

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

DISSERTAÇÃO

**CARACTERIZAÇÃO DE MEL DE *Apis mellifera* PELO SEU PERFIL
EM SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA
DE ALTA EFICIÊNCIA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
BIOLÓGICA**

REGINA LUCIA PELACHIM LIANDA

**Seropédica, Rio de Janeiro
Dezembro 2004**



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

**CARACTERIZAÇÃO DE MEL DE *Apis Mellifera* PELO SEU PERFIL
EM SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA
DE ALTA EFICIÊNCIA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
BIOLÓGICA**

REGINA LUCIA PELACHIM LIANDA

Sob a Orientação da Professora
Dra. Rosane Nora Castro

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência. Área de concentração em Química de Produtos Naturais.

Seropédica, Rio de Janeiro
Dezembro de 2004

547.7
L693c
T

Lianda, Regina Lucia Pelachim, 1971-
Caracterização de mel de *Apis mellifera*
pelo seu perfil em substâncias fenólicas
por cromatografia líquida de alta
eficiência e avaliação da atividade
biológica / Regina Lucia Pelachim Lianda.
- 2004.
ix, 142 f. : il.

Orientador: Rosane Nora Castro.
Dissertação (mestrado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto
de Química.

Bibliografia: f. 131-142.

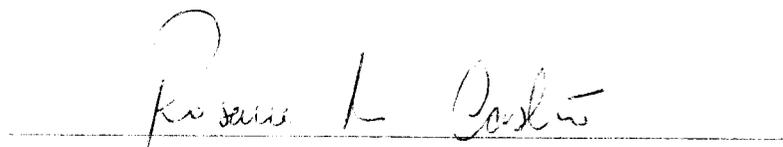
1. Química orgânica - Teses. 2. Mel -
Análise - Teses. 3. Cromatografia líquida
de alta eficiência - Teses. 4. Mel - Uso
terapêutico - Teses. 5. Ácido fenólico -
Teses. 6. Flavonóides - Teses. I. Castro,
Rosane Nora, 1965- II. Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro. Instituto
de Química. III. Título.

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

REGINA LUCIA PELACHIM LIANDA

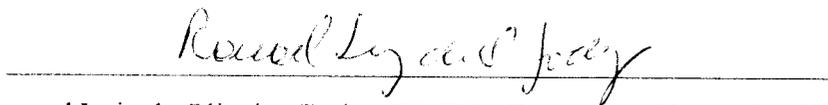
Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Química Orgânica como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre em Ciências em Química Orgânica, com área de concentração em Química de Produtos Naturais

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 17/12/2004



Prof.^a Dra. Rosane Nora Castro (DEQUIM-UFRRJ)

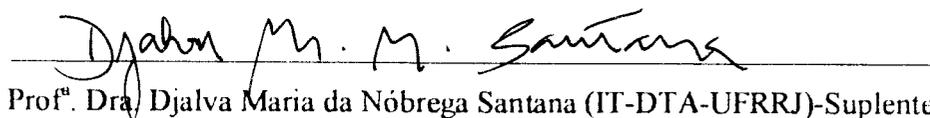
(Presidente-Orientadora)



Dr. Ronoel Luiz de Oliveira Godoy (EMBRAPA-Agroindústria de Alimentos)



Prof.^a Dra. Áurea Echevarria (DEQUIM-UFRRJ)



Prof.^a Dra. Djalva Maria da Nóbrega Santana (IT-DTA-UFRRJ)-Suplente

Aos dois grandes homens de
minha vida ... meu amor
(Alexandre Ulisses Comitre) e
meu pai (Roberto David
Lianda).

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Roberto David Lianda e Laurinda Pelachin Lianda, que contribuíram para a minha formação e sempre permitiram que eu fosse eu mesma.

Ao meu companheiro Alexandre Ulisses Comitre, pelo incentivo, compreensão e amor.

A uma pessoa que admiro como um ser único e puro, Solange Cardoso.

À Prof^a Dra. Rosane Nora Castro, pela orientação e confiança, mesmo antes de me conhecer direito.

À Prof^a Dra. Áurea Echevarria, pelo exemplo de ser humano, pelos ensinamentos, pela amizade e carinho de mãe.

Ao Prof^o Dr. Mário Geraldo de Carvalho, pelo apoio e atenção.

Ao Prof^o Dr. João Batista N. da Costa e ao Prof^o Dr. Aurélio Baird B. Ferreira, pelas amizades.

Aos outros Professores com os quais cursei as disciplinas Prof^a Dr. Francisco de A. da Silva, Prof^a Dr. Victor M. Rumjanek, Prof^o Dra. Ana Cristina S. dos Santos, Prof^o Dra. Akiko Santos e Prof^o Dra. Clarissa Oliveira da Silva.

À Dra. Sonia Couri da EMBRAPA-Agroindústria de Alimentos pelo uso do cromatógrafo.

À CAPES pelo apoio financeiro.

À aluna de Iniciação Científica Amanda Esteves de Souza, que realizou os testes de atividade biológica contribuindo para o meu trabalho e que sempre foi muito atenciosa e paciente.

Aos amigos Prof^o Dr. Paulo Peixoto e Prof^a Dra. Ticiano Nascimento França, sem eles eu não estaria aqui, não tenho nem como enumerar o quanto me assistiram.

Ao amigo Prof^o Dr. Fernando Machado de Melo, pelo incentivo e amizade de sempre.

À nova família que aqui formei, que me acompanhou e tolerou diariamente, em cada momento de estresse e ou alegria, Grazielle Lopes e Ana Paula Rosa Lopes (a Aninha). Também à amiga Heloísa de Mello.

Aos grandes amigos, por todas as situações (dentro e fora do curso), Ari Miranda da Silva, Ildomar Alves do Nascimento e Luciano Ramos Suzart.

Aos colegas de laboratório Cléber Bonfim Barreto Junior, Breno Almeida Soares, Victor Hugo Silva de Oliveira, Rodney Santos, Wellison da Silva Ferreira pelo ótimo ambiente de trabalho. Às várias “mãos direitas”, Sheilla Marie Souza Montagni, Adriana Aparecida Bosso, Sara Vasconcelos Marques e Vanessa Vasconcelos Torres. Ao Prof^o Dr. Marco Edílson F. Lima. À amigona Tatiana Santana Ribeiro, pela companhia e pelo carinho (também de seus pais).

Um agradecimento especial a um exemplo de pessoa, a Andrea Rosane Silva, que me acudiu sempre que esteve presente. E ao Cláudio Eduardo Rodrigues dos Santos pela amizade e simplicidade que eu admiro.

A todos os outros colegas do curso que contribuíram cada um de uma forma, Virginia Claudia Silva, Mário Sérgio da Rocha Gomes, Marli Terezinha Frana Cornelius, Luiz Roberto Marques Albuquerque (o Pilha, de minha turma), Juliana Feijó de Souza Daniel, Cássia Cristina Fernandes Alves, Myrtes Santos da Silva Bellieny, Kenia Pissinate, Andressa Esteves de Souza, Bauer de Oliveira Bernardes, Janaína Marques Rodrigues, Viviane Martins Rebello dos Santos e Júlio Eduardo Paiva Sena Maia.

A todos os funcionários do Pavilhão de Química, pois sem eles o trabalho não poderia ser concluído.

Ao amigo que muito respeito, que me trouxe pela primeira vez a esta Universidade, o Prof^o Miguel Teixeira dos Santos Neto.

Também à atenciosa amiga Prof^a Dra. Mami Yano pelo apoio.

E, aos grandes amigos que, indiretamente, colaboraram para a realização desta vitória, Eduardo S. Lima, Jailson da Silva, Marcus Tullius F. Moraes, Márcia Ferreira M. Correia, Jayme da Silva Ferreira, Silvia Massu de Oliveira e Renata F. Cadorna Cervo.

... a Deus, por ter me dado força e saúde.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 - O Mel	1
1.2 - Composição e Características Físicas do Mel	4
2 - ASPECTOS DA CROMATOGRAFIA	10
3 – AS SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS	15
3.1 - Rota Biossintética	15
3.2 – Tipos e a Distribuição de Substâncias Fenólicas nos Alimentos	24
3.3 – As Substâncias Fenólicas e as Atividades Biológicas	32
3.4 - Biodisponibilidade dos Polifenóis no Corpo	42
4 – PRINCIPAIS METODOLOGIAS USADAS NA CARACTERIZAÇÃO DO MEL	46
4.1 - Análise do Pólen Apícola	46
4.2 – Análise de Substâncias Fenólicas em Méis	50
5 – ORIGEM DAS SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS NOS MÉIS	56
6 – OBJETIVOS	59
7 - PARTE EXPERIMENTAL	60
7.1 – Material e Métodos	60
7.2 - Amostras de Méis	61

7.3 - Padrões Utilizados	63
7.4 - Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	63
7.5 - Preparo da Amostra de Mel	64
8 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
8.1 – Extração das Substâncias Fenólicas do Mel	69
8.2 – Perfis Cromatográficos dos Padrões e Respectiveos Espectros de UV	70
8.2.1 – Considerações sobre as curvas de absorção no UV dos padrões	81
8.3 – Perfis das Substâncias Fenólicas nos Méis Laranjeira e Silvestre por CLAE	88
8.3.1 – Espectros de UV das amostras dos méis	88
8.3.2 – Identificação dos compostos fenólicos nas amostras por CLAE-DAD	93
8.4 – Isolamento e Determinação Estrutural da Morina no Mel Laranjeira (RLL20)	121
8.5 - Atividade Biológica	126
9 – CONCLUSÕES	129
10 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	131

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Composição básica do mel (WHITE, 1975)	5
Tabela 2: Polifenóis em alimentos	28-29
Tabela 3: Atividades antibacteriana, antiviral e antifúngica de vários flavonóides	40
Tabela 4: Doenças tratadas com flavonóides	42
Tabela 5: Amostras de méis analisadas nesse trabalho	62
Tabela 6: Tempo de retenção (t_R) e comprimento de onda (λ_{max}) dos ácidos fenólicos padrões (Mistura A) analisados por CLAE com detector de arranjo de fotodiodos	72
Tabela 7: Tempo de retenção (t_R) e comprimento de onda (λ_{max}) dos ácidos fenólicos padrões (Mistura B) e do ácido clorogênico analisados por CLAE com detector de arranjo de fotodiodos	72
Tabela 8: Tempo de retenção (t_R) e comprimento de onda (λ_{max}) dos ácidos fenólicos padrões (Mistura C) analisados por CLAE com detector de arranjo de fotodiodos	73
Tabela 9: Tempo de retenção (t_R) e comprimento de onda (λ_{max}) dos flavonóides padrões analisados por CLAE com detector de arranjo de fotodiodos	73
Tabela 10: Deslocamento da banda I dos espectros UV dos flavonóides	87
Tabela 11: Substâncias fenólicas identificadas nos méis silvestres e laranjeiras	120
Tabela 12: Dados de RMN de 1H e ^{13}C de RLLMo comparados com os dados da literatura da morina (DA SILVA <i>et al.</i> , 2002)	125

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estruturas do catecol 1 e do pirogalol 2	16
Figura 2: Proposta biossintética para o ácido cinâmico (MANN, 1987)	17
Figura 3: Proposta biossintética para derivados do ácido cinâmico (MANN, 1987)	18
Figura 4: Estrutura do Ácido Clorogênico 9	19
Figura 5: Derivados de ácidos Benzoicos de ocorrência natural	20
Figura 6: Biossíntese do Ácido Gálico 15 (MANN, 1987)	21
Figura 7: Esqueleto básico dos flavonóides	22
Figura 8. Biossíntese dos flavonóides (E-1: Chalcona sintase, E-2: Chalcona isomerase, E-3: Flavona sintase I (2-hidroxi flavanona sintase), E-4: Flavona sintase II (2-hidroxi flavanona sintase), E-5: Isoflavona sintase (2-hidroxiisoflavona sintase), E-6: Flavanona-3-hidroxilase e E-7: Flavonol sintase)	23
Figura 9: Estruturas químicas de polifenóis	25
Figura 10: Exemplos de algumas classes de flavonóides	26
Figura 11: O esqueleto básico de um flavonóide	36
Figura 12: Proposta de rota para absorção/metabolismo da quercetina (PRIOR, 2003)	44
Figura 13: Estruturas básicas dos derivados de ácidos e flavonóides presentes no mel	51
Figura 14: Preparo das amostras dos méis	66
Figura 15: Separação dos padrões de ácidos fenólicos (Mistura A) por CLAE-DAD em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5µm), fluxo de 1mL.min ⁻¹ , fase móvel água: ácido acético (99:1, solvente A) e água: acetonitrila : ácido acético (59:40:1, solvente B) a 270 nm	74
Figura 16: Separação dos padrões de ácidos fenólicos (Mistura B) por CLAE-DAD em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5µm), fluxo de 1mL.min ⁻¹ , fase móvel água: ácido acético (99:1, solvente A) e água: acetonitrila : ácido acético (59:40:1, solvente B) a 270 nm.	75

Figura 17: Separação dos padrões de ácidos fenólicos (Mistura C) por CLAE-DAD em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5µm), fluxo de 1mL.min ⁻¹ , fase móvel água: ácido acético (99:1, solvente A) e água: acetonitrila : ácido acético (59:40:1, solvente B) a 270 nm	76
Figura 18: Cromatograma do ácido clorogênico por CLAE-DAD em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5µm), fluxo de 1mL.min ⁻¹ , fase móvel água: ácido acético (99:1, solvente A) e água: acetonitrila : ácido acético (59:40:1, solvente B) a 270 nm	76
Figura 19: Cromatograma da rutina por CLAE-DAD em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5µm), fluxo de 1mL.min ⁻¹ , fase móvel água: ácido acético (99:1, solvente A) e água: acetonitrila : ácido acético (59:40:1, solvente B) a 270 nm	77
Figura 20: Cromatograma da isoquercetrina por CLAE-DAD em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5µm), fluxo de 1mL.min ⁻¹ , fase móvel água: ácido acético (99:1, solvente A) e água: acetonitrila : ácido acético (59:40:1, solvente B) a 270 nm	77
Figura 21: Cromatograma da hesperidina por CLAE-DAD em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5µm), fluxo de 1mL.min ⁻¹ , fase móvel água: ácido acético (99:1, solvente A) e água: acetonitrila : ácido acético (59:40:1, solvente B) a 270 nm.	78
Figura 22: Cromatograma da miricetina por CLAE-DAD em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5µm), fluxo de 1mL.min ⁻¹ , fase móvel água: ácido acético (99:1, solvente A) e água: acetonitrila : ácido acético (59:40:1, solvente B) a 270 nm	78
Figura 23: Cromatograma da morina por CLAE-DAD em coluna analítica C-18 (25 cm x 4,6 mm x 5 µm), fluxo de 1mL.min ⁻¹ , fase móvel água: ácido acético (99:1, solvente A) e água: acetonitrila : ácido acético (59:40:1, solvente B) a 270 nm	79
Figura 24: Cromatograma da quercetina por CLAE-DAD em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5µm), fluxo de 1mL.min ⁻¹ , fase móvel água: ácido acético (99:1, solvente A) e água: acetonitrila : ácido acético (59:40:1, solvente B) a 270 nm	79
Figura 25: Estruturas dos derivados de ácidos benzóicos usados como padrões	82
Figura 26: Estrutura do ácido cinâmico e seus derivados usados como padrões	83
Figura 27: Espectros ultravioletas dos ácidos <i>p</i> -hidroxibenzóico e cinâmico em MeOH	84
Figura 28: Estruturas dos flavonóides usados como padrões	86

Figura 29: Esqueletos básicos de flavonóides	87
Figura 30: Espectros de absorção UV dos extratos dos méis silvestres selecionados (amostras RLS02 , RLS05 , RLS06 , RLS10 e RLS12) realizados com metanol grau espectroscópico	90
Figura 31: Espectros de absorção UV dos extratos dos méis laranjeiras selecionados (RLL03 , RLL15 , RLL16 , RLL18 , RLL19 e RLL20) realizados com metanol grau espectroscópico	92
Figura 32: Análise da amostra RLL03 (extraída com éter), por CLAE a 250 nm, em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5µm), fluxo de 1mL.min ⁻¹ , fase móvel água: ácido acético (99:1, solvente A) e água: acetonitrila : ácido acético (59:40:1, solvente B). NI (picos não identificados)	95
Figura 33: Análise da amostra RLL03 (extraída com éter), por CLAE a 320 nm, em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5µm), fluxo de 1mL.min ⁻¹ , fase móvel água: ácido acético (99:1, solvente A) e água: acetonitrila : ácido acético (59:40:1, solvente B). NI (pico não identificado)	96
Figura 34: Análise da amostra RLL15 (extraída com acetato de etila), por CLAE a 270 nm, em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5µm), fluxo de 1mL.min ⁻¹ , fase móvel água: ácido acético (99:1, solvente A) e água: acetonitrila : ácido acético (59:40:1, solvente B). NI (pico não identificado)	98
Figura 35: Análise da amostra RLL15 (extraída com acetato de etila), por CLAE a 380 nm, em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5µm), fluxo de 1mL.min ⁻¹ , fase móvel água: ácido acético (99:1, solvente A) e água: acetonitrila : ácido acético (59:40:1, solvente B)	99
Figura 36: Análise da amostra RLL16 (extraída com acetato de etila), por CLAE a 270 nm, em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5µm), fluxo de 1mL.min ⁻¹ , fase móvel água: ácido acético (99:1, solvente A) e água: acetonitrila : ácido acético (59:40:1, solvente B)	101

- Figura 37:** Análise da amostra **RLL19** (extraída com acetato de etila), por CLAE a 270 nm, em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5µm), fluxo de 1mL.min⁻¹, fase móvel água: ácido acético (99:1, solvente A) e água: acetonitrila : ácido acético (59:40:1, solvente B) 103
- Figura 38:** Análise da amostra **RLL18** (extraída com éter), por CLAE a 270 nm, em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5µm), fluxo de 1mL.min⁻¹, fase móvel água: ácido acético (99:1, solvente A) e água: acetonitrila : ácido acético (59:40:1, solvente B). NI (pico não identificado) 104
- Figura 39:** Análise da amostra **RLL20** (extraída com acetato de etila), por CLAE a 270 nm, em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5µm), fluxo de 1mL.min⁻¹, fase móvel água: ácido acético (99:1, solvente A) e água: acetonitrila : ácido acético (59:40:1, solvente B). NI (picos não identificados) 105
- Figura 40:** Análise da amostra **RLS12** (extraída com éter), por CLAE a 280 nm, em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5µm), fluxo de 1mL.min⁻¹, fase móvel água: ácido acético (99:1, solvente A) e água: acetonitrila : ácido acético (59:40:1, solvente B). NI (picos não identificados) 107
- Figura 41:** Análise da amostra **RLS12** (extraída com acetato de etila), por CLAE a 330 nm, em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5µm), fluxo de 1mL.min⁻¹, fase móvel água: ácido acético (99:1, solvente A) e água: acetonitrila : ácido acético (59:40:1, solvente B). NI (pico não identificado) 108
- Figura 42:** Análise da amostra **RLS10** (extraída com éter), por CLAE a 270 nm, em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5µm), fluxo de 1mL.min⁻¹, fase móvel água: ácido acético (99:1, solvente A) e água: acetonitrila : ácido acético (59:40:1, solvente B) 110
- Figura 43:** Análise da amostra **RLS10** (extraída com acetato de etila), por CLAE a 330 nm, em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5µm), fluxo de 1mL.min⁻¹, fase móvel água: ácido acético (99:1, solvente A) e água: acetonitrila : ácido acético (59:40:1, solvente B). NI (picos não identificados) 111

Figura 44: Análise da amostra **RLS10** (extraída com éter), por CLAE a 360 nm, em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5µm), fluxo de 1mL.min⁻¹, fase móvel água: ácido acético (99:1, solvente A) e água: acetonitrila : ácido acético (59:40:1, solvente B). NI (pico não identificado)

112

Figura 45: Análise da amostra **RLS02** (extraída com éter), por CLAE a 270 nm, em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5µm), fluxo de 1mL.min⁻¹, fase móvel água: ácido acético (99:1, solvente A) e água: acetonitrila : ácido acético (59:40:1, solvente B). NI (picos não identificados)

114

Figura 46: Análise da amostra **RLS05** (extraída com éter), por CLAE a 270 nm, em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5µm), fluxo de 1mL.min⁻¹, fase móvel água: ácido acético (99:1, solvente A) e água: acetonitrila : ácido acético (59:40:1, solvente B). NI (picos não identificados)

116

Figura 47: Análise da amostra **RLS06** (extraída com éter), por CLAE a 270 nm, em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5µm), fluxo de 1mL.min⁻¹, fase móvel água: ácido acético (99:1, solvente A) e água: acetonitrila : ácido acético (59:40:1, solvente B). NI (picos não identificados)

117

Figura 48: Espectro de absorção no ultravioleta da substância **RLLMo** em metanol 122

Figura 49: Espectro de RMN ¹H (200 MHz, DMSO-D₆) de **RLLMo** 123

Figura 50: Espectro de RMN ¹H (200 MHz, DMSO-D₆) de **RLLMo**, expandido na região

de 6,0 a 7,30 ppm 123

Figura 51: Espectro de RMN ¹³C (50 MHz, DMSO-D₆) de **RLLMo** 124

Figura 52: Estruturas químicas dos flavonóides amentoflavona e 7''-O-metilgatisflavona

128

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CCF	-cromatografia de camada fina
CLAE	- cromatografia líquida de alta eficiência
CL	- cromatografia líquida
DAD	- detecção de arranjo de fotodiodos
CP	- cromatografia de papel
CC	- coluna aberta convencional
UV	- ultravioleta
EM	- espectrometria de massa
nm	- nanômetro
p.	- página
AcOEt	- acetato de etila
MeOH	- metanol
mL	- mililitro
min	- minutos
mm	- milímetros
μm	- micrômetros
g	- gramas
mg	- miligramas
kg	- quilogramas
ppm	- parte por milhão
⁰ C	- graus Celsius
t _R	- tempo de retenção

RESUMO

LIANDA, Regina Lucia Pelachim. **Caracterização de mel de *Apis mellifera* pelo seu perfil em substâncias fenólicas por cromatografia líquida de alta eficiência e avaliação da atividade biológica.** Seropédica. UFRRJ, 2004. 142p. Dissertação de Mestrado em Química Orgânica, Química de Produtos Naturais.

Este trabalho descreve a identificação de ácidos fenólicos e flavonóides em cinco amostras de mel silvestre e seis amostras de mel laranjeira obtidas de diferentes regiões geográficas. As amostras de méis foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de fotodiodos e UV-visível. A análise do perfil cromatográfico associado ao estudo dos espectros de ultravioleta acumulados a λ 250-380 nm, permitiu identificar os ácidos fenólicos e flavonóides em uma única corrida de 40 minutos. Para as amostras de mel silvestre foram identificados os ácidos gálico, vanílico, *para*-cumárico, *para*-metoxi-benzóico, *para*-metoxi-cinâmico, *para*-hidroxibenzóico, protocatecuico e sinápico, e o flavonóide morina, enquanto para as amostras de mel laranjeira foram identificados os ácidos gálico, vanílico, *para*-cumárico, *para*-metoxi-cinâmico, *para*-hidroxibenzóico, protocatecuico, siríngico, sinápico e cinâmico e os flavonóides quercetina e rutina. Além desses ácidos, para a amostra **RLL20** (mel laranjeira de Taubaté-SP) foi isolado e identificado, pela primeira vez, o flavonol morina.

A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência mostrou-se eficiente e reprodutiva na caracterização das substâncias fenólicas encontradas nas onze amostras de méis estudados.

O estudo perfil cromatográfico para as substâncias fenólicas permitiu estabelecer a composição para os méis monoflorais, oriundos de diferentes regiões geográficas, pois estes não mostraram alterações qualitativas drásticas. Estas substâncias poderão vir a ser usadas como marcadores químicos para a caracterização da origem botânica e/ou geográfica do mel de *Apis mellifera*.

Dentre as diversas substâncias contidas no mel destacam-se as substâncias fenólicas, devido às importantes atividades biológicas, tais como atividades antimicrobianas, antiinflamatórias, antiproliferativas e antitumorais.

Os ensaios biológicos avaliaram a atividade antitumoral *in vivo* e *in vitro* da fração rica em compostos fenólicos do mel silvestre proveniente da cidade de Itararé-SP, sobre o crescimento do carcinoma de Erlich em camundongos. A citotoxicidade mostrou-se pouco significativa para a atividade antitumoral *in vitro* (25% de inibição do crescimento), porém os resultados *in vivo* mostraram significativa inibição do crescimento do tumor e aumento da sobrevivência dos animais (67% dos animais ficaram isentos de tumor após 75 dias de tratamento). Os estudos de atividade biológica do extrato do mel são preliminares, mas revelam-no como potente agente terapêutico.

Palavras chaves: Ácidos fenólicos, Flavonóides, Mel, CLAE, Atividade Antitumoral.

ABSTRACT

LIANDA, Regina Lucia Pelachim.. **Characterization of *Apis mellifera* honey by high-performance liquid chromatography phenolics compounds profile and biological activity evaluation.** Seropédica. UFRRJ, 2004. 142p. Dissertação de Mestrado, Química Orgânica, Química de Produtos Naturais.

This work describes the identification of phenolic acids and flavonoids present in five samples of wild honeys and six of citrus honey from different geographical regions. The honey samples were analyzed by high-performance liquid chromatography with a diode-array detector and UV-Vis. The HPLC phenolic profiles and the UV spectra obtained by diode-array detector at 250-380 nm, allowed to identify phenolic acids and flavonoids in approximated 40 minutes. In the wild honey samples were identified the gallic, vanillic, *para*-coumaric, *para*-methoxy benzoic, *para*-methoxy-cinamic, *para*-hydroxy-benzoic, protocatecuic and sinapic acids, and morin flavonoid, while the citrus honey samples were identified mainly gallic, vanillic, *para*-coumaric, *para*-methoxy-cinamic, *para*-hydroxy-benzoic, protocatecuic, syringic, sinapic e cinamic acids, and quercetin and rutin flavonoids. In the **RLL20** sample (citrus honey – Taubaté-SP) were identified and isolated, in the first time, the morin flavonoid.

The HPLC technique has been showed to be efficient and reproductive in the characterization of the phenolic compounds present in eleven honey samples.

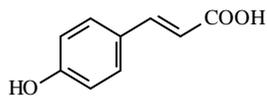
The chromatographic profiles of the phenolic compounds allowed establishing the composition from monofloral honeys from different regions geographical, because they did not show any major qualitative differences. These compounds would be used as chemical markers for the botanical and/or geographical origin of *Apis mellifera* honey.

Among several compounds contained in honey, the phenolic compounds, such as phenolic acids and flavonoids have been described to contain biological activities, including antibacterial, antioxidant and antitumor activities.

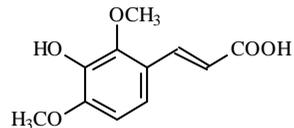
Despite of the identification of many phenolic compounds in honeys, the biological activity was carried with the mainly fraction of the phenolic compounds from wild honey from Itararé-SP. The antitumor activity was tested both *in vitro* and *in vivo* on Erlich carcinoma in mouse. The cytotoxicity showed moderate antitumor activity *in vitro* (25% of increase inhibition), however *in vivo* the results showed significative inhibition of tumor increase and advance of animals survival (67% of the animals didn't showed tumor after 75 days of treatment). These studies of the biological activity of the extracts of honey were only preliminary but they showed that phenolic compounds might have therapeutic potential.

Keywords: Phenolic acids, Flavonoids, Honey, HPLC, Antitumor Activity

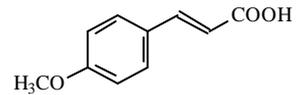
SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS NOS MÉIS SILVESTRES



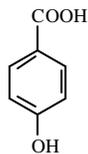
Ácido *p*-cumárico **4**



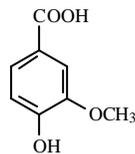
Ácido sinápico **7**



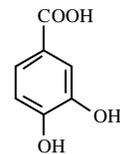
Ácido 4-metoxi-
cinâmico **8**



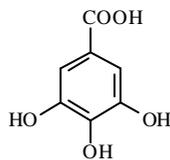
Ácido *p*-hidroxi-
benzóico **11**



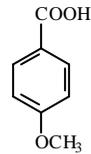
Ácido Vanílico **12**



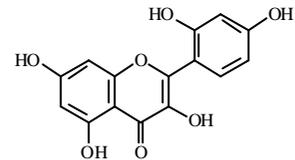
Ácido
Protocatecuico **14**



Ácido Gálico **15**

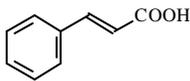


Ácido 4-metoxi-
benzóico **20**

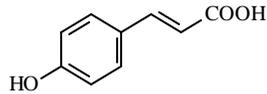


Morina **21**

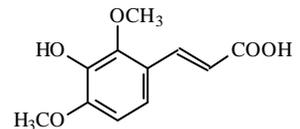
SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS NOS MÉIS LARANJEIRAS



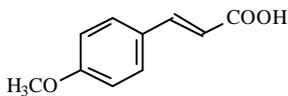
Ácido cinâmico **3**



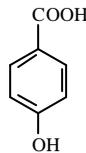
Ácido *p*-cumárico **4**



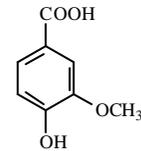
Ácido sinápico **7**



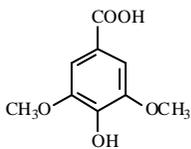
Ácido 4-metoxi-
cinâmico **8**



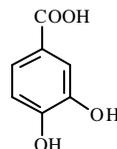
Ácido *p*-hidroxi-
benzóico **11**



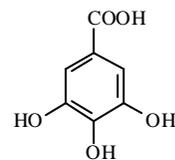
Ácido Vanílico **12**



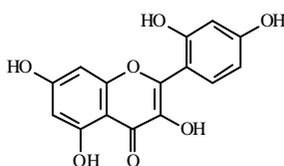
Ácido Siringico **13**



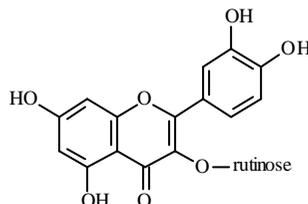
Ácido
Protocatecuico **14**



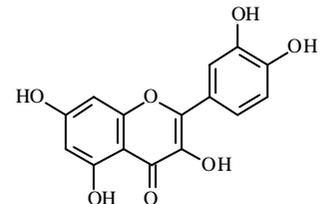
Ácido Gálico **15**



Morina **21**



Rutina **22**



Quercetina **23**

1 – INTRODUÇÃO

1.1 - O Mel

O mel é o produto mais importante da abelha (no Brasil, *Apis mellifera*) do ponto de vista quantitativo e econômico, e foi, também, o primeiro usado pelo homem em épocas antigas. A história do uso do mel está paralela a 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).

A utilização do mel na nutrição humana não deveria limitar-se apenas a sua característica adoçante, como excelente substituto do açúcar, mas, principalmente, por ser um alimento de alta qualidade, rico em energia e inúmeras outras substâncias benéficas ao equilíbrio dos processos biológicos de nosso corpo.

O mel é uma mistura de substâncias naturais de sabor doce produzida pelas abelhas, a partir da coleta do néctar das flores ou de secreções de partes de plantas ou de excreções de insetos que sugam partes das plantas, e que se transformam e combinam com as substâncias específicas de seus próprios organismos, ficando armazenados nos favos das colméias até o amadurecimento. Esta é a definição geral do mel no CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (1990) em que todas as características comercialmente requeridas do produto são descritas.

O néctar, por sua vez, advém do fluido circulante de plantas vasculares. Esse fluido que distribui nutrientes para o tecido vegetal é oriundo de dois sistemas: floema (sistema vascular que conduz matéria orgânica) e xilema (sistema vascular que conduz água e minerais; DE MARIA & MOREIRA, 2003). Ele é produzido pelas plantas com o intuito de atrair insetos, para promover a polinização. E pólen é o elemento fecundante das flores das plantas fanerógamas.

A elaboração do mel resulta de duas modificações principais (reações) sofridas pelo néctar, uma física pela desidratação (eliminação da água), através da evaporação na colméia e absorção no papo (vesícula melífera), a outra reação química que atua sobre o néctar,

transformando a sacarose, através da enzima invertase, em glicose e frutose. Ocorrem mais duas reações, em escala menor, que consistem em transformar o amido do néctar, através da enzima amilase, em maltose e a enzima glicose-oxidase transforma a glicose em ácido glicônico e peróxido de hidrogênio. Em outras palavras, o néctar sofre no trajeto da boca ao papo (vesícula melífera) ação definitiva das enzimas: invertase, amilase e glicose-oxidase estando pronto assim para ser regorgitado nos alvéolos do favo, continuando parte das reações nestes alvéolos, assim ocorre a maturação do mel, culminando com a operculação dos favos (LENGLER, 2004).

O mel é basicamente uma mistura complexa de açúcares altamente concentrada. Sua composição química depende de muitos fatores tais como: espécies colhidas, natureza do solo, raça de abelhas, estado fisiológico da colônia, estado de maturação do mel, condições meteorológicas, etc. Por detrás dessa aparente simplicidade, esconde-se um dos produtos biológicos mais complexos. Sendo assim, é considerado o produto mais importante da abelha do ponto de vista quantitativo e econômico. E 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. O aroma é um dos atributos sensoriais mais atraentes do consumidor.

O sabor, a cor e o aroma variam de acordo com sua origem botânica, clima, solo, umidade, altitude e até mesmo a manipulação pelo apicultor pode alterar as características do mel.

Como características gerais não são permitidas substâncias estranhas à sua composição, nem adição de corretivos de acidez. É proibido a adição de corantes, aromatizantes, espessantes, conservadores e edulcorantes de qualquer natureza, sejam eles naturais ou sintéticos (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 1990).

O mel é originário do néctar de mais de 2500 tipos de flores de plantas diferentes, por isso possui características extremamente variáveis (LENGLER, 2004).

Quanto à origem floral o mel pode ser classificado:

a) Mel de flores, estes podem ser: *i*) méis uniflorais ou monoflorais - quando o mel é produzido, principalmente, a partir do néctar de uma única espécie floral, por exemplo o

mel de angico, de eucalipto, de laranjeira, etc; *ii*) méis multiflorais, poliflorais ou heteroflorais - quando o mel é produzido de néctar coletado de diversas flores de origens florais diferentes, por exemplo, silvestre.

b) Méis de melato (“honeydew”) que são méis obtidos primordialmente a partir de secreções de insetos sugadores de plantas, que se encontram sobre elas; mas também de secreções produzidas por algumas plantas, de néctar extrafloral, nas juntas das folhas (SAWYER, 1975).

Para que o nome da planta apícola possa ser citado no rótulo é necessário que tenha no mínimo 45% de dominância e seja colhido, igualmente, de uma região com predominância floral na área de visitação das abelhas do apiário (BARTH, 1989).

O mel e o pólen são dois produtos da colméia que resultam diretamente da atividade de coleta das abelhas. Um terceiro é a própolis, algumas vezes chamado cola de abelha, que são usados para impermeabilizar suas colméias ou as cavidades do ninho. O nome própolis é derivado do grego *pro* (em defesa de); e *polis* (a cidade), o que quer dizer: “em defesa da cidade ou da colméia”.

Outros três produtos da colméia, comercialmente cultivados, não são materiais vegetais processados, mas secreções das próprias abelhas. Esses produtos são as ceras de abelha, produzidas nas glândulas abdominais e usadas para construção de favos; a geléia real ou leite de abelhas, produzidas nas glândulas da cabeça e usada para alimentar as larvas, e a apitoxina que é o veneno das abelhas operárias de *Apis mellifera* purificado.

Considerando-se o peso, o mel é o menos dispendioso destes seis materiais para o apicultor produzir. Depois vem a cera de abelha, o pólen e, então, a própolis. A geléia real e a apitoxina - os mais dispendiosos de todos – são coletados em quantidades diminutas e sua produção envolve muito trabalho e cuidado.

A composição exata de qualquer mel depende, principalmente, das fontes vegetais das quais ele é derivado, mas também do tempo, solo, e de outros fatores e dois méis nunca são idênticos. Levando em conta a grande variedade do clima e da flora, extremamente rica no Brasil, a produção de mel e sua composição merecem especial atenção.

1.2 - Composição e Características Físicas do Mel

A composição química do mel depende de vários fatores, dos quais se salientam: a espécie de abelhas, tipo de solo e de flora e o estado fisiológico da colônia. Alguns dos componentes são devido à maturação do mel, alguns são adicionados pela abelha e alguns são derivados das plantas. O mel de uma mesma origem floral pode variar devido a mudanças climáticas da estação ou devido a diferentes origens geográficas (ANKLAM, 1998). Pequenas alterações na composição química do mel podem ser atribuídas aos efeitos de processamento e estocagem do mel (TAN *et al.*, 1989a).

O mel é usualmente aquecido até 32-40°C com o intuito de diminuir sua viscosidade, isso facilita a extração e filtração. Essa temperatura é similar à da colméia e não afeta o mel durante um período de processamento relativamente curto (ANKLAM, 1998).

A variedade infinita é, de fato, uma grande atração do mel, e pode ser uma fonte inesgotável de pesquisas e estudos. De um modo geral podemos dizer que o mel é constituído por três componentes essenciais: água (17%), glicídios (80%) e substâncias diversas (3%), como aminoácidos, proteínas, enzimas, ácidos orgânicos e matérias minerais.

Os açúcares representam 95 a 99% da matéria seca do mel. Geralmente, a frutose é mais abundante do que a glicose (Tabela 1), e esta predominância de açúcares simples, e particularmente a porcentagem elevada da frutose, são responsáveis pela maioria das características físicas e nutritivas do mel. Quantidades pequenas de outros açúcares também estão presentes, como dissacarídeos (sacarose, maltose e isomaltose) e alguns trissacarídeos e oligossacarídeos. Por se apresentarem em pequenas concentrações, sua presença em maiores quantidades pode ser indicativa de adulteração e qualquer variação de sua concentração pode ser útil na determinação da origem botânica do mel. A Tabela 1 expõe as porcentagens médias e extremas dos constituintes principais de algumas amostras de méis.

Tabela 1: Composição básica do mel (WHITE, 1975).

Componentes	Média	Desvio padrão	Varição
Água (%)	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)	22,03	8,22	6,75 - 47,19
Lactose (meq/kg)	7,11	3,52	0,00 - 18,76
Acidez total (meq/kg)	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

Além dos açúcares em solução, o mel também contém ácidos orgânicos, enzimas, vitaminas, acetilcolina, flavonóides, minerais e uma extensa variedade de compostos orgânicos que contribuem para sua cor, aroma e sabor, e que até agora ainda não são totalmente conhecidos. Todos estes compostos menores somados, representam em massa, uma pequena parcela do mel.

A cor do mel reflete a sua composição, acredita-se que tanto mais escuro quanto maior é o teor de substâncias minerais presentes, apesar de não confirmado. O peso total dos elementos minerais (teor de cinza total) varia de 0,02% a valores próximos de 1% (WHITE, 1975); e o principal mineral constituinte do mel é o potássio. O conteúdo muito

alto (1%) é bem provável ser encontrado em mel de melato, podendo até ser usado como indicador desses méis.

Muitos dos méis distribuídos comercialmente tem sofrido algum grau de processamento físico, como filtração, centrifugação e decantação, com a finalidade de remover partes de insetos, grãos de pólen e partículas de cera.

O mel contém também, ácidos orgânicos (o pH médio é de cerca de 3,9) que representam menos que 0,5% dos sólidos, podendo ser responsáveis, em parte pela excelente estabilidade do mel frente a microorganismos, e também realçando o seu sabor. Na literatura, pelo menos 19 ácidos orgânicos de baixo peso molecular do mel já foram citados (CRANE, 1990). Sabe-se que o ácido glucônico está presente em maior quantidade; ele é produzido pela ação da enzima glicose-oxidase, proveniente das glândulas hipofaríngeas das abelhas. Já em menor quantidade, pode-se encontrar outros ácidos como: fórmico, acético, benzóico, butírico, láctico, oxálico, málico, succínico, pirúvico, glicólico, cítrico, fenilacético, tartárico, maleico, piroglutâmico, valérico (STRINSON *et al.*, 1960; WHITE, 1975; ANDRADE *et al.*, 1997; HUIDOBRO *et al.*, 2002).

TAN *et al.* (1988) constataram alguns ácidos aromáticos no mel unifloral de manuka (*Leptospermum scoparium*) que não estavam presentes no néctar de suas flores. Os méis de manuka e de viperina (*Echium vulgare*), apresentam alta atividade antimicrobiana, podendo essa atividade estar relacionada com a presença de alguns tipos de ácido (WILKINS *et al.*, 1993).

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 agliconas. A proporção desses três grupos varia enormemente nos méis conforme as origens florais.

Assim como estes ácidos, o mel contém, também, aminoácidos. WOOTON *et al.* (1976) constataram em seis amostras de méis australianos os seguintes aminoácidos livres: leucina, isoleucina, histidina, metionina, alanina, fenilalanina, glicina, ácido aspártico, treonina, serina, ácido glutâmico, prolina, valina, cisteína, tirosina, lisina e arginina.

Dentre esses aminoácidos, a prolina, proveniente das secreções salivares das abelhas, é o que apresenta os maiores valores, variando entre 0,2% e 2,8%.

Em geral, a maior importância dos aminoácidos é que eles podem fornecer “impressões digitais” que distinguem um tipo de mel de outros, e méis autênticos, de substâncias sintéticas disfarçadas em mel. Os aminoácidos são produtos da quebra de proteínas que existem também em quantidades mínimas em méis normais, provenientes das abelhas mais do que das plantas.

Outros componentes menores do mel, como os materiais "flavorizantes" (aldeídos e álcoois), pigmentos, ácidos e minerais, influenciam consideravelmente nas diferenças entre tipos de mel.

AMIOT *et al.* (1992) detectaram alguns flavonóides presentes no mel de girassol (conhecidamente rico em flavonóides). Outros trabalhos também foram relatados na literatura descrevendo os flavonóides como marcadores da origem floral (TOMÁS-BARBERÁN *et al.*, 1993a; 1993b; 1994; 2001).

A composição química do mel, também, pode sofrer alterações devido a adulterações. Essas adulterações são baseadas em dois princípios diferentes: diluição do mel com adição de água e extensão com açúcar e xarope; e outra adulteração devido à abelha ser alimentada com açúcar e xarope ou mel artificial, com posterior rotulação de acordo com a origem floral ou geográfica (ANKLAM, 1998).

A água é o segundo componente em níveis quantitativos e o seu índice é crítico, pois afeta o armazenamento. Somente os méis com menos de 18% de água, podem ser armazenados com pouco ou nenhum risco de fermentação (STONOGA & FREITAS, 1991). O teor de água no mel depende de diversos fatores, tais como, condições do néctar e umidade da colméia, bem como do tratamento durante a extração e armazenamento.

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 & AZEREDO, 1999; MARCHINI, 2001).

Em condições especiais de níveis elevados de umidade, o mel pode fermentar pela ação de leveduras osmofílicas (tolerantes ao açúcar) presentes também em sua composição. Segundo CRANE (1985), a maior possibilidade de fermentação do mel está ligada ao maior teor de umidade e leveduras.

Atividade enzimática poderia ser uma medida de exposição do mel ao aquecimento em processamento ou estocagem do mesmo. Entretanto esse valor é menos exato do que o conteúdo de HMF (hidroximetilfurfural), porque a atividade enzimática varia muito para diversos méis. Isso é devido ao fato de que diferente quantidade de saliva contendo enzimas pode ser adicionada pelas abelhas ao mel sob condições diferentes. A atividade da enzima diastase em mel é relacionada ao tratamento de aquecimento (ANKLAM, 1998). De qualquer forma o número diastase e o conteúdo de HMF são dois parâmetros usados para avaliar o frescor do mel. Algumas legislações usam somente o número diastase para avaliar o grau de frescor do mel (SANCHO *et al.*, 1992). Segundo DE MARIA & MOREIRA (2003) o furfural é altamente reativo e, portanto, níveis mais baixos de furfural poderiam não refletir de maneira fidedigna o processamento inadequado do mel.

Apesar de um prazo máximo para consumo do mel, também deve ser observado que, em alguns casos, sua comercialização só pode ser feita após um período de armazenamento. Um estudo foi feito com 15 amostras de méis *Citrus* espanhóis, de diferentes variedades de limão (*Citrus limon* Burm.), laranja (*Citrus sinensis* Osbeck, *Citrus aurantium* L.) e outro tipo de laranja (*Citrus deliciosa* Ten.), com o objetivo de estudar a variação de antranilato de metila (substância usada como marcador químico), HMF, número diastase e perfil de açúcares durante o período de transição para a comercialização. Dessas quinze amostras, quatro foram selecionadas de acordo com valores médios obtidos para avaliação da quantidade de sacarose. Uma importante perda de sacarose entre 63 e 81% do seu valor inicial foi observada após três meses, enquanto frutose, glicose, isomaltose e maltose aumentaram. Esse produto, quando fresco, não pode ser comercializado, pois o valor inicial de sacarose supera excessivamente os limites legais. De acordo com a legislação européia e brasileira (MOREIRA *et al.*, 2002), esse valor não deve exceder 5% e segundo a CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (1990) não deve ultrapassar de 10%. Para todas as quatro amostras, esses valores foram atingidos após três

meses e um mês, respectivamente. Em consequência somente após estes prazos cumpridos esses méis puderam ser comercializados (BONVEHI & COLL, 1995).

No contexto do nosso trabalho, ênfase será dada a cromatografia líquida de alta eficiência como técnica cromatográfica utilizada para análise e separação das substâncias polifenólicas encontradas nas amostras de méis. Porém, antes de apresentar os resultados, é importante abordar alguns aspectos básicos da cromatografia.

2 - ASPECTOS DA CROMATOGRAFIA

A cromatografia é um método físico-químico de separação, que está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. A grande variedade de combinação entre fases móveis e estacionárias torna-a uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação (DEGANI *et al.*, 1997)

Com o crescente interesse no descobrimento de novos metabólitos presentes nos produtos naturais, existe a necessidade de se separar misturas em quantidades pequenas ou grandes, de maneira eficaz, rápida e econômica. Mesmo sabendo-se que é extremamente difícil satisfazer tais requisitos com as técnicas cromatográficas utilizadas comumente, é de extrema importância conhecer e escolher a técnica mais adequada ao problema.

O isolamento e caracterização de metabólitos especiais requerem cada vez mais a utilização de técnicas cromatográficas modernas, que possam aumentar de forma considerável a sensibilidade e a seletividade da análise dos compostos de interesse. Atualmente, existe a possibilidade de se realizar esquemas rápidos e adequados de separação e caracterização, por meio de uma escolha acertada das diferentes técnicas cromatográficas disponíveis (HOSTETTMANN *et al.*, 2003).

A incansável busca de eficientes técnicas de análise e separação, fez com que um aperfeiçoamento tecnológico ocorresse, principalmente, com a cromatografia instrumental, destacando-se a cromatografia em fase líquida e a em fase gasosa.

Comumente, a cromatografia convencional não é suficientemente eficaz para separar substâncias com estruturas químicas muito próximas. Por outro lado, as técnicas de cromatografia em fase líquida sob pressão, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com a fase estacionária com partículas de baixa granulometria, podem realizar separações difíceis graças a melhores fatores de separação (SNYDER *et al.*, 1988).

Os processos clássicos baseados em cromatografia de papel (CP), cromatografia em camada fina (CCF) e de coluna aberta convencional (CC) continuam a ser utilizados para a separação e purificação de metabólitos especiais, porém o avanço tecnológico, fez com que a cromatografia líquida de alta eficiência tomasse enorme impulso, facilitando em muito a

análise e o isolamento de substâncias de baixa volatilidade, bem como aquelas termolábeis, cuja análise é bastante dificultada por cromatografia em fase gasosa.

Embora a cromatografia tenha sido originada como uma técnica preparativa, desenvolvida por Tswett, para o isolamento de compostos puros de amostras complexas, os avanços da cromatografia, nos últimos anos, têm sido maiores em sua aplicação como uma técnica analítica para a identificação e quantificação de compostos do que uma técnica de isolamento. A principal diferença entre a cromatografia em fase líquida clássica e a cromatografia líquida de alta eficiência é a utilização de fases estacionárias com micropartículas (10, 5 ou 3 μm). Essas fases, por serem muitos menos permeáveis, tornaram necessária a utilização de bombas para a eluição da fase móvel. A utilização dessas novas fases estacionárias, associada ao desenvolvimento da instrumentação, levou esta técnica a um melhor aperfeiçoamento em termos de resolução, quantificação e detecção em um menor tempo de análise (SNYDER & KIRKLAND, 1979).

A separação de uma mistura por CLAE se dá por uma ou mais interações entre o soluto, a fase estacionária e a fase móvel, as quais podem ser ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e hidrofóbicas ou forças de van der Waals, entre outras (SNYDER & KIRKLAND, 1979). Os modos de separação podem ser classificados de acordo com a natureza destas interações. São eles: cromatografia em fase reversa, em fase normal, por pareamento de íons ou troca iônica e por exclusão. Assim, a escolha do modo mais adequado à separação de um soluto é baseada em sua natureza, peso molecular, polaridade e caráter iônico.

A fase estacionária normal é compreendida por adsorventes (sílica, alumina) ou fases polares quimicamente ligadas (ciano, diol, amino), e os solventes utilizados são normalmente uma mistura de solventes orgânicos sem a adição de água, onde a fase estacionária é mais polar que a fase móvel. As moléculas neutras menos polares são mais bem separadas e menos retidas pela cromatografia em fase normal. Já na fase estacionária reversa, ocorre a separação dos compostos polares. Enquanto na cromatografia em fase normal a fase estacionária é mais polar que a fase móvel, na fase reversa a fase móvel é mais polar que a fase estacionária, sendo estas fases estacionárias quimicamente ligadas. Os grupos octadecil, octil e propil, na cadeia lateral, são usados na preparação de fases

estacionárias a serem utilizadas em fase reversa, enquanto grupos aminoalquil, diol e cianopropil são utilizados na imobilização da sílica, com aplicabilidade em fase normal e reversa (MEYER, 1994).

Tanto as colunas de fase reversa quanto as de fase normal podem ser utilizados para análises por CLAE analítica e semipreparativa. A diferença entre a cromatografia semipreparativa e analítica é que, enquanto a última (empregada na separação, identificação e determinação das substâncias usando coluna de diâmetros internos de 3-5 mm e partículas 3 – 5 μm) não se preocupa com a recuperação da amostra, a cromatografia semipreparativa é um processo de purificação e permite o isolamento de substâncias puras contidas em uma mistura (AQUINO NETO & NUNES, 2003).

O uso da CLAE semipreparativa é um termo usado para incluir colunas de diâmetros internos maiores (d.i. = 8-10 mm), empacotadas com partículas de 5-10 μm , e úteis para a separação de mistura de 1 a 100 mg (SNYDER & KIRKLAND, 1979). Essa técnica permite a separação de quantidades maiores por injeções repetidas.

As condições isocráticas são as mais adequadas para a CLAE semipreparativa, pois os problemas de operação são reduzidos e a otimização da separação pode ser realizada em colunas de CLAE analítica antes da transposição para a escala semipreparativa.

Na CLAE com fase reversa a fase móvel mais comumente utilizada é água, metanol, acetonitrila, tetraidrofurano, além de ácido fórmico e ácido acético, tanto em sistema isocrático, como em gradiente. O uso de apenas esses solventes, deve-se à pequena quantidade de solventes orgânicos miscíveis com água. O princípio da retenção em fase reversa é hidrofóbico, e a separação se deve, principalmente, a interações entre a parte não-polar do soluto (amostra) e a fase estacionária, isto é, a repulsão desta parte da amostra pela fase móvel aquosa. A adição de ácido acético e ácido fórmico à fase aquosa, que é freqüentemente utilizada como modificadores de fase, deve-se ao fato destes ácidos impedirem a ionização dos grupos acídicos quando presentes na amostra, diminuïrem os tempos de retenção e influenciarem na simetria dos picos (KARCH *et al.*, 1976).

Na última década, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem sido uma das técnicas mais utilizadas para a análise e isolamento de substâncias fenólicas, principalmente, para os ácidos fenólicos e flavonóides, presentes em matrizes complexas,

como por exemplo, alimentos, mel, pólen, própolis, extratos de plantas e fluidos biológicos (HOSTETTMANN *et al.*, 2003; MERKEN & GARY, 2000). A CLAE tem sido utilizada de maneira rotineira como “piloto” para o isolamento em escala preparativa de polifenóis pela otimização das condições experimentais, pelo controle de diferentes frações obtidas durante o isolamento e pelo controle da pureza final dos compostos isolados.

O progresso tecnológico para a CLAE tem-se refletido no desenvolvimento de novas fases estacionárias, associadas ao desenvolvimento da instrumentação e à evolução das técnicas automatizadas. Efetivamente, o maior avanço verificou-se no aumento da seletividade e sensibilidade da detecção. O nível de informação obtido é limitado pelo tipo de detector acoplado à cromatografia líquida (CL). Detectores baseados em absorção de luz ultravioleta (UV), fluorescência, índice de refração, difração de luz e eletroquímica proporcionam boa detecção e sensibilidade, porém pouca ou nenhuma informação estrutural (MEYER, 1994).

A introdução das técnicas de acoplamento, tais como CLAE/UV equipada com uma rede de detecção de arranjo de fotodiodos (CLAE/UV-DAD) e o acoplamento com a espectrometria de massa (CLAE/EM), proporcionou um real avanço na identificação estrutural, em linha, de produtos naturais. O detector UV-Visível é o mais utilizado em CLAE, este detector possui o princípio de absorção de luz ultravioleta ou visível, por parte da amostra, quando nela passa radiação eletromagnética, ou seja, é um detector seletivo para moléculas que possuem cromóforos.

A CLAE acoplada com detecção de arranjo de fotodiodos (DAD) tem sido utilizada há mais de uma década para o estudo da química de produtos naturais (HOSTETTMANN *et al.*, 1984). Atualmente, esta técnica é amplamente empregada nos laboratórios de pesquisa. Os espectros no UV dos produtos analisados podem dar informações úteis sobre a classe de substâncias e, no caso de polifenóis, informações sobre a posição das oxigenações. Os instrumentos mais modernos possuem bancos de dados com substâncias de referência, e uma pesquisa automática pode comparar rapidamente estes dados com os espectros obtidos, permitindo identificar-se compostos conhecidos (DUCREY *et al.*, 1995).

De 1973 a 1982 houve um dramático aumento de interesse na aplicação de CLAE para o estudo de ácidos fenólicos e flavonóides em produtos naturais. As inovações

tecnológicas desenvolvidas em CLAE permitiram aos pesquisadores rápidos procedimentos para análises qualitativas e quantitativas dessas substâncias, com o uso de quantidades extremamente pequenas de material (WULF & NAGEL, 1976; DAIGLE & CONKERTON, 1988).

Nos últimos anos a cromatografia líquida, principalmente CLAE com o uso de coluna de fase reversa, tem sido aplicada para identificação de flavonóides e ácidos fenólicos em alimentos, extratos de plantas e produtos apícolas (MERKEN & GARY, 2000). E em geral, o isolamento desses compostos fenólicos pode ser feito por cromatografia em coluna aberta usando como adsorventes resinas Amberlite XAD-2, XAD-8 e DEAE celulose (dietilaminoetilcelulose) (MAGGI *et al.*, 1989). As forças adsorptivas envolvidas no uso dessas resinas são, principalmente, interações de van der Waals, e os compostos analisados contendo fenólicos e/ou grupos carboxílicos são influenciados pelo pH.

Segundo os dados da literatura, separação e identificação de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência tem sido apontada como uma técnica muito promissora para estudar a origem floral e geográfica de méis (BANKOVA *et al.*, 1982; AMIOT *et al.*, 1989; FERRERES *et al.*, 1992; SABATIER *et al.*, 1992; TOMÁS-BARBERÁN *et al.*, 1993; ANDRADE *et al.*, 1997), bem como, um bom método de separação e determinação de polifenóis em vegetais, frutas e chás usando como detector o arranjo de fotodiodos (SAKAKIBARA *et al.*, 2003; MERKEN & GARY, 2000).

O grande desenvolvimento conseguido com as novas fases estacionárias, principalmente, as fases quimicamente ligadas, fez com que estas sejam as fases preferencialmente usadas em CLAE analítico. Para este trabalho destacam-se as colunas de fase reversa octadecilsilano (C18), que são as mais empregadas na cromatografia líquida de alta eficiência em virtude, principalmente, do menor custo quanto ao uso da água como um dos solventes na eluição.

Graças a esse interesse, a cromatografia líquida vem se destacando como importante técnica na análise e identificação de derivados fenólicos como marcadores químicos para a caracterização da origem floral e geográfica de produtos apícolas.

3 – AS SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS

3.1 - Rota Biossintética

Um dos aspectos fundamentais da química de produtos naturais é a biossíntese, que sugere os processos pelos quais as substâncias são sintetizadas nos organismos vivos vegetais. Os produtos do metabolismo especial de uma planta se dividem em grupos de substâncias que possuam semelhanças entre seus esqueletos básicos; cada um desses grupos tem origem de um precursor próprio, o que caracteriza a biogênese das dos seus representantes.

O conhecimento do perfil químico aliado às propostas biossintéticas das diferentes classes de metabólitos da família vegetal em estudo é muito importante no processo de elucidação estrutural das substâncias. Assim, através deste conhecimento associado aos dados físicos obtidos de análises espectroscópicas, pode-se propor uma estrutura preliminar que auxilie na caracterização completa dos produtos naturais isolados.

Devido às considerações acima, foi considerado importante descrever um pouco da rota biossintética dos derivados fenólicos, com enfoque especial para os derivados do ácido benzóico, do ácido cinâmico e, inclusive os flavonóides uma vez que estes são considerados possíveis marcadores biológicos presentes nos méis monoflorais e/ou heteroflorais, podendo então, auxiliar na determinação da origem botânica e/ou geográfica desses produtos apícolas.

Os ácidos fenólicos naturais sejam eles derivados do ácido benzóico ou do ácido cinâmico, têm a sua origem derivada da rota do ácido chiquímico.

O ácido chiquímico é o precursor de muitos constituintes químicos das plantas que contenham anel aromático em sua estrutura. As substâncias aromáticas derivadas do ácido chiquímico apresentam um padrão de hidroxilação do anel aromático que são semelhantes com as estruturas do catecol **1** (HO-1,2) ou do pirogalol **2** (OH-1,2,3) (Figura 1).

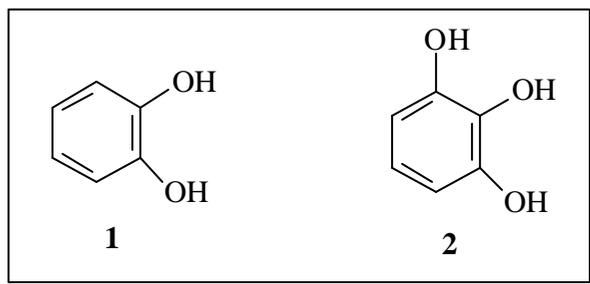


Figura 1: Estruturas do catecol **1** e do pirogalol **2**.

A formação do ácido chiquímico procede dos precursores de três e quatro átomos de carbono, o fosfoenolpiruvato (PEP) e a eritrose-3-fosfato, respectivamente, através de uma série de etapas como ilustrado na Figura 2.

A reação do ácido chiquímico com fosfoenolpiruvato conduz a formação do chiquimato 3-fosfato, que sob a influência da enzima corismato sintase, sofre a perda de ácido fosfórico produzindo o corismato. O corismato através da ação da enzima corismato mutase, sofre um rearranjo de Claisen para gerar o prefenato. Finalmente, a aminação redutiva do prefenato forma a fenilalanina, que é um aminoácido importante na construção de outras substâncias naturais, tais como as proteínas, alcalóides e o ácido cinâmico **3** (substância com esqueleto C_6-C_3). O ácido cinâmico **3** é formado a partir da fenilalanina, pela ação da enzima L-fenilalanina amônia liase (PAL), que é capaz de catalisar a remoção da amônia (Figura 2).

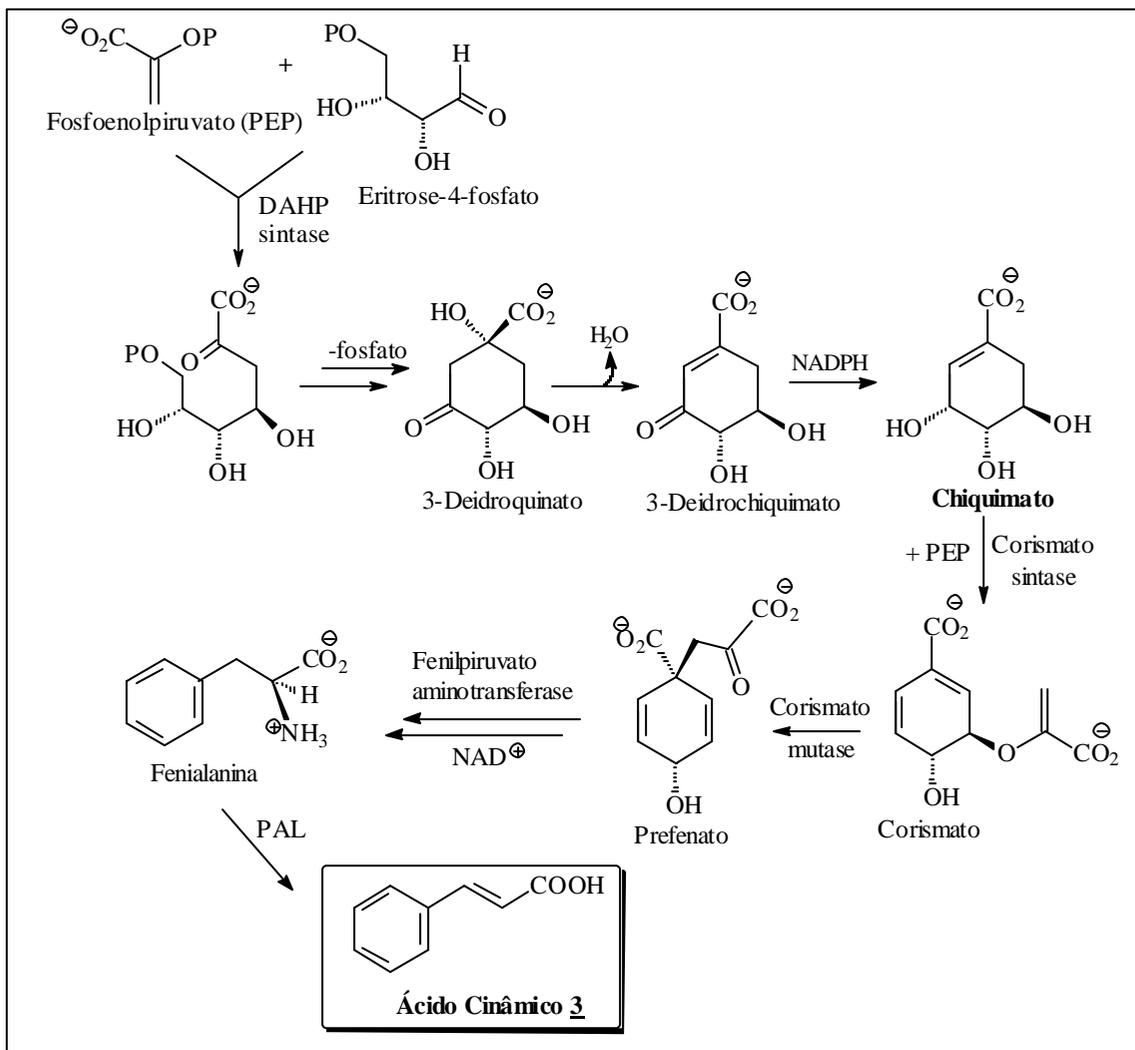


Figura 2. Proposta biossintética para o ácido cinâmico (MANN, 1987).

A importância do ácido cinâmico **3**, e de seus derivados ácido 4-hidroxicinâmico **4** (ácido *para*-cumárico), ácido 3,4-diidroxi-cinâmico **5** (ácido cafeico), ácido 4-hidroxi,3-metoxi-cinâmico **6** (ácido ferúlico), ácido 4-hidroxi, 3,5-dimetoxi-cinâmico **7** (ácido sinápico) e ácido 4-metoxi-cinâmico **8** (ácido *para*-metoxi-cinâmico) como constituintes naturais e como prováveis progenitores para a formação de outras substâncias contendo esqueleto do tipo C₆-C₃ tem sido descrita na literatura (GEISSMAN & CROUT, 1969). A maioria desses derivados é formado a partir de processos oxidativos e/ou de reações de

metilação (sendo estes derivados formados pela ação do cofator enzimático S-adenosil metionina-SAM) sobre o ácido cinâmico **3** (Figura 3).

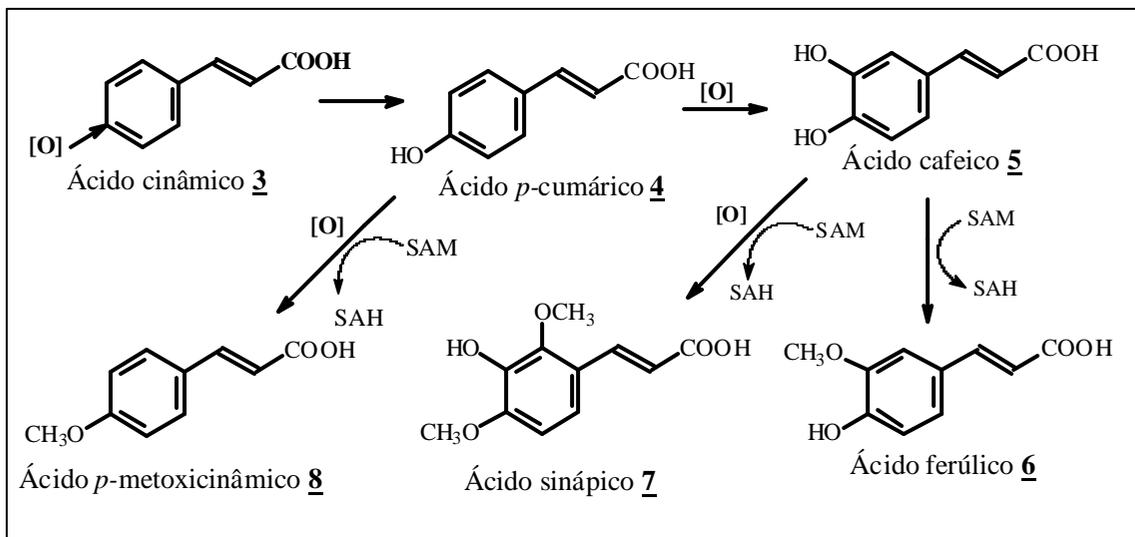


Figura 3. Proposta biossintética para derivados do ácido cinâmico (MANN, 1987).

O ácido cafeico **5** é largamente distribuído nas plantas superiores na forma de seu éster com o ácido quínico; e é conhecido como ácido clorogênico **9** (ácido 3-O-cafeiolquínico; Figura 4). A formação do ácido clorogênico nas plantas superiores a partir da fenilalanina (ou ácido cinâmico) foi estabelecida através de experimentos de marcação isotópica dos precursores com carbono quatorze (^{14}C). Não existe dúvida que a hidroxilação do anel aromático é um processo metabólico comum nas rotas biossintéticas.

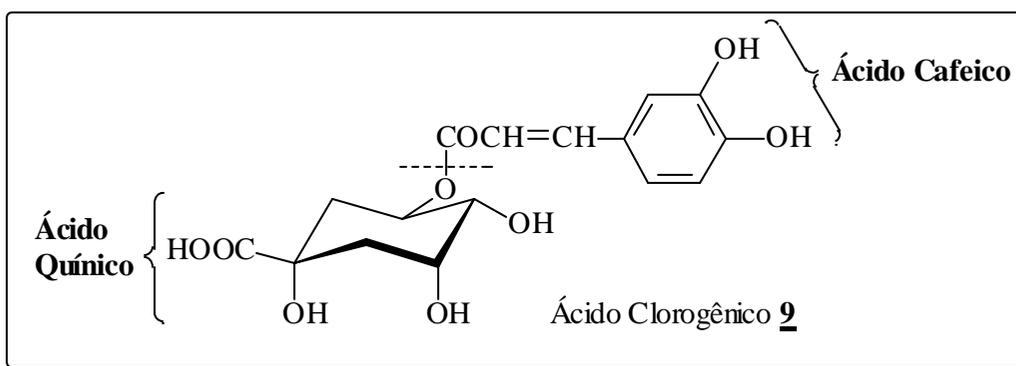


Figura 4: Estrutura do Ácido Clorogênico **9**.

Evidentemente, os ácidos cinamoilquínico são produtos finais; eles se acumulam nas plantas, e embora exista alguma razão para acreditar que eles sofram alterações metabólicas, são colocados na rota principal de formação das substâncias com esqueleto C₆-C₃. Deve-se assumir que a reação de esterificação pela qual o resíduo cinamoil é ligado ao grupo hidroxila do ácido quínico envolve o éster do ácido cinâmico-CoA. Este éster representa o ponto de partida para muitos tipos de metabolismos do ácido cinâmico: formação de éster, β-oxidação, redução de aldeídos e extensão de cadeia pela reação com unidades de malonil-CoA para formar classes de substâncias que possam ser representadas por C₆-C₃(C₂)_n.

O ácido benzóico **10** e os seus derivados ácido *para*-hidroxi-benzóico **11**, ácido vanílico **12**, ácido siríngico **13**, ácido protocatecuico **14**, ácido gálico **15** e ácido gentísico **16** são também largamente distribuídos nas plantas superiores, e ocorrem usualmente, como ésteres alquílicos (-COOR) ou glicosídicos (-COO-gli: açúcares ligados à hidroxila fenólica). Na Figura 5 são mostrados alguns desses ácidos de ocorrência natural.

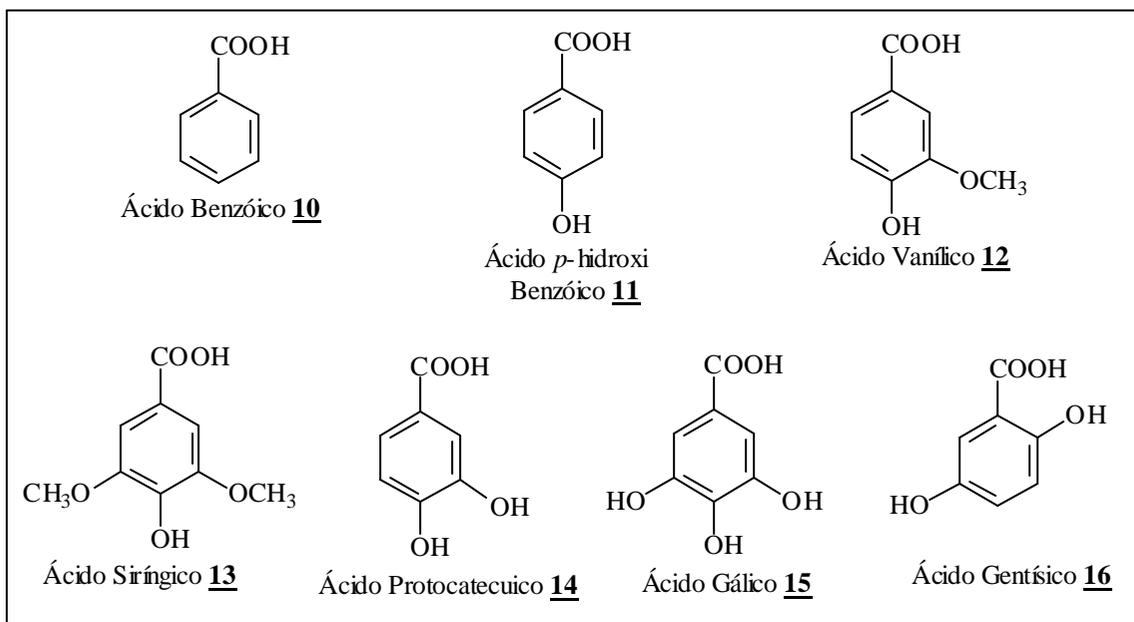


Figura 5: Derivados de ácidos benzóicos de ocorrência natural.

Dos ácidos mostrados na Figura 5, o ácido gálico (**15**) é derivado do ácido 3-deidrochiquimato (intermediário do ácido chiquímico, Figura 6). O ácido protocatecuico (**14**) pode ser formado pela degradação da fenilalanina e pela hidroxilação do ácido *p*-hidroxi-benzóico (**11**). A hidroxilação direta do ácido protocatecuico (**14**) para formar o ácido gálico (**15**), embora rara, também é conhecida (Figura 6).

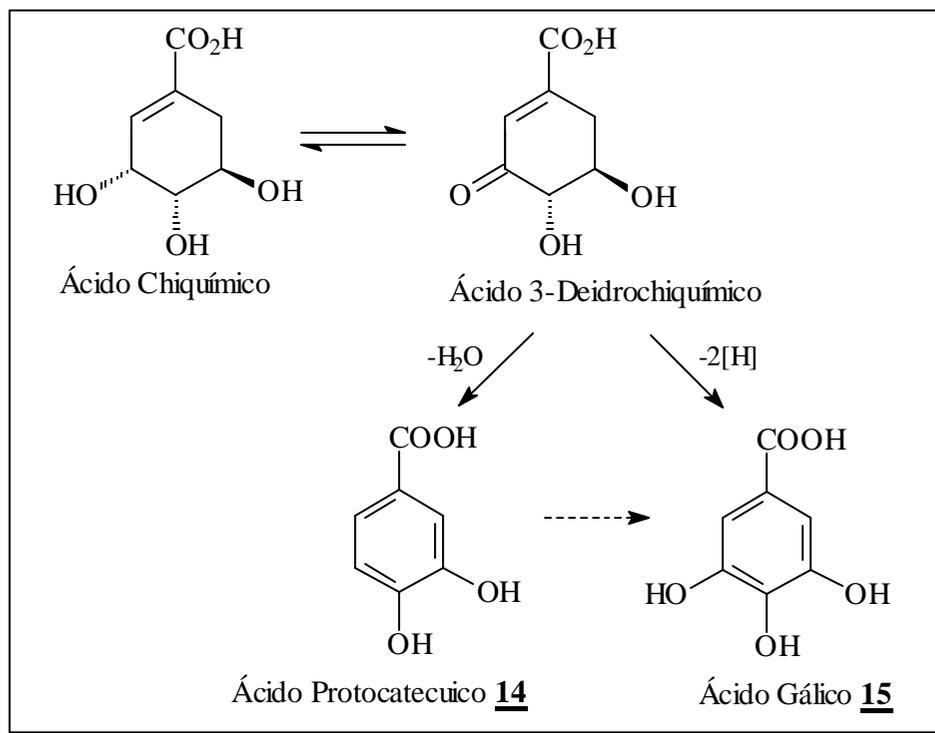


Figura 6: Biossíntese do Ácido Gálico **15** (MANN, 1987).

Pela rota biossintética observa-se que pequenas alterações metabólicas no ácido 3-deidrochiquímico são necessárias para produzir os ácidos aromáticos, derivados do ácido benzóico.

Os ácidos *p*-hidroxibenzóico **11**, vanílico **12**, siríngico **13**, protocatecuico **14** e gentísico **16** são originados de fenilalanina ou ácido cinâmico. Similarmente, os ácidos ferúlico **6** e sinápico **7** podem ser convertidos ao ácido vanílico **12** pela perda de dois átomos de carbono.

O esqueleto básico dos flavonóides, dois anéis aromáticos conectados por uma ponte de três átomos de carbono (C₆-C₃-C₆), resulta de rotas biossintéticas separadas: a do ácido chiquímico e a do acetato, via ácido malônico. A via do ácido chiquímico origina a fenilalanina, precursor do ácido cinâmico, sendo este responsável pelo anel aromático **B** e a ponte de três carbonos. O outro anel aromático, anel **A** do esqueleto básico dos flavonóides é formado pela rota do acetato (Figura 7).

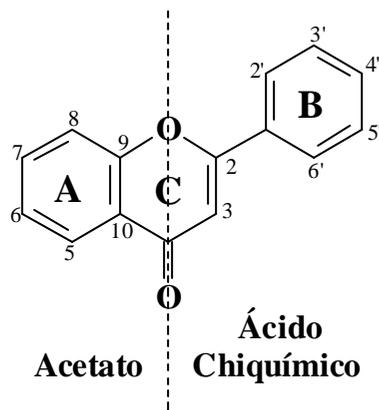


Figura 7. Esqueleto básico dos flavonóides.

O primeiro flavonóide formado na biossíntese é a chalcona e todas as outras formas são derivadas desta através de várias outras rotas (MARKHAN, 1982). A chalcona é formada pela condensação de 4-cumaril CoA com três moléculas de malonil CoA, através da ação da chalcona sintase, enzima limítrofe da síntese de flavonóides, pois catalisa a formação do esqueleto C₁₅, e deste modo a entrada de hidroxicinamatos dentro da biossíntese. A ciclização da chalcona durante a síntese da flavanona é catalisada pela chalcona isomerase encontrada fortemente complexada com a chalcona sintase. A flavanona é precursora de três diferentes classes de flavonóides, isto é; flavonas, isoflavonas e diidroflavonóis. Na formação das flavonas e flavonóis ocorre a introdução de uma dupla ligação entre C₂ e C₃. Dois passos são necessários para esta conversão onde são descritas duas flavonas sintase: flavona sintase I (dioxigenase) e flavona sintase II (monoxigenase). A monoxigenase dependente da citocromo P-450, que também catalisa a epoxidação para a formação das isoflavonas. Os diidroflavonóis são formados pela ação de uma flavanona-3-hidroxilase (DEY & HARBONE, 1997; HELDT, 1997). A Figura 8 indica as reações enzimáticas envolvidas na produção de algumas classes de flavonóides.

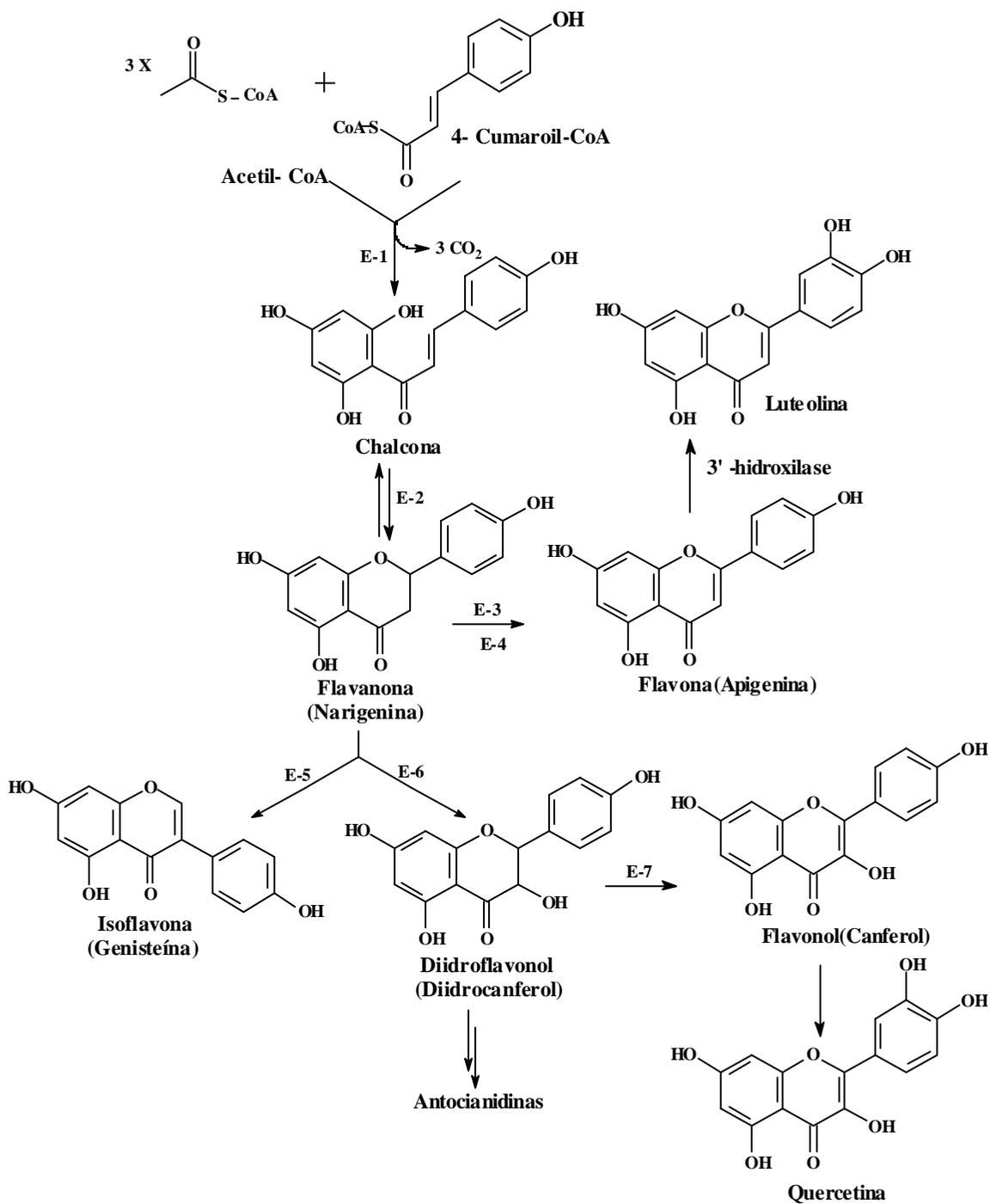


Figura 8. Biossíntese dos flavonóides (**E-1**: Chalcona sintase, **E-2**: Chalcona isomerase, **E-3**: Flavona sintase I (2-hidroxiflavanona sintase), **E-4**: Flavona sintase II (2-hidroxiflavanona sintase), **E-5**: Isoflavona sintase (2-hidroxiiisoflavona sintase), **E-6**: Flavanona-3-hidroxilase e **E-7**: Flavonol sintase).

Outras modificações podem ocorrer em vários estágios, resultando em hidroxilação adicional (ou redução); metilação de grupos hidroxila ou do núcleo flavônico; isoprenilação de grupos hidroxila ou do núcleo flavônico; metilação de grupos diidroxilícos em posição orto; dimerização (para produzir bisflavonóides); formação de bissulfatos; e também, glicosilação de grupos hidroxila (para formar os flavonóides *O*-glucosídicos) ou do núcleo flavônico (para formar flavonóides *C*-glucosídicos) (MARCANO *et al.*, 1991; DEWICK, 1998).

3.2 – Tipos e a Distribuição de Substâncias Fenólicas nos Alimentos

Diversas moléculas tendo a estrutura de um polifenol (substâncias com diversos grupos hidroxila em anel aromático) têm sido identificadas em plantas superiores, sendo centenas delas encontradas em alimentos (mel, frutas, legumes, vegetais, etc). Essas substâncias são metabólitos especiais de plantas e estão, geralmente, envolvidos na defesa contra radiação UV ou agressão por patógenos. As substâncias fenólicas podem ser classificadas em diferentes grupos em função do número de anéis fenólicos que eles contêm ou de elementos estruturais que ligam esses anéis uns aos outros. Distinções devem ser feitas entre os ácidos fenólicos, flavonóides, estilbenos e lignanas (Figura 9). O grupo dos flavonóides compartilha uma estrutura comum, consistindo de dois anéis aromáticos (**A** e **B**) que são ligados entre si por três átomos de carbono que formam um heterociclo oxigenado (anel **C**), que podem ser divididos em seis classes em função do tipo de heterociclo envolvido: flavonol, flavona, flavanol, isoflavona, flavanona e antocianidina (Figura 10, p. 26). Além dessa diversidade, os polifenóis podem estar associados com carboidratos e ácidos orgânicos e com outros fenóis (MANACH *et al.*, 2004).

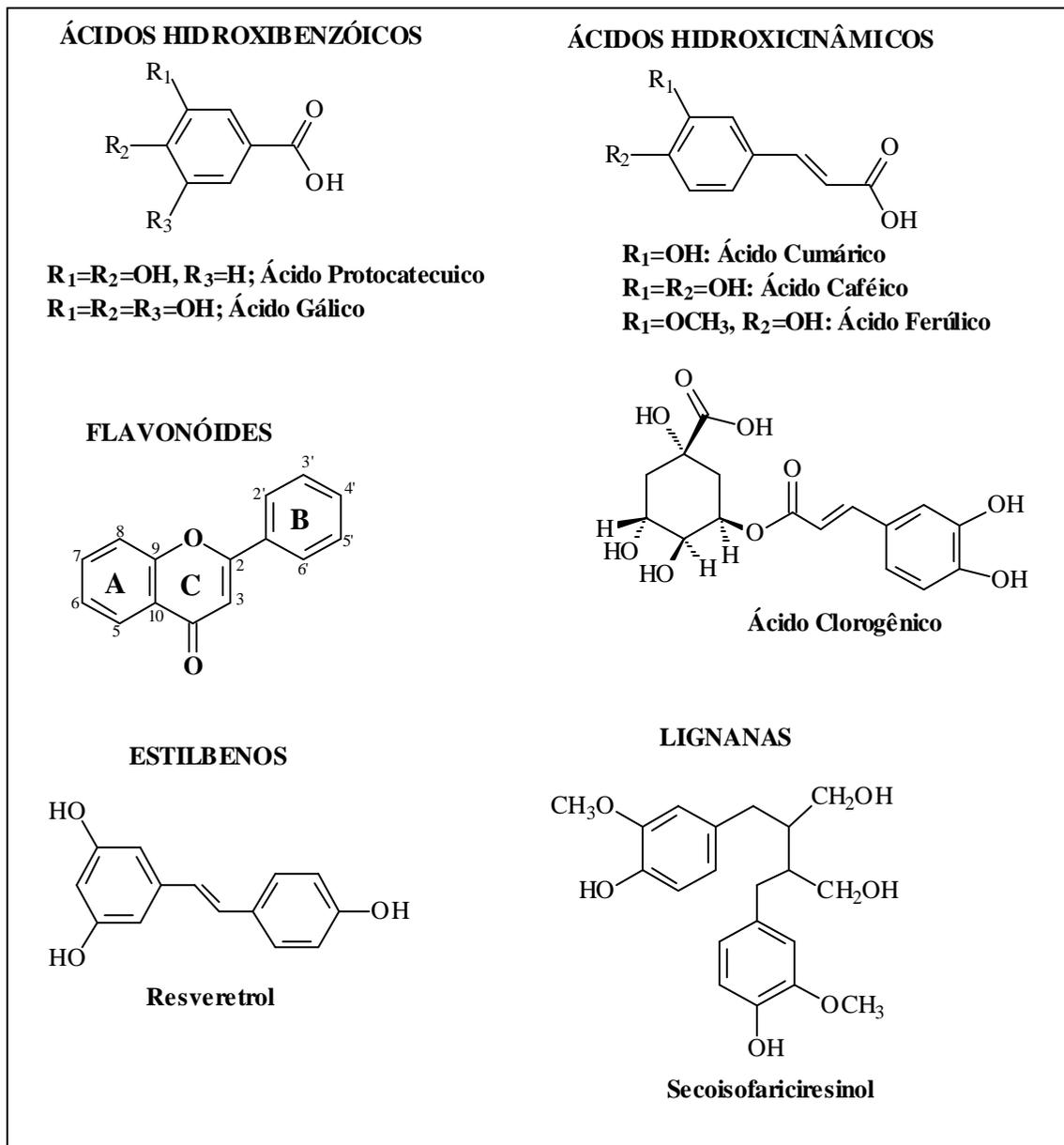


Figura 9. Estruturas químicas de polifenóis.

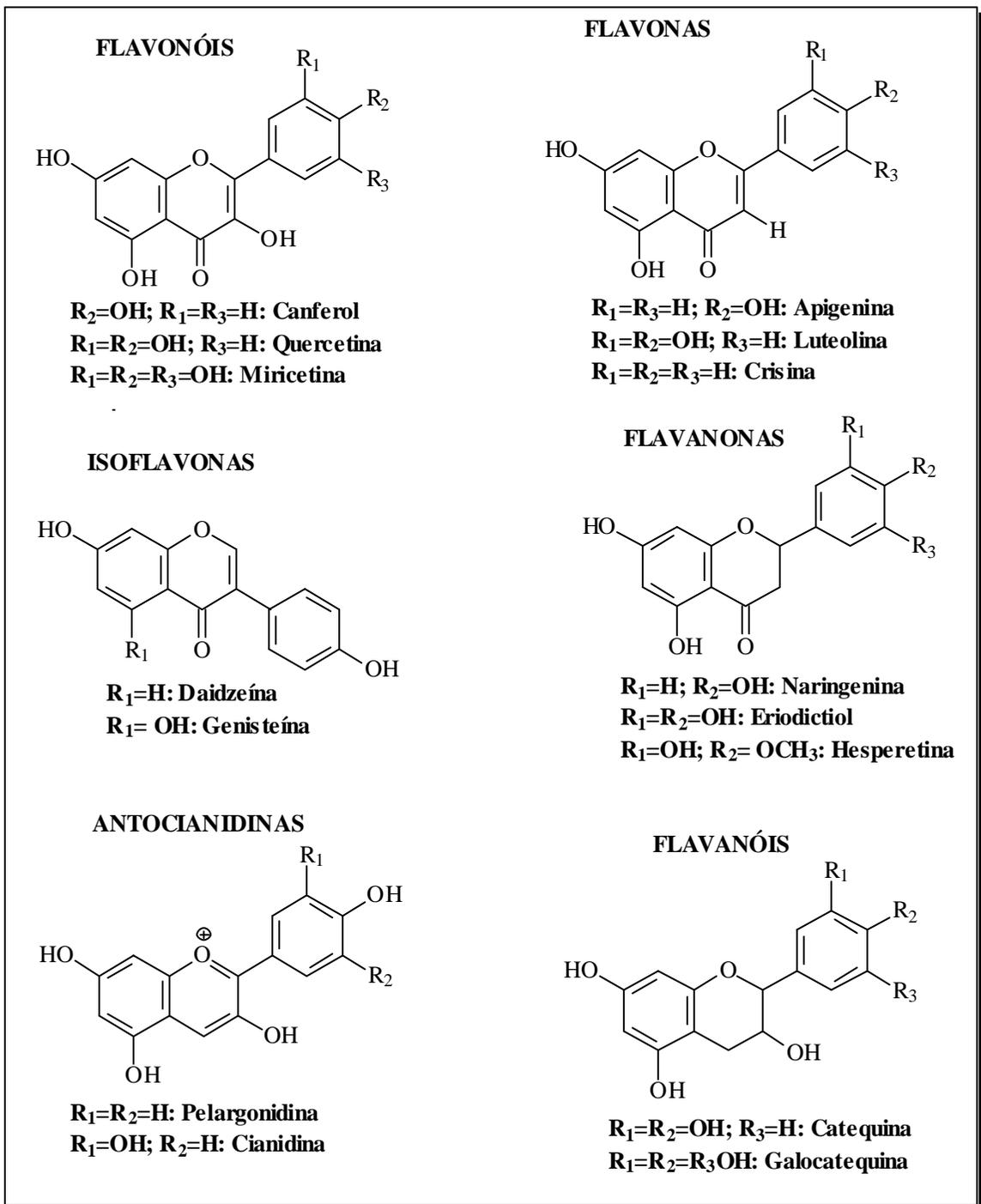


Figura 10: Exemplos de algumas classes de flavonóides.

Os ácidos fenólicos compreendem, como visto na Figura 5, p. 20, os derivados do ácido benzóico e do ácido cinâmico. O conteúdo dos ácidos hidroxibenzoicos nos alimentos é, geralmente, muito baixo, com exceção de certas frutas vermelhas, rabanete e cebola, que podem ter concentrações de algumas dezenas de mg/kg de peso fresco. Chá é uma importante fonte de ácido gálico, folhas de chá podem conter até 4,5 g/kg de peso fresco. Geralmente, esses ácidos aparecem esterificados ou fazendo parte de estruturas mais complexas como a dos taninos.

Os ácidos hidroxicinâmicos são mais comuns do que os ácidos hidroxibenzoicos e consistem, principalmente, dos ácidos *para*-cumárico, cafeico, ferúlico e sinápico. Também podem ser encontrados livres ou esterificados nos alimentos. O ácido cafeico e o ácido quínico se combinam para formar o ácido clorogênico (Figura 4, p. 19), o qual é encontrado em muitos tipos de frutas e em altas concentrações no café (uma xícara contém 70-350mg). O ácido cafeico, livre ou esterificado, é geralmente, o ácido fenólico mais abundante e representa entre 75 e 100% do total do conteúdo de ácidos hidroxicinâmicos da maioria das frutas. Esses ácidos são encontrados em todas as partes da fruta, embora estejam em maiores concentrações nas partes menos maduras do fruto. As concentrações geralmente diminuem durante o processo de amadurecimento, porém as quantidades totais aumentam com o aumento do tamanho do fruto. O ácido ferúlico é o mais abundante encontrado em grãos cereais. O seu conteúdo em grão de trigo é aproximadamente 0,8-2 g/kg de peso seco, que pode representar até 90% do total de polifenóis. As farinhas de arroz e aveia contêm aproximadamente a mesma quantidade de ácidos fenólicos que a farinha de trigo, enquanto o conteúdo na farinha de milho é cerca de três vezes maior (MANACH *et al.*, 2004).

A Tabela 2 a seguir contém informações sobre fontes alimentares de alguns polifenóis e sua concentração nos alimentos.

Tabela 2: Polifenóis em alimentos (MANACH *et al.*, 2004). (Continua)

Polifenóis	Fonte alimentar	Conteúdo de Fenólicos (mg/kg de peso fresco ou mg/L)
Ácidos hidroxibenzóicos		
Ácido protocatecuico	Framboesa (100g)	60-100
Ácido gálico	Amora (100g)	80-270
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico	Morango (200g)	20-90
Ácidos hidroxicinâmicos		
Ácido cafeico	Kiwi (100g)	600-1000
Ácido clorogênico	Cereja (200g)	180-1150
Ácido cumárico	Ameixa (200g)	140-1150
Ácido ferúlico	Pera (200g)	15-600
Ácido sinápico	Chicória (200g)	200-500
	Alcachofra (100g)	450
	Batata (200g)	100-190
	Farinha milho (75g)	310
	Café (200 mL)	350-1750
Antocianinas		
Cianidina	Amora preta (100g)	1000-4000
Pelargonidina	Cereja (200g)	350-4500
Flavonóis		
Quercetina	Cebola (100g)	350-1200
Canferol	Alho poró (200g)	30-225
Miricetina	Tomate cereja (200g)	15-200
	Brócoli (200g)	40-100
Flavonas		

Tabela 2. Continuação.

Apigenina	Salsa (5g)	240-1850
Luteolina	Aipo (200g)	20-140
<hr/> Flavanonas <hr/>		
Hesperetina	Suco laranja (200mL)	215-685
Naringenina	Suco limão (200mL)	50-300
<hr/> Isoflavonas <hr/>		
Daidzeína	Farinha soja (75g)	800-1800
Genisteína	Tofú (100g)	80-700
	Leite soja (200mL)	30-175
<hr/> Flavanóis <hr/>		
Catequina	Chocolate (50g)	460-610
	Feijão (200g)	350-550
Epicatequina	Damasco (200g)	100-250
	Cereja (200g)	50-220
	Uva (200g)	30-175
	Chá verde (200mL)	100-800
	Chá preto (200mL)	60-500
	Vinho tinto (100mL)	80-300

Apesar de se saber que muitos alimentos apresentam flavonóides e/ou ácidos fenólicos, e que estes são ingeridos na dieta diária dos seres vivos, o mecanismo de absorção digestiva e a biodisponibilidade dessas substâncias não estão ainda completamente explicados. Teoricamente, estas substâncias são pouco absorvidas na parte superior do trato digestivo e a sua digestão depende da presença de enzimas que podem quebrar as moléculas de flavonóides e transformá-los em ácidos fenólicos (MANACH *et al.*, 1995; WINTER, 1989).

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 de peso fresco). Estes grupos de fenólicos são responsáveis pelas cores de muitas frutas e vegetais e são encontrados também em grãos, nozes, folhas e flores (COOK & SAMMAN, 1996). Portanto, são constituintes importantes na dieta humana, e embora não sejam considerados nutritivos, o interesse nessas substâncias nasceu por causa dos possíveis efeitos sobre a saúde humana, principalmente, as atividades antimicrobianas e anticâncer (HERTOG *et al.*, 1992).

A química dos flavonóides naturais é complexa devido ao fato de na sua maioria corresponderem a formas conjugadas, ligando-se a açúcares ou mais grupos fenólicos. Os flavonóis e as flavonas ocorrem usualmente como glicosídeos, principalmente, nas folhas e outras partes das plantas acima da superfície do solo, pois sua biossíntese é estimulada pela luz (HERTOG *et al.*, 1992). Os flavonóis são os que mais se destacam nos alimentos, sendo os principais representantes a quercetina e o canferol (Figura 10, p. 26). As flavonas são menos comuns em frutas e vegetais e consistem, principalmente, dos glicosídeos de luteolina e apigenina (MANACH *et al.*, 2004).

As antocianinas são pigmentos dissolvidos na seiva dos tecidos das flores e frutas, que dão a coloração rosa, vermelho, azul ou violeta. Elas existem em diversas formas químicas, ambas coloridas e não coloridas, de acordo com o pH. Embora sejam altamente instáveis na forma aglicona (antocianidinas), enquanto presentes nas plantas, são resistentes à luz, pH e condições de oxidação, que são suficientes para degradá-las. A degradação é diminuída pela glicosilação e pela esterificação com vários ácidos orgânicos (cítrico e málico) e ácidos fenólicos. Na dieta humana, as antocianidinas são encontradas nos vinhos vermelhos, em certas variedades de cereais e vegetais (rabanete, beterraba, cebola, etc), e muito abundante nas frutas. O conteúdo nos alimentos é, geralmente, proporcional a intensidade da cor e alcança valores de 2-4 g/kg de peso fresco. A cianidina (Figura 10, p. 26) tem sido descrita como a mais comum antocianidina em alimentos (MANACH *et al.*, 2004).

As frutas e as bebidas, tais como chá e os vinhos vermelhos, constituem a principal fonte de polifenóis. Certos polifenóis tais como a quercetina, são encontrados em vários tipos de matrizes (frutas, vege tais, cereais, leguminosas, sucos, chá, vinhos, mel, própolis,

pólens, etc), enquanto outros são específicos de um tipo de alimento (flavononas em frutas cítricas, isoflavonas em soja). Em muitos casos, os alimentos contêm misturas complexas de polifenóis de difícil caracterização. A maçã, por exemplo, contém monômero de flavonol (epicatequina) ou oligômeros (procianidina B2), ácido clorogênico e quantidades pequenas de outros ácidos hidroxicinâmicos, quercetina glicosilada e antocianidinas (MANACH *et al.*, 2004).

Há numerosos fatores que podem afetar o conteúdo de polifenóis nas plantas, que incluem amadurecimento no tempo de colheita, fatores ambientais, processamento e estocagem. Os fatores ambientais são os de maior efeito; esses fatores podem ser climáticos (tipo de solo, exposição ao sol, umidade, etc) ou agrônômicos (cultura em estufas ou campo, cultura biológica, cultura hidropônica, rendimento de frutas por árvore etc.). Exposição à luz tem um notável efeito sobre a maioria dos flavonóides. O grau de amadurecimento afeta consideravelmente as concentrações e proporções de vários polifenóis. Em geral, as concentrações dos ácidos fenólicos diminuem durante o amadurecimento, enquanto as concentrações de antocianinas aumentam (MANACH *et al.*, 2004).

Muitos polifenóis, especialmente os ácidos fenólicos, estão diretamente envolvidos na resposta de plantas a diferentes tipos de estresse, eles possuem propriedades antimicrobianas, e suas concentrações podem aumentar após infecção (PARR & BOLWELL, 2000). Embora muito poucos estudos estejam diretamente dirigidos para esse fim, o conteúdo de polifenóis de vegetais produzidos por agricultura orgânica ou sustentável é certamente maior do que daqueles vegetais cultivados sem estresse, tais como aqueles crescidos em condições hidropônicas ou convencionais. Isso foi mostrado recentemente em trabalhos realizados com morangos, amoras e milho (ASAMI *et al.*, 2003).

Estocagem pode também afetar o conteúdo de polifenóis que são facilmente oxidados. As reações de oxidação resultam na formação de mais ou menos substâncias polimerizadas, que levam a mudanças na qualidade dos alimentos, particularmente, na cor e características organolépticas (MANACH *et al.*, 2004).

3.3 – As Substâncias Fenólicas e as Atividades Biológicas

A atividade farmacológica das substâncias fenólicas é menos pronunciada do que a de outros grupos de substâncias naturais como, por exemplo, os alcalóides ou os esteróides. Por esta razão talvez, o valor terapêutico dos polifenóis foi durante algum tempo rodeado de dúvidas e controvérsias.

Entretanto, nos últimos anos, o desenvolvimento nos métodos bioquímicos e na área de farmacologia permitiu um aperfeiçoamento científico mais aprofundado da atividade biológica atribuída a essas substâncias (NARAYANA *et al.*, 2001; NIJVELDT *et al.*, 2001).

As substâncias fenólicas, destacando-se os flavonóides e os ácidos fenólicos são metabólitos especiais largamente distribuídos no reino vegetal e são encontrados em quantidades substanciais em frutas, vegetais, grãos e bebidas. Essas substâncias têm uma ação suave e benéfica em numerosos processos fisiológicos no corpo e podem beneficiar o coração, veias, fígado, sistema imunológico, rins, musculatura e sistema nervoso. Das várias propriedades terapêuticas atribuídas a essa substâncias, podem-se destacar os efeitos antioxidantes, anti-bacterianos, anti-alérgicos, anti-inflamatórios, anti-hepatotóxicos, anti-neoplásicos e anti-virais(<http://www.geocities.com/nutriflip/Supplements/Flavonoids.html>; NIJVELDT *et al.*, 2001).

Na seqüência serão apresentadas algumas das principais atividades biológicas dos flavonóides e ácidos fenólicos que normalmente são descritas na literatura.

a) Atividades antioxidante e anti-neoplásicas

Há um grande número de relatos nos últimos anos sobre agentes antioxidantes e sua ação sobre proliferação de célula cancerígena. A grande maioria desses estudos tem se referido aos antioxidantes polifenólicos, por serem estes ativos em doenças crônicas degenerativas, incluindo doenças cardiovasculares e câncer. O uso de antioxidantes polifenólicos derivados de alimentos tem sido descrito, porém os mecanismos envolvidos nesses processos ainda não são muito claros.

O papel de radicais livres, tais como radical superóxido, radical hidroxila e outros, têm sido enfatizado em um número de doenças, incluindo câncer, doenças cardiovasculares, catarata, doenças inflamatórias gastrintestinais e outros processos inflamatórios.

Alimentos usualmente contêm antioxidantes naturais que podem seqüestrar radicais livres. Moléculas pequenas antioxidantes, tais como vitamina C, vitamina E, e carotenóides têm gerado particular interesse como defensores contra doenças degenerativas. Entretanto, alguns estudos têm indicado que substâncias fenólicas, tais como flavonóides e ácidos fenólicos, são consideravelmente mais potentes antioxidantes que a vitamina C e a vitamina E. Outros estudos têm mostrado a alta correlação entre a atividade antioxidante total de algumas frutas e seu conteúdo fenólico (PRIOR, 2003).

Agentes antioxidantes que podem inibir a produção de espécies reativas oxigenadas (ROS) podem prevenir apoptose endotelial. Apoptose é uma forma distinta, morfológica e bioquimicamente, de morte da célula caracterizada por encolhimento celular sem rupturas na membrana. É um modo de morte da célula diferente da necrose. Consistente com os dados de agentes inibidores de produção de ROS, flavanóis e flavonóis, em particular (-)-epigallocatequina e quercetina, qualificados como potentes antioxidantes, tiveram alta atividade antiapoptótica em células endoteliais vasculares humanas tratadas com peróxido de hidrogênio (CHOI *et al.*, 2003).

Espécies reativas oxigenadas (ROS) podem interferir diretamente no crescimento celular. Os danos causados por espécies reativas oxigenadas podem induzir mitose, aumentando o risco de danificar DNA, e a divisão de células com danos irreparáveis ou mal-reparados levando a mutações (NIJVELDT *et al.*, 2001).

Nutricionistas têm se interessado por essas substâncias e o seu papel na dieta humana. Além das frutas e vegetais, o mel, pólen e a própolis podem ser uma boa fonte de antioxidantes naturais de interesse farmacológico (BERAHIA *et al.*, 1993).

As propriedades oncoprotetoras de antioxidantes endógenos têm sido documentadas em um número de estudos epidemiológicos e estudos *in vitro*. Antioxidantes endógenos são exclusivamente produzidos por plantas; eles são divididos em antioxidantes solúveis em água (exemplo vitamina C) e os lipossolúveis (exemplos: vitamina A, vitamina E e β -caroteno). Adicionalmente, uma rica classe de substâncias, porém heterogênea, são os polifenóis, caracterizados pela presença de um ou mais anéis fenólicos em sua estrutura, e que está presente também nas plantas. Exemplos dessas substâncias são os ácidos fenólicos

simples (ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido ferúlico, ácido sinápico, etc) ou os flavonóides (catequinas, quercetina, miricetina, etc; KAMPA *et al.*, 2004).

Tem sido indicado que os flavonóides, como antioxidantes, podem inibir a carcinogênese. Alguns flavonóides tais como quercetina, apigenina e luteolina foram indicados como potentes inibidores de proliferação de células. NIJVELDT e colaboradores (2001) relataram em seus trabalhos que a quercetina e apigenina inibiram o crescimento de melanoma e influenciaram enormemente o potencial invasivo e metastático em camundongos.

Em um estudo recente realizado por KAMPA e colaboradores (2004) foi investigada a ação antiproliferativa e os efeitos apoptóticos de seis ácidos fenólicos (cafeico, sirínico, sinápico, protocatecuico, ferúlico e 3,4-diidroxifenilacético [PAA]) sobre células de câncer de mama. As substâncias testadas mostraram efeito inibitório (tempo-dependente e dose-dependente) sobre o crescimento da célula, com a seguinte potência: ácidos cafeico > ferúlico = protocatecuico = PAA > sinápico = sirínico. Comparando as estruturas dos diferentes ácidos fenólicos, os dados sugeriram que dois grupos hidroxila no anel fenólico e três carbonos na cadeia lateral eram ambos essenciais para a atividade antiproliferativa. A diminuição da cadeia lateral e/ou metilação de grupo(s) hidroxila produziram uma perda da atividade antiproliferativa. Foi observado nesse trabalho, que os ácidos fenólicos exerciam uma ação antiproliferativa em baixas concentrações comparáveis com aqueles encontrados nos fluídos biológicos após ingestão de alimentos ricos em ácidos fenólicos.

O uso de mel no tratamento de lesões crônicas e úlceras diabéticas, cataratas e outras doenças da visão, e indisposições gástricas tem sido documentado também. Esse papel benéfico do mel foi parcialmente atribuído à sua atividade antibacteriana. Entretanto, desde que algumas doenças têm sido consideradas como conseqüência da presença de radicais livres, foi visto que parte do papel terapêutico do mel é devido à sua atividade seqüestradora (antioxidante). O mel contém um número de componentes conhecidos como antioxidantes, incluindo vitaminas C e E, enzimas, tais como catalase e peroxidase, e compostos fenólicos. Prévios trabalhos têm indicado que a atividade antioxidante do mel varia muito, dependendo da origem floral (ALJADI & KAMARUDDIN, 2004).

Dois méis malasianos mais comuns de *Apis mellifera* de origens florais diferentes (*Cocos mucifera* e *Melaluca* spp.) foram estudados com o objetivo de avaliar a capacidade antioxidante e determinar a relação entre o conteúdo fenólico e essa atividade. A atividade antioxidante foi determinada em termos de seu poder anti-radical (ARP) avaliado pela análise seqüestradora de radical, usando 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) como antioxidante. Essa atividade foi determinada espectrofotometricamente a 517 nm, onde a mudança de absorvância do DPPH de cor púrpura foi avaliada. A alta correlação foi encontrada entre a atividade antioxidante total dos méis e seus conteúdos fenólicos, indicando que estes são os componentes responsáveis pelos efeitos antioxidantes do mel, apesar de, obviamente, outros fatores estarem envolvidos. Nesse trabalho o mel *Melaluca* apresentou ter uma atividade antioxidante significativamente maior do que o de *Cocos mucifera*. O mel *Melaluca* mostrou conter alguns ácidos fenólicos, tais como ácidos gálico, ferúlico, cafeico, benzóico e cinâmico, enquanto o mel de coco apresentou os ácidos gálico, cafeico e benzóico, mais alguns outros compostos fenólicos desconhecidos. O valor terapêutico do mel é devido, em parte, à sua atividade antioxidante (ALJADI & KAMARUDDIN, 2004).

Pouco se conhece sobre a absorção e metabolismo dos flavonóides. Acredita-se não serem tóxicos e, se absorvidos e ativos biologicamente *in vivo* podem prevenir radicais livres e peroxidação lipídica (LPO), que está associado com envelhecimento de células e doenças crônicas, tais como arteriosclerose e câncer. A LPO procede em três estágios: iniciação, propagação e terminação. Na iniciação, o radical livre abstrai hidrogênio de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) para formar o radical lipídico. Na propagação, o radical lipídico reage com oxigênio para formar o radical peroxi-lipídico que irão gerar mais radicais livres, então mantendo as reações em cadeia. No estágio de terminação, as espécies de radicais livres reagem entre si ou com antioxidantes para formar produtos inertes. A LPO pode ser suprimida por inativação enzimática de radicais livres e antioxidantes que inibem o estágio de iniciação e/ou aceleram o estágio de terminação. Os flavonóides inibem a LPO *in vitro* no estágio de iniciação agindo como seqüestradores de ânions superóxidos e radicais hidroxilas, terminando as reações radicalares em cadeia por doação de átomos de hidrogênio para o radical peróxido, formando o radical flavonóide (menos reativo e mais estável). Este último desvia as reações com radicais livres

terminando, então, a propagação em cadeia (COOK & SAMMAN, 1996; NIJVELDT *et al.*, 2001). Em seu trabalho COOK & SAMMAN (1996) destacaram que a inibição de LPO era influenciada por diversos fatores estruturais dos flavonóides (Figura 11), tais como:

- (1) a presença do grupo hidroxila na posição três do anel C. Exemplos de flavonóides agliconas nessas condições: canferol, quercetina, miricetina e morina (flavonóis);
- (2) a ligação dupla entre os carbonos dois e três do anel C. A hidrogenação desta ligação diminui o efeito antiperoxidativo;
- (3) o número de grupos hidroxilas; quanto maior o número de grupos hidroxila nos anéis A e B, maior a atividade seqüestradora de radicais livres;
- (4) a presença de uma porção açúcar. A eficiência antiperoxidativa é diminuída nos grupos hidroxilas adjacentes ao grupo glicosídeo devido ao impedimento estérico;
- (5) grupos metoxílicos também diminuem a eficiência antiperoxidativa de flavonóides *in vitro* devido ao impedimento estérico; e
- (6) flavonóides contendo grupo carbonila na posição quatro, e grupos hidroxilas nas posições três ou cinco, tais como quercetina, rutina, canferol, miricetina e morina, formam quelatos com íons metálicos. A habilidade dos flavonóides para seqüestrar íons metálicos pode contribuir para suas propriedades antiperoxidativas por prevenir a formação de radicais livres. Essa formação de quelatos é um mecanismo antioxidante dos flavonóides (COOK & SAMMAN, 1996).

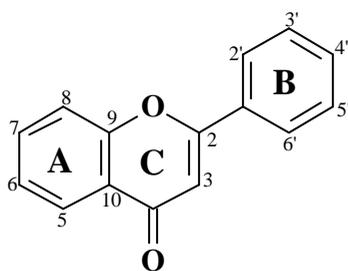


Figura 11: O esqueleto básico de um flavonóide.

Quercetina, canferol, morina, miricetina e rutina, por agirem como antioxidantes, exibem diversos efeitos benéficos, tais como antiinflamatório, antialérgico, antiviral bem como atividade anticâncer. Eles também têm sido sugeridos atuarem no papel protetor das doenças do fígado, catarata e doenças cardiovasculares (NARAYANA *et al.*, 2001).

b) Efeitos cardioprotetivo e cardiotônico

Um estudo realizado para examinar a relação entre as dietas contendo flavonóides e o risco de doenças coronárias (incluindo 805 homens entre 65 e 84 anos), demonstrou uma associação inversa significativa entre esse consumo e a mortalidade por doenças coronárias (CHD), e uma relação inversa, porém menos significativa, com a incidência de infarto do miocárdio (COOK & SAMMAN, 1996).

Um outro estudo demonstrou que a substância 3-metil-quercetina teve efeito cronotrópico positivo no átrio (aurícula do coração) direito e efeito antiarrítmico no átrio esquerdo de porcos da Índia. Os glicosídeos de luteolina, apigenina e genisteína produziram maior atividade anti-hipertensiva que a droga de referência papaverina. Três flavonóides apresentaram efeito vasorelaxante em ordem de potência, luteolina > erodictiol > naringenina na aorta torácica de ratos (NARAYANA *et al.*, 2001).

c) Atividade antiulcerogênica e hepatoprotetora

Alguns recentes relatos têm indicado que muitos flavonóides possuem atividades antiulcerogênicas. Tratamento oral com fração etérea de extratos de flavonóides demonstrou um bom nível de proteção gástrica. A quercetina, o canferol e a rutina produziram um efeito inibitório sobre funções intestinais (diarréias e outras secreções intestinais; NARAYANA *et al.*, 2001). Nesse mesmo trabalho foi avaliado a quercetina, apigenina e naringenina como supostos agentes terapêuticos contra substâncias indutoras de hepatotoxicidade. Rutina e apigenina mostraram efeitos regenerativos e hepatoprotetores em cirrose experimental. Os resultados de diversas investigações clínicas mostraram a eficácia e segurança de flavonóides no tratamento de disfunções hepato-biliar e complicações digestivas, tais como constipação, perda de apetite, náusea e dor abdominal (NARAYANA *et al.*, 2001).

d) Atividade antiinflamatória

Alguns flavonóides são relatados possuírem atividade antiinflamatória. A hesperidina possui significativos efeitos antiinflamatório e analgésico. Recentemente, apigenina, luteolina e quercetina foram relatadas apresentarem também atividade antiinflamatória (NARAYANA *et al.*, 2001).

A ciclooxigenase e lipoxigenase têm um importante papel como mediadores inflamatórios. Eles estão envolvidos na liberação de ácido araquidônico, o qual é importante para a resposta geral da inflamação. Substâncias fenólicas selecionadas mostraram inibir ambos as rotas da ciclooxigenase e 5-lipoxigenase. Essa inibição reduz a liberação do ácido araquidônico. O exato mecanismo pelo qual os flavonóides inibem essas enzimas não é claro. A quercetina, em particular, inibiu ambas as atividades da ciclooxigenase e lipoxigenase, diminuindo assim, a formação desses metabólitos inflamatórios (NIJVELDT *et al.*, 2001).

e) Efeitos sobre vasos sangüíneos

Quercetina e rutina têm sido usadas como constituintes efetivos de diversos produtos farmacêuticos para tratamento de fragilidade capilar e flebosclerose. As atividades de certos flavonóides para regular a permeabilidade capilar foram encontradas na seguinte ordem, hesperetina > rutina > quercetina > naringenina > canferol > isoquercitol. Tem sido sugerido que os flavonóides que contêm grupos hidroxila livres nas posições 3, 3' e 4' exercem efeitos fisiológicos benéficos sobre os capilares. A diminuição da agregação de plaquetas no sangue produzidas pela maioria dos flavonóides deve explicar os efeitos benéficos dessas substâncias relatados sobre fragilidade e permeabilidade capilar, conduzindo a redução de sintomas de doenças e sua proteção contra vários traumas e estresses. Administrados oralmente em ratos, os flavonóides inibiram fracamente a permeabilidade vascular e previniram a hemorragia pulmonar (NARAYANA *et al.*, 2001).

f) Atividade antimicrobiana

Alguns flavonóides e ésteres de ácidos fenólicos foram investigados por suas atividades antibacteriana, antifúngica e antiviral (Tabela 3, p. 41; NARAYANA *et al.*, 2001).

- i) Atividade antibacteriana: a maioria das flavanonas, na forma aglicona, mostrou atividades antimicrobiana e inibitória contra microorganismos.
- ii) Atividade antifúngica: alguns flavonóides isolados da casca de tangerina foram testados frente *Deuterophoma tracheiphila* mostrando-se promissores.

iii) Atividade antiviral: flavonóides também indicaram atividade antiviral, incluindo atividade anti-HIV. Os flavonóis mostraram ser mais ativos que as flavonas contra vírus tipo 1 de *herpes simplex* e a ordem de atividade foi galangina > canferol > quercetina. Os flavanóis foram mais eficientes do que as flavonas e flavanonas na inibição seletiva de HIV-1, HIV-2 e em infecções similares de imunodeficiências causadas por vírus.

Tabela 3: Atividades antibacteriana, antiviral e antifúngica de vários flavonóides
(NARAYANA *et al.*, 2001).

Organismo	Flavonóides
Atividade antibacteriana	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Quercetina, hesperetina, naringina + rutina, naringina + hesperetina
<i>Streptococcus pyogenes e viridans</i>	Apigenina
<i>Streptococcus jaccalis, baris e pneumoniae</i>	Crisina
<i>Shigella boydii</i>	Hesperetina, naringina + rutina, naringenina + hesperetina
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Rutina, naringina
<i>Escherichia coli e Bacillus subtilis</i>	Quercetina
<i>Bacillus anthracis</i>	Rutina
Atividade antiviral	
Rabies virus	Quercetina, quercetrina, rutina
Herpes vírus e Pseudorabies virus	Quercetina
Para influenza virus	Quercetina, rutina
Herpes simplex vírus tipo 2	Quercetina
Potato virus	Morina, rutina + quercetina
Influenza virus	Rutina + quercetina
Immuno-deficiency virus infection	Apigenina
Atividade antifúngica	
<i>Candida tropicalis</i>	Quercetina
<i>Azotobacter vinelandii</i>	Quercetina, rutina, epicatequina

Recentemente, MIORIN e colaboradores (2003) relataram em seus trabalhos a atividade antibacteriana de extratos etanólicos de própolis e mel contra 118 variedades de *Staphylococcus aureus* isolados de infecções humanas.

Esses estudos revelaram que o extrato de própolis potencializou a ação de vários antibióticos. O efeito de biomicina, tetraciclina, neomicina, polimixina, penicilina e estreptomicina contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* foi aumentado pela adição de própolis ao meio nutriente (MARCUCCI, 1996).

Foi feito também um trabalho com a própolis obtida de apiários comerciais da região de Santa Maria-RS. O extrato alcoólico a 50% de própolis apresentou atividade antibacteriana *in vitro*, inibindo o crescimento de 67,7% das amostras de *Nocardia asteróides*, *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Rhodococcus equi*, *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa* avaliadas (VARGAS *et al.*, 2004).

g) Efeitos bioquímicos dos flavonóides

Os flavonóides são conhecidos por inibir um número de enzimas, tais como aldose redutase, xantina oxidase, fosfodiesterase, Ca^{2+} ATPase, lipo-oxigenase e ciclooxigenase. Os flavonóides, tais como quercetina, miricetina e canferol inibem a atividade da adenosina deaminase das células endoteliais, enquanto, as flavonas são inativas. Os flavonóides inibem elevação intracelular Ca^{2+} por redução da atividade fosfolipase-C e eles possuem potenciais efeitos inibitórios sobre diversos sistemas enzimáticos, tais como proteína quinase-C, proteína tirosina quinase, fosfolipase A2 e outras. Alguns flavonóides são, predominantemente, inibidores de cada ciclooxigenase ou lipoxigenase, outros são igualmente efetivos contra ambas enzimas (NARAYANA *et al.*, 2001).

Também tem sido descrito, que os flavonóides têm atividade regulatória de hormônios, onde a quercetina, miricetina, rutina, canferol afetaram o transporte, metabolismo e ação de hormônios da tireóide (NARAYANA *et al.*, 2001).

Algumas doenças tratadas com flavonóides estão relacionadas na Tabela 4 a seguir.

Tabela 4: Doenças tratadas com flavonóides (NARAYANA *et al.*, 2001).

Flavonóides	Alvo	Doenças
Quercetina, silimarina	Síntese de PG (prostaglandinas)	Dores e inflamação, fadiga, câimbra, inchaço de membros
Quercetina	Aldose redutase	Diabetes mellitus
Rutina/citrina	Parede capilar	Alergia
Quercetina	Célula mestre	Alergia
Quercetina	Na ⁺ /K ⁺ ATPase	Câncer
Quercetina	H ⁺ ATPase de membrana lisossomal	Infecção por vírus, resfriados
Quercetina	Arilidroxilase, epóxido hidroxilase	oncogênese química
Quercetina	Síntese de PG (prostaglandinas)	Cirurgia oral, estômago, dor de cabeça, úlcera duodenal
Rutina, quercetina, canferol	PAF (fator de agregação plaquetária)	Antiúlcera

3.4- Biodisponibilidade dos Polifenóis no Corpo

É importante ter consciência de que os polifenóis que são mais comuns na dieta humana, não são necessariamente, os mais ativos dentro do corpo, seja porque eles têm menor atividade intrínseca ou porque são pouco absorvidos no intestino, são altamente metabolizados ou rapidamente eliminados. Adicionalmente, os metabólitos que são encontrados no sangue e nos órgãos alvos resultam da atividade digestiva ou hepática e deve ser muito diferente da substância original em termos de atividade biológica. O conhecimento extensivo da absorção e da biodisponibilidade dos polifenóis é, assim, essencial para se entender os efeitos sobre a doença (MANACH *et al.*, 2004).

Nas plantas e alimentos, os flavonóides estão presentes amplamente como conjugados, geralmente ligados a grupos glicosídeos, e a glicosilação influencia a absorção (CERMAK *et al.*, 2003; MANACH *et al.*, 2004).

O metabolismo dos polifenóis ocorre via uma rota comum (SCALBERT & WILLIAMSON, 2000). As agliconas podem ser absorvidas no intestino delgado. Contudo a maioria dos polifenóis que estão presentes nos alimentos, e que estão na forma de ésteres, glicosídeos ou polímeros, não podem ser absorvidos na sua forma original. Essas substâncias devem ser hidrolisadas pelas enzimas intestinais ou pela microflora do cólon antes que elas possam ser absorvidas. Quando a flora está envolvida, a eficiência da absorção é frequentemente reduzida porque a flora também degrada as agliconas que liberam e produzem vários ácidos aromáticos simples no processo. Durante o processo da absorção, polifenóis são conjugados no intestino delgado e depois no fígado. Este processo inclui, principalmente, metilação, sulfonação e glicuronização. Este é um processo comum de desintoxicação e que facilita a eliminação de substâncias tóxicas seja pela bile ou urina por aumentar sua hidrofobicidade. Os polifenóis também são capazes de penetrar nos tecidos, particularmente naqueles nos quais eles são metabolizados. Os polifenóis e seus derivados são eliminados, principalmente pela urina e pela bile. Eles são secretados via a rota biliar dentro do duodeno, onde eles estão sujeitos a ação de enzimas bacterianas, especialmente β -glicoronidase, no segmento distal do intestino, depois os quais eles são reabsorvidos.

A quercetina é um dos flavonóides mais abundantes na dieta e tem sido um dos mais estudados, no que diz respeito a absorção e metabolismo. Estudos relatam que a quercetina deve ser absorvida no intestino delgado após clivagem da ligação β -glicosídica pelas enzimas bacterianas encontradas na flora intestinal. Nesse trabalho, PRIOR (2003) relatou que humanos absorvem quercetina, mas concluiu que a absorção é aumentada pela ligação com glicose (Figura 12).

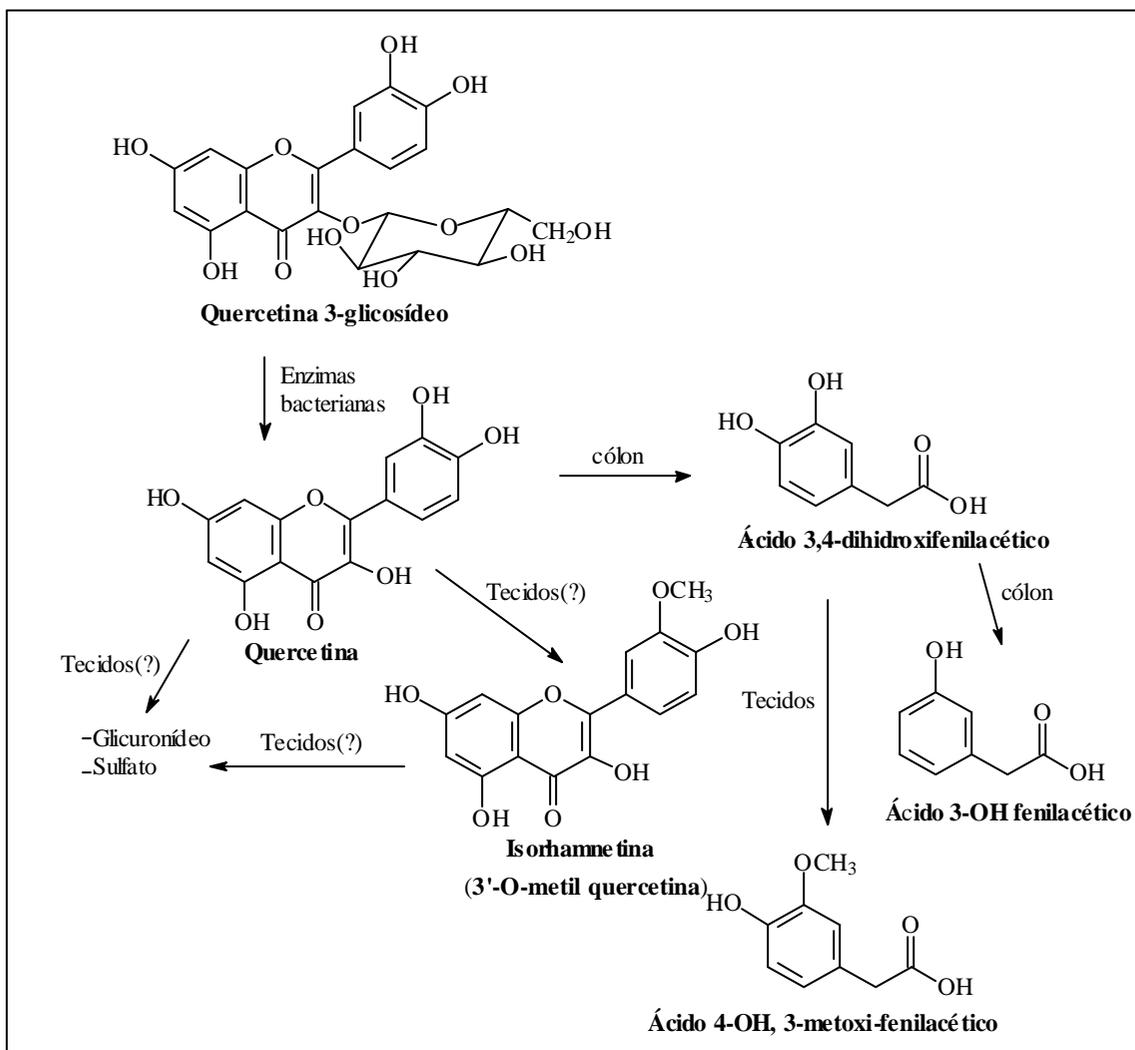


Figura 12. Proposta de rota para absorção/metabolismo da quercetina (PRIOR, 2003).

Experimentos usando ratos tratados cirurgicamente nos quais a absorção foi restrita ao estômago, mostrou que a absorção no nível gástrico é possível para alguns flavonóides, tais como quercetina e daidzeína, mas não para seus glicosídeos. A maioria dos glicosídeos provavelmente resiste à hidrólise ácida no estômago e assim, chegam intactos no duodeno. Somente agliconas e alguns glicosídeos podem ser absorvidos no intestino delgado, enquanto polifenóis ligados a ramnose devem atingir o cólon (no intestino grosso) e serem

hidrolisados por ramnosidases da microflora antes de serem absorvidos (MANACH *et al.*, 2004).

Apesar da escassez de estudos relatando a biodisponibilidade de ácidos hidroxicinâmicos, quando ingeridos na forma livre, esses compostos são rapidamente absorvidos no intestino delgado. Tecidos humanos (mucosa intestinal, fígado) e fluidos biológicos (plasma, suco gástrico, fluido duodenal) não possuem esterases capazes de hidrolisar ácido clorogênico para liberar ácido cafeico, por exemplo. Isso tem sido observado em ratos. Somente a microflora intestinal poderia ser capaz de realizar essa hidrólise. Conseqüentemente, como foi observado para flavonóides glicosilados, que devem ser hidrolisados pela microflora, a eficiência da absorção dos ácidos fenólicos é notavelmente, um tanto reduzido quando eles estão presentes na forma esterificada comparada à forma livre (MANACH *et al.*, 2004).

Enfim, interações diretas entre polifenóis e alguns componentes do alimento, tais como as ligações com as proteínas e polissacarídeos, podem ocorrer, e essas interações podem afetar a absorção. Além do mais, outros efeitos indiretos da dieta, sobre vários parâmetros da fisiologia do intestino (pH, fermentações intestinais, excreção biliar, etc.) podem ter conseqüências na absorção de polifenóis; até as enzimas envolvidas na absorção e metabolismo podem também ser induzidas ou inibidas na presença de alguns micronutrientes (MANACH *et al.*, 2004).

4 – PRINCIPAIS METODOLOGIAS USADAS NA CARACTERIZAÇÃO DO MEL

4.1 - Análise do Pólen Apícola

Sabe-se que as abelhas visitam apenas uma pequena parte da flora. A colheita do pólen pelos insetos em geral, não está condicionada pela quantidade de pólen produzido, mas pelas características dos seus constituintes.

As razões pelas quais as abelhas se orientam para as colheitas polínicas não são ainda completamente conhecidas, embora, LINDSTED (1971) tenha apresentado um trabalho sobre compostos que as atraem e orientam, assim como, compostos que as “prendem” impedindo-as de se moverem e procurarem outro tipo de alimento.

Alguns autores verificaram que substâncias, como os flavonóides e as antocianinas, existem nas flores para servir de “guias”, atraindo os insetos polinizadores até as fontes de néctar e/ou pólen. Os pigmentos amarelos mais comuns são os carotenóides, e os flavonóides (chalconas, auronas, 6- e 8-hidroxi-flavonóis), que são muito importantes, como matéria corante num significativo número de plantas com flores amarelas (HARBONE & GREYER, 1993).

Segundo PERIS (1984) o “pólen apícola” é o resultado da aglutinação do pólen das flores com néctar e substâncias salivares das abelhas, *Apis mellifera*, que acumulam em cargas polínicas (semelhantes a pequenas bolas) e que o homem utiliza após a sua colheita nos caça-pólen, após secagem, limpeza e empacotamento.

As abelhas alimentam-se do néctar e de pólen das flores, levando-os para as colméias. A armadura bucal está adaptada à sucção do néctar e as patas especializadas para a recolha de grãos de pólen, que são compactados em cargas polínicas transportáveis. Ao coletarem o néctar das flores, que é regorgitado nos alvéolos, chamados melíferos, parte do pólen é, então, misturado com o néctar e aparece no mel, sendo importante demonstrativo de sua origem botânica. O espectro polínico de mel é determinado pelas condições climáticas, fitogeográficas, agrônômicas e florestais da região na qual esses produtos foram coletados (BARTH, 1989; DUTRA & BARTH, 1997).

O estudo da morfologia do grão de pólen é conhecido como palinologia e, por isso, o estudo de grãos de pólen no mel como melissopalynologia (PERSANO ODDO & RICCIARDELLI D'ALBORE, 1989; BARTH, 1989; BARTH & DUTRA, 2000; TERRAB *et al.*, 2003). A análise polínica é uma técnica laboratorial que permite caracterizar a origem floral, ou não-floral, de amostras de mel. O pólen introduzido no mel pelas abelhas reflete a vegetação da área de coleta de néctar, bem como o seu potencial apícola. Havendo dominância de florada de determinada espécie apícola, o mel produzido possui qualidades organolépticas, aspecto e consistência constantes, repetidas ano por ano na ocasião dessa florada. Através do espectro polínico do sedimento de mel é possível identificar a espécie botânica apícola da qual foi obtido o mel e a proporção de participação de cada uma das espécies botânicas visitadas pelas abelhas durante a coleta de néctar. Esta análise constitui-se nas classes de frequência aceitas internacionalmente.

Alguns méis podem ser identificados com mais ou menos certeza por seu aroma, cor, cristalização rápida, sabor ou por uma combinação dessas e de outras características. Alguns méis podem ser especificados porque são produzidos em colméias situadas dentro de grandes áreas com uma espécie de planta, durante o seu período de florescimento. Em áreas onde se pratica agricultura em grande escala e em formações geológicas de grande porte, com grandes áreas homogêneas de vegetação natural, pode existir pouca dúvida com relação à fonte de mel obtido. Isto é especialmente válido se o apicultor for um bom observador de abelhas e das plantas ao alcance de coleta delas.

Vários parâmetros físicos têm sido utilizados nas análises de méis, como uma das maneiras de identificá-los e classificá-los segundo sua origem botânica. A análise polínica também é um método para identificação de origem floral e/ou geográfica de méis. As análises microscópicas, que visam, principalmente, o reconhecimento do grão de pólen, indicam as plantas que as abelhas visitaram, correlacionando assim a sua origem botânica. O pólen é coletado pelas abelhas e é transportado para a colméia nas suas patas traseiras. Assim, o mel contém, geralmente, grãos de pólen de flores que contribuíram com seu néctar para a sua confecção. Grãos de pólen de diferentes plantas podem ser distinguidos sob um microscópio por seu tamanho e forma, e por seus padrões de superfície de sulco, poros, espinhos etc.

Difícilmente há a ocorrência de mel “puro”, isto é, cujo néctar seja proveniente de uma só espécie vegetal, e de acordo com essa composição classifica-se o pólen presente no mel como: dominante (PD), acessório (PA) e isolado (PI, sendo, ainda, isolado importante - Pli e isolado ocasional - Pio). Os méis que contêm mais de 45% do total de grãos de pólen de uma mesma espécie serão considerados como PD, e sob a denominação de PA são compreendidas as espécies cujos grãos ocorrem na quantidade de 16 a 45% do total de grãos de uma amostra de mel. Deve-se considerar no caso de pólen acessório, duas categorias de amostras de mel. Uma é aquela que, além de pólen acessório, apresenta também pólen dominante, sendo, portanto, constituída de só duas espécies em quantidades diferentes. O outro caso é o da amostra desprovida de pólen dominante, apresentando somente uma ou mais espécies de pólen acessório. A grande maioria das espécies dadas como melíferas (plantas que possuem nectários funcionais) e poliníferas no Brasil ocorre nas amostras em quantidade reduzida como pólen isolado (PI), não ultrapassando 15% do total de grãos de pólen. Quando presentes na quantidade de 3 a 15% são chamados de pólen isolado importante (Pli), e até 3% de pólen isolado ocasional (Pio). Quanto à origem geográfica da amostra, o pólen de algumas espécies desta categoria pode ser significativo (BARTH, 1989).

Pode-se considerar que a abelha explora para a sua alimentação (néctar, melão e pólen) uma flora variada, mas que representa, normalmente, só cerca de 10% das espécies existentes na sua área de colheita. Embora este valor pareça baixo, é suficiente para que, na composição dos méis e dos pólenes apícolas, se verifique uma grande diversidade (BARTH, 1989).

Alguns estudos de caracterização polínica foram feitos com 20 amostras de méis de laranjeira, procedentes dos estados do Rio de Janeiro e São Paulo. Todas as amostras apresentaram o pólen de *Citrus* em porcentagem dominante ou acessória. Nas amostras provenientes do Rio de Janeiro foram encontrados como principais tipos polínicos acessórios, o pólen de *Eucalyptus* e *Anadenanthera*, e para São Paulo os de *Eucalyptus*, *Myrcia* e *Coffea* (BARTH & CORÉ-GUEDES, 1999).

Outro trabalho feito no Brasil, na região de Bananal-SP, área que faz limite com o município de Barra Mansa-RJ, DUTRA & BARTH (1997) analisaram 22 amostras de méis, onde 15 eram de origem extrafloral, 4 eram heteroflora, somente 2 uniflorais (*Eupatorium*

sp. - erva de santa cruz e *Vernonia sp.* - assa-peixe) e um mel de melato. Este último apresentou na análise microscópica grande quantidade de massa granulosa, o que é característico desse tipo de mel (DUTRA & BARTH, 1997).

Alguns cuidados, porém, devem ser tomados com relação a essa metodologia. Por exemplo, como no caso do mel de melato, que contém relativamente poucos grãos de pólen (SAWYER, 1975), lembrando que ele não é produzido a partir do néctar das flores. Diferentes espécies de plantas produzem diferentes proporções de pólen, a quantidade de pólen pode variar de estação para estação, o néctar colhido pode ser diferente em flores macho e fêmea, abelhas tomam o pólen sem colher o néctar. Outra limitação para este método é que o pólen pode ser adicionado fraudulentamente. E, ainda, no caso de mel *Citrus*, a análise de pólen não é útil como em algumas outras origens florais, devido ao fato de que a quantidade de pólen é geralmente pequena e muito variável (ANKLAM, 1998; FERRERES *et al.*, 1994). A origem botânica do mel, a qual influencia enormemente a preferência do consumidor, permanece ainda, difícil de ser determinada. Em alguns casos, contudo, a análise de pólen não é possível, como nos casos de méis de plantas estéreis.

A qualidade do mel é julgada pela sua origem botânica e pela sua composição química e o seu preço está baseado na sua qualidade e, sendo assim, na sua origem floral (DATTA *et al.*, 2003). Tradicionalmente, a fonte floral de um mel tem sido identificada pela análise do pólen apícola presente. Contudo, TAN e colaboradores (1989) sugeriram que uma abordagem química deveria ser mais precisa e de mais fácil entendimento na caracterização da origem floral do mel.

O emprego da melissopalínologia, apesar de trazer grandes benefícios à apicultura e ao estudo da biologia das abelhas, tem também suas limitações. Algumas delas são de ordem metodológica. Por exemplo, antes que métodos quantitativos possam ser empregados na análise de méis de uma determinada região, é necessário que se estude a quantidade de resíduo polínico presente, normalmente, em méis extraídos de formas diferentes e originados de plantas distintas na região.

Outra limitação é de ordem econômica, onde o emprego de equipamento relativamente caro e de pessoal especializado faz com que as técnicas palinológicas não estejam ao alcance da maioria dos produtores individuais. Entretanto, todas estas limitações poderiam ser suplantadas, caso as cooperativas apícolas mantivessem laboratórios

especializados ou convênios com instituições de pesquisa, como as universidades ou as empresas estaduais e federais de pesquisa agropecuária, o que ainda não acontece.

Nos últimos anos tem havido um interesse crescente em se desenvolver métodos analíticos que possam vir a complementar a análise do pólen, auxiliando na determinação da origem floral do mel. Abordagens químicas têm sido sugeridas, onde a identificação de substâncias características do néctar de certos tipos de plantas, as quais podem ou não ser modificadas bioquimicamente pelas enzimas das abelhas, para que possam auxiliar na caracterização da fonte floral do mel (D'ARCY *et al.*, 1997; TAN *et al.*, 1989). Em particular, a combinação de métodos físicos e químicos poderia ser uma abordagem promissora para demonstrar autenticidade dos diferentes méis (ANKLAM, 1998). As análises das substâncias fenólicas, incluindo os flavonóides, têm sido sugeridas na identificação de mel (AMIOT *et al.*, 1989), e dessa forma tem sido usado como ferramenta para o estudo da origem botânica e geográfica.

4.2 – Análise de Substâncias Fenólicas em Méis

Um interesse crescente em se desenvolver métodos analíticos que possam vir a complementar a análise do pólen na determinação da origem floral do mel tem surgido na literatura. Recentemente, pesquisas apresentaram a análise de aminoácidos (BOSI & BATTAGLINI, 1978), compostos voláteis (BONAGA & GIUMANINI, 1986; D'ARCY *et al.*, 1997), compostos fenólicos (AMIOT *et al.*, 1989), ácidos aromáticos e seus ésteres (STEEG & MONTAG, 1988) e derivados de carotenóides (TAN *et al.*, 1989), utilizando cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa, para o assinalamento da origem floral de méis europeus.

Segundo os dados da literatura, a cromatografia líquida de alta eficiência tem sido apontada nos últimos anos como a técnica de escolha para analisar grande parte dos componentes não-voláteis que constituem os méis europeus, e que auxiliam na caracterização da origem floral e geográfica (AMIOT *et al.*, 1989; FERRERES *et al.*, 1992; SABATIER *et al.*, 1992; TOMÁS-BARBERÁN *et al.*, 1993; MARTOS *et al.*, 2000). Esses estudos relatam a ocorrência de padrões de flavonóides (flavona e flavonóis) e de derivados de ácidos benzóico e cinâmico como sendo importantes marcadores químicos de méis de diferentes regiões e origens geográficas (Figura 13).

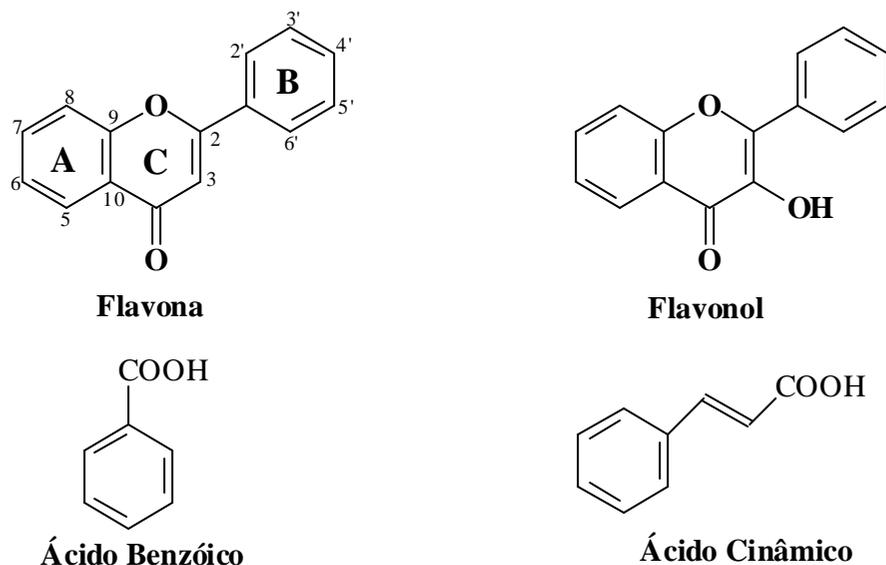


Figura 13. Estruturas básicas dos derivados de ácidos e flavonóides presentes no mel.

Análise de compostos fenólicos por CLAE tem sido sugerida como uma técnica promissora para o estudo da origem floral e geográfica do mel (AMIOT *et al.*, 1989; FERREERES *et al.*, 1992; SABATIER *et al.*, 1992; TOMÁS-BARBERÁN *et al.*, 1993). Em dez amostras de méis espanhóis foram avaliados dezesseis flavonóides agliconas por CLAE em fase reversa, com o intuito de investigar a origem geográfica. Os principais flavonóides identificados foram pinocembrina, pinobanksina, galangina, crisina, luteolina, apigenina, isorhamnetina e 3-metil quercetina. Muitos desses flavonóides foram encontrados também em própolis (FERRERES *et al.*, 1991).

A flavanona hesperetina foi usada como marcador para caracterizar mel *Citrus* não tendo sido detectada em nenhum outro tipo de mel estudado anteriormente, incluindo rosmaninho, lavanda, girassol, amêndoa, castanha, trevo branco, eucalipto, *Erisarum*, *Robinia*, *Rhododendron*, *Tília*, *Prosopis*, *Calluna* e méis multiflorais (FERRERES *et al.*, 1993; 1994). Enquanto, a flavona canferol foi descrita para mel rosmaninho (FERRERES *et al.*, 1994a; 1998) e a quercetina para mel de girassol (em níveis relativamente altos – 125-290 µg/100g mel) (TOMÁS-BARBERÁN *et al.*, 2001). Além dessas substâncias, alguns ácidos fenólicos também foram encontrados e usados como marcadores químicos. Destacam-se os ácidos cafeico, *para*-cumárico e ferúlico em méis de castanha (ANDRADE

et al., 1997; FERRERES *et al.*, 1996a). Pinocebrina, pinobanksina e crisina são flavonóides característicos da própolis, e estas substâncias foram encontradas na maioria dos méis europeus (TOMÁS-BARBÉRAN *et al.*, 2001).

Em algumas amostras de méis, tais como lavanda e acácia, nenhum composto fenólico específico foi útil como marcador químico (TOMÁS-BARBÉRAN *et al.*, 2001). Porém outros possíveis marcadores fitoquímicos, tal como o ácido abscísico foi indicado como possível marcador para o mel urze (“heather”) por FERRERES e colaboradores (1996), e posteriormente, foi encontrado em quantidades significantes em méis de acácia (TOMÁS-BARBÉRAN *et al.*, 2001).

SABATIER e colaboradores (1992) descreveram em seu trabalho, a identificação de pinocebrina, pinobanksina, crisina, galangina, quercetina, canferol e tectocrisina em mel de girassol francês, utilizando CLAE com detector de fotodiodo, com o apoio de outras técnicas, a cromatografia de camada fina e cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas. Entre os flavonóides descritos, duas principais estruturas foram encontradas: as flavanonas e os flavanóis.

MARTOS *et al.* (2000) descreveram a identificação dos flavonóides: miricetina, tricetina, quercetina, luteolina e canferol em diversos méis europeus de eucalipto por CLAE, com o propósito de correlacioná-los com a origem floral e/ou geográfica. Sendo que a miricetina, tricetina e luteolina não haviam sido associadas, até então, com qualquer origem floral específica, podendo então ser marcadores do mel eucalipto.

Em 1997, ANDRADE *et al.* compararam dois tipos de méis portugueses, o mel urze *Erica* sp e lavanda (*Lavandula stoechas*), e observaram que as amostras continham um perfil de ácidos fenólicos comum, incluindo os ácidos vanílico, clorogênico, cafeico, *p*-cumárico, ferúlico, *m*-cumárico e cinâmico. O ácido gálico apareceu somente no mel lavanda. O mel urze foi caracterizado pela presença dos ácidos *p*-hidroxibenzóico, siríngico, *o*-cumárico e elágico. A presença do ácido elágico em méis *Erica* spp estava de acordo com relatos anteriores, que o sugerem como marcador de origem floral. Considerando a grande quantidade de ácido *p*-cumárico nas amostras de mel urze (por volta de 39%) e pequena quantidade presente no mel lavanda, também poderia ser relacionado com a origem floral do mel *Erica* spp. Em outro trabalho com méis de urze foram

identificados os flavonóides miricetina, 3-metil miricetina, 3'-metil-miricetina e tricetina (GUYOT *et al.*, 1999).

Para melhor esclarecimento sobre o mel urze (“heather”), ele é produzido em Portugal de *Erica* spp. (Ericaceae), enquanto na Espanha e França o mel urze vem das espécies *Calluna* ou *Erica*. Na Nova Zelândia, méis derivados de *Calluna* são considerados como mel urze. Esse mel é caracterizado pelo forte sabor e cor marrom escuro (FERRERES *et al.*, 1996).

Amostras de méis da Tunísia (norte da África), bem como própolis da mesma região, foram estudadas com o intuito de compará-las com o perfil europeu, além do interesse nessas substâncias para determinação de origem geográfica e floral do mel. Os perfis dos compostos fenólicos investigados nessas amostras foram completamente diferentes daqueles encontrados nos méis europeus oriundos de diferentes origens florais. Os méis europeus apresentaram um perfil em compostos fenólicos relativamente constante, porém os méis tunisianos mostraram uma variação, mesmo quando originários de mesma fonte floral. Apenas cinco das treze amostras demonstraram conter flavonóides derivados de álamo (a principal planta fornecedora de própolis na Europa): pinocembrina, crisina, galangina e pinobanksina, exatamente os que apresentaram maior conteúdo total de fenólicos. Ainda procurando relacionar as substâncias fenólicas dos méis da Tunísia com os marcadores químicos dos méis europeus, o mel rosmaninho da Tunísia também apresentou como principais constituintes o canferol e 8-metoxicanferol. O mel *Citrus* também apresentou hesperetina em quantidades similares aquelas reportadas em méis *Citrus* da Espanha (MARTOS *et al.*, 1997).

Com o intuito de analisar o conteúdo de flavonóides de méis eucalipto da Austrália e determinar se os marcadores encontrados nos méis eucalipto europeus estão também presentes nas amostras australianas, foram estudados 7 amostras de *Eucalyptus pilligaensis*, duas amostras de *Eucalyptus melliodora* e 6 amostras de *Eucalyptus camaldulensis*. Os cromatogramas das três espécies australianas e da espécie européia demonstraram perfis similares, contendo miricetina, tricetina, quercetina, luteolina e canferol (este último, minoritário). Porém, os flavonóides oriundos da própolis de álamo (nativa na Europa) no mel europeu (pinocembrina, pinobanksina e crisina) não estiveram presentes no mel

australiano; que por sua vez, apresentou a 3-metilquercetina que não havia sido relatada no mel eucalipto europeu (MARTOS *et al.*, 2000; YAO *et al.*, 2004).

Em outro trabalho, os ácidos fenólicos foram analisados em méis eucaliptos australianos (*E. intermédia*, *E. ochrophloia*, *E. crebra*, *E. nubila*, *E. melliodora*, *E. moluccana*, *E. camaldulensis*, *E. globoidia*, *E. largiflorens*), com o mesmo propósito de definir marcadores químicos. O ácido gálico foi encontrado em quase todas as amostras, e também foi de maior concentração em todos os tipos de méis estudados, exceto para o mel *E. globoidia*, que foi dominado pelo ácido elágico. Como o ácido gálico não tinha sido até então relatado, ele foi indicado como marcador floral de méis eucalipto australianos (YAO *et al.*, 2004a).

Segundo relatos de ANKLAM (1998), o mel de trigo mourisco apresentou alto conteúdo de ácido 4-hidroxibenzóico. A análise de seu extrato identificou ainda, os seguintes compostos: ácidos 3,4-diidroxibenzóico, 4-hidroxifenilático, 2,5-diidroxibenzóico, 4-hidroxifenilacético, 3-hidroxibenzóico, 3,4-diidroxicinâmico, 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzóico, 2-hidroxibenzóico, 4-hidroxicinâmico e 4-hidroxi-3-metoxicinâmico.

Para os méis brasileiros, contudo, o único trabalho relatado na literatura até então, investigou os principais constituintes não-voláteis de amostras de mel genuíno derivados de diferentes espécies de plantas encontradas em distintos estados brasileiros (DE MARIA *et al.*, 1999). Os níveis de água, acidez total, prolina livre, atividade de diastase, HMF, frutose e glicose foram determinados em 74 diferentes tipos de méis de *Apis mellifera* de quatro regiões do Brasil, porém nenhum composto fenólico foi investigado e relacionado à origem botânica.

Recentemente o nosso grupo estudou, pela primeira vez, o perfil dos compostos fenólicos dos méis de eucalipto e silvestre dos estados do Rio de Janeiro e São Paulo. A análise do perfil cromatográfico associado ao estudo dos espectros de ultravioleta obtidos pelo detector de arranjo de fotodiodos dos méis de eucalipto indicou a presença dos ácidos: gálico, vanílico, *para*-cumárico, ferúlico e cinâmico, enquanto para o mel silvestre foram identificados os ácidos gálico, vanílico, clorogênico, *orto*-cumárico, cinâmico e 2-metoxicinâmico. A ocorrência de quantidades significativas dos ácidos vanílico, *para*-cumárico e ferúlico nas treze amostras de méis de eucalipto, e dos ácidos vanílico,

clorogênico e cinâmico nas seis amostras de méis de silvestre, indicou que estas substâncias poderiam ser usadas como marcadores químicos destas espécies de méis (DA SILVA, 2004).

Em todos esses estudos as análises dos ácidos fenólicos e flavonóides foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência, através da observação do perfil cromatográfico dessas substâncias com o uso de padrões. Os compostos fenólicos foram identificados e quantificados através da comparação dos seus tempos de retenção com os padrões autênticos, além da comparação de seus espectros de ultravioleta (MARTOS *et al.*, 1997; 2000; 2000a ; MERKEN & GARY, 2000; DATTA *et al.*, 2003, YAO *et al.*, 2004). Nesses trabalhos o perfil dos compostos fenólicos foi característico dos tipos florais estudados e, assim, as substâncias analisadas serviram como marcadores bioquímicos para autenticação botânica dos méis. O resultado mostrou que a análise por CLAE das substâncias não-voláteis pode servir como ferramenta coadjuvante para a determinação floral dos méis. O uso de detector arranjo de fotodiodos (DAD) foi muito útil para a identificação das substâncias presentes no mel (TOMÁS-BARBERÁN *et al.*, 1993).

5 – ORIGEM DAS SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS NOS MÉIS

Os flavonóides presentes no mel podem ser originários do néctar, pólen ou própolis. O pólen é um local de acúmulo de flavonóides glicosilados, bem como o néctar e a própolis são ricos, principalmente, em flavonóides agliconas. Os flavonóides glicosilados provenientes do pólen ou néctar podem sofrer hidrólise pelas enzimas glicosidases das glândulas salivares das abelhas, fornecendo as correspondentes agliconas (FERRERES *et al.*, 1993; GIL *et al.*, 1995).

A glicosilação é uma das etapas finais na biossíntese dos flavonóides. A adição de “oses” aos flavonóides relativamente pouco polares produz moléculas hidrossolúveis bastante volumosas.

Segundo dados da literatura, os derivados fenólicos encontrados nos méis podem ter suas origens um tanto quanto indefinidas, porém vários trabalhos investigando, seja pólen, própolis ou o néctar, têm sido relatados.

Apesar de diferentes composições de pólen, os flavonóides padrões observados em diferentes amostras de méis da região de La Alcarria foram muito comuns, e constituídos somente de agliconas, o que mostra que o pólen não foi a principal fonte dos flavonóides dos méis. Neste mesmo trabalho foi feita análise por CLAE da própolis, no qual o seu perfil foi muito similar ao do mel, confirmando a sugestão de outros autores que, nem todos, mas a maioria dos flavonóides de mel tem sua origem, principalmente, na própolis. Esses flavonóides deveriam vir parcialmente da hidrólise dos flavonóides glicosilados do pólen junto com os flavonóides da própolis, constituindo os flavonóides agliconas detectados no mel (FERRERES *et al.*, 1992).

O grupo de flavonóides da própolis, por sua vez, depende da planta usada para coleta da própolis. Isso sugere que flavonóides podem ser úteis como um adjunto para determinação da origem geográfica do mel, antes da análise da origem botânica (FERRERES *et al.*, 1992). Na Europa, bem como Ásia e América do Norte, regiões de clima temperado, por exemplo, a árvore de álamo é a fonte de resina utilizada pelas abelhas para produção da própolis, e os flavonóides comumente encontrados nessa própolis são pinocembrina, pinobanksina, galangina, crisina e apigenina. A composição química de

fenólicos da própolis coletada em diferentes regiões na Bulgária revelou que a planta origem da própolis foi álamo preto (*Populus nigra*). Os mesmos pesquisadores estudaram a própolis da Albânia e concluíram que suas fontes foram *Populus nigra* e *Populus canadensis*. E também na Espanha confirmou-se a *Populus nigra* como fonte da própolis. Na Rússia, as abelhas coletam resina, principalmente, da *Betula verrucosa*, na Ucrânia da *Betula verrucosa*, *Populus nigra* e *Populus tremula*; e na Mongólia da *Populus suaveolens* (MARCUCCI *et al.*, 2001).

Já a própolis brasileira, que é muito utilizada pelos japoneses, foi pouco estudada sobre sua composição química e atividade biológica. Ela é oriunda de diferentes origens botânicas, e sua composição química pode ser distinta.

Há trabalhos também de análise do néctar a procura de compostos fenólicos. A flavanona hesperetina tem sido sugerida como possível marcador para a origem floral do mel *Citrus* (FERRERES *et al.*, 1993). Este é um composto fenólico contido no néctar, onde está presente como um glicosídeo (hesperidina) (ANKLAM, 1998). Considerando essa indicação para marcador químico, néctar e pólen de flores *Citrus sinensis* foram coletados durante a primavera de 1992, para posteriormente serem analisados por CLAE. A análise do néctar de laranja revelou que a flavanona hesperidina (hesperetina-7-rutinose) foi o flavonóide majoritário detectado. O extrato de pólen também resultou em hesperidina como composto majoritário, porém diversas análises posteriores apresentaram diferenças muito significantes. Já a análise por CLAE de diversas amostras de méis da mesma região não revelou diferenças significativas nas quantidades relativas de hesperetina, o que sugere que o néctar é a principal fonte de hesperetina detectada em mel *Citrus* (FERRERES *et al.*, 1993).

O flavonóide canferol indicado como marcador do mel rosmaninho, também foi confirmado através de comparações de cromatogramas de CLAE do mel, néctar e própolis. O perfil dos compostos fenólicos da própolis se apresentou muito semelhante ao do mel, com a diferença que os flavonóides agliconas mais hidrofílicos quercetina e canferol foram detectados em maior quantidade no mel do que na própolis. Considerando que os conteúdos de canferol e quercetina na própolis são muito baixas, conclui-se que o néctar foi a principal fonte para o surgimento deles no mel após hidrólise, e que todos os flavonóides restantes foram originários da própolis integralmente (GIL *et al.*, 1995).

Em 1996, FERRERES e colaboradores, avaliaram se o ácido abscísico detectado no mel urze *Erica* spp, seria oriundo do néctar floral de *Erica* ou se teria sido produzido pela ação enzimática das abelhas. Nesse trabalho o néctar foi coletado e seus constituintes solúveis analisados por CLAE. Os principais compostos detectados foram os isômeros do ácido abscísico, sugerindo ser o néctar a fonte para origem deste ácido no mel.

Em 2001, TOMÁS-BARBERÁN e colaboradores, considerando as grandes quantidades de quercetina encontradas nos méis girassol, resolveram estudar o néctar e o pólen de girassol da mesma região (Itália e França). Observaram que o pólen continha a presença de quercetina-3-rutinoze (rutina), como principal flavonóide, e que o néctar continha quantidades variáveis de quercetina. Desta forma, eles concluíram que ambos poderiam ser responsáveis pelos grandes níveis de quercetina encontrados no mel girassol.

6 – OBJETIVOS

- Estabelecer uma metodologia cromatográfica eficiente para a identificação de ácidos fenólicos e flavonóides em amostras de méis brasileiros (silvestre e laranjeira);
- Caracterizar o mel baseado no perfil cromatográfico das substâncias fenólicas por cromatografia líquida de alta eficiência;
- Fazer a correlação das substâncias fenólicas identificadas com a origem botânica e/ou geográfica dos méis; e
- Avaliar a atividade biológica da fração rica em substâncias fenólicas.

O objetivo da presente investigação é propor uma análise sistemática de méis brasileiros, baseados nos perfis cromatográficos das suas substâncias fenólicas, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Este estudo visa identificar ácidos fenólicos e/ou flavonóides por cromatografia líquida associado ao detector de arranjo de fotodiodos, e utilizá-los como potentes marcadores químicos na determinação da origem floral e/ou geográfica.

Foram escolhidos ácidos fenólicos e flavonóides do mel, porque já foram reconhecidos previamente como sendo potencialmente úteis como marcadores taxonômicos em méis europeus (TAN *et al.*, 1989; ANDRADE *et al.*, 1997; DATTA *et al.*, 2003), e nos méis brasileiros (DA SILVA, 2004), bem como, pelo fato dessas substâncias apresentarem comprovadas atividades antioxidantes, anti-radicais e antibacterianas (MIORIN *et al.*, 2003).

7 - PARTE EXPERIMENTAL

7.1 – Material e Métodos

Todos os solventes em grau de pureza para análise e espectroscópico foram obtidos comercialmente da Vetec Química Fina Ltda e da Tedia Brasil, e foram utilizados sem purificação prévia. A água utilizada na cromatografia líquida e nas purificações das amostras de méis foi purificada em um aparelho de Milli-Q da Millipore. O ácido acético glacial, grau espectroscópico, foi obtido da Merck e usado como modificador de pH da fase aquosa nas análises por cromatografia líquida de alta eficiência.

As análises utilizando cromatografia em camada fina (CCF) foram realizadas em cromatofolhas de alumínio com sílica gel 60 F254 (Merck, Darmstadt, Germany). As substâncias foram visualizadas através da irradiação com lâmpada ultravioleta no comprimento de onda de 254 nm e 366 nm e/ou pulverizadas com solução 1% de AlCl_3 em etanol como revelador químico para a avaliação de flavonóides. As misturas dos solventes utilizados nos processos cromatográficos foram feitas em % v/v.

As separações cromatográficas foram efetuadas sobre Amberlite XAD-2 (poro 9 nm e partícula 0.3 – 1.2 mm), obtido comercialmente da Supelco (Bellefonte, PA, EUA) e para cromatografia de exclusão foi utilizada Sephadex LH-20 obtido da Sigma Chemical Co. (Saint Louis, MO, EUA).

As amostras e solventes analisados por CLAE foram previamente filtradas em membranas de nylon de 0,45 μm obtidas da Sartorius.

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

Os espectros na região UV realizados tanto para os padrões quanto para as amostras foram obtidos em espectrofotômetro Shimadzu modelo UV mini 1240, utilizando como solvente metanol grau espectroscópico.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H -RMN) e carbono¹³ (^{13}C -RMN), foram obtidos em espectrômetro Brücker modelo AC-200 (200 MHz

para ^1H e 50,3 MHz para ^{13}C). O solvente utilizado foi deuterado (DMSO- D_6), e como padrão interno o tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos (δ) foram obtidos em parte por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) foram medidas em Hertz (Hz).

7.2 - Amostras de Méis

As amostras de méis foram adquiridas tanto diretamente de apicultores quanto compradas no comércio. Os méis adquiridos dos apicultores foram das seguintes regiões de origem: Paraty, no estado do Rio de Janeiro; Serra da Mantiqueira, Itararé, Botucatu, no estado de São Paulo. As outras compradas nos comércios foram das seguintes regiões: Niterói-RJ; Cunha, Botucatu/Avaré, Rio Claro/São Carlos, Botucatu, Bebedouro e Taubaté, no estado de São Paulo. Uma amostra, ainda, foi adquirida no Instituto de Zootecnia da UFRRJ, em Seropédica-RJ (Tabela 5). Os méis estudados foram os monoflorais de laranjeira, isto é, cujo néctar apresenta a predominância de uma espécie botânica, e outros heteroflorais, um mel mais heterogêneo, denominados de “mel silvestre” ou “mil flores”, cujo néctar apresenta uma mistura de espécies botânicas.

Para a determinação dos perfis cromatográficos foram obtidas dezoito amostras de méis de diferentes regiões, sendo oito amostras de méis silvestre e dez amostras de méis laranjeira, no período de 2003-2004 (Tabela 5). Todas amostras foram estocadas na geladeira à 4°C até o momento da análise, a fim de evitar qualquer tipo de alteração.

Tabela 5: Amostras de méis analisadas nesse trabalho.

Código da Amostra	Tipo de mel	Origem Floral	Data de Chegada	Origem Geográfica
RLS02	silvestre	Heterofloral	10/06/2003	Cunha-SP / divisa com Paraty-RJ
RLS05	silvestre	Heterofloral	07/08/2003	UFRRJ – IZ -Seropédica-RJ
RLS06	silvestre	Heterofloral	07/10/2003	Serra da Mantiqueira entre Esp. Sto do Pinhal-SP e Andradas-MG
RLS07	silvestre	Heterofloral	10/10/2003	Botucatu-SP / Avaré-SP
RLS10	silvestre	Heterofloral	01/03/2004	Paraty-RJ
RLS11	silvestre	Heterofloral	11/03/2004	Rio Claro-SP / São Carlos -SP
RLS12	silvestre	Heterofloral	11/03/2004	Itararé-SP
RLS13	silvestre	Heterofloral	11/03/2004	Comércio em São Paulo-SP (Botucatu-SP)
RLL03	laranjeira	<i>Citrus</i>	23/06/2003	Niterói-RJ
RLL04	laranjeira	<i>Citrus</i>	25/08/2003	Niterói-RJ
RLL08	laranjeira	<i>Citrus</i>	10/10/2003	Bebedouro-SP
RLL09	laranjeira	<i>Citrus</i>	29/11/2003	Cunha-SP
RLL15	laranjeira	<i>Citrus</i>	12/03/2004	Botucatu-SP
RLL16	laranjeira	<i>Citrus</i>	12/03/2004	Botucatu-SP
RLL17	laranjeira	<i>Citrus</i>	11/03/2004	Rio Claro-SP / São Carlos -SP
RLL18	laranjeira	<i>Citrus</i>	11/03/2004	Itararé-SP
RLL19	laranjeira	<i>Citrus</i>	11/03/2004	Comércio em São Paulo-SP (Botucatu-SP)
RLL20	laranjeira	<i>Citrus</i>	11/03/2004	Taubaté-SP

7.3 - Padrões Utilizados

Os padrões utilizados nas análises cromatográficas foram sempre de 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, 4-metoxi-cinâmico, 4-metoxi-benzóico, *para*-hidroxibenzóico, vanílico e clorogênico foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Os flavonóides quercetina, morina, hesperidina, rutina foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). A miricetina foi doada pelo Prof. Dr. Mário Geraldo de Carvalho (DEQUIM-UFRRJ). Soluções dos padrões foram preparadas individualmente ou misturada. 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 μ m.

7.4 - Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Todas os padrões e as amostras dos méis foram analisados preliminarmente em um aparelho Shimadzu equipado com duas bombas modelo LC 10-AS, um detector de ultravioleta-visível com comprimento de onda variável (analisados a 270 e 340 nm), modelo SPD-10A, e integrador modelo CR-6A. As amostras foram injetadas através de injetor Rheodyne 7125i com *loop* de 20 μ L. A separação dos ácidos fenólicos e flavonóides foi realizada em coluna de fase reversa C-18 (250 mm x 4,6 mm d.i. e 5 μ m de tamanho de partícula), usando como fase móvel água: ácido acético (99:1, solvente A) e água: acetonitrila : ácido acético (59:40:1, solvente B). A separação foi feita com gradiente de fluxo: 0,8 mL.min⁻¹ inicialmente e foi aumentado para 1,0 mL.min⁻¹ após 10 minutos, mantendo-se constante até o final. O gradiente de eluição estabelecido foi: 25% do solvente B inicialmente, este foi aumentado para 70% em 20 minutos, 85% do solvente B em 25 minutos, 100% do solvente B em 30 minutos. Finalmente, com eluição isocrática com 100% do solvente B até 35 minutos.

A identificação das substâncias foi realizada em outro cromatógrafo com fase líquida da Waters Modelo 600E equipado com detector de arranjo de fotodiodos (DAD 996), com controlador de temperatura ajustado para 30°C e injetor Rheodyne 7125i com

loop de 20 μ L (Laboratório Biotecnologia-EMBRAPA-Agroindústria de Alimentos). Para esta análise utilizou-se a mesma coluna de fase reversa C-18, porém com fluxo constante de 1mL.min⁻¹, e o gradiente de eluição: 35% do solvente B inicialmente, este foi aumentado para 50% em 10 minutos, 70% do solvente B em 20 minutos, 85% do solvente B em 30 minutos, 100% do solvente B em 40 minutos, e finalmente, retornou-se para 35% do solvente B após 42 minutos. O sistema de computador com o “*software*” Millennium³² (Waters) possibilitou a aquisição dos espectros de UV dos componentes analisados para serem comparados aos espectros dos padrões autênticos, permitindo assim sua identificação. O volume de injeção para os padrões e amostras de méis foi de 20 μ l. O monitoramento dos cromatogramas foi realizado a 270 nm e 340 nm, visto que a maioria dos ácidos fenólicos e flavonóides encontrados nos méis mostram suas absorções máximas no ultravioleta, próximos a esses comprimentos de onda (MARTOS *et al.*, 1997).

7.5 - Preparo da Amostra de Mel

O êxito de uma análise cromatográfica para uma amostra com uma matriz tão complexa como o mel, depende, além de outros fatores, do preparo adequado da amostra. Nesta primeira etapa do trabalho, são eliminados ao máximo, os possíveis interferentes da análise, efetuando-se apenas a extração das substâncias de interesse, neste caso a fração rica em substâncias fenólicas.

As substâncias fenólicas foram extraídas do mel segundo metodologia descrita previamente na literatura (TOMÁS-BARBERÁN, *et al.*, 2001; FERRERES *et al.*, 1994; MARTOS *et al.*, 2000), porém algumas pequenas modificações foram testadas. A amostra de mel (cerca de 50 g) foi misturada com 250 ml de água destilada, ajustada a pH = 2 com ácido clorídrico concentrado e agitada com agitador magnético, a temperatura ambiente, até completa dissolução. A amostra fluida foi em seguida, filtrada através de algodão para eliminar possíveis partículas suspensas. O filtrado foi passado através de uma coluna de vidro (45 x 3,5 cm) empacotada com cerca de 75 g de Amberlite XAD-2 (poro 9 nm e partícula 0,3 – 1,2 mm). A coluna foi então lavada primeiramente com água acidificada (pH = 2 com HCl concentrado, 100 mL), e subseqüentemente, com água destilada (cerca de 150 mL) para remover todos os açúcares e outros constituintes polares do mel, enquanto as substâncias fenólicas presentes no mel permaneceram na coluna. A fração fenólica

adsorvida na coluna foi então eluída com metanol (cerca de 350 mL). O extrato metanólico obtido foi concentrado até à secura sob pressão reduzida em um evaporador rotatório a 40°C. Após esta etapa, procedimentos diferentes de extrações foram avaliados (Figura 14, p. 66).

- **Método I**

Este procedimento estudado teve por objetivo testar dois solventes diferentes no processo extrativo da fração metanólica do mel. Ao extrato metanólico concentrado foram adicionados 5 mL de H₂O destilada e realizou-se partição com dois solventes diferentes: a) éter (TOMÁS-BARBERÁN *et al.*, 2001) e b) acetato de etila. Após seis extrações (6 x 10 mL), a fase orgânica foi reunida, seca com sulfato de sódio ou de magnésio anidro, e concentrada até secura. Em seguida, o extrato foi redissolvido em 5 mL de metanol grau espectroscópico, filtrado em membrana de 0,45 µm e analisado por CLAE. Apenas uma das frações etéreas foi também enviada para teste de atividade biológica.

- **Método II**

Visando isolar flavonóides, a fração metanólica concentrada foi passada através de coluna de Sephadex LH-20 (5 x 1 cm) e eluídas com metanol. As frações fenólicas foram recolhidas e evaporadas a pressão reduzida no evaporador rotatório a 40°C. Algumas frações foram reunidas após avaliação por cromatografia de camada fina e redissolvidas em metanol grau espectroscópico para a análise por CLAE.

Em todos os casos as amostras foram guardadas a 4°C até serem analisadas.

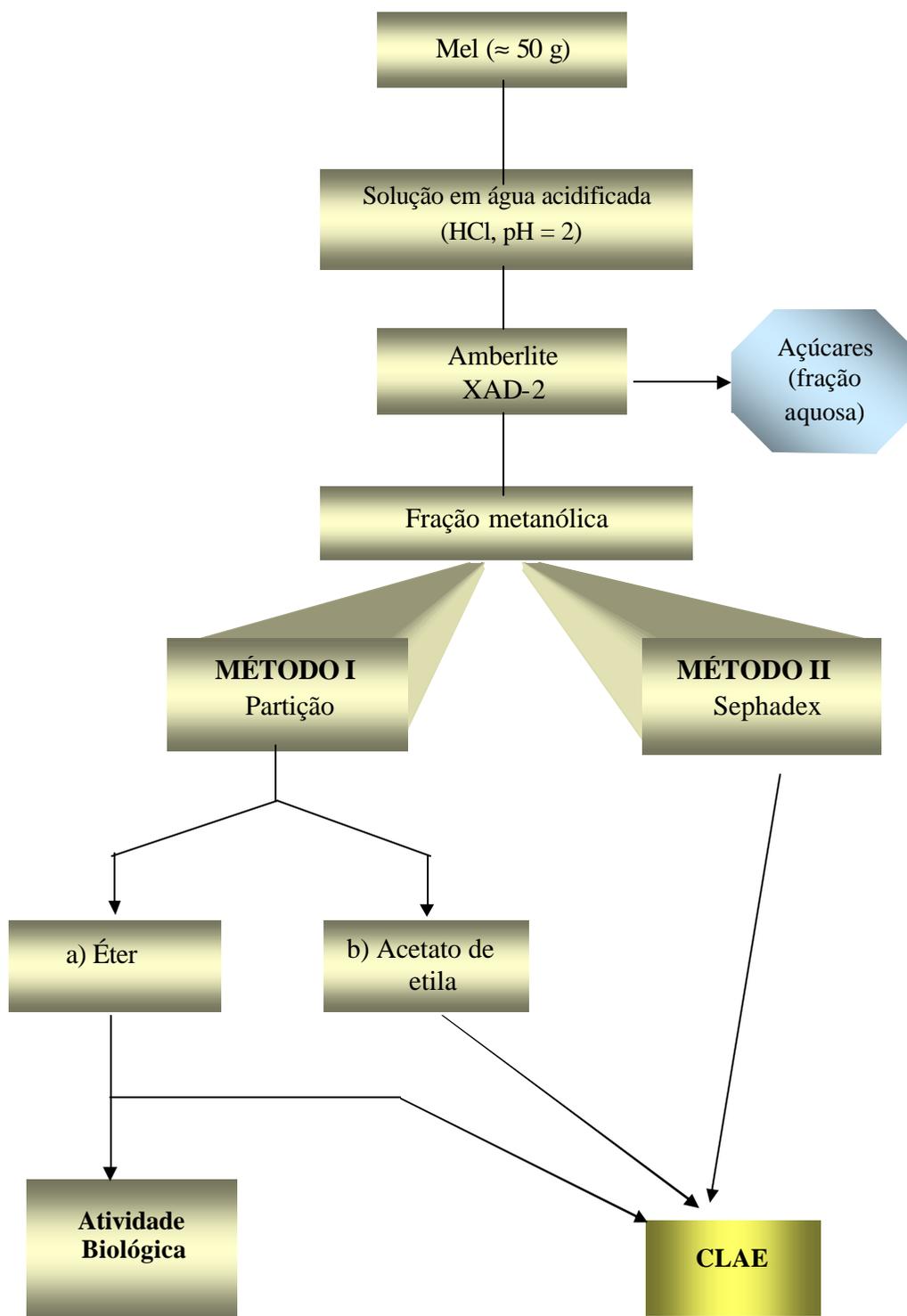


Figura 14: Preparo das amostras dos méis.

8 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

O nosso grupo de pesquisa já vem trabalhando com a análise do perfil cromatográfico de polifenóis em amostras de méis brasileiros de *Apis mellifera*, onde foram analisados os méis eucalipto e silvestre dos estados do Rio de Janeiro e São Paulo (DA SILVA, 2004). Com a finalidade de dar continuidade à investigação de marcadores químicos para os diferentes méis brasileiros, no atual trabalho foi escolhido mel silvestre de outras cidades, o que poderia servir de comparação com aqueles já estudados, além de um outro tipo de mel monofloral, mel laranjeira, que é de alto interesse comercial devido ao seu suave sabor e aroma.

Os ácidos fenólicos e flavonóides foram as classes escolhidas nas análises dos méis brasileiros, porque já foram reconhecidas previamente como sendo potencialmente úteis como marcadores taxonômicos em méis europeus (TAN *et al.*, 1989; ANDRADE *et al.*, 1997; DATTA *et al.*, 2003), mas não nos méis brasileiros até o estudo realizado por DA SILVA (2004), bem como, pelo fato, dessas substâncias apresentarem comprovadas atividades antioxidantes, antitumorais e antibacterianas (KAMPA *et al.*, 2004; ALJADI & KAMARUDDIN, 2004; ALJADI & KAMARUDDIN, 2003; MIORIN *et al.*, 2003; PRIOR, 2003; AL-MAMARY *et al.*, 2002).

A identificação desses derivados fenólicos poderá vir a auxiliar na caracterização da origem floral e geográfica de diferentes méis. Como o conteúdo dessas substâncias varia com o tipo floral, tem-se a possibilidade de utilizar tais substâncias como marcadores químicos do mel o que complementaria a sua análise microscópica (análise polínica).

Com efeito, para que uma determinada substância possa ter um papel importante como indicador químico deve obedecer a determinadas condições:

- não deve pertencer aos constituintes principais como açúcares, lipídeos;
- reciprocamente, não deve ter uma estrutura muito complexa ou ser elaborada por um número de espécies particulares;
- deve acumular-se e por conseqüência intervir de maneira limitada nas reações metabólicas; e
- deve ser fácil de detectar.

Os ácidos fenólicos e flavonóides escolhidos parecem satisfazer às condições requeridas, podendo desempenhar um papel importante na classificação dos méis.

Embora os processos clássicos baseados em cromatografia de camada fina (CCF) e de coluna (CC) continuem a ser utilizados para a separação e purificação de produtos naturais, ênfase e particular atenção serão dadas aqui à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada ao detector de arranjo por fotodiodo devido a sua rapidez e reprodutibilidade para a identificação das substâncias fenólicas. A espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta para identificação dos compostos fenólicos, que foi pioneira nos anos 50, ainda é muito usada e aplicada a todas as classes de polifenóis, principalmente, quando acopladas às técnicas cromatográficas instrumentais, como a cromatografia líquida de alta eficiência.

A técnica utilizada foi a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada ao detector de ultravioleta (UV) e de arranjo de fotodiodo (DAD), utilizando coluna analítica de fase reversa (octadecil-C18) e uma mistura de solventes (fase móvel água: ácido acético -99:1, solvente A- e água: acetonitrila : ácido acético -59:40:1, solvente B) com gradiente de eluição (p. 64).

Todas as amostras foram, primeiramente, analisadas em um cromatógrafo com fase líquida (Shimadzu – local UFRRJ), onde também foram injetados todos os padrões de ácidos fenólicos e flavonóides (separadamente e como misturas) para se ter uma prévia comparação por tempo de retenção. A partir dos perfis apresentados foram selecionadas algumas amostras de maior interesse, seja pelo número de picos ou por coincidência com os tempos de retenção dos padrões, para posterior análise no CLAE-DAD (Waters- local EMBRAPA), onde além do tempo de retenção, pode-se obter os respectivos espectros de absorção no UV para auxiliar na identificação.

Das dezoito amostras de méis avaliadas foram escolhidas apenas cinco de mel silvestre (**RLS02, RLS05, RLS06, RLS10 e RLS12**) e seis de méis laranjeira (**RLL03, RLL15, RLL16, RLL18, RLL19 e RLL20**- Tabela 5, p. 62) por apresentarem os perfis cromatográficos mais interessantes.

A identificação dos ácidos e flavonóides foi feita através da comparação dos tempos de retenção, juntamente com as análises dos respectivos espectros de absorção no UV,

comparado aos dos padrões. Entretanto, nem todos os picos puderam ser identificados dessa forma, pois os padrões foram escolhidos de acordo com a literatura prévia e a disponibilidade no laboratório, não sendo suficientes para monitorar completamente os picos presentes nos cromatogramas. Foram feitas também análises de CCF analítica dos méis comparando os R_f (fator de retenção) com aqueles dos padrões e, posteriormente avaliação desses resultados com os obtidos por CLAE.

8.1 – Extração das Substâncias Fenólicas do Mel

Com o objetivo de se obter frações ricas nos compostos de interesse e considerando-se a complexidade da matriz do mel, a metodologia extrativa adotada foi realizada segundo protocolo descrito na literatura, conforme apresentado na parte experimental (p. 64).

Dos métodos de extração avaliados (TOMÁS-BARBERÁN, *et al.*, 2001; FERRERES *et al.*, 1994; MARTOS *et al.*, 2000) selecionou-se aquele que nos pareceu mais reprodutivo do ponto de vista qualitativo e até mesmo quantitativo. As análises por CCF e por CLAE permitiram observar algumas pequenas variações para as concentrações das substâncias (verificadas pelas áreas relativas dos picos nos cromatogramas) quanto da capacidade extrativa do éter comparado ao acetato de etila (Método I, Figura 14, p. 66). Em alguns casos observou-se uma diferença qualitativa quanto à presença das substâncias, mesmo quando se comparou mel de uma mesma origem floral. Sendo assim, optou-se muitas das vezes trabalhar tanto com extrato etéreo como com o de acetato de etila, para garantir o máximo de recuperação das substâncias fenólicas. Na apresentação dos resultados será indicado quando estes dois solventes foram ou não utilizados.

Após a obtenção do extrato seco, além da CLAE, alguns procedimentos analíticos foram realizados, com o intuito de auxiliar na identificação das frações ricas em substâncias fenólicas. O extrato seco obtido de todas as amostras, tanto do método Ia (éter) quanto Ib (acetato de etila), além da CLAE, foi monitorado por CCF analítica, como uma análise rápida que pudesse fornecer algumas informações preliminares sobre o mel.

Das amostras estudadas a **RLS12**, extraída com éter, foi enviada para testes de atividade biológica *in vivo* e *in vitro* em camundongos. Essa amostra foi selecionada devido à indicação, pela primeira vez, da presença de possíveis flavonóides (por CCF). Esses testes foram realizados pela aluna de Iniciação Científica, Amanda Esteves-Souza, da Profa. Dra.

Áurea Echevarria, no Departamento de Química da UFRRJ e os resultados serão apresentados posteriormente.

O resíduo seco após partição com acetato ou éter, de todas as amostras selecionadas, foi redissolvido em 1mL de metanol grau espectroscópico, filtrado através de membrana de 0,45 μ m e analisado por CLAE-DAD.

O método II consistiu no fracionamento através de coluna com Shepadex LH-20 para avaliar a presença de flavonóides, segundo relatos descritos na literatura para méis europeus (ANDRADE *et al*, 1997). As amostras do mel silvestre e do mel laranjeira não mostraram perfil cromatográfico que indicasse a presença de flavonóides (comparação com t_R dos padrões usados), bem como nenhuma absorção característica na região de 250-380 nm (região característica para flavonóides). Sendo assim, esta metodologia extrativa foi abandonada.

A escolha do método Ia e/ou Ib para definir os perfis cromatográficos dos derivados fenólicos do mel se baseou na eficiência e reprodutibilidade a partir das análises dos picos nos cromatogramas e suas respectivas áreas relativas, bem como o grau de recuperação do extrato bruto após os processos extrativos (massa obtida de ~ 20 mg) partindo-se de 50 g de amostra de mel.

A escolha da coluna de fase reversa C-18 já havia sido utilizada pelo nosso grupo em trabalho anterior (DA SILVA, 2004), porém as condições cromatográficas (fase móvel, velocidade de fluxo e tempo de análise) foram modificadas para atender às novas análises, visto que não havia sido ainda identificado no mel brasileiro a presença de flavonóides. Essa metodologia analítica, embora um pouco diferente da anterior, conseguiu numa só análise abranger dois grupos de substâncias fenólicas: os ácidos fenólicos (benzóicos e cinâmicos) e os flavonóides (aglicona ou glicosilado). Aqui serão apresentados apenas os resultados das condições consideradas mais adequadas para as análises desses méis.

8.2 – Perfis Cromatográficos dos Padrões e Respectivos Espectros de UV

Conforme a descrição feita sobre o modo de identificação dos compostos fenólicos nas amostras, o estudo cromatográfico teve início pela análise do comportamento dos padrões disponíveis por CCF em gel de sílica (fase normal) e CLAE-DAD (fase reversa), bem como pela absorção no espectro ultravioleta em soluções da fase móvel usada (água:

acetonitrila: ácido acético - 59:40:1). Cabe destacar que o espectro de absorção no ultravioleta obtido com este solvente, não foi substancialmente diferente daquele resultante em metanol quando os padrões foram analisados separadamente em um espectrofotômetro.

Primeiramente, os padrões foram aplicados em placas de CCF analítica 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. Após alguns testes com diferentes fases móveis, tanto para os ácidos fenólicos como para os flavonóides agliconas o sistema de solvente usado na cromatografia de camada fina (CCF) foi uma mistura de hexano: acetato de etila: ácido fórmico (20:19:1). Para os flavonóides glicosilados o sistema de solvente usado foi acetato de etila: água: ácido fórmico (85:15:10; SIMONOVSKA *et al.*, 2003). Os ácidos fenólicos usados como padrões foram visualizados a 254 nm. Já os flavonóides foram revelados com uma solução 1% de cloreto de alumínio, que de uma forma geral apresentaram coloração amarelo a 366 nm. O cloreto de alumínio forma complexos estáveis com os grupos 5-hidroxi-4-ceto, 3-hidroxi-4-ceto e sistemas *orto*-diidroxí nos flavonóides em metanol, ocorrendo na análise espectrofotométrica um desvio para maiores comprimentos de onda (batocrômico) e uma intensificação da absorção (BRAZ-FILHO, 1971; MARKHAN & MABRY, 1975).

Cada padrão de ácido fenólico teve o seu cromatograma por CLAE-UV-Vis analisado individualmente e, em seguida misturados, confirmando seus tempos de retenção. Como alguns ácidos apresentaram tempos de retenção muito próximos (devido às características estruturais), apesar das curvas de absorção no ultravioleta permitirem a distinção entre eles, estes foram reunidos formando três misturas diferentes, denominadas A, B e C, com o intuito de facilitar as análises. A partir destas análises, os tempos de retenção e os comprimentos de onda dos padrões nas misturas e do ácido clorogênico analisado separadamente por CLAE-DAD foram reunidos nas Tabelas 6, 7 e 8 (p. 72 e 73) para facilitar a sua comparação com as amostras dos méis.

Os flavonóides, no entanto, só foram analisados individualmente, não como misturas. Reuniram-se os dados de tempo de retenção e comprimento de onda dos padrões dos flavonóides obtidos por CLAE-DAD (Tabela 9, p. 73). Os cromatogramas correspondentes às análises dos ácidos e dos flavonóides estão nas Figuras 15-24 (p. 74-79), com os respectivos espectros de absorção no UV.

Tabela 6: Tempo de retenção (t_R) e comprimento de onda (λ_{max}) dos ácidos fenólicos padrões (**Mistura A**) analisados por CLAE com detector de arranjo de fotodiodos.

Padrões de Ácidos	t_R (minutos)	λ_{max} (nm)
Ácido protocatecuico	4,190	259, 295
Ácido siríngico	5,936	274
Ácido <i>p</i> -cumárico	11,377	310
Ácido <i>m</i> -cumárico	14,511	278, 316 <i>om</i>
Ácido <i>o</i> -cumárico	18,506	277, 324
Ácido cinâmico	27,669	278
Ácido-4-metoxi-cinâmico	28,797	306

om = ombro

Tabela 7: Tempo de retenção (t_R) e comprimento de onda (λ_{max}) dos ácidos fenólicos padrões (**Mistura B**) e do ácido clorogênico analisados por CLAE com detector de arranjo de fotodiodos.

Padrões de Ácidos	t_R (minutos)	λ_{max} (nm)
Ácido gálico	3,404	272
Ácido <i>p</i> -hidroxi-benzóico	6,325	256
Ácido vanílico	7,509	260, 292
Ácido sinápico	13,572	294 <i>om</i> , 323
Ácido 4-metoxibenzóico	19,969	257
Ácido clorogênico*	14,632	256, 355

* injetado separadamente; *om* = ombro

Tabela 8: Tempo de retenção (t_R) e comprimento de onda (λ_{max}) dos ácidos fenólicos padrões (**Mistura C**) analisados por CLAE com detector de arranjo de fotodiodos.

Padrões de Ácidos	t_R (minutos)	λ_{max} (nm)
Ácido cafeico	5,455	292 <i>om</i> , 324
Ácido ferúlico	12,298	294 <i>om</i> , 322

Na mistura C as curvas de absorção no ultravioleta mostraram-se semelhantes para ambas as substâncias, sendo importante assim, a observação dos tempos de retenção para a distinção das mesmas.

Tabela 9: Tempo de retenção (t_R) e comprimento de onda (λ_{max}) dos flavonóides padrões analisados por CLAE com detector de arranjo de fotodiodos.

Padrões	t_R (minutos)	λ_{max} (nm)
Rutina	13,292	256, 354
Isoquercetrina	13,409	256, 354
Hesperidina	19,794	254, 328 <i>om</i>
Miricetina	20,574	253, 371
Morina	25,114	252, 353
Quercetina	27,416	256, 368

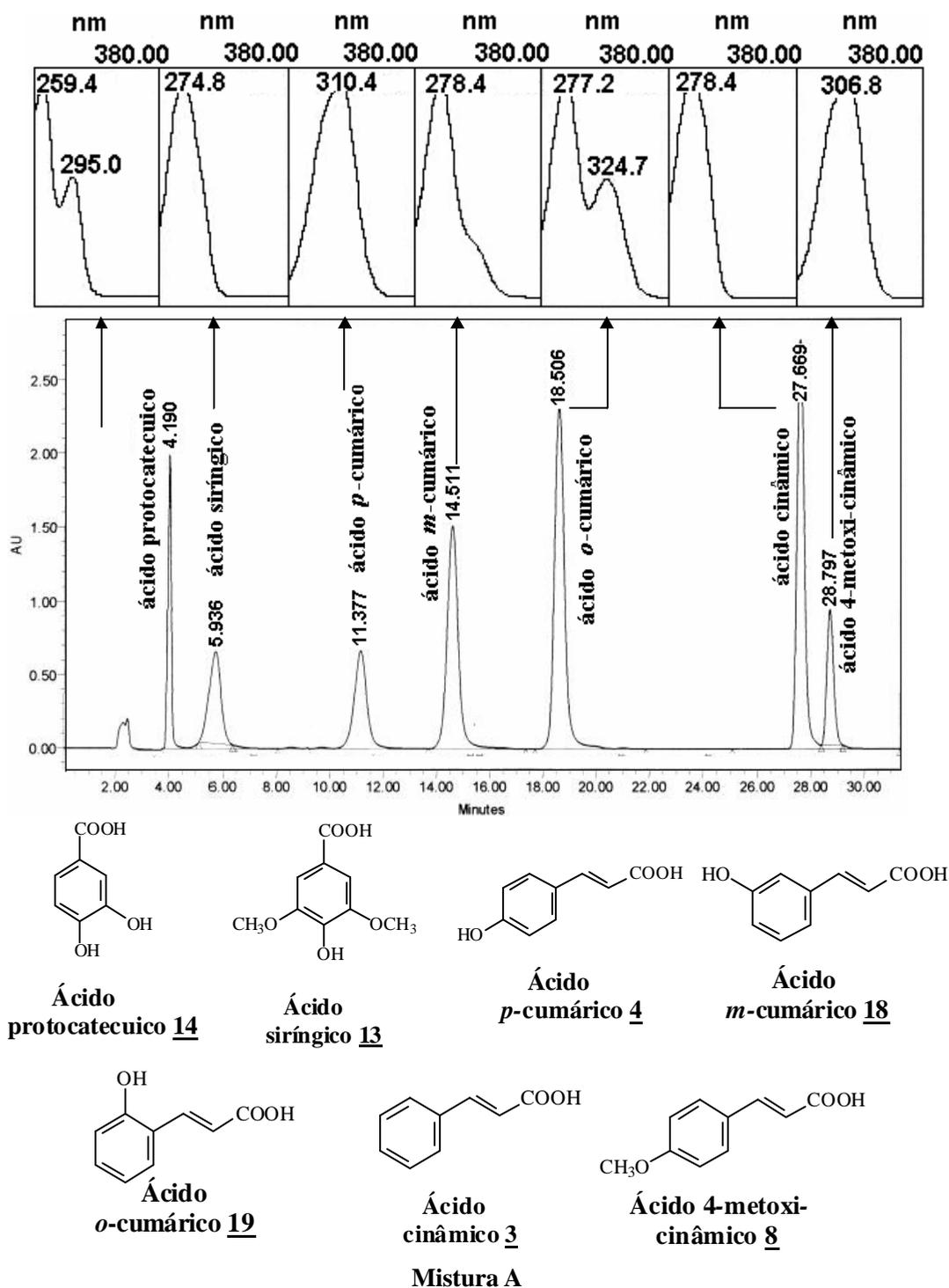
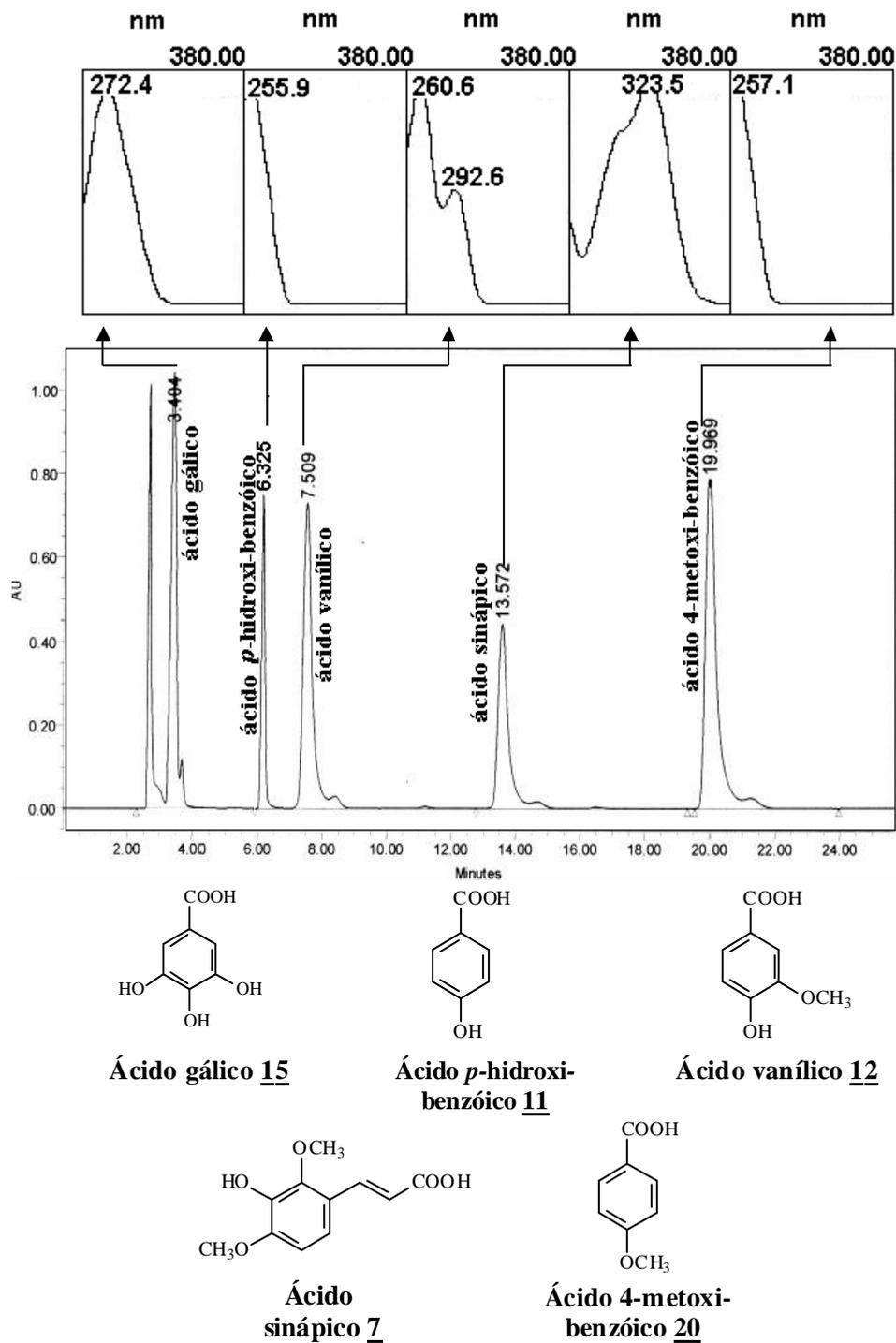


Figura 15: Separação dos padrões de ácidos fenólicos (**Mistura A**) por CLAE-DAD em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5µm), fluxo de 1mL.min⁻¹, fase móvel água: ácido acético (99:1, solvente A) e água: acetonitrila : ácido acético (59:40:1, solvente B) a 270 nm.



Mistura B

Figura 16: Separação dos padrões de ácidos fenólicos (**Mistura B**) por CLAE-DAD em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5µm), fluxo de 1mL.min⁻¹, fase móvel água: ácido acético (99:1, solvente A) e água: acetonitrila : ácido acético (59:40:1, solvente B) a 270 nm.

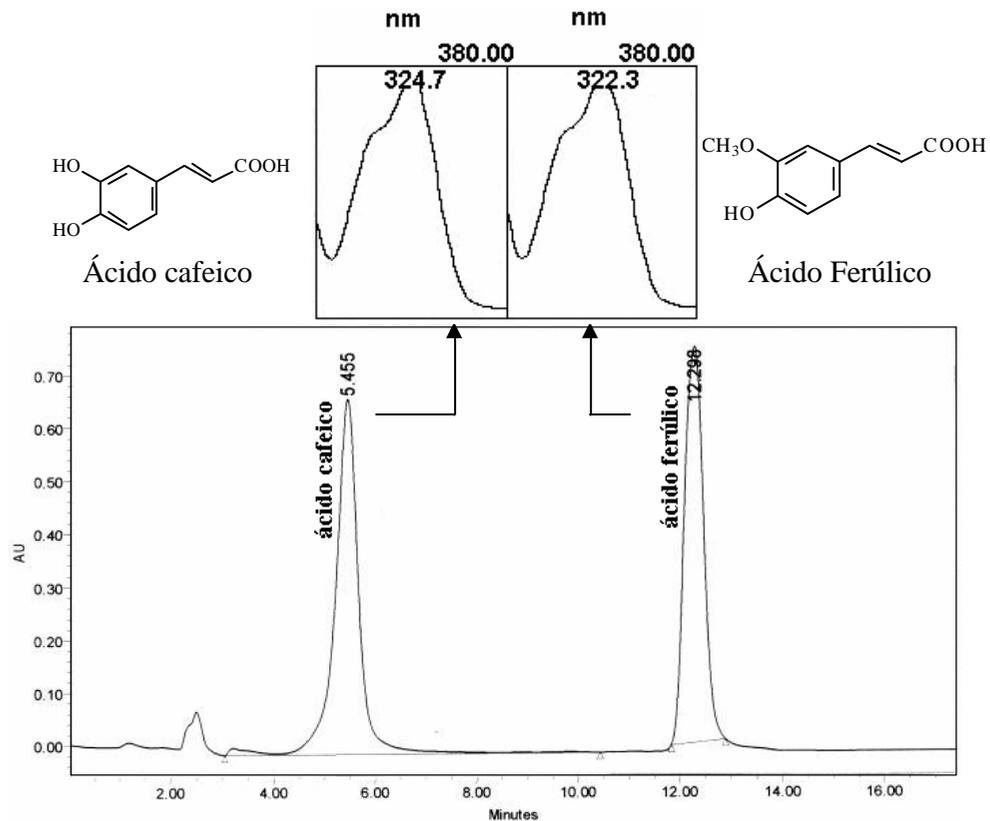


Figura 17: Separação dos padrões de ácidos fenólicos (**Mistura C**) por CLAE-DAD em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5µm), fluxo de 1mL.min⁻¹, fase móvel água: ácido acético (99:1, solvente A) e água: acetonitrila : ácido acético (59:40:1, solvente B) a 270 nm.

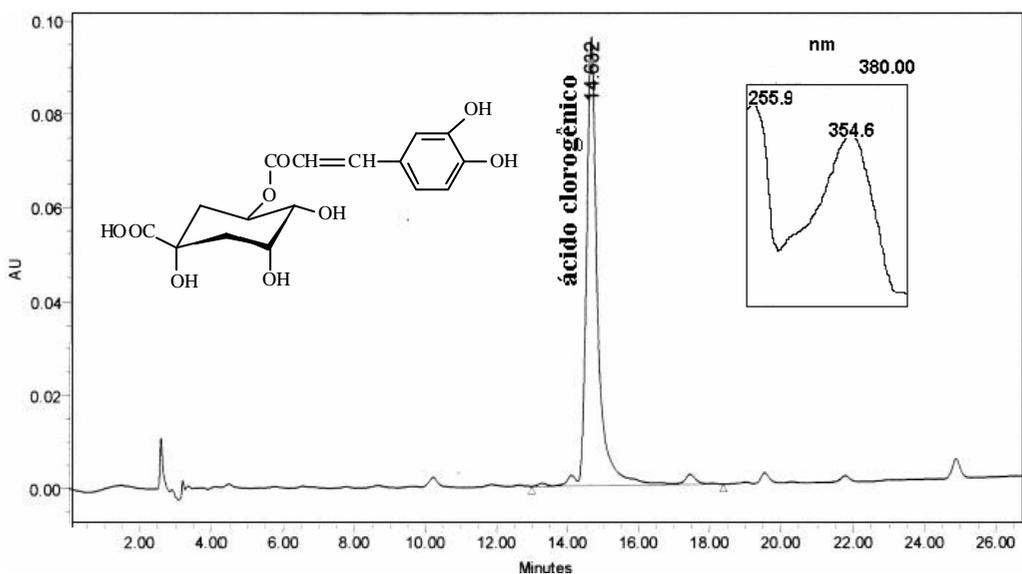


Figura 18: Cromatograma do **ácido clorogênico** por CLAE-DAD em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5µm), fluxo de 1mL.min⁻¹, fase móvel água: ácido acético (99:1, solvente A) e água: acetonitrila : ácido acético (59:40:1, solvente B) a 270 nm.

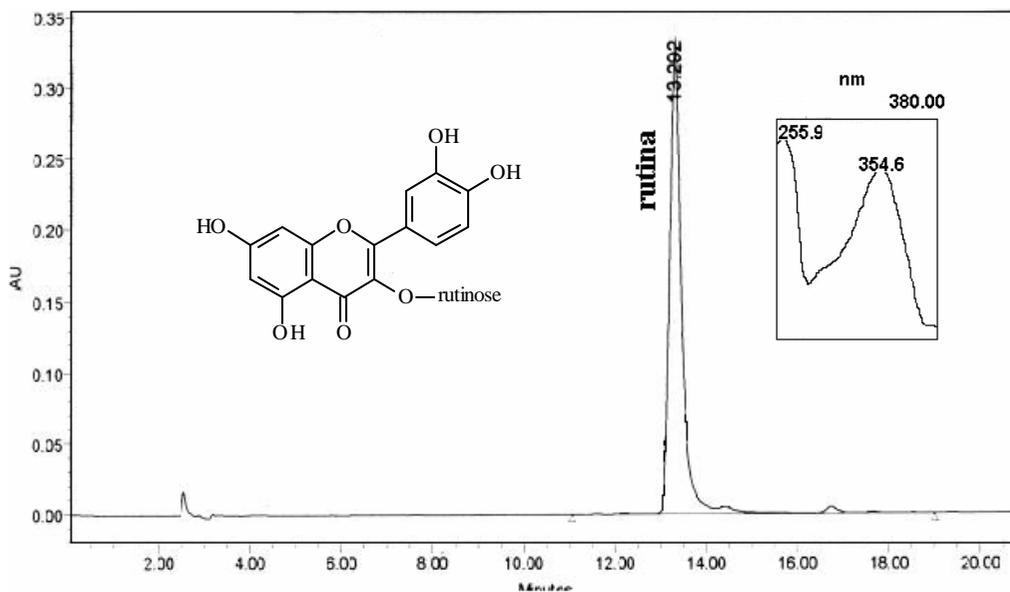


Figura 19: Cromatograma da **rutina** por CLAE-DAD em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5 μ m), fluxo de 1mL.min⁻¹, fase móvel água: ácido acético (99:1, solvente A) e água: acetonitrila : ácido acético (59:40:1, solvente B) a 270 nm.

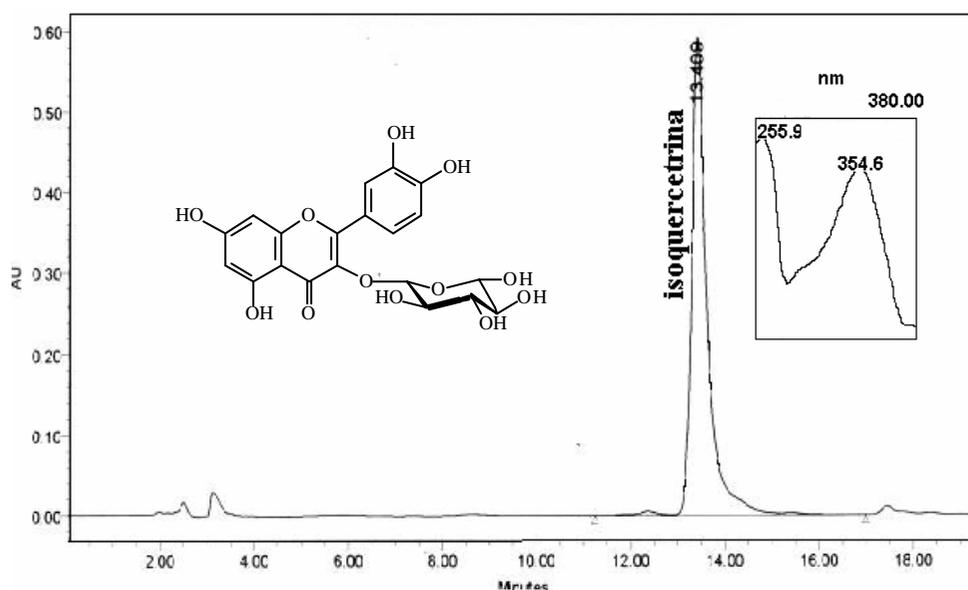


Figura 20: Cromatograma da **isoquercetrina** por CLAE-DAD em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5 μ m), fluxo de 1mL.min⁻¹, fase móvel água: ácido acético (99:1, solvente A) e água: acetonitrila : ácido acético (59:40:1, solvente B) a 270 nm.

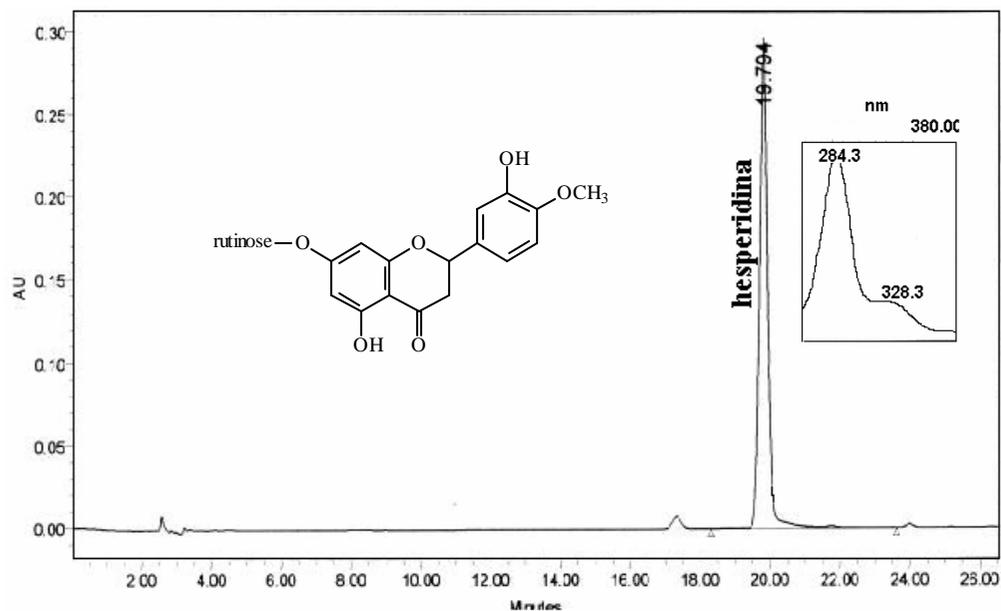


Figura 21: Cromatograma da **hesperidina** por CLAE-DAD em coluna analítica G-18 (25cm x 4,6mm x 5 μ m), fluxo de 1mL.min⁻¹, fase móvel água: ácido acético (99:1, solvente A) e água: acetonitrila : ácido acético (59:40:1, solvente B) a 270 nm.

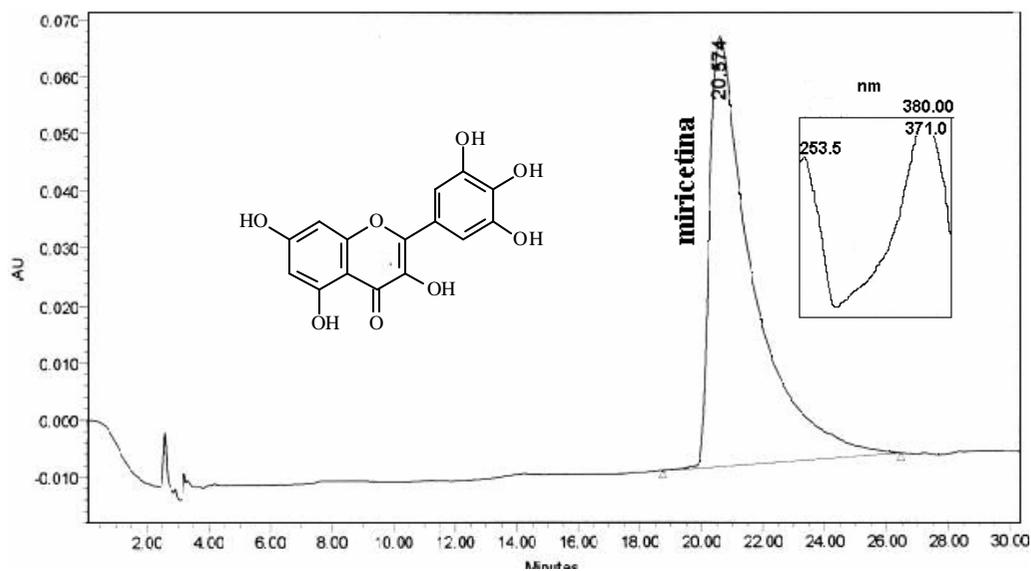


Figura 22: Cromatograma da **miricetina** por CLAE-DAD em coluna analítica G-18 (25cm x 4,6mm x 5 μ m), fluxo de 1mL.min⁻¹, fase móvel água: ácido acético (99:1, solvente A) e água: acetonitrila : ácido acético (59:40:1, solvente B) a 270 nm.

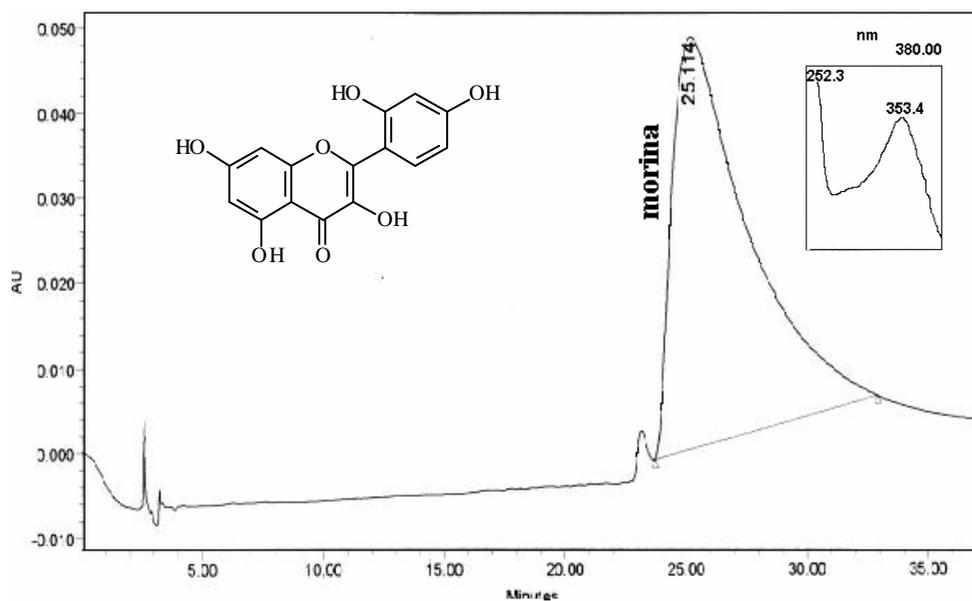


Figura 23: Cromatograma da **morina** por CLAE-DAD em coluna analítica C-18 (25 cm x 4,6 mm x 5 μ m), fluxo de 1mL.min⁻¹, fase móvel água: ácido acético (99:1, solvente A) e água: acetonitrila : ácido acético (59:40:1, solvente B) a 270 nm.

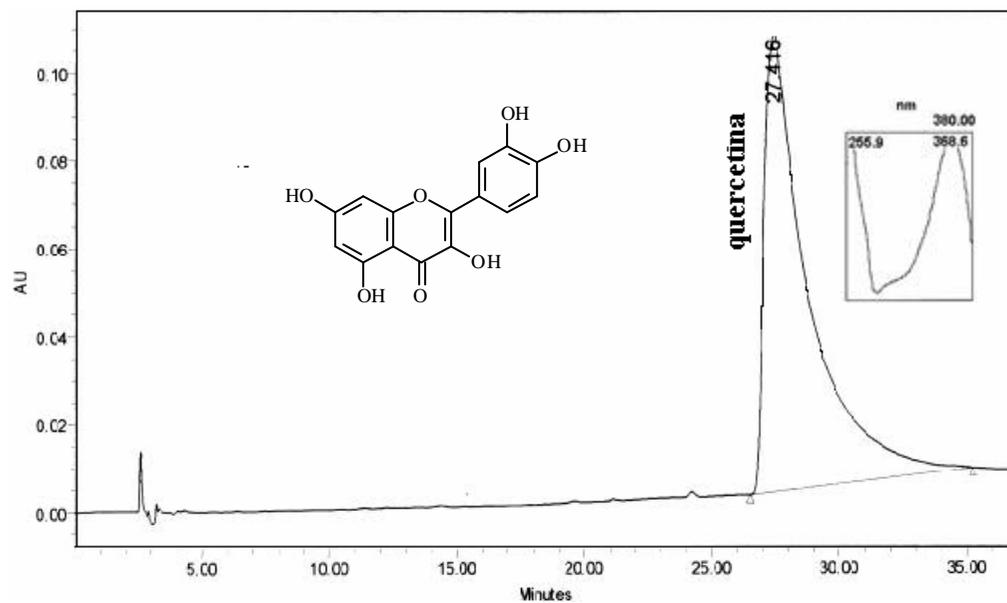


Figura 24: Cromatograma da **quercetina** por CLAE-DAD em coluna analítica G18 (25cm x 4,6mm x 5 μ m), fluxo de 1mL.min⁻¹, fase móvel água: ácido acético (99:1, solvente A) e água: acetonitrila : ácido acético (59:40:1, solvente B) a 270 nm.

Essa metodologia embora um pouco longa (cerca de 40 minutos de análise), conseguiu numa só corrida abranger os ácidos e flavonóides estudados, e através dos dados acumulados de absorção espectroscópica no detector de arranjo por fotodiodo, o tipo de substância fenólica pode ser identificado na matriz do mel.

O uso de diferentes misturas de padrões de ácidos fenólicos foi feito com o objetivo de permitir uma análise mais segura para aqueles ácidos cujos tempos de retenção eram muito próximos, embora os espectros de UV permitissem avaliar tal diferença. Como por exemplo, os da classe do ácido benzóico: o ácido protocatecuico (com hidroxilas nas posições 3, 4) e o ácido gálico (com as hidroxilas nas posições 3, 4, 5) apresentaram pouca diferença em termos de polaridade, portanto apresentaram tempos de retenção próximos (Tabelas 6 e 7, p. 72); então foram colocados em misturas distintas para facilitar sua identificação nas amostras de méis, mesmo sendo os seus máximos de absorção no UV diferentes. Esses dois ácidos foram os mais polares dentre os estudados.

Dessa forma, a ordem de eluição para os ácidos no cromatograma de cada mistura pode ser avaliado com maior segurança. Para tal discussão deve-se considerar a utilização de fase reversa, ou seja, a fase móvel é mais polar que a fase estacionária o que faz com que as substâncias mais polares saiam primeiro.

Com relação ao perfil cromatográfico dos flavonóides, observou-se que os cromatogramas foram diferentes quando se compararam os três flavonóides glicosilados (rutina, isoquercetrina e hesperidina) com aqueles agliconas (quercetina, morina e miricetina). Os flavonóides glicosilados por serem mais polares saem com tempo de retenção menor ($t_R = 13-19$ minutos) na fase reversa e apresentam seus picos mais simétricos e finos, quando comparados com flavonóides agliconas que tem picos mais largos e tempos de retenção maiores ($t_R = 20-27$ minutos) (Tabela 9, p. 73). Certamente, a resolução dos flavonóides agliconas poderia ter sido melhorada, aumentando-se a concentração do solvente orgânico na fase móvel (metanol ou acetonitrila), bem como poderia ter sido utilizada uma coluna de menor comprimento (por exemplo, 12,5 cm ao invés de 25 cm). Em virtude da falta de disponibilidade do aparelho, outras condições não foram testadas. Os padrões rutina e isoquercetrina (ambos flavonóis), nas condições utilizadas, apresentaram tempos de retenção e espectros de UV muito semelhantes. A diferença entre eles é apenas no açúcar no C-3, que para rutina é um dissacarídeo, a

rutinose, e para a isoquercetrina, é um monossacarídeo, a glicose, o que tornaria a sua identificação difícil na matriz do mel. Para esse caso recorreu-se ao auxílio da CCF analítica em gel de sílica, onde seus fatores de retenção foram diferentes (R_f da rutina = 0,22; R_f da isoquercetrina = 0,48).

A técnica de cromatografia em fase líquida acoplada ao detector de arranjo de fotodiodos, além de ter sido uma preciosa ferramenta na identificação estrutural dos ácidos fenólicos e flavonóides, permitiu verificar, se durante o processo de extração das substâncias da matriz do mel, as características dessas se mantiveram inalteradas, através da comparação do seu perfil cromatográfico (t_R) e o seu espectro de absorção no UV. Embora os espectros tenham sido obtidos, nesse caso, com a fase móvel (acetonitrila/água/ácido acético), se mostram idênticos àqueles dos padrões puros feitos em metanol.

8.2.1 – Considerações sobre as curvas de absorção no UV dos padrões

Os quatorze ácidos fenólicos, bem como os seis flavonóides estudados tiveram seus espectros de absorção no UV feitos em metanol, a fim de facilitar o seu monitoramento na análise cromatográfica quando do uso do detector de arranjo por fotodiodo na CLAE.

A metodologia extrativa associada com a análise por CLAE com detector de arranjo de fotodiodos permitiu estudar os ácidos fenólicos quanto à sua absorção no ultravioleta sem que para isso fosse necessário o seu isolamento, e ainda com a garantia de que se trabalhou com elevado grau de pureza quando os ácidos foram identificados.

A análise dos espectros de absorção no ultravioleta obtido pelo detector de arranjo de fotodiodos e acumulados com varredura de λ 250-380 nm permitiu que se fizesse algumas considerações relativas à estrutura das substâncias cromatografadas.

Inicialmente, serão apresentadas algumas considerações sobre os espectros de absorção no ultravioleta para os ácidos fenólicos, e posteriormente para os flavonóides, para que possam auxiliar a sua identificação na matriz do mel.

a) Ácidos fenólicos

Pelos dados acumulados de absorção espectroscópica no detector de arranjo de fotodiodos, determinou-se imediatamente o tipo de composto fenólico em questão. Os ácidos fenólicos encontrados nas amostras dos méis estudadas foram os derivados de ácido

benzóico (esqueleto C6-C1) e os derivados de ácido cinâmico (esqueleto C6-C3), cuja origem biossintética tenha como precursor importante o ácido chiquímico, como mostrado no item 3 (Figura 2, p.17). Esta classificação facilitou a identificação pelo espectro de ultravioleta quanto ao esqueleto estrutural básico, onde os derivados de ácido benzóico estudados foram: ácido gálico, ácido vanílico, ácido siríngico; ácido protocatecuico, ácido *para*-hidroxi-benzóico e ácido *para*-metoxi-benzóico (Figura 25), enquanto os derivados do ácido cinâmico foram: ácido ferúlico, ácido clorogênico, ácido sinápico, ácido cafeico, ácido cinâmico, ácidos *orto*, *meta* e *para*-cumárico e ácido 4-metoxi-cinâmico (Figura 26).

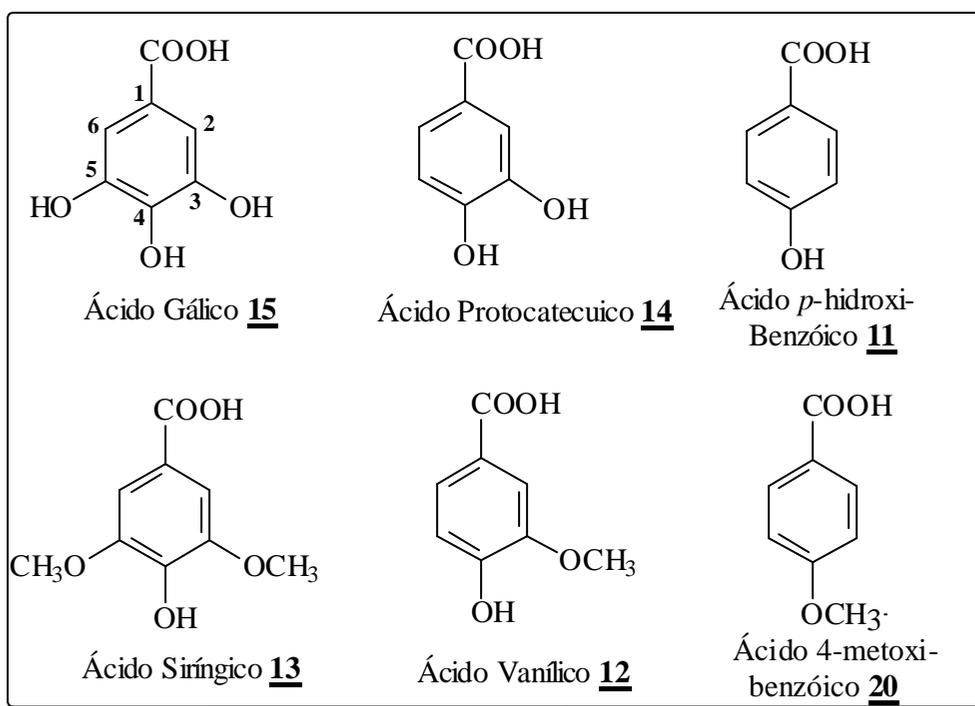


Figura 25: Estruturas dos derivados de ácidos benzóicos usados como padrões.

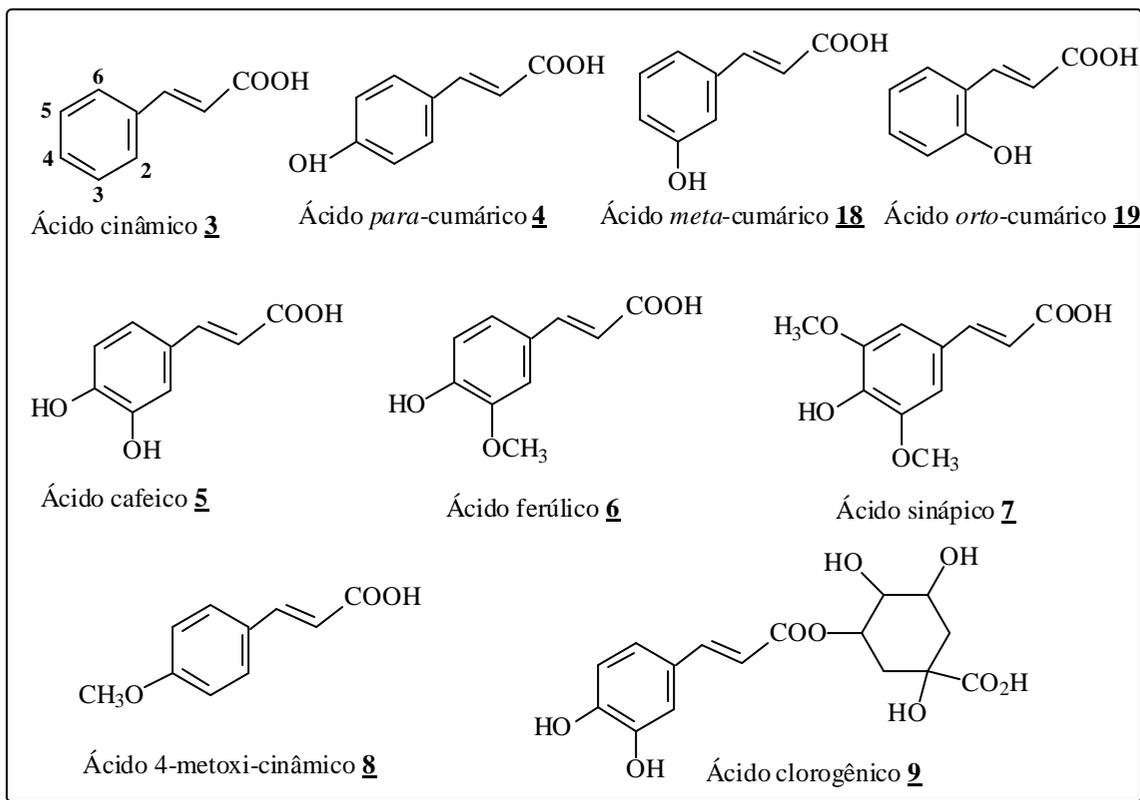


Figura 26: Estrutura do ácido cinâmico e seus derivados usados como padrões.

Os ácidos fenólicos que se encontraram nas amostras de méis estudados estavam todos substituídos, exceto o próprio ácido cinâmico, mas o seu espectro de absorção no ultravioleta permitiu observar tais variações estruturais.

Para efeito de discussão os espectros dos ácidos *para*-hidroxibenzóico e cinâmico foram utilizados como modelo para se discutir as modificações nas bandas de absorção dos espectros de todos os padrões feitos em metanol grau espectroscópico como solvente. Para o ácido *para*-hidroxibenzóico com apenas um grupo hidroxila no anel aromático, observou-se uma única banda de absorção de λ_{\max} a 253 nm, referente à banda B dos sistemas aromáticos (transição $\pi - \pi^*$). O ácido cinâmico não tem a hidroxila, mas manteve a mesma banda B de absorção máxima no ultravioleta de $\lambda_{\max} = 270$ nm, porém agora com um desvio batocrômico de 17 nm devido à extensão de conjugação do anel com o sistema olefínico presente na unidade C3 (Figura 27).

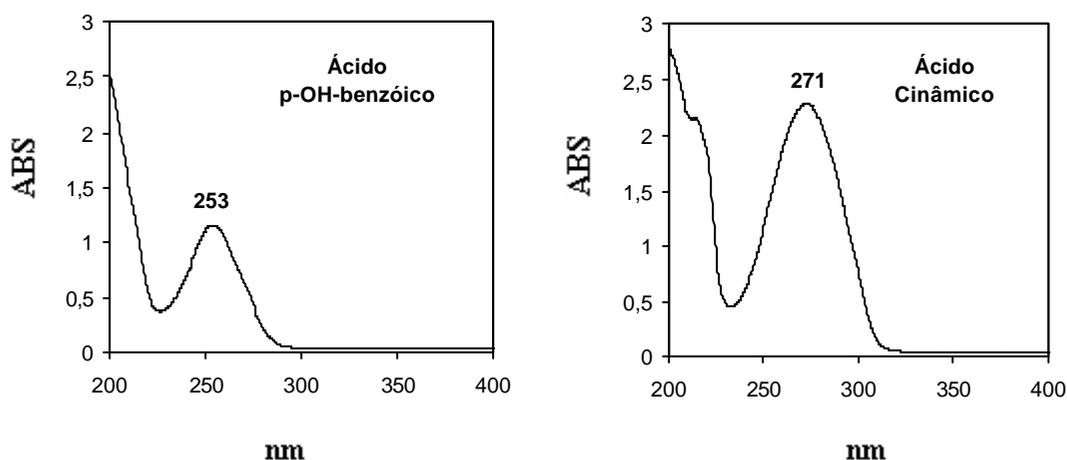


Figura 27: Espectros de absorção no ultravioleta dos ácidos *p*-hidroxibenzóico e cinâmico em metanol.

Para os derivados do ácido benzóico que apresentam três grupos hidroxila no anel aromático a alteração que se verifica é um desvio batocrômico de 17 nm quando comparados ao ácido *p*-hidroxi-benzóico ($\lambda_{\text{max}} = 253\text{nm}$; PAVIA & LAMPMAN, 1979), independentemente do fato de estarem ou não substituídos por metilas. Como exemplo, temos o ácido gálico ($\lambda_{\text{max}} = 272\text{ nm}$) e o ácido siríngico ($\lambda_{\text{max}} = 274\text{ nm}$; Figuras 15 e 16, p. 74 e 75). Este efeito está de acordo com esperado com base nos efeitos dos substituintes previstos pelas regras de Woodward (WILLIAMS & FLEMING, 1995).

Já os derivados do ácido benzóico que possuem substituintes nas posições 3, 4 do anel (*orto*-substituídos), apresentam espectros com duas bandas de absorção independente dos substituintes serem hidroxilas e/ou metoxilas, como podem ser observados os espectros dos ácidos protocatecuico ($\lambda_{\text{max}}=259\text{ e }295\text{ nm}$) e vanílico ($\lambda_{\text{max}} = 260\text{ e }296\text{ nm}$; Figuras 15 e 16, p. 74 e 75).

Para os derivados de ácido cinâmico também foi observado um desvio batocrômico em relação ao ácido cinâmico padrão ($\lambda_{\text{max}}=272\text{ nm}$), quando estes possuem substituintes nas posições 3, 4 do anel aromático, resultando em espectros com duas bandas de absorção independentes também, se os substituintes são hidroxilas e/ou metoxilas. Como foi observado nos espectros dos ácidos ferúlico ($\lambda_{\text{max}}=294\text{ e }322\text{ nm}$), cafeico ($\lambda_{\text{max}}=292\text{ e }$

324 nm), mesmo para o derivado trissubstituído, o ácido sinápico ($\lambda_{\text{max}}=294$ e 324 nm; Figuras 16 e 17, p. 75 e 76).

Como pode ser visto, todos os derivados do ácido cinâmico têm absorção máxima entre 293 e 320 nm sofrendo um desvio batocrômico de aproximadamente 30 nm quando se encontram substituídos no carbono carbonílico, como é o caso do ácido clorogênico ($\lambda_{\text{max}}=307$ e 354 nm).

Para os ácidos *orto*-, *meta*- e *para*- cumárico no entanto, ocorre uma alteração com relação às duas bandas de absorção observadas para os demais derivados. A existência de apenas uma hidroxila no anel aromático permite uma interação com a carbonila, alterando-se assim o espectro à medida que o grupamento hidroxila se aproxima da carboxila (no caso do derivado *orto*-substituído, efeito pronunciado). Assim, o deslocamento do grupo hidroxila da posição *para*- para *meta*- fez aparecer uma segunda banda de absorção a 310 nm que se acentuou quando passou à posição *orto* (Figura 15, p. 74).

b) Flavonóides

A espectroscopia no ultravioleta associada a CLAE é a uma técnica bastante útil para a detecção de flavonóides, durante os processos de monitoramento e/ou isolamento. O espectro ultravioleta de um flavonóide é normalmente determinado em etanol ou metanol e consiste tipicamente em duas bandas de absorção máxima: uma ocorrendo entre 240-285 nm (banda II, devido à absorção do anel **A**, sistema benzoila) e outro entre 300-450 nm (banda I, devido ao anel **B**; sistema cinamoila; Figura 28; SIMÕES *et al.*, 2000; HARBONE, 1994). A posição precisa e as intensidades relativas destes máximos de absorção dão uma valiosa informação quanto à natureza do flavonóide e ao seu padrão de oxigenação.

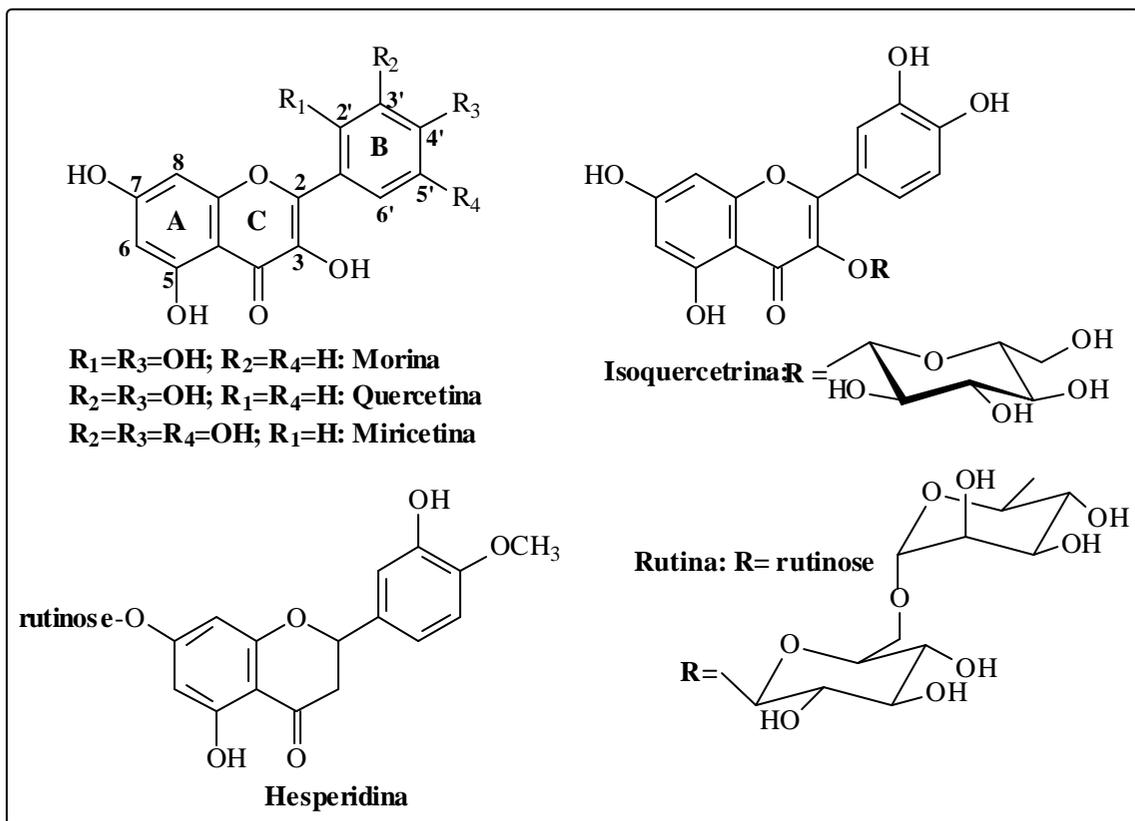


Figura 28: Estruturas dos flavonóides usados como padrões.

Numa análise rápida da Tabela 9 (p. 73) facilmente se verificou uma certa semelhança no espectro de absorção dos flavonóides, tanto para a classe dos flavonóis glicosilados: rutina (quercetina-3-*O*-rutinosídeo) e isoquercetrina (quercetina-3-*O*-glicosídeo), como para os flavonóis agliconas: miricetina (3, 5, 7, 3', 4', 5'-hexaidroxi-flavona), quercetina (3, 5, 7, 3', 4'-pentaidroxi-flavona) e morina (3, 5, 7, 2', 4'-pentaidroxi-flavona), que apresentam duas bandas de absorção características (banda I e banda II). A diferença, no entanto, foi observada para a hesperidina (5, 3'-diidroxi, 4'-metoxi, 7-rutinosé flavanona), que é uma flavanona glicosilada que apresentou apenas uma banda de absorção intensa relacionada ao sistema benzoila (banda II, anel A) (Figura 21, p. 78).

A análise dos espectros de absorção no ultravioleta forneceu considerações importantes sobre o tipo de flavonóide e o seu padrão de oxigenação, particularmente pela análise da banda I. Nas flavonas e flavonóis a banda I aparece entre 304-350 nm, já as flavanonas exibem uma banda I de baixa intensidade, freqüentemente, aparecendo como ombro da banda II (Figura 29, Tabela 10).



Figura 29: Esqueletos básicos de flavonóides.

Tabela 10: Deslocamento da banda I dos espectros UV dos flavonóides.

Tipo de Flavonóides	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
Flavonas	304-350
Flavonóis (OH-3 substituído)	328-357
Flavonóis (OH-3 livre)	352-385
Flavanonas	304-330 (Banda I, ombro) 240-280 (bandaII)

Quando os espectros dos padrões foram analisados, observou-se que o aumento no grau de oxigenação do anel B nos flavonóis causou um desvio batocrômico notável na banda I por cada grupo hidroxila adicional, e conseqüentemente, os espectros deslocam-se no sentido dos maiores comprimentos de onda, porém um efeito muito menor para a banda II. Isso foi observado para o espectro de absorção ultravioleta da miricetina ($\lambda_{\text{máx}} = 371$ nm, banda I e 253 nm, banda II) quando comparados com os espectros da quercetina ($\lambda_{\text{máx}} =$

368 e 256 nm) e da morina ($\lambda_{\text{max}} = 353$ e 252 nm). A metilação ou a glicosilação dos grupamentos hidroxila não alteram, em geral, os respectivos espectros. Porém, se os grupos hidroxilas nas posições C-3, C-5 ou C-4' dos núcleos das flavonas ou flavonóis, são metilados ou glicosilados, observam-se desvios hipsocrômicos em especial na banda de maior comprimento de onda (banda I). Esse fato foi observado no espectro da isoquercetrina ($\lambda_{\text{max}} = 353$ nm, banda I) quando comparado ao espectro da quercetina ($\lambda_{\text{max}} = 368$ nm), que apresentou um efeito hipsocrômico de 14 nm, em virtude da presença da glicose no C-3.

8.3 – Perfis das Substâncias Fenólicas nos Méis Laranjeira e Silvestre por CLAE

Antes de realizar as análises por CLAE, as amostras passaram por diversas etapas com o intuito de se obter informações preliminares sobre a composição química dos méis, e com isso fazer uma triagem para o processo cromatográfico. Foram feitos espectros de ultravioleta (UV) de todos os extratos de mel em metanol, bem como análises por cromatografia de camada fina analítica em gel de sílica, porém serão apresentadas e discutidas somente as análises dos méis selecionados, por apresentarem um perfil mais rico em fenólicos.

8.3.1 – Espectros de ultravioleta das amostras dos méis

Inicialmente, fez-se um estudo dos espectros de absorção no ultravioleta em metanol dos extratos dos méis obtidos, tanto pelo método Ia (éter), quanto pelo método Ib (acetato de etila, p. 66) que permitiu que se fizessem algumas considerações relativas às estruturas das substâncias a serem identificadas. Serão apresentados mais adiante, juntamente com os perfis cromatográficos por CLAE, os espectros de absorção no ultravioleta obtidos pelo detector de fotodiodo, correspondentes a cada substância presente nos extratos dos méis.

Na Figura 30 foram apresentados os espectros de absorção de ultravioleta dos extratos dos méis selecionados. A análise desses espectros permitiu verificar absorção localizada entre 250-350 nm, faixa de absorção que sugeriu a presença de derivados fenólicos, incluindo os ácidos e flavonóides.

Dos cinco méis silvestres (**RLS02, RLS05, RLS06, RLS10, RLS12**) estudados, apenas os **RLS02** e **RLS05** apresentaram semelhanças em seus espectros de UV, sendo os

demais diferentes entre si (Figura 30). Essas diferenças, a princípio, foram até previsíveis, visto que estes méis são heteroflorais e de regiões diferentes (Cunha-SP, Seropédica-RJ, Serra da Mantiqueira - entre SP e MG, Paraty-RJ e Itararé-SP - divisa com o estado do Paraná). Um outro espectro de ultravioleta com absorção diferente foi o mel **RLS06**, que apresentou uma banda de absorção forte em $\lambda_{\text{máx}} = 270$ nm e um ombro a $\lambda_{\text{máx}} = 325$ nm. Isto sugeriu a presença de ácido cinâmico, ou derivados de ácido benzóico trissubstituídos com hidroxilas e/ou metoxilas, tais como ácidos gálico e siríngico, além de flavonóides da subclasse da flavanona, que também apresentam tais características (Figura 21, p. 78). As demais amostras estudadas, **RLS10E** (fração etérea), **RLS12A**, **RLS12B**, também apresentaram bandas de absorção localizadas na faixa de $\lambda_{\text{máx}} = 250-350$ nm, porém tendo os seus máximos e perfis de curva distintos.

Os espectros das frações **RLS12A** e **RLS12B** referem-se ao mesmo mel, sendo a **RLS12A** partição com acetato de etila (método Ib) e a **RLS12B** partição com éter (método Ia). Observou-se que no **RLS12B** a banda em $\lambda_{\text{máx}} = 257,5$ nm é acentuada em relação ao **RLS12A** e ocorre também o surgimento de um ombro em $\lambda_{\text{máx}} = 291,5$ nm.

Em todos os casos, no entanto, não devemos descartar a presença de flavonóides, considerando que há pequenas absorções próximas a $\lambda_{\text{máx}} = 350$ nm e que puderam ser avaliados quando da análise do perfil por CLAE e seu espectro ultravioleta obtido pelo detector de fotodiodo.

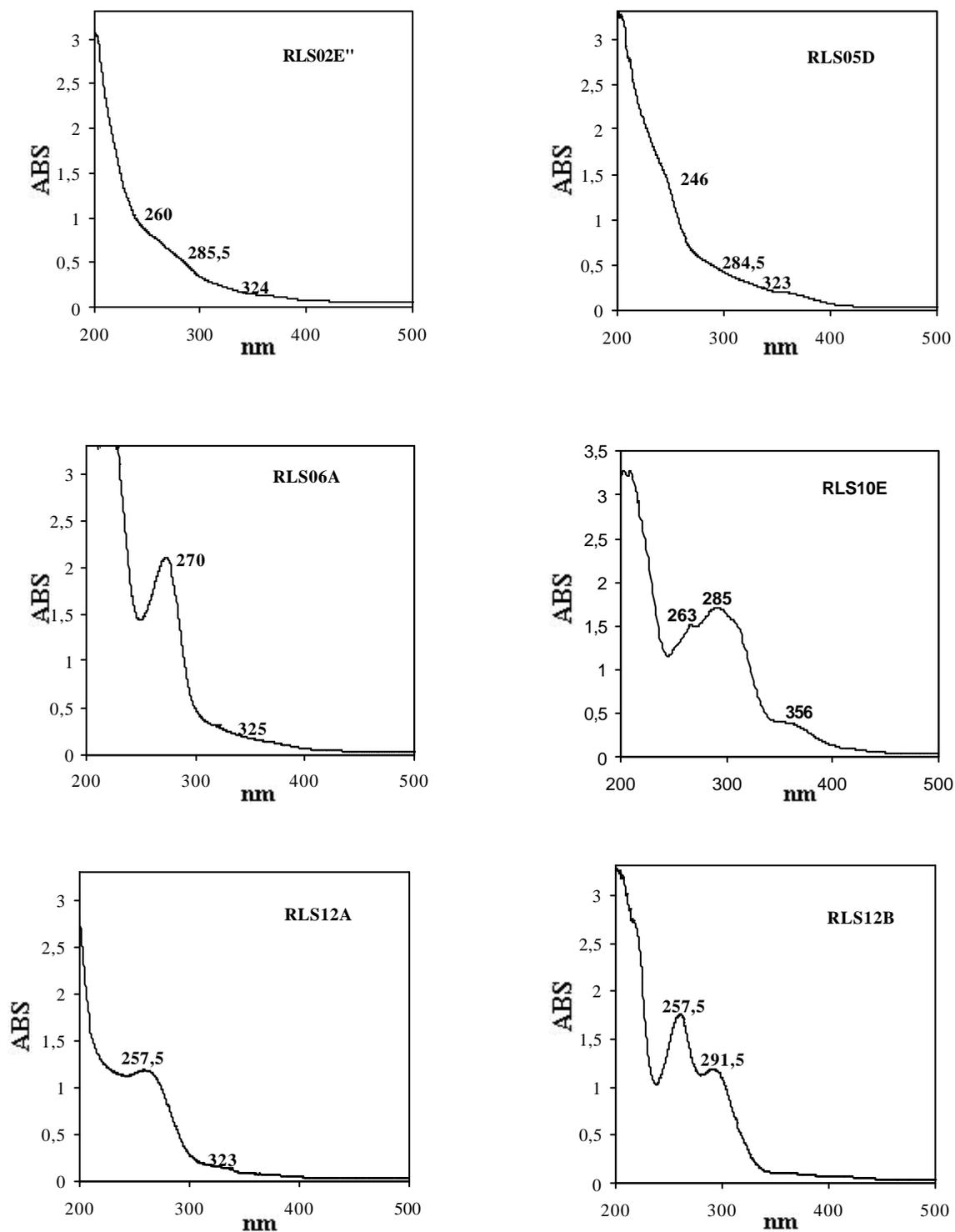


Figura 30: Espectros de absorção UV dos extratos dos méis silvestres selecionados (amostras RLS02, RLS05, RLS06, RLS10 e RLS12) realizados com metanol grau espectroscópico.

Para as seis amostras de méis laranjeiras selecionadas, **RLL03, RLL15, RLL16, RLL18, RLL19 e RLL20**, as análises dos espectros de ultravioleta em metanol também demonstraram absorção entre $\lambda_{\text{máx}} = 250\text{-}350$ nm, indicando a presença de ácidos fenólicos e, também possíveis flavonóides (Figura 31). Podemos sugerir antecipadamente, algumas informações com relação a alguns casos. Por exemplo, o ácido protocatecuico e/ou vanílico pode(m) estar presente(s) em algumas das amostras (bandas próximas de $\lambda_{\text{máx}} = 250$ nm e $\lambda_{\text{máx}} = 290$ nm). A banda próxima de $\lambda_{\text{máx}} = 250$ nm também pode indicar a presença de derivados de ácido benzóico.

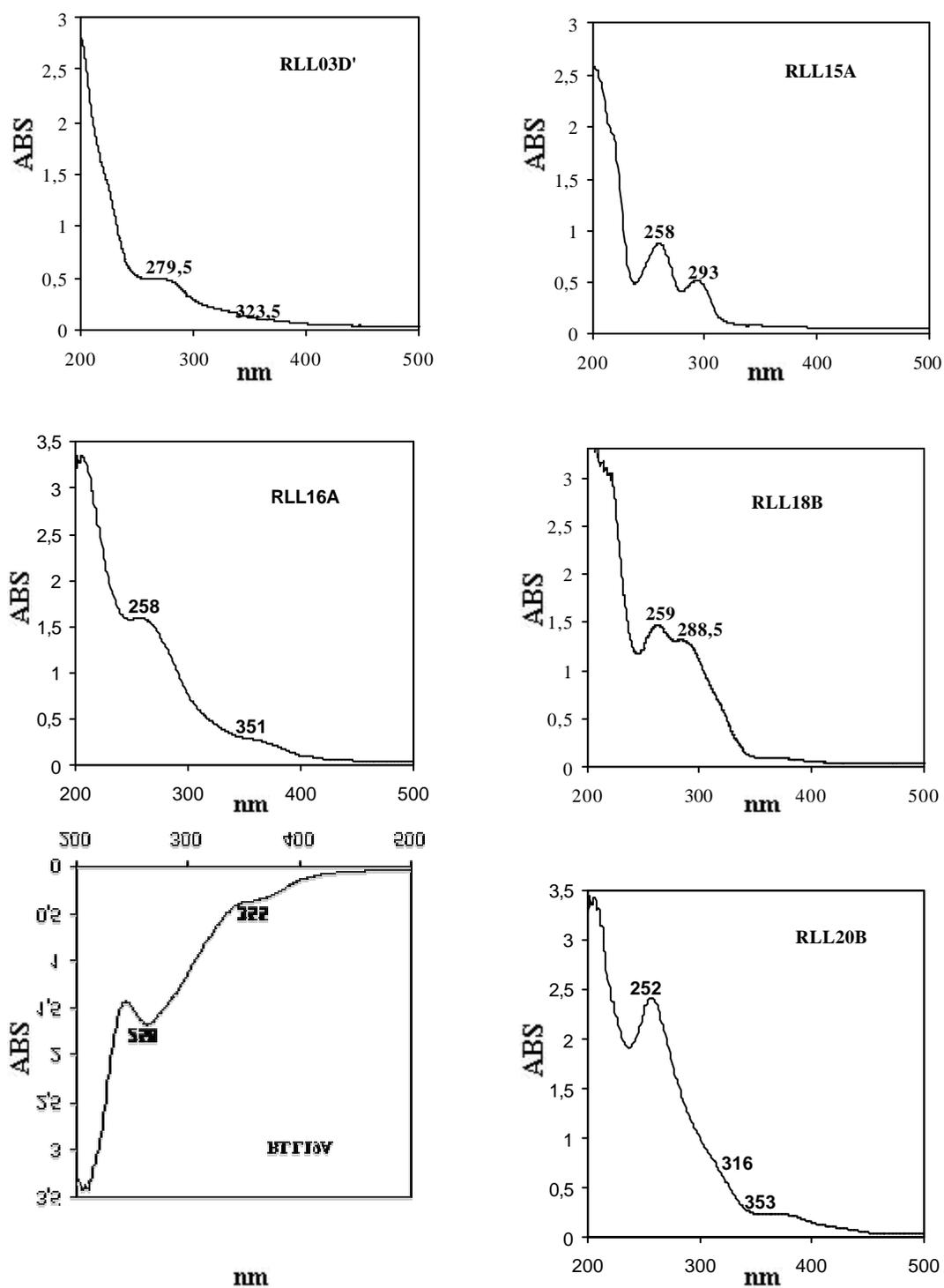


Figura 31: Espectros de absorção UV dos extratos dos méis laranjeiras selecionados (RLL03, RLL15, RLL16, RLL18, RLL19 e RLL20) realizados com metanol grau espectroscópico.

8.3.2 – Identificação das substâncias fenólicas nas amostras por CLAE-DAD

Os extratos dos méis selecionados foram analisados previamente, por cromatografia de camada fina (CCF) em gel de sílica, tendo como fases móveis hexano: acetato de etila: ácido fórmico (20:19:1) ou acetato de etila: água: ácido fórmico (85:15:10), afim de avaliar a presença ou não de ácidos fenólicos e/ou flavonóides, a partir da comparação dos R_f com os padrões.

Após as análises dos padrões dos ácidos fenólicos e flavonóides através dos seus perfis cromatográficos (t_R) e seus respectivos espectros de absorção no UV, passou-se à identificação daquelas substâncias que foram extraídas dos méis silvestre e laranjeira.

Observando-se os cromatogramas das amostras de méis silvestres (heterofloral; Figuras 40 à 47, p. 107, 108, 110-112, 114, 116 e 117) e laranjeira (monofloral; Figuras 32 à 39, p. 95, 96, 98, 99, 101, 103-105), notou-se que os monoflorais foram mais reprodutíveis em termos de perfil da composição química, facilitando assim, o trabalho para definir marcadores químicos para a origem botânica e/ou geográfica.

A análise dos espectros de UV obtidos pelo detector de arranjo de fotodiodos e acumulados com varredura de $\lambda = 250-380$ nm permitiu tirar algumas conclusões sobre as estruturas das substâncias fenólicas presentes no mel. Com esta técnica (CLAE) as substâncias separadas foram analisadas com alto grau de pureza, mesmo em uma matriz de alta complexidade, onde as bandas de absorção obtidas para cada pico puderam auxiliar na identificação da estrutura. Assim, aplicando-se os conhecimentos adquiridos pelos estudos feitos sobre análise no ultravioleta dos padrões, associados com seu perfil cromatográfico (t_R), e adicionalmente o uso de cromatografia de camada fina, as estruturas das substâncias fenólicas presentes no mel puderam ser identificadas.

A comparação dos perfis cromatográficos do mel laranjeira com o mel silvestre mostrou que as substâncias fenólicas encontradas, não foram as mesmas na sua totalidade. Quando os cromatogramas e os respectivos espectros de absorção no UV foram analisados, pode-se verificar uma diferença bastante pronunciada, no que diz respeito às áreas relativas dos picos, bem como a existência de picos distintos para cada amostra de mel analisada. No entanto, para as seis amostras de méis laranjeiras analisadas por CLAE-DAD e comparadas entre si, foi observado uma maior semelhança quanto ao perfil cromatográfico das

substâncias fenólicas do que aquele encontrado nos méis silvestres. O perfil cromatográfico para o mel silvestre mostrou muito pouca correlação entre as substâncias fenólicas identificadas e a sua origem geográfica e/ou botânica.

A análise do perfil cromatográfico para o mel **RLL03**, permitiu identificar dois ácidos fenólicos, o ácido *p*-hidroxi-benzóico ($t_R = 6,326$ min) e o ácido vanílico ($t_R = 7,458$ min). O ácido *p*-hidroxi-benzóico foi identificado apenas nessa amostra de mel laranjeira (Figura 32). No cromatograma desta amostra observaram-se outros picos ($t_R = 3,94$ min, $t_R = 14,445$ min e $18,802$ min) que não foram identificados, por não terem os tempos de retenção e espectros de UV relacionados a nenhum dos padrões estudados. Porém os espectros de ultravioleta para essas substâncias apresentaram uma banda com máximo de absorção em $284,3$ nm ($t_R = 3,94$ min) e $250,8$ nm ($t_R = 14,445$ min) e duas bandas em $260,6$ e 351 nm ($18,802$ min), que sugerem a possibilidade de serem derivados de ácido benzóico, para as duas primeiras, e derivados de ácido cinâmico para outra. Para esta amostra **RLL03** também foi identificado o ácido *p*-cumárico ($t_R = 11,555$ min), que apareceu como constituinte majoritário dos identificados (área relativa) quando comparado aos outros ácidos encontrados (Figura 33, p. 96).

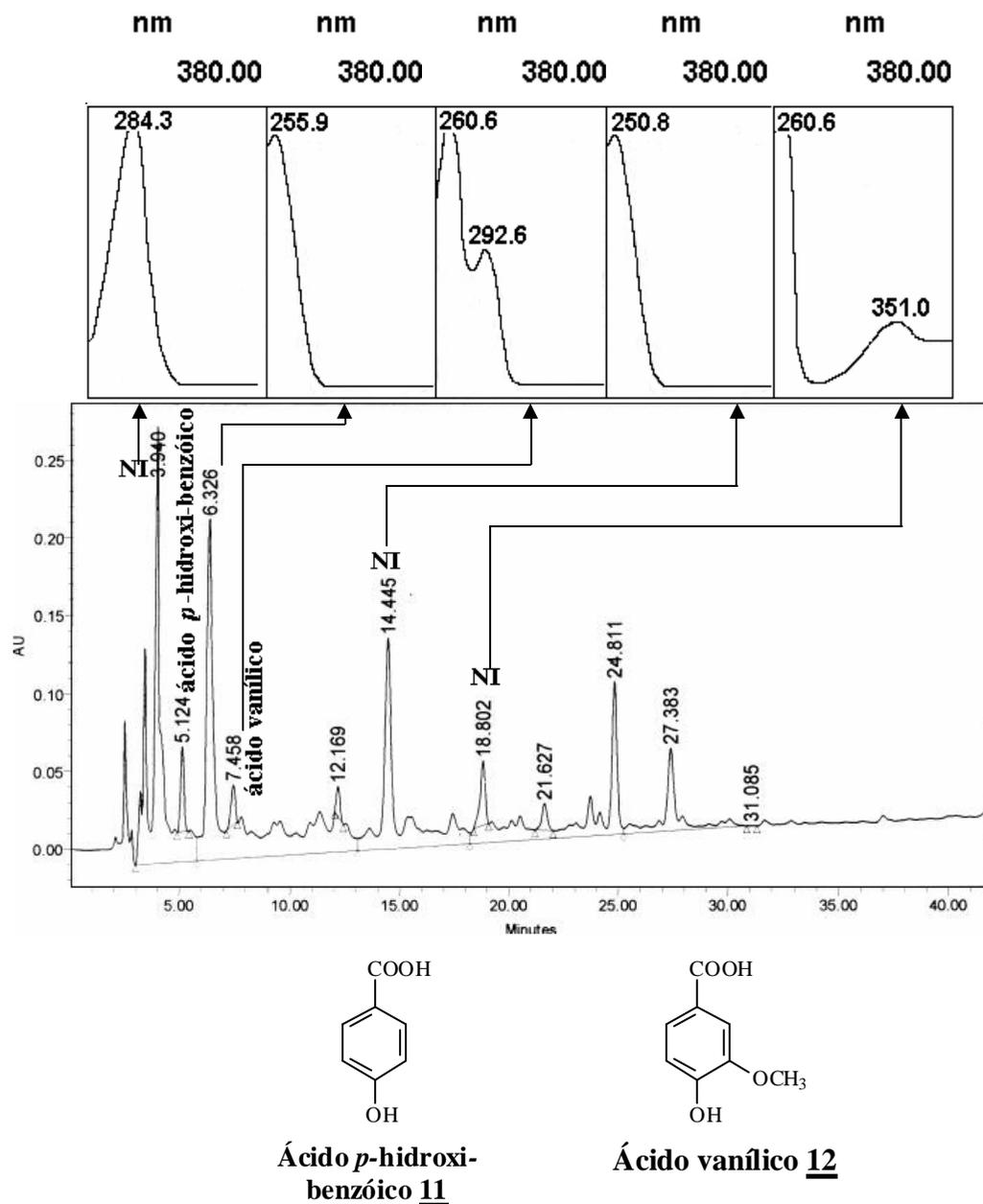
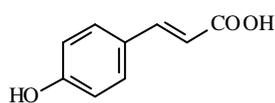
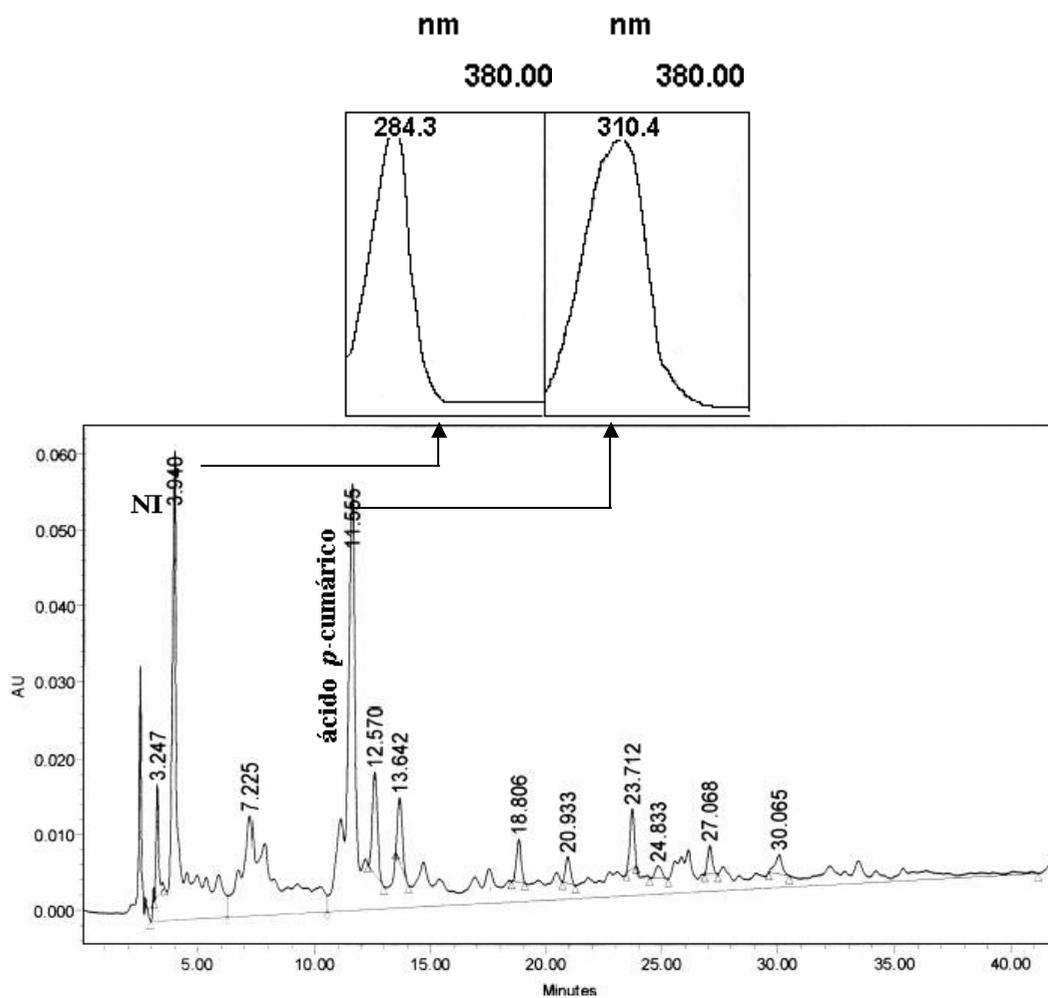


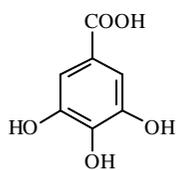
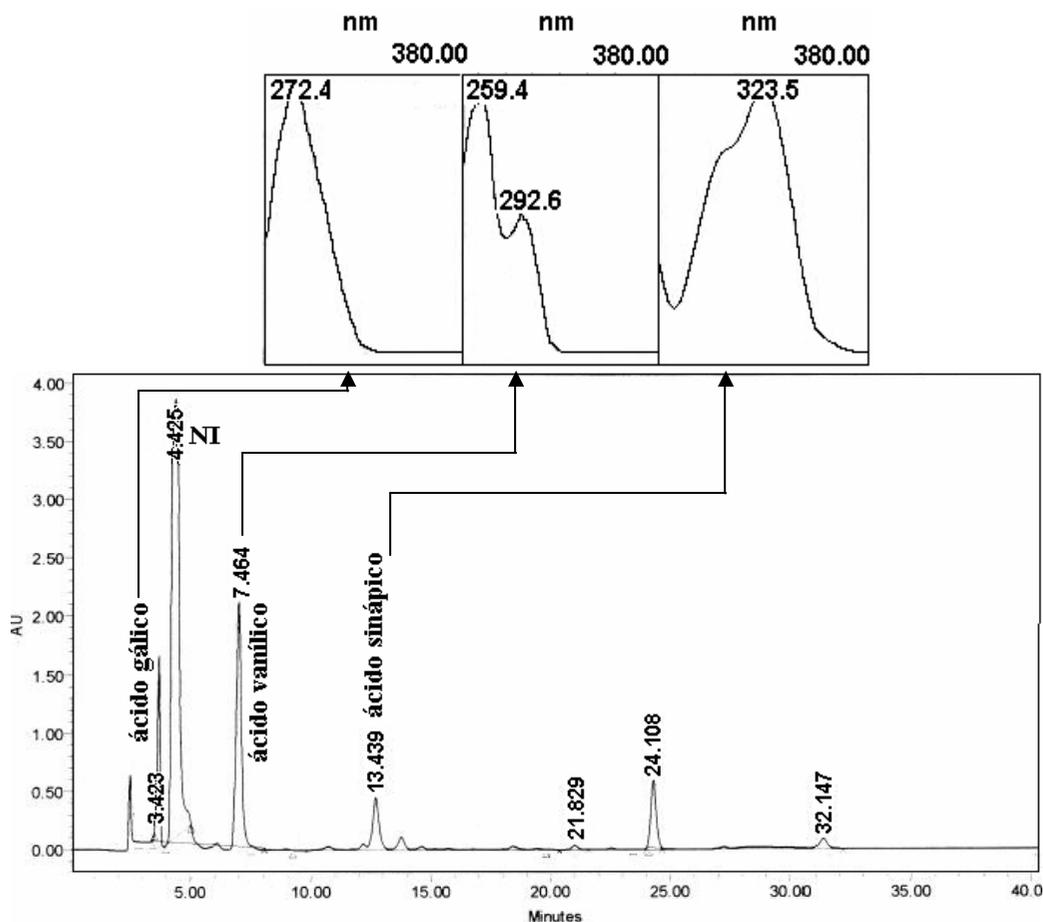
Figura 32: Análise da amostra **RLL03** (extraída com éter) por CLAE a 250 nm, em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5µm), fluxo de 1mL.min⁻¹, fase móvel água: ácido acético (99:1, solvente A) e água: acetonitrila : ácido acético (59:40:1, solvente B). NI (picos não identificados).



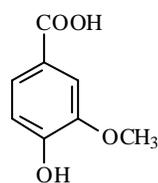
**Ácido
p-cumárico 4**

Figura 33: Análise da amostra **RLL03** (extraída com éter) por CLAE a 320 nm, em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5µm), fluxo de 1mL.min⁻¹, fase móvel água: ácido acético (99:1, solvente A) e água: acetonitrila : ácido acético (59:40:1, solvente B). NI (pico não identificado).

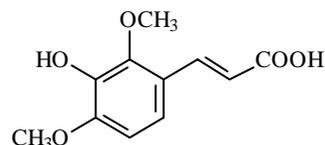
Um outro mel laranjeira que apresentou também o ácido vanílico ($t_R = 7,464$ min) foi o **RLL15**. A análise do perfil cromatográfico deste mel permitiu identificar ainda, o ácido gálico ($t_R = 3,423$ min) e ácido sinápico ($t_R = 13,439$ min), sendo que o ácido vanílico foi o majoritário (área relativa) entre os identificados. Além dessas substâncias observou-se neste cromatograma um pico bastante proeminente ($t_R = 4,425$ min), que poderia estar relacionado ao ácido benzóico (Figura 34). Nessa amostra ainda foram identificados dois flavonóides, um a quercetina ($t_R = 28,128$ min), e o outro um flavonóide glicosilado ($t_R = 13,287$ min), cuja curva de absorção no UV apresentou um efeito hipsocrômico para a banda I em relação à quercetina. A substância com $t_R = 13,287$ min não pode ser identificada apenas por CLAE-DAD, pois a comparação com os tempos de retenção e as curvas de ultravioleta com os padrões utilizados, sugeriram a possibilidade de ser a rutina ou a isoquercetrina (ambos flavonóides glicosilados na mesma posição C-3, diferindo apenas no tipo de açúcar, no primeiro um dissacarídeo e no segundo um monossacarídeo) que apresentaram tempos de retenção e absorções no UV semelhantes (Figuras 19 e 20, p. 77). No entanto, a análise por CCF em gel de sílica com posterior revelação com solução 1% de $AlCl_3$ e visualizada a 366 nm, mostrou diferenças para estas substâncias. O uso de CCF com fase normal permitiu observar o $R_f = 0,22$ para a rutina e o $R_f = 0,48$ para a isoquercetrina (eluente - acetato etila: água: ácido fórmico – 85:15:10). A comparação destes valores, com o R_f da substância presente na amostra **RLL15** permitiu identificar a rutina como o flavonóide de $t_R = 13,287$ min.. O ácido sinápico ($t_R = 13,439$ min) pode ser visualizado em ambos os comprimentos de onda analisados, apesar da sua baixa concentração (área relativa).



Ácido gálico 15

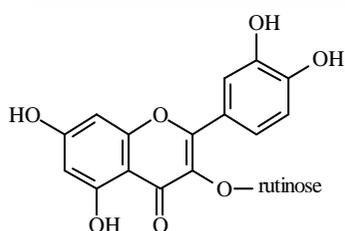
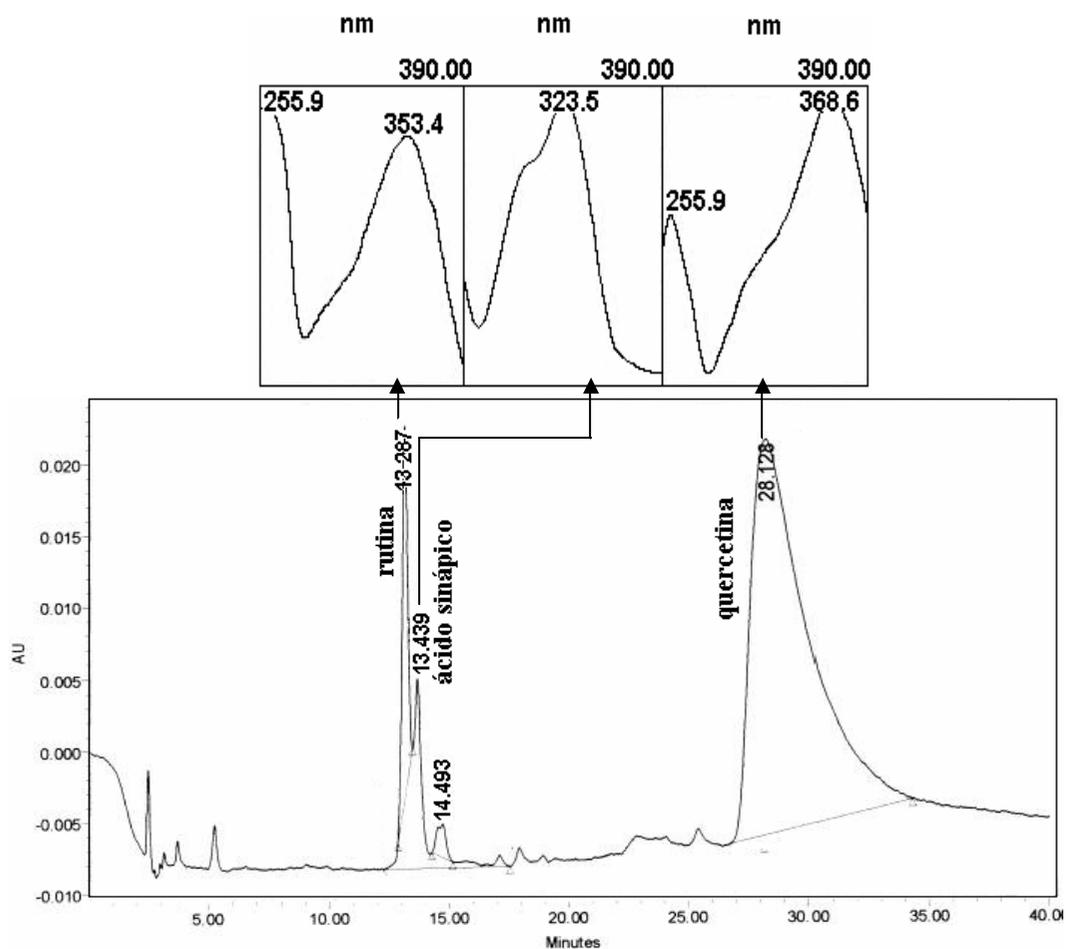


Ácido vanílico 12

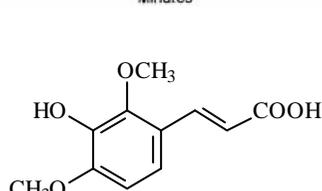


Ácido sinápico 7

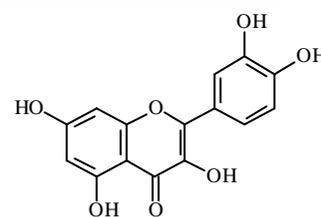
Figura 34: Análise da amostra **RLL15** (extraída com acetato de etila) por CLAE a 270 nm, em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5µm), fluxo de 1mL.min⁻¹, fase móvel água: ácido acético (99:1, solvente A) e água: acetonitrila : ácido acético (59:40:1, solvente B). NI (pico não identificado).



Rutina 22



Ácido sinápico 7



Quercetina 23

Figura 35: Análise da amostra **RLL15** (extraída com acetato de etila) por CLAE a 380 nm, em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5µm), fluxo de 1mL.min⁻¹, fase móvel água: ácido acético (99:1, solvente A) e água: acetonitrila : ácido acético (59:40:1, solvente B).

Pela análise do perfil cromatográfico, o ácido sinápico ($t_R = 13,578$ min) apareceu também, em mais uma amostra de mel laranjeira, o **RLL16**. Além desse ácido, o ácido *p*-cumárico ($t_R = 11,595$ min) que já fora identificado no mel **RLL03** (Figura 33, p. 96), o ácido protocatecuico ($t_R = 4,329$ min), ácido cinâmico ($t_R = 27,675$ min) e ácido 4-metoxi-cinâmico ($t_R = 28,826$ min) foram também identificados. Observou-se, no entanto, que os ácidos cinâmico e 4-metoxi-cinâmico foram às substâncias predominantes (Figura 36).

O ácido cinâmico foi identificado em apenas mais uma amostra de mel, o **RLL19**, dentre todos os méis analisados (tanto laranjeira quanto silvestre).

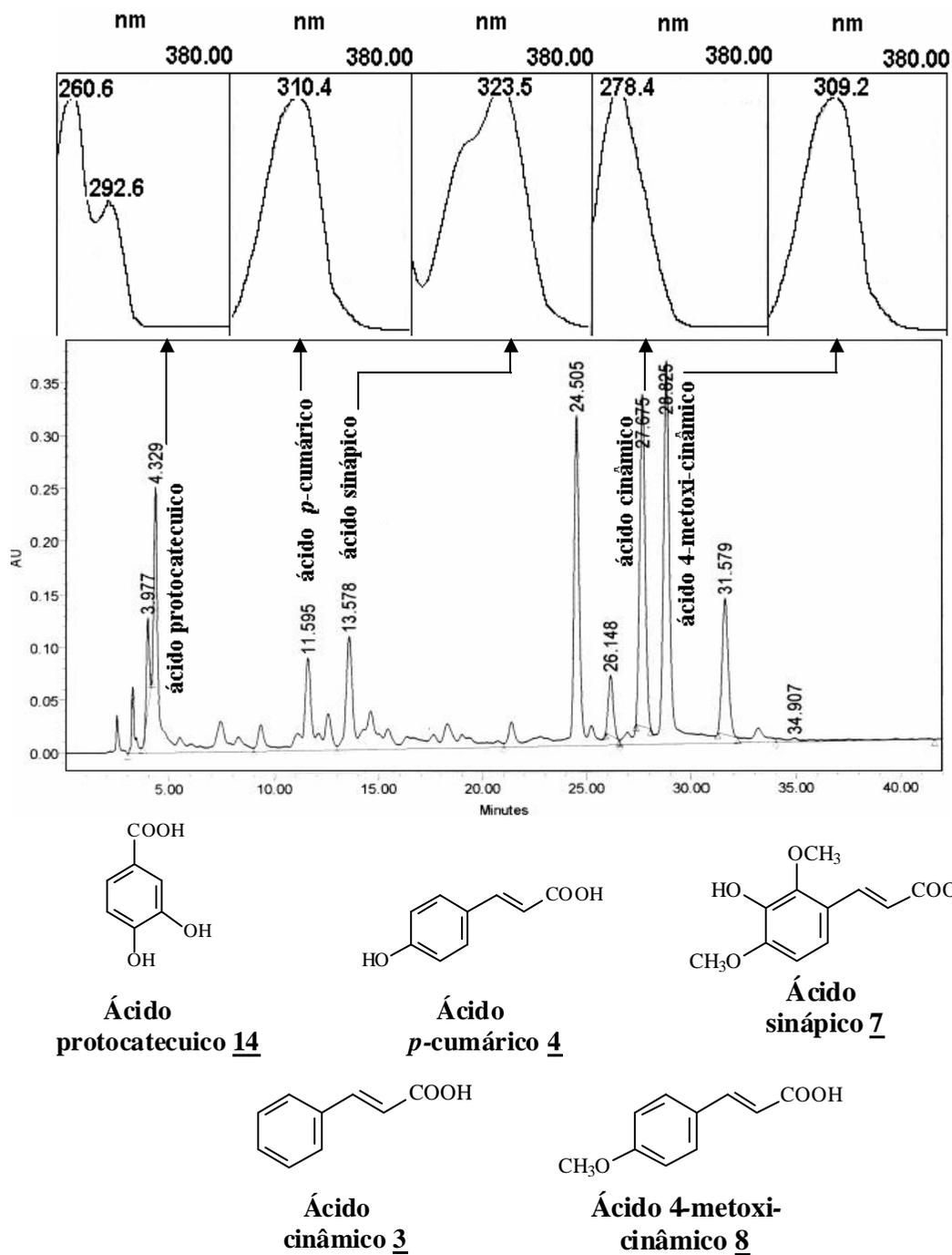


Figura 36: Análise da amostra **RLL16** (extraída com acetato de etila) por CLAE a 270 nm, em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5 μ m), fluxo de 1mL.min⁻¹, fase móvel água: ácido acético (99:1, solvente A) e água: acetonitrila : ácido acético (59:40:1, solvente B).

A análise do cromatograma para o mel laranjeira, amostra **RLL19**, permitiu identificar os ácidos protocatecuico ($t_R = 4,007$ min), ácido siríngico ($t_R = 5,92$ min), *p*-cumárico ($t_R = 11,656$ min), ácido cinâmico ($t_R = 27,526$ min) e 4-metoxi-cinâmico ($t_R = 28,565$ min). Para esta amostra o ácido cinâmico foi o componente majoritário (Figura 37). O perfil cromatográfico deste mel é muito parecido com o mel **RLL16** citado anteriormente (Figura 36, p. 101), variando apenas nas quantidades relativas para cada ácido identificado (áreas relativas dos picos). A substância que diferencia, qualitativamente, este mel do **RLL16** é o ácido siríngico ($t_R = 5,92$ min), que inclusive, apareceu apenas neste mel.

A semelhança dos perfis cromatográficos associados à absorção no ultravioleta para esses dois méis pode estar relacionada, além da origem floral, à origem geográfica, pois ambos os méis são de Botucatu-SP. O que estaria de acordo com a proposta desse trabalho no que diz respeito à identificação de marcadores químicos para os méis brasileiros.

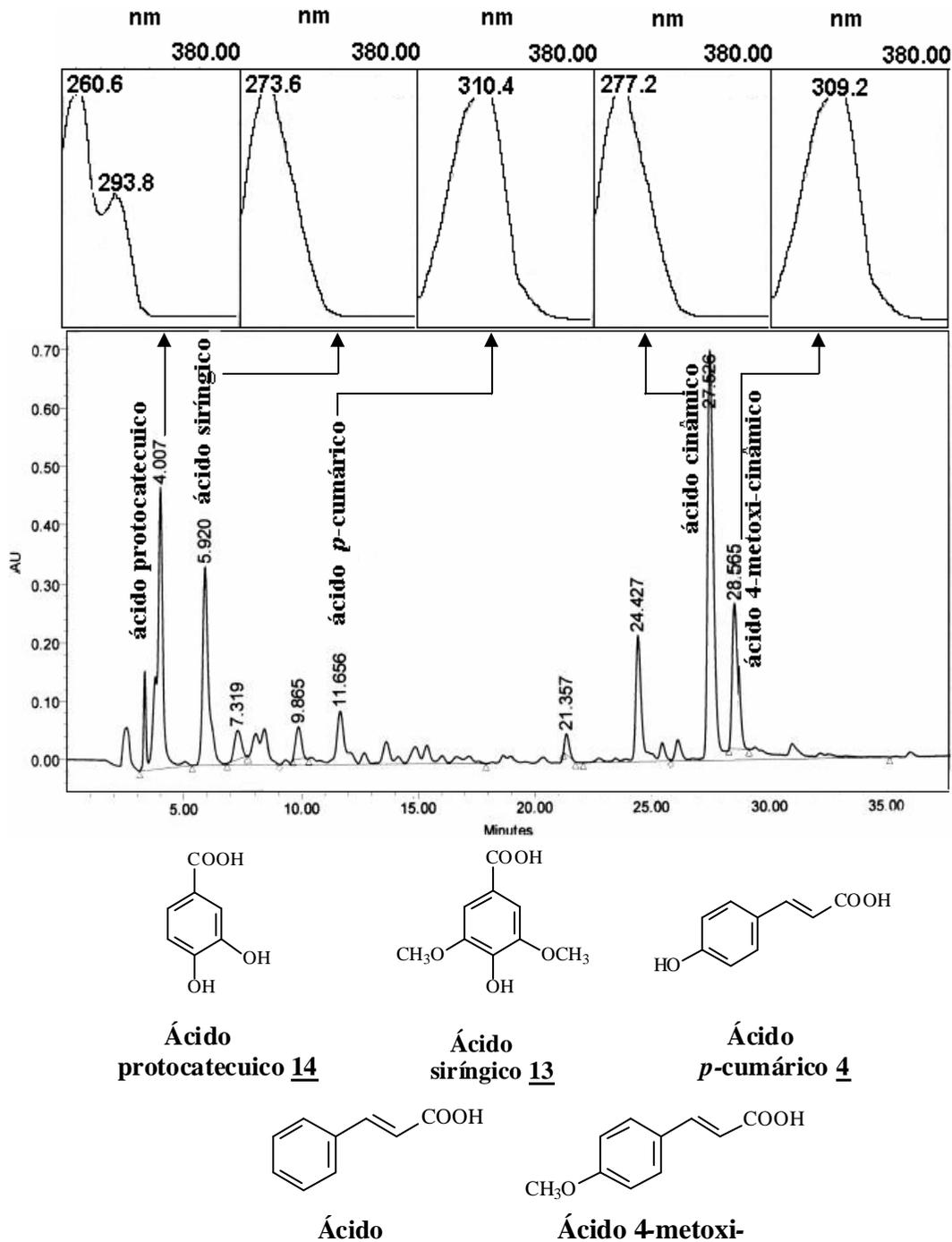


Figura 37: Análise da amostra **ácido 9** (extraída com **ácido 8**) por CLAE a 270 nm, em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5µm), fluxo de 1mL.min⁻¹, fase móvel água: ácido acético (99:1, solvente A) e água: acetonitrila : ácido acético (59:40:1, solvente B).

O mel **RLL18** apresentou um perfil cromatográfico pobre para substâncias fenólicas (Figura 38). A análise do cromatograma permitiu identificar apenas o ácido protocatecuico ($t_R= 4,439$ min) nessa amostra. Porém, uma outra substância ($t_R= 25,763$ min) presente em maior proporção, não pode ser identificada. No entanto, a sua curva de absorção no ultravioleta ($\lambda_{max}=308,0$ nm) sugeriu a possibilidade de ser um derivado de ácido cinâmico.

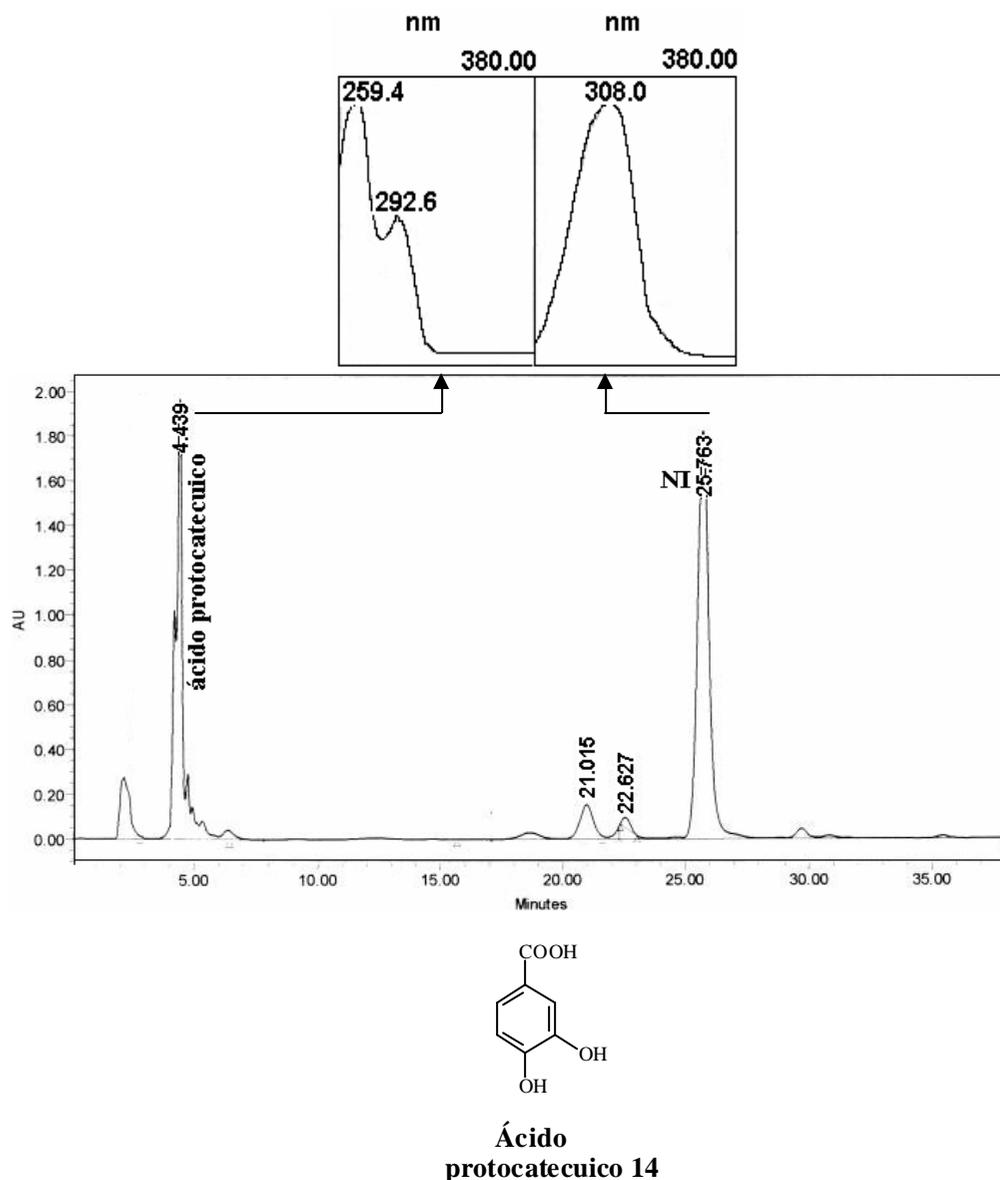


Figura 38: Análise da amostra **RLL18** (extraída com éter) por CLAE a 270 nm, em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5 μ m), fluxo de 1mL.min⁻¹, fase móvel água: ácido acético (99:1, solvente A) e água: acetonitrila : ácido acético (59:40:1, solvente B). NI (pico não identificado).

Assim como no mel **RLL18** (Itararé-SP), a análise do perfil cromatográfico para a amostra do mel laranja **RLL20** (Taubaté-SP), mostrou também ser muito pobre em substâncias fenólicas. Para este mel, apenas o ácido protocatecuico ($t_R= 4,181$ min) e o ácido *p*-cumárico ($t_R= 11,565$ min) foram identificados, porém em baixas proporções (Figura 39). Além dessas substâncias, foi observado neste cromatograma, dois picos majoritários ($t_R= 21,445$ min e $24,623$ min), cuja curva de absorção no UV também indicou a possibilidade de estruturas relacionadas ao ácido benzóico.

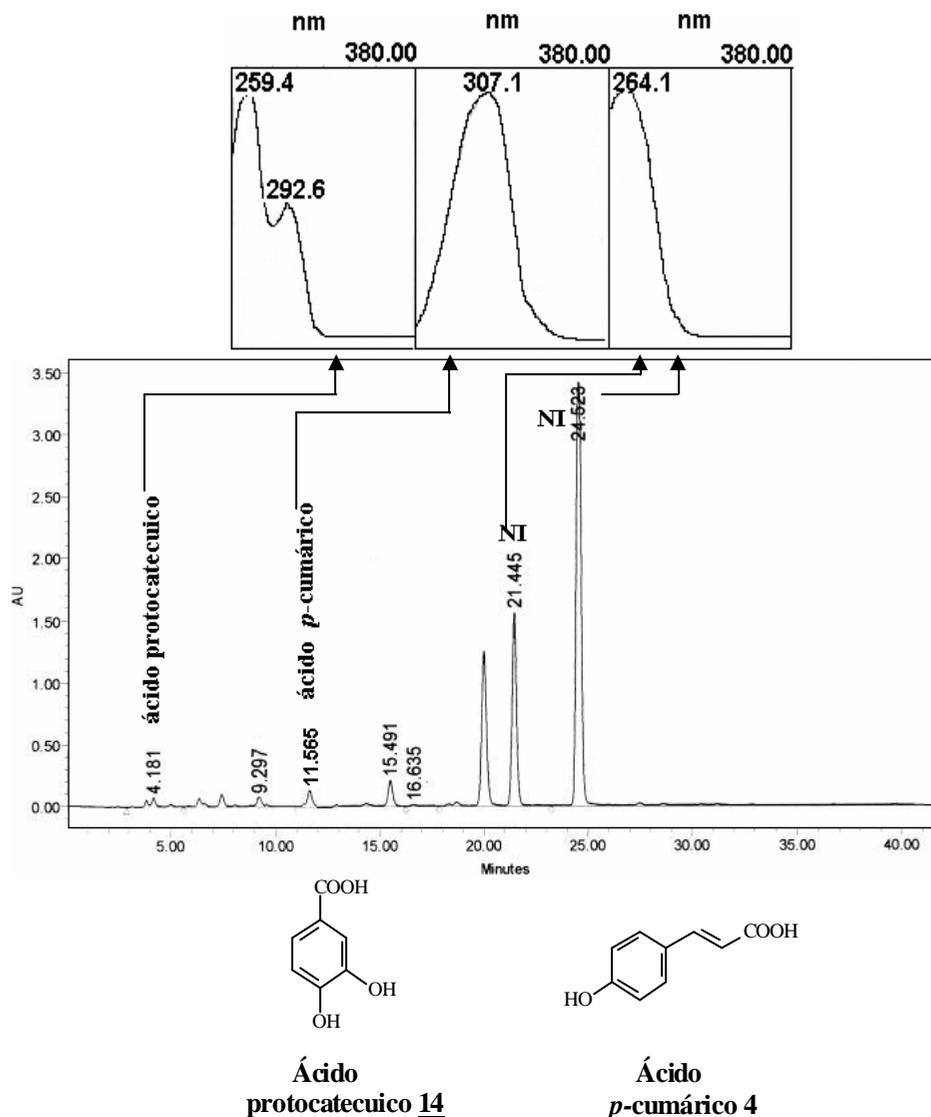


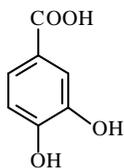
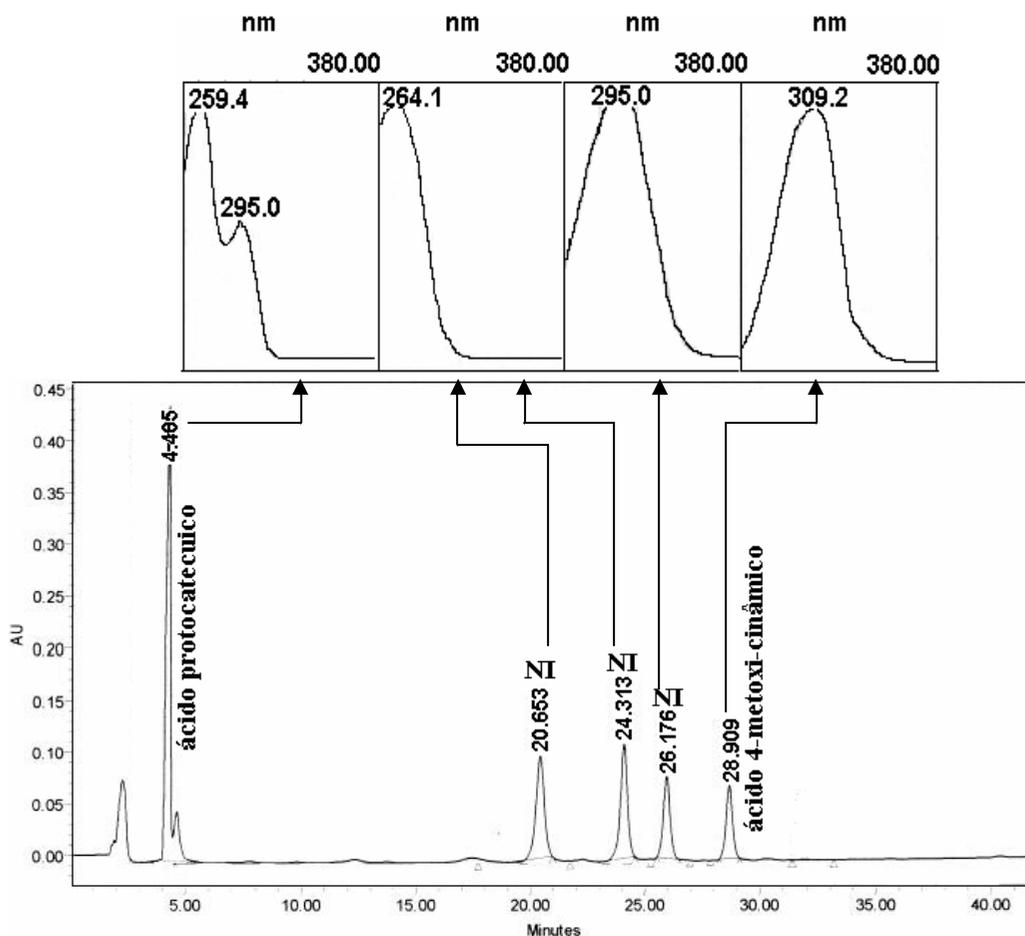
Figura 39: Análise da amostra **RLL20** (extraída com acetato de etila) por CLAE a 270 nm, em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5 μ m), fluxo de 1mL.min⁻¹, fase móvel água: ácido acético (99:1, solvente A) e água: acetonitrila : ácido acético (59:40:1, solvente B). NI (picos não identificados).

As análises dos cromatogramas para os seis méis laranjeira estudados permitiram observar que a quantidade relativa para cada ácido identificado variou dentro das amostras quando comparado em área relativa. Para esses méis laranjeiras estudados, foram observados que os ácidos protocatecuico (amostras **RLL16**, **RLL18**, **RLL19** e **RLL20**; Figuras 36-39, p. 101, 103, 104 e 105) e *p*-cumárico (amostras **RLL03**, **RLL16**, **RLL19** e **RLL20**; Figuras 33, 36, 37 e 39; p. 96, 101, 103 e 105) foram àqueles encontrados com maior freqüência nas amostras de méis laranjeiras, porém o ácido protocatecuico o majoritário em três delas (**RLL16**, **RLL18** e **RLL19**).

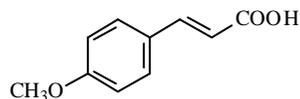
Com relação ao perfil cromatográfico para o mel silvestre, também foram seis as amostras analisadas (**RLS02**, **RLS05**, **RLS06**, **RLS10**, **RLS12A** e **RLL12B**).

A análise do cromatograma para a amostra **RLS12B** (extração com éter etílico) permitiu identificar a presença dos ácidos protocatecuico ($t_R = 4,405$ min) e 4-metoxi cinâmico ($t_R = 28,909$ min; Figura 40). Uma observação interessante foi que, para os méis laranjeiras, o ácido protocatecuico foi identificado nas frações extraídas com acetato de etila para as amostras **RLL16**, **RLL19** e **RLL20** e com éter para a amostra **RLL18**. No mel silvestre **RLS12** o ácido protocatecuico foi extraído somente com éter, não aparecendo nos cromatogramas das frações extraídas com acetato de etila (Figura 41). Para a amostra **RLS12A** (extração com acetato de etila) foi identificado, além do ácido 4-metoxi-cinâmico ($t_R = 28,909$ min), o ácido *p*-cumárico ($t_R = 11,444$ min), como componente majoritário identificado a $\lambda_{max} = 330$ nm (Figura 41).

Esse mel, o **RLS12**, foi o único que apresentou três picos não identificados ($t_R = 20,663$; $24,313$ e $26,176$ min) na fração extraída com éter, e cujas curvas de absorção no ultravioleta ($\lambda_{max} = 264,1$ e $295,0$ nm) sugeriram estruturas relacionadas aos derivados de ácido benzóico e cinâmico, respectivamente (Figura 40). Para a amostra extraída com acetato de etila, **RLS12A**, apenas o pico com $t_R = 24,693$ min, que também não foi identificado, foi sugerido ter sua estrutura relacionada ao ácido benzóico, em virtude de sua absorção no ultravioleta ter máximo a $\lambda_{max} = 264,1$ nm (Figura 41).



**Ácido
protocatecuico 14**



**Ácido 4-metoxi-
cinâmico 8**

Figura 40: Análise da amostra **RLS12** (extraída com éter) por CLAE a 280 nm, em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5µm), fluxo de 1mL.min⁻¹, fase móvel água: ácido acético (99:1, solvente A) e água: acetonitrila : ácido acético (59:40:1, solvente B). NI picos não identificados.

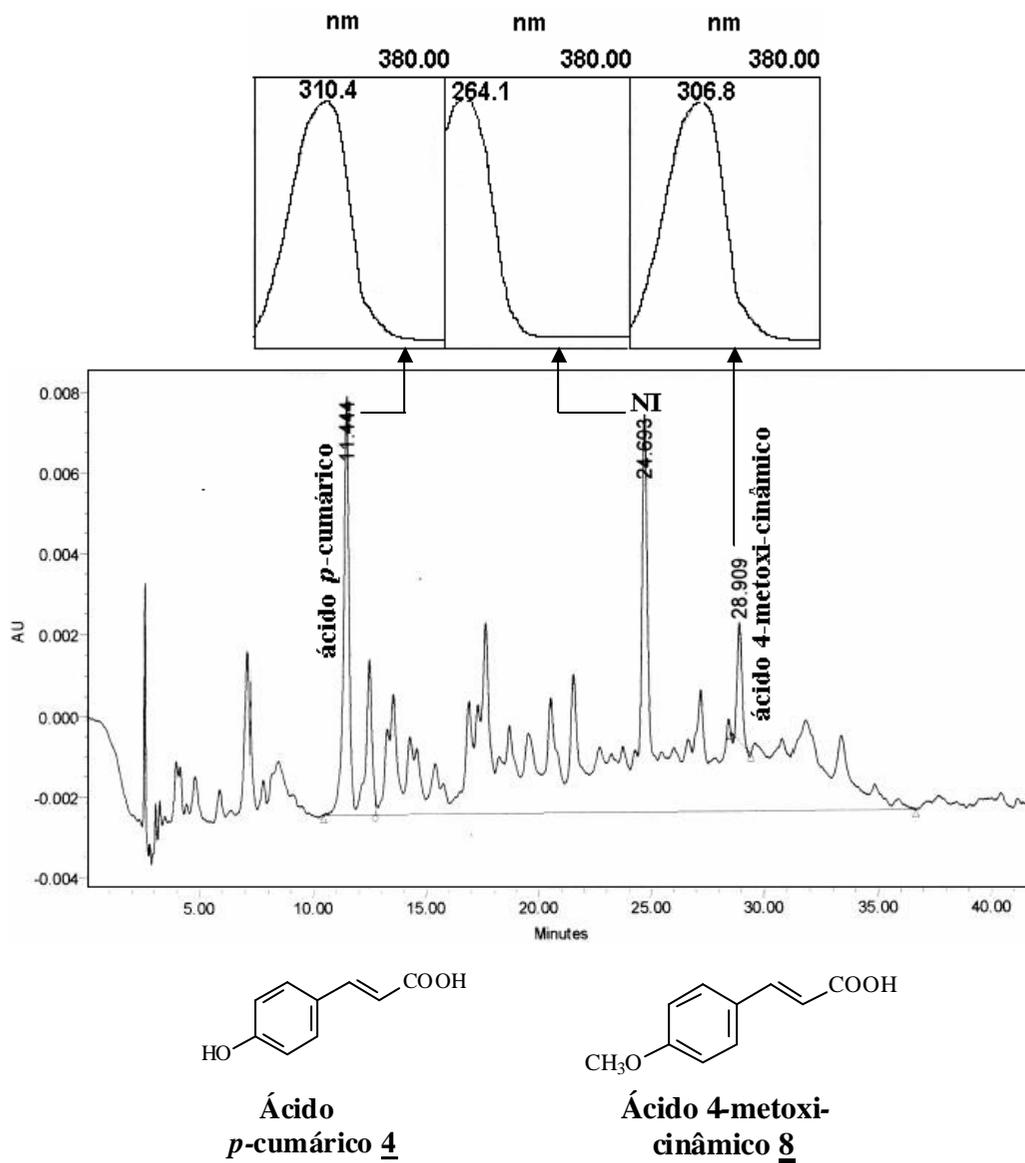


Figura 41: Análise da amostra **RLS12** (extraída com acetato de etila) por CLAE a 330 nm, em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5 μ m), fluxo de 1mL.min⁻¹, fase móvel água: ácido acético (99:1, solvente A) e água: acetonitrila : ácido acético (59:40:1, solvente B). NI (pico não identificado).

A análise do perfil cromatográfico para o mel **RLS10** também permitiu identificar o ácido 4-metoxi-cinâmico ($t_R = 28,223$ min), nesta fração etérea, como pico majoritário (Figura 42). Este mel foi o único silvestre que apresentou o ácido vanílico ($t_R = 7,229$ min; Figura 42) e o ácido sinápico ($t_R = 13,611$ min; Figura 43, p. 111) que já foram identificados anteriormente nos méis laranjeiras (**RLL03** e **RLL15**; e **RLL15** e **RLL16**, respectivamente; Figuras 32, 34 e 36; p. 95, 98 e 101). Além dessas substâncias, os ácidos gálico ($t_R = 3,331$ min) e *p*-hidroxi-benzóico ($t_R = 6,177$ min) também foram identificados (Figura 42).

Na extração feita com acetato de etila observou-se a presença de um pico ($t_R = 8,17$ min) majoritário, não identificado, que só aparece nessa amostra e nessas condições (Figura 43, p. 111). Nesse mesmo cromatograma observou-se a presença de um outro pico não identificado ($t_R = 22,292$ min) que pode ser derivado de ácido cinâmico, de acordo com a respectiva curva de absorção no UV ($\lambda_{max} = 321,1$ nm).

Uma observação interessante quanto à fração etérea desta amostra **RLS10**, monitorada a 360 nm no detector de arranjo de fotodiodo, foi quanto à presença de um pico ($t_R = 24,784$ mi) com absorção no UV a $\lambda_{max} = 252,3$ e 353,4 nm (duas bandas de absorção -banda I e banda II) característico de flavonóide (Figura 44, p. 112). A comparação do tempo de retenção associada ao espectro de absorção no ultravioleta, com o padrão (Figura 23, p. 79) permitiu identificar esta substância como a morina.

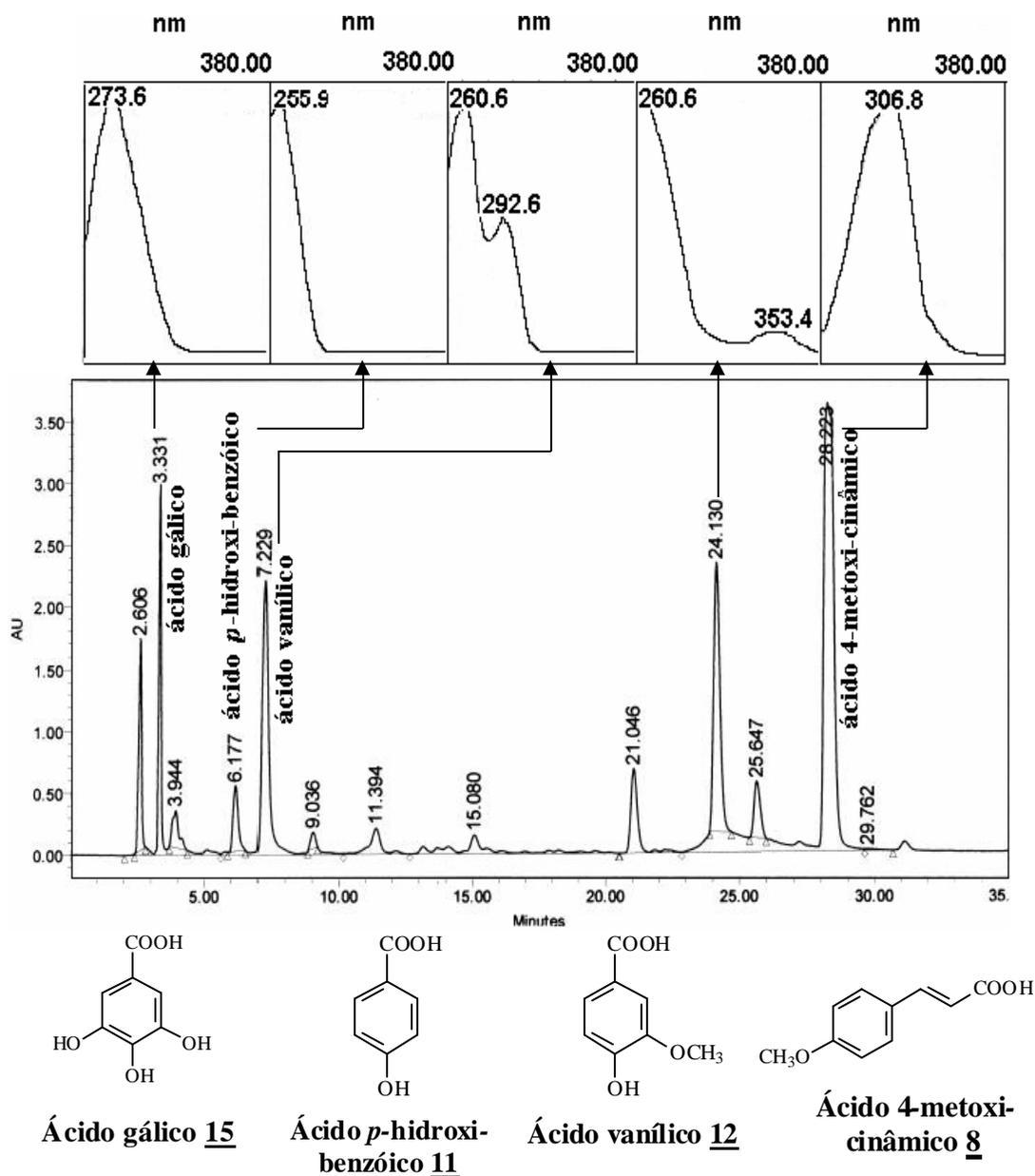


Figura 42: Análise da amostra **RLS10** (extraída com éter) por CLAE a 270 nm, em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5µm), fluxo de 1mL.min⁻¹, fase móvel água: ácido acético (99:1, solvente A) e água: acetonitrila : ácido acético (59:40:1, solvente B).

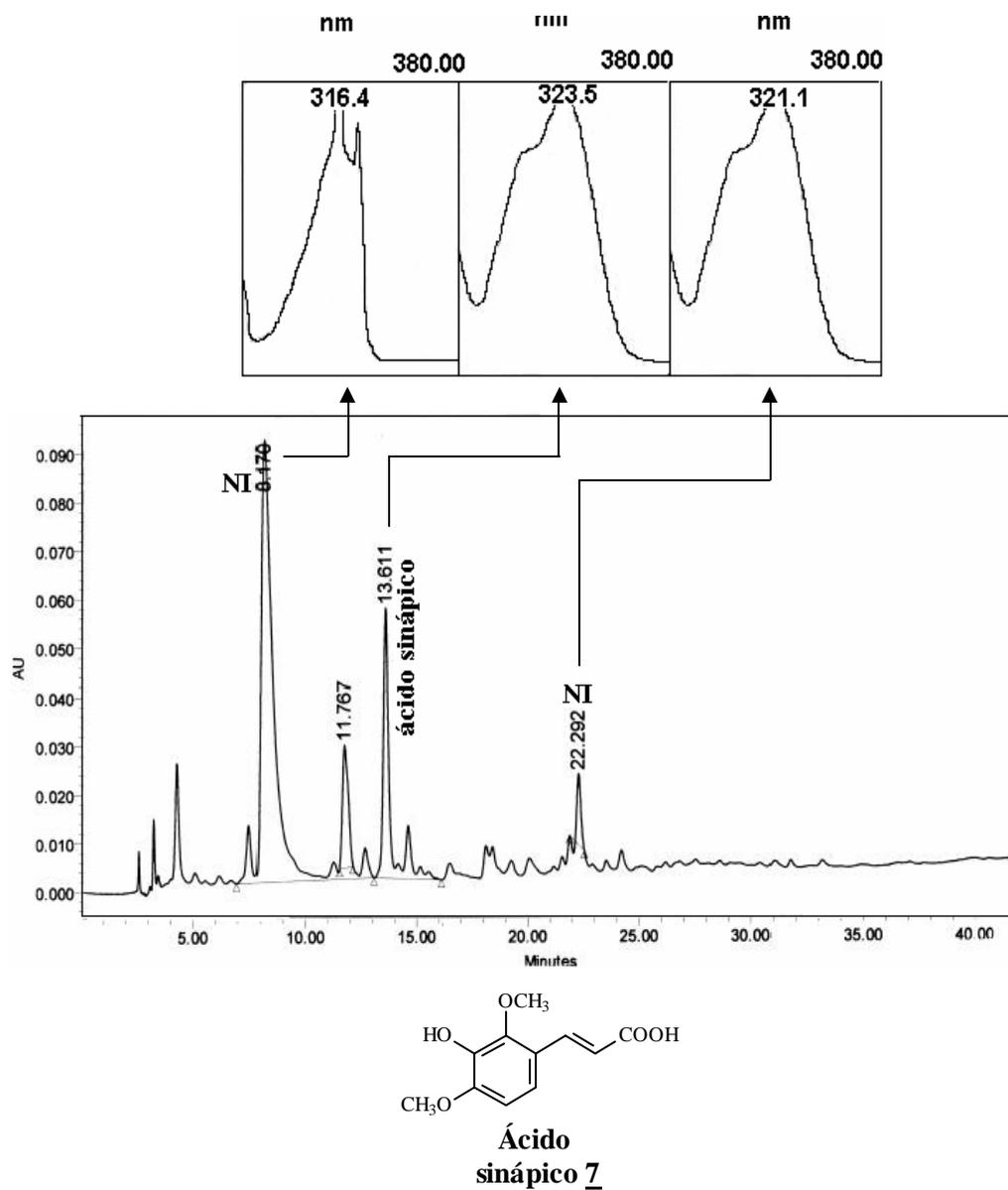
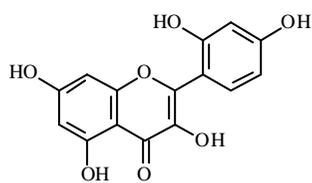
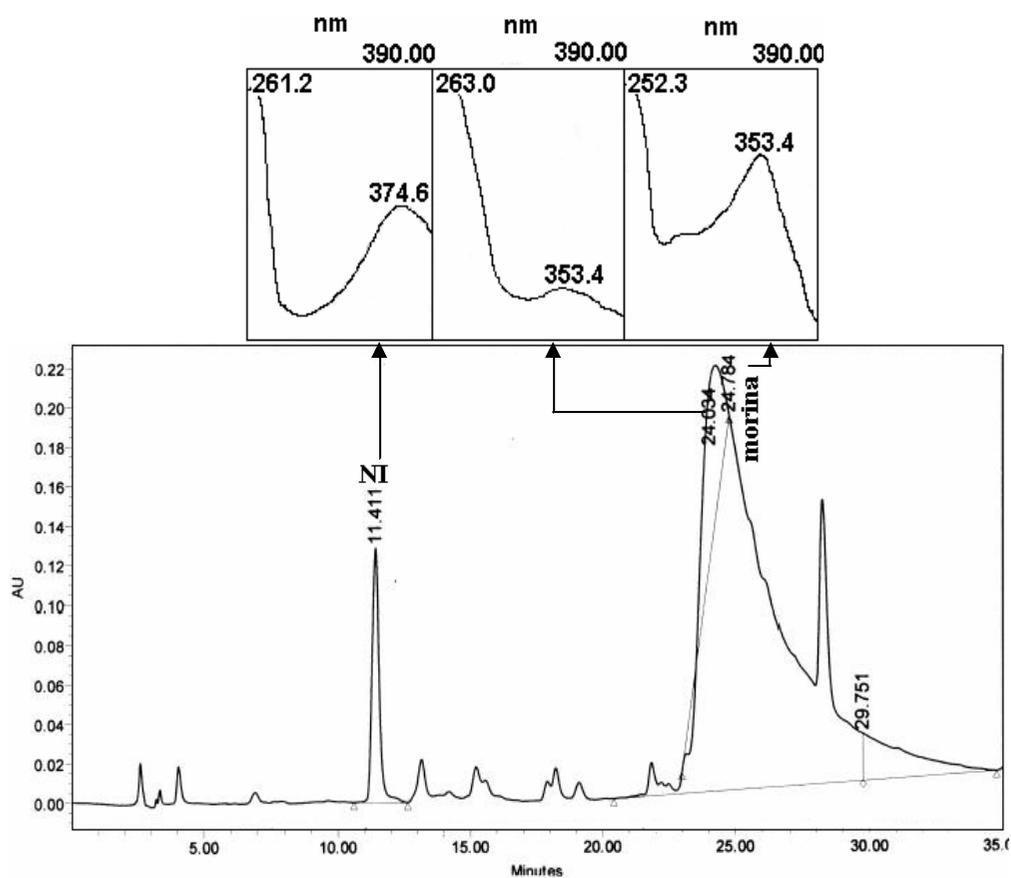


Figura 43: Análise da amostra **RLS10** (extraída com acetato de etila) por CLAE a 330 nm, em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5µm), fluxo de 1mL.min⁻¹, fase móvel água: ácido acético (99:1, solvente A) e água: acetonitrila : ácido acético (59:40:1, solvente B). NI picos não identificados.

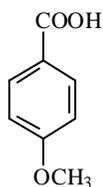
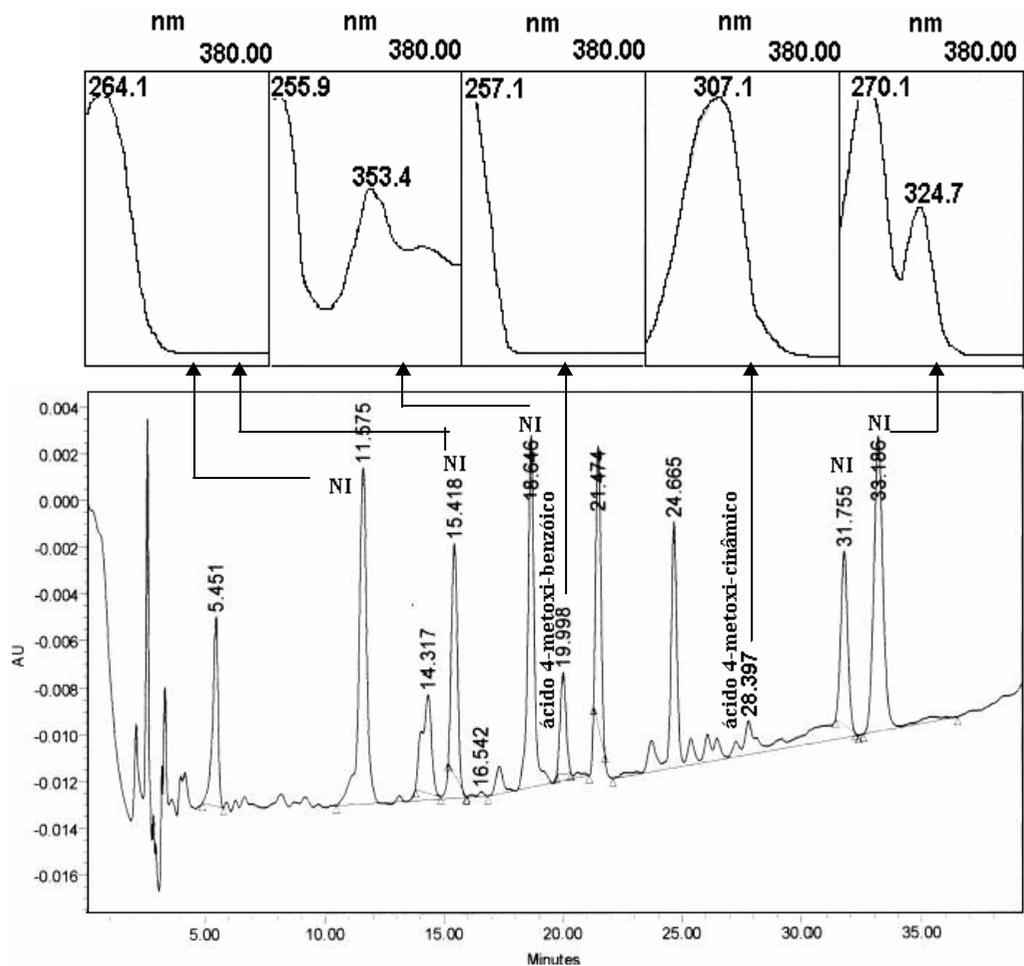


Morina 21

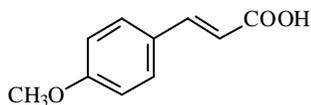
Figura 44: Análise da amostra **RLS10** (extraída com éter) por CLAE a 360 nm, em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5µm), fluxo de 1mL.min⁻¹, fase móvel água: ácido acético (99:1, solvente A) e água: acetonitrila : ácido acético (59:40:1, solvente B). NI pico não identificado.

No mel **RLS02** também foi identificado o ácido 4-metoxi-cinâmico ($t_R = 28,397$ min), porém em menor proporção (Figura 45) quando comparado aos casos anteriores (**RLL16**, Figura 36, p. 101; **RLL19**, Figura 37, p. 103; **RLS10**, Figura 42, p. 110; **RLS12**, Figuras 40 e 41, p. 107 e 108).

Dentre os méis estudados, o **RLS02** foi o único onde se identificou o ácido 4-metoxi-benzóico ($t_R = 19,998$ min; Figura 45), como sendo o componente majoritário daqueles que foram identificados. Embora esta amostra tenha apresentado um perfil bastante rico, a maioria das substâncias presentes não pode ser identificada, mesmo sendo as majoritárias no cromatograma, pois não coincidiram com nenhum dos padrões estudados. O pico ($t_R = 16,646$ min) que teve máximos de absorção no UV a $\lambda_{max} = 255,9$ e $354,3$, poderia sugerir a presença de flavonóides, enquanto os picos ($t_R = 11,575$ e $15,418$ min) poderiam sugerir a presença de derivados de ácido benzóico (Figura 45).



Ácido 4-metoxi-benzóico 20



Ácido 4-metoxi-cinâmico 8

Figura 45: Análise da amostra **RLS02** (extraída com éter) por CLAE a 270 nm, em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5µm), fluxo de 1mL.min⁻¹, fase móvel água: ácido acético (99:1, solvente A) e água: acetonitrila : ácido acético (59:40:1, solvente B). NI (picos não identificados).

No mel **RLS05** foi identificado apenas o ácido *p*-hidroxi-benzóico ($t_R = 6,081$ min), porém não sendo a substância majoritária (Figura 46). Outros cinco picos que apareceram, mas não foram identificados, apresentaram suas curvas de absorção no UV que sugeriram a possibilidade de estarem relacionados às estruturas do ácido benzóico ($t_R = 14,188$ min, $\lambda_{max} = 250,8$ nm; $t_R = 18,399$ min, $\lambda_{max} = 250,8$ nm; $t_R = 21,34$ min, $\lambda_{max} = 261,8$ nm; $t_R = 24,528$ min, $\lambda_{max} = 263,0$ nm; e $t_R = 27,124$ min, $\lambda_{max} = 249,9$ nm).

Semelhança ocorreu para a análise do cromatograma do mel **RLS06**, em que diversos picos, porém minoritários, também não foram identificados (Figura 47, p. 117) e suas curvas de absorção no UV também sugeriram a presença de substâncias estruturalmente relacionadas aos derivados do ácido benzóico ($t_R = 4,681$ min, $\lambda_{max} = 250,3$ nm; $t_R = 12,006$ min, $\lambda_{max} = 261,4$ nm; $t_R = 18,155$ min, $\lambda_{max} = 265,3$ nm). Como pode ser observado pela análise do perfil cromatográfico, este mel apresentou-se pobre com relação à presença de fenólicos, e o único pico majoritário identificado, foi o ácido gálico ($t_R = 3,004$ min).

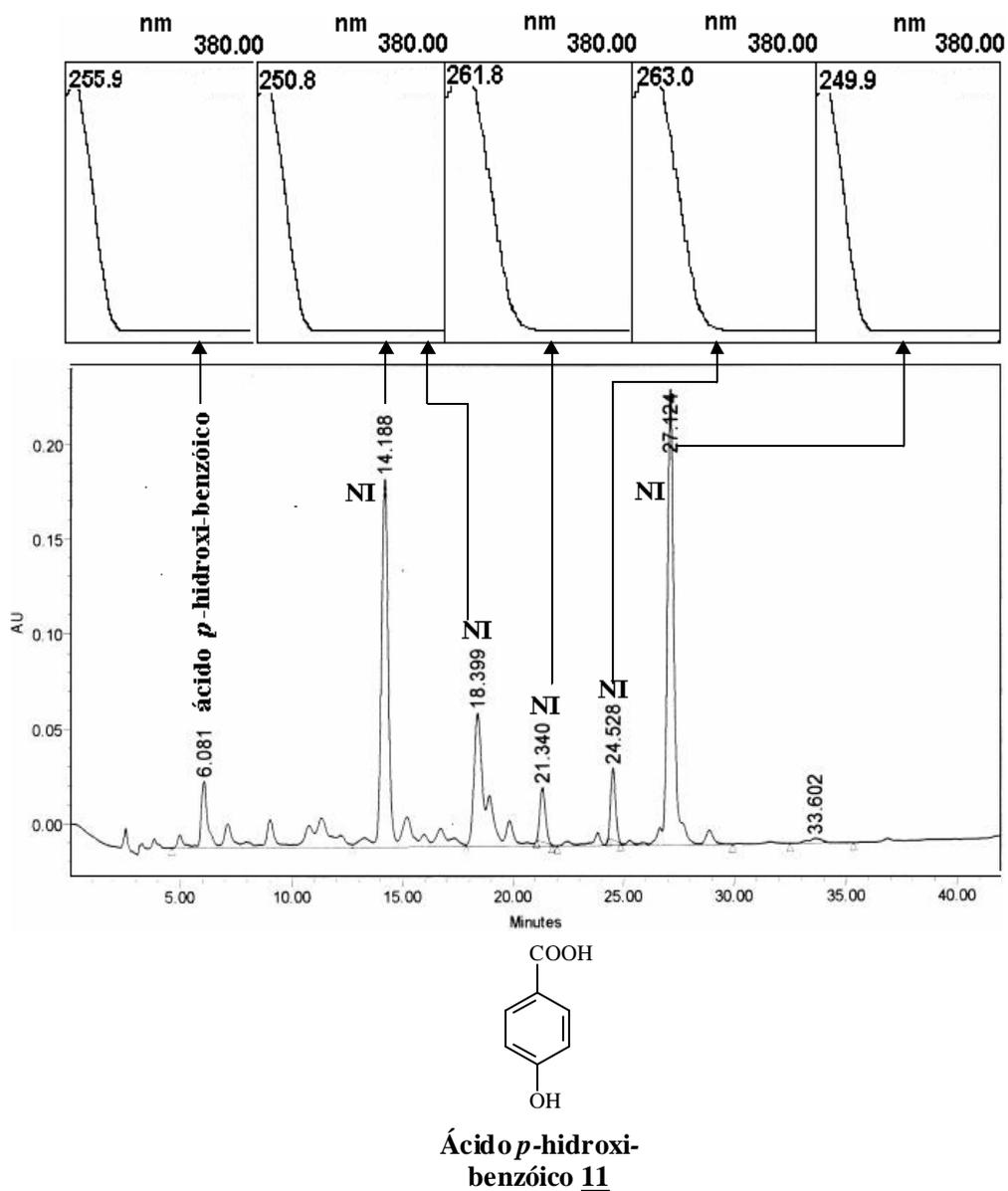
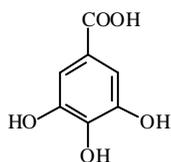
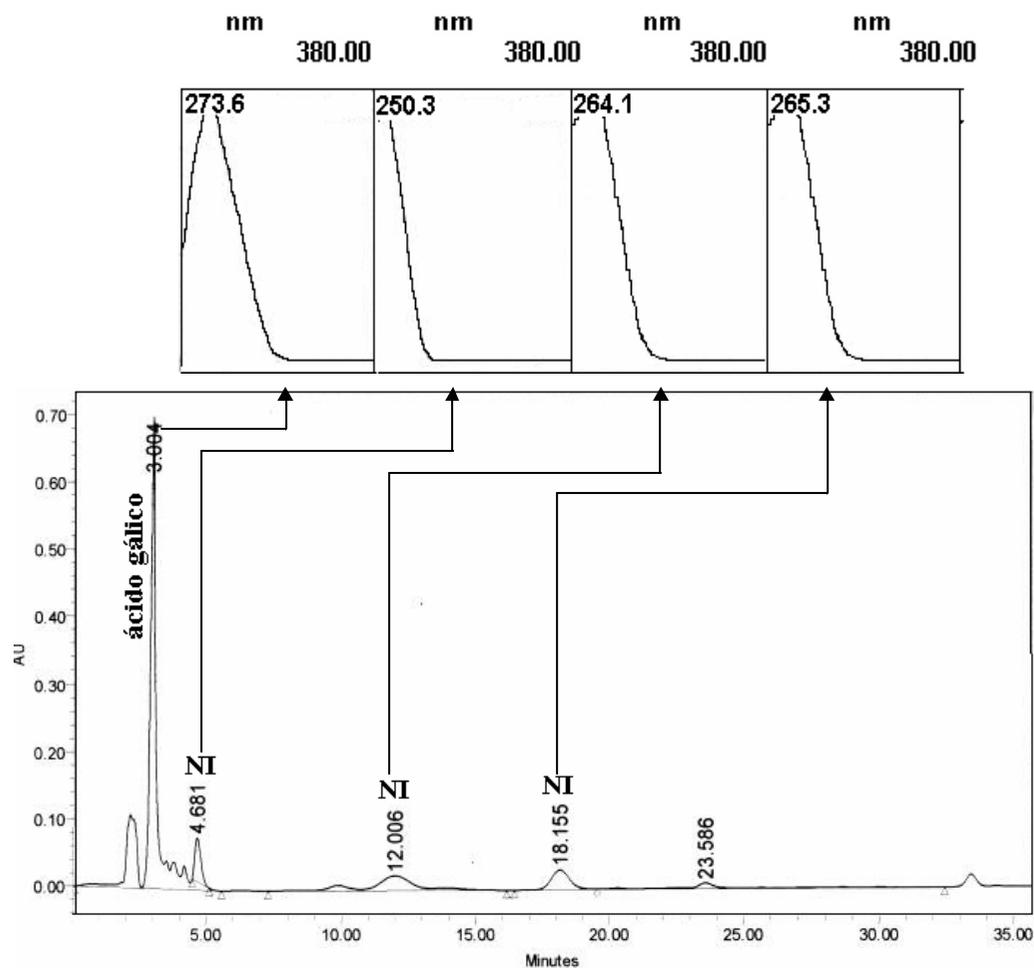


Figura 46: Análise da amostra **RLS05** (extraída com éter) por CLAE a 270 nm, em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5µm), fluxo de 1mL.min⁻¹, fase móvel água: ácido acético (99:1, solvente A) e água: acetonitrila : ácido acético (59:40:1, solvente B). NI (picos não identificados).



Ácido gálico 15

Figura 47: Análise da amostra **RLS06** (extraída com éter) por CLAE a 270 nm, em coluna analítica C-18 (25cm x 4,6mm x 5µm), fluxo de 1mL.min⁻¹, fase móvel água: ácido acético (99:1, solvente A) e água: acetonitrila : ácido acético (59:40:1, solvente B). NI (picos não identificados).

As análises efetuadas para os méis silvestres não permitiram identificar nenhuma substância fenólica que pudesse servir como marcador químico, seja para identificação da origem botânica ou geográfica, em virtude da falta de semelhança entre seus perfis cromatográficos (Tabela 11, p. 120). Porém um fato interessante foi observado para os méis **RLS10** e **RLS12**, que apresentaram algumas semelhanças com os méis laranjeiras. Estes foram os únicos méis silvestres que apresentaram os ácidos protocatecuico e *p*-cumárico (**RLS12**) e ácidos vanílico e sinápico (**RLS10**; Tabela 11, p. 120). Também foram os únicos méis silvestres que apresentaram flavonóides (morina no **RLS10**, confirmada por CLAE; morina e quercetina no **RLS12**, indicadas pelos seus R_f por CCF apenas).

Neste trabalho não foram feitos o isolamento ou a quantificação das substâncias presentes, porém para algumas amostras observou-se claramente a presença de picos majoritários (área relativa), e que muitas das vezes não foi identificado com nenhum dos padrões (por exemplo: o **RLS05**, $t_R= 27,124$ min, 249,9 nm, Figura 46, p. 116; o **RLS10**, $t_R= 8,17$ min, 316,4 nm, Figura 43, p. 111; o **RLL18**, $t_R= 25,763$ min, 308,0 nm, Figura 38, p. 104).

Uma outra característica observada em algumas das amostras estudadas (tanto de laranjeira quanto silvestre) foi o aparecimento de picos com tempo de retenção a 21,5 min (com exceção das amostras **RLS06**, **RLL15** e **RLL16**) e 24,5 minutos (com exceção das amostras **RLS06**, **RLS10** e **RLL18**). Nessas amostras, ambas substâncias não foram identificadas com nenhum dos padrões, porém apresentaram bandas com máximos de absorção no UV em aproximadamente $\lambda_{max}= 260-264$ nm, sugerindo a possibilidade de serem derivados do ácido benzóico.

O isolamento das substâncias não identificadas seja por técnicas analíticas tradicionais ou CLAE semipreparativa, será necessário em trabalhos futuros para confirmar se estas substâncias também poderão servir como potentes marcadores para os méis monoflorais ou até mesmo heteroflorais.

Apesar de outras análises por CLAE serem necessárias para confirmar a presença dos flavonóides nas amostras **RLS12**, **RLL16**, **RLL19** e **RLL20**, um fator fica em evidência: os únicos méis silvestres que apresentaram ácidos fenólicos coincidentes com os das amostras de méis laranjeiras foram os **RLS10** (Paraty-RJ) e **RLS12** (Itararé-SP); e estes

mesmos foram também os méis silvestres que apresentaram flavonóides, bem como os laranjeiras **RLL15**, **RLL16**, **RLL19** e **RLL20**. De acordo com os resultados fornecidos pelas análises de CCF, dentre esses apenas o mel **RLL15** não apresentou morina (Tabela 11, p. 120).

A amostra **RLS10** que indicou a presença de morina por CLAE-DAD foi obtida da cidade de Paraty, no sul do estado do Rio de Janeiro, e o apiário fica localizado na Mata Atlântica, enquanto a amostra **RLS12B** (extração com éter) que teve também a indicação da presença de morina apenas por CCF ($R_f = 0,44$), foi oriunda de Itararé, no sul do estado de São Paulo, e também teve como flora principal a Mata Atlântica.

A amostra **RLL16** que também apresentou a morina por CCF foi obtida de Botucatu-SP, sendo o apiário localizado próximo a Mata Atlântica (informação do apicultor). Já os méis **RLL19** e **RLL20**, oriundos de Botucatu-SP e Taubaté-SP, respectivamente, foram comprados no comércio local e não continham a localização do apiário, porém ambos os méis apresentaram morina por CCF. Esses dados foram avaliados na tentativa de se buscar uma correlação entre a origem geográfica desses méis utilizando a morina como um possível marcador químico. Quanto à origem botânica, por serem os méis estudados de diferentes origens (silvestre e laranjeira), seria necessária uma análise do perfil polínico para se identificar a predominância da flora visitada pela abelha, e dessa forma avaliar se a morina poderia ser considerado um marcador químico.

O flavonóide quercetina foi identificado no mel **RLL15** por CLAE-DAD e nos outros méis laranjeiras (**RLL16**, **RLL19** e **RLL20**) e silvestre (**RLS12**) apenas pela análise por CCF e comparação do fator de retenção com a do padrão ($R_f = 0,52$ para quercetina).

Abaixo está apresentada a Tabela 11 que relaciona as principais substâncias fenólicas identificadas nos méis silvestres e laranjeiras estudados nesse trabalho.

Diversas observações puderam ser feitas a partir das análises dos perfis cromatográficos dos méis, principalmente, do ponto de vista qualitativo, onde ocorreu uma variação das substâncias fenólicas encontradas. Para os méis silvestres foram encontrados os ácidos protocatecuico, vanílico, *p*-cumárico, sinápico, 4-metoxi-cinâmico, gálico e *p*-hidroxibenzóico, os quais também foram encontrados em amostras de méis laranjeiras, segundo descrito na Tabela 11. Os flavonóides morina e quercetina apareceram em ambos

tipos de méis e o flavonóide glicosilado, rutina, foi identificado em apenas um mel laranja. Os ácidos siríngico e cinâmico foram encontrados apenas em dois méis laranjeiras (**RLL16 e RLL19**), enquanto o ácido 4-metoxi-benzóico foi exclusivo do mel silvestre **RLS02** (Tabela 11).

Tabela 11: Substâncias fenólicas identificadas nos méis silvestres e laranjeiras.

Amostra de mel	Substâncias Fenólicas identificadas por CLAE
Méis Silvestre	
RLS02	Ácidos: 4-metoxi-benzóico e 4-metoxicinâmico
RLS05	Ácidos: <i>p</i> -hidroxi-benzóico
RLS06	Ácido gálico
RLS10	Ácidos: gálico, <i>p</i> -hidroxi-benzóico, vanílico, sinápico e 4-metoxi-cinâmico Flavonóide: morina
RLS12	Ácidos: protocatecuico, <i>p</i> -cumárico, e 4-metoxi-cinâmico *Flavonóides: morina e quercetina
Méis Laranja	
RLL03	Ácidos: <i>p</i> -hidroxi-benzóico, vanílico e <i>p</i> -cumárico
RLL15	Ácidos: gálico, vanílico e sinápico Flavonóides: quercetina, ** rutina
RLL16	Ácidos: protocatecuico, <i>p</i> -cumárico, sinápico, cinâmico e 4-metoxi-cinâmico * Flavonóides: morina e quercetina
RLL18	Ácido protocatecuico
RLL19	Ácidos: protocatecuico, siríngico, <i>p</i> -cumárico, cinâmico e 4-metoxi-cinâmico *Flavonóides: morina e quercetina
RLL20	Ácidos: protocatecuico e <i>p</i> -cumárico *Flavonóides: morina e quercetina

* Visualizado somente por CCF.

** Confirmado por CCF.

Assim sendo, tudo indica que para um mel monofloral (laranjeira) a semelhança do perfil cromatográfico para as substâncias fenólicas, poderá auxiliar na sua determinação botânica, enquanto para mel heterofloral (silvestre), um conhecimento prévio sobre fonte floral de maior predominância em sua composição, poderá auxiliar na investigação dos ácidos, visto ser este mel produzido de néctar coletado de diversas flores de origens diferentes.

8.4 - Isolamento e Determinação Estrutural da Morina no Mel Laranjeira (RLL20)

O monitoramento por CLAE analítica da amostra **RLL20** (mel laranjeira oriundo de Taubaté-SP) não permitiu observar nenhum pico no cromatograma que pudesse estar relacionado ao flavonóide morina (Figura 42, p.110). Porém a análise comparativa de **RLL20** com o padrão morina por CCF, mostrou claramente a presença desta substância através da observação do mesmo fator de retenção ($R_f = 0,44$) em hexano: acetato de etila: ácido fórmico (20:19:1), assim como, a coloração amarelo escuro, após revelação com solução 1% de cloreto de alumínio em etanol e aquecimento, observado a 366 nm. A partir destas observações foi realizado o isolamento da morina por cromatografia de camada fina preparativa. A amostra **RLL20** (70 mg) foi aplicada em uma placa de vidro 20 x 20 recoberta com gel de sílica e indicador de fluorescência (F254) e eluída com hexano: acetato de etila: ácido fórmico (15:24:1). Após a eluição, a placa foi visualizada na lâmpada a 254 e 366 nm, respectivamente, para auxiliar na retirada da amostra da placa. O material foi raspado da placa, misturado com 20 mL de metanol, deixado agitar por 30 minutos e filtrado em papel de filtro. Em seguida, o metanol foi evaporado até a secura, resultando em um sólido de coloração amarelo-castanho e peso 5,6 mg.

A substância isolada da amostra **RLL20** e codificada como **RLLMo** foi caracterizada através das análises espectroscópicas no UV, RMN ^1H e ^{13}C .

A análise do espectro no UV em metanol permitiu observar dois máximos de absorção a $\lambda_{\text{máx}}$ 255 e 356 nm (Figura 48), que caracterizam a banda II (devido à absorção do anel **A**, sistema benzoila) e a banda I (devido ao anel **B**; sistema cinamoila), respectivamente, para a morina (3, 5, 7, 2', 4'-pentaidroxi-flavona), que é um flavonol.

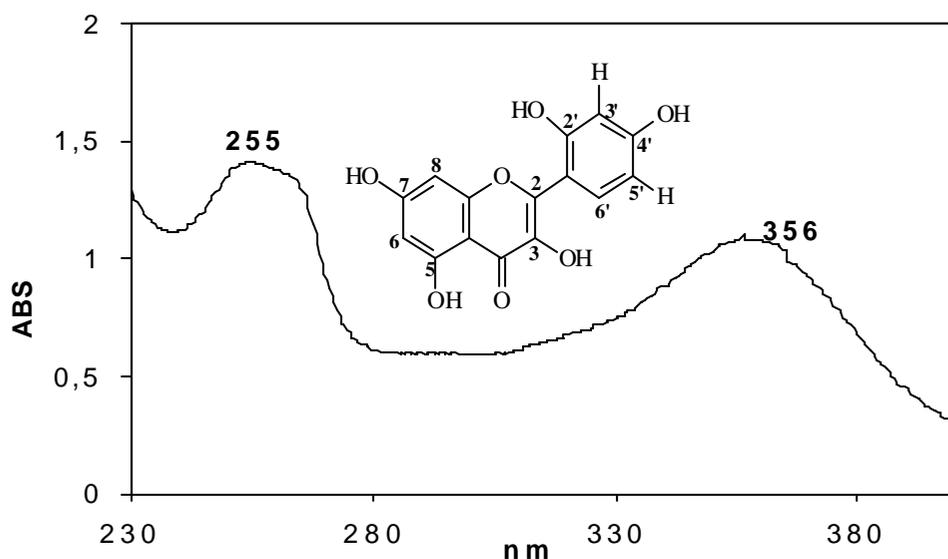


Figura 48: Espectro de absorção no ultravioleta da substância **RLLMo** em metanol.

As análises por RMN de ^1H e ^{13}C da substância **RLLMo** auxiliaram também na confirmação estrutural.

A análise do espectro de RMN ^1H (Figuras 49 e 50) da substância **RLLMo** permitiu identificar sinal de hidroxila em campo baixo a δ_{H} 12,62 (s) ppm, confirmando a presença do hidrogênio do grupo hidroxila localizada no átomo de carbono C5 envolvido em ligação de hidrogênio com o grupo carbonila no C-4. Além dessa hidroxila, foi possível identificar também, os sinais referentes as outras hidroxilas livres a δ_{H} 10,72; 9,78 e 9,31 ppm, que estão localizadas nos carbonos C-4', C-3 e C-7/C-2', respectivamente. Na região de deslocamento químico dos hidrogênios aromáticos foram observados dois sinais para hidrogênios no anel A, com acoplamento em *meta*, δ_{H} 6,15 (*d*, $J=2,0$ Hz; H-6) e 6,27 (*d*, $J=2,0$ Hz; H-8) indicando que as posições C-5,7 são oxigenadas para esta unidade flavonoídica. Em um outro campo, o espectro de RMN ^1H permitiu observar três sinais correspondentes aos três hidrogênios do anel aromático B do flavonol com substituições nas posições 2' e 4', indicados pelos dubletos em δ_{H} 7,21 (*d*, $J=8,5$ Hz, H-6'-5'), duplo-dublete em δ_{H} 6,35 (*dd*, $J=2,2$ Hz, H-5'-3' e $J=8,5$ Hz, H-5'-6') e o dublete em δ_{H} 6,41 (*d*, $J=2,2$ Hz, H 3'-5').

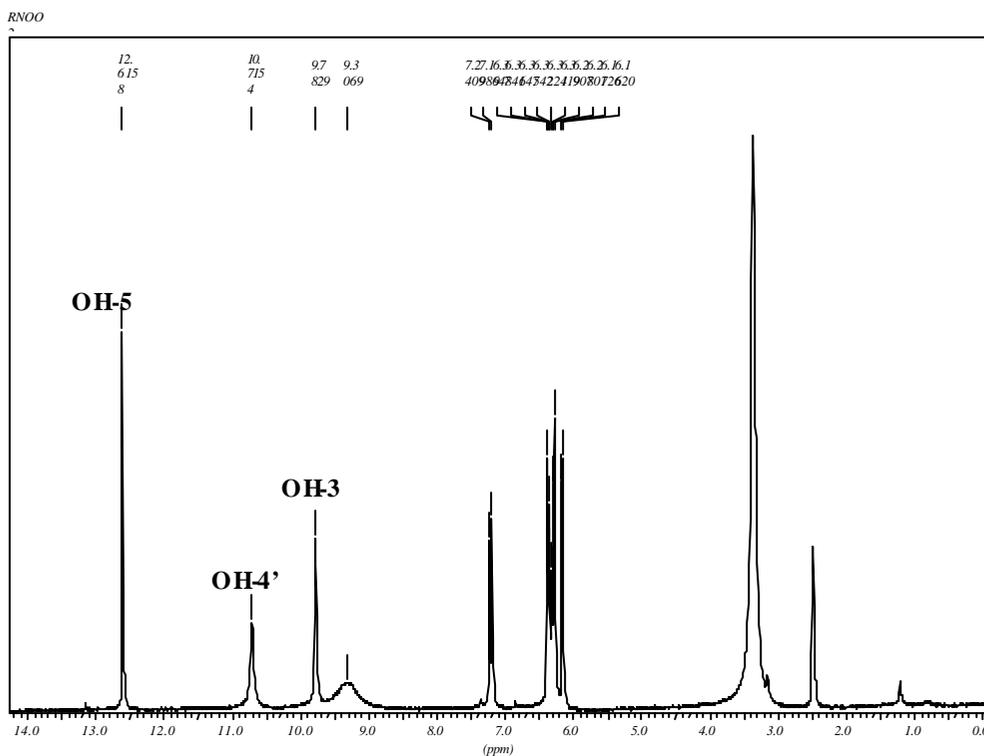


Figura 49: Espectro de RMN ^1H (200 MHz, DMSO-D_6) de **RLLMo**.

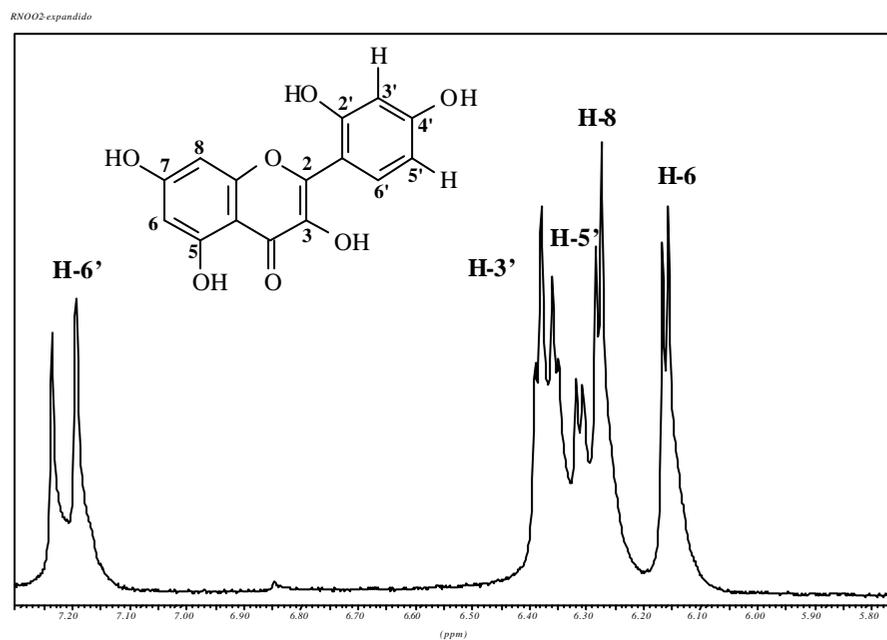


Figura 50: Espectro de RMN ^1H (200 MHz, DMSO) de **RLLMo**, expandido na região de 6,0 a 7,30 ppm.

O espectro de RMN ^{13}C totalmente desacoplado (Figura 51) apresentou, entre outros sinais, os deslocamentos químicos em 98,4 e 93,8 ppm, referentes aos carbonos C-6 e C-8, respectivamente, do anel A do flavonol. Além desses carbonos, a distinção entre uma flavona (H-3) e um flavonol (RO-3) foi facilmente verificada pela ausência de sinal de carbono metínico em torno de δ_{CH} 103 ppm (CH-3 de flavonas), e a presença do sinal de C-3 em 139,8 ppm que porta um grupo hidroxila, confirmando ser um flavonol. Este maior deslocamento químico para o C-3 oxigenado, pode ser justificado pelo efeito indutivo retirador de elétrons do átomo de oxigênio (AGRAWAL, 1982; MARKHAY *et al.*, 1982). Os sinais em δ 156,9 e 159,7 ppm se referem ao anel B, onde os carbonos C-2' e C-4' estão oxigenados. O deslocamento químico do sinal da carbonila a δ 176,4 ppm foi influenciado pela interação da ligação intramolecular com o hidrogênio do grupo HO-3 e HO-5.

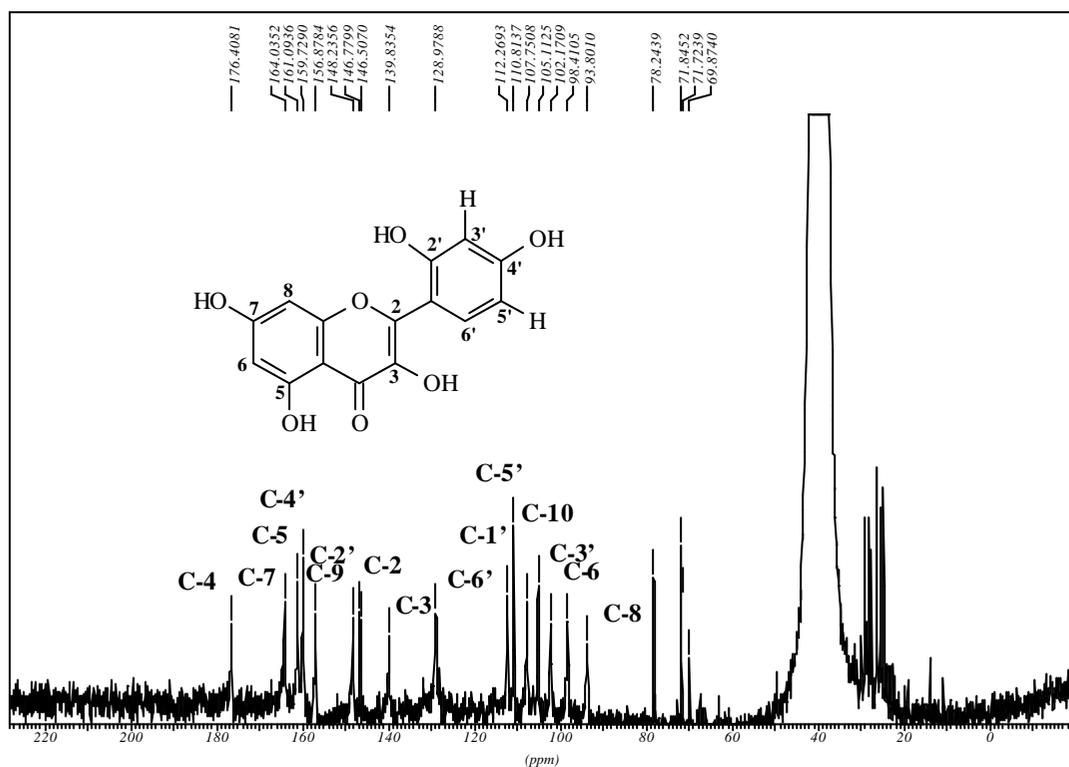


Figura 51: Espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, DMSO- D_6) de **RLLMo**.

Os deslocamentos químicos detectados no RMN de ^1H e ^{13}C permitiram deduzir que a substância **RLLMo** é um flavonol, apontado anteriormente pelo espectro de UV (Figura 48, p.122) sendo estes dados compatíveis com os deslocamentos químicos da morina. Na Tabela 12 foram listadas as atribuições dos deslocamentos químicos da substância **RLLMo** comparada com os deslocamentos químicos da morina relatadas na literatura (DA SILVA, 2002), como uma forma também de auxiliar na identificação.

Tabela 12: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de RLLMo comparados com os dados da literatura da morina (DA SILVA *et al.*, 2002).

C	d H RLLMo	$\delta^{13}\text{C}$ RLLMo	d H Morina	$\delta^{13}\text{C}$ Morina
2		146,5		149,6
3		139,8		136,5
4		176,4		176,7
5	OH- 12,61	161,1	OH- 12,56	161,3
6	6,15 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz)	98,4	6,21 (<i>d</i> , <i>J</i> =2,0 Hz)	99,5
7		164,03		164,1
8	6,27 (<i>d</i> , <i>J</i> = 2,0 Hz)	93,8	6,32 (<i>d</i> , <i>J</i> =2,0 Hz)	94,9
9		146,8		156,9
10		107,7		104,9
1'		112,3		111,1
2'		156,9		158,1
3'	6,41 (<i>d</i> , <i>J</i> =2,2 Hz)	105,1	6,44 (<i>d</i> , <i>J</i> =2,2 Hz)	104,9
4'	OH-10,72	159,7		160,9
5'	6,35 (<i>d</i> , <i>J</i> =2,2; 8,4 Hz)	110,9	6,39(<i>dd</i> , <i>J</i> =2,2; 8,4 Hz)	109,2
6'	7,21 (<i>d</i> , <i>J</i> =8,4 Hz)	128,9	7,6 (<i>d</i> , <i>J</i> =8,4 Hz)	132,3

8.5 - Atividade Biológica

Cabe destacar que os testes biológicos foram realizados pelo grupo de pesquisa da Profa. Dra. Áurea Echevarria do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas, da UFRRJ com a participação da aluna de iniciação científica Amanda Esteves-Souza. O interesse desse grupo em estudar as propriedades anticâncer de substâncias naturais de plantas brasileiras vem sendo descrito na literatura (GRYNBERG *et al.*, 1994; 1997; 1998).

Sabe-se que a atividade biológica das substâncias fenólicas é menos pronunciada do que a de outros grupos de substâncias, como por exemplo, os alcalóides ou os esteróides. Por esta razão, talvez, o valor terapêutico dos polifenóis foi, durante algum tempo, rodeado de dúvidas e controvérsias.

No entanto, na última década, o interesse por essa classe de substâncias e os trabalhos que vem sendo desenvolvidos tem revelado importantes atividades biológicas.

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 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).

O mel de abelhas *Apis mellifera* é um produto natural de composição química bastante complexa, que sofre influência das condições da flora e do clima da região. As substâncias que mais se destacam são os açúcares, derivados fenólicos, aminoácidos e as vitaminas. Dentre as inúmeras propriedades medicinais atribuídas ao mel pela medicina popular e que vêm sendo comprovadas cientificamente, destacam-se sua atividade antimicrobiana, anti-séptica e antiproliferativa, atribuída, principalmente, aos compostos fenólicos.

Como já citado anteriormente, KAMPA e colaboradores (2004) investigaram a ação antiproliferativa e os efeitos apoptóticos de seis ácidos fenólicos (cafeico, siríngico, sinápico, protocatecuico, ferúlico e 3,4-diidroxifenilacético [PAA]) sobre células de câncer de mama. As substâncias testadas mostraram efeito inibitório (tempo-dependente e dose-

dependente) sobre o crescimento da célula, com a seguinte potência: ácidos cafeico > ferúlico = protocatecuico = PAA > sinápico = siríngico.

Sendo assim, nesse trabalho buscou-se avaliar a atividade antitumoral *in vivo* e *in vitro* da fração rica em compostos fenólicos do mel silvestre (**RLS 12**, amostra selecionada devido à indicação por CCF da presença de flavonóides e ácidos fenólicos) proveniente da cidade de Itararé-SP, frente ao carcinoma de Ehrlich. A fração rica em compostos fenólicos foi obtida a partir do mel por partição em éter etílico, que foi anteriormente fracionada em coluna de XAD-2. A seleção desta amostra foi decorrente do indício de apresentar substâncias que foram citadas como potentes inibidores de tumores malignos (os tumores podem ser benignos ou malignos, e a palavra câncer é usada para todos os tumores malignos; GRYNBERG, 1999). O momento desta escolha ocorreu quando a análise por CCF indicou a presença dos ácidos protocatecuico e 4-metoxi-cinâmico, além dos flavonóides morina e quercetina. A análise por CLAE confirmou a presença dos dois ácidos fenólicos.

A presença do ácido protocatecuico chamou a atenção devido aos testes indicados por KAMPA e colaboradores e a atividade antitumoral da quercetina (Figura 10, p. 26) também foi estudada por GRYNBERG (1999), bem como os flavonóides 7'-O-metilagatisflavona, amentoflavona (Figura 50) e rutina (Figura 28, p. 86). A atividade citotóxica dessas substâncias sobre as células de Ehrlich, em cultura de 48 horas, foi medida pelo ensaio do MTT. Desses compostos, a amentoflavona e rutina, nos esquemas ensaiados com doses totais de 30 mg/kg não revelaram atividade contra o tumor S180. Esses resultados estão de acordo com observações anteriores, indicando que a quercetina apresenta atividade antitumoral em alguns tumores como o de Ehrlich (SUOLINA *et al.*, 1975; KANDASWAMI *et al.*, 1992) e carcinoma de cabeça (CASTILLO *et al.*, 1989).

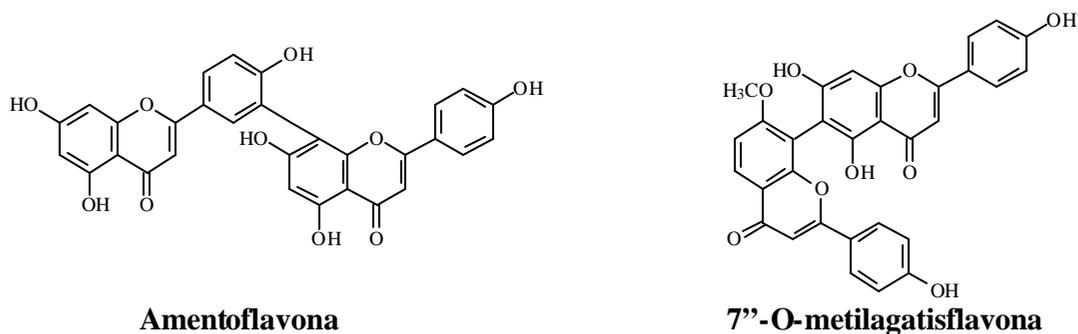


Figura 52: Estruturas químicas dos flavonóides amentoflavona e 7''-O-metilagatisflavona.

A atividade antitumoral foi avaliada sobre o crescimento do carcinoma de Ehrlich injetado por via intraperitoneal (ip) em camundongos fêmea SW no esquema de tratamento envolvendo a aplicação ip de 80 mg/Kg (em DMSO/salina como solvente) da fração nos dias 1, 2 e 4 após a inoculação do tumor (5.10^6 células/mL). O grupo de animais controle recebeu o veículo no mesmo esquema de tratamento. A citotoxicidade *in vitro* foi avaliada frente a células de Ehrlich em cultura (5.10^5 células/mL) em RPMI, soro fetal bovino em atmosfera de 5% CO_2 por 48h, utilizando o método do MTT.

A eficiência do tratamento foi determinada pelo aumento do tempo de sobrevivência dos ratos tratados (T) quando comparado ao do grupo controle (C) usando a expressão (% T/C = tempo médio de sobrevida de animais tratados (dias) / tempo médio de sobrevida dos animais controle (dias; GRYNBERG *et al.*, 1997).

A citotoxicidade mostrou-se pouco significativa indicando 25% de inibição do crescimento na dose de 6,5 μ g/mL. No entanto, os resultados para a atividade antitumoral *in vivo* mostraram significativa inibição do crescimento e aumento da sobrevida (% T/C = 390), sendo que após 75 dias de tratamento 67% dos animais ficaram isentos de tumor. A fração do mel silvestre rica em compostos fenólicos mostrou resultados promissores para a atividade antitumoral indicando a importância desses metabólitos especiais.

9 - CONCLUSÕES

A análise do perfil cromatográfico associado ao estudo dos espectros de ultravioleta obtidos pelo detector de arranjo de fotodiodos para os méis laranjeiras permitiu identificar o ácido protocatecuico, o ácido vanílico, o ácido *para*-cumárico, o ácido cinâmico, o ácido sinápico e o ácido 4-metoxi-cinâmico como os mais representativos, além da presença do ácido *p*-hidroxi benzóico, ácido gálico e ácido siríngico que não foram encontrados em mais de uma amostra de mel. Para os méis silvestres foram identificados os ácidos gálico, *para*-hidroxi-benzóico e 4-metoxi-cinâmico como os mais representativos, além dos ácidos 4-metoxi-benzóico, protocatecuico, sinápico, vanílico e *para*-cumárico que apareceram com maior variação.

Nesse trabalho está sendo descrito, pela primeira vez, a presença de flavonóides nos méis brasileiros. Os méis laranjeiras, **RLL16**, **RLL19** e **RLL20** apresentaram além dos ácidos fenólicos, os flavonóides morina e quercetina, e o **RLL15** apresentou quercetina e rutina. Para as amostras de méis silvestres, apenas a **RLS12** apresentou morina e quercetina, enquanto a **RLS10** apresentou apenas a morina.

A morina foi confirmada por CLAE-DAD em apenas um mel oriundo da Mata Atlântica (**RLS10**, de Paraty-RJ) e não foi citado até então em outro mel, segundo relatos da literatura. Caso haja a comprovação de que outros méis brasileiros oriundos da Mata Atlântica, apresentem a morina, esta substância poderá vir a ser um marcador químico para caracterização de origem geográfica, visto que a Mata Atlântica está presente apenas em nosso país.

Os perfis cromatográficos das substâncias fenólicas para os méis monoflorais (laranjeira), oriundos de diferentes regiões geográficas, não sofreram alterações qualitativas drásticas, quando comparados aos méis heteroflorais (silvestre), que apresentaram um perfil bastante irregular.

A ocorrência dos ácidos protocatecuico e *para*-cumárico em quatro amostras de méis laranjeira, indicou que estas substâncias poderiam ser usadas como marcadores químicos destas espécies.

Para os méis heteroflorais (silvestre) não foi observada a ocorrência constante de nenhum dos ácidos estudados, de forma que pudessem ser considerados possíveis marcadores. Talvez isso possa estar relacionado à diversidade da origem geográfica e botânica. Sendo assim, será necessário um estudo mais aprofundado para a confirmação inequívoca da composição química deste mel, utilizando um número maior de amostras.

Os resultados obtidos na determinação preliminar da atividade antitumoral *in vivo* com o extrato da amostra **RLS12B** (fração etérea), rica em substâncias fenólicas, mostraram significativa inibição do crescimento e aumento da sobrevivência dos animais, onde após 75 dias de tratamento 67% dos animais ficaram isentos de tumor. Isto nos estimula à utilização dessas substâncias como potentes fármacos que possam auxiliar na prevenção ou no combate ao câncer.

10 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALJADI, A.M. & KAMARUDDIN, M.Y. Isolation and identification of phenolic acids in Malaysian honey with antibacterial properties. *Turk J. Med. Sci.* 2003, 33, 229-236.
- 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.
- 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.
- AMIOT, M.J.; SABATIER, S.; TACCHINI, M.; AUBERT, S. Identification of flavonoids in sunflower honey. *J. Food Sci.* 1992, 57(3), 773-777.
- ANDRADE, P.; FERRERES, F.E.; AMARAL, M.T. Analysis of Honey phenolic acids by HPLC, its application to honey botanical characterization. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* 1997, 20 (14), 2281-2288.
- ANKLAM, E. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chemistry* 1998, 63(4), 549-562.
- AQUINO NETO, F.R. & NUNES, D.S.S. Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins. Interciência, 2003, p. 187.
- ASAMI, D.K; HONG, Y.J.; BARRETT, D.M.; MITCHELL, A.E. Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. *Journal Agric. Food Chem.* 2003, 51, 1237-1241.
- AZEREDO, M.A.A. & AZEREDO, L.C. Características físico-químicas dos méis do município de São Fidélis-RJ. *Ciência e Tecnologia de Alimento* 1999, 19(1), 3-7.

BANKOVA, V.S.; POPOV, S.S.; MAREKOV, N.L. High-performance liquid chromatographic analysis of flavonoids from propolis. *Journal of Chromatography* 1982, 242, 135-143.

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

BARTH, O.M & CORÉ-GUEDES, J. Caracterização de méis de laranjeiras procedentes dos estados do Rio de Janeiro e de São Paulo, Brasil, por meio da análise polínica. *LECTA, Bragança Paulista* 1999, 17 (1), 27-35.

BARTH, O.M. & DUTRA, V.M.L. Concentração de pólen em amostras de mel de abelhas monoflorais do Brasil. *Revista da Universidade de Guarulhos – Geociências*. Número especial: 2000, 173-176.

BERAHIA, T.; CERRATI, C.; SABATIER, S.; AMIOT, M.J. Gas chromatography-mass spectrometry analysis of flavonoids in honey. *Sciences des Aliments* 1993, 13, 25-44.

BONAGA, G. & GIUMANINI, A.G. The volatile fraction of chestnut honey. *Journal Apicultural Research* 1986, 25, 113-120.

BONVEHI, J.S. & COLL, F.V. Characterization of citrus honey (*Citrus* Spp.) produced in Spain. *J. Agric. Food Chem.* 1995, 43, 2053-2057.

BOSI, G. & BATTAGLINI, A.G. Gas Chromatography analysis of free and protein amino acids in some unifloral honeys. *Journal Apicultural Research* 1978, 17, 152-166.

BRAZ-FILHO, R. *Tese de Doutorado*. Estudo químico da *Apuleia leiocarpa*. PPGQO-UFRRJ. 1971. p. 372.

CARTLAND, B. *The magic of honey*. *Corgi Books* 1970, London, UK, 160 p.

CASTILLO, M.H.; PERKINS, E.; CAMPBELL, J.H.; DOERR, R.; HASSET, J.M.; KANDASWAMI, C.; MIDDLETON, E. The effects of the bioflavonoid quercetin on squamous cell carcinoma of head and neck origin. *Am J. Surgery* 1989, 158, 351-355.

CERMAK, R.; LANDGRAF, S.; WOLFFRAM, S. The bioavailability of quercetin in pigs depends on the glycoside moiety and on dietary factors. *J. Nutr.* 2003, 133, 2802-2807.

CHOI, Y.J.; KANG, J.S.; PARK, J.H.Y.; LEE, Y.J.; CHOI, J.S.; KANG, Y.H. Polyphenolic flavonoids differ in their antiapoptotic efficacy in hydrogen peroxide-treated human vascular endothelial cells. *J. Nutr.* 2003, 133, 985-991.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. Official methods of analysis, 1990, v.3, Supl 2.

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

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

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. In: *Bees and beekeeping: Science, Practice and World Resources*. Heinemann 1990, Oxford, 400p, Chapter 13.

CROZIER, A.; BURNS, JENNIFER, 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.

D'ARCY, B.; RINTOUL, G.; ROWLAND, C.Y.; BLACKMAN, A.J. Composition of Australian honey extractives. 1. Nor-isoprenoids, monoterpenes, and other natural volatiles from Blue Gum (*Eucalyptus leucoxylon*) and Yellow Box (*Eucalyptus melliodora*) honeys. *J. Agric. Food Chem.* 1997, 45, 1834-1843.

DA SILVA, T.M.S. *Tese de Doutorado*. Estudo químico de espécies de *Solanum*. PPGQO-UFRRJ. 2002, p. 194.

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.

DAIGLE D.J. & CONKERTON E.J. Analysis of flavonoids by HPLC: An update. *Journal of Liquid Chromatography* 1988, 11(2), 309-325.

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

DEGANI, A.L.G.; CASS, Q.B; VIEIRA, P.C. Cromatografia: Um breve ensaio. *Química Nova na Escola* 1997, 7, 21-25.

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

DE MARIA, C.A. & MOREIRA, R.F.A. Compostos voláteis em méis florais. *Química Nova* 2003, 26(1), 90-96.

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

DEWICK, P.M. Medicinal natural products: A biosynthetic approach. London: John Wiley, 1998, p. 466.

DUCREY, B.; WOLFENDER, J.L.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Analysis of flavonol glycosides of 13 epilobium species (Onagraceae) by LC-UV and thermospray LC-MS. *Phytochemistry* 1995, 38, 129-137.

DUTRA, V.M.L. & BARTH, O.M. Análise palinológica de amostras de mel da região de Bananal (SP/RJ), Brasil. *Revista Universidade Guarulhos* 1997, Geociências II (nº especial), 174-183.

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

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

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

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

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

FERRERES, F.; ANDRADE, P.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A. Natural occurrence of abscisic acid in heather honey and floral nectar. *Journal Agric. Food Chem.* 1996, 44(8), 2053-2056.

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

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 Scie. Food Agric.* 1998, 77, 506-510.

GEISSMAN, T.A. & CROUT, D.H.G. Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolism. Freeman, Cooper & Company. USA, Chapter 4: Compounds derived from shikimic acid, 1969, p.137-148.

GIL, M.I.; FERRERES, F.; ORTIZ, A.; SUBRA, E.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A. Plant phenolic metabolites and floral origin of Rosemary honey. *J. Agric. Food Chem.* 1995, 43, 2833-2838.

GRYNBERG, N.F.; MARTORELLI, R.A.; CARVALHO, M.G.; BRAZ-FILHO, R.; MOREIRA, I.C.; SANTOS, A.C.S.; ECHEVARRIA, A. Inhibition of murine tumour growth by natural biflavone and mesoionic compounds. *XVI International Cancer Congress* 1994, 63-66.

GRYNBERG, N.; SANTOS, A.C.; ECHEVARRIA, A. Synthesis and *in vivo* antitumor activity of new heterocyclic derivatives of the 1, 3, 4-thiadiazolium-2-aminide class. *Anti-Cancer Drugs* 1997, 8, 88-91.

GRYNBERG, N.F.; BRIOSO, P.S.T.; VELANDIA, J.R.; ECHEVARRIA, A.; CARVALHO, M.G.; BRAZ-FILHO, R. Antiproliferative effects and activation of apoptosis on Ehrlich tumour cells by flavones. *17th International Cancer Congress* 1998, 317-320.

GRYNBERG, N.F. *Tese de Doutorado*. Mecanismo de ação e atividade antitumoral de flavonóides diterpenos e derivados de mesoiônicos em tumores experimentais. PPGQO-UFRRJ. 1999, p. 194.

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

HARBONE, J. & GREYER, R.J. Flavonoids and insects. In: ed. Lit. J.B. Harbone. *The Flavonoids: Advances in Research since 1986*. Edited by J.B. Harbone. London: Chapman & Hall, 1993, p. 589-618.

HARBORNE, J.B. *The Flavonoids Advances in Research since 1986*. Ed. Chapman & Hall, 2-6 Boundary Row, London-UK, 1994.

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

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

HOSTETTMANN, K; DOMON, B.; SCHAUFELBERGER, D.; HOSTETTMANN, M. On line high-performance liquid-chromatography-ultraviolet visible spectroscopy of phenolic compounds in plant-extracts using post-column derivatization. *Journal of Chromatography* 1984, 283, 137-147.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E.F.; VIEIRA, P.C. *Princípios Ativos de Plantas Superiores*. São Carlos: Ed UFSCAR, 2003.

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.

HUIDOBRO, J.F.; SUÁREZ-LUQUE, S.; MATO, I.; SIMAL-LOZANO, J.; SANCHO, M.T. Rapid determination of minority organic acids in honey by high-performance liquid chromatography. *Journal Chromatography A* 2002, 955, 207-214.

<http://www.geocities.com/nutriflip/Supplements/Flavonoids.html>

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.

KANDASWAMI, C.; PERKINS, E.; DRZEWIECKI, G.; SOLONIUK, D.S.; MIDDLETON, E. Differential inhibition of proliferation of human squamous cell carcinoma, gliosarcoma and embryonic fibroblast-like lung cells in culture by plant flavonoids. *Anti-Cancer Drugs* 1992, 3, 525-530.

KARCH, K.; SEBESTIAN, I.; HALÁSZ, I.; ENGELHARDT, H. Optimization of reverse-phases separation. *J. Chromatography* 1976, 122, 171-184.

LENGLER, S. www.com.br/apicultura/pesquisas/inspeção_mel, 01.doc. 2004.

LINDSTED, K. Chemical control of feeding behavior. *Comp. Biochem. Physiol.* 1971, 39A, 553-581.

MAGGI, L.; STELLA, R.; VALENTINI, M.T.G. Model compound sorption by the resins XAD-2, XAD-8 and diethylaminoethylcellulose. *Journal of Chromatography* 1989, 478, 225-230.

MANACH, C.; MORAND, C.; TEXIER, O. Quercetin metabolism in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. *J. Nutr.* 1995, 125, 1911-1922.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004, 79, 727-747.

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

MARCANO, D.; MASAHISA, H. *Fitoquímica orgânica*. Caracas: Universidade Central de Venezuela, 1991, p. 81.

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.

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

MARCUCCI, M.C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. *Química Nova* 1996, 19 (5), 529-536.

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.

MARKHAN, K; MABRY, T.J. Ultraviolet-visible and proton magnetic resonance spectroscopy of flavonoids. In: Harbone, J.B.; Mabry, T.J. ; Mabry, H. *The Flavonoids*, London: Chapman & Hall, 1975, 45-77.

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

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

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 Agric. Food Chem.* 2000a, 48, 4744-4748.

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

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

MEYER, V. R. *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. 2nd, John Wiley & Sons, 1994.

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.

MOREIRA, R.F.A.; TRUGO, L.C.; PIETROLUONGO, M.; DE MARIA, C.A.B. Flavor composition of cashew (*anacardium occidentale*) and marmeleiro (*Croton species*) honeys. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 7616-7621.

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.

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

PARR, A.J. & BOLWELL, G.P. Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenol content or profile. *Journal Agric. Food Chem.* 2000, 80, 985-1012.

PAVIA, D. & LAMPMAN, K.G. *Ultraviolet spectroscopy*. In: *Introduction to spectroscopy – a guide for students of organic Chemistry*. Saunders College Publishing/Holt Rinehart and Winston. 1979, p.183-224.

PERIS, J. Producción y comercio de los productos apícolas en España. El Campo del Banco de Bilbao. *Apicultura* 1984, 93.

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

PRIOR, R.L. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *Am. J. Clin. Nutr.* 2003, 78 (suppl), 570S-578S.

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

SAKAKIBARA, H.; YOSHINORI, H; NAKAGAWA, S.; ASHIDA, H.; KANAZAWA, K. Simultaneous determination of all polyphenol in vegetables, fruits, and teas. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 571-581.

SANCHO, M.T.; MUNIATEGUI, S.; HUIDOBRO, J.F.; LOZANO J.S. Aging of honey. *J. Agric. Food Chem.* 1992, 40,134-138.

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

SCALBERT, A. & WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.*; 2000, 11, 253-260.

SIMÕES, C. M. O. SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia -Da Planta ao Medicamento*. Editora Universidade UFRG/Ed. Da UFSC, 2000.

SIMONOVSKA, B.; VOVK, I.; ANDRENESEK, S.; VALENTOVÁ, K.; ULRICHOVÁ, J. Investigation of phenolic acids in yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves and tubers. *Journal of Chromatography A* 2003, 1016, 89-98.

SNYDER, L.R. & KIRKLAND, J.J. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 2nd New York, John Wiley and Sons, 1979.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J. L. *Practical HPLC Method Development*. New York, John Wiley and Sons, 1988.

STEEG, E. & MONTAG, A. Quantitative determination of aromatic carboxylic acids in honey. *Zeitschrift fuer Lebensmittel Untersuchung und Forschung* 1988, 187, 115-120.

STONOGA, V.I. & FREITAS, R.J.S.D. Conteúdo de água e açúcares em mel de abelhas. *Bd. Ceppa* 1991, Curitiba; 9 (1), 9-16.

STRINSON, E.E.; SUBES, M.H.; PETTY, J.; WHITE, J.W.; JR. The composition of honey. V. Separation and identification of the organic acids. *Arch. Biochemistry Biophys* 1960, 89, 6-12.

SUOLINA, M.; BUCHSBAUM, R.N.; RACKER, E. Effect of flavonoids on aerobic glycolysis and growth of tumor cells. *Cancer Res.* 1975, 35, 1865-1872.

TAN, S.T., HOLLAND, P.T., WILKINS, A.L.; MOLAN, P.C. Extractives from New Zealand Honeys. 1. White clover, manuka and kanuka unifloral honeys. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1988, 36, 453-460.

TAN, S.T.; WILKINS A.L.; MOLAN, P.C.; HOLLAND, P.T.; REID, M. A chemical approach to the determination of floral sources of New Zealand honeys. *Journal of Apicultural Research* 1989, 28(4), 212-222.

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.

TERRAB, A.; DÍEZ, M.J.; HEREDIA, F.J. Palynological, physico-chemical and colour characterization of Moroccan honeys: I. River red gum (*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh) honey. *International Journal of Food Science and Technology* 2003, 38, 379-386.

TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; FERRERES, F.; BLÁZQUEZ, A.; GARCÍA-VIGUERA, C.; TOMÁS-LORENTE, F. High-performance liquid chromatography of honey flavonoids. *Journal of Chromatography* 1993, 634, 41-46.

TOMÁS-BARBERÁN, F.A; 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; FERRERES, F.; TOMÁS-LORENTE, F.; GARCÍA-VIGUERA, C. Hesperetin: A marker of the floral origin of citrus honey. *J. Sci. Food Agric.* 1993b, 61, 121-123.

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

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. *J. Sci.Food Agric.* 2001, 81, 485-496.

VARGAS, A.C.; LOGUERCIO, A.P.; WITT, N.M.; COSTA, M.M.; SILVA, M.S.S.; VIANA, L.R. Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcoólico de própolis. *Cienc. Rural* 2004, 34 (1), Santa Maria ene./feb. 2004.

WANWIMOLRUK, S.; HO, P.; SAVILLE, D.J. Inhibition of human CYP3A4 activity by grapefruit flavonoids, furanocoumarins and related compounds. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 2001, 4(3), 217-227.

WHITE, J.W. *Physical characteristics of honey*. In: CRANE, E. Honey a comprehensive survey. 1975. London: Heinemann, Cap.6, p.207-239.

WILKINS, A.L., LU, Y.; MOLAN, P.C. Extractable organic substances from New Zealand unifloral manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. *Journal of Apicultural Research* 1993, 32 (1), 3-9.

WILLIAMS, D.H. & FLEMING, I. *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry*. McGraw-Hill, 5th ed. 1995, p. 329.

WINTER, F. Gring cleavage of flavonoids by human intestinal bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 1989, 55(5), 1203-1208.

WOOTON, M.; EDWARDS, R.A.; FARAJI-HAREMI, R. Effect of accelerated storage conditions on the chemical composition and properties of Australian honeys. 2. Changes in sugar and free amino acid contents. *Journal of Apicultural Research* 1976, 15(1), 29-34.

WULF, L.W. & NAGEL, C.W. Analysis of phenolic acids and flavonoids by high-pressure liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 1976, 116, 271-279.

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

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

ZWAENEPREL, C. *Honey: facts and folklore*. Alberta Beekeepers' Association 1984, Edmonton, Canada, p. 24.