

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**PERFIL CROMATOGRÁFICO DAS SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS  
PRESENTES EM EXTRATOS DE MEL DE ASSA PEIXE E AVALIAÇÃO DE  
SEU PODER ANTIOXIDANTE**

Elaborado por  
**MILENE APARECIDA PEREIRA**

Orientadora  
**Prof<sup>ª</sup>. Dra. ROSANE NORA CASTRO**

SEROPÉDICA  
2010

MILENE APARECIDA PEREIRA

CURSO DE GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**PERFIL CROMATOGRÁFICO DAS SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS  
PRESENTES EM EXTRATOS DE MEL DE ASSA PEIXE E AVALIAÇÃO DE  
SEU PODER ANTIOXIDANTE**

Monografia apresentada como requisito parcial do grau de Licenciado em Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

SEROPÉDICA

2010

Monografia apresentada por **Milene Aparecida Pereira** em **21/01/2010** ao Departamento de Química da UFRRJ e pela Banca Examinadora formada pelos seguintes professores:

Prof<sup>a</sup>. Rosane Nora Castro  
UFRRJ – ICE - DEQUIM  
Presidente da Banca Examinadora

Prof<sup>a</sup> Andressa Esteves de Souza dos Santos  
UFRRJ – ICE - DEQUIM

Prof. Luciano Ramos Suzart  
UFRRJ – ICE - DEQUIM

Prof. Dr. Francisco de Assis da Silva  
UFRRJ – ICE – Departamento de Química  
Coordenador do Curso de Graduação em Química  
da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

SEROPÉDICA

2010

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo de bom que tem me ajudado a conquistar, dando-me sempre força e saúde. Aos meus pais, por acreditarem e apoiarem o meu sonho acadêmico. Aos demais familiares e amigos cambuienses, que sempre compreenderam a minha ausência por estar empenhada na graduação e por estar a quilômetros de distância, pelas faltas em seus aniversários e comemorações, mesmo que sempre soubessem que os tinham presentes em meu coração. Em especial, a minha grande Tia Tina que sempre atuou como minha segunda mãe.

Ao amigo Wanderson José Lambert, pelo incentivo, compreensão e amor.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Rosane Nora Castro pela oportunidade concedida, pela acolhida, orientação, ensinamentos e amizade.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Cristina Affonso Lorenzon, coordenadora do Laboratório Abelha-Natureza-IZ-UFRRJ, pela colaboração e fornecimento do mel de Assa Peixe para a execução do trabalho.

Aos professores Andressa Esteves de Souza dos Santos e Luciano Ramos Suzart, por aceitarem o convite de fazerem parte da banca desta monografia.

A todos os professores que tive ao longo da graduação, que foram essenciais para a construção da maior parte do conhecimento que adquiri nesses anos.

Ao mestrando Carlos Alberto Fonseca Jardim Vianna, pela co-orientação e também pela amizade.

À grande amiga Luiza D'Oliveira, com a qual, para adiantar os experimentos, trabalhei muitas vezes aos fins de semana no laboratório e a quem eu admiro por ser tão determinada e dedicada.

Aos colegas: Natália Drummond, Natália Corado, Juliana Leme, Mirza e Thiago de Jesus, por nossas alegres conversas no Laboratório 48.

Aos amigos, que tive o prazer de conhecer durante estes anos de graduação e que ficarão para sempre em meu coração.

“Nada se assemelha à alma como a abelha. Esta voa de flor para flor, aquela de estrela para estrela. A abelha traz o mel, como a alma traz a luz.”

*Vitor Hugo*

“Se as abelhas desaparecerem, ao homem restarão apenas quatro anos de vida”.

*Albert Einstein*

## Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. O mel	3
2.2. A planta Assa Peixe	5
2.3. Composição química e propriedades do mel	7
2.4. As Propriedades Antioxidantes das Substâncias Fenólicas	9
3. OBJETIVOS	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1. Amostra de mel de Assa Peixe e padrões utilizados	18
4.2. Preparo dos extratos de mel de Assa Peixe	18
4.3. Análises cromatográficas das substâncias fenólicas nos extratos do mel	22
4.3.1. Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA)	22
4.3.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD)	23
4.4. Avaliação da Atividade Antioxidante	23
4.4.1. Verificação da atividade antioxidante por CCDA	23
4.4.2. Determinação da atividade antioxidante pelo método do DPPH	24
4.5. Determinação do teor de fenóis totais no mel	26
4.5.1. Preparo do reagente Folin-Denis	26
4.5.2. Preparo da curva analítica com ácido gálico	26
4.6. Determinação do teor de flavonóides totais no mel	27
4.6.1. Preparo da curva analítica com quercetina	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1. Preparo dos extratos do mel de Assa Peixe	28
5.2. Cromatografia em camada delgada analítica dos extratos do mel	29
5.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência dos extratos do mel	33
5.4. Determinação da atividade antioxidante do mel, dos extratos e padrões	48
5.5. Determinação do teor de fenóis totais do mel	51
5.6. Determinação do teor de flavonóides totais	54
6. CONCLUSÕES	57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

## LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt – Acetato de etila

CCDA - Cromatografia de Camada Delgada Analítica

CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência

DPPH - 2,2 difenil-1-picril-hidrazil

ELISA - Enzyme Linked Immunoabsorvent Assay

MeOH - metanol

min - minutos

mL - mililitro

nm - nanômetro

p. - página

R<sub>f</sub> - fator de retenção

t<sub>R</sub> - tempo de retenção

µm - micrômetros

UV - ultravioleta

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> A planta de Assa Peixe	6
<b>Figura 2.</b> Exemplos de alguns ácidos fenólicos e flavonóides identificados em mel	10
<b>Figura 3.</b> Estrutura química do radical DPPH	14
<b>Figura 4.</b> Formação da orto-quinona no anel B da quercetina	15
<b>Figura 5.</b> Colunas com Amberlite XAD-2 usadas na separação das substâncias fenólicas	19
<b>Figura 6.</b> Procedimento de extração líquido-líquido com éter e AcOEt	20
<b>Figura 7.</b> Preparo e análises dos extratos do mel de Assa Peixe	21
<b>Figura 8.</b> Esquema do ensaio de atividade antioxidante utilizando o espectrofotômetro ELISA (LIANDA, 2009)	25
<b>Figura 9.</b> Análise dos extratos do mel por CCDA em gel de sílica	30
<b>Figura 10.</b> Análises dos extratos (1 a 7) e os padrões: gálico, vanílico, metóxi-benzóico, meta--cumárico, ferúlico, siríngico, clorogênico, protocatecuico, cinâmico, para-hidroxi benzóico, cafeico, quercetina, miricetina e o ácido para-cumárico (nessa ordem aplicados na placa).	31
<b>Figura 11.</b> Mistura 1 analisada por CLAE-DAD -coluna analítica C-18 (25 cm x 4,6 mmx 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.	35
<b>Figura 12:</b> Estruturas das substâncias fenólicas contidas na <b>Mistura 1</b>	36
<b>Figura 13:</b> Curvas de UV dos padrões contidos na <b>Mistura 1</b> adquiridas pela análise por CLAE-DAD	38
<b>Figura 14:</b> Curvas de UV dos padrões contidos na <b>Mistura 1</b> adquiridas pela análise por CLAE-DAD	39
<b>Figura 15.</b> Extratos de mel de Assa Peixe analisados por CLAE-DAD: <b>EMM</b> . Em coluna analítica C-18 (25 cm x 4,6 mmx 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.	40

**Figura 16.** Extratos de mel de Assa Peixe analisados por CLAE-DAD: **EMAc**. Em coluna analítica C-18 (25 cm x 4,6 mmx 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. 41

**Figura 17.** Extratos de mel de Assa Peixe analisados por CLAE-DAD: **EMAc2**. Em coluna analítica C-18 (25 cm x 4,6 mmx 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. 42

**Figura 18.** Extratos de mel de Assa Peixe analisados por CLAE-DAD: **EMpE**. Em coluna analítica C-18 (25 cm x 4,6 mmx 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. 43

**Figura 19.** Extratos de mel de Assa Peixe analisados por CLAE-DAD: **EMpA**. Em coluna analítica C-18 (25 cm x 4,6 mmx 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. 44

**Figura 20.** Extratos de mel de Assa Peixe analisados por CLAE-DAD: **EMeUs**. Em coluna analítica C-18 (25 cm x 4,6 mmx 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. 45

**Figura 21.** Extratos de mel de Assa Peixe analisados por CLAE-DAD: **EMAus**. Em coluna analítica C-18 (25 cm x 4,6 mmx 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. 46

**Figura 22.** Cromatograma dos padrões e extratos de mel 1-7 (**EMM**, **EMpAc**, **EMpE**, **EMAus**, **EMeUs**, **EMAc**, **EMAc2**) revelados com solução 1% de DPPH em metanol 49

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Composição fundamental do mel (WHITE, 1979)	8
<b>Tabela 2.</b> Substâncias fenólicas identificadas nos méis silvestres, Assa Peixe e Macieira (MONTAGNI, 2005)	16
<b>Tabela 3.</b> Massas obtidas para os extratos do mel de Assa Peixe	22
<b>Tabela 4.</b> Testes para a determinação de ácidos fenólicos (TUZEN e OZDEMIR, 2003)	
<b>Tabela 5.</b> Ácidos fenólicos analisados por CCDA nos extratos do mel de Assa Peixe	32
<b>Tabela 6.</b> Flavonóides analisados por CCDA nos extratos do mel de Assa Peixe	32
<b>Tabela 7.</b> Tempos de retenção ( $t_R$ ) e comprimentos de onda ( $\lambda_{max}$ ) das substâncias contidas na mistura 1 analisadas por CLAE-DAD	37
<b>Tabela 8.</b> Substâncias fenólicas identificadas por CLAE-DAD nos extratos do mel de Assa Peixe	47
<b>Tabela 9.</b> Valores de $CE_{50}$ ( $\mu M$ e $\mu g.mL^{-1}$ ) obtidos para os padrões das substâncias fenólicas nos ensaios de atividade antioxidante pelo método do DPPH, suas médias e desvios padrão (LIANDA, 2009)	50
<b>Tabela 10.</b> Resultados da atividade antioxidante ( $CE_{50}$ ) para cada extrato e para mel de Assa Peixe	50
<b>Tabela 11.</b> Valores das absorvâncias (triplicata), médias e desvios padrão do mel de Assa Peixe nos ensaios de Folin-Denis	52
<b>Tabela 12.</b> Valores de A e B pra construção das curvas de ácidos fenólicos (VIANNA, 2009)	52
<b>Tabela 13.</b> Teores de Ácidos Fenólicos Individuais no mel de Assa Peixe (mg/100 g de mel)	54
<b>Tabela 14.</b> Valores das absorvâncias (triplicata), médias e desvios padrão, do mel de Assa Peixe nos ensaios com cloreto de alumínio	55
<b>Tabela 15.</b> Valores de A e B na construção das curvas de flavonóides (OLIVEIRA, 2009)	55
<b>Tabela 16.</b> Valores obtidos para teores de flavonóides totais (mg/100g de mel) para as amostras de mel de Assa Peixe usando cloreto de alumínio	55

## 1. INTRODUÇÃO

De acordo com as pesquisas de WIESE (1995), as abelhas existem em nosso planeta há milhares de anos, mas somente muito tempo depois os egípcios, gregos e romanos registraram os primeiros contatos com as abelhas do gênero *Apis*. Ao se familiarizarem com o inseto, estes povos obtiveram o seu primeiro edulcorante ou adoçante natural, além da cera e o própolis, com a qual realizavam vários trabalhos, entre os quais o principal era embalsamar seus falecidos nobres e reis.

Segundo o mesmo autor, as abelhas do gênero *Apis* não são nativas em nosso continente. Estas vieram do continente Europeu, em 1839, quando o Padre Antônio Carneiro conseguiu a autorização do Rei Dom Pedro II para importar para o estado do Rio de Janeiro algumas espécies de *Apis mellifera mellifera*. GONÇALVES (1998) relata que em 1956 foram introduzidas no Brasil as abelhas africanas *Apis mellifera scutellata* pelo Prof. Warwick Estevam Kerr, esta abelha hoje é mais conhecida como africanizada, que é um polihíbrido resultante do cruzamento da africana *Apis mellifera scutellata* com as demais subespécies de abelhas melíferas européias aqui existentes, a italiana *Apis mellifera ligustica*, a alemã *Apis mellifera mellifera* e a austríaca *Apis mellifera carnica*.

O Brasil tem um grande potencial apícola devido à sua flora ser bastante diversificada, por sua extensão territorial e pela variabilidade climática existente, possibilitando assim produzir mel o ano todo, o que o diferencia dos demais países que, normalmente, colhem mel uma vez por ano.

Mel é um néctar coletado de muitas plantas e processado pelas abelhas (*Apis mellifera*). Este produto natural é largamente apreciado como a única forma concentrada de açúcar disponível no mundo todo (FAO, 1996) e é também usado como um conservante da comida (CHERBULIEZ & DOMEREGO, 2003).

Na legislação brasileira (Instrução Normativa nº 11, 20.10.2000) , “entende-se por mel o 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 que ficam sobre partes vivas de plantas, que as abelhas recolhem, transformam, combinam com substâncias específicas próprias, armazenam e deixam maturar nos favos da colméia” (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA).

O mel é um dos mais antigos produtos naturais e dos melhores que o homem tem conhecido como edulcorante. Lamentavelmente, durante o transcorrer dos tempos, esse excepcional alimento vem sofrendo adulterações mediante a mistura com açúcar de cana ou glicose, por falsificadores que, a procura de lucros fáceis, compromete no entanto, a saúde dos consumidores (WIESE, 1986).

O mel é o produto mais importante da atividade apícola no Brasil, do ponto de vista quantitativo e econômico. A história do uso do mel está paralela à história do homem, e em cada cultura a evidência disto pode ser encontrada no seu uso como uma fonte de alimento e como um símbolo empregado em cerimônias religiosas, mágicas e terapêuticas (CARTLAND, 1970; CRANE, 1980; ZWAENEPREL, 1984).

Atrás da aparente simplicidade do mel, esconde-se um dos produtos biológicos mais complexos. O seu valor comercial está relacionado à sua origem floral, que é um dos principais parâmetros de qualidade. Alguns méis monoflorais são mais apreciados do que outros devido às suas propriedades de aroma e sabor, bem como atributos farmacológicos (LIANDA, 2004).

Dentro desse contexto, neste trabalho buscou-se analisar o perfil das substâncias fenólicas presentes no mel de Assa Peixe (monofloral) proveniente de São Lourenço/MG, bem como avaliar a sua atividade antioxidante. Este mel se caracteriza por ter uma coloração amarela clara e alta viscosidade.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. O mel

O mel, que é usado como alimento pelo homem desde a pré-história, por vários séculos foi retirado dos enxames de forma extrativista e predatória, muitas vezes causando danos ao meio ambiente e matando as abelhas. Entretanto, com o tempo, o homem foi aprendendo a proteger seus enxames, a mantê-los em colméias racionais e manejá-los para obter maior produção de mel sem causar prejuízo para as abelhas (CAMARGO et al., 2003).

Hoje, além do mel, é possível explorar, com a criação racional das abelhas, produtos como: pólen apícola, cera, própolis, geléia real, apitoxina, rainhas e polinização (LIANDA et al., 2009).

De acordo com os estudos de WIESE (2000), foi constatado que a pastagem apícola representa o campo floral ou a vegetação com flores para o suprimento de néctar e pólen para as abelhas. É necessária para a elaboração do mel, da cera, coleta da própolis e preparo da geléia real. Sendo que, esta pastagem pode ser vegetação nativa, áreas reflorestadas e/ou culturas.

Segundo SANCHEZ (1997), o produtor deve observar, de acordo com as características da região, onde será implantado o apiário e quais as plantas são boas produtoras de pólen e néctar. Este também deve dar preferência às plantas que produzem flores o ano todo, ou boa parte dele. Algumas plantas boas produtoras de néctar e pólen, são: abacateiro, alfafa, algaroba, amor agarradinho, assa peixe, cafeeiro, girassol, eucalipto, milho, macieira, soja, etc.

O mel tem sido reportado por conter cerca de 200 substâncias (mistura complexa de açúcares, mas também pequenas quantidades de outros constituintes tais como, minerais, proteínas, vitaminas, ácidos orgânicos, flavonóides, ácidos fenólicos, enzimas e outros fitoquímicos), e é considerada uma importante parte da medicina tradicional (WHITE, 1979). Ele tem sido usado na etnomedicina desde o início da humanidade, e em tempos mais recentes seu papel no tratamento de queimaduras, desordens gastrointestinais, asma, feridas crônicas e infectadas, úlceras de pele, catarata e outros problemas dos olhos têm sido redescobertos (CASTALDO & CAPASSO, 2002; MARCUCCI, 1995; MOLAN, 1992; ORHAN et al., 2003). Este papel benéfico é atribuído parcialmente às suas

atividades antibacterianas. Além disso, serve como fonte de antioxidantes, o qual executa um importante papel na preservação dos alimentos e na saúde humana combatendo os danos causados pelos agentes oxidantes, por exemplo, oxigênio, reduzindo o risco de desordens do coração, câncer, declínio do sistema de imunização, diferentes processos inflamatórios, etc. (THE NATIONAL HONEY BOARD, 2003).

O mel é riquíssimo em elementos nutritivos, devendo constar na dieta de todos, principalmente daqueles que sofrem de estresse e cansaço, com exceção de pessoas diabéticas. Contém água, glicose, sacarose, potássio, ferro, sódio, enxofre, cloro, cálcio, magnésio, fósforo, zinco, vitaminas do complexo B, vitaminas A, E, C e substâncias que agem como antibióticos naturais ([http://www.acesa.com/arquivo/viver/nutricao-Mel\\_Curiosidades/](http://www.acesa.com/arquivo/viver/nutricao-Mel_Curiosidades/)). Ajuda a desintoxicar e favorece a digestão, sem sobrecarregar o organismo, podendo ser usado na combinação com frutas, leite, iogurte, pães e biscoitos. É um dos melhores e mais eficientes contra os efeitos da gripe e resfriados, e é também um ótimo complemento alimentar.

O sabor, aroma, cor e densidade do mel variam de acordo com a sua origem botânica, clima, solo, umidade, altitude e por fim até a manipulação do apicultor pode alterar as características do mel (BARTH, 1989; 2004).

O mel é classificado, na maioria das vezes, de acordo com as plantas utilizadas na sua elaboração. Características físico-químicas constantes tais como consistência, cor, odor, sabor e aromas ocorrem somente em méis chamados monoflorais ou uniflorais, isto é, aqueles procedentes, principalmente, do néctar de uma só espécie vegetal, por exemplo, mel de laranjeira, mel de eucalipto, mel de Assa Peixe, etc. De outro lado, estão os méis multiflorais, ou poliflorais, ou heteroflorais, também chamados de silvestres, não sendo constantes as suas características; são menos apreciados pelos consumidores. E ainda, os méis extraflorais, chamados de méis de melato (“honeydew”), são méis obtidos a partir de excreção de insetos sugadores de plantas, além dos méis de seiva (cana) (SAWYER, 1975).

Quanto ao estado físico os méis podem ser classificados em: líquido, semi-granulado, granulado (cristalizado) e em favos.

“Mel de ervas” é um produto do tipo mel obtido das abelhas que tem o hábito alimentar baseado na sacarose contida em extratos herbais ou suco de frutas. A grande variedade do potencial de fontes dos tais aditivos derivados de plantas faz possível dar

características sensoriais específicas (cor, aroma, sabor) para os méis de ervas, os quais, então, expandem consideravelmente a gama comercial dos produtos das abelhas. Méis de ervas tem propriedades medicinais das ervas ou de outros materiais crus contidos nos alimentos fornecidos às abelhas, tornando-os de utilidade na farmácia e na medicina, como componentes das drogas, agentes profiláticos ou suplementos dietéticos. Temos por exemplo méis de laranjeira, eucalipto, assa Peixe e muitos outros. Estudos relatam que alguns desses méis atuam com benefícios específicos de acordo com sua florada, alguns exemplos:

- Mel de eucalipto: ajuda a combater a bronquite, a tosse e asma.
- Mel de laranja: regulador do intestino, tranquilizante natural.
- Mel de Assa Peixe: tônico e depurativo do sangue, calmante.
- Mel silvestre: recomendado para o sistema nervoso, vias respiratórias e pele; é também calmante, laxante, desintoxicante (MENDES & COELHO, 1983).

O Brasil é, atualmente, o décimo primeiro produtor mundial de mel, ficando atrás da China, Estados Unidos, Turquia, Argentina, México e Canadá (CAMARGO et al., 2003).

## **2.2. A Planta Assa Peixe**

*Vernonia polifanthes* Less (Asteraceae), popularmente conhecida como Assa Peixe, Assa Peixe branco, estanca sangue, tramanhém, mata pasto, cambará guaçu, cambará do branco, erva preá e enxuga é uma planta silvestre comum nos cerrados de São Paulo, Mato Grosso, Minas Gerais e Goiás. Multiplica-se com facilidade em terrenos de pastagens e solos poucos férteis, nas beiras de estradas, nos lugares abertos sendo, até mesmo, considerada planta daninha nas culturas perenes (ALZUGARAY & ALZUGARAY, 1984).

A espécie é considerada como fornecedora de bom mel, sendo procurada pelas abelhas, tanto pelo néctar como pelo pólen (WIESE, 1983). As suas folhas são utilizadas no tratamento de afecções do aparelho respiratório, de problemas renais, de feridas e fraturas e em torções, contusões e luxações, e ainda, indicada como tônica, emenagoga e diurética (GRANDE et. al., 1989) (Figura 1).



**Figura 1.** A planta de Assa Peixe (Fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/AssaPeixe>)

As suas folhas são empregadas na medicina popular em casos de gripes, resfriados, tosses, bronquite, contusões, hemorróidas e infecções do útero (MARTINS et al, 2000). Além da sua utilização na medicina popular, ela é um problema para as pastagens e lavouras, pois é considerada uma erva daninha muito resistente e de difícil controle. Um levantamento bibliográfico de algumas espécies evidenciou a deficiência de artigos relacionados ao estudo fitoquímico e até mesmo biológico desta planta (OLGUIN et al, 2005).

Curiosamente, as inflorescências do assa peixe, tende a ser sextavada, como os favos das colméias; e é uma das plantas mais frequentada pelas abelhas que dele produzem um mel muito saboroso e aromático (MARCIANO, 2008).

O mel das abelhas criadas junto a plantações de Assa Peixe é delicioso, com sabor leve como o mel de laranjeira. Rica em sais minerais e diurética, a erva também tem ação balsâmica e expectorante. A folha do Assa Peixe ajuda a combater as afecções da pele, bronquite, cálculos renais, dores musculares, gripes, pneumonia, retenção de líquidos e até tosse. Apresenta-se no mel produzido nesta região ora como pólen dominante, ora como pólen acessório. A coloração do mel depende quase que, exclusivamente, da origem da flor, podendo ser claro, vermelho, dourado ou escuro. Dependendo da coloração, o sabor e o aroma sofrem alterações, porém o seu valor nutritivo deve ser mantido.

### 2.3. Composição química e propriedades do mel

A composição básica do mel é uma solução de açúcares que constitui cerca de 79% do seu peso, sendo: 18% de água, 31% de glicose, 38% de frutose, 10% de outros açúcares e 3% de outras substâncias (HOOPER, 1981).

A parte que torna o mel único é a vasta mistura de substâncias contidas em 3% de sua composição, onde se incluem substâncias como vitaminas, minerais, pigmentos, enzimas, ácidos orgânicos, flavonóides e outras substâncias biologicamente ativas (HOOPER, 1981).

Ao todo já foram encontradas mais de 180 substâncias em diferentes tipos de méis (CRANE, 1996; WHITE, 1979). Sua composição, cor, aroma e sabor dependem, principalmente, das floradas, das regiões geográficas, do clima e da espécie de abelha (ANKLAM, 1998; FELSNER, 2001). Alguns dos componentes são devido à maturação do mel, alguns são adicionados pela abelha e alguns são derivados das plantas. Pequenas alterações na composição química do mel podem ser atribuídas aos efeitos de processamento e estocagem (TAN et al., 1989; FELSNER, 2001).

O mel contém menos que 0,3% de aminoácidos, sendo a prolina o mais abundante. O pólen é a principal fonte de aminoácidos, que também podem ser originados do néctar, do melato e das abelhas (WHITE, 1979).

Embora em concentrações ínfimas, vitaminas, tais como: B1, B2, B3, B5, B6, B8, B9, C e D também são encontradas no mel, sendo facilmente assimiláveis pela associação a outras substâncias como os carboidratos, sais minerais, oligoelementos, ácidos orgânicos e outros (CRANE, 1985).

O conteúdo de água do mel pode variar de 15 a 21%, sendo normalmente encontrados níveis de 17% (MENDES & COELHO, 1983). Apesar da legislação brasileira permitir um valor máximo de 20%, valores acima de 18% já podem comprometer sua qualidade final. Entretanto, níveis bem acima desses valores já foram encontrados por diversos pesquisadores em diferentes tipos de mel (CORTOPASSI-LAURINO & GELLY, 1991; AZEREDO et al., 1999; MARCHINI, 2001).

A cristalização ou granulação do mel acontece pela separação da glicose, que é menos solúvel na água do que a frutose, e é dependente dos seguintes fatores: origem botânica (flor), temperatura ambiente e teor de umidade do mel. O pseudo mel (falso mel) não cristaliza (WIESE, 2000).

Na tabela abaixo são apresentadas as médias dos principais constituintes do mel de acordo com WHITE, 1979.

**Tabela 1.** Composição fundamental do mel (WHITE, 1979).

Componentes	Média	Desvio padrão	Variação
Umidade (%)	17,2	1,46	13,4 - 22,9
Frutose (%)	38,19	2,07	27,25 - 44,26
Glicose (%)	31,28	3,03	22,03 - 40,75
Sacarose (%)	1,31	0,95	0,25 - 7,57
Maltose (%)	7,31	2,09	2,74 - 15,98
Açúcares totais (%)	1,50	1,03	0,13 - 8,49
Outros (%)	3,1	1,97	0,0 - 13,2
pH	3,91	-	3,42 - 6,10
Acidez livre (meq·kg <sup>-1</sup> )	22,03	8,22	6,75 - 47,19
Lactose (meq·kg <sup>-1</sup> )	7,11	3,52	0,00 - 18,76
Acidez total (meq·kg <sup>-1</sup> )	29,12	10,33	8,68 - 59,49
Lactose/Acidez livre	0,335	0,135	0,00 - 0,950
Cinzas (%)	0,169	0,15	0,020 - 1,028
Nitrogênio (%)	0,041	0,026	0,00 - 0,133
Diastase	20,8	9,76	2,1 - 61,2

Os derivados de ácidos fenólicos também devem ser destacados, visto que muitos deles são importantes por conferir aroma e sabor. Segundo AMIOT et al. (1989) os compostos fenólicos de méis podem ser divididos em três grupos: ácidos benzóicos e seus ésteres; ácidos cinâmicos e seus ésteres e flavonóides. A proporção desses três grupos varia enormemente nos méis conforme as origens florais e geográficas (LIANDA, 2009).

O mel contém nutrientes como carboidratos, proteínas, aminoácidos, lipídeos, vitaminas, além de ácidos fenólicos e flavonóides sendo um dos motivos para ser utilizado como alimento alternativo e/ou suplemento alimentar (LIANDA, 2009).

## **2.4. As Propriedades Antioxidantes das Substâncias Fenólicas**

Várias fontes de antioxidantes naturais são conhecidas e algumas são amplamente encontradas no reino vegetal. Nos últimos anos, tem-se assistido a uma intensa pesquisa sobre as propriedades antioxidantes de produtos naturais, que pode ser atribuído ao seu conteúdo de substâncias fenólicas. O conhecimento das importantes funções que os antioxidantes desempenham na inibição dos radicais livres resultantes do metabolismo celular, tem motivado o interesse pela análise destes compostos em diversos produtos alimentares. Os estudos realizados tem mostrado que os antioxidantes contribuem para a prevenção de doenças associadas ao envelhecimento, diminuindo o risco de doenças cardiovasculares e o aparecimento de câncer. Os antioxidantes atuam, também, como conservantes alimentares inibindo reações de oxidação responsáveis pela degradação dos alimentos (ANGELO & JORGE, 2007).

As substâncias fenólicas ou polifenóis são um dos mais importantes grupos de substâncias que ocorrem nas plantas e que contribuem para as propriedades antioxidantes e sensoriais (cor, aroma, adstringência) de frutas, mel, bebidas e vegetais. Essas substâncias são fruto do metabolismo secundário das plantas, isto é, produtos que não apresentam uma função direta nas atividades bioquímicas primárias, responsáveis pelo crescimento, desenvolvimento e reprodução mas estão envolvidos na adaptação a condição de estresses ambientais, seja na defesa contra a radiação ultravioleta ou agressão por patógenos (MOURE et al., 2001).

Os flavonóides e os ácidos fenólicos (derivados de ácido benzóico e cinâmico) constituem a classe mais importante de polifenóis, tendo mais de 5000 substâncias descritas na literatura (MOURE et al., 2001).

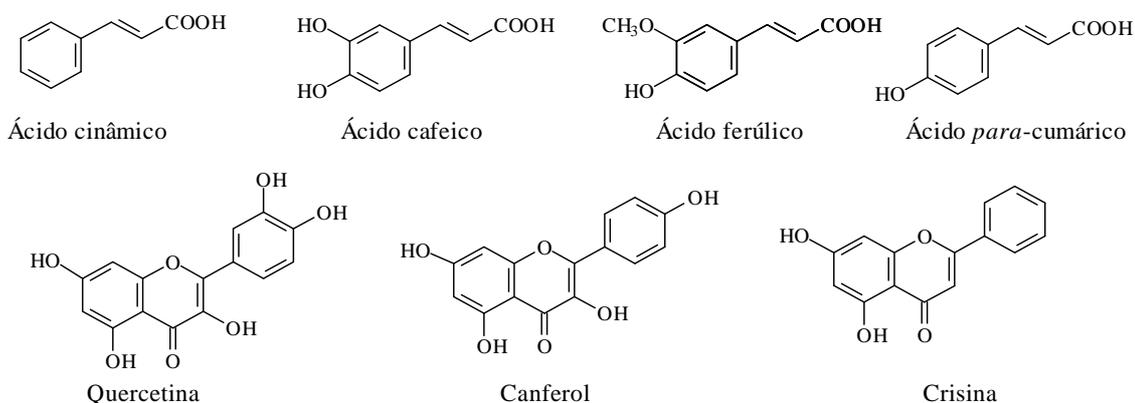
Os compostos fenólicos são estruturas químicas que apresentam hidroxilas e anéis aromáticos, nas formas simples ou de polímeros, que os confere o poder antioxidante. Esses compostos podem ser naturais ou sintéticos. Quando presentes em vegetais podem estar em formas livres ou complexadas a açúcares e proteínas. Dentre eles, destacam-se os flavonóides, os ácidos fenólicos, os taninos e os tocoferóis como os antioxidantes fenólicos mais comuns de fonte natural (ANGELO & JORGE, 2007).

Os antioxidantes podem ser divididos em duas classes: a dos com atividade enzimática e a dos sem essa atividade. Na primeira, estão os compostos capazes de bloquear a iniciação da oxidação, ou seja, as enzimas que removem as espécies reativas ao

oxigênio. Na segunda classe, estão moléculas que interagem com as espécies radicalares e são consumidas durante a reação. Nesta classificação, incluem-se os antioxidantes naturais e sintéticos como os compostos fenólicos (PIETTA, 2000).

De acordo com seu modo de ação, os antioxidantes podem ser classificados em primários e secundários. Os primários atuam interrompendo 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 o complexo lipídio-antioxidante que pode reagir com outro radical livre. Os antioxidantes secundários atuam retardando a etapa de iniciação da autoxidação, por diferentes mecanismos que incluem complexação de metais, sequestro de oxigênio, decomposição de hidroperóxidos para formar espécie não radical, absorção da radiação ultravioleta ou desativação de oxigênio singlete. Os compostos fenólicos são incluídos na categoria de interruptores de radicais livres, sendo muito eficientes na prevenção da autoxidação (SHAHIDI et al, 1992).

Diversos estudos têm comprovado a ação terapêutica do mel, existindo atualmente interesse em avaliar a sua capacidade antioxidante. O mel apresenta na sua constituição compostos que lhe podem conferir propriedades antioxidantes, tais como os ácidos fenólicos e os flavonóides. Algumas destas substâncias já foram identificadas no mel, como, por exemplo, os ácidos cinâmico, cafeico, ferúlico e *para*-cumárico, a quercetina, a crisina e o canferol (Figura 2); (TOMÁS-BARBERÁN, 2001; LIANDA, 2008; PYRZYNSKA & BIESAGA, 2009).



**Figura 2.** Exemplos de alguns ácidos fenólicos e flavonóides identificados em mel

Os flavonóides constituem uma larga família de pigmentos fenólicos encontradas nas plantas e alimentos. Eles estão geralmente presentes em baixas concentrações (~15-30

mg.kg<sup>-1</sup> de peso fresco). 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, a ação das substâncias fenólicas, como antioxidante, tem um papel importante na redução da oxidação lipídica em tecidos, vegetal e animal, pois quando incorporados na alimentação humana não conservam apenas a qualidade do alimento, mas também reduzem o risco de desenvolvimento de patologias, como arteriosclerose e câncer (RAMARATHNAM et al., 1995).

A química dos flavonóides é complexa porque na sua maioria liga-se a açúcares ou a outros grupos fenólicos. Os flavonóis são os que mais se destacam nos alimentos, sendo os principais representantes a quercetina e o canferol. As flavonas são menos comuns em frutas e vegetais e consistem, principalmente, dos glicosídeos de luteolina e apigenina (MANACH et al., 2004).

Para melhor compreender a capacidade fisiológica dos compostos fenólicos, deve-se considerar que *in vitro*, a capacidade antioxidante dos mesmos varia não somente em função da sua estrutura química, mas também devido à polaridade do solvente empregado para sua extração, dos procedimentos de isolamento e da sua pureza, bem como em função do ensaio que será desenvolvido, se em sistema aquoso ou lipídico. Alguns estudos tem sugerido que o fator determinante da atividade antioxidante das substâncias fenólicas é a natureza lipofílica das moléculas e a afinidade do antioxidante por lipídios (MOURE et al., 2001).

Quanto à solubilidade, os antioxidantes podem ser classificados em dois grupos: antioxidantes hidrofílicos, tais como vitamina C e a maioria dos compostos fenólicos, e antioxidantes lipofílicos, principalmente vitamina E e carotenóides (HUANG et al., 2002).

Até cerca dos anos 50, eram escassos artigos que relatassem o mecanismo de ação dos flavonóides e ácidos fenólicos. Contudo, hoje, inúmeros trabalhos são descritos na literatura, destacando a variedade de atividades biológicas, tais como, a inibição da proteína quinase e APTase, ação antiproliferativa, antioxidante, antiviral, antifúngica, antimicrobiana, antibacteriana e antitumoral como as mencionadas por alguns autores (CROZIER et al., 2000; WANWIMOLRUK et al., 2001; NARAYANA et al., 2001; MARCUCCI et al., 2001; HOU et al., 2003; MIORIN et al., 2003; KAMPA et al., 2004; ALJADI & KAMARUDDIN, 2004; CUSHNIE & LAMB, 2005).

A principal substância antibacteriana do mel é o peróxido de hidrogênio, cuja quantidade presente no mel é dependente tanto dos níveis de glicose-oxidase, quanto de catalase, uma vez que a catalase destrói o peróxido de hidrogênio (WESTON et al., 2000).

Peróxido de hidrogênio é um agente antimicrobiano muito conhecido, inicialmente aclamado por suas propriedades bactericidas e desinfetantes quando foi pela primeira vez avaliado em atividades clínicas (TURNER, 1983).

Segundo MOLAN (1992) e WAHDAN (1998), os responsáveis pela habilidade antimicrobiana dos méis são os fatores físicos, como sua alta osmolaridade e acidez, e os fatores químicos relacionados com a presença de substâncias inibidoras, como o peróxido de hidrogênio, os flavonóides e ácidos fenólicos.

FERRERES et al. (1991) e AMIOT et al. (1989), mostraram claramente a presença de flavonóides em mel. Entre os flavonóides presentes no mel, a flavanona pinocembrina tem sido relatada e estudada por sua atividade antibacteriana (BERAHIA et al., 1993). Outros estudos também demonstraram a presença dos flavonóides pinobanksina (RIBEIRO-CAMPOS et al., 1990), galangina e crisina (SABATIER et al., 1992), canferol (FERRERES et al., 1998) e ácido benzóico e cinâmico (WESTON et al., 1999). De acordo com MARTOS et al. (2000a), TOMÁS-BARBERÁN et al. (1993a; 1993b; 1994; 2001), GÓMEZ-CARAVACA et al., 2006; DIMITROVA et al., 2007, KENJERIC et al., 2008; KAHOUN et al., 2008 as análises de flavonóides e outros compostos fenólicos podem ser utilizados para a determinação da origem botânica e autenticidade de cada tipo de mel. Os compostos fenólicos presentes no mel podem ser originados do néctar das flores, da própolis (TOMÁS-BARBERÁN et al., 1993) e do pólen (FERRERES et al., 1993).

O mel, como uma fonte de antioxidantes, tem sido relatado como eficaz contra o escurecimento enzimático de frutas e vegetais (CHEN et al., 2000), a deterioração oxidativa de alguns alimentos (McKIBBEN & ENGESETH, 2002) e no controle do crescimento de patógenos em alimentos (TAORMINA et al., 2001). Propriedades antissépticas e antibacterianas também são atribuídas ao mel (RACOWSK et al., 2007). Sua propriedade antibacteriana foi estudada por diversos autores (WHITE & SUBERS, 1963; CORTOPASSI-LAURINO & GELLY, 1991; COOPER et al., 1999). Foram estudadas também suas ações fungicidas (EFEM et al., 1992), cicatrizante e promotora da epitelização das extremidades de feridas (EFEM, 1988).

Mais recentemente, foi descoberto que 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).

A presença de propriedades antioxidantes no mel pode ser atribuída tanto pelas substâncias enzimáticas: catalase (SCHEPARTZ, 1966), glicose oxidase e peroxidase (IOYRISH, 1974), como as não enzimáticas: ácido ascórbico, alfa-tocoferol, carotenóides, aminoácidos, proteínas, ácidos orgânicos e produtos da reação de Maillard (AL-MAMARY et al., 2002; ALJADI & KAMARUDDIN, 2004; BALTRUSAITYTE et al., 2007; BERTONCELJ et al., 2007; GHELDOF et al., 2001; GHELDOF et al., 2002; SCHRAMM et al., 2003; THE NATIONAL HONEY BOARD, 2003), e ainda pela presença de mais de 150 compostos polifenólicos, incluindo flavonóides, ácidos fenólicos (derivados de benzóico e cinâmico) e catequinas (BURATTI, BENEDETTI, & COSIO, 2007; FERRERES, TOMAS-BARBERAN et al., 1994; GHELDOF et al., 2002).

Inúmeros estudos com méis europeus têm mostrado que a presença de flavonóides, tais como: hesperitina, canferol, quercetina e crisina, bem como de ácidos fenólicos: ácido abscísico, elágico, *para*-cumárico, gálico e ferulico dão ao mel excelente capacidade antioxidante. Muitos métodos para a determinação das atividades antioxidantes no mel tem sido usados, como por exemplo, determinação da quantidade de total de fenólicos (TOMAS-BARBERAN et al., 2001; BERETTA et al., 2005; KENJERIC et al., 2008; MUÑOZ, 2007; SOCHA et al., 2009; FERREIRA et al., 2009; PICHICHERO, 2009; KUMAR & MANDAL, 2009), e formação de radical livre.

Recentemente, tem havido um aumento de interesse nos alimentos funcionais, isto é, alimentos que não somente cumprem as necessidades nutricionais básicas e energéticas, como adicionam efeitos fisiológicos benéficos. Dentre as substâncias funcionais, o grupo mais amplamente estudado são a dos antioxidantes (GÓMEZ-CARAVACA et al., 2006).

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).

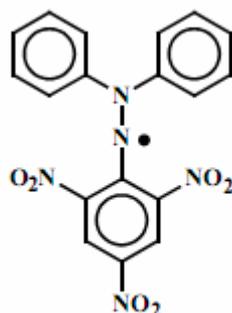
A maioria dos métodos usados para avaliar as propriedades antioxidantes envolve a geração de espécies oxidantes, geralmente radicais livres, e sua concentração é monitorada na presença de antioxidantes que os sequestram. As propriedades antioxidantes das

amostras puras e dos extratos fenólicos podem ser avaliadas através de ensaios químicos e biológicos, tais como: atividade sequestradora de radical pelo DPPH (2,2 difenil-1-picril-hidrazil), poder redutor, ensaio com  $\beta$ -caroteno, inibição da peroxidação lipídica utilizando ácido tiobarbitúrico, etc. (MILLER, 1971; NG, T. B., LIU, F., & WANG, 2000, FERREIRA et al. 2009).

Entre os métodos usuais descritos na literatura que empregam substâncias orgânicas na avaliação de sequestradores de radicais livres, o método do DPPH (2,2 difenil-1-picril-hidrazil, Figura 3) tem sido exaustivamente utilizado por vários autores, devido principalmente a sua simplicidade e rapidez (BRAND-WILLIAMS et al., 1995; ESTEVINHO et al., 2008, FERREIRA et al. 2009).

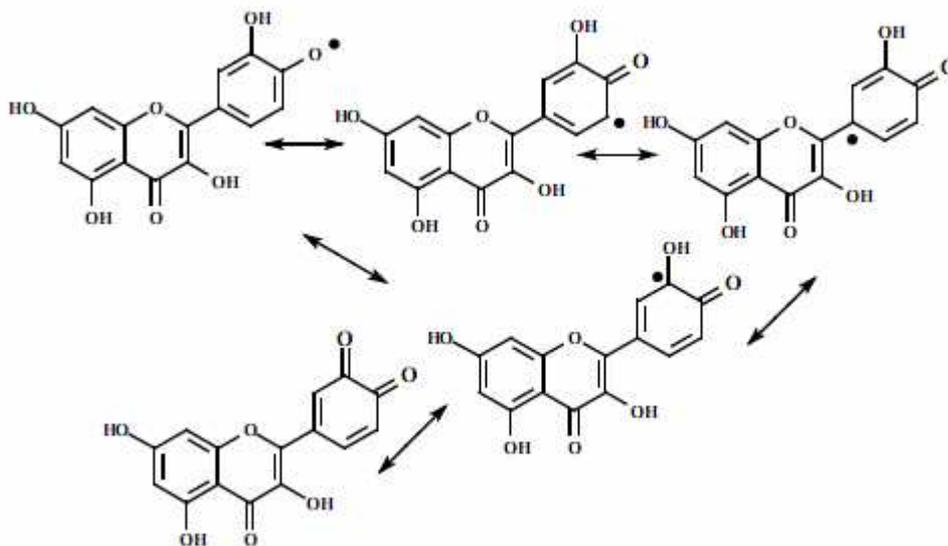
A molécula de DPPH é considerada um radical livre estável por apresentar um elétron livre que pode deslocalizar-se por toda a sua estrutura, e além do mais, não dimeriza facilmente como ocorre usualmente com os demais radicais livres. Esse efeito de ressonância que a molécula de DPPH apresenta resulta 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.

Quando a solução de DPPH é misturada com alguma substância que pode doar um radical hidrogênio, então a reação gera a sua forma reduzida com a perda da coloração violeta (embora seja esperado aparecer um resíduo de coloração amarela em virtude da presença do grupamento picril).



**Figura 3.** Estrutura química do radical DPPH (2,2 – difenil-picril-hidrazil).

Segundo TSIMOGIANNIS & OREOPOULOU (2006) a reação entre o flavonóide quercetina e o radical DPPH produz uma *orto*-quinona, menos ativa, sendo esta reação atribuída à presença das hidroxilas em posição *orto* no anel B (Figura 4).



**Figura 4.** Formação da *orto*-quinona no anel B da quercetina (LIANDA, 2009)

NARAYANA e colaboradores (2001) observaram que a quercetina, canferol, morina, miricetina e rutina, por apresentarem propriedades antioxidantes exibem diversos efeitos benéficos para a saúde, tais como antiinflamatório, antialérgico, antiviral bem como anticancerígeno. Neste trabalho a avaliação da atividade sequestrante do radical livre DPPH 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 substâncias presentes.

Diversos pesquisadores tem trabalhado na separação, identificação, quantificação e aplicação das substâncias fenólicas em alimentos, enfrentando muitos problemas metodológicos, pois, além de englobarem uma gama enorme de substâncias, são, na maioria das vezes, de grande polaridade, muito reativos e susceptíveis à ação de enzimas.

Os métodos realizados em análises de substâncias fenólicas podem ser classificados em determinação de teor de fenólicos totais, quantificação individual e/ou de um grupo ou classe de substâncias fenólicas. A análise de substâncias fenólicas é influenciada pela natureza do composto, o método de extração empregado, o tamanho da amostra, o tempo e

as condições de estocagem, o padrão utilizado e a presença de interferentes, tais como ceras, gorduras, terpenos e clorofilas.

O nosso grupo de pesquisa vem estudando os perfis cromatográficos de polifenóis em amostras de méis e pólen brasileiros de *Apis mellifera*. Até o presente momento foram realizadas análises dos méis de eucalipto e silvestres dos estados do Rio de Janeiro e São Paulo (DA SILVA 2004,); méis de laranjeira, silvestre e eucalipto do Rio de Janeiro e São Paulo (LIANDA, 2004 e 2009) e mel e pólen silvestre e de Assa Peixe, e mel de macieira, de diferentes regiões brasileiras (MONTAGNI, 2005; **Tabela 2**)

**Tabela 2.** Substâncias fenólicas identificadas nos méis silvestres, assa peixe e macieira (MONTAGNI, 2005).

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

Considerando a abundância na natureza e a importância das substâncias fenólicas devido a sua influência na qualidade dos alimentos, este trabalho apresenta um estudo de diferentes metodologias extrativas para as substâncias fenólicas em méis de Assa Peixe, e o estudo de suas propriedades antioxidantes.

### **3. OBJETIVOS**

- Avaliar diferentes procedimentos de partição líquido-líquido para ácidos fenólicos e/ou flavonóides de mel de Assa Peixe oriundo de São Lourenço/MG;
- Avaliar a composição química dos diferentes extratos do mel de Assa Peixe por meio de técnicas cromatográficas, como Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com arranjo de diodo (CLAE-DAD);
- Determinar os teores de fenóis e flavonóides totais no mel através de métodos espectrofotométricos; e
- Avaliar o potencial antioxidante do mel e dos seus extratos utilizando CCDA e o método espectrofotométrico de captura dos radicais livres com DPPH.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Amostra de mel de Assa Peixe e padrões utilizados

A amostra de mel de Assa Peixe (~1 Kg) foi adquirida de um apicultor de São Lourenço (MG) no período de agosto de 2009. A amostra de mel foi coletada diretamente da colméia pelo apicultor, através da retirada de pedaços de favos, acondicionada e armazenada em frascos de vidros limpos, a 4°C até o momento da análise.

Os padrões utilizados nas análises cromatográficas e nos ensaios de fenólicos e flavonóides foram sempre com grau de pureza elevado (~99%). Os ácidos *trans*-cinâmico, cafeico, protocatecuico, *meta*-cumárico, *orto*-cumárico e *para*-cumárico foram obtidos comercialmente da Sigma Chemical Co. (Saint Louis, MO, EUA) e os ácidos gálico, siríngico, ferúlico, sinápico, *para*-metoxi-cinâmico, *para*-metoxi-benzóico, *para*-hidroxibenzóico, *meta*-hidroxi-benzóico, vanílico e clorogênico da Merck (Darmstadt, Alemanha). Os flavonóides quercetina, morina, canferol, hesperidina, rutina, quercetina, isoquercetrina, luteolina, crisina, miricetina e naringenina, 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. Para avaliação de atividade antioxidante foi utilizado o padrão do DPPH (2,2-difenilpicril-hidrazil) obtido da Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Alemanha) também solubilizado em metanol.

### 4.2. Preparo dos extratos do mel de Assa Peixe

A primeira extração dos compostos fenólicos do mel seguiu o método descrito por FERRERES et al. 1994, 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. A solução resultante foi agitada com agitador magnético, à temperatura ambiente, até completa dissolução, em seguida o pH foi ajustado para 2,0 com HCl concentrado. A amostra fluida foi, em seguida, 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, em seguida, empacotado em uma coluna de vidro (45 x 3,5 cm; Figura 5). O material contido na coluna foi então lavado primeiramente com 100 mL de água acidificada (pH = 2 com HCl concentrado), e, subsequentemente, 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 (**EMM**) foi pesado e armazenado a 4 °C até ser utilizado no processo de extração líquido-líquido com acetato de etila ou éter (para cada solvente foi realizado todo esse procedimento para preparar o extrato metanólico).

Ao extrato metanólico (**EMM**) foram adicionados 10 mL de H<sub>2</sub>O destilada e em seguida, realizada a extração líquido-líquido com diferentes solventes:

a) Partição com éter etílico foi realizada segundo o método descrito previamente na literatura (TOMÁS-BARBERÁN et al., 2001); e

b) Partição com acetato de etila foi realizada segundo a metodologia utilizada anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa (DA SILVA, 2004; LIANDA, 2004; MONTAGNI, 2005).



**Figura 5.** Colunas com Amberlite XAD-2 usadas na separação das substâncias fenólicas

**Procedimento geral para a partição líquido-líquido:** O extrato metanólico (EMM) foi redissolvido em 10 mL de água destilada, e, em seguida, transferido para funil de separação e extraído com éter ou acetato de etila (5 x 25 mL). As fases orgânicas foram reunidas, secas com sulfato de sódio anidro e concentradas até secura em rotavapor a 40°C, e pesadas para obter os extratos etéreos (**EMpE**) e o de acetato de etila (**EMpA**). Até aqui, foram realizados três ensaios, que resultaram os três extratos com diferentes solventes: metanol (**EMM**), éter etílico (**EMpE**) e acetato de etila (**EMpA**).



**Figura 6.** Procedimento de extração líquido-líquido com éter e AcOEt.

Para a preparação do quarto e quinto extratos, foi seguido o mesmo procedimento realizado no item 4.2, porém cada extração (5 x 25 mL) com éter etílico (**EMeUs**) ou acetato de etila (**EMAus**) foi realizada em banho de ultrassom por 15 minutos.

Já no sexto extrato, para a extração das substâncias fenólicas foi seguido o método descrito por SOCHA et al (2009). Para o preparo dos extratos do mel foram pesados cerca de 50 gramas, os quais foram misturados com 70 mL de água destilada, e agitada com agitador magnético, à temperatura ambiente, até completa dissolução. A solução resultante foi em seguida transferida para funil de separação e extraída com acetato de etila (5 x 25 mL). As fases orgânicas foram reunidas, secas com sulfato de sódio anidro, concentradas até secura em rotavapor a 40°C e armazenadas a 4°C. Esse extrato foi denominado **EMAc**.

No sétimo ensaio, foi repetido o procedimento descrito acima, mas ao invés de solubilizar o mel em água destilada, ele foi solubilizado em 70 mL de água acidificada (pH = 2 com HCl concentrado). A extração também foi realizada com acetato de etila (5 x 25 mL), e o extrato no final, depois de seco e pesado, foi denominado de **EMAc2**.

Na Figura 7 estão representados os preparos dos extratos e os demais ensaios realizados (fenóis e flavonóides totais, atividade antioxidante) nesse trabalho.

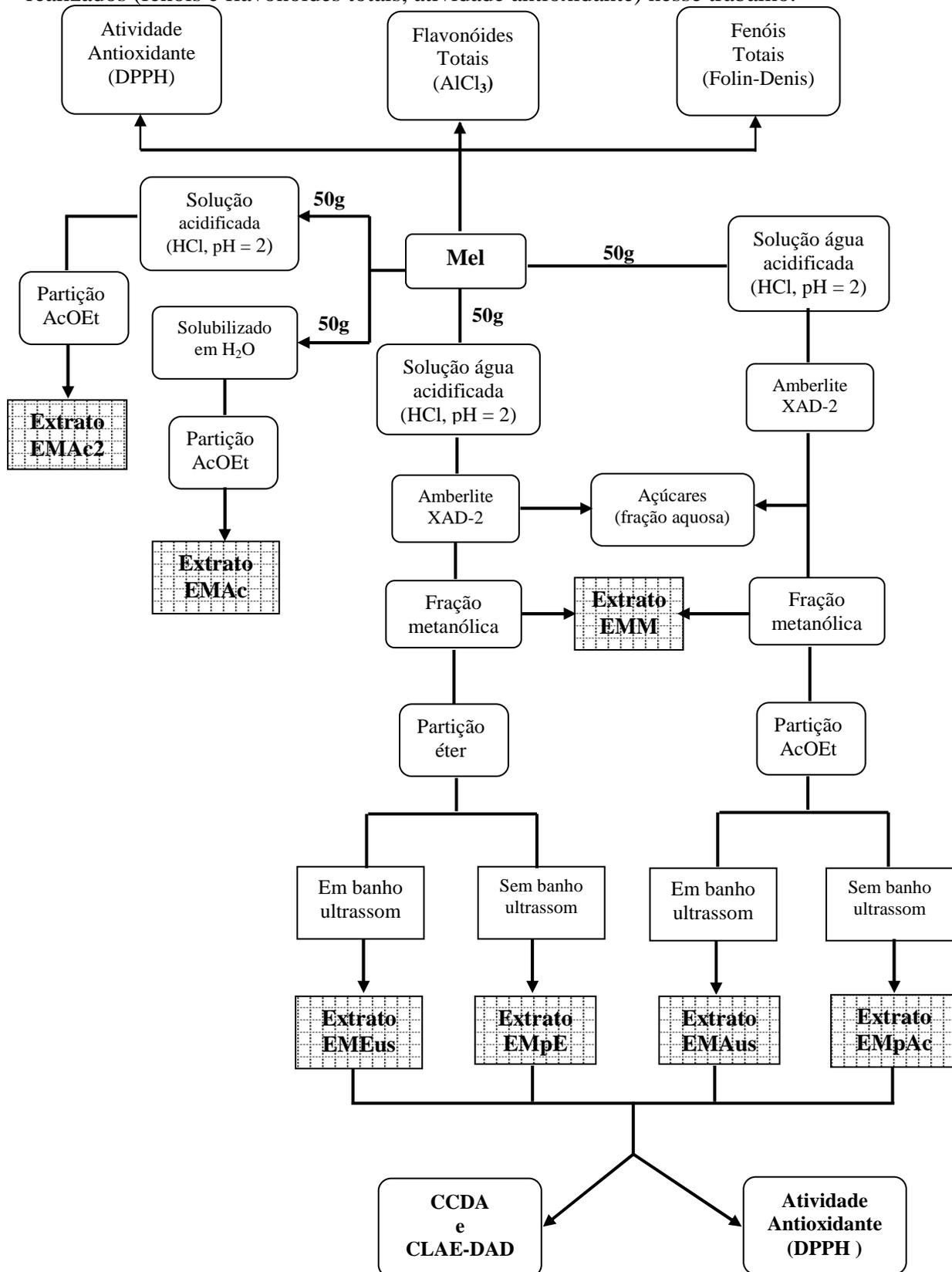


Figura 7. Preparo e análises dos extratos do mel de Assa Peixe.

Na Tabela 3 abaixo, são apresentados os extratos e as massas obtidas após os procedimentos das extrações.

**Tabela 3.** Massas obtidas para os extratos do mel de Assa Peixe

Peso do extrato	Metanol (EMM)	Acetato (EMpA)	Éter (EMpE)	Acetato/Ultrassom (EMAus)	Éter/Ultrassom (EMEus)	Água/AcOEt (EMAc)	Água Acidificada/ACOEt (EMAc2)
Massa (g)	0,0298	0,0146	0,0118	0,0132	0,0127	0,0380	0,0422

### 4.3. Análises cromatográficas das substâncias fenólicas nos extratos do mel

#### 4.3.1. Cromatografia em camada delgada analítica (CCDA)

Na análise por CCDA, realizadas pela otimização de metodologias descritas por STAHL (1969), no qual 10  $\mu$ L dos extratos fenólicos dos méis e das amostras de padrões de ácidos e flavonóides (conc. 1 mg/mL em metanol) foram aplicados em cromatofolhas de alumínio com gel de sílica 60 F254 (Merck). Como fases móveis, foram utilizados dois sistemas de eluentes, para os ácidos fenólicos e flavonóides aglicona utilizou-se o sistema de solvente: hexano: acetato de etila: ácido fórmico (17: 22: 1), e para os flavonóides glicosilados utilizou-se: clorofórmio: metanol: água: ácido fórmico (30: 18: 1: 1). A detecção das substâncias foi realizada, quando possível, sob luz UV a 254 e 365 nm. As misturas dos solventes utilizados nos processos cromatográficos foram feitas em % v/v. O ensaio foi realizado em quadruplicata para permitir a revelação das placas por nebulização com os reativos de vanilina sulfúrica (vanilina a 2 % em etanol e adicionada de 10 % de ácido sulfúrico), solução aquosa 2% de FeCl<sub>3</sub>, solução 1% de AlCl<sub>3</sub> em etanol e a mistura (1:1) de FeCl<sub>3</sub> (cloreto férrico) + K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> (ferricianeto de potássio), (STAHL, 1969). O aparecimento de colorações específicas (Tabela 3, TUZEN & OZDEMIR, 2003), após nebulização dos reativos, revelou a presença de diferentes substâncias fenólicas nos extratos analisados. Utilizaram-se, como parâmetros de avaliação, a comparação do R<sub>f</sub> (fator de retenção) e da cor desenvolvida na sequência de reveladores empregados para a detecção do perfil cromatográfico dos extratos e dos padrões.

Na Tabela 4, estão apresentados os testes com reveladores químicos para a determinação de alguns dos ácidos fenólicos por cromatografia em camada delgada analítica (TUZEN e OZDEMIR, 2003).

**Tabela 4.** Testes para a determinação de ácidos fenólicos no cromatograma

<i>Ácidos</i>	<i>FeCl<sub>3</sub></i>	<i>FeCl<sub>3</sub> + K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub></i>	<i>Vanilina + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></i>
<b>Cinâmico</b>	Amarelo escuro	Amarelo	-
<b>Ferúlico</b>	Vermelho café	Azul escuro	Lilás claro
<b>Vanílico</b>	-	Azul	Rosa
<i>para-cumárico</i>	Laranja	Azul	Lilás escuro
<i>para-hidroxi benzóico</i>	Amarelo	Azul claro	-
<b>Cafeico</b>	verde	Azul escuro	Lilás

#### 4.3.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD)

Paralelamente ao estudo por CCDA, procedeu-se à caracterização química dos extratos num cromatógrafo líquido Shimadzu, equipado com detector de arranjo de díodos. O sistema foi controlado por computador, utilizando o programa LCSolution da Shimadzu. Utilizou-se uma coluna analítica Shim-pak octadesil-C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm de partícula, da Shimadzu) sendo a temperatura da coluna de 35 °C. Como fase móvel utilizou-se uma mistura de: **A)** água + 1% de ácido acético, e **B)** metanol + acetonitrila (90:10) e um gradiente de 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. O volume injetado foi de 10 µL.

#### 4.4. Avaliação da Atividade Antioxidante

A capacidade antioxidante dos extratos foi determinada por Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA) e a capacidade de sequestro de radicais livres foi quantificada por espectrofotometria.

##### 4.4.1. Verificação da atividade antioxidante por CCDA

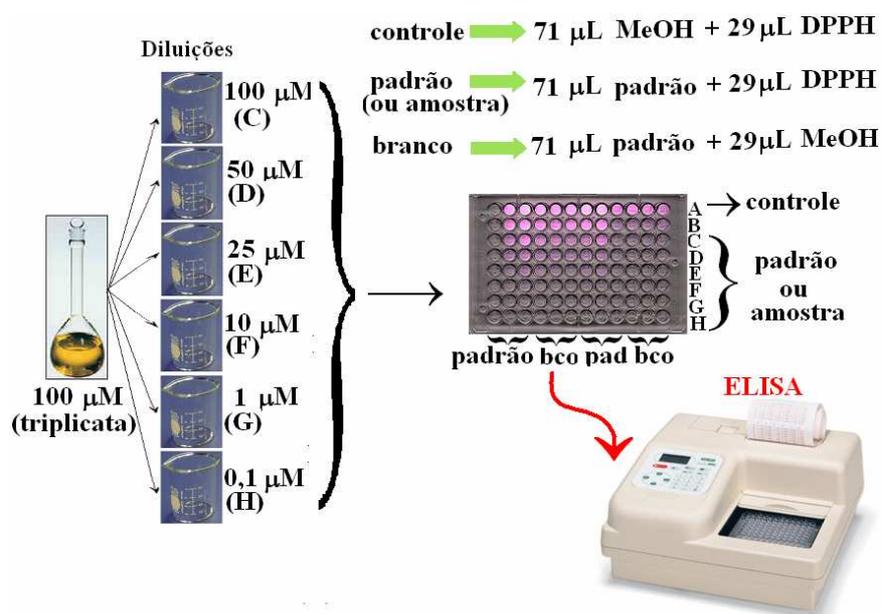
Na avaliação por cromatografia em camada analítica, foram aplicadas alíquotas dos padrões de ácidos e flavonóides e alíquotas de cada extrato de mel em placa de sílica gel 60 F254, utilizando como fase móvel hexano: acetato de etila: ácido fórmico (17:22: 1), e

como revelador, solução de 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) a 0,2% em metanol, segundo o método descrito por CERUKS et al., 2007. Cada ensaio foi efetuado em triplicada e os padrões de ácidos usados foram: *para*-metóxi-benzóico, ferúlico, siríngico, clorogênico, protocatecuico, cinâmico, *para*-hidroxi benzóico, cafeico, *para*-cumárico, gálico, vanílico, e os flavonóides quercetina e miricetina.

As substâncias com atividade antiradicalar aparecem na forma de manchas amarelas sobre fundo violeta.

#### **4.4.2. Determinação da atividade antioxidante pelo método do DPPH**

A atividade antioxidante das substâncias presente no mel de Assa Peixe e em seus extratos foi determinada segundo o método descrito MENSOR et al., 2001, com o uso de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil). Na presença de um antioxidante, a coloração púrpura do 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, bem como dos padrões comerciais, foi utilizada solução metanólica 0,3 mM de DPPH. Para a determinação da atividade antioxidante, os extratos fenólicos (em metanol) foram preparados na concentração de 0,1 mg/mL (100 µg/mL) e os méis (solubilizados em metanol : água 1:1) na concentração de 100 mg/mL. A partir da concentração inicial foram feitas diluições (50, 25, 10, 1 e 0,1 µg/mL do extrato ou mg/mL do mel) para fornecer a faixa de melhor atividade. Os ensaios foram realizados em microplacas com 96 poços de 100 µL de volume, onde foram adicionados 71 µL do extrato e 29 µL da solução metanólica 0,3mM de DPPH (Figura 3). As leituras foram feitas após 30 minutos de incubação no escuro a 520nm, em espectrofotômetro ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorvent Assay, modelo 680 microplate reader da Bio Rad). O branco específico da amostra foi determinado usando 29 µL de metanol e 71 µL da amostra de cada concentração, e o controle negativo com 29 µL de DPPH e 71 µL de metanol. Todas as determinações foram realizadas em triplicata.



**Figura 8.** Esquema do ensaio de atividade antioxidante utilizando o espectrofotômetro ELISA (LIANDA, 2009).

A atividade antioxidante (AA%) foi expressa como o percentual de inibição do radical DPPH, e calculado segundo a equação:

$$AA [\% ] = \frac{100 - (Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100}{Abs_{controle}}$$

$Abs_{amostra}$  = absorvância da amostra (mel ou extrato) com a solução de DPPH

$Abs_{branco}$  = absorvância da amostra (mel ou extrato) com metanol

$Abs_{controle}$  = absorvância do metanol com a solução de DPPH (solução controle negativo)

A atividade sequestrante 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 substâncias presentes.

#### **4.5. Determinação do teor de fenóis totais no mel**

Para a determinação do conteúdo de fenólicos totais, o método descrito por MEDA et al (2005) foi empregado, porém utilizando-se o reagente de Folin-Denis ao invés do reagente de Folin-Ciocalteu (SINGLETON & ROSSI, 1965). Soluções de méis em água na concentração de 100mg/mL foram preparadas. A uma alíquota de 0,5 mL (utilizando micropipetas de 1000 $\mu$ L) dessa solução adicionou-se 2,5 mL de Reagente de Folin-Denis, após 5 minutos adicionou-se 2,0 mL de solução recém-preparada de carbonato de sódio 14%. Manteve-se a mistura incubada por 2h, onde a coloração da solução passou de esverdeada para azul. Em seguida, fez-se a medida de sua absorvância a 760 nm, utilizando a água como branco. Foram efetuados três ensaios para cada amostra, sendo apresentada a média, expressa em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG)/100 g de mel.

##### **4.5.1. Preparo do reagente de Folin-Denis**

O reagente de Folin-Denis foi preparado, solubilizando-se 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) em 38 mL de água Milli-Q. A mistura foi mantida sob refluxo por 2 horas, em seguida resfriou-se e completou-se o volume a 50 mL em balão volumétrico, estocando no escuro. A solução apresentou coloração esverdeada (Official Methods of Analysis of the AOAC, 1950).

##### **4.5.2. Preparo da curva analítica com ácido gálico**

Foi preparada uma curva analítica a partir da solução aquosa padrão de ácido gálico (1 mg/mL  $\equiv$  0,0059 mM), a partir de alíquotas de diferentes volumes (2, 6, 8, 10, 20, 30, 50, 75 e 100  $\mu$ L) que foram misturadas com 2,5 mL do reagente de Folin-Denis, e após 5 minutos adicionou-se 2,0 mL de solução recém-preparada de carbonato de sódio 14%. As leituras foram feitas contra um branco de água. A curva analítica foi construída a partir do programa Origin 6.0 (UFRRJ), na qual foi efetuada a regressão linear e obtida a equação da reta [ $y = a + b.x$ ] relacionando concentração de ácido gálico *versus* absorvância de cada leitura a 760 nm. Através dessa equação determinou-se indiretamente o teor de fenóis

totais nas amostras, onde se substituiu y pela média da absorvância de cada amostra de mel para se calcular x (concentração).

#### **4.6. Determinação do Teor de Flavonóides Totais no Mel**

O teor de flavonóides totais foi determinado segundo metodologia descrita na literatura (MEDA et al., 2005; AHN et al., 2007, com adaptações) utilizando como reagente uma solução de cloreto de alumínio 2% em metanol. Soluções de méis em metanol: água (1:1) na concentração de 500mg/mL foram preparadas. A 3,0 ml desta solução de mel adicionou-se 3,0 mL de solução metanólica a 2% de cloreto de alumínio hidratado (Vetec). Após 30 minutos em repouso, leu-se as absorvâncias das soluções no comprimento de onda de 415 nm, contra o branco consistindo de 3 mL de metanol (MEDA et al., 2005; AHN et al., 2007).

##### **4.6.1. Preparo da curva analítica com quercetina**

A curva analítica foi feita a partir de uma solução padrão de quercetina em metanol (1,78 mg/mL  $\equiv$  0,0059 mM). Em seguida foram coletadas alíquotas da solução original com diferentes volumes (2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30 e 40  $\mu$ L), às quais foram acrescentados 3,0 mL de solução de cloreto de alumínio 2%. Após 30 minutos em repouso, leu-se as absorvâncias das soluções no comprimento de onda de 415 nm contra o branco, consistindo de 3,0 mL de solução de mel misturados a 3,0 mL de metanol sem cloreto de alumínio. 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 quercetina contra absorvância de cada leitura a 415 nm. 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).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1. Preparo dos extratos do mel de Assa Peixe

Como o mel tem uma complexa matriz e baixos níveis de concentrações de algumas substâncias polifenólicas, é necessário aplicar diversas etapas (exemplo: extração, preconcentração ou purificação) com o objetivo de se obter um extrato uniformemente enriquecido em todas as substâncias de interesse e livre de interferentes da matriz. Este procedimento é, em geral, o que consome mais tempo e o que permite o maior número de erros. Por isso, nesse trabalho pensou-se em desenvolver um método que pudesse garantir níveis consideráveis de recuperação e repetibilidade no procedimento de extração. Além disso, outro fato importante, é que o desenvolvimento de uma metodologia de extração, deve levar em conta também as questões ambientais e econômicas, no sentido de reduzir a quantidade de amostras e solventes utilizados.

O objetivo principal de uma partição é a preparação de um extrato enriquecido uniformemente em todas as substâncias de interesse e livre de interferentes presentes na matriz. Geralmente para a análise de ácidos fenólicos e flavonóides em mel, os açúcares devem ser removidos previamente. No caso da extração líquido-líquido (ELL), os solventes, comumente usados, são acetato de etila ou éter etílico.

Nos últimos anos, novos métodos de extração para flavonóides tem sido desenvolvidos [exemplos: extração assistida por microondas (MAE) e extração em banho de ultrassom (US)]. Espera-se com isso, que o tempo da extração seja drasticamente reduzido e os rendimentos para os flavonóides sejam efetivamente melhorados. Contudo, foi observado que a seletividade de MAE foi baixa, com significativa quantidade de material não-fenólico, e o longo tempo de irradiação no EU diminuiu a porcentagem de componentes extraídos, presumivelmente devido a processos de degradação. Métodos de extração alternativos, tais como extração com fluido supercrítico (SFE) e extração com líquido pressurizado (PLE), devido ao curto tempo de extração e reduzida quantidade de solvente, tem sido avaliados para o isolamento de ácidos polifenólicos e (PYRZYNSKA & BIESAGA, 2009). De acordo com TOMÁS-BARBERÁN et al (1993) e repetido em outros procedimentos, Amberlite XAD-2 adsorve as substância fenólicas, mas permite uma recuperação de 80-90%.

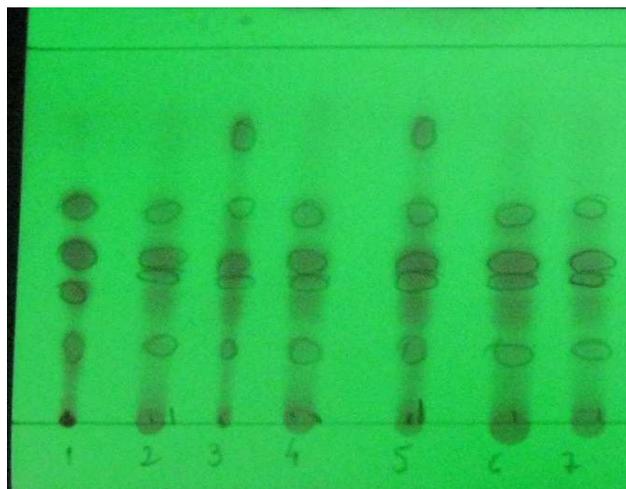
Entre as metodologias estudadas nesse trabalho foi possível observar algumas diferenças qualitativas quanto ao perfil cromatográfico das substâncias fenólicas nos diferentes extratos, por CCDA e por CLAE-DAD. Os extratos fenólicos obtidos por extração líquido-líquido (ELL), pela solubilização do mel em água acidificada (**EMAc2**) ou em água destilada (**EMAc**) e extraídos com acetato de etila, embora tenham apresentados as maiores massas (42,2 e 38,0 mg, respectivamente), quando comparados aos demais extratos (Tabela 3, p. 23), não foram os que apresentaram as maiores quantidades (em área relativa na visualização do cromatograma) de substâncias fenólicas avaliadas por CLAE-DAD. O uso de banho ultrassônico no procedimento de extração não causou nenhuma modificação significativa nas massas obtidas para os extratos **EMAus** (13,2 mg) e **EMEus** (12,7 mg) quando comparados aos procedimentos usuais de ELL (**EMpA** = 14,6 mg; **EMpE** = 11,8 mg), porém foi observado uma diminuição da porcentagem (em área relativa) dos componentes extraídos por CLAE, como relatado na literatura (PYRZYNSKA & BIESAGA, 2009). Esse procedimento permitiu uma redução no tempo gasto com a extração, bem como minimizou a formação de emulsão nos extratos, quando comparado a ELL.

A avaliação do extrato metanólico (**EMM**) obtido diretamente da coluna cromatográfica preenchida com a resina Amberlite XAD-2, resultou em uma massa levemente superior (29,8 mg) em relação aos extratos obtidos com acetato de etila ou éter, porém o perfil das substâncias fenólicas, basicamente se manteve inalterado quando analisados por CCDA e CLAE-DAD.

## 5.2. Cromatografia em camada delgada analítica dos extratos do mel

Há vários métodos e técnicas analíticas para identificação de substâncias, os quais são escolhidos avaliando desde fatores referentes à substância (propriedades químicas, físicas e biológicas) como também do método (disponibilidade, simplicidade, viabilidade financeira, adequação técnica, dentre outros). Um método muito usado para estudar o perfil das substâncias químicas presentes em extratos vegetais é a cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), porque tais substâncias estão na ordem de miligramas e por ser tal procedimento analítico mais rápido, de baixo custo, simples, e por vir a auxiliar preliminarmente, na identificação dessas substâncias.

A análise utilizando cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) em gel de sílica mostrou que os perfis cromatográficos obtidos para os sete extratos foram semelhantes qualitativamente, no que diz respeito ao aparecimento de manchas na placa quando observada sob a irradiação de 254 nm (Figura 9). O extrato em éter (**EMpE**) e o extrato em éter/ultrassom (**EMEus**) apresentaram uma mancha mais apolar quando comparados aos outros extratos (Figura 9).



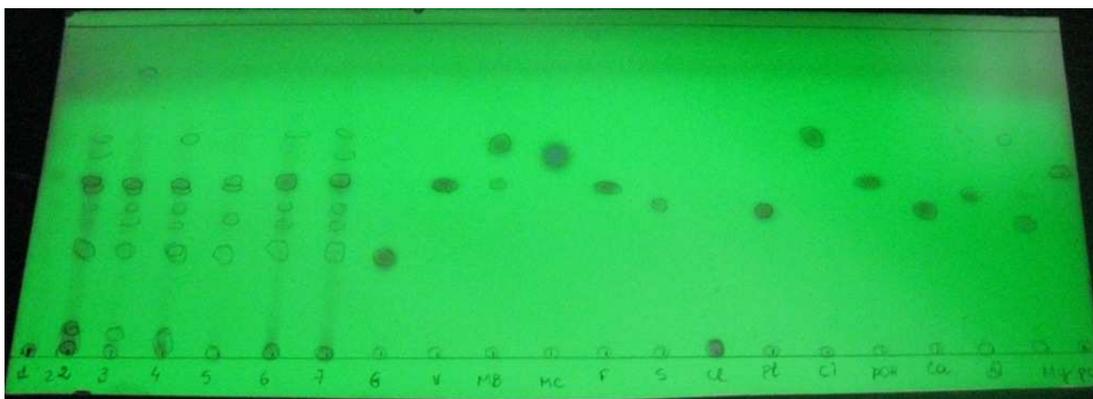
**Figura 9.** Análise dos extratos do mel por CCDA em gel de sílica. Onde os spots:

1- **EMM**; 2-**EMAus**; 3- **EMEus**; 4-**EMpAc**; 5-**EMpE**; 6- **EMAc**; 7-**EMAc2**.

A polaridade e a escolha do sistema de solvente são importantes fatores para a separação dos ácidos fenólicos por CCDA. Os resultados ( $R_f$  e cores desenvolvidas) dos extratos foram comparados com os dos padrões de ácidos e flavonóides para verificar possíveis interferências, tais como sobreposição de substâncias com  $R_{fs}$  idênticos ou similares e alteração da cor da mancha, que podem ocorrer na análise desses produtos.

A presença de ácidos fenólicos e flavonóide nos extratos foi inicialmente examinada por CCDA através da medida do fator de retenção ( $R_f$ ) e o uso de reveladores específicos (Tabela 4, p. 24). A separação dos ácidos e flavonóides nos extratos por CCDA em comparação com padrões autênticos, indicou a presença dos derivados de ácido cinâmico : ferúlico, cafeico e *para*-cumárico, e o próprio ácido cinâmico, e os derivado de ácido benzóico: gálico, vanílico, *para*-metóxi-benzóico, *para*-hidroxibenzóico, siríngico e protocatecuico. Os flavonóides crisina, apigenina, miricetina, canferol e narigenina também se mostraram presentes por CCDA.

A revelação de placas cromatográficas de camada delgada pode ser uma ferramenta muito útil na avaliação preliminar do perfil químico de um extrato bruto. Dezenas de reveladores químicos, destrutivos ou semi-destrutivos, podem ser usados em placas de CCDA e são descritos na literatura (STAHL, 1969). Sendo assim, o uso de alguns desses reveladores cromogênicos auxiliou, junto com as medidas dos fatores de retenção ( $R_f$ ), na identificação de alguns desses ácidos e flavonóides nos extratos estudados, e que foram citados acima.



**Figura 10.** Análises dos extratos (1 a 7) e os padrões: gálico, vanílico, metóxi-benzóico, *meta*-cumárico, ferúlico, sirínico, clorogênico, protocatecuico, cinâmico, *para*-hidroxibenzóico, cafeico, quercetina, miricetina e o ácido *para*-cumárico (aplicados na placa nessa ordem).

Nas Tabelas 5 e 6 estão apresentados os ácidos fenólicos e flavonóides encontrados na CCDA dos extratos. Apesar de algumas substâncias apresentarem  $R_f$  iguais (cafeico e protocatecuico, 0,44) ou bem próximos (*para*-cumárico, *para*-hidroxibenzóico e vanílico; 0,50, 0,50 e 0,51, respectivamente; Tabela 4), a identificação destas substâncias foi possível devido à diferença nas cores das manchas apresentadas em cada revelador e/ou na sequência de reveladores utilizados, bem como na análise realizado por CLAE-DAD.

**Tabela 5.** Ácidos fenólicos analisados por CCDA nos extratos do mel de Assa Peixe.

<i>Extratos</i>	<i>cafeico</i>	<i>Ferúlico</i>	<i>gálico</i>	<i>Cinâmico</i>	<i>m-cumárico</i>	<i>parametóxi-benzóico</i>	<i>p-cumárico</i>	<i>p-OH-benzóico</i>	<i>proto-catecuico</i>	<i>sinápico</i>	<i>Vanílico</i>
Metanol (EMM)	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-
AcOEt (EMpA)	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+
Éter (EMpE)	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
AcOEt/US (EMAus)	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
Éter/US (EMEus)	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+
AcOEt (EMAc)	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
pH2/AcOEt (EMAc2)	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
<b>R<sub>f</sub></b>	<b>0,44</b>	<b>0,34</b>	<b>0,29</b>	<b>0,61</b>	<b>0,58</b>	<b>0,65</b>	<b>0,51</b>	<b>0,51</b>	<b>0,44</b>	<b>0,44</b>	<b>0,50</b>

O ácido meta-cumárico mostrou uma fluorescência lilás sob a lâmpada de UV, diferentes de todos os demais, e este ácido mostrou-se ausente nos sete extratos avaliados

**Tabela 6.** Flavonóides analisados por CCDA nos extratos do mel de Assa Peixe

<i>Extratos</i>	<i>Narigenina</i>	<i>Luteonina</i>	<i>Crisina</i>	<i>Miricetina</i>	<i>Canferol</i>	<i>Apigenina</i>	<i>Quercetina</i>
Metanol (EMM)	-	+	+	-	+	-	-
AcOEt (EMpA)	-	-	-	+	-	+	-
Éter (EMpE)	-	-	-	-	-	+	-
AcOEt/Ultrassom (EMAus)	+	-	-	-	-	+	-
Éter/Ultrassom (EMEus)	+	-	-	+	-	+	-
Água/AcOEt (EMAc)	+	-	-	-	+	+	-
pH2/ACOEt (EMAc2)	-	-	-	+	-	+	-
<b>R<sub>f</sub></b>	<b>0,57</b>	<b>0,42</b>	<b>0,64</b>	<b>0,36</b>	<b>0,51</b>	<b>0,49</b>	<b>0,46</b>

As substâncias fenólicas presentes no mel podem ser originadas do néctar das flores, da própolis (TOMÁS-BARBERÁN et al., 1993) e do pólen (FERRERES et al., 1993).

As análises utilizando cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), mostraram que o extrato em água destilada (**EMAc**) e o extrato em água acidificada (**EMAc2**), ambos usando acetato de etila, apresentaram o maior número de substâncias fenólicas, quando comparados aos padrões de ácidos fenólicos e flavonóides. Os extratos **EMpE**, **EMAc**, **EMc2** foram os que mais indicaram a presença de ácidos fenólicos, enquanto para flavonóides, os extratos **EMM** e **EMEus** foram os mais representativos.

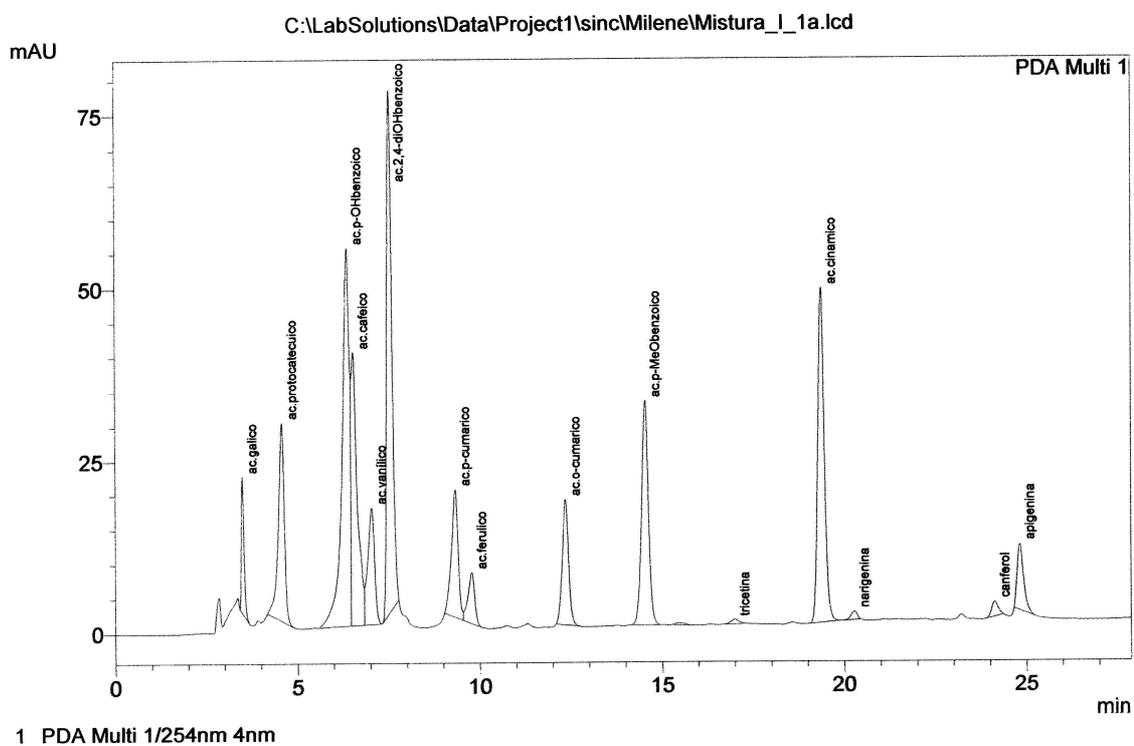
### 5.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência dos extratos de mel

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 adicionados à fase aquosa para manter o pH apropriado 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).

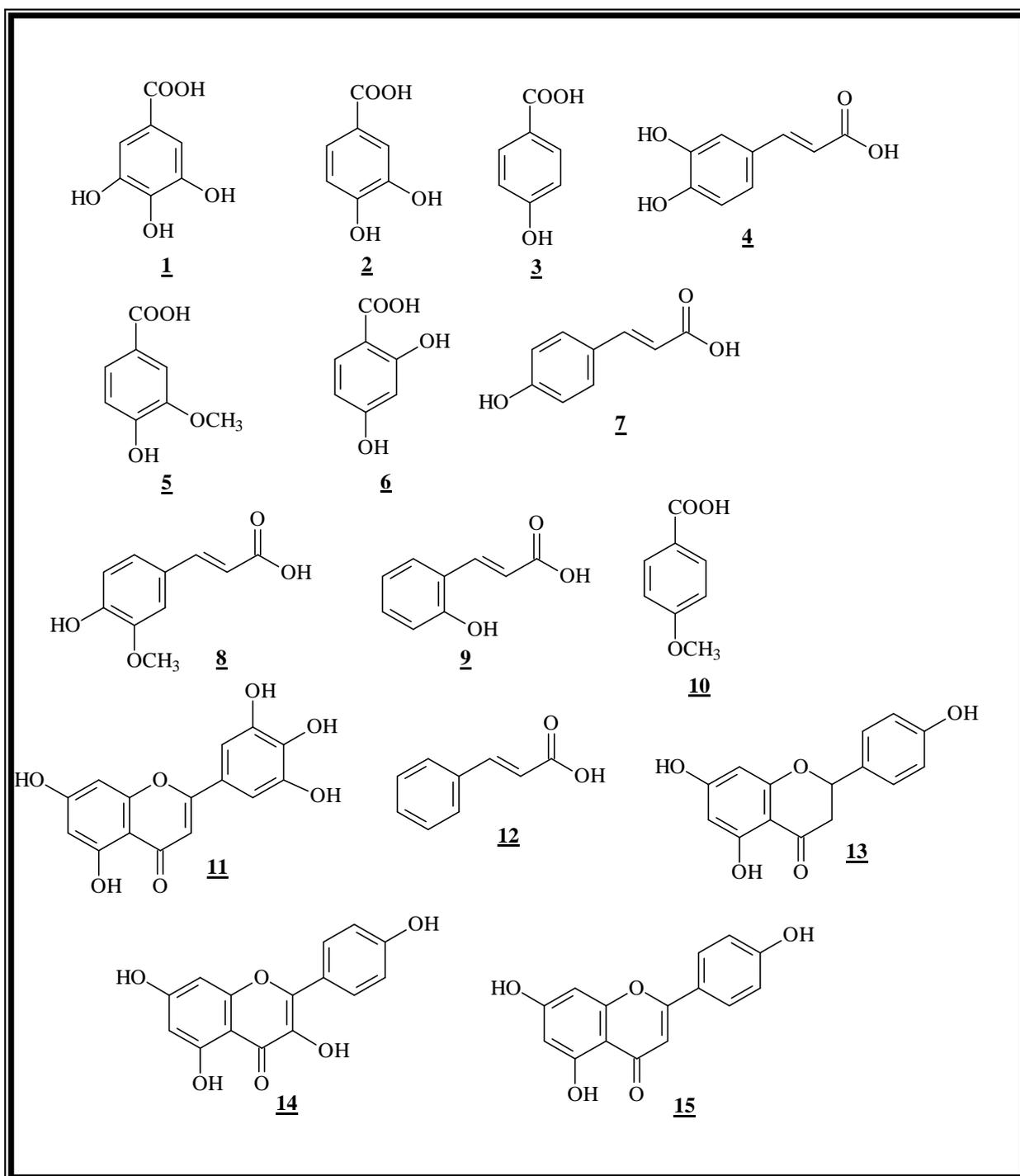
Em CLAE a detecção de substâncias fenólicas é tipicamente baseada na medida de absorção por ultravioleta, frequentemente usando um detector de arranjo de fotodiodo (DAD). A combinação de ambos o espectro de UV-Vis e o tempo de retenção ( $t_R$ ) pode conduzir mais facilmente a identificação das substâncias 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 4.3.2. 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 cromatoplaças 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 por CLAE-DAD individualmente, para terem seus tempos de retenção e as suas curvas de UV determinadas, e posteriormente foram reunidos para comporem a **Mistura 1**. A composição desta mistura contendo os ácidos e flavonóides (Figura 11) teve como base os resultados de CCDA ( $R_f$  e cores desenvolvidas) obtidos para os extratos quando estes foram comparados aos dos padrões das substâncias fenólicas e aos trabalhos realizados pelo nosso grupo anteriormente (DA SILVA, 2004, MONTAGNI, 2005, LIANDA 2004 e 2009). As informações obtidas no cromatograma da **Mistura 1**, tempos de retenção e as curvas de UV dos padrões (Tabela 7, p.38 e Figuras 13 e 14, ps. 39 e 40), foram utilizadas posteriormente, para identificar nos extratos de mel as substâncias desconhecidas. Na Tabela 7 foram reunidos os tempos de retenção e os respectivos comprimentos de onda de cada padrão na **Mistura 1** para facilitar a comparação com os dados obtidos nas amostras dos méis. O cromatograma obtido para a **Mistura 1** está na Figura 11 e as estruturas das substâncias fenólicas que a compõem estão na Figura 12, p. 35 e p. 36.



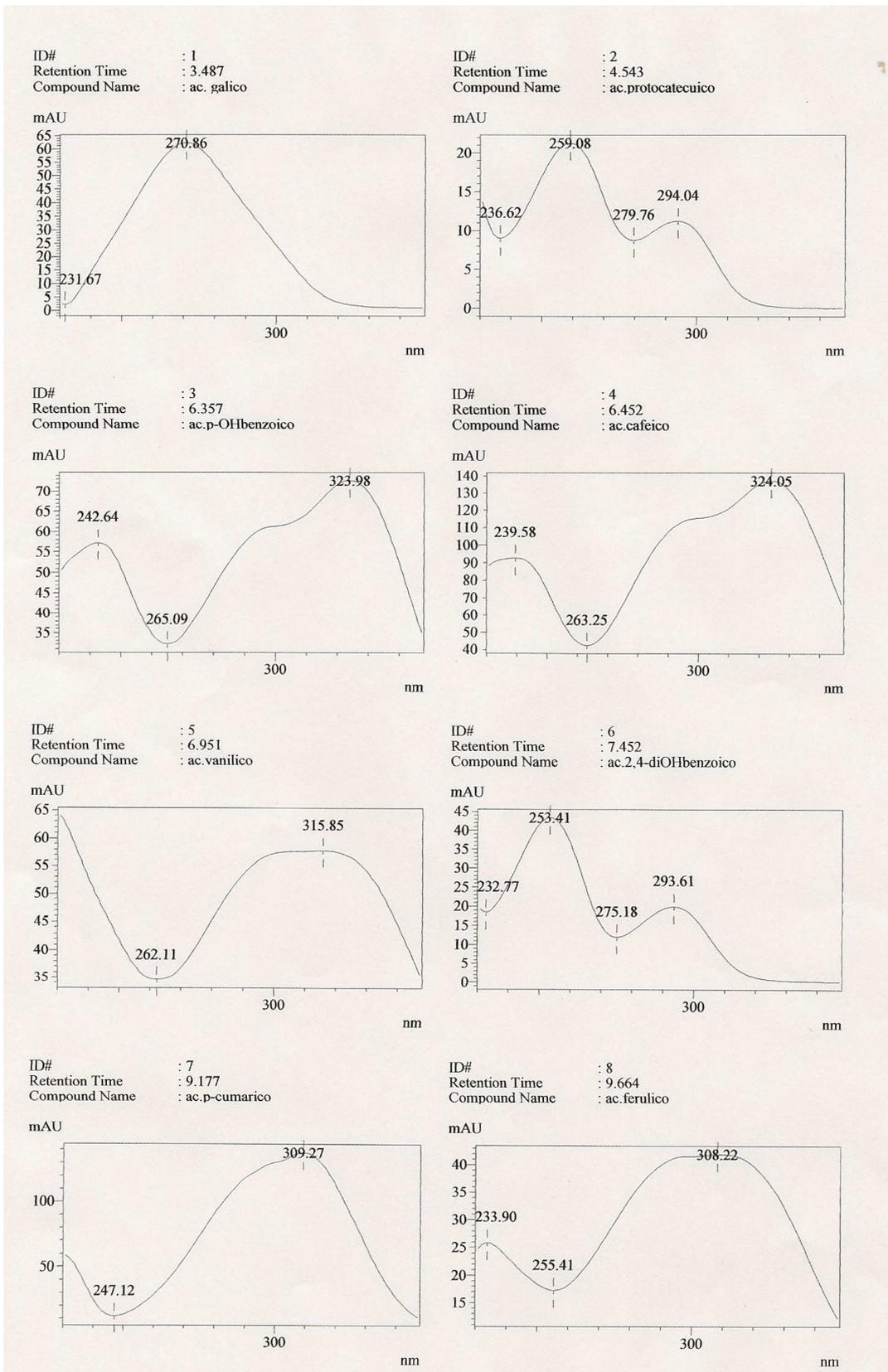
**Figura 11.** Mistura 1 analisada por CLAE-DAD -coluna analítica C-18 (25 cm x 4,6 mm x 5 µm), fluxo de 1,0 mL.min-1, fase móvel metanol: acetonitrila (90:10)-solvente B e água: ácido acético (99:1 - solvente A), 200-400 nm.



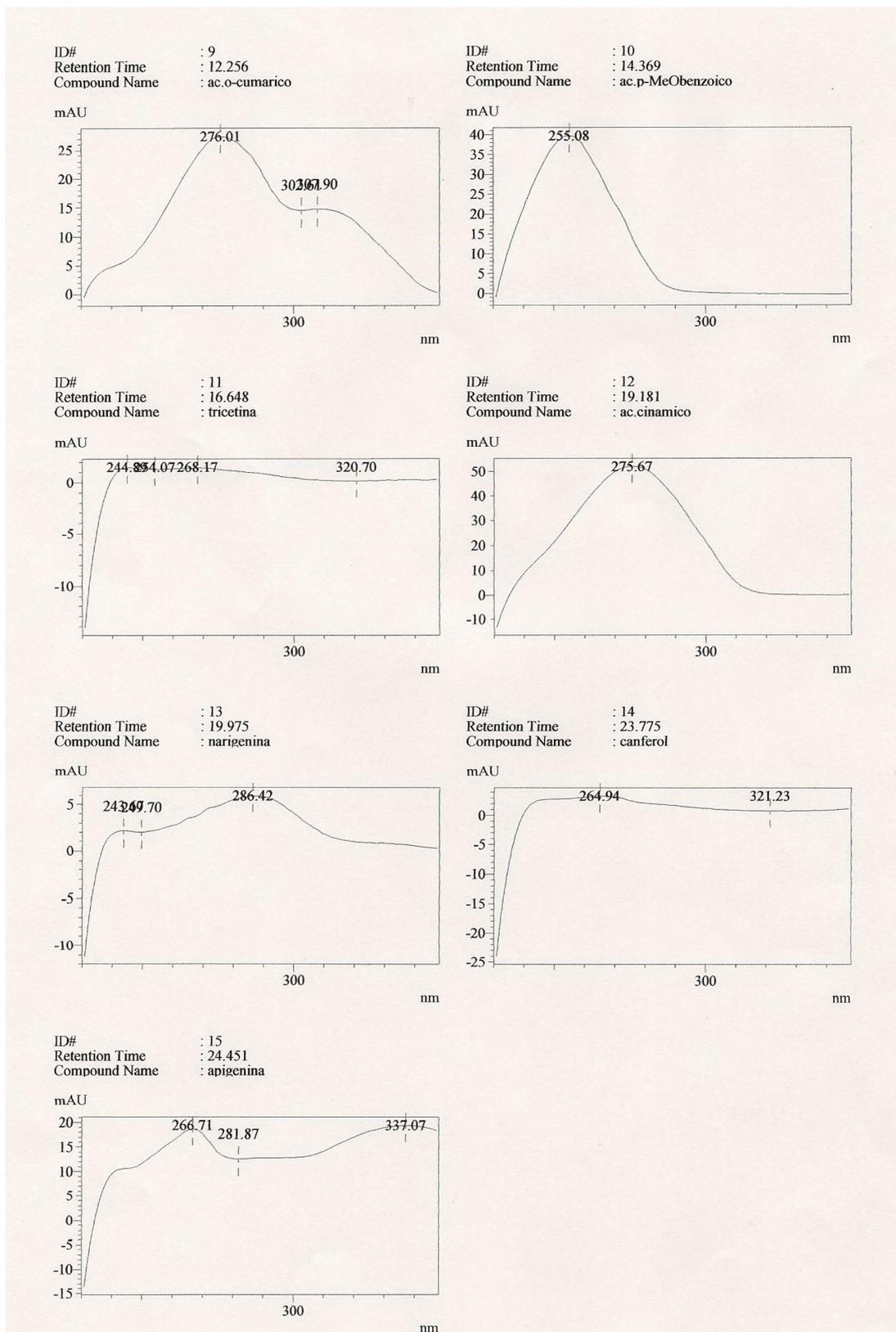
**Figura 12.** Estruturas das substâncias fenólicas contidas na **mistura 1** (1- Ácido gálico, 2- Ácido protocatecuico, 3-Ácido *para*-hidroxi-benzóico, 4-Ácido cafeico, 5-Ácido vanílico, 6- Ácido 2,4-diOHbenzóico, 7-Ácido *para*-cumárico, 8-Ácido ferúlico, 9-Ácido *orto*-cumárico, 10-Ácido *para*-metoxi-benzóico,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

**Tabela 7.** Tempos de retenção ( $t_R$ ) e comprimentos de onda ( $\lambda_{max}$ ) das substâncias contidas na Mistura 1 analisadas por CLAE –DAD.

<b>Mistura 1</b>	$t_R$ (minutos)	$\lambda_{max}$ (nm)
Ácido gálico	3,49	270
Ácido protocatecuico	4,58	259 ; 295
Ácido <i>para</i> -hidroxi-benzóico	6,37	253
Ácido cafeico	6,45	323
Ácido vanílico	6,92	261 ; 291
Ácido 2,4-diOHbenzóico	7.45	253; 294
Ácido <i>para</i> -cumárico	9,34	308
Ácido ferúlico	9,64	322
Ácido <i>orto</i> -cumárico	12,25	276; 325
Ácido <i>para</i> -metoxi-benzóico	14,36	255
Tricetina	16.64	351
Ácido cinâmico	19.18	277
Narigenina	19.97	288
Canferol	23,77	360
Apigenina	24,45	267; 336

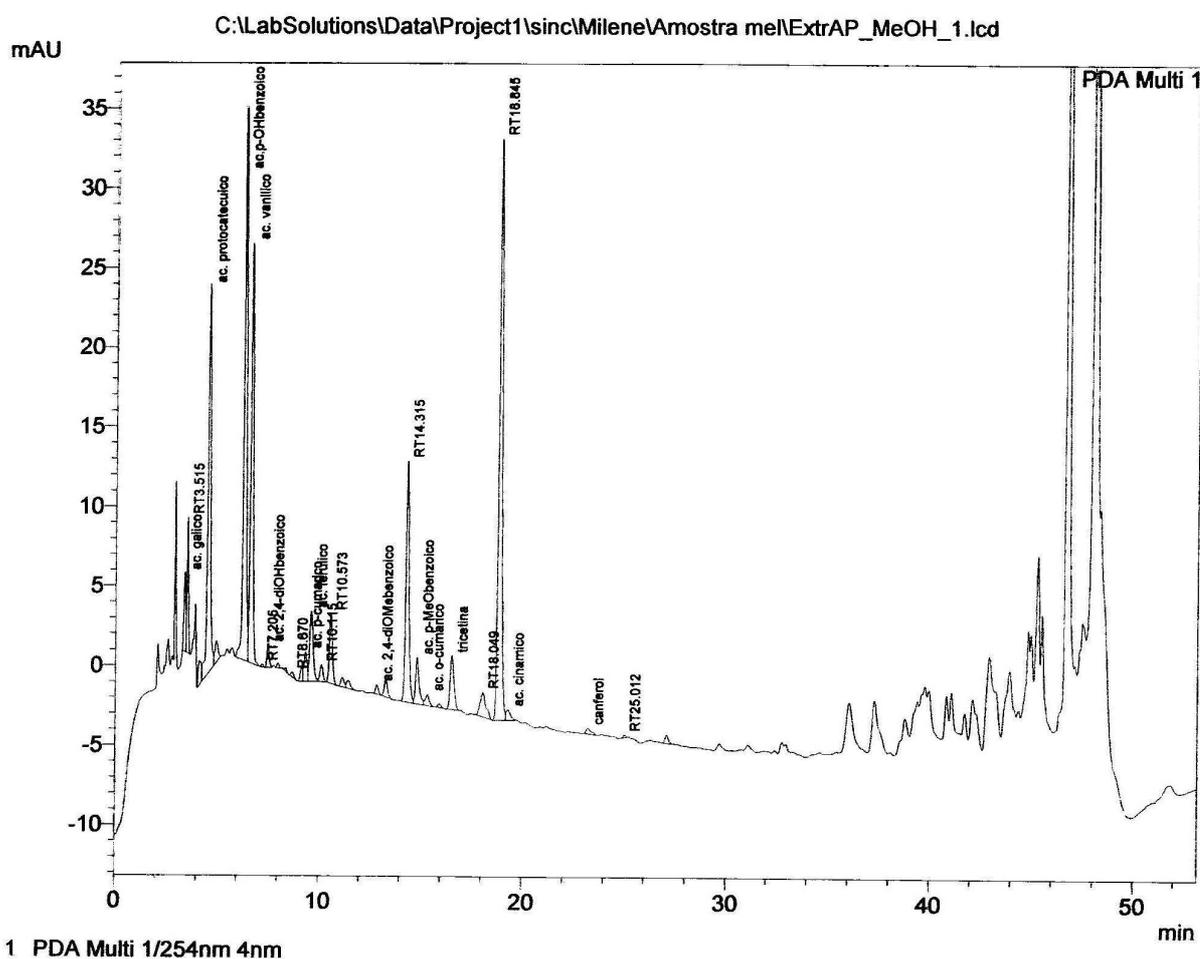


**Figura 13.** Curvas de UV dos padrões contidos na **Mistura 1** adquiridas pela análise por CLAE-DAD.

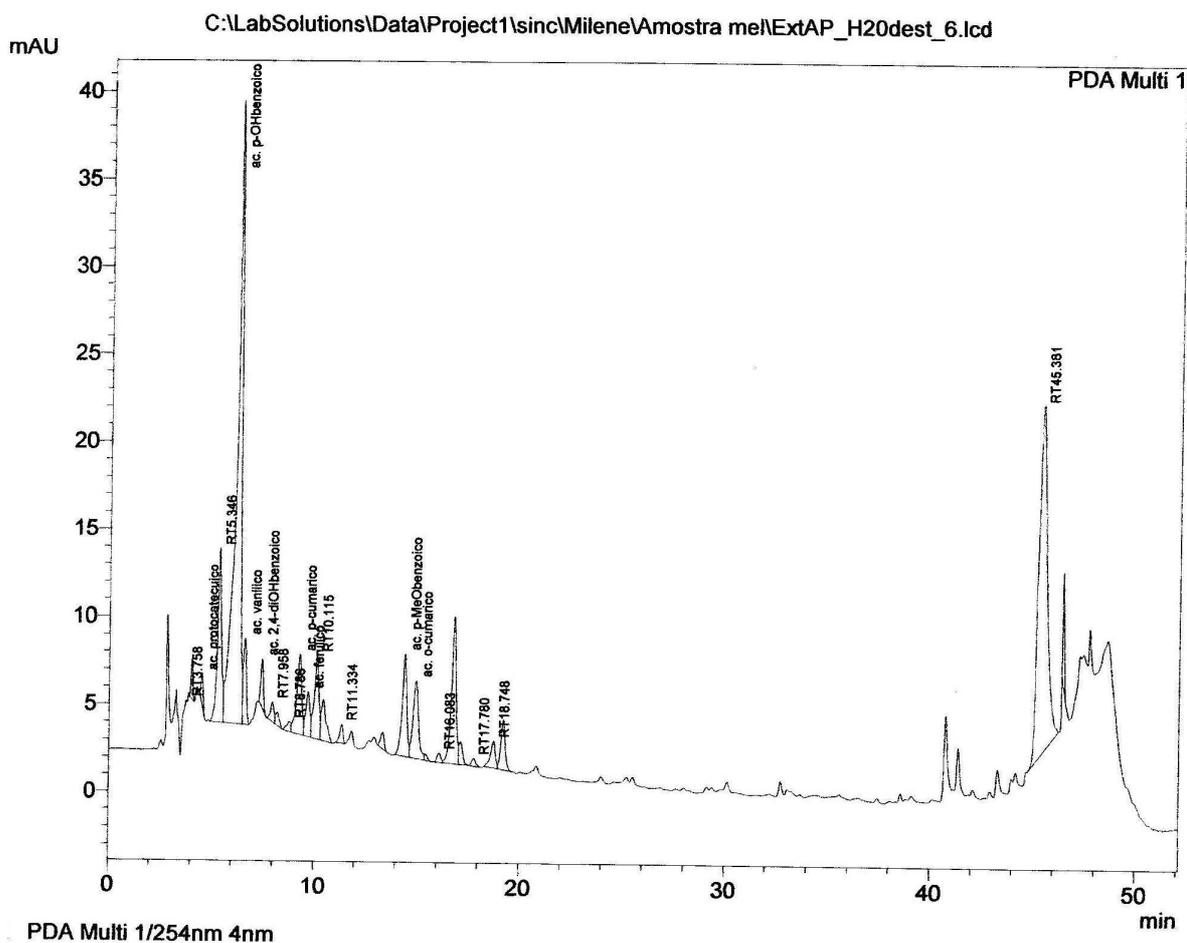


**Figura 14.** Curvas de UV dos padrões contidos na **Mistura 1** adquiridas pela análise por CLAE-DAD.

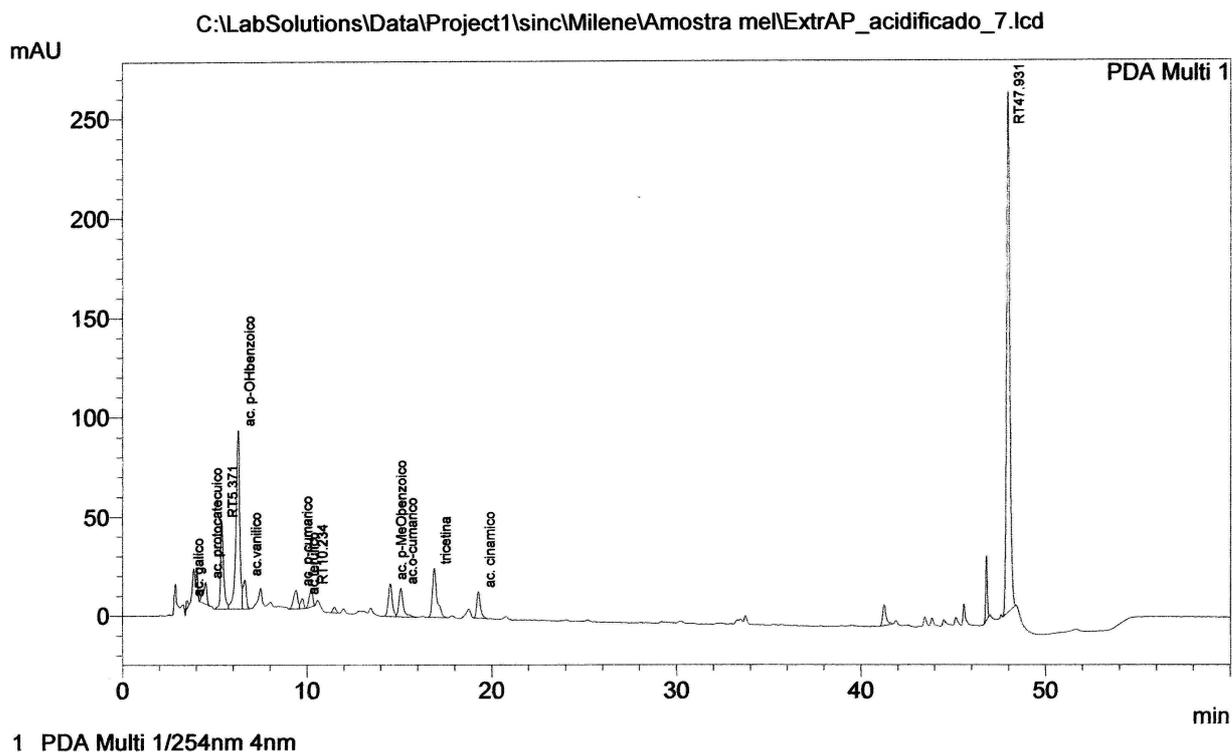
Para a interpretação relativa dos resultados obtidos nos cromatogramas dos extratos (Figuras 15 a 21) foi feita uma comparação dos seus  $t_R$  e das suas curvas de UV com aquelas obtidas para os padrões na mistura 1. As substâncias fenólicas presentes que apresentaram estruturas químicas e/ou comportamentos químicos semelhantes no processo cromatográfico, foram avaliadas cuidadosamente. 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.



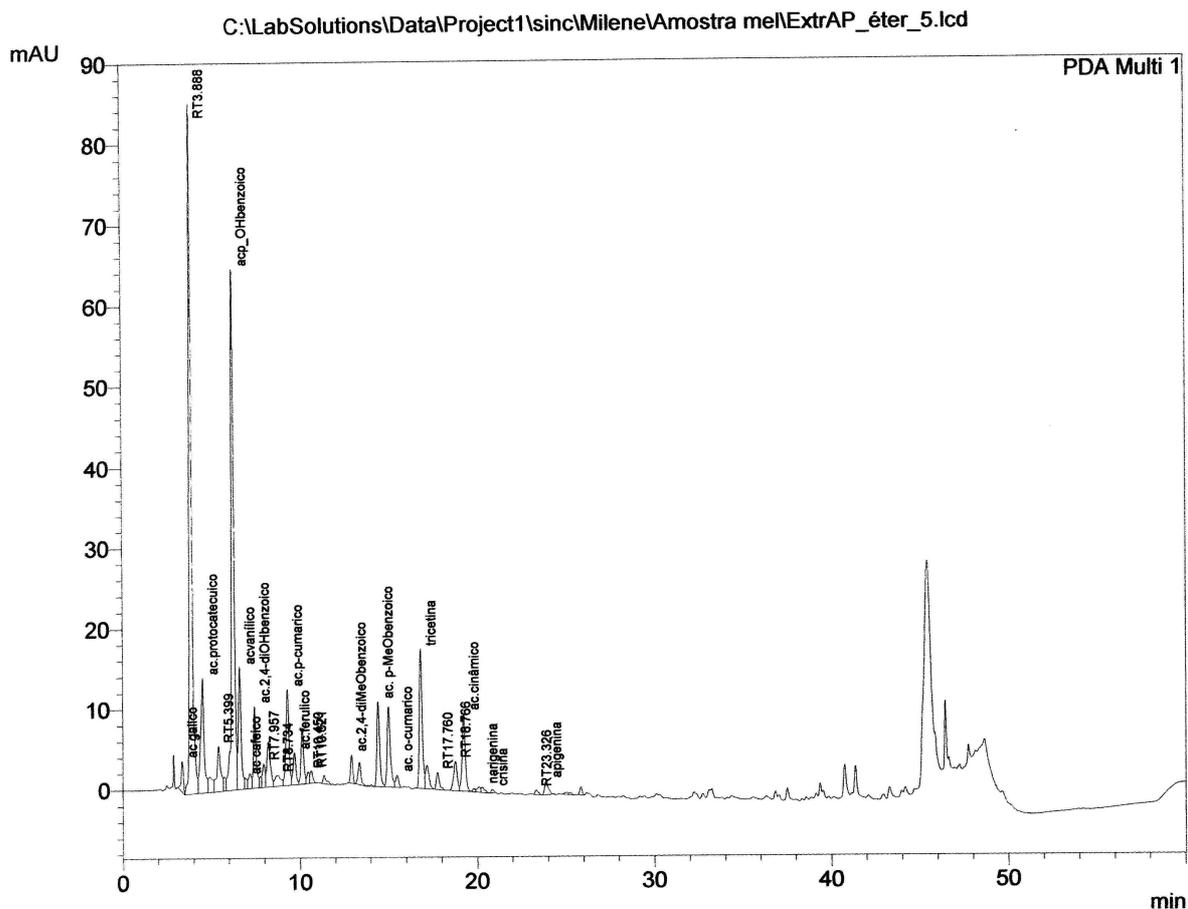
**Figura 15.** Extratos de mel de Assa Peixe analisados por CLAE-DAD: **EMM**. Em coluna analítica C-18 (25 cm x 4,6 mm x 5  $\mu$ m), fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>, fase móvel metanol: acetonitrila (90:10)-solvente B e água: ácido acético (99:1 - solvente A), 200-400 nm.



**Figura 16.** Extratos de mel de Assa Peixe analisados por CLAE-DAD: **EMAc**. 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.

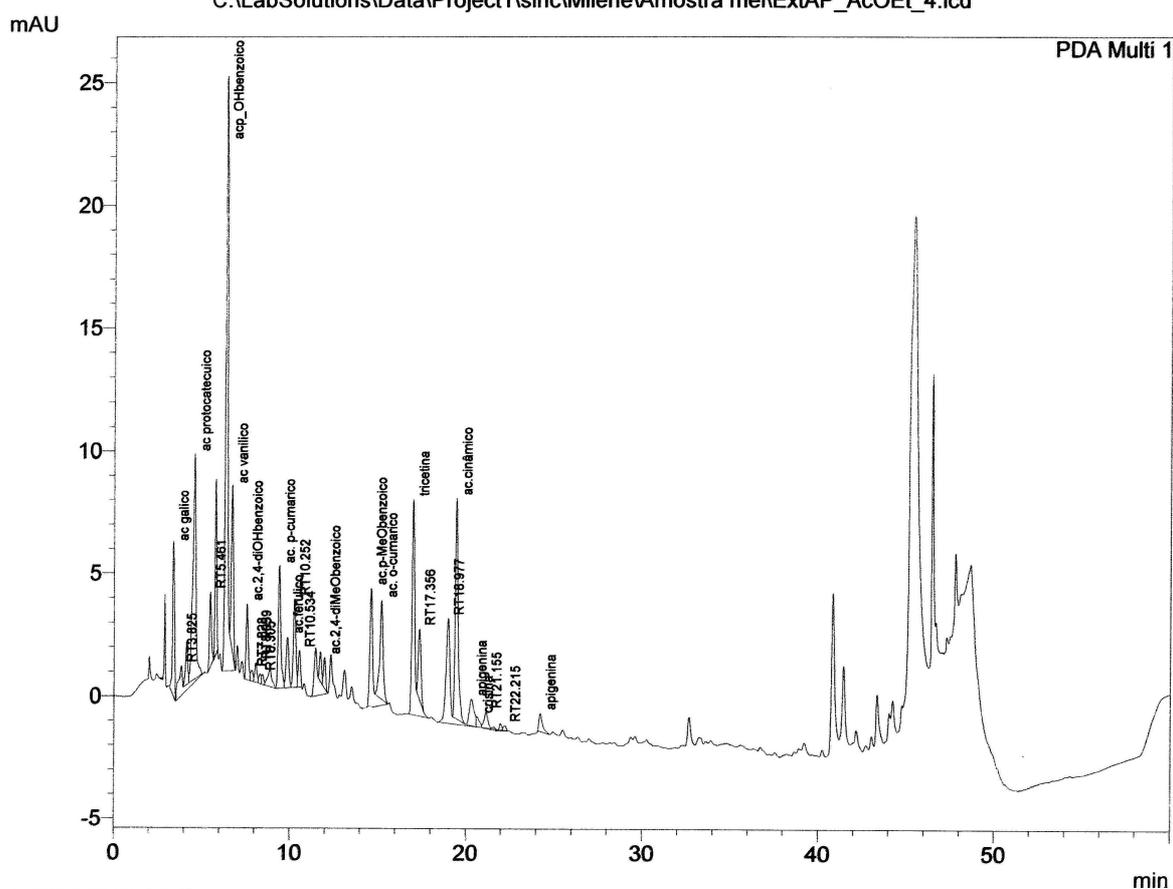


**Figura 17.** Extratos de mel de Assa Peixe analisados por CLAE-DAD: **EMAc2**. Em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6 mmx 5  $\mu$ m), fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>, fase móvel metanol: acetonitrila (90:10)-solvente B e água: ácido acético (99:1 - solvente A), 200-400 nm.

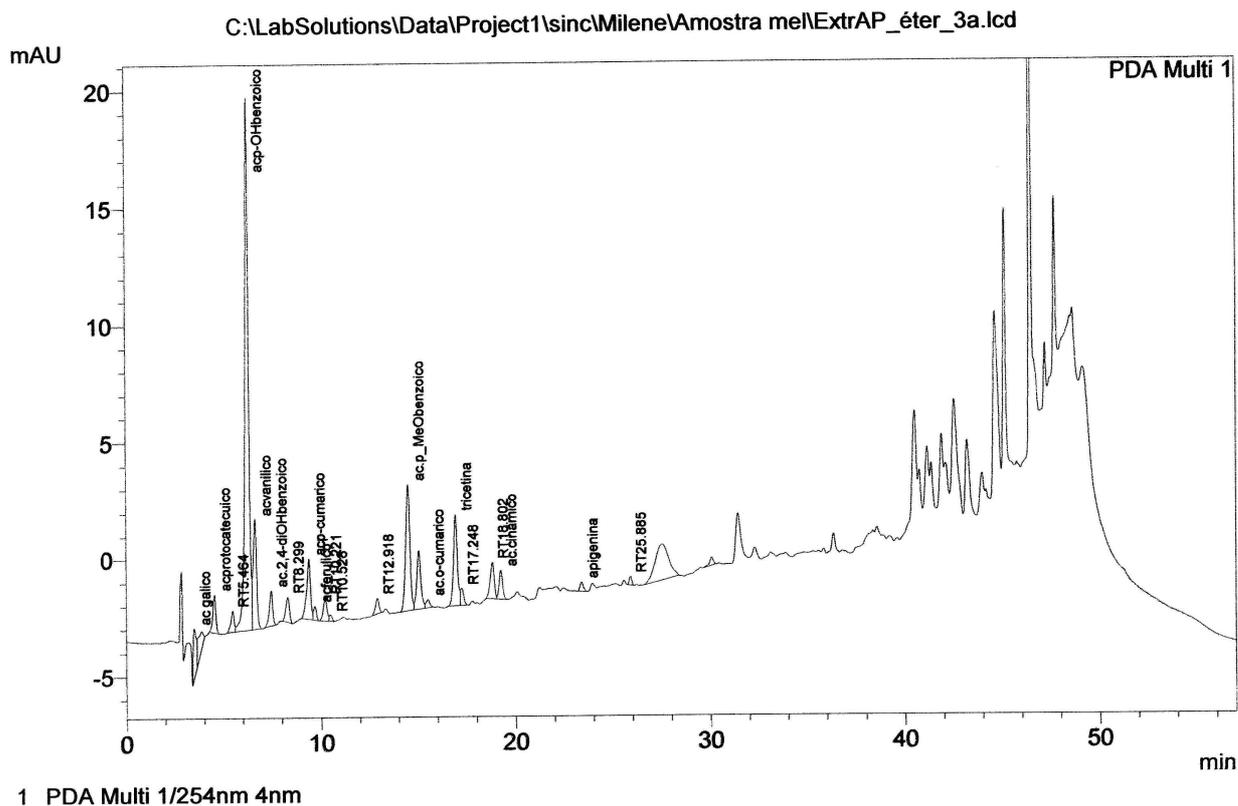


1 PDA Multi 1/254nm 4nm

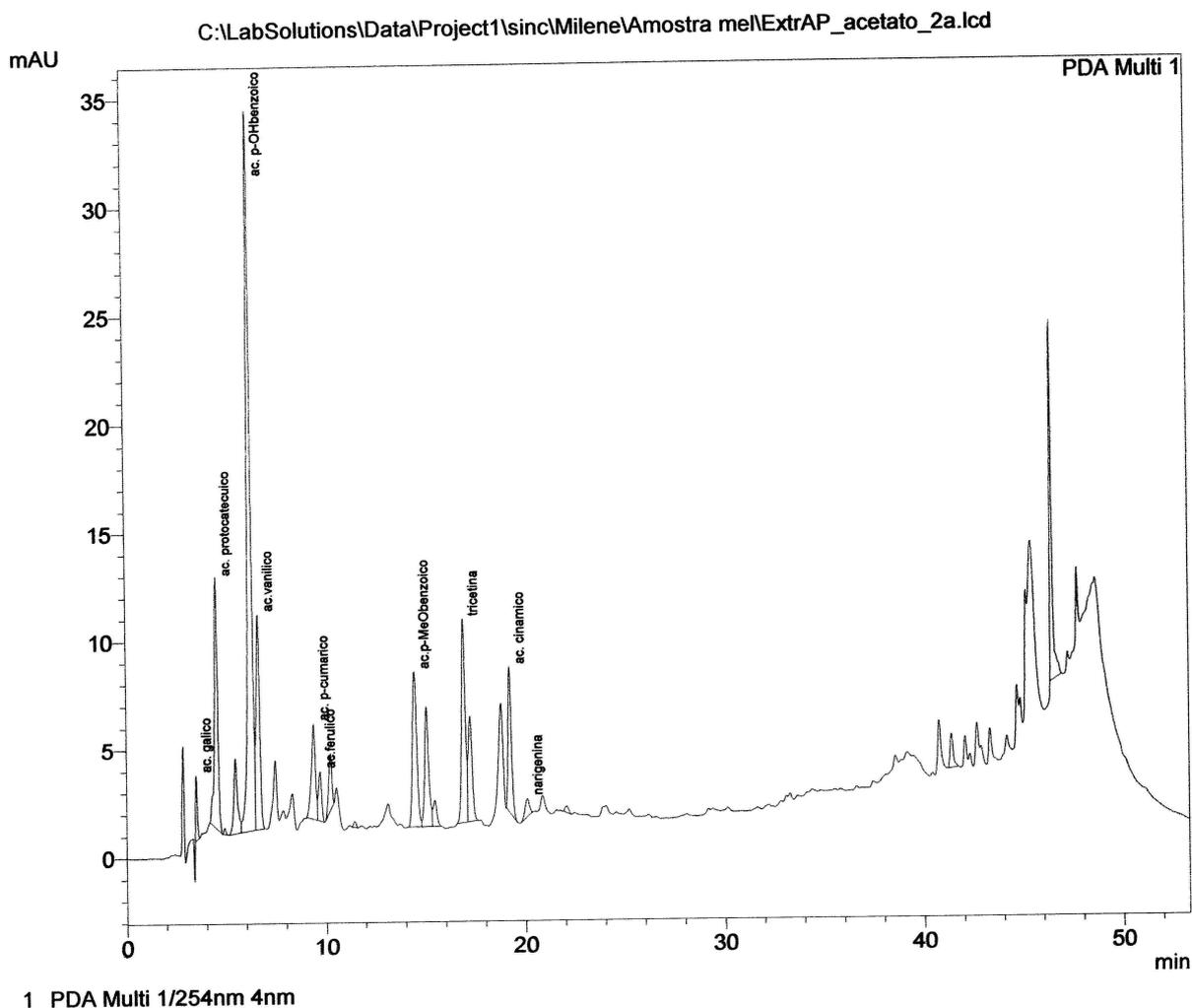
**Figura 18.** Extratos de mel de Assa Peixe analisados por CLAE-DAD: **EMpE**. Em coluna analítica C-18 (25 cm x 4,6 mm x 5 µm), fluxo de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>, fase móvel metanol: acetonitrila (90:10)-solvente B e água: ácido acético (99:1 - solvente A), 200-400 nm.



**Figura 19.** Extratos de mel de Assa Peixe analisados por CLAE-DAD: **EMPA**. 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.



**Figura 20.** Extratos de mel de Assa Peixe analisados por CLAE-DAD:**EMEus**. Em coluna analítica C-18 (25cm 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.



**Figura 21.** Extratos de mel de Assa Peixe analisados por CLAE-DAD: **EMAus**. Em coluna analítica C-18 (25cm 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.

Sendo assim, foi imprescindível o uso da curva de absorção no ultravioleta para a identificação das substâncias na matriz. Em alguns casos, até mesmo a união destas duas informações não foi suficiente para confirmar a estrutura de uma determinada substância nos extratos do mel, sendo necessário o uso da medida de  $R_f$  e/ou as cores desenvolvidas na CCDA em fase normal para auxiliar.

De acordo com o resultado, observamos que no extrato **EMAc** ( mel solubilizado direto em água e extraído com acetato de etila) não foram detectados flavonóides, enquanto para os extratos **EMM** e **EMAc2** os flavonóides tricetina e canferol foram identificados em pequenas quantidades (área relativa). Utilizando a metodologia usual para extração de

substâncias fenólicas do mel, descrita em trabalhos anteriores (LIANDA, 2009), observou-se um perfil cromatográfico mais abundante para ácidos e flavonóides. As análises dos extratos em éter e acetato revelaram a presença dos flavonóide tricetina, narigenina, crisina e apigenina. O uso de ultrassom no processo de extração com éter (**EMEus**) e acetato de etila (**EMAus**) comparativamente ao processo de partição usual em ampola de separação, não mostrou nenhuma alteração significativa quanto á composição de fenólicos no mel.

A tabela 8 apresentada abaixo lista as principais substâncias identificadas em cada extrato.

**Tabela 8.** Substâncias Fenólicas identificadas por CLAE-DAD nos extratos do mel de Assa Peixe.

Substâncias Identificadas	EMM	EMAc	EMAc2	EMpE	EMpA	EMEus	EMAus
Ácido gálico	+	-	+	+	+	+	+
Ácido protocatecuíco	+	+	+	+	+	+	+
Ácido <i>p</i> -OH-benzóico	+	+	+	+	+	+	+
Acido cafeico	-	-	-	+	-	-	-
Ácido vanílico	+	+	+	+	+	+	+
Ácido 2,4-diOHbenzóico	+	+	-	+	+	+	+
Ácido <i>para</i> -cumárico	+	+	+	+	+	+	+
Ácido ferúlico	+	+	+	+	+	+	+
Àcido <i>o</i> -cumárico	+	+	+	+	+	+	+
Ácido <i>m</i> -cumárico	-	-	-	-	-	-	-
Ácido 2,4-diMeObenzóico*	-	-	-	-	+	-	-
Ácido <i>para</i> -metoxi-benzóico	+	+	+	+	+	+	+
Tricetina	+	-	+	+	+	+	+
Ácido cinâmico	+	-	+	+	+	+	+
Narigenina	-	-	-	+	+	-	-
Crisina*	-	-	-	+	+	-	-
Quercetina	-	-	-	-	-	-	-
Canferol	+	-	-	-	-	-	-
Apigenina	-	-	-	+	+	+	+

\* Substâncias que não fizeram parte da mistura 1, mas foram avaliadas individualmente por CLAE-DAD e/ou CCDA.

Nos estudos realizados por FERRERES et al. (1991) a CLAE permitiu a identificação de 16 flavonóides em amostras de méis. De acordo com ANKLAM (1998) somente flavonóides agliconas estão presentes em amostras de mel. Isto significa que os flavonóides agliconas do mel podem ser parcialmente oriundos dos flavonóides contidos no pólen, resultantes da hidrólise pelas enzimas presentes na saliva das abelhas. Desta forma há a necessidade de mais estudos para se verificar a existência dos flavonóides no néctar. Nos méis brasileiros não é comum a presença de flavonóides, eles são muitos mais ricos em ácidos fenólicos (DA SILVA, 2004; MONTAGNI, 2005; LIANDA, 2004 e 2009). Este parâmetro poderá funcionar como um marcador químico da origem botânica deste tipo de mel.

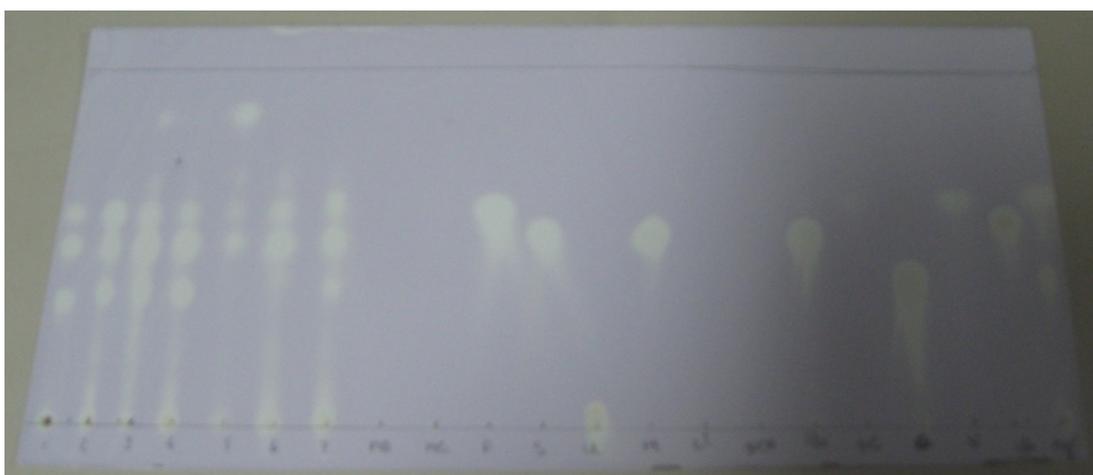
A cromatografia em fase líquida acoplada ao detector de arranjo de fotodiodo demonstrou ser uma valiosa ferramenta para a identificação dos ácidos fenólicos e flavonóides na matriz do mel sem a necessidade de isolá-los previamente.

#### **5.4. Determinação da atividade antioxidante do mel, dos extratos e padrões**

Uma das propriedades mais interessantes do mel é a atividade antioxidante, destacando-se os ácidos fenólicos e flavonóides presentes, considerados os principais antioxidantes naturais desse alimento. O uso deste parâmetro pode ser utilizado para assegurar a qualidade e o possível potencial terapêutico dos méis. Danos oxidativos irreversíveis de biomoléculas são alguns dos fatores que causam a ocorrência e desenvolvimento de numerosas doenças degenerativas. O ensaio com o radical DPPH é um método bastante utilizado para a determinação da atividade sequestradora de radicais de extratos vegetais e substâncias puras, por ser de fácil e rápida execução. Sendo assim, essa etapa do trabalho visou investigar essa atividade de méis brasileiros de *Apis mellifera*, bem como de seus extratos. A quantificação da atividade antioxidante pode ser utilizada para assegurar a qualidade e o possível potencial terapêutico dos méis.

Através da análise preliminar por CCDA foi possível investigar a existência de atividade antioxidante de alguns dos extratos dos méis estudados. Quando reveladas com DPPH, as amostras dos extratos revelaram manchas amarelas, sobre um fundo violeta, da mesma forma que alguns dos padrões apresentaram-nas.

O potencial de atividade antioxidante do extrato foi determinado preliminarmente, com base na atividade sobre o radical DPPH em solução, para revelação de cromatograma e, depois, a avaliação da capacidade sequestrante de radical livre dos extratos e do mel. O DPPH é um radical livre estável, para o qual as substâncias antioxidantes transferem elétrons ou átomos de hidrogênio, neutralizando seu caráter radicalar. Esta reação proporciona mudança de cor de violeta para amarelo e a absorvância da solução onde houve a reação, a 520 nm, diminui (BANERJEE et al., 2005). Pela CCDA, foi possível verificar que as substâncias presentes nos extratos apresentaram atividade antioxidante, já que uma mancha amarela, indicativa de inibição de oxidação, formou-se na região do cromatograma onde se encontram as substâncias responsáveis pela mesma, enquanto que no cromatograma, onde não existiam substâncias antioxidantes, a coloração permaneceu violeta, como pode ser observado na Figura 22.



**Figura 22.** Cromatograma dos padrões e extratos de mel 1-7 (**EMM, EMpAc, EMpE, EMAus, EMEus, EMAc, EMAc2**) revelados com solução 1% de DPPH em metanol.

As substâncias fenólicas foram selecionadas de acordo com o perfil apresentado por CLAE dos extratos de méis estudados anteriormente (LIANDA, 2009). A seguir estão apresentados os resultados das triplicatas dos ensaios de atividade sequestradora do radical livre DPPH realizados com os padrões das substâncias fenólicas (Tabela 9), com os extratos e com o mel (Tabela 10), bem como suas médias e respectivos desvios padrão. Os valores desses ensaios em triplicata foram mostrados aqui para facilitar a visualização dos resultados finais.

**Tabela 9.** Valores de  $CE_{50}$  ( $\mu\text{M}$  e  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) obtidos para os padrões das substâncias fenólicas nos ensaios de atividade antioxidante pelo método do DPPH, suas médias e desvios padrão (LIANDA, 2009).

Padrões	Ensaio			Média Atividade Antioxidante	Média Atividade Antioxidante
	[ $\mu\text{M}$ ]			$CE_{50}[\mu\text{M} \pm \text{DP}^*]$	$CE_{50}[\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1} \pm \text{DP}^*]$
	1º	2º	3º		
<b>Quercetina</b>	3,186	3,012	3,304	<b>3,17 ± 0,146</b>	<b>0,96 ± 0,044</b>
<b>Morina</b>	16,23	16,032	16,772	<b>16,3 ± 0,383</b>	<b>4,94 ± 0,042</b>
<b>Rutina</b>	8,389	8,231	8,948	<b>8,52 ± 0,377</b>	<b>5,20 ± 0,230</b>
<b>Ác. Gálico</b>	5,838	5,528	5,474	<b>5,61 ± 1,96</b>	<b>0,86 ± 0,030</b>
<b>Ác. Protocatecuico</b>	10,671	11,863	11,548	<b>11,36 ± 0,618</b>	<b>1,75 ± 0,095</b>

\* DP = desvio padrão

**Tabela 10.** Resultados da atividade antioxidante ( $CE_{50}$ ) para cada extrato e mel Assa Peixe

<i>Amostras</i>	<i>Mel Assa Peixe (mg/mL)</i>	<i>EMM (µg/mL)</i>	<i>EMpAc (µg/mL)</i>	<i>EMpE (µg/mL)</i>	<i>EMAc (µg/mL)</i>	<i>EMAc2 (µg/mL)</i>
<b>CE<sub>50</sub></b>	<b>52,7</b>	<b>38,5</b>	<b>40,5</b>	<b>41,8</b>	<b>54,6</b>	<b>42,3</b>

Com respeito à atividade antioxidante, empregando-se o DPPH, os extratos se comportaram de maneira distinta, isto é, alguns apresentaram boa atividade antioxidante, quando comparados com a amostra de mel bruta. O valor de  $CE_{50}$  expressa a concentração que elimina 50% dos radicais livres, isto é, quanto menor esta concentração, maior a atividade. O extrato **EMM** foi o que apresentou a melhor atividade antioxidante ( $CE_{50} = 38,5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) sendo superior a do mel ( $CE_{50} = 52,7 \text{ mg}/\text{mL}$ ).

Pela CCDA, os padrões utilizados apresentaram-se amarelo quando revelados com DPPH, porém não obtiveram a mesma intensidade de coloração. Da mesma forma, os extratos apresentaram-se diferentes, mostrando atividades antioxidantes distintas. Observa-se que os extratos **EMAc** e **EMAc2**, não apresentaram as mesmas intensidades de coloração que os demais, sendo as suas menores atividades comprovadas pela determinação do  $CE_{50}$ .

Os extratos avaliados (**EMM**, **EMpAc**, **EMpE**, **EMAc**, **EMAc2**) indicaram em sua composição química pelo estudo dos perfis cromatográficos (CCDA e CLAE-DAD) a

presença dos seguintes ácidos fenólicos: ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido vanílico, ácido *para*-cumárico, ácido *para*-hidroxibenzóico; além dos flavonóides: luteolina e apigenina em pequena proporção.

Os baixos valores obtidos para a atividade antioxidante do mel e dos seus extratos, quando comparados aos padrões (Tabela 9), podem estar relacionados ao teor de substâncias fenólicas presentes nesses méis. A baixa atividade sequestradora do radical DPPH observada para as amostras, provavelmente por estar relacionada à presença dos ácidos *para*-cumárico, *para*-hidroxibenzóico (ambos com apenas uma hidroxila) e o ácido vanílico (hidroxila vizinha de metoxila), além dos flavonóides, que não tem hidroxilas vizinhas e assim, não podem formar a orto-quinona, supondo-se, então, apresentarem menor atividade.

### **5.5. Determinação do teor de fenóis totais do mel**

Em paralelo aos ensaios de atividade antioxidante, o ensaio para determinação do teor de fenóis totais do mel Assa Peixe foi realizado através do método de Folin-Denis, utilizando o ácido gálico como padrão de referência (metodologia descrita na p. 26).

O reagente de Folin-Denis, embora não específico para uma determinada classe de metabólitos, detecta todos os fenóis, ácidos fenólicos, flavonóides e taninos presentes em uma matriz. Desta forma pode-se utilizar esta metodologia para quantificação do total de fenóis, uma vez que ocorre a oxidação de qualquer fenol presente pela reação com o ácido fosfomolibdico e tungístico do reagente de Folin-Denis (FERRREIRA et al, 2004).

A seguir na Tabela 11 estão apresentados os valores das absorvâncias obtidos nos ensaios de fenóis totais realizados com mel Assa Peixe, em triplicata (e suas médias e desvios padrão). Os resultados calculados dos teores de fenóis totais dos méis estão apresentados na tabela abaixo, p. 52.

**Tabela 11.** Valores das absorvâncias (triplicata), médias e desvios padrão do mel Assa Peixe nos ensaios de Folin-Denis.

Amostra	A1	A2	A3	A <sub>méd.</sub> ± DP
Mel de Assa Peixe	0,699	0,703	0,696	0,699± 0,003

Utilizando as curvas de ácidos fenólicos previamente realizadas por VIANNA, 2009, obteve-se a equação da reta com os valores de A e B correspondentes a cada padrão de alguns ácidos fenólicos comumente encontrados em méis. A saber os ácidos: cafeico, ferúlico, gálico, *meta*-cumárico, *orto*-cumárico, *para*-cumárico, *para*-hidroxibenzóico, protocatecuico, siríngico e vanílico, conforme tabela 12 a seguir.

**Tabela 12.** Valores de A e B para construção das curvas de ácidos fenólicos (VIANNA, 2009)

Ácidos Fenólico	cafeico	ferúlico	gálico	<i>meta</i> -cumárico	<i>orto</i> -cumárico	<i>para</i> -cumárico	<i>para</i> OH-benzóico	proto-catecuico	Siríngico	vanílico
A	0,151	0,191	0,083	0,236	0,234	0,218	0,259	0,154	0,153	0,144
B	142,824	72,791	81,759	74,169	58,964	70,234	72,717	118,696	52,694	90,762
Erro de A	0,0184	0,0098	0,0152	0,0148	0,0101	0,0119	0,0253	0,0207	0,0074	0,0179
Erro de B	2,2034	0,7078	1,3415	1,1811	0,8110	0,9500	3,3816	2,1824	0,4895	1,3983
R	<b>0,99893</b>	<b>0,99957</b>	<b>0,99892</b>	<b>0,99886</b>	<b>0,99915</b>	<b>0,99918</b>	<b>0,99357</b>	<b>0,99882</b>	<b>0,99961</b>	<b>0,99893</b>

A partir destes valores foi possível calcular o teor de fenóis totais equivalentes a cada ácido, expresso em mg/100g de mel (tabela 12). Utilizando como exemplo o ácido gálico, tem-se a seguinte equação:

$$Y_1 = A + B \cdot X$$

$$Y_1 = 0,083 (\pm 0,0152) + 81,759 (\pm 1,3415) \cdot X_1$$

$$0,699 = 0,083 (\pm 0,0152) + 81,759 (\pm 1,3415) \cdot X_1$$

$$X_1 = \mathbf{0,00753 \text{ mg/mL}}$$

$$Y_2 = A + B \cdot X$$

$$Y_2 = 0,083 (\pm 0,0152) + 81,759 (\pm 1,3415) \cdot X_2$$

$$0,703 = 0,083 (\pm 0,0152) + 81,759 (\pm 1,3415) \cdot X_2$$

$$X_2 = \mathbf{0,00758 \text{ mg/mL}}$$

$$Y_3 = A + B \cdot X$$

$$X_{\text{méd.}} = \mathbf{0,00754}$$

$$Y_3 = 0,083 (\pm 0,0152) + 81,759 (\pm 1,3415) \cdot X_3$$

$$0,696 = 0,083 (\pm 0,0152) + 81,759 (\pm 1,3415) \cdot X_3$$

$$X_3 = \mathbf{0,00750 \text{ mg/mL}}$$

Portanto, nos três frascos há uma concentração de ácido fenólico (equivalente de ácido gálico) de 0,00753, 0,00758 e 0,00750 mg/mL. Como há um volume total de 5 mL por frasco (0,5 mL de solução de mel, 2,5 mL de solução de Folin-Denis e 2,0 mL de solução de carbonato de sódio), para encontrar a massa de ácido contida em cada frasco da triplicata, multiplicou-se por 5.

$$0,00753 \text{ mg} \text{ ---- } 1 \text{ mL}$$

$$X_1 \text{ ----- } 5 \text{ mL} \therefore X_1 = \mathbf{0,0376 \text{ mg}}$$

$$0,00758 \text{ mg} \text{ ---- } 1 \text{ mL}$$

$$X_2 \text{ ----- } 5 \text{ mL} \therefore X_2 = \mathbf{0,0379 \text{ mg}}$$

$X_{\text{méd.}} = \mathbf{0,0376}$
-------------------------------------

$$0,00750 \text{ mg} \text{ ---- } 1 \text{ mL}$$

$$X_3 \text{ ----- } 5 \text{ mL} \therefore X_3 = \mathbf{0,0375 \text{ mg}}$$

Foi inserido em cada frasco um volume de 0,5 mL de solução de mel com concentração de 100 mg/mL, então a massa de mel contida neste volume foi de 50 mg. Como foi calculado que em cada frasco há uma média de 0,0376 mg de ácido gálico, pode-se concluir que a cada 50 mg de mel há 0,41 mg deste ácido. Sendo assim, foi obtido o teor equivalente de ácido gálico a cada 100 g desse mel.

$$100 \text{ mg} \text{ --- } 1 \text{ mL}$$

$$x \text{ ----- } 0,5 \text{ mL} \therefore x = 50 \text{ mg (0,05 g)}$$

$$0,0376 \text{ mg} \text{ ---- } 0,05 \text{ g de mel}$$

$$x \text{ ----- } 100 \text{ g de mel} \therefore \mathbf{x = 75,2 \text{ mg/100 g de mel}}$$

Os níveis de ácidos fenólicos individuais no mel de Assa Peixe estão especificados na Tabela 13.

**Tabela 13.** Teores de Ácidos Fenólicos Individuais no mel Assa Peixe (mg/100 g de mel)

<i>Amostra</i>	<i>gálico</i>	<i>siríngico</i>	<i>vanílico</i>	<i>meta-cumárico</i>	<i>orto-cumárico</i>	<i>paracumárico</i>	<i>paraOH-benzóico</i>	<i>proto-catecuico</i>	<i>ferúlico</i>	<i>caféico</i>
Mel de Assa Peixe	75.2	45.9	61.2	62.5	78.9	68.5	60.5	45.9	69.8	38.6

Entre os ácidos fenólicos individuais avaliados, o *orto-cumárico* e *gálico* foram os que estiveram presentes em maior quantidade; o conteúdo de *caféico* e *siríngico* foram os menores.

Ao comparar os resultados obtidos com os dados da literatura realizados com méis de outros países e de diferentes origens florais, os teores de polifenóis foram de 84 e 100 mg ácido *gálico*/100 de mel (MEDA, 2005), verificou-se que o intervalo de variação determinado neste trabalho foi, sem dúvida, mais alargado e de menor valor.

### 5.6. Determinação do teor de flavonóides totais do mel

O teor de flavonóides totais também foi determinado para a amostra de mel de Assa Peixe, utilizando o ensaio com solução de cloreto de alumínio, segundo metodologia descrita na p. 27.

O cátion alumínio forma complexos estáveis com os flavonóides em metanol, ocorrendo na análise espectrofotométrica um desvio para maiores comprimentos de onda e uma intensificação da absorção. Dessa maneira, é possível determinar a quantidade de flavonóides, evitando-se a interferência de outras substâncias fenólicas, principalmente os ácidos fenólicos, que quase sempre acompanham os flavonóides. Nessas condições, o complexo flavonóide-Al absorve um comprimento de onda bem maior do que o flavonóide sem a presença do agente complexante. Os ácidos fenólicos, mesmo os que formam complexos com  $AlCl_3$ , absorvem em comprimentos de onda muito inferiores, evitando-se dessa maneira interferências nas médias de absorbância. MARCUCCI et al, 2005)

A seguir, na Tabela 14, estão apresentados os valores das absorvâncias obtidos nos ensaios de flavonóides totais realizados com o mel Assa Peixe, em triplicata (e suas médias e desvios padrão). Os resultados calculados dos teores de flavonóides totais dos méis estão apresentados na Tabela 14.

**Tabela 14.** Valores das absorvâncias (triplicata), médias e desvios padrão, do mel Assa Peixe nos ensaios com cloreto de alumínio.

Amostra	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>méd.</sub> ± DP
Mel de Assa Peixe	0,370	0,374	0,368	<b>0,371± 0,003</b>

Utilizando as curvas de flavonóides previamente realizadas por OLIVEIRA (2009), obteve-se a equação da reta com os valores de A e B correspondentes a cada padrão de alguns flavonóides comumente encontrados em méis, sendo eles a quercetina, rutina, narigenina, morina, miricetina, lueonina, isoquercetina, crisina, canferol e apigenina, conforme tabela a seguir.

**Tabela 15.** Valores de A e B na construção das curvas de flavonóides (OLIVEIRA ,2009)

Flavonóides	Quercetina	Rutina	Narigenina	Morina	Miricetina	Luteonina	Isoquercetina	Crisina	Canferol	Apigenina
A	0,00482	0,02492	0,00032	0,03084	-0,01586	-0,02811	0,00332	-0,00005	-0,0324	-0,00421
B	47,44374	28,0565	0,51460	57,7539	53,50975	84,56582	47,67260	14,83983	90,3422	27,15661
Erro de A	0,01401	0,01052	0,000131	0,01269	0,00468	0,01683	0,01852	0,0033	0,01329	0,00251
Erro de B	1,07055	0,35045	0,00193	0,85426	0,41589	1,39008	1,02903	0,30303	0,91784	0,18916
R	0,99797	0,99922	0,99995	0,99891	0,99979	0,99879	0,99834	0,99834	0,99954	0,99976

Os níveis de flavonóides individuais no mel de Assa Peixe estão especificados na Tabela 16.

**Tabela 16.** Valores obtidos para teores de flavonóides totais (mg/100g de mel) para as amostras de mel Assa Peixe usando cloreto de alumínio.

Amostra	Quercetina	Rutina	Narigenina	Morina	Miricetina	Luteonina	Isoquercetina	Crisina	Canfeerol	Apigenina
Mel de Assa Peixe	3,08	5,64	<b>287,87</b>	2,78	2,89	1,89	3,08	9,99	1,78	5,52

Na literatura foram encontrados valores de teor em flavonóides em diversos tipos de mel os quais variam entre 0,2 e 8,4 mg de quercetina/100g de mel (MEDA, 2005). Os resultados determinados neste trabalho estão dentro do intervalo de valores referidos por esses autores, com exceção da determinação usando narigenina.

Narigenina foi o flavonóide mais abundante determinado nesse mel. No entanto, a ocorrência desse flavonóide só foi relatada uma única vez em mel europeu (SOCHA, 2009).

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. O uso do cloreto de alumínio para a determinação da quantidade de flavonóides totais não é, no entanto, um procedimento isento de limitações. Ele pode ser pouco exato, ou seja, o valor que ele fornece pode ser diferente (geralmente inferior) em relação à quantidade de flavonóides totais realmente presente na amostra analisada.

O mel possui propriedades profiláticas para a saúde que resulta provavelmente, de sua composição. O conteúdo de substâncias polifenólicas (ácidos fenólicos e flavonóides) no mel é afetado pela origem floral e geográfica, bem como pelas características climáticas da região. Essas substâncias antioxidantes tem um efeito benéfico sobre a saúde humana. Adicionalmente, o mel pode ser considerado um biomarcador para a poluição ambiental e pode indicar os níveis de contaminação do ar, água, planta e solo sobre a área de atuação das abelhas.

Por causa da importância dos polifenóis, interesse em sua identificação e quantificação no mel tem aumentado significativamente nos últimos anos.

## 6. CONCLUSÕES

Os extratos do mel de Assa Peixe obtidos pelos diferentes procedimentos de extração, apesar da diferença de massa, apresentaram o perfil das substâncias fenólicas, basicamente, semelhantes quando analisados por CCDA e/ou CLAE-DAD. Principais substâncias fenólicas por CCDA/CLAE: ácidos gálico, protocatecuico, *para*OHbenzoico, paracumarico, cinâmico, vanílico, ferúlico. Flavonóides: apigenina, narigenina, miricetina, canferol.

A técnica em CCDA mostrou-se reprodutível, abrangente e de fácil execução, sendo adequada para procedimentos de triagem quanto ao perfil das substâncias presentes nos diferentes extratos de mel de Assa Peixe. O uso de reveladores auxiliou na diferenciação de alguns ácidos fenólicos quando estes apresentaram  $R_f$  semelhantes, como no caso dos ácidos vanílico e o *para*-hidroxibenzóico.

Os extratos apresentaram potencial antioxidante, verificado pela presença de substâncias com capacidade redutora, identificados pela cromatografia em camada delgada analítica como substâncias fenólicas. Porém, tanto o mel quanto os seus extratos apresentaram atividade antioxidante inferiores às dos padrões avaliados. Os resultados podem contribuir para avaliação dos efeitos antioxidantes *in vitro* dos méis. Entretanto maiores estudos devem ser feitos para elucidar o mecanismo de ação e a biodisponibilidade das substâncias fenólicas presentes. Finalmente, de acordo com este estudo e segundo alguns autores, o mel apresenta uma atividade antioxidante semelhante à determinada em frutos e vegetais e por isso, ao ser usado como adoçante constitui uma saudável alternativa ao açúcar na medida em que pode funcionar como uma fonte importante de antioxidantes. Pode-se estabelecer assim, uma relação entre a atividade antioxidante demonstrada pelos extratos e as substâncias fenólicas presentes no mel de Assa Peixe.

Em comparação aos estudos realizados anteriormente com mel de Assa Peixe (MONTAGNI, 2005) em nosso grupo, os ácidos gálico, protocatecuico, vanílico, cinâmico, *para*-metoxi-benzóico, *para*-hidroxibenzóico também foram identificados no mel de Assa Peixe de São Lourenço. No entanto, os flavonóides quercetina e rutina, que haviam sido encontrados nos méis analisados por MONTAGNI (2005), diferiram dos que foram identificados nesse trabalho. Por CLAE-DAD foi possível identificar nos setes extratos avaliados: o flavonóide tricetina em seis extratos (exceto **EMAc**); a apigenina em quatro dos extratos (**EMpE**, **EMpA**, **EMEus** e **EMEus**), e narigenina e a crisina em dois extratos (**EMpE** e **EMpA**). A narigenina foi pela primeira vez relatada em mel brasileiro e na determinação do teor de flavonóides totais, foi a substâncias que apresentou o maior valor (287,87 mg/100g de mel ) em quantidade de equivalente totais, estando esse dado de acordo com o relatado recentemente na literatura para mel europeu (SOCHA, 2009).

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

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.

ALZUGARAY, D. & ALZUGARAY, Flora Brasileira – Primeira Enciclopédia de Plantas do Brasil, 1984, 1: 65-66.

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.

ÂNGELO, P.M. E JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. *Rev Inst Adolfo Lutz*, 2007, 66(1): 232-240.

ANKLAM, E. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chemistry*, 1998, 63 (4), 549-562.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF THE ASSOCIATION OF CHEMISTS, 13<sup>a</sup> ed, 1950

AZEREDO, M.A.A.; AZEREDO, L.C.; DAMASCENO, J.G. Características físico-químicas dos méis do município de São Fidélis-RJ. *Ciência e Tecnologia de Alimento* 1999, 19(1), 3-7.

BANERJEE, A.; DASGUPTA, N; DE, B. In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. *Food Chemistry*, v. 90, p.727-733, 2005.

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.

BALTRUSAITYLE, V., VENSKUTONIS, P. R., & CEKSTERYT, V. Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts. *Food Chemistry* 2007, 101, 502-514.

BERAHIA, T.; CERRATI, C.; SABATIER, S.; AMIOT, M.J. Gas chromatography-mass spectrometry analysis of flavonoids in honey. *Sciences Des Aliments* 1993, 13(1), 15-24.

- BERETTA, G.; GRANATA, P.; FERRERO, M.; ORIOLI, M.; FACINO, R.M. Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Analytica Chimica Acta* 2005, 533, 185–191.
- BERTONCELJ, J., DOBERSEK, U., JAMNIK, M., & GOLOB, T. Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chemistry* 2007, 105, 822–828.
- 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 e do Abastecimento. Instrução Normativa n. 11, de 20 de outubro de 2000. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel. *Diário Oficial da União, Brasília*, n. 204, 23 out 2000. Seção 1, p.16.
- BURATTI, S., BENEDETTI, S., & COSIO, M. S. Evaluation of the antioxidant power of honey, propolis and royal jelly by amperometric flow injection analysis. *Talanta* 2007, 71, 1387–1392.
- 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 19.11.2009.
- CARTLAND, B. *The magic of honey*. Corgi Books 1970, London, UK, 160p.
- CASTALDO, S., & CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia* 2002, 73, S1–S6.
- CERUKS, M.; ROMOFF, P.; FÁVERO.; LAGO, J.H.G. Constituintes fenólicos polares de *Schinus terebinthifolius* RADDI (ANACARDIACEAE). *Química Nova*, Vol. 30, n° 3, 597-599, 2007.
- 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.
- CHERBULIEZ, T., & DOMEREGO, R. *L'apitherapie, Médecine des abeilles*. Editions Amyris 2003.
- COOK, N.C. & SAMMAN, S. Flavonoids – chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Nutritional Biochemistry* 1996, 7, 66-76.
- COOPER, R.A.; MOLAN, P.C.; HARDING, K.G. Antibacterial activity of honey against strains of *Staphylococcus aureus* from infected wounds. *Journal of the Royal Society of Medicine* 1999, 92(6), 283-285.

CORTOPASSI-LAURINO, M. & GELLY, D.S. Analyse pollinique, propriétés physico-chimiques et action antibactérienne des miels d'abeilles africanisées *Apis mellifera* et de Méliponinés du Brésil. *Apidology* 1991, 22, 61-73.

CRANE, E. Honey: A comprehensive survey. New York, USA: Crane Russak and Company, 1975.

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

CRANE, E. O livro do mel. Nobel, 1985, 2ed. São Paulo, 226p.

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

CROZIER, A.; BURNS, J.; AZIZ, A.A.; STEWAR, A.J.; RABIASZ, H.S; JENKINS, G.I.; EDWARDS, C.A.; LEAN, M.E. Antioxidant flavonols from fruits, vegetables and beverages: measurements and bioavailability. *Biological Research* 2000, 33(2), 1-6.

CUSHNIE, T.P.T. & LAMB, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2005, 26, 343–356.

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.

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.

EFEM, S.E.E. Clinical observations on the wound healing properties of honey. *The British Journal of Surgery* 1988, 75(7), 679-681.

EFEM, S.E.E.; UDOH, K.T.; IWARA, C.I. The antimicrobial spectrum of honey and its clinical significance. *Infection* 1992, 20(4), 227-229.

ESTEVINHO, L.; PEREIRA, A.N.; MOREIRA, L.; DIAS, L.G.; PEREIRA, E. Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. *Food and Chemical Toxicology* 2008, 46, 3774-3779.

FAO. Value-added products from beekeeping. FOA Agricultural Services Bulletin. Rome 1996, Italy: FAO.

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, 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.

FERREIRA, E.C.; NOGUEIRA, A.R.A; SOUZA, G.B; BATISTA, L.A.R; Effect of drying method and length of storage on tannin and total phenol concentrations in Pigeon pea seeds.2004, *Food Chemistry*, 86, 17-23.

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.; 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., TOMAS-BARBERAN, F. A., SOLER, C., & GARCIA-VIGERA, C. A simple extractive technique for honey flavonoid HPLC analysis. *Apidologie* 1994, 25, 21–30.

FERRERES, F.; JUAN, T.; PEREZ-ARQUILLUE, C.; HERRERA-MARTEACHE, A.; GARCIA-VIGUERA, C.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A. Evaluation of pollen as a source of kaempferol in rosemary honey. *Journal Science Food Agric.* 1998, 77, 506-510.

GHELDOF, N., & ENGESETH, N. J. Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002, 50, 3050–3055.

GHELDOF, N., WANG, X., & ENGESETH, N. Characterization of the antioxidants in honeys from different floral sources. Presented at Annual Meeting, Institute of Food Technologists, Dallas, USA, 2001, 11–14 June.

GHELDOF, N., WANG, X., ENGESETH, N., Identification and Quantification of Antioxidant Components of Honeys from Various Floral Sources, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50, 5870-5877.

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.

GONÇALVES, L.S. Principais Impactos Biológicos Causados pela Africanização das Abelhas *Apis mellifera* e Perspectivas da Apicultura Brasileira. In: ANAIS DO ENCONTRO SOBRE ABELHAS, III, Ribeirão Preto-SP, p.31 a 36. 1998.

GRANDE, T. S. M., TRINDADE, J. A., PINTO, M. J. F, FERREIRA, L. L., CATELLA, A. C. Botanical Survey on Medicinal Plants used by the Populations of the State of Minas Gerais. Brasil. Simpósio de Química e Farmacologia de Produtos Naturais. 1989.

HOOPER, Ted. Guia do apicultor. 3º ed. São Paulo: Europa América, 1981. 269 p.

HOU, Y.C.; CHAO, P.D.L.; HO, H.J.; WEN, C.C.; HSIU S.L. Profound difference in pharmacokinetics between morin and its isomer quercetin in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2003, 55 (2), 199-203.

[http://pt.wikipedia.org/wiki/Assa\\_Peixe](http://pt.wikipedia.org/wiki/Assa_Peixe). Acessado em Outubro de 2009.

[http://www.acesa.com/arquivo/viver/nutricao-Mel\\_Curiosidades/](http://www.acesa.com/arquivo/viver/nutricao-Mel_Curiosidades/), acessado em Outubro de 2009, Apiário Águas Claras - Br 267 Km 151, Manejo, Lima Duarte, MG. Tel: (021)627-4276.

HUANG, D.; OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J.A.; DEEMER, E.K. Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin as the solubility enhancer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002, 50, 1815-1821.

IOYRISH, N. Bees and people. Moscow, 1974, USSR: MIR Publisher.

KAHOUN, D.; REZKOVÁ, S.; VESKRNOVÁ, K.; KRÁLOVSKÝ, J.; HOLCAPEK, M. Determination of phenolic compounds and hydroxymethylfurfural in meads using high performance liquid chromatography with coulometric-array and UV detection. *Journal of Chromatography A* 2008, 1202, 19–33.

KAMPA, M.; ALEXAKI, V.I.; NOTAS, G.; NIFLI, A.P.; NISTIKAKI, A.; HATZOGLOU, A.; BAKOGEORGOU, E.; KOUIMTZOGLOU, E.; BLEKAS, G.; BOSKOU, D.; GRAVANIS, A.; CASTANAS, E. Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action. *Breast Cancer Res* 2004, 6, R63-R74.

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

KUMAR, S. J. & MANDAL, M. Antiproliferative Effects of Honey and of Its Polyphenols: A Review. *J. of Biomedicine and Biotechnology*; 2009, 8-13.

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.

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.L.P. Tese de Doutorado. Perfil de substâncias fenólicas de méis brasileiros por cromatografia líquida de alta eficiência e avaliação do potencial antioxidante. PPGQO-UFRRJ. 2009.

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

MARCHINI, L.C. Caracterização de amostras de méis de *Apis mellifera* (Hymenoptera-apidae) do Estado de São Paulo, baseada em aspectos físico-químicos e biológicos. Livre Docência, Piracicaba-SP, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. 2001.

MARCIANO, S. [www.jornalalecrim.objetoarte.com](http://www.jornalalecrim.objetoarte.com); ago/set 2008; ano 6 • nº 39.

MARCUCCI, M.C. Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutical activity, Apidologie, 1995, v.26, p. 83-89.

MARCUCCI, M.C.; WOISKY, R.G.; SALATINO, A.; Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis.2005. <http://www.bichoonline.com.br/artigos/apa0014.htm>. Acesso outubro de 2009.

MARCUCCI, M.C.; FERRERES, F.; GARCIA-VIGUERA, C.; BANKOVA, V.S.; DE CASTRO, S.L.; DANTAS, A.P.; VALENTE, P.H.M.; PAULINO, N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. Journal of Ethnopharmacology 2001, 74, 105-112.

MARTINS, E.R; CASTRO, D.M; CASTELLANI, D.C; DIAS, J.E. Plantas Medicinais. Editora UFV(Universidade Federal de Viçosa), 2000.

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

McKIBBEN, J.; ENGESETH, N.J. Honey as a protection agent against lipid oxidation in muscle foods. Journal Agric. Food Chemist, 2002. 50: 592-595.

MEDA, A.; LAMIEN, C.E.; ROMITO, M.; MILLOGO, J.; NACOUUMA, 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.

MENDES, B.A. & COELHO, E.M. Considerações sobre características de mel de abelhas. Análises e critérios de inspeção. Informe Agropecuário 1983, 9(106), 56-67.

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.

MILLER, H.E. A simplified method for the evaluation of antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, Champaign, v. 48, p.91, 1971.

MIORIN, P.L.; JUNIOR, N.C.L.; CUSTODIO, A.R.; BRETZ, W.A.; MARCUCCI, M.C. Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology* 2003, 95, 913-920.

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

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.

MOURE, A.; CRUZ, J.M.; FRANCO, D.; DOMÍNGUEZ, J.M.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; NÚÑEZ, M.J.; PARAJÓ, J.C. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry* 2001, 72, 145-171.

MUÑOZ, O.; COPAJA, S.; SPEISKY, H.; PEÑA, R. C. E MONTENEGRO, G. Contenido de Flavonoides Y Compuestos Fenólicos De Mielles Chilenas e Índice Antioxidante. *Química Nova*, 2007, 30 (4), 848-851.

NARAYANA, K.R.; REDDY, M.S.; CHALUVADI, M.R.; KRISHNA, D.R. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology* 2001, 33, 2-16.

NG, T. B., LIU, F., & WANG, Z. Antioxidative activity of natural products from plants. *Life Sciences*, 2000, 66, 709-723.

McKIBBEN, J. & ENGESETH, N.J. Honey as a protective agent against lipid oxidation in ground turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002, 50, 592-595.

OLIVEIRA, D'L. Mestranda da UFRRJ: Construção das curvas de flavonóides, 2009. Dados experimentais pessoais.

OLGUIN, C. DE F. A., HAMERSKI, LIDILHONE ; PERCIO, M. F. E SOMENSI, A. *Revista Varia Scientia*, 2005, volume 05 (10) , p. 137-143.

ORHAN, F., SEKEREL, B. E., KOCABAS, C. N., SACKESEN, C., ADALIOG ˘LU, G., & TUNCER, A. Complementary and alternative medicine in children with asthma. *Annals of Allergy, Asthma, and Immunology*, 2003; 90, 611-615.

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.

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.

PICHICHERO, E.; CANUTI, L.; CANINI, A. Characterisation of the phenolic and flavonoid fractions and antioxidant power of Italian honeys of different botanical origin. *J.Sci. Food and Agric.*; 2009, 89, 5 (15), 609-616.

PIETTA PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod* 2000; 63 (7): 1035-42.

PYRZYNSKA, K. and 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.

RAMARATHNAM N, OSAWA T, OCHI H, KAWAKISHI S. The contribution of plant food antioxidants to humans health. *Trends Food Sci Nutr* 1995; 6 (3): 75-82.

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.

SANCHEZ, M. Apicultura no cerrado. 2ª edição. Goiânia – GO: Editora Kelps, p.59-92. 1997.

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.

SCHEPARTZ, A. I. Honey catalase: Occurrence and some kinetic properties. *Journal of Apiculture Research* 1966, 5, 167–176.

SCHRAMM, D. D., KARIM, M., SCHRADER, H. R., HOLT, R. R., CARDETI, M., & KEEN, C. L. Honey with high levels of antioxidants can provide protection to healthy human subjects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003, 51, 1732–1735.

SHAHIDI, F; JANITHA PK, WANASUNDARA PD. Phenolic antioxidants. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1992; 32 (1): 67-103.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *American Journal of Enology and Viticulture*. 16 (1965) 144–158.

SOCHA, R.; JUSZCZAK, L.; PIETRZYK, S.; FORTUNA, T. Antioxidant activity and phenolic composition of herb honeys. *Food Chemistry*, 2009, 113, 568–574.

STAHL, E. *Thin-layer chromatography*. Springer-Verlag New York, 1969. 1041 páginas.

TAN, S.T.; WILKINS, A.L.; HOLLAND, P.T.; MCGHIE, T.K. 1. Extractives from New Zealand unifloral honeys. 2. Degraded carotenoids and other substances from heather honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1989a, 37(5), 1217-1221.

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.

THE NATIONAL HONEY BOARD. *Honey-Health and therapeutic qualities*. Lashley Street Longmont 2003, <<http://www.nhb.org>>.

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.; FERRERES, F.; GARCIA-VIGUERA, C.; TOMÁS-LORENTE, F. Flavonoids in honey of different geographical origin. *Zeitschrift-fuer Lebensmittel Untersuchung und Forschung* 1993a, 196, 38-44.

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.

TSIAPARA, A.V.; JAAKKOLA, M.; CHINOU, I.; GRAIKOU, K.; TOLONEN, T.; VIRTANEN, V.; MOUTSATSOU, P.; *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.

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

TUZEN, M. & OZDEMIR, M. Chromatographic Determination of Phenolic Acids in the Snowdrop by HPLC. *Turk J Chem* 27 (2003), 49-54.

VIANNA, C.A.F.J. *Mestrando da UFRRJ: Construção das curvas de ácidos fenólicos*, 2009. Dados experimentais pessoais.

- WAHDAN, H. Causes of the antimicrobial activity of honey. *Infection* 1998, 26, 26.
- WANWIMOLRUK, S.; HO, P.; SAVILLE, D.J. Inhibition of human CYP3A4 activity by grapefruit flavonoids, furanocoumarins and related compounds. *Journal Pharm. Pharmaceut. Science* 2001, 4(3), 217-227.
- WESTON, R.J.; MITCHELL, K.R.; ALLEN, K.L. Antibacterial phenolic components of New Zealand manuka honey. *Food Chemistry* 1999, 64 (3), 295-301.
- WESTON, R. J.; BROCKLEBANK, K. L.; LU, Y. Identification and quantitative levels of antibacterial components of some New Zealand honeys. *Food Chemistry* 2000, 70, 427-35.
- WIESE, H. et. al. *Nova Apicultura*. Porto Alegre. Livraria Agropecuária Ltda. 1983. 485 p.
- WIESE, H. *Nova Apicultura*. 7a Ed. Porto Alegre-RS:Editora Agropecuária LTDA. 493p. 1986.
- WIESE, H. *Novo Manual de Apicultura*. Guaíba-RS:Editora Agropecuária LTDA. 1995. 292p.
- WIESE, H. *Apicultura:Novos Tempos*. 1a Ed. Guaíba-RS:Editora Agropecuária LTDA. 424p. 2000.
- WHITE, J.W.Jr.; SUBERS, M.H.; SCHEPARTZ, A.I. The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose-oxidase system. *Biochimica et biophysica acta* 1963, 73, 57-70.
- WHITE, J.W. Composition of honey. In: CRANE, E. *Honey. A comprehensive survey*. 1979. London: Heinemann, p. 157-207.
- ZWAENEPREL, C. *Honey: facts and folklore*. Alberta Beekeepers' Association 1984, Edmonton, Canada, p. 24.