sub>1</sub>) há 0,33148 mg em

equivalentes de quercetina. Esse mesmo raciocínio foi repetido para cada um dos outros dois valores de absorvâncias do mel de assa peixe (NCA<sub>1</sub>, Tabela 11), bem como para todas as outras amostras.

As médias dos valores calculados para os teores em flavonóides totais para cada amostra de mel estão reunidas na Figura 23 a seguir.



**Figura 23:** Teor de quercetina em equivalentes nos méis de assa peixe e eucalipto.

A quercetina é um dos padrões mais utilizados para as determinações dos teores de flavonóides totais em méis. Conforme pode ser observado, o teor em flavonóides totais para os méis estudados nesse trabalho variou de 0,04 a 2,53 mg equivalentes em quercetina/100g mel, para os méis de assa peixe, e de 0,4 a 1,54 mg quercetina/100 g para os méis de eucalipto (Figura 23). Dos méis analisados, o mel assa peixe (NAC<sub>3</sub>) foi o que apresentou uma menor concentração (0,04 mg quercetina/100 g de mel) nestas substâncias.

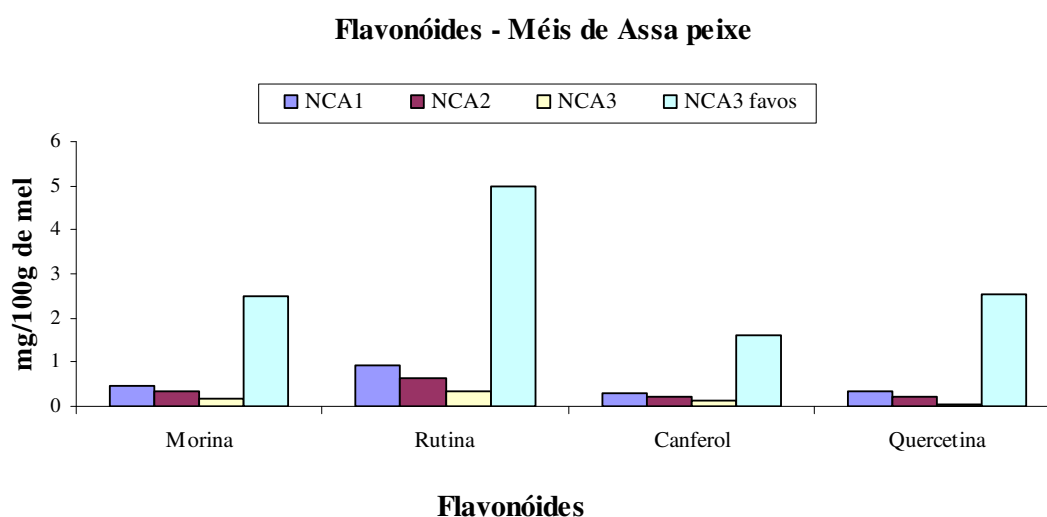
De um modo geral, os resultados indicam existir uma diferença significativa entre teor em flavonóides e a origem floral e/ou geográfica do mel.

Ao comparar esses resultados com os realizados por LIANDA (2009), para méis heterofloral e monofloral do Rio de Janeiro e São Paulo, onde os valores encontrados variam de 0,25 a 4,27 mg em quercetina/100 g de mel, para méis silvestres e de 0,25 a 0,3 mg em quercetina/100g de mel para méis de laranja, foi possível verificar que os valores obtidos no presente trabalho foram muito superiores para os méis monoflorais de eucalipto (0,71 – 1,54 mg/100g) quando comparados ao de laranja (0,25 – 0,3 mg/100g).

Contudo, ao comparar esses resultados com os determinados em estudos semelhantes realizados com méis de outros países e de diferentes origens florais, os quais variam entre 0,2 e 8,4 mg de quercetina/100g de mel (MEDA *et al*, 2005; SOCHA *et al*, 2009), foi possível verificar que os valores determinados neste trabalho estão abaixo do intervalo de valores referidos por esses autores.

Os resultados obtidos estão de acordo com os relatos da literatura que sugerem que nos méis brasileiros os ácidos fenólicos são bem mais abundantes que os flavonóides (LIANDA, 2009; SOCHA *et al*, 2009).

Os teores em flavonóides individuais obtidos para cada uma das dez amostras de mel estão especificados nas Figuras 24 e 25, sendo estes valores referentes à média para três determinações.

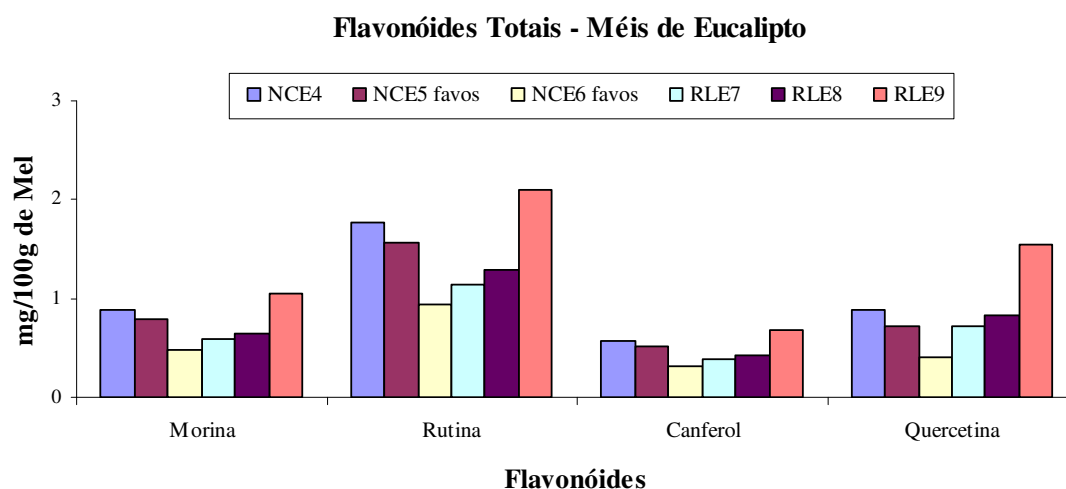


**Figura 24.** Teor em flavonóides individuais nos méis de assa-peixe.

Semelhantemente aos resultados obtidos com os fenólicos, a amostra NCA<sub>3</sub> favos também apresentou o maior resultado em comparação à sua amostra centrifugada (NCA<sub>3</sub>) com uma variação de 2,53mg em equivalentes de quercetina para 4,99mg em equivalentes de rutina/100g de mel, contra 0,04 mg em quercetina para 0,33mg em equivalentes de rutina/100g de mel. Esse fato corrobora a idéia de SEELEY (2006) indicando que os favos, por receberem uma camada de resina, rica em polifenóis, apresentam também, uma maior quantidade de flavonóides em relação a sua amostra centrifugada.

Na Figura 25 estão apresentados os resultados em flavonóides individuais obtidos para os seis méis de eucalipto, sendo as amostras NCE<sub>5</sub> e NCE<sub>6</sub> (méis de favos).





**Figura 25.** Teor em flavonóides individuais para os méis de eucalipto.

A amostra RLE<sub>9</sub> apresentou o maior teor de flavonóides variando de 0,69mg de canferol equivalente para 2,09mg de rutina /100g de mel. E semelhante aos resultados obtidos para os fenólicos o mel NCE<sub>6</sub> favos, apresentou o menor resultado entre todos analisados com 0,31mg de canferol equivalente, valor mínimo, e 0,93mg de rutina /100g de mel.

A quercetina é um dos padrões mais utilizados nas determinações dos teores de flavonóides em méis. E nas análises realizadas neste trabalho, o teor de quercetina equivalente variou de 0,04mg, valor mínimo obtido com a amostra NCA<sub>3</sub>, a um valor máximo de 2,53mg/100g de mel para a amostra NCA<sub>3</sub> favos.

Os resultados de SOCHA *et al* (2009) para a determinação do teor de quercetina em diferentes amostras de méis poloneses foram de 6,9 a 28,5mg de equivalente de quercetina /100g de mel.

O teor de flavonóides totais para vinte e quatro amostras de méis romenos foi determinado por AL *et al* (2009), que obteve uma variação de 0,91-2,42; 4,70-6,98 e 11,53-15,33mg de quercetina equivalente /100g de mel de acácia, limão e girasol, respectivamente.

Em um outro trabalho com méis italianos, vinte sete amostras de méis florais de diferentes origens da Itália apresentaram um teor de equivalentes de quercetina variando de 41,88 a 211,68 mg/Kg de mel (PICHICHERO *et al*, 2009).

Os métodos espectrofotométricos usando AlCl<sub>3</sub> embora permitam quantificar flavonóides com estruturas similares, são convenientes e apropriados nas determinações

de flavonóis e flavonas, porém apresentam limitações na sensibilidade e especificidade. O uso deste reagente na determinação de flavonas, flavonóis, flavanonas e isoflavonas se encontra bem documentados (Tabela 13). No caso, dos flavonóis (quercetina, canferol, rutina, miricetina e morina) e flavonas (apigenina, crisina e luteolina), é gerado um complexo estável com um máximo de absorção a 415 nm (JURD, 1962). As flavanonas naringenina, hesperidina e naringina não apresentam absorção importante com  $\text{AlCl}_3$ , porém são ativas com 2,4-dinitrofenilidrazina com máximo de absorção a 495 nm.

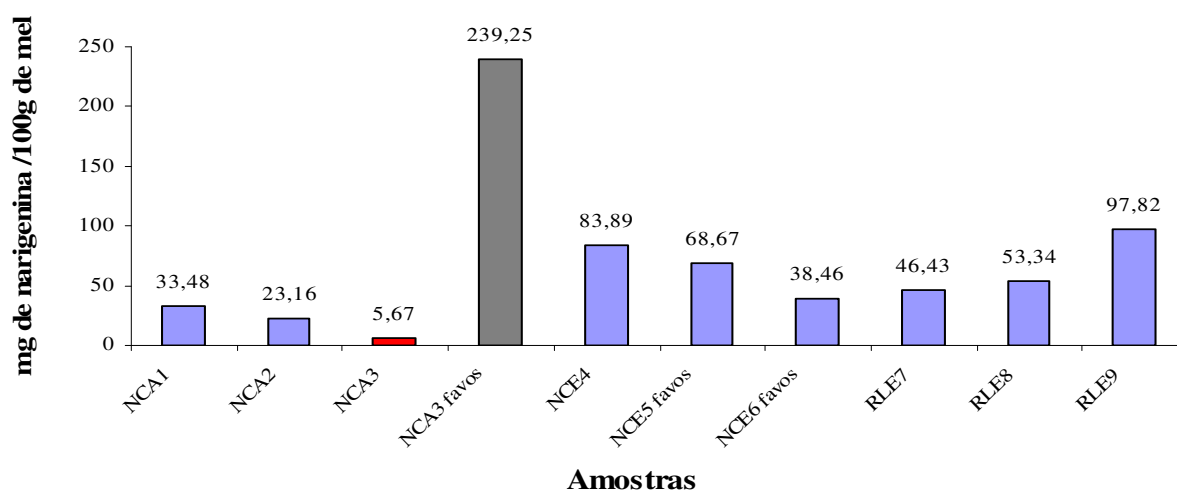
**Tabela 13:** Bandas de absorção de flavonóides em solução metanólica e na presença de cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ).

Tipos de Flavonóides	Banda I (nm)	Banda II (nm)	Deslocamento por complexação com $\text{AlCl}_3$ (nm)*
Flavonas	310-350	250-280	+ 35-55
Flavonóis	350-385	250-280	+ 35-55
Flavonóis (3-OH substituído)	330-360	250-280	+ 50-60
Isoflavonas	310-330 ombro	245-275	+ 10-14
Flavanonas e diidroflavonóis	300-330 ombro	230-270	+ 20-26

\* Em 415 nm, os ácidos fenólicos e outras substâncias fenólicas não absorvem em presença de  $\text{AlCl}_3$ , por isso não há interferência destas substâncias na quantificação de flavonóides.

Os complexos formados entre outros flavonóis e o alumínio absorvem bem próximo de 425 nm, mas os complexos derivados da classe das flavonas e flavanonas absorvem em comprimentos de onda inferiores, o que pode causar uma superestimativa nas determinações de misturas muito ricas em flavonas e flavanonas, como pode ser observado com a naringenina na Figura 26.

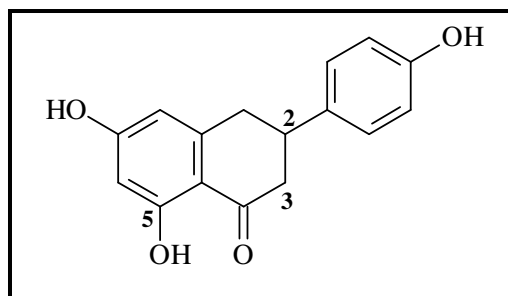
### Teor de Naringenina Equivalente nos Méis



**Figura 26.** Teor de naringenina em méis de assa-peixe e eucalipto, referente à média de três determinações.

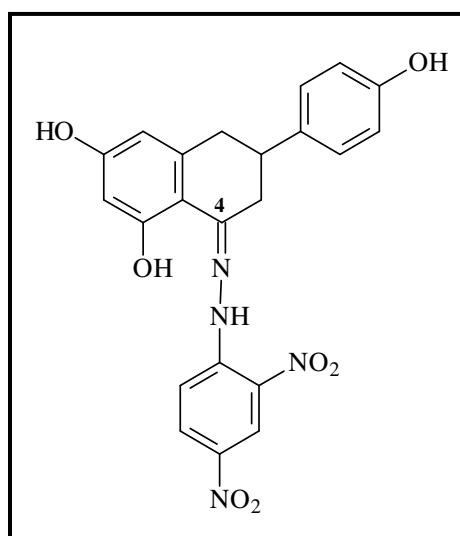
Como pode ser observado, os resultados mostram valores altos em equivalentes de naringenina obtidos para cada amostra, variando de 5,26 a 239,25 mg/100g de mel. Esses teores foram calculados a partir da equação da reta mostrada na Tabela 12 (pg 63), obtida pela reação entre a solução de naringenina padrão, em diferentes concentrações, com o  $\text{AlCl}_3$  em metanol.

A equação da reta mostra os coeficientes linear e angular (A e B), com valores muito menores ( $3,2 \cdot 10^{-4}$  e 0,5146) em comparação aos valores observados para as outras equações, referentes aos flavonóis (rutina, quercetina, morina e canferol). Neste contexto, o  $\text{AlCl}_3$  em metanol não se mostrou um bom reagente de complexação para promover o desvio batocrômico (para maior comprimento de onda), bem como a intensificação da banda de absorção da flavanona naringenina no espectrofotômetro. Esse fato, provavelmente pode ser explicado pela ausência da hidroxila no carbono C3, bem como a falta de insaturação nos carbonos C2-C3, na estrutura da naringenina (Figura 27) que auxilia a complexação com o cátion alumínio. A estabilidade do complexo obtido deve-se à formação de um anel de seis membros estável e planar através do átomo de alumínio com a hidroxila em C-5 e o grupo carbonila em C-4, que tem no C-3 adjacente uma ligação dupla e uma hidroxila, como no caso dos flavonóis.



**Figura 27.** Estrutura da flavanona naringenina

As flavonas e flavonóis, do ponto de vista da reatividade, formam complexos estáveis com cloreto de alumínio e são suscetíveis a serem analisados mediante espectrofotometria ultravioleta-visível (MABRY *et al*, 1970; MARKHAM, 1982), entretanto, as flavanonas reagem melhor com 2,4-dinitrofenilhidrazina (NAGY Y GRANCAI, 1996), situação que tem sido avaliada por Chang *et al* (2002), Kosalec *et al* (2004) e GROSSO *et al* (2007) para estimar o total de flavonóides em própolis de diferentes países. No primeiro caso se formam complexos de coloração amarelo formados pelos flavonóis (3,5-diidroxiflavonóis) que absorvem a 415 nm, e no segundo, formam-se derivados de coloração laranja de 2,4-dinitrofenilidrazonas (Figura 28), através da reação que acontece na carbonila (C-4) da flavanona e que absorve a 495 nm.



**Figura 28.** Estrutura do derivado 2,4-fenilidrazona formado através da naringenina e 2,4 dinitrofenilidrazina.

#### 5.4 Atividade Antioxidante dos Méis e seus Extratos

Radicais livres (RL) e espécies reativas de oxigênio (ERO) desempenham papel fundamental no metabolismo celular. No entanto, quando em excesso, podem gerar estresse oxidativo, levando a alterações teciduais responsáveis por diversas patologias, incluindo o câncer (DRÖGE, 2002). Antioxidantes são compostos que atuam inibindo e/ou diminuindo os efeitos desencadeados pelos radicais livres e pelos compostos oxidantes (CHEN *et al*, 2000). Entre os antioxidantes mais conhecidos estão as vitaminas, principalmente vitaminas C e E, os ácidos fenólicos e os flavonóides, entre os quais pode-se citar os ácidos gálico, caféico, protocatecuico, quercetina, rutina, hesperidina e naringenina.

Muitas substâncias obtidas de alimentos têm sido identificadas como sequestradoras de espécies reativas de oxigênio, sendo capazes de proteger o corpo humano dos efeitos provocados por estas espécies, além de retardar o aparecimento de muitas doenças crônicas (MEDA *et al*, 2005). Uma das propriedades mais promissoras do mel é sua atividade antioxidante, que resulta principalmente da presença natural de substâncias fenólicas como ácidos fenólicos e flavonóides, em sua composição

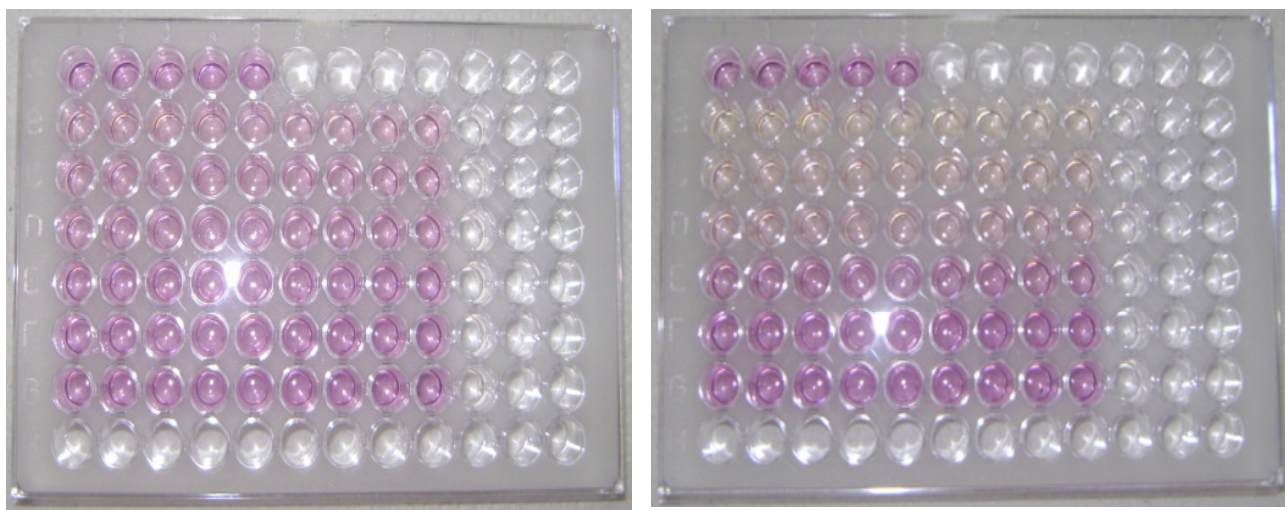
Diferentes métodos têm sido desenvolvidos para obter a diferenciação, seja qualitativa ou quantitativa, da capacidade antioxidante de compostos, tanto através de testes sem a utilização de células (testes químicos) ou utilizando culturas celulares (testes biológicos). Os testes químicos são mais rápidos e simples de serem executados, e embora sejam muito utilizados, não são representativos das condições celulares do homem.

Entre os métodos que empregam radicais orgânicos na avaliação de sequestradores de radicais livres, o método do DPPH (2,2 difenil-1-picril-hidrazil) tem sido muito usado para se avaliar a capacidade sequestrante de produtos da apicultura, como pólen (CAPES *et al*, 2008), própolis (AHN *et al*, 2007) e mel (MEDA *et al*, 2005). Esse radical orgânico estável é muitas vezes preferido na análise de sequestro de radicais livres em função da sua rapidez e simplicidade. Esse método é baseado na redução de soluções alcoólicas de DPPH a 517 nm na presença de um antioxidante doador de hidrogênio.

Neste trabalho, a propriedade antioxidante dos méis de assa peixe e eucalipto foi avaliada pelo ensaio do DPPH, que é um método muito utilizado nesse tipo de

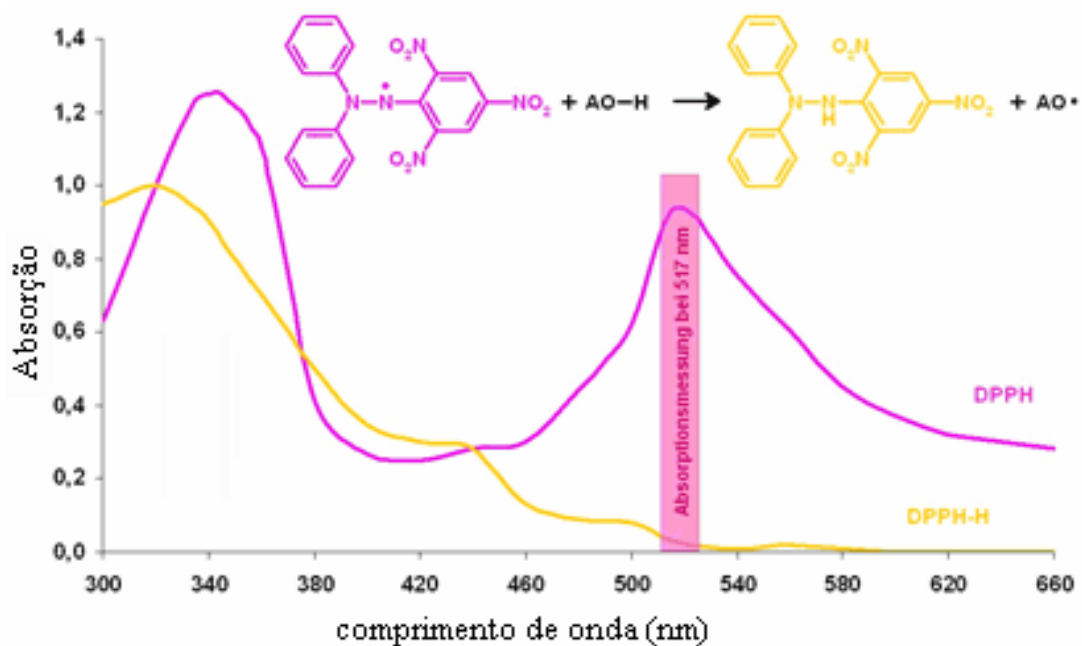
determinação. Na presença de um antioxidante, a coloração púrpura da solução de DPPH decai, e a mudança de absorvância pode ser lida espectrofotometricamente (PÉREZ *et al*, 2007).

A atividade antioxidante ou antiradicalar pode ser observada visualmente pela descoloração do radical DPPH ao entrar em contato com a amostra de mel ou do seu extrato em concentrações previamente determinadas, Figura 29.



**Figura 29.** Microplaca mostrando a mistura das soluções de mel em diferentes concentrações com a solução de DPPH em concentração fixa. A) Após 3 minutos. B) Após 20 minutos.

O teste com DPPH, o qual utilize uma reação redox com o radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil, pode ser usado para determinar a capacidade antioxidante do mel e dos seus extratos. O radical tem uma coloração violeta, devido ao um elétron desemparelhado sobre o nitrogênio, e depois da reação com uma substância seqüestradora de radical (como os polifenóis, por exemplo), o DPPH-H reduzido (2,2-difenil-1-picril-hidrazina) passa a ter coloração amarela. Esta mudança de coloração pode ser observada espectrofotometricamente a 517 nm e desta maneira o potencial antioxidante de uma substância ou de um extrato pode ser determinado (Figura 30).



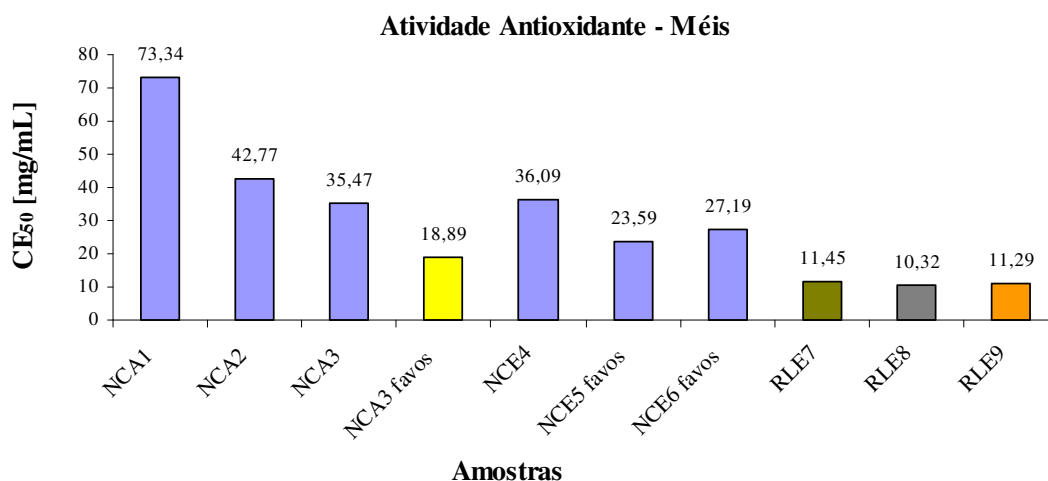
**Figura 30.** Análise espectrofotométrica de uma solução de DPPH com substâncias antioxidantes.

Embora o mecanismo de ação antioxidante das substâncias fenólicas não esteja totalmente esclarecido e possa variar de acordo com a estrutura química dos compostos (GUO *et al*, 1999), de modo geral, os flavonóides são capazes de doar hidrogênio para os radicais livres, estabilizando-os e impedindo o estresse oxidativo capaz de gerar danos tissulares ou morte celular (CHEN *et al*, 1990; SAIJA, 1995; JOVANOVIC *et al*, 1998).

Todas as determinações foram realizadas em triplicata. A porcentagem de atividade de seqüestrante (%AA) foi determinada segundo a fórmula de Mensor *et al* (2001).

A atividade seqüestrante do radical livre DPPH também foi expressa em termos de CE<sub>50</sub> (concentração efetiva mínima necessária para o antioxidante reduzir em 50% a concentração inicial do DPPH), através da média obtida nos gráficos, que relaciona o percentual de atividade *versus* a concentração da substância ensaiada. Desta forma, quanto menor o valor de CE<sub>50</sub>, maior é a capacidade antioxidante das substâncias presentes.

A figura 31 mostra a atividade antioxidante dos méis de assa peixe e eucalipto, com os resultados expressos em CE<sub>50</sub> obtidos após o mínimo de três determinações.



**Figura 31.** Atividade antioxidante dos méis de assa peixe e eucalipto, obtida a partir de três determinações.

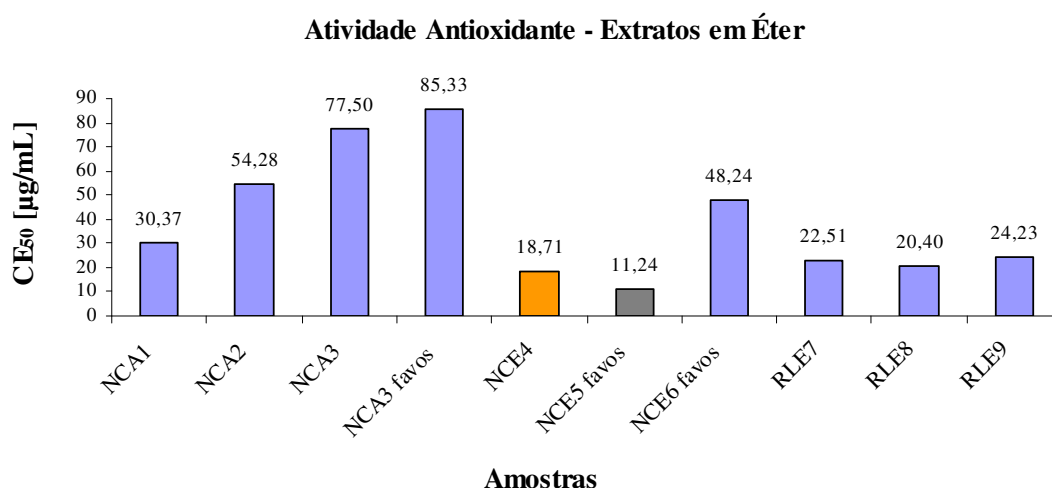
A melhor atividade entre as amostras de méis de assa peixe pode ser observada no mel NCA<sub>3</sub> favos, com CE<sub>50</sub> de 18,89 mg/mL. Já entre as amostras de eucalipto, os méis RLE<sub>8</sub>, RLE<sub>9</sub> e RLE<sub>7</sub>, com 10,32, 11,29 e 11,45 mg/mL, respectivamente, apresentaram o melhor resultado.

Comparando-se esses valores com os resultados obtidos por LIANDA (2009), para méis monofloral de laranjeira do Rio de Janeiro e São Paulo, onde o valor mínimo encontrados foi de 29,85 mg/mL, e o valor máximo de 52,64 mg/mL, observa-se que os méis NCA<sub>3</sub> favos, RLE<sub>8</sub>, RLE<sub>9</sub> e RLE<sub>7</sub>, estudados neste trabalho, tiveram um melhor rendimento.

Em comparação aos valores obtidos para méis portugueses, FERREIRA *et al* (2009) relataram uma variação de 106,67 a 168,94 mg/mL de EC<sub>50</sub> estando também abaixo dos conteúdos relatados nesse trabalho.

A Figura 32 expressa a atividade antioxidante dos extratos em éter, dos méis de assa peixe e eucalipto, com os resultados descritos em termos de CE<sub>50</sub> obtidos após o mínimo de três determinações.



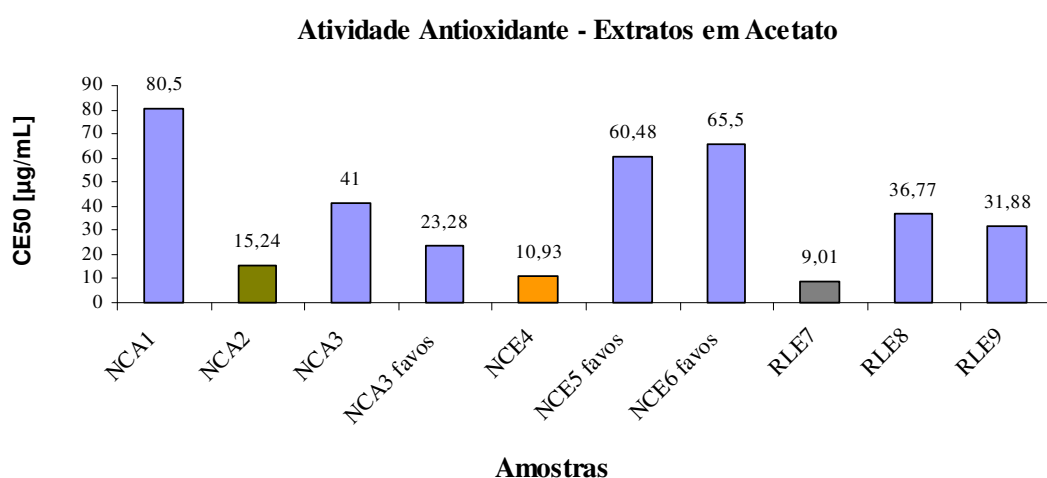


**Figura 32.** Atividade antioxidante dos extratos em éter dos méis de assa peixe e eucalipto, obtida a partir de três determinações.

Os resultados mostram que os extratos etéreos dos méis de eucalipto, das amostras NCE<sub>5</sub> favos e NCE<sub>4</sub>, com CE<sub>50</sub> de 11,24 e 18,71 µg/mL, respectivamente, foram os que apresentaram os melhores rendimentos. Já entre os méis de assa peixe, a amostra NCA<sub>1</sub> teve o melhor rendimento com CE<sub>50</sub> de 30,37 µg/mL, valor muito acima dos extratos etéreos NCE<sub>5</sub> favos e NCE<sub>4</sub>.

Vale destacar que o extrato etéreo da amostra NCE<sub>3</sub> favos apresentou o pior rendimento entre os extratos etéreos com CE<sub>50</sub> de 85,33 µg/mL.

A figura 33 mostra a atividade antioxidante dos extratos em acetato, dos méis de assa peixe e eucalipto, com os resultados descritos em termos de CE<sub>50</sub> obtidos após o mínimo de três determinações.



**Figura 33.** Atividade antioxidante dos extratos em acetato dos méis de assa peixe e eucalipto, obtida a partir de três determinações.

As avaliações mostram que o extrato em acetato da amostra NCE<sub>4</sub> com CE<sub>50</sub> de 10,93 µg/mL, apresentou o melhor resultado entre as amostras de eucalipto. Já entre as amostras de assa peixe, o extrato em acetato NCA<sub>2</sub>, com CE<sub>50</sub> de 15,24 µg/mL, apresentou o melhor resultado.

O extrato NCA<sub>1</sub> apresentou o pior resultado entre todos os extratos em acetato analisados, com CE<sub>50</sub> de 80,5 µg/mL, seguido pelo NCE<sub>6</sub> favos e NCE<sub>5</sub> favos, com 65,5 e 60,48 µg/mL, respectivamente.

A Tabela 14 compara todos os valores obtidos neste trabalho para atividade antioxidante dos méis, e seus extratos em éter e acetato, com suas médias e respectivos desvios padrões.

**Tabela 14.** Comparação entre os valores de CE<sub>50</sub> para os méis de assa peixe e eucalipto, e seus respectivos extratos em acetato e éter, com suas médias e desvios padrões.

Amostra	Mel Média CE <sub>50</sub> [mg/mL]	Extrato – Éter Média CE <sub>50</sub> [µg/mL]	Extrato – Acetato Média CE <sub>50</sub> [µg/mL]
NCA <sub>1</sub>	73,34±5,28	30,37±0,14	80,5±5,83
NCA <sub>2</sub>	42,77±0,88	54,28±0,41	<b>15,24±0,05</b>
NCA <sub>3</sub>	35,47±0,19	77,50±1,76	41,0±1,80
NCA <sub>3</sub> (Favos)	<b>18,89±0,14</b>	85,33±2,89	23,28±0,82
NCE <sub>4</sub>	36,09±0,75	<b>18,71±1,35</b>	<b>10,93±0,29</b>
NCE <sub>5</sub> (Favos)	23,59±0,08	<b>11,24±0,21</b>	60,48±0,60
NCE <sub>6</sub> (Favos)	27,19±0,42	48,24±1,09	65,50±0,78
RLE <sub>7</sub>	<b>11,45±0,11</b>	22,51±0,25	<b>9,01±0,4</b>
RLE <sub>8</sub>	<b>10,32±0,16</b>	20,40±0,09	36,77±0,17
RLE <sub>9</sub>	<b>11,29±0,16</b>	24,23±0,4	31,88±0,60

## 5.5. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência dos extratos de mel

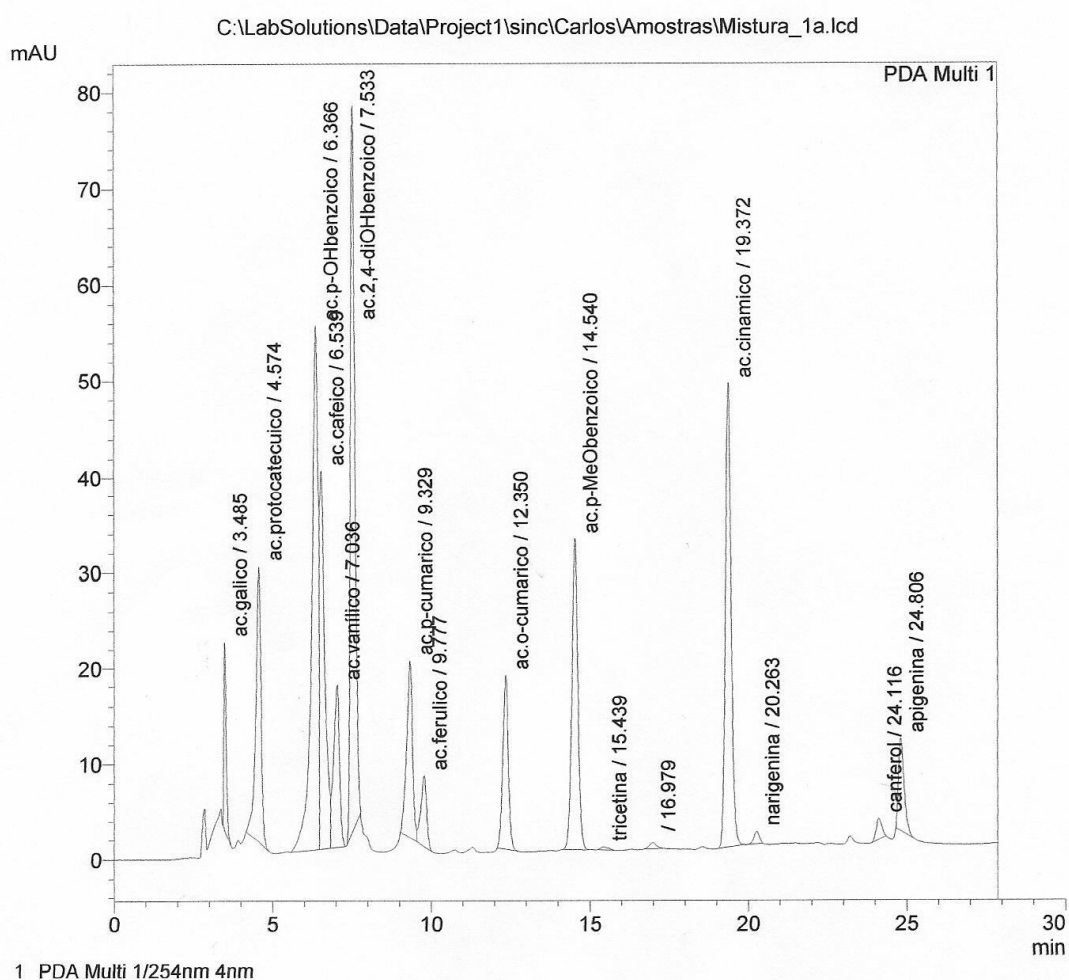
Em geral, as separações de ácidos fenólicos e flavonóides tem sido realizada por CLAE utilizando coluna de fase reversa (C18 – octadecil). Eluição com gradiente é normalmente usado em virtude da complexidade do perfil fenólico das amostras de méis. Numerosas fases móveis têm sido empregadas, mas um sistema binário compreendendo um componente aquoso e um solvente orgânico menos polar (exemplo acetonitrila ou metanol) tem sido o mais comum. Ácidos (fórmico, acético ou fosfórico) tem sido adicionado a fase aquosa para manter o pH em condições ideais durante a execução do gradiente. O padrão de eluição comumente observado: ácidos benzóicos, cinâmicos, flavonona glicosilada, seguida por flavonol e flavona glicosilada e então as agliconas (TOMÁS-BARBERÁN, 1993; SOCHA, *et al*, 2009; TSIAPARA *et al*, 2009).

Em CLAE a detecção de substâncias fenólicas é tipicamente baseada na medida de absorção por ultravioleta, frequentemente usando um detector de arranjo de fotodiodo (DAD). A combinação de ambos o espectro de UV-Vis e o tempo de retenção ( $t_R$ ) pode conduzir mais facilmente a identificação das substâncias separadas. O DAD pode simultaneamente detectar cromatogramas em diferentes comprimentos de onda ( $\lambda$ ). Este fato aumenta significativamente a eficiência do sistema de separação, particularmente quando diferentes grupos polifenólicos estão misturados em uma mesma amostra. Quando é escolhido o comprimento de onda correto (no máximo de absorção) todos os grupos podem ser detectados com mais alta sensibilidade. Uma apropriada seleção do comprimento de onda pode também possibilitar a quantificação de um pico com pouca resolução. Contudo, uma abordagem convencional baseada no espectro de UV é frequentemente limitada quando amostras contem substâncias muito semelhantes.

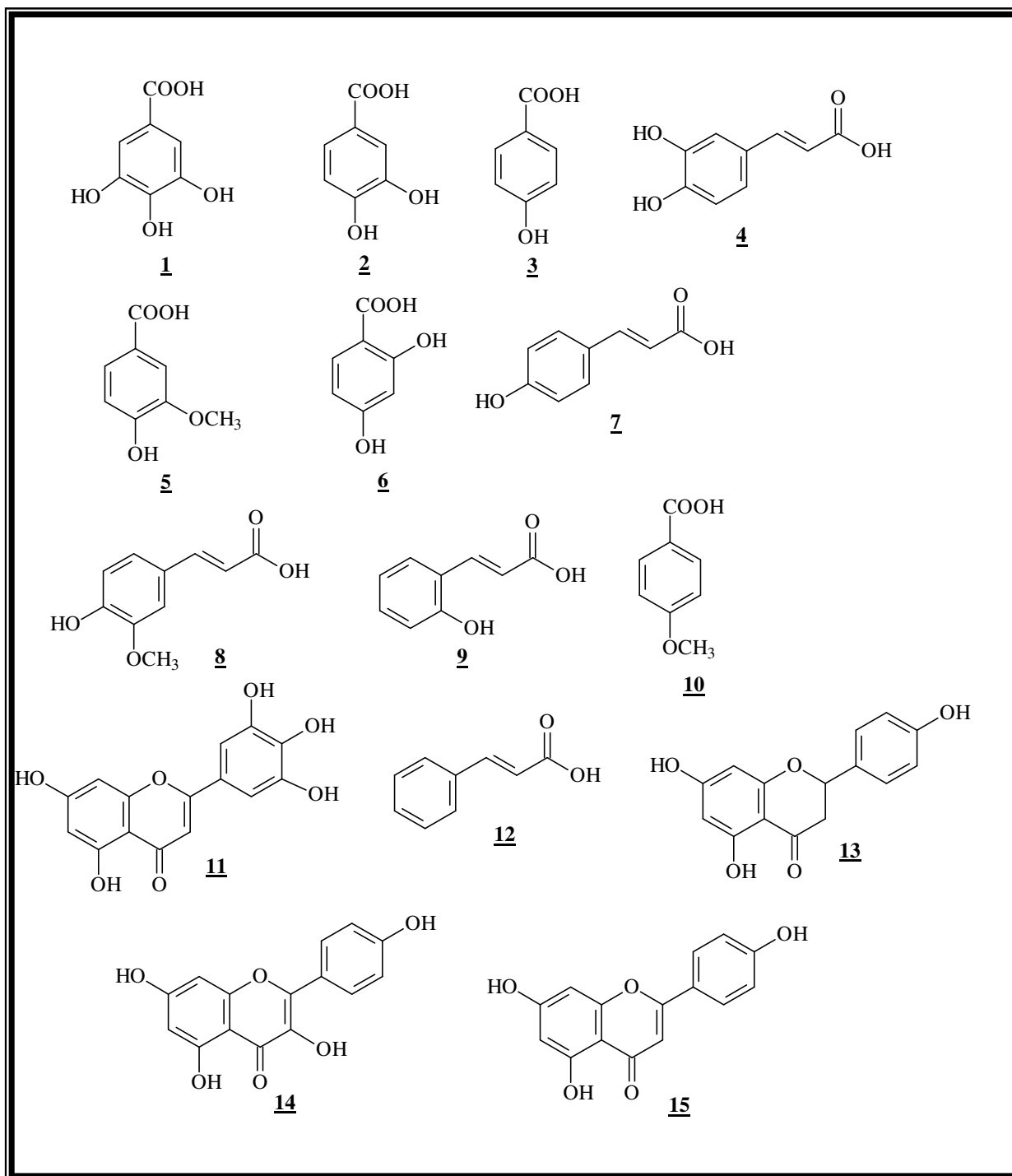
As análises por CLAE-DAD dos extratos de méis foram realizadas de acordo com o método descrito no item 4.5 (pg. 41). A avaliação das substâncias fenólicas teve início pela análise do perfil dos padrões por CCDA em gel de sílica (fase normal), seguido da análise por CLAE-DAD (fase reversa). Primeiramente, os padrões foram analisados em cromatoplasmas de fase normal, com o propósito de observar o fator de retenção ( $R_f$ ), bem como o aspecto e cor de suas manchas observadas pela irradiação da luz UV nos comprimentos de onda de 254 nm e 366 nm.

Cada padrão de ácido fenólico e flavonóide foi analisado, individualmente, por CLAE-DAD para terem seus tempos de retenção e as suas curvas de UV determinadas,

e posteriormente, foram reunidos para comporem a **mistura 1** (Figura 34). A composição desta mistura contendo os ácidos e flavonóides (Figura 35) teve como base os resultados preliminares obtidos nas análises por CCDA, mostrados em anexo (Figura P-X, pg. 118), ( $R_f$  e cores desenvolvidas) dos extratos dos méis, quando estes foram comparados aos padrões e com resultados anteriores do nosso grupo (DA SILVA, 2004; MONTAGNI, 2005; LIANDA 2004 e 2009 e PEREIRA, 2010). Os tempos de retenção e algumas curvas de UV (Figura 36, pg. 79) obtidas a partir do cromatograma da **mistura 1** foram utilizadas, posteriormente, para identificar nos diferentes extratos de mel (acetato de etila e éter) as substâncias desconhecidas.

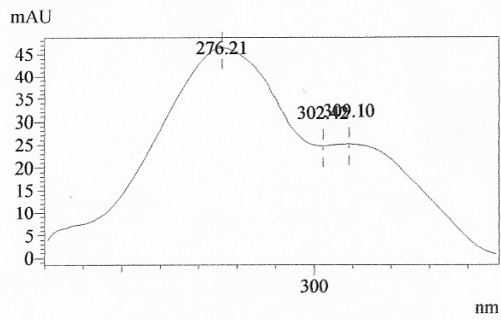


**Figura 34.** Mistura 1 analisada por CLAE-DAD -coluna analítica C-18 (25 cm x 4,6 mmx 5  $\mu$ m), fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>, fase móvel metanol: acetonitrila (90:10)-solvente B e água: ácido acético (99:1 - solvente A), 270-340 nm.

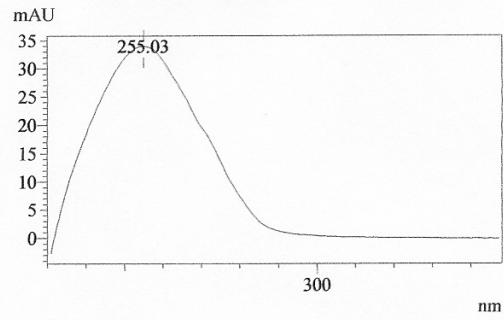


**Figura 35.** Estruturas das substâncias fenólicas contidas na **mistura 1** (**1**- Ácido gálico, **2**- Ácido protocatecuíco, **3**-Ácido *p*-hidroxi-benzóico, **4**-Ácido cafeico, **5**-Ácido vanílico, **6**- Ácido 2,4-diOHbenzóico, **7**-Ácido *p*-cumárico, **8**-Ácido ferúlico, **9**-Ácido *o*-cumárico, **10**- Ácido *p*-metoxi-benzóico, **11**-Tricetina, **12**-Ácido cinâmico, **13**-Narigenina, **14**-Canferol, **15**-Apigenina)

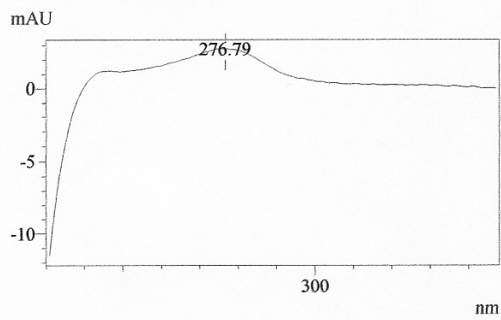
ID# : 9  
Retention Time : 12.350  
Compound Name : ac.o-cumarico



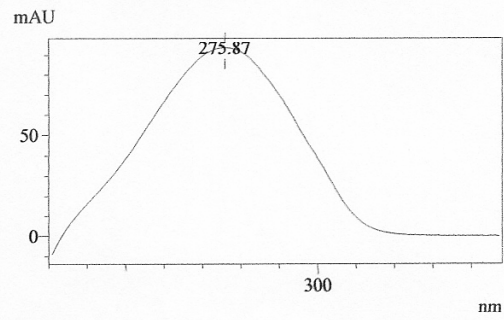
ID# : 10  
Retention Time : 14.540  
Compound Name : ac.p-MeObenzoico



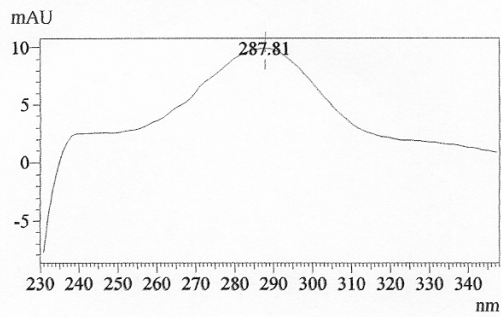
ID# : 11  
Retention Time : 15.439  
Compound Name : tricetina



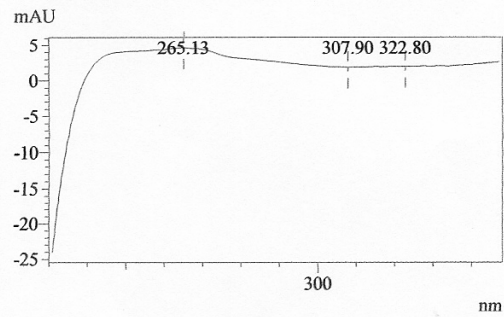
ID# : 12  
Retention Time : 19.372  
Compound Name : ac.cinamico



ID# : 13  
Retention Time : 20.263  
Compound Name : naringenina



ID# : 14  
Retention Time : 24.116  
Compound Name : canferol



ID# : 15  
Retention Time : 24.806  
Compound Name : apigenina

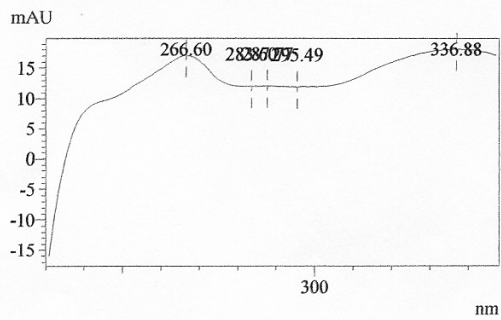


Figura 36. Curvas de UV dos padrões contidos na **Mistura 1** adquiridas pela análise por CLAE-DAD.

Para a avaliação preliminar dos resultados obtidos nos cromatogramas dos extratos dos méis de assa peixe e eucalipto (Figura A-O, em anexo pg. 104) foi feita uma comparação dos seus  $t_R$  e das suas curvas de UV com aquelas obtidas para os padrões na mistura 1 (Figura 34, pg. 77). Devido a possíveis interações entre as substâncias na mistura, em alguns casos ocorreram coincidências ou pequenas variações nos tempos de retenção quando comparados aos padrões analisados individualmente.

Abaixo esta apresentada a Tabela 15 que relaciona as principais substâncias fenólicas identificadas nos méis assa peixe e eucalipto avaliados por CCDA e/ou CLAE-DAD. Na Tabela 16 estão apresentadas às substâncias fenólicas identificadas em méis dessa mesma origem floral, que foram estudadas por LIANDA, 2009 e PEREIRA, 2010.

**Tabela 15:** Substâncias fenólicas identificadas nos extratos de méis de assa peixe e eucalipto nesse trabalho.

Amostras	Substâncias Fenólicas identificadas por CCDA e/ou CLAE-DAD
<b>Assa peixe</b>	
NCA <sub>1</sub>	Ácidos: <i>para</i> -hidroxi-benzóico, <i>para</i> -cumárico, ferulico <i>para</i> -metoxi-benzóico e cinâmico Flavonóide: tricetina*, apigenina**
NCA <sub>2</sub>	Ácidos: gálico, protocatecuico, <i>para</i> -hidroxi-benzóico, cafeico, ferulico, <i>para</i> -metoxi-benzóico e cinâmico.
NCA <sub>3</sub>	Ácidos: gálico, protocatecuico <i>para</i> -hidroxi-benzóico, <i>para</i> -cumárico, <i>para</i> -metoxi-benzóico Flavonóide: Narigenina**, apigenina**
NCA <sub>3</sub> /favos	Ácidos: gálico, , <i>para</i> -hidroxi-benzóico, cafeico, <i>para</i> -cumárico , ferulico, <i>para</i> -metoxi-benzóico e cinâmico *Flavonóide: Narigenina*, apigenina**
<b>Eucalipto</b>	
NCE <sub>4</sub>	Ácidos: protocatecuico, <i>para</i> -hidroxi-benzóico, cafeico, <i>para</i> -cumárico, ferulico, cinâmico Flavonóide: miricetina, canferol**
NCE <sub>5</sub> /favos	Ácidos: gálico,, <i>para</i> -hidroxi-benzóico, vanílico, <i>para</i> -cumárico, ferulico*, <i>para</i> -metoxi-benzóico, cinâmico Flavonóides: miricetina, canferol**
NCE <sub>6</sub> /favos	Ácidos: gálico, protocatecuico, <i>para</i> -hidroxi-benzóico, cafeico, <i>para</i> -cumárico, ferúlico, cinâmico Flavonóides: tricetina *, narigenina, canferol, miricetina, apigenina

\* confirmado por CLAE-DAD; \*\* confirmado por CCDA



**Tabela 16:** Substâncias fenólicas identificadas em méis de eucalipto (LIANDA, 2009) e assa peixe (PEREIRA, 2010) em trabalhos realizados anteriormente.

Eucaliptos	
<b>RLE<sub>7</sub></b>	Ácidos: protocatecuico, <i>para</i> -hidroxi-benzóico e siríngico *Flavonóide: tricetina
<b>RLE<sub>8</sub></b>	Ácidos: protocatecuico, <i>para</i> -hidroxi-benzóico, vanílico e siríngico
<b>RLE<sub>9</sub></b>	Ácidos: protocatecuico, siríngico e cinâmico *Flavonóide: tricetina
Assa peixe	
<b>MPA</b>	**Ácidos: gálico, protocatecuico, <i>para</i> -hidroxibenzóico, <i>para</i> -cumarico, cinâmico, vanílico, ferúlico. **Flavonóides: apigenina, narigenina, miricetina, canferol.

\* Confirmado por CCDA; \*\* Identificados por CCDA/CLAE-DAD

## 6 CONCLUSÕES

A determinação da substância 5-hidroxi metilfurfural (HMF) para os méis de assa peixe e eucalipto mostrou que entre todas as amostras, o mel RLE<sub>7</sub>, com HMF de 64,1 mg.kg<sup>-1</sup> de mel, não se enquadra dentro os valores estabelecidos pela legislação internacional e brasileira, com limites de 40 e 60 mg.kg<sup>-1</sup> de mel, respectivamente. Considerando que todas as amostras receberam as mesmas condições de acondicionamento após a sua chegada ao laboratório, o valor auto de HMF encontrado no mel RLE<sub>7</sub> pode estar diretamente relacionado com o aquecimento inadequado, ou com algum tipo de adulteração ou mesmo com o seu tempo de prateleira, que é o maior (08/2006), entre todas. As amostras mais recentes (NCE<sub>4</sub>, NCE<sub>5</sub> e NCE<sub>6</sub> favos), com chegada em 02/2009 apresentaram os menores valores de HMF, variando entre 2,2 e 3,7 mg.kg<sup>-1</sup> de mel. Sendo assim, os valores obtidos para o teor de HMF, quando comparados com os pré-estabelecidos (índices de qualidade) por órgãos oficiais internacionais ou pelo próprio país, podem servir para manutenção da qualidade e fiscalização do mel produzido no País.

A determinação de fenóis totais mostrou que as maiores quantidades de fenólicos foram observadas entre os méis de eucalipto, amostras NCE<sub>4</sub>, NCE<sub>5</sub> e NCE<sub>6</sub> favos, RLE<sub>7</sub>, RLE<sub>8</sub> e RLE<sub>9</sub>, em comparação com os méis de assa peixe, NCA<sub>1</sub>, NCA<sub>2</sub>, NCA<sub>3</sub> e NCA<sub>3</sub> favos. Para os teores em ácidos fenólicos individuais, destacam-se os equivalentes de ácido sirínico, com média de 173,43 mg, os ácidos *orto*-cumárico, *para*-cumárico e gálico com 141,13; 120,8 e 120,31 mg, respectivamente. Os ácidos cafeico e protocatecuico foram os que apresentaram os menores conteúdos, com valores médios de 64,13 e 76,86 mg, respectivamente.

Os teores de flavonóides totais não foram tão elevados em comparação com os de fenóis totais, como tem sido descrito para os méis brasileiros (LIANDA, 2009). Dentre os méis analisados, os maiores valores para os teores em flavonóides individuais foram observados na amostra NCA<sub>3</sub> favos (mel assa peixe em favo), com uma variação de 2,53 mg em equivalentes de quercetina a 4,99 mg em equivalentes de rutina. Esse fato sugere que a origem floral e/ou o tipo de processamento do mel, se por centrifugação ou se mantidos dentro dos próprios favos, podem contribuir significativamente para o aumento dos teores de flavonóides totais nos méis.

Em relação a atividade antioxidante, os méis de eucalipto RLE<sub>8</sub>, RLE<sub>9</sub> e RLE<sub>7</sub>, com CE<sub>50</sub> de 10,32, 11,29 e 11,45 mg/mL, respectivamente, foram os que apresentaram

os melhores resultados. Esse fato pode estar relacionado com o maior teor de fenólicos observados nessas amostras. Para os méis de assa peixe, a melhor atividade foi verificada para o mel NCA<sub>3</sub> favos, com CE<sub>50</sub> de 18,89 mg/mL. Apesar do mel NCA<sub>3</sub> favos não ter apresentado o mais alto teor de fenólicos, a sua melhor atividade antioxidante pode estar relacionada com a mais elevada quantidade de flavonóides.

Para a atividade antioxidante dos extratos em éter, as amostras NCE<sub>5</sub> favos e NCE<sub>4</sub>, com CE<sub>50</sub> de 11,24 e 18,71 µg/mL, respectivamente, apresentaram os melhores rendimentos. Esse fato não se repetiu para o extrato em acetato de etila da amostra NCE<sub>5</sub> favos, que apresentou o segundo pior resultado (CE<sub>50</sub> de 65,50 µg/mL), seguido pela amostra NCE<sub>1</sub> (CE<sub>50</sub> de 80,5 µg/mL). Resultado semelhante também foi observado para a amostra NCA<sub>3</sub> favos (CE<sub>50</sub> de 85,33 µg/ml), que teve o mais baixo rendimento entre os extratos etéreos, enquanto para o extrato em acetato de etila o CE<sub>50</sub> foi de 23,28 µg/ml. Em relação aos extratos das amostras de eucalipto (RLE<sub>7</sub>, RLE<sub>8</sub> e RLE<sub>9</sub>), não se observou grandes variações quando os extratos etéreos foram comparados aos de acetato de etila. Nesse caso, destacou-se o extrato em acetato de etila da amostra RLE<sub>7</sub>, que apresentou o melhor resultados entre todos os outros extratos, até mesmo os etéreos, com CE<sub>50</sub> de 9,01 µg/mL . A quantidade e a diferença estrutural das substâncias fenólicas podem variar em amostras de méis de diferentes floradas ou até mesmo entre amostras de mesma origem floral. Essa variação no perfil fenólico implicará diretamente nas propriedades antioxidantes do mel.

Devido às diferentes condições climáticas, edáficas e florísticas das regiões onde o mel é produzido, tem sido verificada uma grande variação em suas características físico-químicas e nas suas propriedades. Esse fato sugere que a complexidade da composição fenólica do mel exige, cada vez mais, um estudo específico e cauteloso quanto ao estabelecimento de critérios para a quantificação e identificação desses polifenóis.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEGOKE, G.O.; VIJAY, K.M.; GOPALA, K.A.G.; VARADAJ, M.C.; SAMBAIAH, K.; LOKESH, B.R. Antioxidants and lipid oxidation in food – a critical appraisal. *J Food Sci. Technol.* 1998; 35 (4): 283-398.

AHN, M-R.; KUMAZAWA, S.; USUI, Y.; NAKAMURA, J.; MATSUKA, M.; ZHU, F.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. *Food Chemistry.* 2007, 101, 1383–1392.

AL, M.L.; DANIEL, D.; MOISE, A.; BOBIS, O.; LASLO, L.; BOGDANOV, S. Physico-chemical and bioactive properties of different floral origin honeys from Romania. *Food Chemistry.* 112 (2009) 863–867.

ALCÁZAR, A.; JURADO, J.M.; PABLOS, F.; GONZÁLES, A.G.; MARTIN, M.J. HPLC determination of 2-furaldehyde and 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde in alcoholic beverages. *Microchemical Journal.* 2006, 82, 22– 28.

ALJADI, A.M. & KAMARUDDIN, M.Y. Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. *Food Chemistry.* 2004, 85, 513-518.

AL-MAMARY, M.; AL-MEERI, A.; AL-HABORI, M. Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutrition Research.* 2002, 22, 1041-1047.

ALVES, H. de M. A Diversidade Química das Plantas como Fonte de Fitofármacos. *Química Nova na Escola.* 2003, 3, 10-15.

AMIOT, M.J.; AUBERT, S.; GONNET, M.; TACCHINI, M. The phenolic compounds in honeys: preliminary study upon identification and family quantification. *Apidologie.* 1989, 20 (2), 115-125.

ANDRADE, P.; FERRERES, F.E.; AMARAL, M.T. Analysis of Honey phenolic acids by HPLC, its application to honey botanical characterization. *Journal of Liquid Chromatography & Rel. Technology.* 1997, 20 (14), 2281-2288.

APPEL, H.M.; GOVERNOR, H.L. D'ASCENZO, M.; SISKI, E.; SCHULTZ, J.C. Limitations of folin assays of foliar phenolics in ecological studies. *Journal of Chemical Ecology.* 27 (2001) 761-778.

BARRETO, L.M.R.C. Levantamento Florístico Polínico e Estudo Melissopalínológico Durante a Principal Safra da Microregião Homogênea da Zona da Mata de Viçosa, MG. Dissertação (Mestrado em Entomologia), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 74 p., 1999.

BARTH, O.M. *O Pólen no Mel Brasileiro*, Luxor, 1989, Rio de Janeiro, 150 p.

BARTH, O.M. Melissopalynology in Brazil: a review of pollen analysis of honeys, propolis and pollen loads of bees. *Scientia Agrícola*. 2004, 61, 342-350.

BERTONCELI, J. DOBERSEK, U.; JAMNK, M.; GOLOB, T. Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chemistry*. 2007, 105, 822–828.

BLASA, M.; CANDIRACCI, M.; ACCORSI, A.; PIACENTINI, M.P.; PIATTI, E. Honey flavonoids as protection agents against oxidative damage to human red blood cells. *Food Chemistry*. 2007,104, 1635–1640.

BOGDANOV, S. Honey quality and international regulatory standards: review by the international honey commission. *Bee World*. 1999, 80 (2), 61-69.

BOGDANOV, S. Harmonised Methods of the International Honey Commission. 2002.

BORGES, V.C. Alimentos funcionais: prebióticos, probióticos, fitoquímicos e simbióticos. In: Waitzberg DL. Nutrição Enteral e Parenteral na Prática Clínica. São Paulo: Atheneu; 2001.

BRANCO NETO, A. *et al.*. Aprenda a criar abelhas. *Editora Três Ltda*, Primeira edição. 80p. 1986.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science & Technology (London)*. 1995, 28(1), 25-30.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000. Regulamento técnico de identidade e qualidade do mel. Diário Oficial, Brasília, 20 de outubro de 2000, Seção 001, p.16-17.

BRASIL, Ministério da Saúde, Resolução RDC n. 39 de 21 de março de 2001b, Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/39\\_01rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/39_01rdc.htm). Acesso em: 18 abril 2009.

CAMARGO, R.C.R.; LOPES, M.T.R.; PEREIRA, F.M.; VILELA, S.L.O. Produção de Mel. Net. Piauí: julho de 2003. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mel/SPMel/index.htm>>. Acesso em 05.09.2007.

CARLINE, E.A., RODRIGUES, E.; MENDES, F.R.; NEGRI, G.; ALMEIDA, J.M.D.; TABACH, R. Da Planta Medicinal ao Medicamento. *Scientifican American Brasil*. 2007, 63, 70-77.

CARPES, S. T.; PRADO, A.; MORENO, I. A. M.; MOURÃO, G. M.; SEVERINO MATIAS DE ALENCAR, S. M. DE A. E MASSON, M. L. Avaliação do potencial

antioxidante do pólen apícola produzido na região sul do Brasil. *Química Nova*, 2007, 31 (7), 1660-1664.

CHANG, C. C., YANG, M. H. WEN, .H. M. e CHERN, J. C. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J. Food Drug Anal.* 2002. 10: 178-182.

CHEN, Y.; ZHENG, R.; JIA, Z.; JU, Y. Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. *Free Rad. Biol. Med.*,1990, 9, 19-21.

CHEN, L.; MEHTA, A.; BERENBAUM, M. ZANGERL, A.R.; ENGESETH, N.J. Honey from different floral sources as inhibitors of enzymatic browning in fruit and vegetable homogenates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000, 48, 4997-5000.

CRANE, E. *A book of honey*. Oxford University Press 1980, Oxford, U.K., 198p.

CRANE, E. The past and present importance of bee products to me. In: MIZRAHI; LENZKY. *Bee Products*. New York, Penum: 1996, 1-6.

CRANE, E. *Livro do Mel*, Livraria e Editora Nobel S.A. São Paulo, 226 p. 1996.

CAMPOS, M. da G. R. Contribuição para o estudo do mel, pólen, geléia real e própolis. *Boletim da Faculdade de Farmácia de Coimbra*. Coimbra, 1987, 11(2), 17-47.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. *Official methods of analysis*. Rome, 1990. v.3, supl.2, p.15-39.

COOK, N.C. & SAMMAN, S. Flavonoids – chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Nutritional Biochemistry*. 1996, 7, 66-76.

DA SILVA, R. F. *Dissertação de Mestrado*. Investigação de ácidos fenólicos em amostra de mel por cromatografia líquida de alta eficiência e sua aplicação na caracterização da origem floral. PPGQO-UFRRJ. 2004, p.82.

DATTA, N.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A; MARTOS, I.; FERRERES, F.; YAO, L.; SINGANUSONG, R. Flavonoids, Phenolic acids and Abscisic acid in Australian and New Zealand *Leptospermum* honeys. *Food Chemistry*. 2003, 81, 159-168.

DAYRELL, I.O.; VITAL, N.C. Comparação entre dois métodos oficiais para determinação de hidroximetilfurfural (HMF) em mel brasileiro. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 1991, 11(1), 137-141.

DE MARIA, C.A.B.; TRUGO, L.C.; COSTA, L.S.M.; ALBUQUERQUE, M.L.S.; QUINTEIRO, L.M.C.; BARTH, O.M. Determination of non-volatile compounds of different botanical origin Brazilian honeys. *Food Chemistry*. 1999, 65, 347-352.

DEWICK, P.M. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. 2° ed. Jhon Wiley & Sons, LTD, 2001, 512 p.

DEY, P.M. & HARBONE, J.B. Plant Biochemistry. London: Academic Press, 1997, p. 554.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; CAPASSO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Science**, Tucson, v. 65, n. 4, p. 337-353, 1999.

DIMITROVA, B.; GEVRENOVA, R.; ANKLAM, E. Analysis of Phenolic Acids in Honeys of Different Floral Origin by Solid-phase Extraction and High-performance Liquid Chromatography. *Phytochemical Analysis*. 2007, 18, 24–32.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Phys. Rev.*, 2002, 82, 47-95.

DURLING, L.J.K. BUSK, L.; HELLMAN, B.E. Evaluation of the DNA damaging effect of the heat-induced food toxicant 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in various cell lines with different activities of sulfotransferases. *Food and Chemical Toxicology*. 2009, 47, 880–884.

DUTHIE, G.G.; DUTHIE, S.J.; KYLE, A.M. Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. *Nutrition Research Reviews*. 2000, 13(1), 79-106.

DUTHIE, G. G.; GARDNER, P.T.; KYLE, J.A.M.; Plant polyphenols: are they the new magic bullet? *Proc Nutr Soc*. 2003, 62, 599-603.

FELSNER, M.L. *Tese de Doutorado*). Caracterização de méis monoflorais de eucalipto e de laranja do Estado de São Paulo por técnicas termoanalíticas. Universidade de São Paulo-USP, São Paulo, 2001.

FERREIRA, M., *et al.*, Os compostos fenólicos como possíveis marcadores da autenticidade dos produtos de origem vegetal, *Ciência y Tecnologia Alimentaria*. 1997, 1 (4), 56-63.

FERREIRA, I.C.F.R.; AIRES, E.; BARREIRA, J.C.M.; ESTEVINHO, L.M. Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract. *Food Chemistry*. 2009, 114, 1438–1443.

FERRERES, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; GIL, M.I.; TOMÁS-LORENTE, F. An HPLC technique for flavonoid analysis in honey. *Journal Science Food Agric*. 1991, 56, 49-56.

FERRERES, F.; ORTIZ, A.; SILVA, C.; GARCIA-VIGUERA, C.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; TOMÁS-LORENTE, F. Flavonoids of “La Alcarria” honey – a study of their botanical origin. *Zeitschrift-fuer Lebensmittel Untersuchung und Forschung*. 1992, 194, 139-143.

FERRERES, F.; GARCIA-VIGUERA, C.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; TOMÁS LORENTE, F. Hesperetin: a marker of the floral origin of citrus honey. *Journal Science Food Agric.* 1993, 61, 121-123.

FERRERES, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; GINER, J.M. A comparative study of hesperetin and methyl anthranilate as markers of the floral origin of citrus honey. *Journal Science Food Agric.* 1994, 65, 371-372.

FERRERES, F.; BLAZQUEZ, M.A.; GIL, M.I.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A. Separation of honey flavonoids by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal Chromatography A.* 1994a, 669(1/2), 268-274.

FERRERES, F.; ANDRADE, P.; GIL, M.I.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A. Floral nectar phenolics as biochemical markers for the botanical origin of heather honey. *Z. Lebensm Unters Forsch.* 1996a, 202, 40-44.

FIORANI, M.; ACCORSI, A.; BLASA, M.; PIATTI, E. Flavonoids from Italian Multifloral Honeys Reduce the Extracellular Ferricyanide in Human Red Blood Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2006, 54, 8328-8334.

Folin, O. & W. Denis. On phosphotungstic phosphomolybdic compounds as color reagents. *J. Biol. Chem.* 1912, 12:239-43.

FRÍAS, I.; HARDISSON, A. Estudio de los parámetros analíticos de interés en la miel. II: Azúcares, cenizas y contenido mineral y color. *Alimentaria.* 1992, 28 (235), 41-43.

FUKUDA, M.; KOBAYASHI, K.; HIRONO, Y.; MIYAGAWA, M.; ISHIDA, T.; EJIJOGU, E.C.; SAWAI, M.; PINKERTON, K.E.; TAKEUCHI, M. Jungle Honey Enhances Immune Function and Antitumor Activity. *Evidence-based Complementary and alternative medicine.* 2009.

FUENTE, E. de la.; VALENCIA-BARRERA, R.M.; MARTÍNEZ-CASTRO, I.; SANZ, J. Occurrence of 2-hydroxy-5-methyl-3-hexanone and 3-hydroxy-5-methyl-2-hexanone as indicators of botanic origin in eucalyptus honeys. *Food Chemistry.* 2007, 103, 1176–1180.

GALLARDO-CHACON, J.J.; CASELLES, M.; ISQUIERDO-PULIDO, M.; RIUS, N.; Inhibitory activity of monofloral and multifloral honeys against bacterial pathogens. *Journal of Apicultural Research.* 2008, 47, 131-136.

GÓMEZ-CARAVACA, A. M.; GÓMEZ-ROMERO, M.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2006, 41, 1220–1234.



GUO, Q.; ZHAO, B.; PACKER, L. Electron spin resonance study of free radicals formed from a procyanidin-rich pine (*Pinus maritima*) bark extract, pycnogenol. *Free Rad. Biol. Med.*, 1999, 27, 1308 – 1312.

GROSSO, G. S.; CARVAJAL, I. L. C. e PRINCIPAL, J. Perfil de flavonoides e índices de oxidación de algunos propóleos colombianos. *Zootecnia Trop.*, 2007, 25(2), 95-102.

GUYOT, C.; SCHEIRMAN, V.; COLLIN, S. Floral origin markers of heather honeys: *Calluna vulgaris* and *Erica arborea*. *Food Chemistry*. 1999, 64, 3-11.

HAGHIAC, M. & WALLE, T. Quercetin induces necrosis and apoptosis in SCC-9 oral cancer cells. *Nutrition and cancer*. 2005, 53, 220-231.

HARBORNE, J.B. Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plant analysis. Londres. Chapman and Hall. 1984, p. 288.

HELDT, H.W. Plant Biochemistry and Molecular Biology. 1 ed. New York: Oxford University Press, 1997, p. 522.

HERTOG, M.G.L.; HOLLMAN, P.C.H.; VENEMA, D.P. Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1992, 40, 1591-1598.

INDAP, M.A.; BHOSLE, S.C.; SHINDE, A.D.; BARKUME, M.S.; INGLE, A.D. Tumour response to quercetin, a bioflavonoid with some promises in therapies. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2006, 68, 570-574.

KANDASWAMI, C. LEE, L.T. ; LEE, P.P.; HWANG, J.J.; KE, F.C.; HUANG, Y.T.; LEE, M.T. The antitumor activities of flavonoids. *In Vivo*. 2005, 19 (5), 895-909.

KENJERIC, D.; MANDIC, M.L.; PRIMORAC, L.; CACIC, F. Flavonoid pattern of sage (*Salvia officinalis* L.) unifloral honey. *Food Chemistry*. 2008, 110, 187–192.

KOMATSU, S.S., *et al.* Análises Físico-Químicas de Amostras de Méis de Flores Silvestres, de Eucalipto e de Laranjeira, Produzidos Por *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera, Apidae) no Estado de São Paulo. 2. Conteúdo de Açúcares e de Proteína. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 2002, 22(2), 143-146.

KOSALEC, M., BAKMAZ, M., PEPELJNJAK, S. e KNE, S.V. Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. *Acta Pharm.* 2004, 54, 65-72.

KÜÇÜK, M.; KOLAYLI, S.; KARAOGLU, S.; ULUSOY, E.; BALTACI, C.; CANDAN, F. Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chemistry*. 2007, 100, 526-534.

LEGLER, S. Inspeção e controle da qualidade do mel. SEMINÁRIO ESTADUAL DE APICULTURA, 5.; ENCONTRO DE APICULTORES DO MERCOSUL, 1., 2000, São Borja, RS.

LEGLER, S. [www.com.br/apicultura/pesquisas/inspeção\\_mel](http://www.com.br/apicultura/pesquisas/inspeção_mel), 01.doc. 2004.

LEWKOWSKI, J. Synthesis, chemistry and applications of 5-hydroxymethylfurfural and its derivatives. ARKIVOC, 2001 (i) 17-54. Disponível em <<http://www.arkat-usa.org/get-file/20028>>. Acesso em 21/06/2010.

LIANDA, R.L.P. *Dissertação de Mestrado*. Caracterização de mel de *Apis mellifera* pelo seu perfil em substâncias fenólicas por cromatografia líquida de alta eficiência e avaliação da atividade biológica. PPGQO-UFRRJ. 2004, p.142.

LIANDA, R.L.P. & CASTRO, R.N. Isolamento e identificação da morina em mel brasileiro de *Apis mellifera*. *Química Nova*. 2008, 31(6), 1472-1475.

LIANDA, R.P.L. *Tese de Doutorado*. Caracterização de mel de *Apis mellifera* pelo seu perfil em substâncias fenólicas por cromatografia líquida de alta eficiência e avaliação da atividade biológica PPGQ-UFRRJ, 2009, p.142.

LURLINA, M.O.; SAIZ, A.I.; FRITZ, R.; MANRIQUE, G.D. Major flavonoids of Argentinean honeys. Optimisation of the extraction method and analysis of their content in relationship to the geographical source of honeys. *Food Chemistry*. 2009, 115, 1141–1149.

MABRY, T. J., MARKHAM, K.R. e THOMAS, M.B. *The Systematic Identification of Flavonoids*. Springer-Verlag. New York (USA), 1970.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2004, 79, 727-747.

MANN, J. *Secondary Metabolism*, Claredon Press, Oxford, 8, 1987.

MARANO, L.A. & Takahashi, C.S. Efeito protetor do flavonóide isorhaminetina sobre danos genéticos causados pela doxorubicina em linfócitos do sangue periférico humano. Resumo do 55º Congresso Brasileiro de Genética, 09 de 2009, Águas de Lindóia, São Paulo.

MARKHAN, K.R. *Techniques of flavonoid identification*. London: Academic Press, 1982, p. 113.

MARCHINI, L.C. *Tese (Livre Docência)*. Caracterização de amostras de méis de *Apis mellifera* L. 1978 (Hymenoptera: Apidae) do Estado de São Paulo, baseada em aspectos físico-químicos e biológicos. Piracicaba-SP. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. 2001. 83p

MARCHINI, L.C. ; MORETI, A.C.DE C.C. ; OTSUK, I.P. Análise de Grupamento, com Base na Composição Físico-Química, de Amostras de Méis Produzidos por *Apis Mellifera* L. no Estado de São Paulo. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 2005, 25(1), 8-17.

MATIAS, A.S. *et al.*. Estudo fitoquímico da origem botânica da própolis e avaliação da composição química de mel de *Apis mellifera* africanizada de diferentes regiões do Brasil. Campinas, S.P. 2002.

MARTOS, I.; COSENTINI, M.; FERRERES, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A. Flavonoid composition of Tunisian honeys and propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1997, 45(8), 2824-2829.

MARTOS, I.; FERRERES, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A. Identification of flavonoids markers for the botanical origin of *Eucalyptus* honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000, 48, 1498-1502.

MARTOS, I.; FERRERES, F.; YAO, L.H. ; D'ARCY, B.R.; CAFFIN, N.; TOMÁSBARBERÁN, F.A. Flavonoids in monospecific *Eucalyptus* honeys from Australia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000a, 48, 4744-4748.

MEDA, A.; LAMIEN, C.E.; ROMITO, M.; MILLOGO, J.; NACOULMA, O.G. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkin Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*. 2005, 91(3), 571-577.

MELO, Z.F.N.; DUARTE, M.E.M. ; MATA, M.E.R.M.C. ; Alterações do Hidroximetilfurfural e da Atividade Diastásica em Méis de Abelha em Diferentes Condições de Armazenamento. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*. Campina Grande, 2003, 5 (1), 89-99.

MENSOR, L.L.; MENEZES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS, A.S.; DOS SANTOS, T.C.; COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy Research*. 2001, 15(2), 127-130.

MERKEN, H.M. & GARY, R.B. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography : a Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000, 48(3), 577- 599.

MOLAN, P.C. The antibacterial activity of honey. The nature of the antibacterial activity. *Bee World*. 1992, 73(1), 5-28.

MOLAN, P. Honey: antimicrobial actions and role in disease management. *New Strategies Combating Bacterial Infection*. 2009, 229-253.

MONTAGNI, S.M.S. *Dissertação de Mestrado*. Identificação de Substâncias Fenólicas em Mel e Pólen Apícola de Diferentes Origens Botânicas e Geográficas. PPGQO-UFRRJ. 2005, p. 140.

MOREIRA, R.F.A. & DE MARIA, C.A.B. Glicídios no mel. *Química Nova*. 2001, 24 (4), 516-525.

MORETI, A.C.C.C. CARVALHO, C.A.L. DE.; MARCHINI, L.C.; OLIVEIRA, P.C.F. DE. Espectro Polínico de Amostras de Amostras de Méis de *Apis mellifera* L. Bragantia, Campinas, 2000, 59 (1), 1-6.

MORETI, A.C.C.C. Pólen: alimento protéico para as abelhas - complemento alimentar para o homem. <http://www.iz.sp.gov.br/artigos/augustaPolen.html>. Acesso em 04/10/2004.

MUNÕZ, O.; COPAJA, S.; SPEISKY, H.; PEÑA, R.C.; MONTENEGRO, G. Contenido de flavonoides y compuestos fenolicos de mieles chilenas e indice antioxidante. *Química Nova*. 2007, 30 (4), 848-851.

NAGY M. e D. GRANCAI. Colorimetric determination of flavanones in propolis. *Pharmazie*. 1996. 51: 100-101.

NOGUEIRA NETO, P. Vida e Criação de Abelhas Indígenas sem Ferrão. Ed. Nogueirapis, São Paulo, 1997, 445 p.

NIJVELDT, R.J.; NOOD, E.V.; HOORN, D.E.C.V.; BOELEN, P.G.; NORREN, K.V.; LEEUWEN, P.A.M.V. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal Clinical Nutrition*. 2001, 74, 418-425.

Official Methods of Analysis of the AOAC, Seventh edition, 1950.

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

PAGANGA, G.; AL-HASHIM, H.; KHODR, H.; SCOTT, B.C.; ARUOMA, O.I.; HIDER, R.C.; HALLIWELL, B.; RICE-EVANS, C.A. Mechanisms of antioxidant activities of quercetin and catechin. *Redox Report*. 1996, 2(6), 359-364.

PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.; AGUIAR, C.L. Estudo da composição fenólica de méis e própolis oriundos de mesma colméia. *Revista Mensagem Doce*. 2003, São Paulo - SP, p. 1-11.

PEREIRA, M. A. *Monografia*. Perfil cromatográfico das substâncias fenólicas presentes em extratos de mel de assa peixe e avaliação de seu poder antioxidante. DEQUIM-UFRRJ, 2010, p.67.

PÉREZ, R. A.; IGLESIAS, M. T.; PUEYO, E.; GONZÁLEZ, M.; DE LORENZO, C. Amino Acid Composition and Antioxidant Capacity of Spanish Honeys. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007, 55, 360-365.

PERSANO ODDO, L. & RICCIARDELLI D'ALBORE, G. Nomenclatura melissopolinológica. *Apicultura*. 1989, 5, 63-72.

PICHICHERO, E.; CANUTI, L.; CANINI, A. Characterisation of the phenolic and flavonoid fractions and antioxidant power of Italian honeys of different botanical origin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2009, 89, 609-616(8).

POLLONIO, M.A.R. Alimentos funcionais: as recentes tendências e os envolvidos no consumo. *Higiene Alimentar*. 2000, 14, 26-31.

POPOVA, M.P.; BANKOVA, V.S.; BOGDANOV, S.; TSVETKOVA, I.; NAYDENSKI, C.; MARCAZZAN, G.L.; SABATINI, A.G. Chemical characteristics of poplar type propolis of different geographic origin. *Apidologie*. 2007, 38, 306-311.

PYRZYNSKA, K. & BIESAGA, M. Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. *Trends in Analytical Chemistry*. 2009, 28, 7, 893-902.

RACOWSKI, I.; CIANGA SILVAS, F.P.; TAKUSHI, D.T.T.; DA SILVA, D.W.G.; MIRANDA, P. dos S. Ação antimicrobiana do mel em leite fermentado. *Revista Analytica*. 2007, 30, 106-115.

RESENDE, R. B. A contribuição da Rede Apis na implantação da apicultura sustentável. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA. Belo Horizonte-MG. Anais XVII Congresso Brasileiro de Apicultura: Confederação Brasileira de apicultura, 2008.

RIBEIRO-CAMPOS, M.G.; SABATIER, S.; AMIOT, M.J.; AUBERT, S. Characterization of flavonoids in three hiveproducts: bee pollen, própolis and honey. *Planta Médica*. 1990, 56, 580-581.

SABATIER, S.; AMIOT, M.J.; TACCHINI, M.; AUBERT, S. Identification of flavonoids in sunflower honey. *Journal of Food Science*. 1992, 57 (3), 773-777.

SAIJA, A.; SCALESE, M.; LANZA, M.; MARZULLO, D.; BONINA, F.; CASTELLI, F. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. *Free Rad. Biol. Med.*, 1995, 19, 4, 481- 486.

SALINAS, F.; ESOINOSA-MANSILLA, A.; BERZAS-VEVADO, J.J. Flow-injection determination of HMF in honey by Winkler method. *Journal of Analytical Chemistry*. 1991, 340 (4), 250-252.

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

SCALBERT, A. Quantitative methods for the estimation of tannins in plant tissues. In: HEMINGWAY, R.W., LAKS, P.E. Plant Polyphenols. New York: Plenum Press, 1992, 259-280.

SEELEY, T.D. Ecologia das Abelhas: um estudo de adaptação na vida social. Tradução de Osowski, C.A. Porto Alegre: Paixão, 256 p., 2006.

- SEEMANN, P. & NEIRA, M. Tecnología de la producción apícola. Valdivia: Universidad Austral de Chile/ Facultad de Ciencias Agrarias Empaste, 1988. 202p.
- SHUZHONG, Z.; YANG, X.; MORRIS, E. Flavonoids Are Inhibitors of Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2)-Mediated Transport. *Molecular Pharmacology*. 65 (2004) 1208–1216.
- SINGLETON, V. L., & ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 1965, (16), 144–158.
- SOCHA, R.; JUSZCAK, L.; PIETRZYK, S.; FORTUNA, T. Antioxidant activity and phenolic composition of herb honeys. *Food Chemistry*. 2009, 113, 568–574.
- SODRÉ, G. da S. *Dissertação de Mestrado*. Características físico-químicas e análises polínicas de amostras de méis de *Apis mellifera* L., 1758 (HYMENOPTERA: APIDAE) da região litoral norte do Estado da Bahia. Piracicaba, SP. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. 2000. 83p.
- SOUZA, D.C. Apicultura: Manual do Agente de Desenvolvimento Rural. 2. ed., 186 p., rev. Brasília, Sebrae, 2007.
- SURH, Y.J. MILLER, J.A.; TANNENBAUM, S.R. 5-Sulfoxymethylfurfural as a possible ultimate mutagenic and carcinogenic metabolite of the Maillard reaction product, 5-hydroxymethylfurfural. *Carcinogenesis*. 1994, 15 (10), 2375-2377.
- TAORMINA, P.J.; NIERMIRA, B.A.; BEUCHAT, L.R. Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. *Int. Journal Food Microbiology*. 2001, 69, 217-225.
- TERRAB, A.; DÍEZ, M.J.; HEREDIA, F.J. Palynological, physico-chemical and colour characterization of Moroccan honeys: I. River red gum (*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh) honey. *International Journal of Food Science and Technology*. 2003, 38, 379-386.
- TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; FERRERES, F.; BLÁZQUEZ, A.; GARCÍA-VIGUERA, C.; TOMÁS-LORENTE, F. High-performance liquid chromatography of honey flavonoids. *Journal of Chromatography*. 1993, 634, 41-46.
- TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; MARTOS, I.; FERRERES, F.; RADOVIC, B.S.; ANKLAM, E. HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys *Journal Science Food Agric*. 2001, 81, 485-496.
- TRUCHADO, P.; MARTOS, I.; BORTOLOTTI, L.; SABATINI, A.G.; FERRERES, F.; TOMAS-BARBERAN, F.A. Nectar Flavonol Rhamnosides Are Floral Markers of Acacia (*Robinia pseudacacia*) Honey. *J. Agric. Food Chem*. 2008, 56, 8815–8824.
- TSIAPARA, A.V.; JAAKKOLA, M.; CHINO, I.; GRAIKOU, K.; TOLONEN, T.; VIRTANEN, V.; MOUTSATSOU, P. Bioactivity of Greek honey extracts on breast

cancer (MCF-7), prostate cancer (PC-3) and endometrial cancer (Ishikawa) cells: Profile analysis of extracts. *Food Chemistry*. 2009, 116, 702–708.

TSIMOGIANNIS, D.I. & OREOPOULOU, V. The contribution of flavonoid C-ring on the DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3',4'-hydroxy substituted members. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2006, 7, 140-146.

TUBEROSO, C.I.G.; BIFULCO, E.; JERKOVI, I.; CABONI, P.; CABRAS, P.; FLORIS, I. Methyl Syringate: A Chemical Marker of Asphodel (Asphodelus microcarpus Salzm. et Viv.) Monofloral Honey. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, 3895–3900

TURNER, F.J. Hydrogen peroxide and Other Disinfectants – 3rd ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 1983.

VÁZQUEZ, L.C. L.; MAROTO-DÍAZ, M.C. GONZÁLES-VIÑAS, M.A.; PÉREZ-COELLO, M.S. Differentiation of monofloral citrus, rosemary, eucalyptus, lavender, thyme and heather honeys based on volatile composition and sensory descriptive analysis. *Food Chemistry*. 112 (2009) 1022–1030.

VERISSIMO, M.T. da L. Saiba o que é HMF. *Apicultura no Brasil*. 1988, 4 (24), p. 31.

WAHDAN, H. Causes of the antimicrobial activity of honey. *Infection* 1998, 26, 26.

WHITE, J. W. Physical characteristics of honey. In: CRANE, E. Honey a comprehensive survey. London: Heinemann, 1975.

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

WOISKY, R. G. *Dissertação de Mestrado*. Métodos de controle químico de amostras de própolis. Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP. 1996, p.74.

WOISKY, R. G. & SALATINO, A. Analysis of propolis: parameters and procedures for chemical quality control. *Journal Apiculture Research*. 1998, 37 (2), 99-105.

YAO, L.; JIANG, Y.; SINGANUSONG, R.; DATTA, N.; RAYMONT, K. Phenolic acids and abscisic acid in Australian *Eucalyptus* honeys and their potential for floral authentication. *Food Chemistry*. 2004, 86, 169-177.

YAO, L.; JIANG, Y.; D'ARCY, B.; SINGANUSONG, R.; DATTA, N.; CAFFIN, N.; RAYMONT, K. Quantitative high-performance liquid chromatography analyses of flavonoids in Australian *Eucalyptus* honeys. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004a, 52, 210-214.

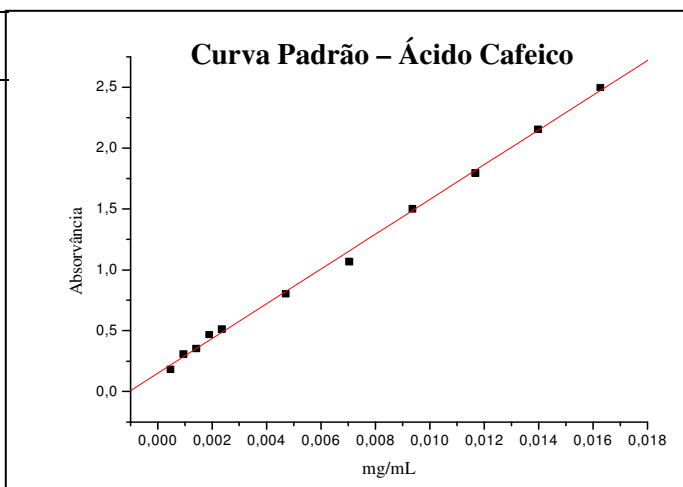
YAO, L.; JIANG, Y.; SINGANUSONG, R.; DATTA, N.; RAYMONT, K. Phenolic acids in Australian Melaleuca, Guioa, Lophostemon, Banksia and Helianthus honeys and their potential for floral authentication. *Food Research International*. 2005, 38, 651–658.

# **ANEXOS**



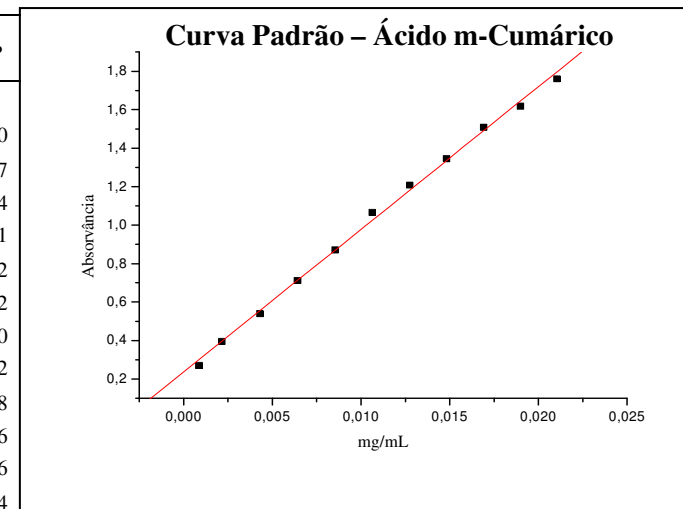
Valores obtidos a partir da solução padrão de **ácido caféico** em diferentes concentrações após o ensaio em triplicata com reagente de Folin-Denis.

Volume (μL)	[ ] mg/mL	Absorvância (UV-760nm)			Média Abs. ± D.P
		1°	2°	3°	
2	0,00047	0,177	0,185	0,189	0,184±0,006
4	0,00094	0,305	0,310	0,314	0,310±0,005
6	0,00141	0,333	0,355	0,371	0,353±0,019
8	0,00189	0,470	0,452	0,482	0,468±0,015
10	0,00236	0,525	0,511	0,508	0,515±0,009
20	0,00470	0,816	0,815	0,782	0,804±0,019
30	0,00703	1,056	1,068	1,084	1,069±0,014
40	0,00936	1,553	1,479	1,481	1,504±0,042
50	0,01167	1,755	1,832	1,810	1,799±0,040
60	0,01397	2,154	2,221	2,096	2,157±0,063
70	0,01627	2,500	2,500	2,500	2,500±0,000



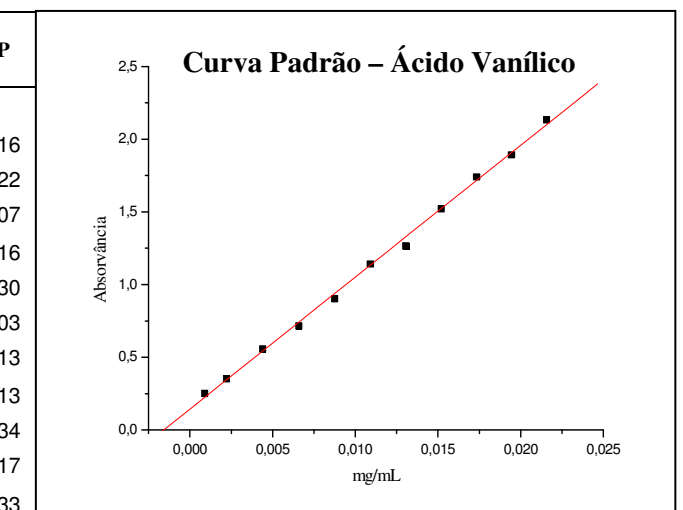
Valores obtidos a partir da solução padrão de **ácido m-cumárico** em diferentes concentrações após o ensaio em triplicata com reagente de Folin-Denis.

Volume (μL)	[ ] mg/mL	Absorvância (UV-760nm)			Média Abs. ± D.P
		1°	2°	3°	
4	0,00086	0,260	0,274	0,280	0,271±0,010
6	0,00129	0,320	0,317	0,272	0,303±0,027
10	0,00215	0,394	0,391	0,399	0,395±0,004
20	0,00428	0,547	0,528	0,548	0,541±0,011
30	0,00641	0,705	0,727	0,706	0,713±0,012
40	0,00852	0,901	0,878	0,838	0,872±0,032
50	0,01063	1,050	1,089	1,063	1,067±0,020
60	0,01273	1,195	1,215	1,216	1,209±0,012
70	0,01482	1,321	1,327	1,389	1,346±0,038
80	0,01690	1,506	1,503	1,514	1,508±0,006
90	0,01897	1,590	1,627	1,640	1,619±0,026
100	0,02104	1,770	1,780	1,734	1,761±0,024



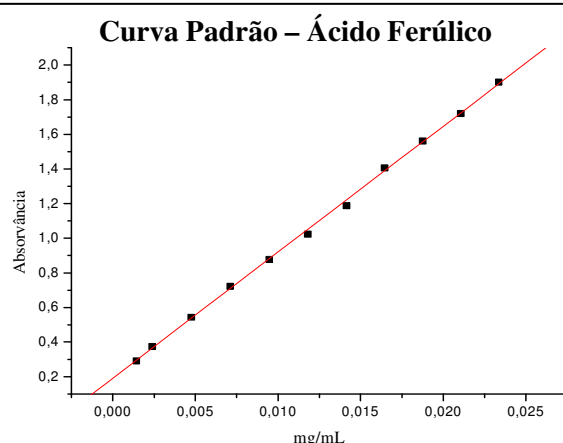
Valores obtidos a partir da solução padrão de **ácido vanílico** em diferentes concentrações após o ensaio em triplicata com reagente de Folin-Denis.

Volume (μL)	[ ] mg/mL	Absorvância (UV-760nm)			Média Abs. ± D.P
		1°	2°	3°	
4	0,00088	0,267	0,253	0,235	0,252±0,016
10	0,00220	0,329	0,358	0,373	0,353±0,022
20	0,00439	0,553	0,566	0,559	0,559±0,007
30	0,00656	0,712	0,702	0,733	0,716±0,016
40	0,00873	0,871	0,907	0,931	0,903±0,030
50	0,01089	1,140	1,140	1,145	1,142±0,003
60	0,01304	1,257	1,283	1,265	1,268±0,013
70	0,01518	1,528	1,508	1,531	1,522±0,013
80	0,01731	1,781	1,722	1,723	1,742±0,034
90	0,01944	1,876	1,896	1,909	1,894±0,017
100	0,02155	2,096	2,154	2,154	2,135±0,033



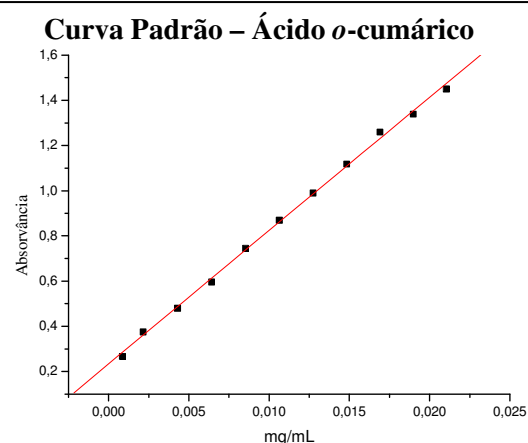
Valores obtidos a partir da solução padrão de **ácido ferúlico** em diferentes concentrações após o ensaio em triplicata com reagente de Folin-Denis.

Volume (µL)	[ ] mg/mL	Absorvância (UV-760nm)			Média Abs. ± D.P
		1°	2°	3°	
6	0,00143	0,294	0,285	0,295	0,291±0,005
10	0,00239	0,377	0,375	0,372	0,375±0,002
20	0,00475	0,559	0,532	0,541	0,544±0,014
30	0,00711	0,715	0,725	0,728	0,723±0,007
40	0,00946	0,875	0,886	0,875	0,879±0,006
50	0,01180	0,989	1,040	1,039	1,023±0,029
60	0,01413	1,191	1,124	1,253	1,189±0,065
70	0,01645	1,391	1,421	1,407	1,406±0,015
80	0,01876	1,559	1,554	1,572	1,562±0,009
90	0,02106	1,716	1,731	1,715	1,721±0,009
100	0,02334	1,900	1,900	1,894	1,903±0,011



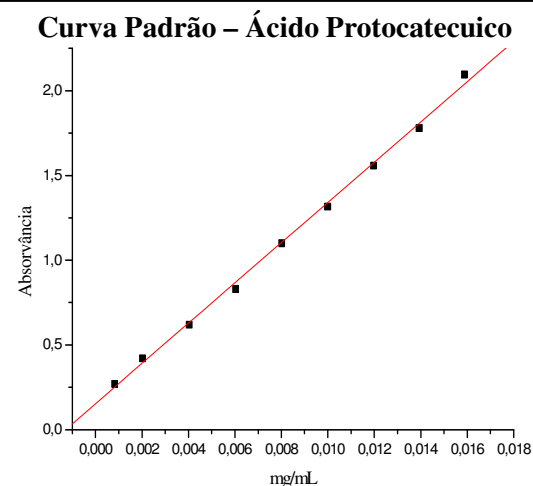
Valores obtidos a partir da solução padrão de **ácido o-cumárico** em diferentes concentrações após o ensaio em triplicata com reagente de Folin-Denis.

Volume (µL)	[ ] mg/mL	Absorvância (UV-760nm)			Média Abs. ± D.P
		1°	2°	3°	
4	0,00086	0,267	0,270	0,265	0,267±0,003
10	0,00215	0,394	0,358	0,376	0,376±0,018
20	0,00428	0,480	0,480	0,480	0,480±0,000
30	0,00641	0,596	0,596	0,600	0,597±0,002
40	0,00852	0,749	0,741	0,749	0,746±0,005
50	0,01063	0,869	0,871	0,871	0,870±0,001
60	0,01273	0,975	0,999	0,997	0,990±0,013
70	0,01482	1,116	1,121	1,120	1,119±0,003
80	0,01690	1,260	1,259	1,261	1,260±0,001
90	0,01897	1,331	1,347	1,338	1,339±0,008
100	0,02103	1,479	1,452	1,420	1,450±0,030



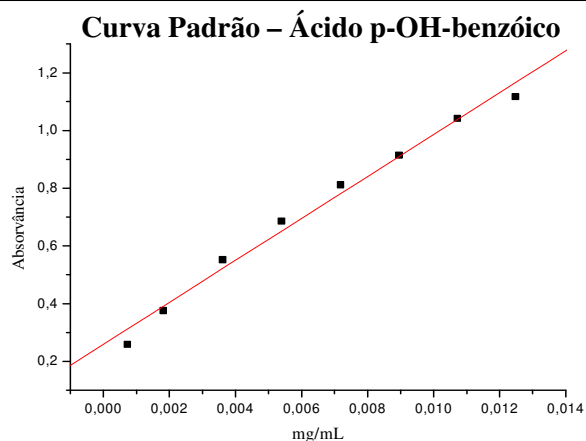
Valores obtidos a partir da solução padrão de **ácido protocatecuico** em diferentes concentrações após o ensaio em triplicata com reagente de Folin-Denis.

Volume (µL)	[ ] mg/mL	Absorvância (UV-760nm)			Média Abs. ± D.P
		1°	2°	3°	
4	0,00081	0,280	0,269	0,265	0,271±0,008
10	0,00202	0,463	0,412	0,395	0,423±0,035
20	0,00402	0,633	0,618	0,611	0,621±0,011
30	0,00602	0,824	0,826	0,844	0,831±0,011
40	0,00801	1,128	1,092	1,086	1,102±0,023
50	0,00999	1,284	1,338	1,331	1,318±0,029
60	0,01195	1,557	1,554	1,569	1,560±0,008
70	0,01391	1,783	1,778	1,781	1,781±0,003
80	0,01587	2,096	2,096	2,096	2,096±0,000



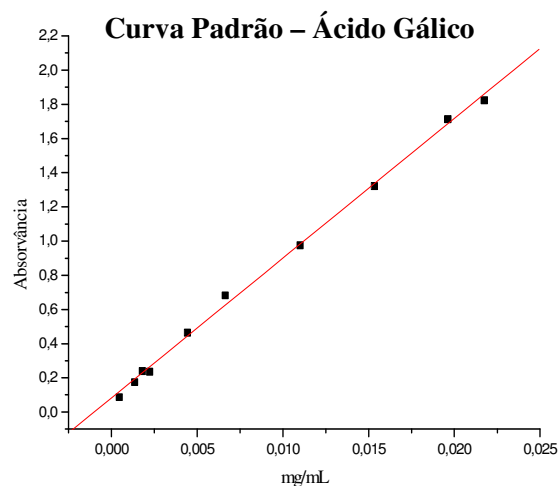
Valores obtidos a partir da solução padrão de **ácido p-OH-benzóico** em diferentes concentrações após o ensaio em triplicata com reagente de Folin-Denis.

Volume (µL)	[ ] mg/mL	Absorvância (UV-760nm)			Média Abs. ± D.P
		1°	2°	3°	
4	0,00072	0,258	0,262	0,259	0,260±0,0021
10	0,00181	0,368	0,398	0,365	0,377±0,0182
20	0,00360	0,560	0,524	0,575	0,553±0,0262
30	0,00539	0,715	0,704	0,641	0,687±0,0399
40	0,00717	0,797	0,825	0,817	0,813±0,0144
50	0,00895	0,915	0,929	0,903	0,916±0,0130
60	0,01071	1,042	1,043	1,043	1,043±0,0006
70	0,01247	1,122	1,103	1,128	1,118±0,0131



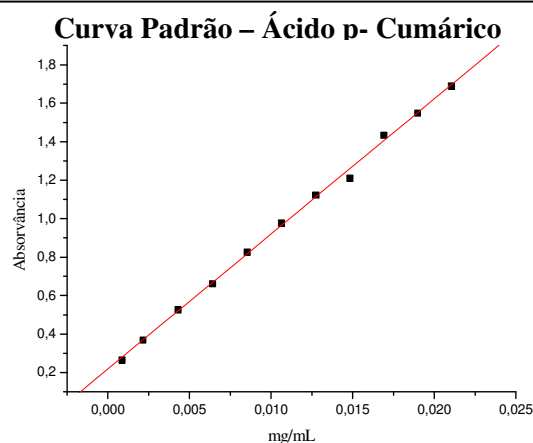
Valores obtidos a partir da solução padrão de **ácido gálico** em diferentes concentrações após o ensaio em triplicata com reagente de Folin-Denis.

Volume (µL)	[ ] mg/mL	Absorvância (UV-760nm)			Média Abs. ± D.P
		1°	2°	3°	
2	0,00044	0,087	0,094	0,085	0,089±0,005
6	0,00133	0,168	0,177	0,183	0,176±0,007
8	0,00178	0,233	0,254	0,237	0,241±0,011
10	0,00221	0,245	0,244	0,224	0,238±0,012
20	0,00443	0,451	0,471	0,476	0,466±0,013
30	0,00662	0,679	0,694	0,679	0,684±0,009
50	0,01099	0,957	0,967	1,008	0,977±0,027
70	0,01531	1,292	1,325	1,352	1,323±0,030
90	0,01960	1,661	1,73	1,752	1,714±0,048
100	0,02174	1,786	1,825	1,866	1,826±0,040



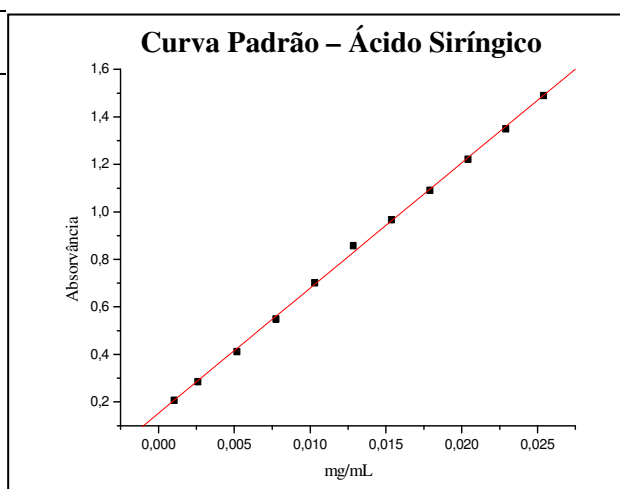
Valores obtidos a partir da solução padrão de **ácido p-cumárico** em diferentes concentrações após o ensaio em triplicata com reagente de Folin-Denis.

Volume (µL)	[ ] mg/mL	Absorvância (UV-760nm)			Média Abs. ± D.P
		1°	2°	3°	
4	0,00086	0,275	0,264	0,260	0,266±0,008
10	0,00215	0,370	0,369	0,369	0,369±0,001
20	0,00428	0,522	0,533	0,526	0,527±0,006
30	0,00641	0,636	0,679	0,675	0,663±0,024
40	0,00853	0,821	0,829	0,832	0,827±0,006
50	0,01063	0,981	0,976	0,978	0,978±0,003
60	0,01273	1,115	1,128	1,127	1,123±0,007
70	0,01482	1,125	1,251	1,257	1,211±0,074
80	0,01690	1,458	1,427	1,416	1,434±0,022
90	0,01897	1,546	1,544	1,557	1,549±0,007
100	0,02104	1,687	1,692	1,690	1,690±0,002



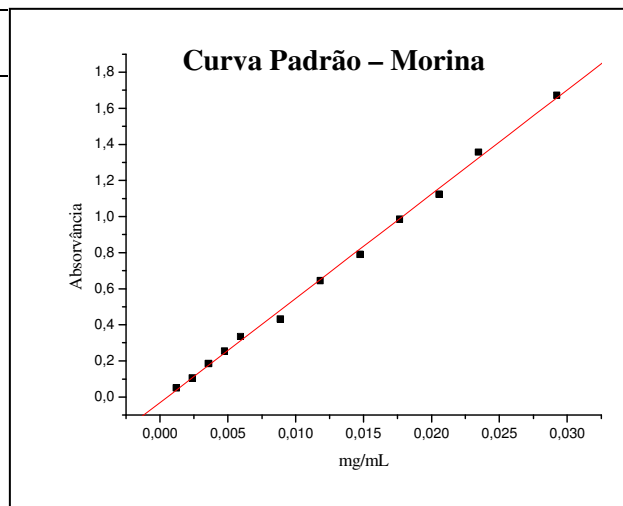
Valores obtidos a partir da solução padrão de **ácido siríngico** em diferentes concentrações após o ensaio em triplicata com reagente de Folin-Denis.

Volume (µL)	[ ] mg/mL	Absorvância (UV-760nm)			Média Abs. ± D.P
		1°	2°	3°	
4	0,00104	0,209	0,206	0,208	0,208±0,002
10	0,00259	0,286	0,284	0,289	0,286±0,003
20	0,00517	0,414	0,412	0,410	0,412±0,002
30	0,00774	0,555	0,540	0,555	0,550±0,009
40	0,01029	0,692	0,691	0,726	0,703±0,020
50	0,01284	0,863	0,853	0,864	0,860±0,006
60	0,01537	0,994	0,940	0,971	0,968±0,027
70	0,01789	1,109	1,078	1,089	1,092±0,016
80	0,02041	1,180	1,237	1,249	1,222±0,037
90	0,02291	1,353	1,351	1,347	1,350±0,003
100	0,02540	1,505	1,488	1,477	1,490±0,014



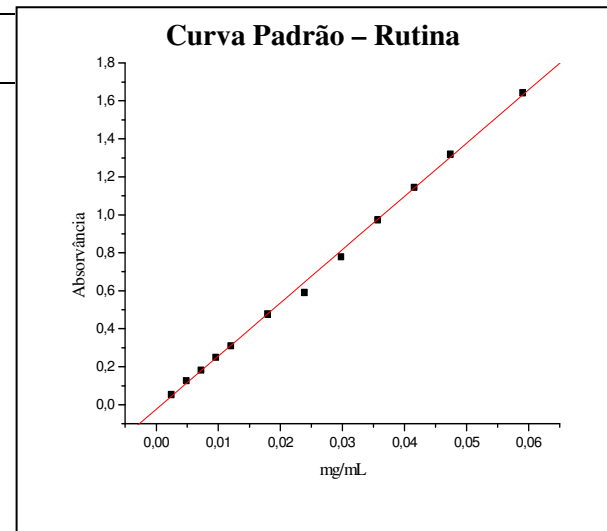
Valores obtidos a partir da solução padrão de **morina** em diferentes concentrações após o ensaio em triplicata com cloreto de alumínio a 2%.

Volume (µL)	[ ] mg/mL	Absorvância (UV-760nm)			Média Abs. ± D.P
		1°	2°	3°	
2	0,00119	0,049	0,057	0,046	0,051±0,006
4	0,00237	0,113	0,105	0,101	0,106±0,006
6	0,00356	0,193	0,183	0,185	0,187±0,005
8	0,00474	0,267	0,256	0,241	0,255±0,013
10	0,00592	0,319	0,356	0,334	0,336±0,019
15	0,00887	0,438	0,429	0,431	0,433±0,005
20	0,01180	0,635	0,653	0,649	0,646±0,009
25	0,01473	0,785	0,797	0,792	0,791±0,006
30	0,01764	0,994	0,978	0,985	0,986±0,008
35	0,02055	1,083	1,134	1,158	1,125±0,038
40	0,02345	1,360	1,363	1,350	1,358±0,007
50	0,02921	1,679	1,684	1,656	1,673±0,015



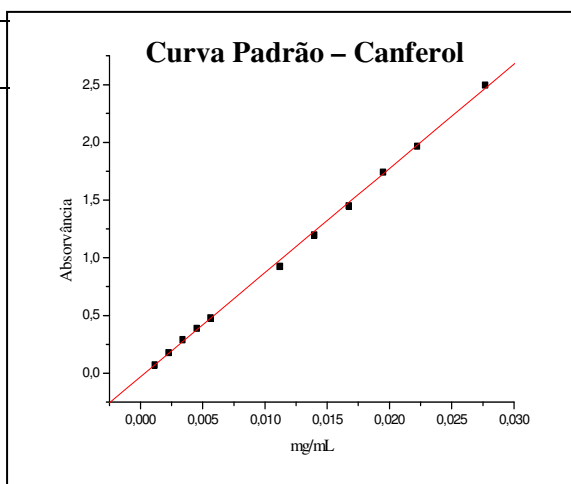
Valores obtidos a partir da solução padrão de **rutina** em diferentes concentrações após o ensaio em triplicata com cloreto de alumínio a 2%.

Volume (µL)	[ ] mg/mL	Absorvância (UV-760nm)			Média Abs. ± D.P
		1°	2°	3°	
2	0,00240	0,059	0,058	0,045	0,054±0,008
4	0,00479	0,130	0,130	0,120	0,127±0,006
6	0,00718	0,191	0,179	0,179	0,183±0,007
8	0,00957	0,241	0,260	0,251	0,251±0,010
10	0,01196	0,307	0,319	0,306	0,311±0,007
15	0,01791	0,482	0,485	0,470	0,479±0,008
20	0,02383	0,596	0,592	0,589	0,592±0,004
25	0,02974	0,762	0,784	0,794	0,780±0,016
30	0,03563	0,993	0,968	0,964	0,975±0,016
35	0,04150	1,136	1,142	1,158	1,145±0,011
40	0,04736	1,324	1,321	1,318	1,321±0,003
50	0,05900	1,619	1,668	1,645	1,644±0,025



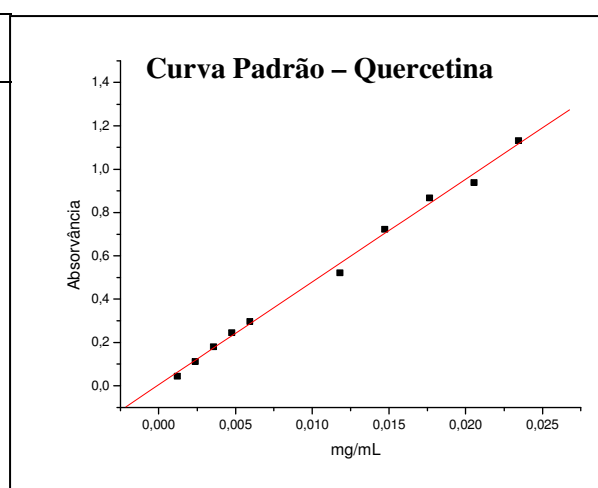
Valores obtidos a partir da solução padrão de **canferol** em diferentes concentrações após o ensaio em triplicata com cloreto de alumínio a 2%.

Volume (µL)	[ ] mg/mL	Absorvância (UV-760nm)			Média Abs. ± D.P
		1°	2°	3°	
2	0,00112	0,083	0,069	0,068	0,073±0,008
4	0,00225	0,186	0,177	0,174	0,179±0,006
6	0,00337	0,297	0,290	0,292	0,293±0,004
8	0,00449	0,394	0,383	0,394	0,390±0,006
10	0,00561	0,501	0,452	0,488	0,480±0,025
20	0,01395	0,921	0,916	0,948	0,928±0,017
25	0,01671	1,189	1,223	1,184	1,199±0,021
30	0,01946	1,449	1,458	1,449	1,452±0,005
35	0,02220	1,717	1,753	1,761	1,744±0,023
40	0,02766	1,959	1,976	1,969	1,968±0,009
50	0,00112	2,500	2,500	2,500	2,500±0,000



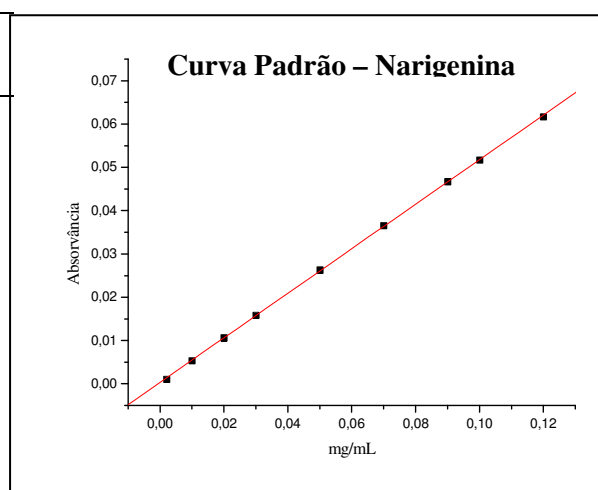
Valores obtidos a partir da solução padrão de **quercetina** em diferentes concentrações após o ensaio em triplicata com solução de cloreto de alumínio.

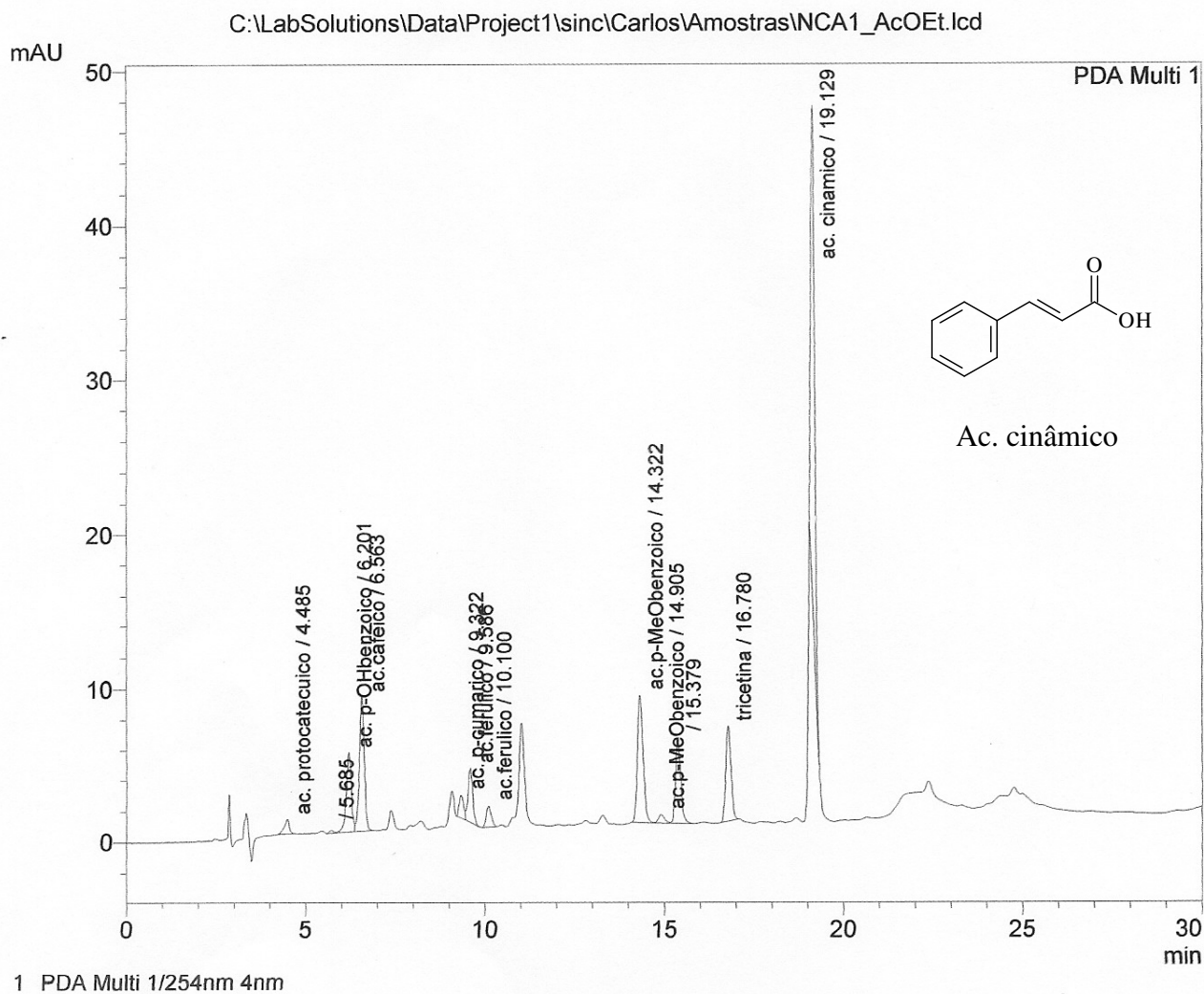
Volume (µL)	[ ] mg/mL	Absorvância (UV-415nm)			Média Abs. ± D.P
		1°	2°	3°	
2	0,0012	0,052	0,045	0,04	0,046±0,006
4	0,0024	0,106	0,12	0,114	0,113±0,007
6	0,0035	0,204	0,177	0,163	0,181±0,021
8	0,0047	0,216	0,283	0,239	0,246±0,034
10	0,0059	0,314	0,286	0,294	0,298±0,014
20	0,0118	0,497	0,53	0,542	0,523±0,023
25	0,0147	0,753	0,708	0,707	0,723±0,026
30	0,0176	0,866	0,818	0,92	0,868±0,051
35	0,0205	0,91	0,99	0,916	0,939±0,045
40	0,0234	1,114	1,155	1,128	1,132±0,021



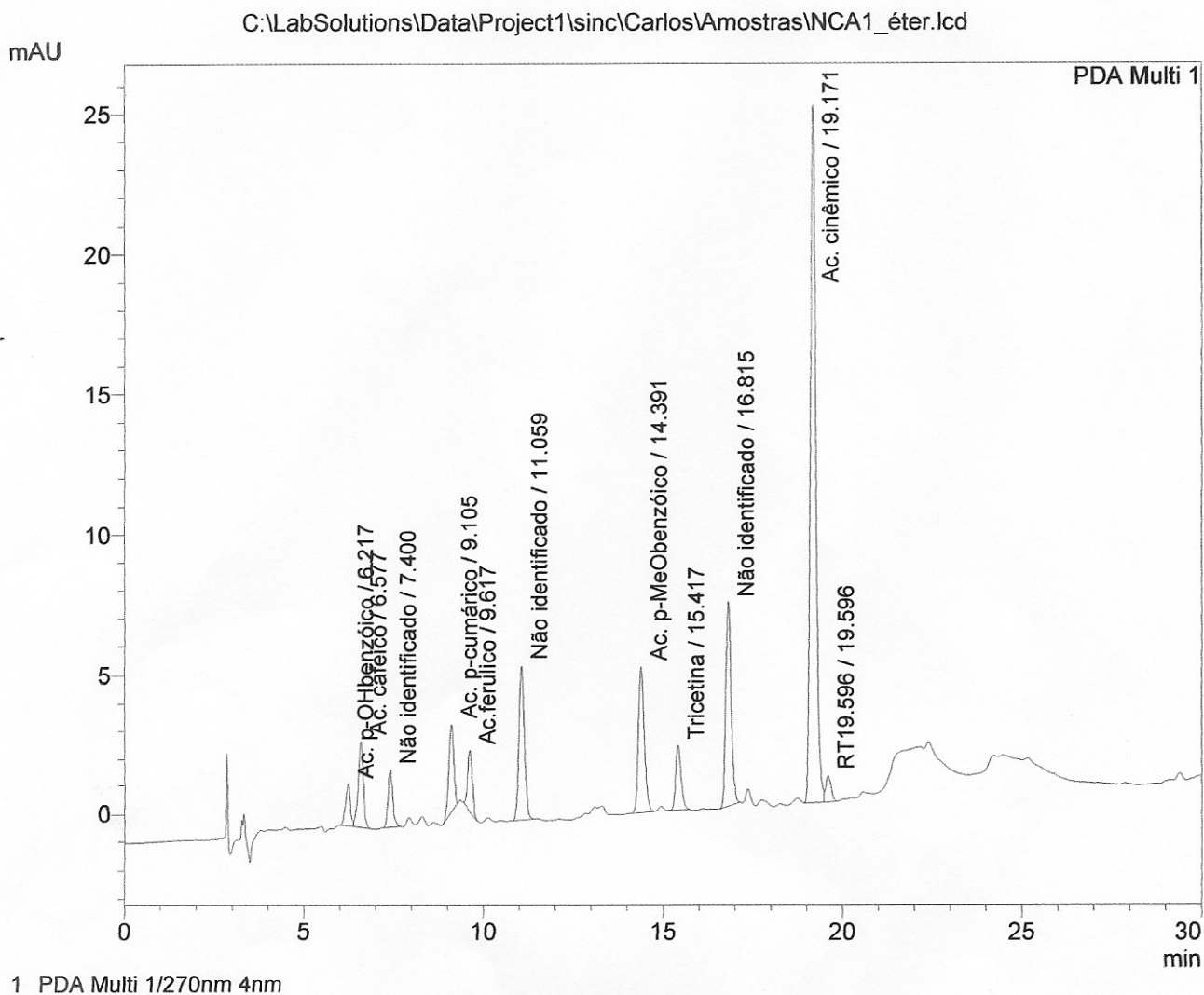
Valores obtidos a partir da solução padrão de **narigenina** em diferentes concentrações após o ensaio em triplicata com cloreto de alumínio a 2%.

Volume (µL)	[ ] mg/mL	Absorvância (UV-760nm)			Média Abs. ± D.P
		1°	2°	3°	
2	0,00107	0,004	0,004	0,006	0,005±0,001
10	0,00533	0,016	0,008	0,017	0,014±0,005
20	0,01063	0,031	0,029	0,035	0,032±0,003
30	0,01589	0,064	0,064	0,061	0,063±0,002
50	0,02631	0,105	0,105	0,111	0,107±0,003
70	0,03659	0,148	0,156	0,156	0,153±0,005
90	0,04674	0,193	0,202	0,202	0,199±0,005
100	0,05177	0,223	0,229	0,226	0,226±0,003
120	0,06172	0,274	0,261	0,247	0,261±0,014

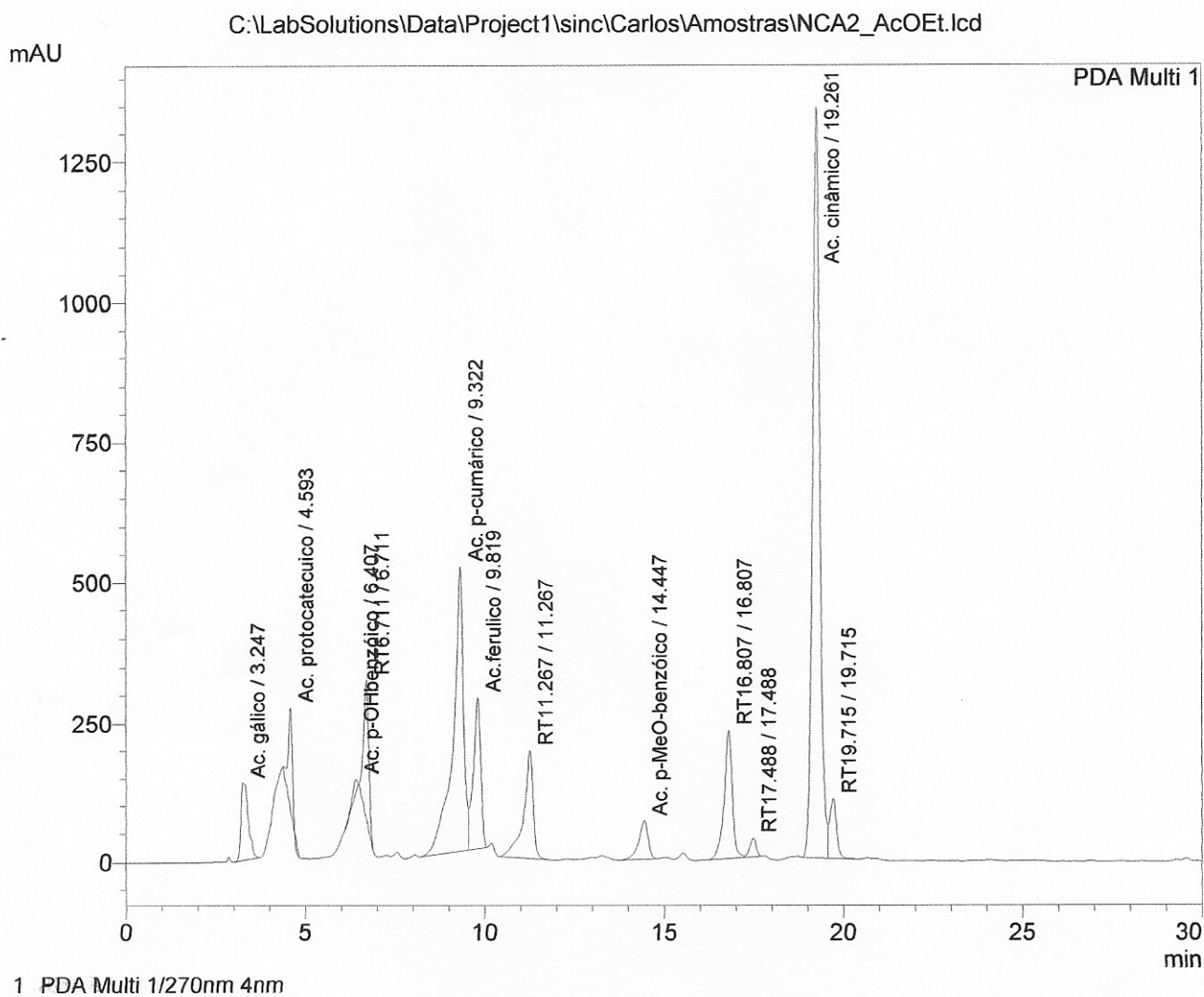




**Figura A.** Extratos de mel de Assa Peixe analisados por CLAE-DAD: NCA1\_acetato de etila. Em coluna analítica C-18 (25 cm x 4,6 mm x 5  $\mu$ m), fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>, fase móvel metanol: acetonitrila (90:10)-solvente B e água: ácido acético (99:1 - solvente A), 200-400 nm. DAD-270 e 380 nm.

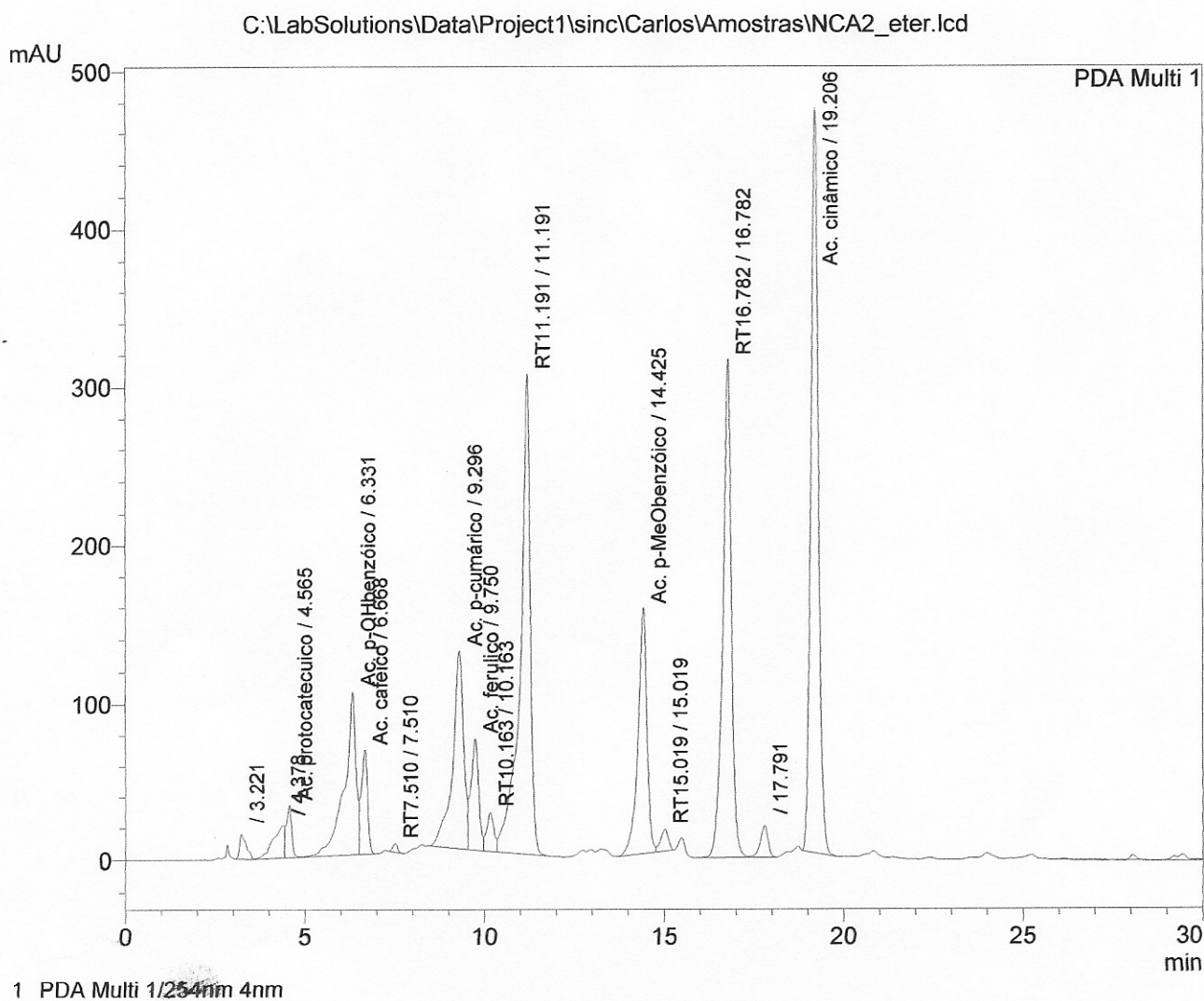


**Figura B.** Extratos de mel de Assa Peixe analisados por CLAE-DAD: NCA1\_éter. Em coluna analítica C-18 (25 cm x 4,6 mm x 5  $\mu$ m), fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>, fase móvel metanol: acetonitrila (90:10)-solvente B e água: ácido acético (99:1 - solvente A), 200-400 nm. DAD-270 e 380 nm.

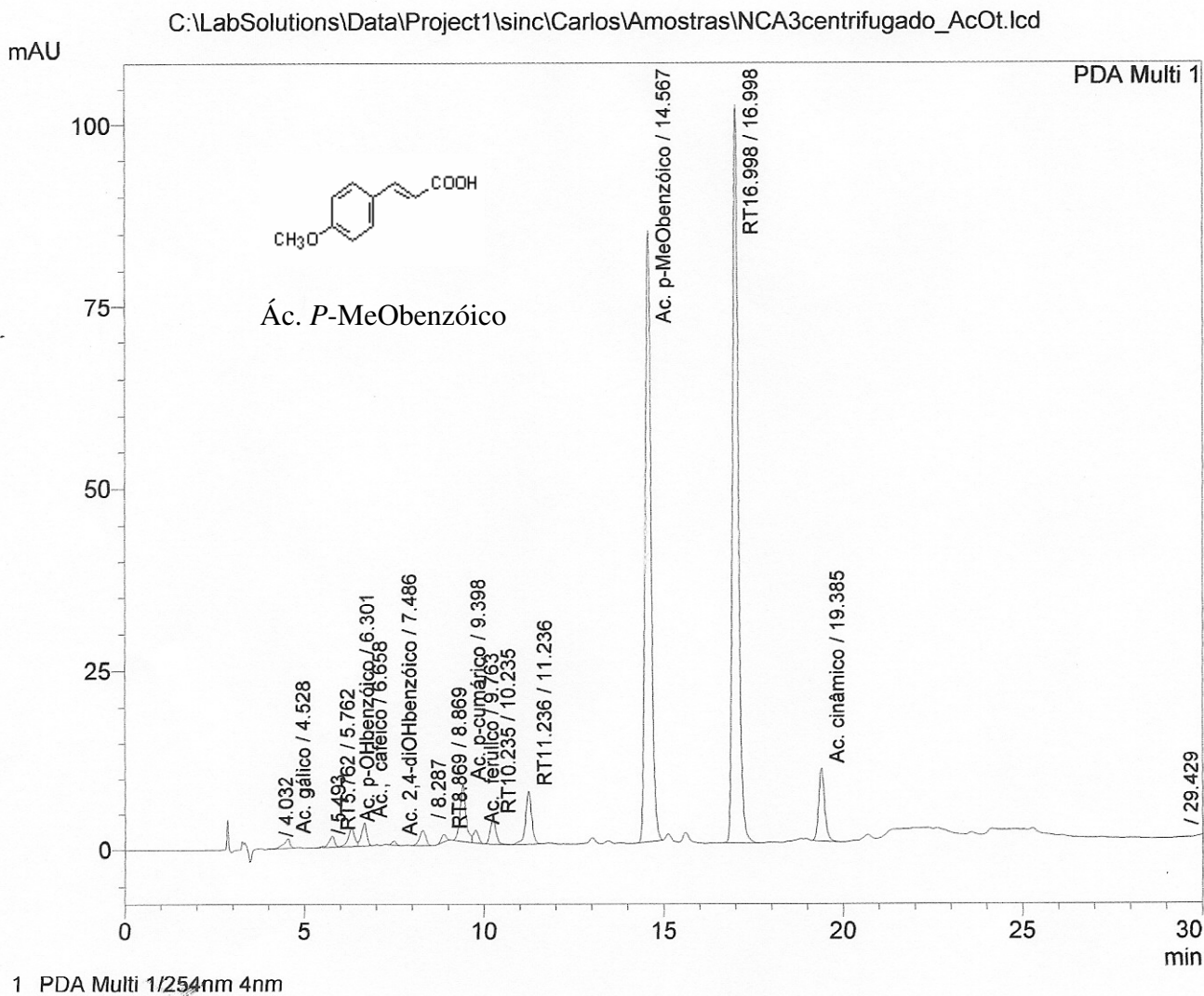


**Figura C.** Extratos de mel de Assa Peixe analisados por CLAE-DAD: **NCA2 acetato de etila**. Em coluna analítica C-18 (25 cm x 4,6 mm x 5  $\mu$ m), fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>, fase móvel metanol: acetonitrila (90:10)-solvente B e água: ácido acético (99:1 - solvente A), 200-400 nm. DAD-270 e 380 nm.

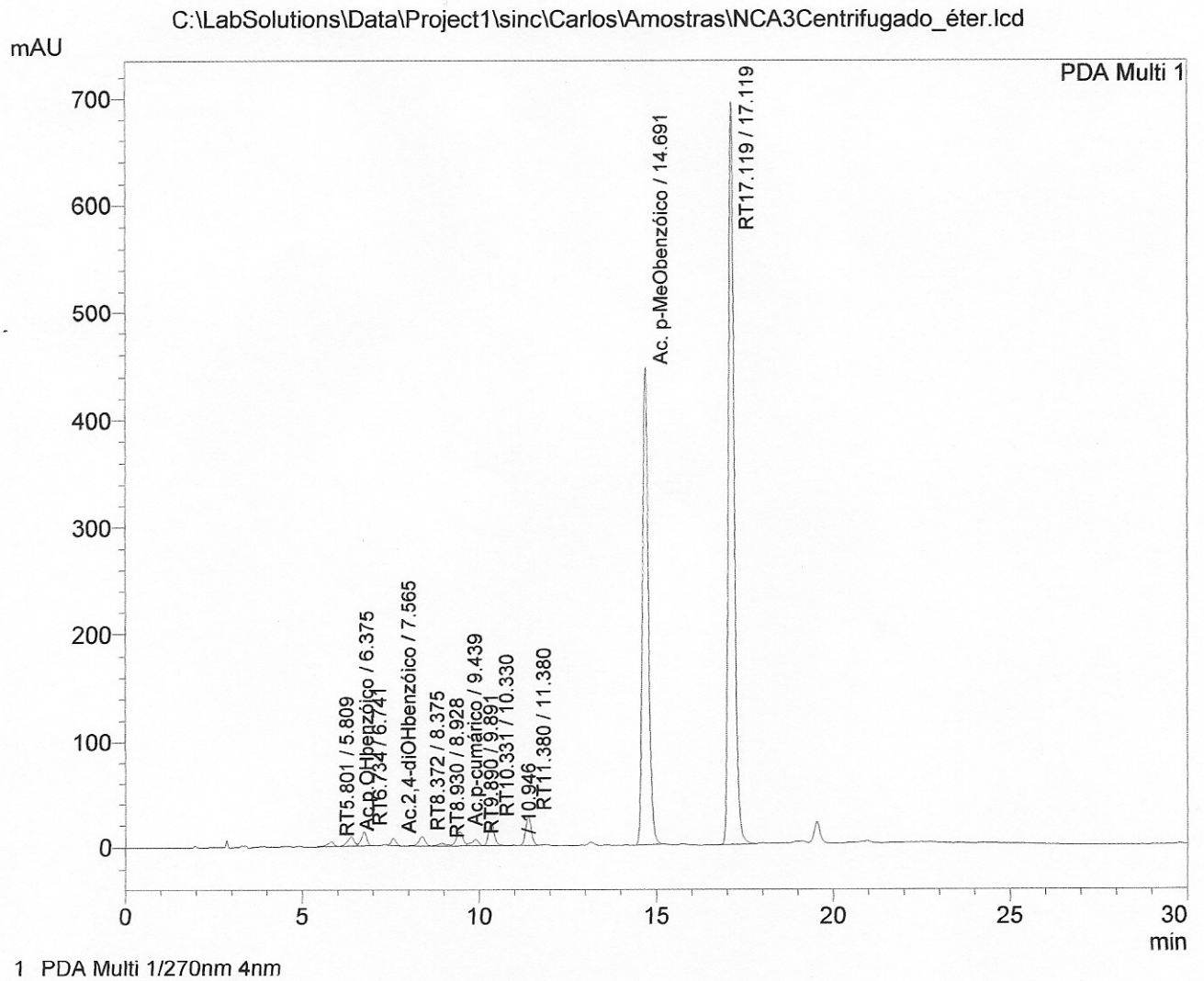




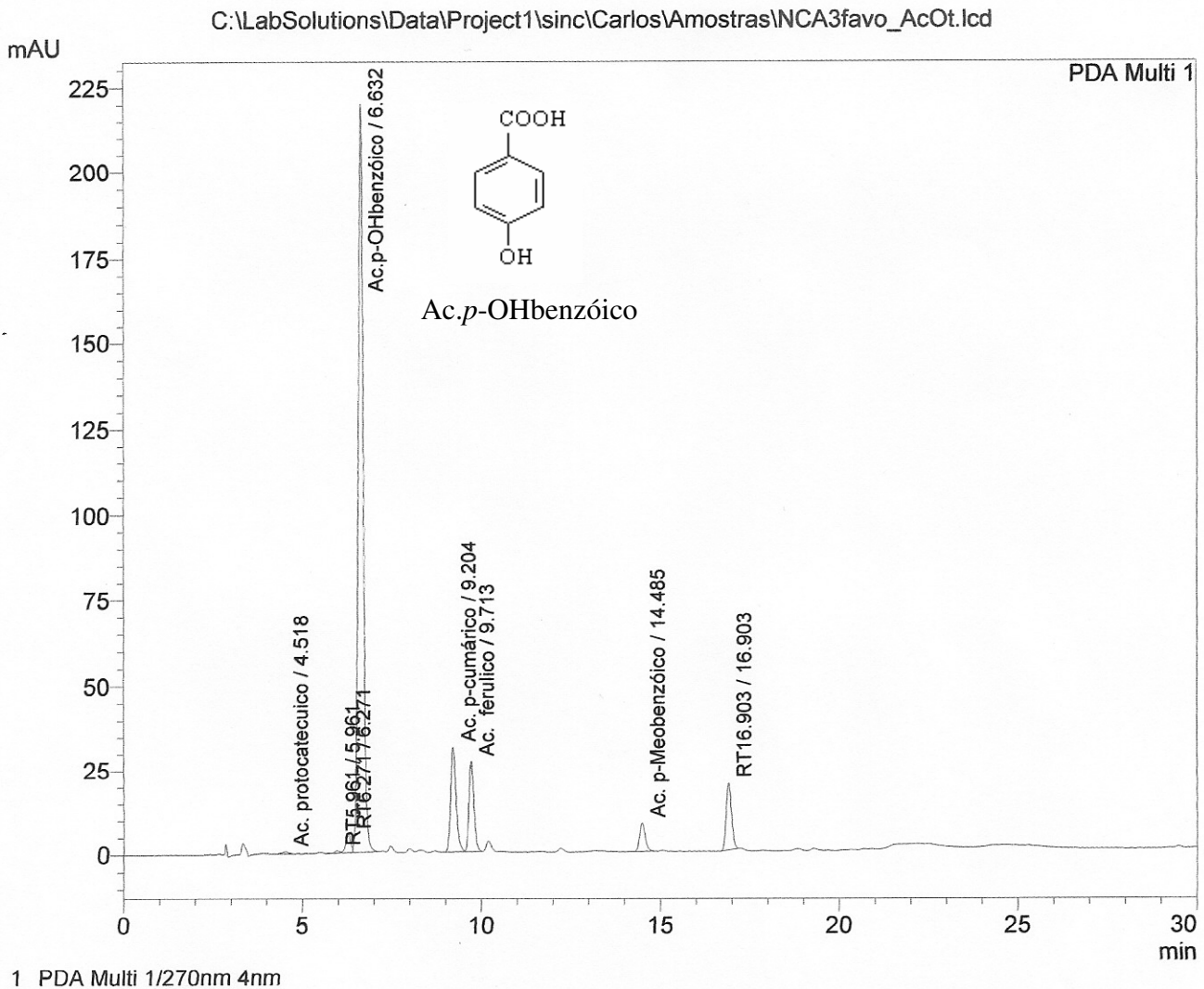
**Figura D.** Extratos de mel de Assa Peixe analisados por CLAE-DAD: **NCA2\_éter**. Em coluna analítica C-18 (25 cm x 4,6 mm x 5  $\mu$ m), fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>, fase móvel metanol: acetonitrila (90:10)-solvente B e água: ácido acético (99:1 - solvente A), 200-400 nm. DAD-270 e 380 nm.



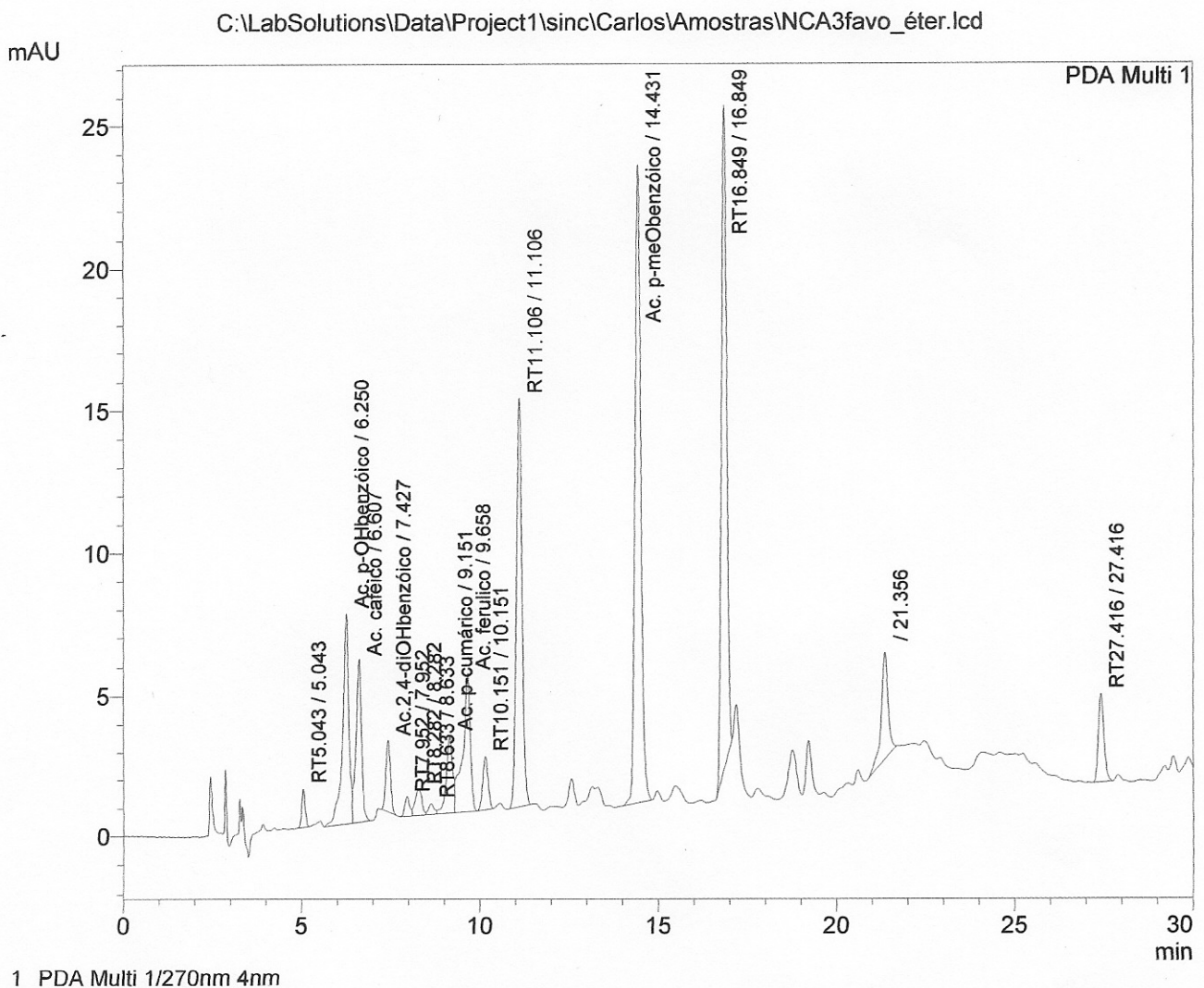
**Figura E.** Extratos de mel de Assa Peixe analisados por CLAE-DAD: **NCA3 Centrifugado acetato de etila**. Em coluna analítica C-18 (25 cm x 4,6 mm x 5 µm), fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>, fase móvel metanol: acetonitrila (90:10)-solvente B e água: ácido acético (99:1 - solvente A), 200-400 nm. DAD-270 e 380 nm.



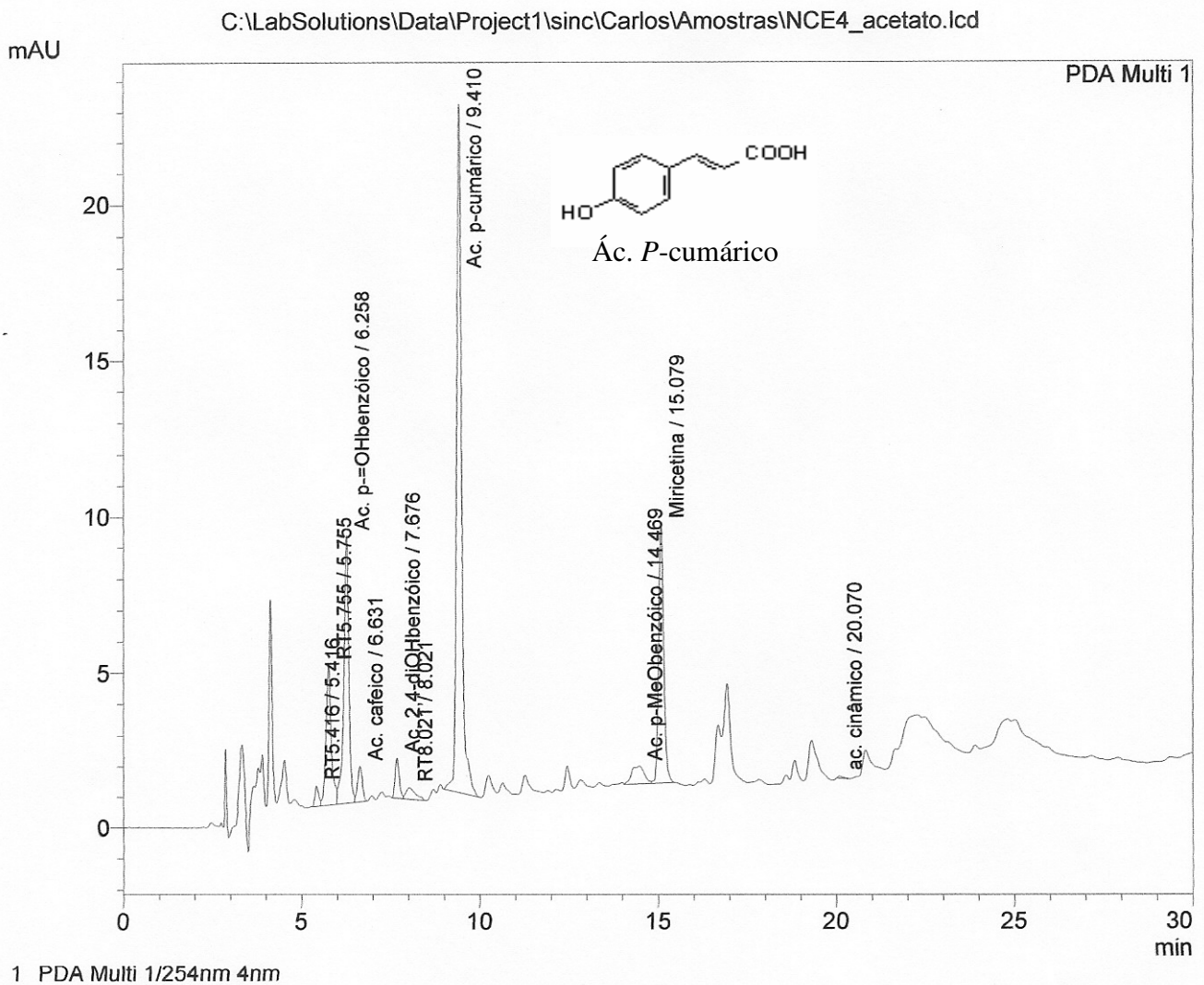
**Figura F.** Extratos de mel de Assa Peixe analisados por CLAE-DAD: **NCA3 Centrifugado\_éter**. Em coluna analítica C-18 (25 cm x 4,6 mm x 5  $\mu$ m), fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>, fase móvel metanol: acetonitrila (90:10)-solvente B e água: ácido acético (99:1 - solvente A), 200-400 nm. DAD-270 e 380 nm.



**Figura G.** Extratos de mel de Assa Peixe analisados por CLAE-DAD: **NCA3 Favos\_ acetato de etila.** Em coluna analítica C-18 (25 cm x 4,6 mmx 5  $\mu$ m), fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>, fase móvel metanol: acetonitrila (90:10)-solvente B e água: ácido acético (99:1 - solvente A), 200-400 nm. DAD-270 e 380 nm.

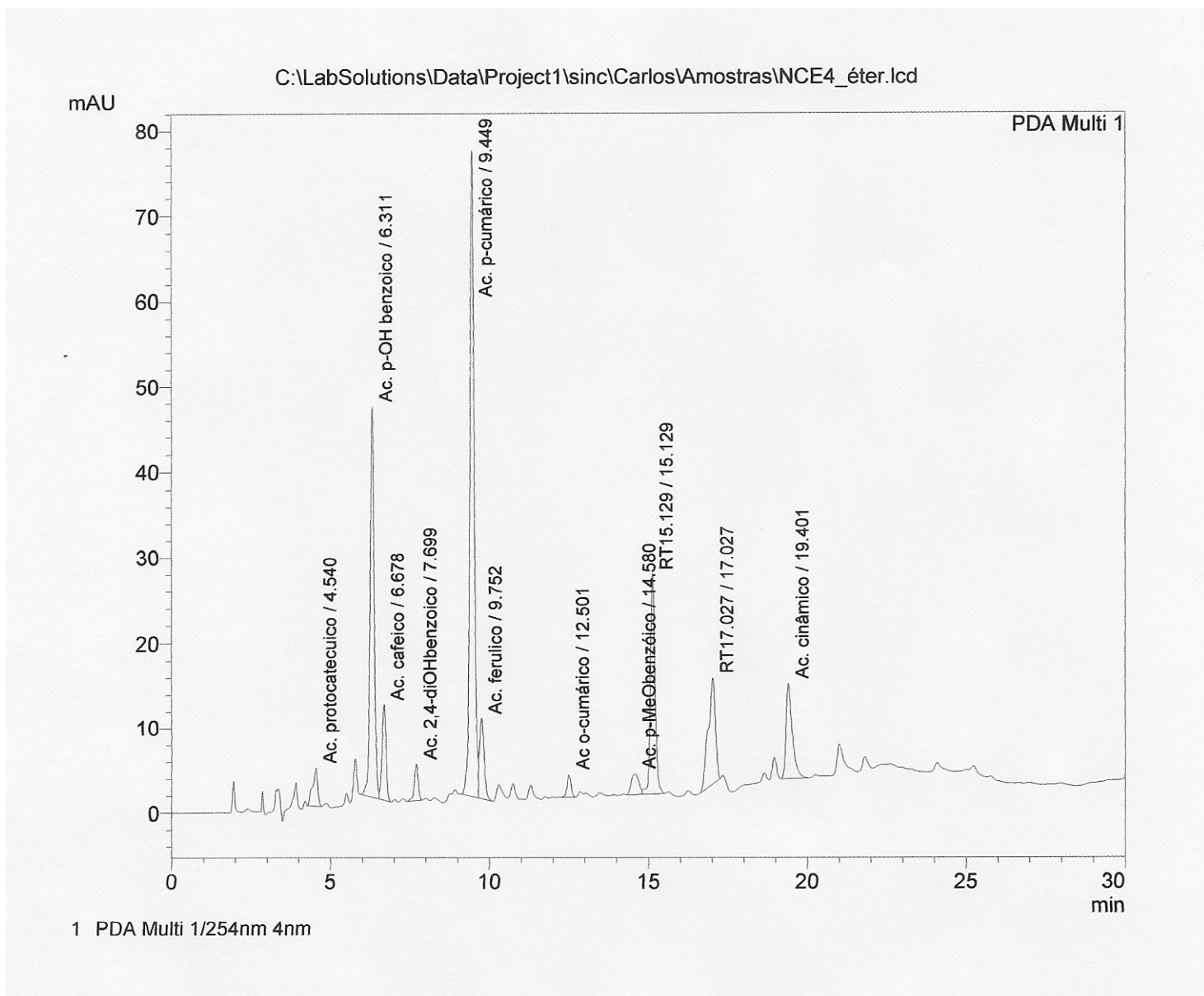


**Figura H.** Extratos de mel de Assa Peixe analisados por CLAE-DAD: **NCA3 Favos\_éter**. Em coluna analítica C-18 (25 cm x 4,6 mm x 5  $\mu$ m), fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>, fase móvel metanol: acetonitrila (90:10)-solvente B e água: ácido acético (99:1 - solvente A), 200-400 nm. DAD-270 e 380 nm.

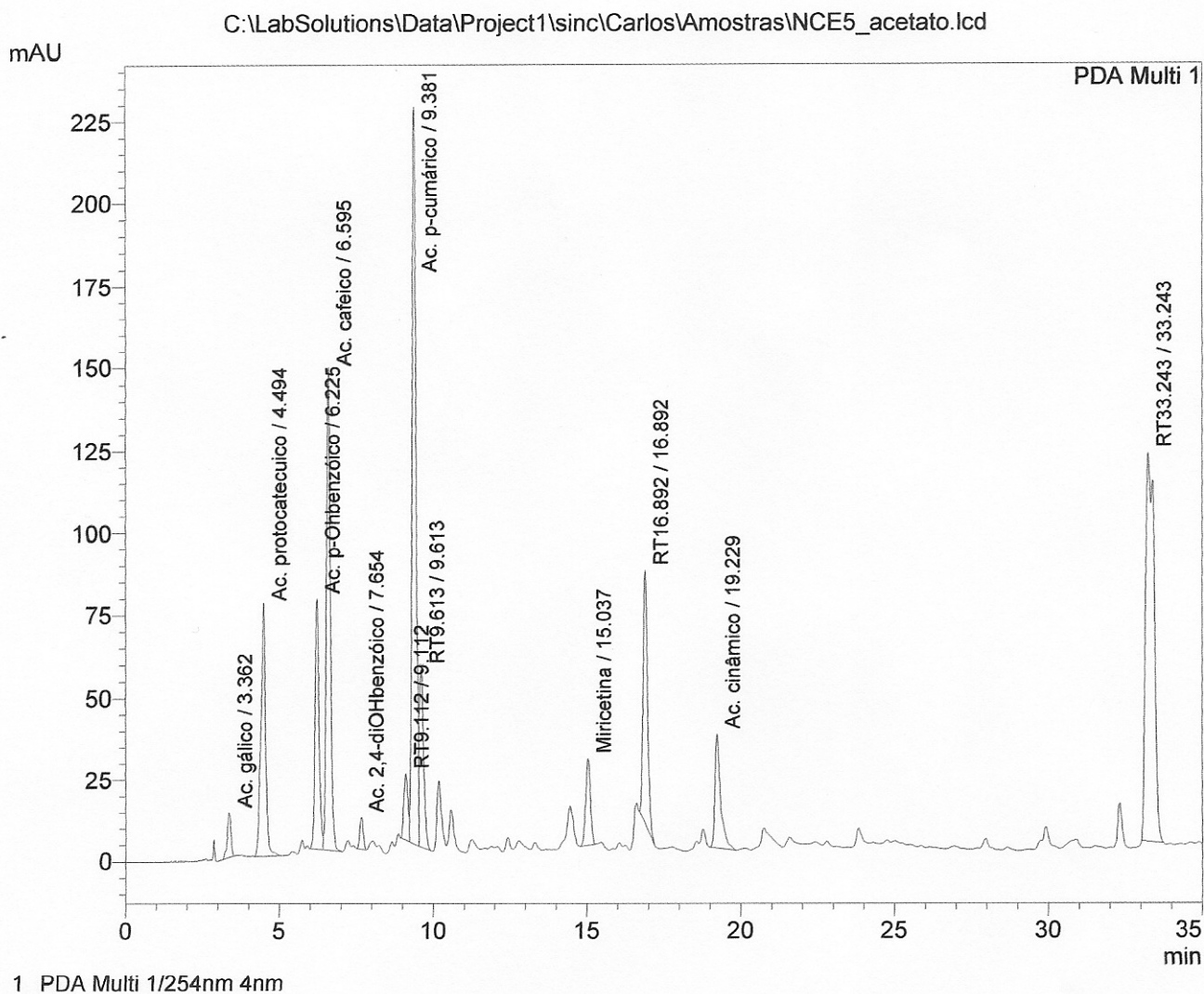


**Figura I.** Extratos de mel de Assa Peixe analisados por CLAE-DAD: NCE4\_ acetato de etila. Em coluna analítica C-18 (25 cm x 4,6 mm x 5  $\mu$ m), fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>, fase móvel metanol: acetonitrila (90:10)-solvente B e água: ácido acético (99:1 - solvente A), DAD-270 e 380 nm.



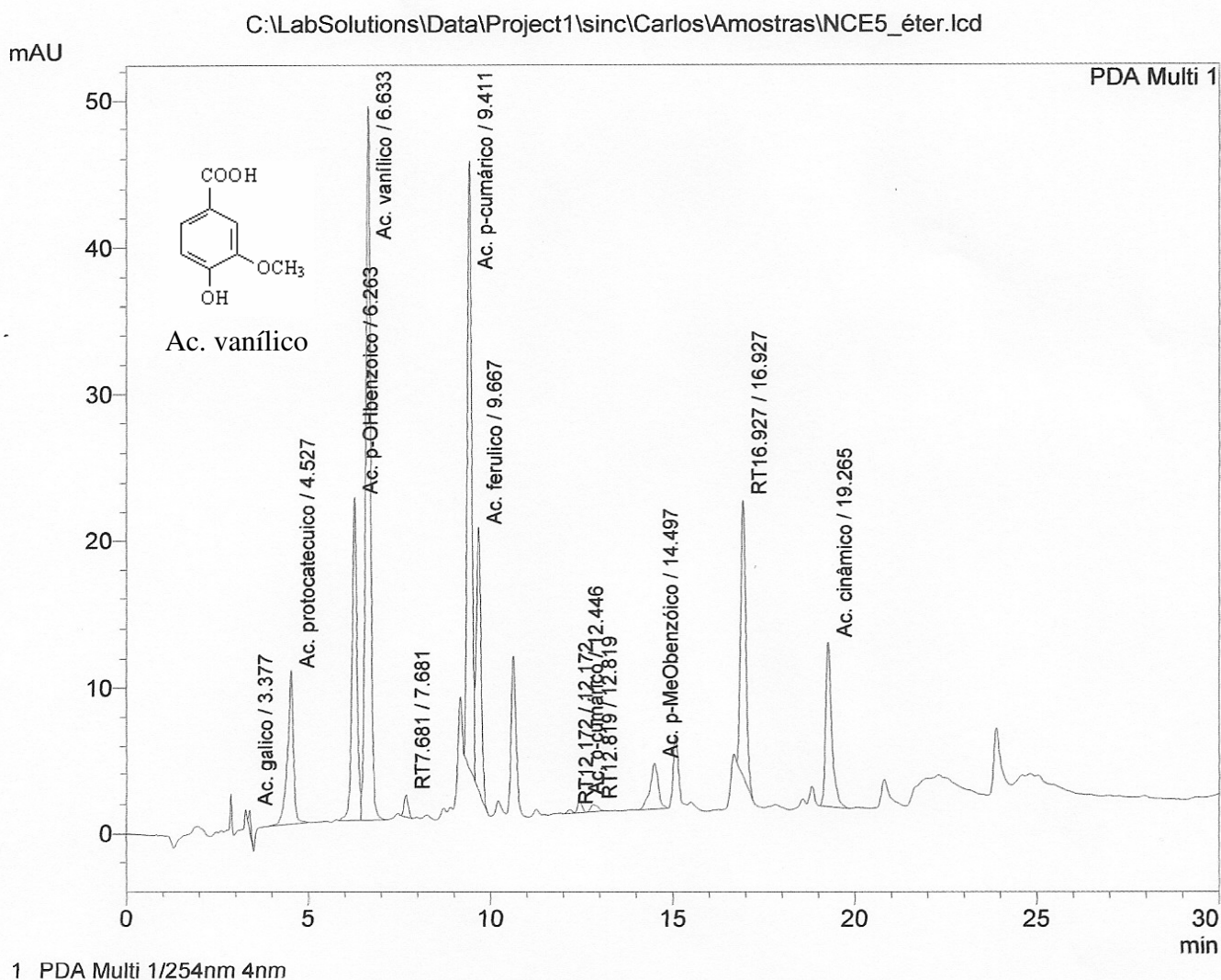


**Figura J.** Extratos de mel de Assa Peixe analisados por CLAE-DAD: NCE4\_éter. Em coluna analítica C-18 (25 cm x 4,6 mm x 5 µm), fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>, fase móvel metanol: acetonitrila (90:10)-solvente B e água: ácido acético (99:1 - solvente A), 200-400 nm. DAD-270 e 380 nm.

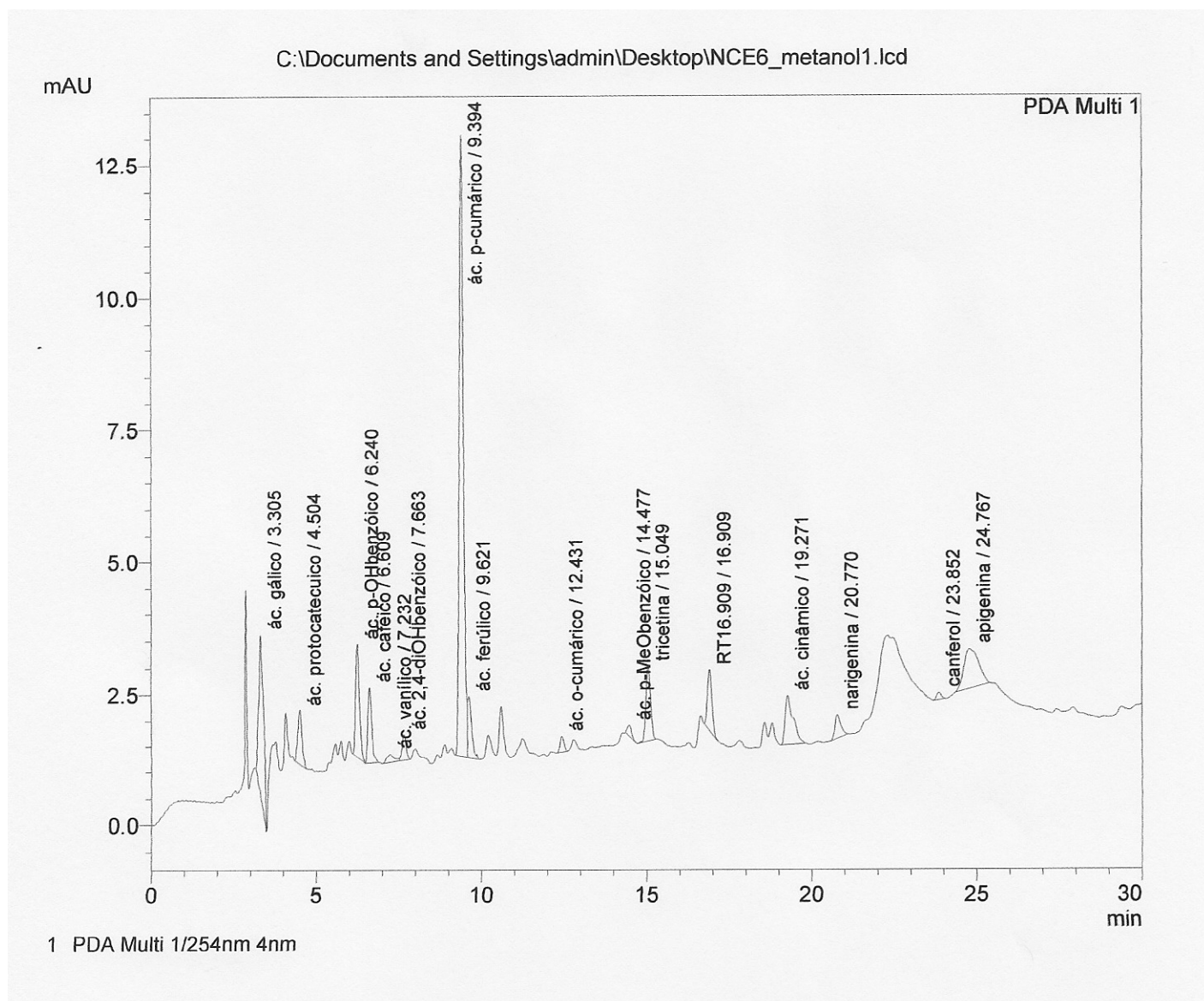


**Figura K.** Extratos de mel de Assa Peixe analisados por CLAE-DAD: **NCE5\_ acetato de etila**. Em coluna analítica C-18 (25 cm x 4,6 mm x 5  $\mu$ m), fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>, fase móvel metanol: acetonitrila (90:10)-solvente B e água: ácido acético (99:1 - solvente A), 200-400 nm. DAD-270 e 380 nm.

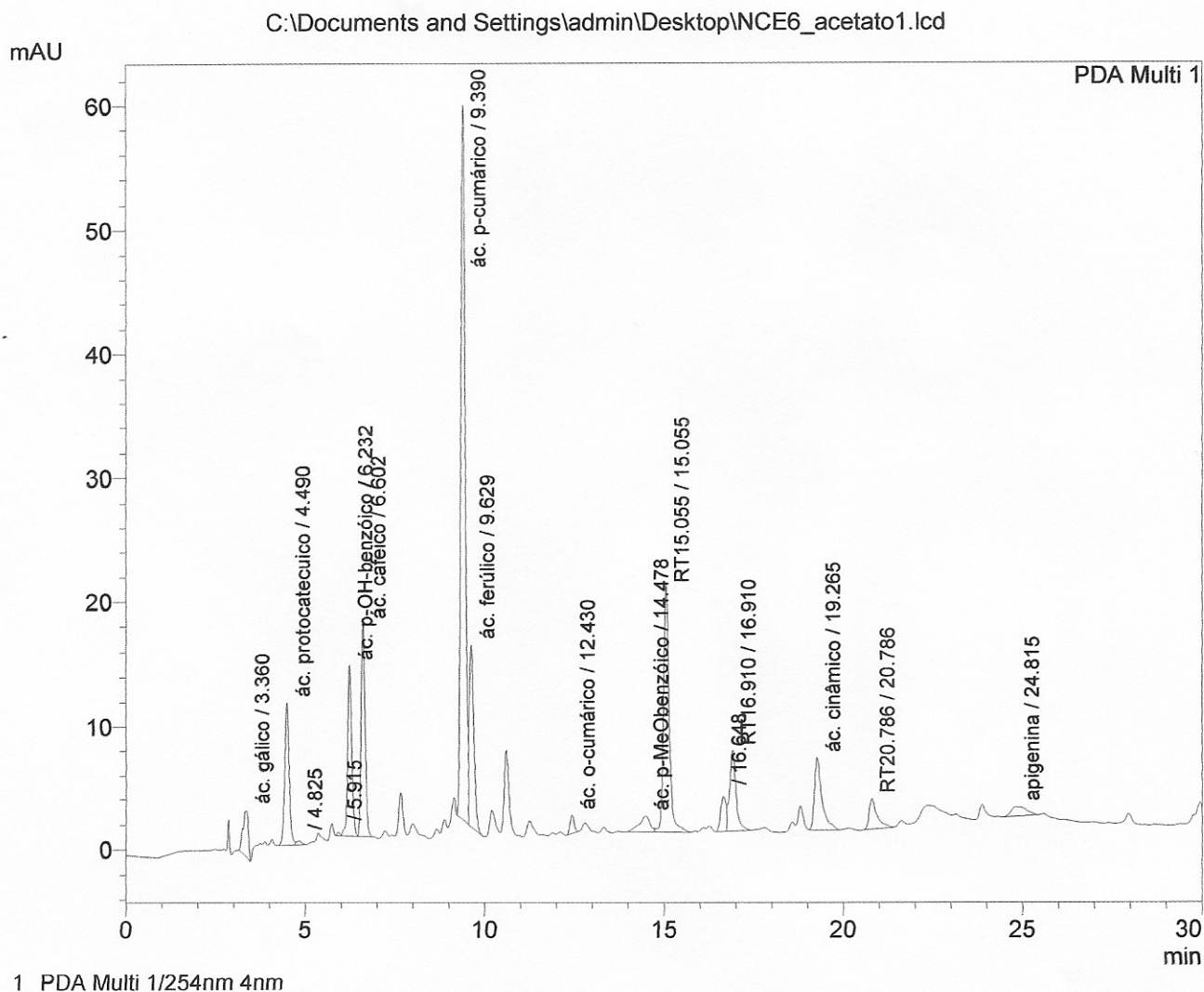




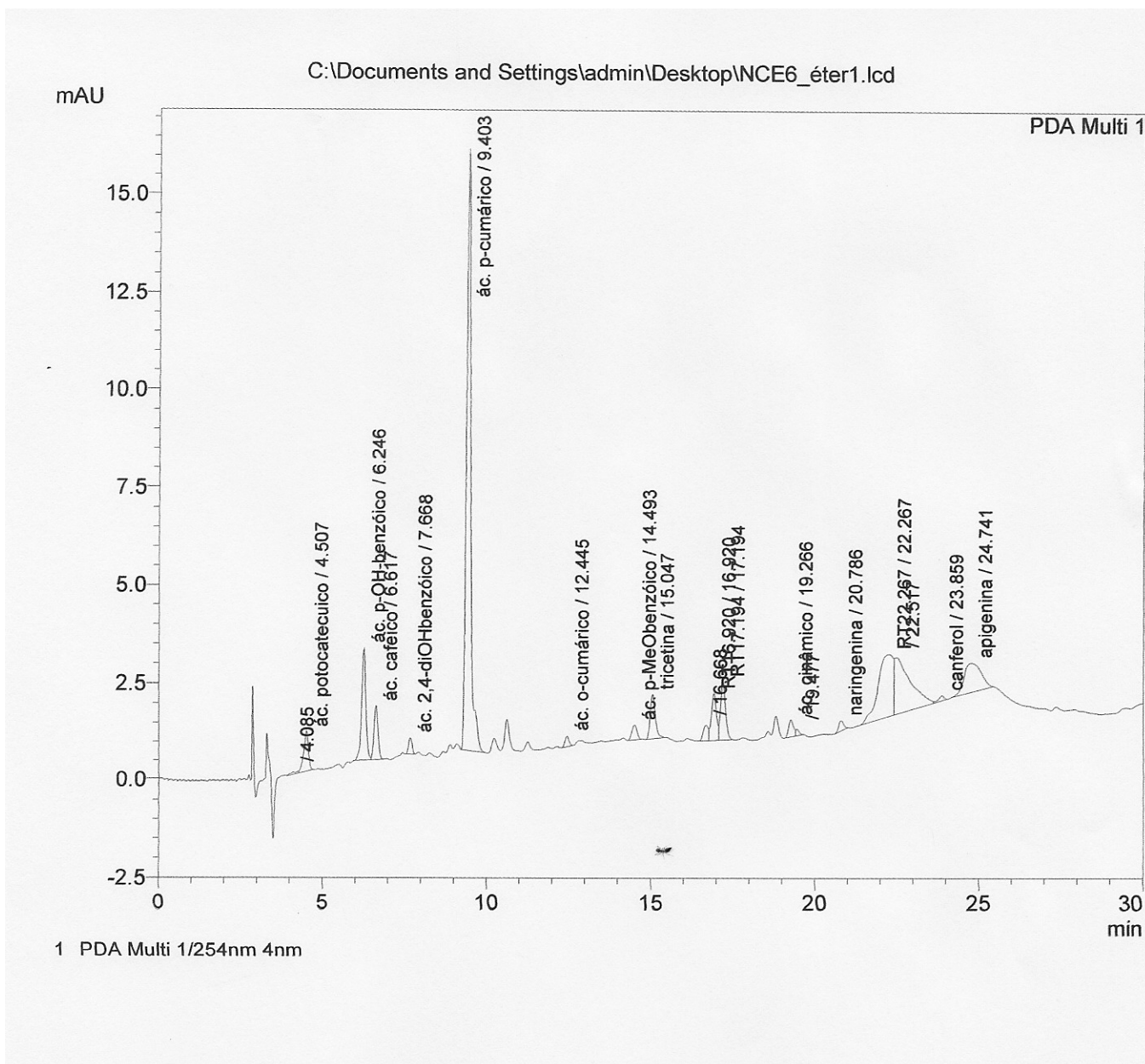
**Figura L.** Extratos de mel de Assa Peixe analisados por CLAE-DAD: NCE5\_éter. Em coluna analítica C-18 (25 cm x 4,6 mm x 5 µm), fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>, fase móvel metanol: acetonitrila (90:10)-solvente B e água: ácido acético (99:1 - solvente A), DAD-270 e 380 nm.



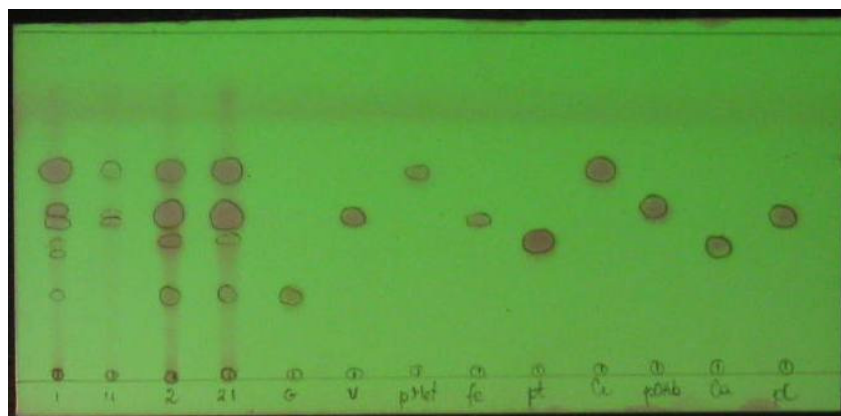
**Figura M.** Extratos de mel de Assa Peixe analisados por CLAE-DAD: **NCE6\_metanol**. Em coluna analítica C-18 (25 cm x 4,6 mm x 5  $\mu$ m), fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>, fase móvel metanol: acetonitrila (90:10)-solvente B e água: ácido acético (99:1 - solvente A), DAD-270 e 380 nm.



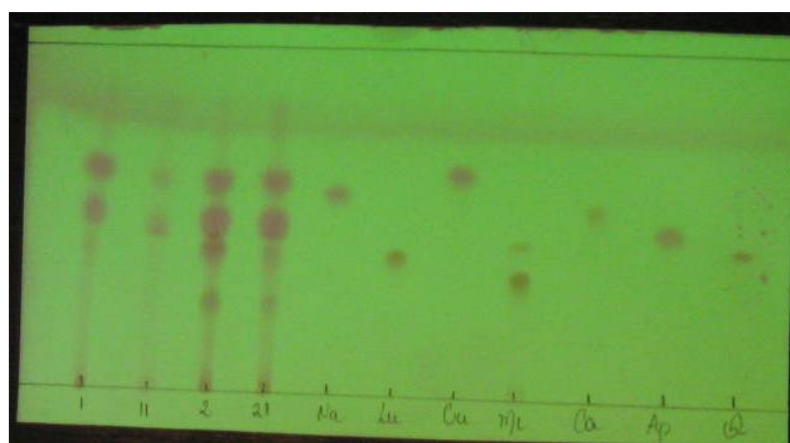
**Figura N.** Extratos de mel de Assa Peixe analisados por CLAE-DAD: **NCE6\_ acetato de etila**. Em coluna analítica C-18 (25 cm x 4,6 mm x 5  $\mu$ m), fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>, fase móvel metanol: acetonitrila (90:10)-solvente B e água: ácido acético (99:1 - solvente A), 200-400 nm. DAD-270 e 380 nm.



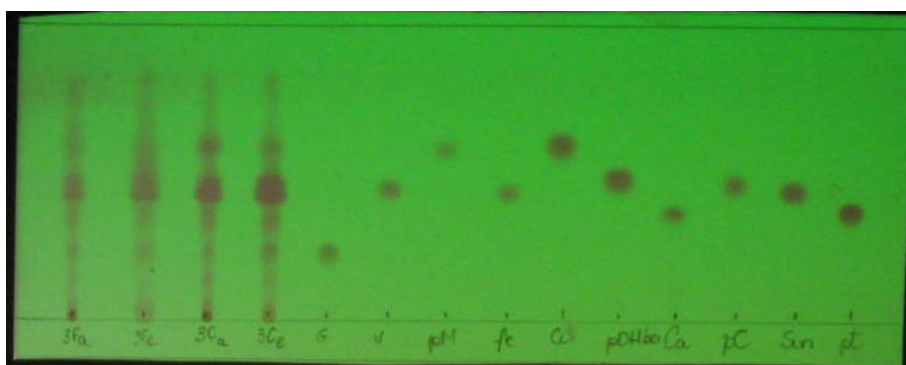
**Figura O.** Extratos de mel de Assa Peixe analisados por CLAE-DAD: NCE6\_éter. Em coluna analítica C-18 (25 cm x 4,6 mm x 5 µm), fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>, fase móvel metanol: acetonitrila (90:10)-solvente B e água: ácido acético (99:1 - solvente A), 270-380 nm. DAD-270 e 380 nm.



**Figura P.** Análises dos extratos NCA 1a, NCA 1e, NC 2a, NC 2e, e os padrões dos ácidos fenólicos: gálico, vanílico, *para*-metóxi-benzóico, ferúlico, protocatecuico, cinâmico, *para*-hidroxi benzóico, *para*-cumárico, cafeico e sinápico (nessa ordem aplicados na placa).

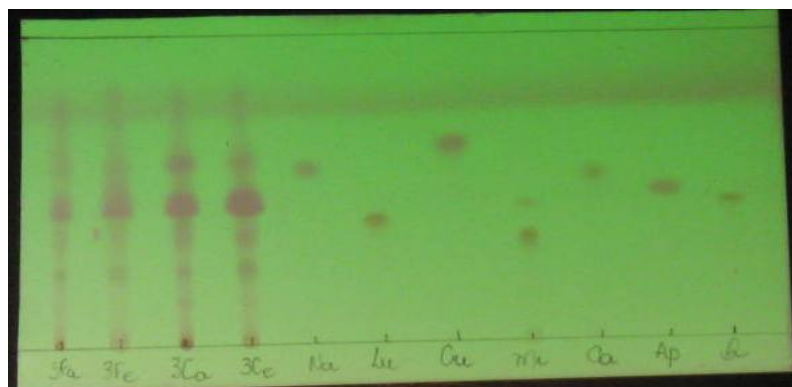


**Figura Q.** Análises dos extratos NCA 1a, NCA 1e, NCA 2a, NCA 2e, e os padrões dos flavonóides: naringenina, luteolina, crisina, miricetina, canferol, apigenina e quercetina (aplicados nessa ordem).

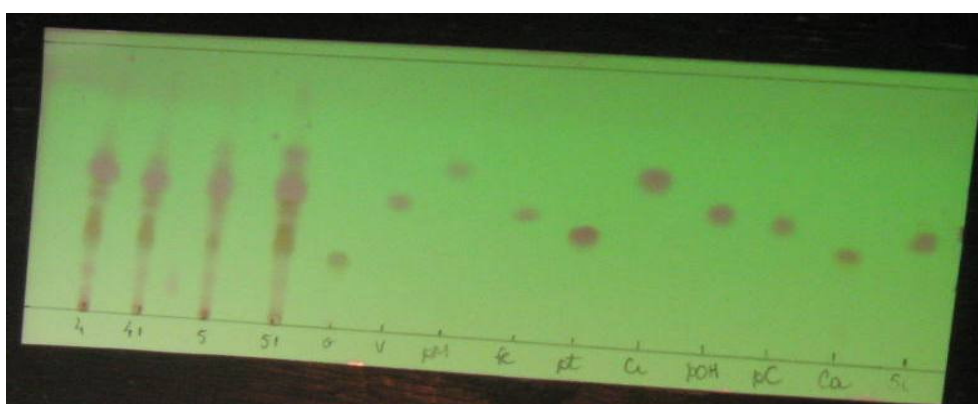


**Figura R.** Análises dos extratos NCA 3a (favos), NCA 3e (favos), NCA 3a (centrifugado), NCA 3e (centrifugado), e os padrões dos ácidos fenólicos: gálico, vanílico, *para*-metóxi-benzóico, ferúlico, cinâmico, *para*-hidroxi benzóico, cafeico, *para*-cumárico, sinápico e protocatecuico (nessa ordem aplicados na placa).

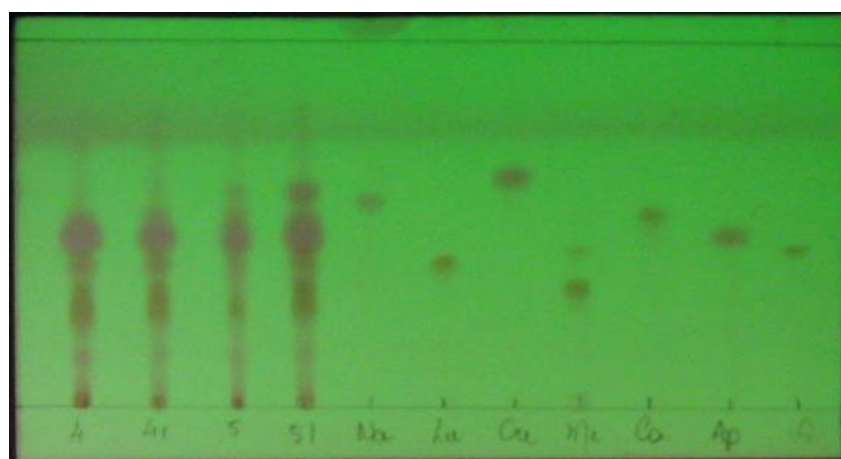




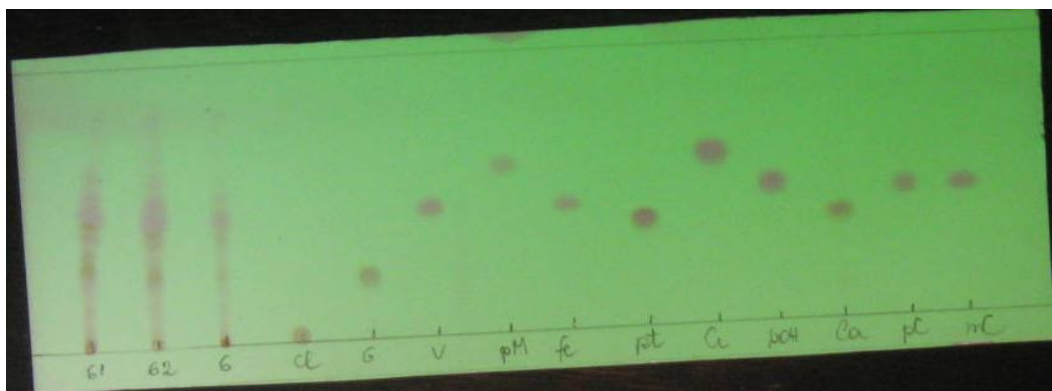
**Figura S.** Análises dos extratos NCA 3a (favos), NCA 3e (favos), NCA 3a (centrifugado), NCA 3e (centrifugado), e os padrões dos flavonóides: narigenina, luteolina, crisina, miricetina, canferol, apigenina e quercetina (aplicados nessa ordem).



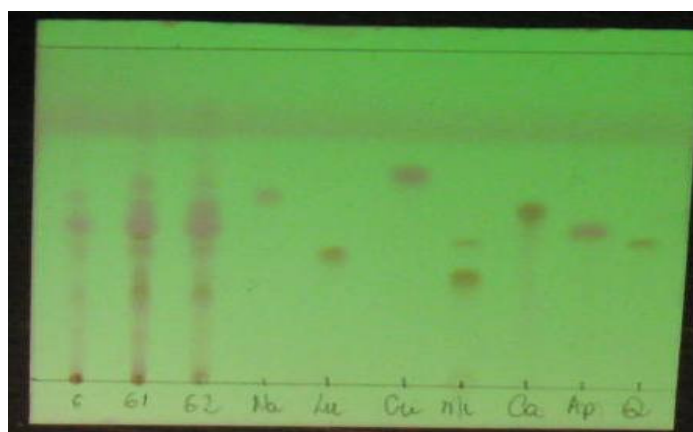
**Figura T.** Análises dos extratos NCE 4a, NCE 4e, NCE 5a, NCE 5e, e os padrões dos ácidos fenólicos: gálico, vanílico, *para*-metóxi-benzóico, ferúlico, protocateuico, cinâmico, *para*-hidroxi benzóico, *para*-cumárico, cafeico e sinápico (nessa ordem aplicados na placa).



**Figura U.** Análises dos extratos NCE 4a, NCE 4e, NCE 5a, NCE 5e, e os padrões dos flavonóides: narigenina, luteolina, crisina, miricetina, canferol, apigenina e quercetina (aplicados nessa ordem).



**Figura V.** Análises dos extratos NCE 1a, NCE 1e, NCE MeOH, e os padrões dos ácidos fenólicos: clorogênico, gálico, vanílico, *para*-metóxi-benzóico, ferúlico, protocatecuico, cinâmico, *para*-hidroxi benzóico, cafeico, *para*-cumárico e *para*-cumárico (nessa ordem aplicados na placa).



**Figura X.** Análises dos extratos NCE MeOH, NCE 1a, NCE 1e, e os padrões dos flavonóides: narigenina, luteolina, crisina, miricetina, canferol, apigenina e quercetina (aplicados nessa ordem).

<i>Padrões flavonóides</i>	<i>Narigenina</i>	<i>Luteonina</i>	<i>Crisina</i>	<i>Miricetina</i>	<i>Canferol</i>	<i>Apigenina</i>	<i>Quercetina</i>
$R_f$	0,57	0,38	0,64	0,32 e 0,45	0,53	0,47	0,43

<i>Padrões Ácidos fenólicos</i>	<i>cafeico</i>	<i>Ferúlico</i>	<i>gálico</i>	<i>Cinâmico</i>	<i>m-cumárico</i>	<i>p-metóxi-benzóico</i>	<i>p-cumárico</i>	<i>p-OH-benzóico</i>	<i>protocatecuico</i>	<i>sinápico</i>	<i>Vanílico</i>
$R_f$	0,34	0,40	0,22	0,56	0,58	0,56	0,44	0,46	0,36	0,42	0,42