



**MARIA AUXILIADORA MIGUEL JACOB**

**COMPOSTOS FENÓLICOS, ATIVIDADE  
ANTIOXIDANTE E CARACTERÍSTICAS  
FÍSICO-QUÍMICA DE MEL E PÓLEN  
COLETADOS POR *Apis mellifera* Linnaeus, 1758  
(Hymenoptera: Apidae)**

**LAVRAS – MG**

**2014**

**MARIA AUXILIADORA MIGUEL JACOB**

**COMPOSTOS FENÓLICOS, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E  
CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICA DE MEL E PÓLEN  
COLETADOS POR *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae)**

Tese apresentada à Universidade Federal Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, área de concentração em Entomologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutora.

Orientador

Dr. César Freire Carvalho

**LAVRAS - MG**

**2014**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e  
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Jacob, Maria Auxiliadora Miguel.

Compostos fenólicos, atividade antioxidante e características físico-químicas de mel e pólen coletados por *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae) / Maria Auxiliadora Miguel Jacob. – Lavras : UFLA, 2014.

85 p.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: César Freire Carvalho.

Bibliografia.

1. Abelha. 2. Polinizador. 3. Fenóis. 4. Mel - Qualidade. 5. Pólen - Qualidade. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 638.16

**MARIA AUXILIADORA MIGUEL JACOB**

**COMPOSTOS FENÓLICOS, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E  
CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICA DE MEL E PÓLEN  
COLETADOS POR *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae)**

Tese apresentada à Universidade Federal Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós - Graduação em Entomologia, área de concentração em Entomologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 28 de Fevereiro de 2014.

Dr. Wilson César Abreu	UFLA
Dr. Stephan Malfitano Carvalho	UFU
Dra. Elisângela Elena Nunes Carvalho	UFLA
Dra. Sára Maria Chalfoun de Souza	EPAMIG

Dr. César Freire Carvalho  
Orientador

**LAVRAS – MG**

**2014**

## AGRADECIMENTOS

Agradecer... tão difícil lembrar de todos que o merecem sem ser injusta...

Agradeço, inicialmente, a DEUS, minha fonte de vida, fé e motivação.

A minha mãe Sada Miguel Salim Jacob, meu pai Jorge Jacob (*in memoriam*), por terem me educado e estarem ao meu lado em todos os passos dessa caminhada, apoiando-me incondicionalmente.

Ao meu filho Ricardo Miguel Jacob Nunes Costa, por acreditar nos princípios que lhe ensinei e por suportar meus momentos de ausência e ainda assim me amar.

Ao Programa de Pós Graduação em Entomologia da Universidade Federal de Lavras pela oportunidade concedida e à CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor César Freire Carvalho, pela orientação, por creditar confiança em meu trabalho, pelos ensinamentos e pela amizade.

Ao professor Wilson César Abreu, pela coorientação e pela paciência de ensinar, comentar e refazer, toda vez que isso foi necessário.

À professora Elisângela Elena Nunes Carvalho, pelo apoio durante as análises de cromatografia líquida.

À professora Brígida Souza, coordenadora do curso de pós-graduação em Entomologia, pelo apoio durante a realização deste trabalho.

Aos amigos que conheci durante o curso de doutorado:

Lêda Gonçalves Fernandes, Mariana Abreu, Nara Edreira, Flávio Montes.

Espaço especial reservado para Amanda Fialho, Telma Melo Brandão e Soraia Vilela Borges!

Aos funcionários do Departamento de Entomologia.

Aos funcionários do Departamento de Ciências dos Alimentos: Constantina Maria Braga Torres e Denize de Carvalho Selvati, no laboratório. A acadêmica de pós-doutorado Eloisa Helena de Siqueira Elias, pelo apoio no cálculo dos resultados das análises físico-químicas.

A todos vocês deixo as palavras do poeta...

“Amanhecer é uma lição do universo, que nos ensina que é preciso renascer. O novo amanhece.”

(Renato Teixeira)

“Qualidade não é obra do acaso. Resulta de intenção, esforço e competência.”

George Herbert

## RESUMO GERAL

O mel e o pólen são compostos básicos empregados por *Apis mellifera* na sua alimentação. O primeiro, de natureza energética e o segundo, relacionado à fonte proteica. Esses compostos são também usados pelo homem com a mesma finalidade, contudo avaliar física e quimicamente o mel e o pólen é uma necessidade, obtendo-se índices de referência quanto à qualidade desses compostos, para o consumo pelo homem. Assim, objetivou-se avaliar: a) os teores de compostos fenólicos dos méis e pólenes coletados por *A. mellifera* na região de Lavras, MG, Brasil; b) a composição físico-química dos méis produzidos por *A. mellifera* e seu enquadramento nas especificações da legislação brasileira; c) os teores de compostos fenólicos do pólen apícola com o uso de diferentes solventes; d) a atividade antioxidante do mel e pólen apícola pelo método DPPH e  $\beta$ -caroteno ácido-linoleico. As amostras de méis foram obtidas no apiário da Universidade Federal de Lavras- UFLA, e o pólen comercial oriundo do município de Neópolis – SE, Brasil. As análises laboratoriais desses compostos evidenciaram que os maiores teores de compostos fenólicos em mel foram obtidos em amostras oriundas de meses com menor regime pluviométrico. Quanto ao pólen, foi verificado que os teores de compostos fenólicos foram influenciados pelo tipo de extrator usado. O emprego de acetona ou etanol a 70% ou ainda de forma associada, nessas mesmas concentrações, permitiram a obtenção de maiores porcentagens de compostos fenólicos. As análises físico-químicas realizadas demonstraram que os méis avaliados encontram-se dentro dos índices de qualidade estabelecidos pela legislação brasileira. A cromatografia evidenciou a presença de compostos fenólicos, sendo os de maior ocorrência: o ácido gálico, catequina, ácido clorogênico e ácido p-cumárico. A atividade antioxidante dos méis, determinada pelos métodos avaliados, mostraram-se superiores em épocas de menor umidade relativa do ar.

Palavras-chave: Abelha. Polinizador. Mel. Pólen. Composto fenólico. Índice de qualidade.

## GENERAL ABSTRACT

Honey and pollen are basic compounds employed by *Apis mellifera* in its feeding. The first, of energetic nature and, the second, related to a source of protein. These compounds are also used by man with the same end, however, evaluating honey and pollen physically and chemically is a necessity, obtaining reference indexes regarding the quality of these compounds, for human consumption. Thus, we aimed at evaluating: a) the contents of phenolic compounds in honeys and pollens collected by *A. mellifera*; b) the physical-chemical composition of honeys produced by *A. mellifera* and its fitting into Brazilian legislation; c) the phenolic contents of the pollen using different solvents; 4) the antioxidant activity of the honey and pollen by means of the DPPH and  $\beta$ -carotene-linoleic acid methods. The honey samples were obtained in the apiary of the Universidade Federal de Lavras – UFLA, and the commercial pollen from the municipality of Neópolis – SE, Brazil. The laboratory analyses of these compounds showed that the highest contents of phenolic compounds in honey were obtained from samples collected during months with lower pluviometric regimen. Regarding the pollen, we verified that the contents of phenolic compounds were influenced by the type of extractor used. The employment of acetone, 70% ethanol or the association of both in these same concentrations, allowed the achievement of higher percentages of phenolic compounds. The physical-chemical analyses showed that the evaluated honeys were inside the quality indexes established by Brazilian legislation. The chromatography showed the presence of phenolic compounds, with higher occurrence of: gallic acid, catechin, chlorogenic acid and p-cumaric acid. The antioxidant activity of the honeys, determined by the evaluated methods, were superior in periods of less relative air humidity.

Keywords: Bee. Pollinator. Honey. Pollen. Phenolic compound. Quality index.

## SUMÁRIO

	<b>CAPÍTULO 1</b> .....	11
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	11
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	16
<b>2.1</b>	<b>Produção e mercado de mel e pólen apícola no Brasil</b> .....	16
<b>2.2</b>	<b>O forrageamento por <i>Apis mellifera</i></b> .....	19
<b>2.3</b>	<b>Compostos fenólicos no mel, pólen e a utilização como alimentos funcionais</b> .....	21
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	24
	<b>CAPÍTULO 2 Características físico-químicas de méis produzidos pela abelha africanizada <i>Apis mellifera</i> Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae) em Lavras-MG</b> .....	30
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	32
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	34
<b>2.1</b>	<b>Teores de compostos fenólicos totais</b> .....	34
<b>2.2</b>	<b>Determinação da atividade antioxidante pelo radical DPPH</b> .....	35
<b>2.3</b>	<b>Determinação da atividade antioxidante pelo sistema <math>\beta</math>-caroteno ácido-linoleico</b> .....	36
<b>2.4</b>	<b>Análise dos dados</b> .....	37
<b>2.5</b>	<b>Características organolépticas e físico-químicas do mel</b> .....	37
<b>2.6</b>	<b>pH</b> .....	38
<b>2.7</b>	<b>Acidez</b> .....	38
<b>2.8</b>	<b>Sólidos solúveis nos méis</b> .....	39
<b>2.9</b>	<b>Umidade e matéria seca</b> .....	39
<b>2.10</b>	<b>Cinzas</b> .....	40
<b>2.11</b>	<b>Prova quantitativa de hidroximetilfurfural (HMF) e diástase</b> .....	40
<b>2.12</b>	<b>Açúcares</b> .....	41
<b>2.13</b>	<b>Análise cromatográfica</b> .....	41
<b>2.13.1</b>	<b>Descrição dos reagentes</b> .....	42
<b>2.13.2</b>	<b>Preparação das amostras e padrões</b> .....	42
<b>2.13.3</b>	<b>Equipamentos e condições cromatográficas</b> .....	43
<b>2.13.4</b>	<b>Identificação e quantificação dos compostos</b> .....	43
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	45
<b>3.1</b>	<b>Compostos fenólicos totais</b> .....	45
<b>3.2</b>	<b>Compostos fenólicos presentes no mel</b> .....	54
<b>3.3</b>	<b>Análises físico-químicas do mel</b> .....	58
<b>3.3.1</b>	<b>Açúcares, umidade e sólidos solúveis</b> .....	59
<b>3.3.2</b>	<b>Teores de cinza, pH e cor</b> .....	61
<b>3.3.3</b>	<b>Acidez, atividade diastásica e HMF</b> .....	62
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	64

	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>65</b>
	<b>CAPÍTULO 3 Extração de fenólicos totais e atividade antioxidante em pólen apícola coletado por <i>Apis mellifera</i> Linnaeus, 1758 (Hymenoptera:Apidae) .....</b>	<b>70</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>72</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>74</b>
<b>2.1</b>	<b>Produção dos extratos e determinação de compostos fenólicos ....</b>	<b>74</b>
<b>2.2</b>	<b>Atividade antioxidante: método radical do DPPH.....</b>	<b>76</b>
<b>2.3</b>	<b>Método da solução sistema <math>\beta</math>-caroteno ácido-linoleico .....</b>	<b>76</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>78</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>82</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>83</b>

## CAPÍTULO 1

### 1 INTRODUÇÃO GERAL

Desde que o homem iniciou a criação racional de abelhas até os dias atuais, tem-se entre as diversas espécies desse grupo de Apidae, as abelhas do gênero *Apis*, as quais encontram-se adaptadas a diversas condições climáticas e diferentes biomas. Os relatos históricos das interações entre as civilizações primitivas, no que concerne à exploração de mel, o mencionam como alimento sagrado por alguns povos. Segundo Crane (1983), registros datados em 2.400 a.C evidenciaram que os egípcios são considerados os pioneiros na criação de abelhas, desenvolvendo no passado técnicas que até hoje são comercialmente importantes. Naquela época, as abelhas eram mantidas em potes de barro, possibilitando o manejo e seu transporte, sendo exploradas, basicamente, a produção de mel e cera.

No tocante a apicultura no Brasil, sabe-se que, as abelhas nativas eram as únicas presentes até 1839, quando ocorreu a importação de colônias de *Apis mellifera* Linnaeus, 1758, originária da cidade do Porto, em Portugal, pelo padre Antônio Pinto Carneiro. A importação objetivou incrementar a produção de cera, uma vez que existia demanda dessa matéria-prima para a produção de velas. Naquela oportunidade, não foi possível alcançar com as espécies nativas de meliponíneos, níveis de produção comercial de cera para atender a procura pelo produto. Além desse aspecto, produziam maior quantidade de mel com aroma e sabor mais agradável (ROUBIK, 1989; NOGUEIRA-NETO, 1997).

Mesmo com a presença da abelha europeia no Brasil, até meados da década de 1950, a produção de mel no Brasil era de aproximadamente quatro mil ton./ano. Assim, para melhorar a produção de mel no país uma das alternativas era a introdução de material genético de outra região e que apresentasse maior

produtividade. Um dos critérios para essa iniciativa era introduzir insetos que fossem oriundos de áreas onde as condições climáticas fossem semelhantes às brasileiras (STORT; GONÇALVES, 1978). Nesse contexto, foi introduzida da África do Sul *Apis mellifera scutellata* Lepeletier, 1836. Essas abelhas eram mais produtivas do que as europeias, com produção da ordem de 70kg/colmeia/ano (STORT; GONÇALVES, 1978; GONÇALVES, 2004).

Após a introdução da *A. m. scutellata* e em função de características comportamentais até então desconhecidas, houve enxameamento e o cruzamento natural com abelhas de origem europeia, surgindo na região Neotropical o híbrido fértil conhecido como “abelha africanizada” (STORT; GONÇALVES, 1978; NOGUEIRA-NETO, 1997). Na realidade, o apicultor brasileiro se deparou com uma nova situação, pois essas abelhas, apesar de mais produtivas e com maior resistência a diversas epizootias, eram mais agressivas. Isso exigiu aprimorar seus conhecimentos sobre aspectos biológicos, comportamentais, manejo e equipamentos para adaptarem-se às novas condições necessárias para criar e explorar comercialmente essa atividade (PAULA, 2008).

O impulso da apicultura no Brasil ocorreu a partir da década de 1970 aliadas aos fatores: a) as pesquisas sobre genética, manejo, biologia e comportamento; b) características climáticas do país favoráveis à criação ininterrupta durante todo o ano; c) diversidade da flora nativa, aliada às espécies exóticas de interesse agrícola com as quais a abelha interagiu positivamente, proporcionando ampla oferta de recursos alimentares; d) aumento das exportações de mel a partir de 2002, exigindo a profissionalização dos apicultores e a adoção de metodologias técnico/científicas que fossem executadas desde o manejo dos enxames até o processamento e comercialização dos produtos (GONÇALVES, 2004).

O desenvolvimento e a exploração da atividade apícola envolvem diferentes etapas podendo-se destacar a produção de mel, porém, a contribuição

mais importante da apicultura para plantas nativas e cultivadas, decorre da interação inseto-planta, que é a polinização. As abelhas são os polinizadores mais eficientes das angiospermas e durante a visita floral, na busca por recursos alimentares, transportam o pólen das anteras de uma flor até o estigma da mesma flor, ou de outra flor da mesma espécie, realizando a polinização (FREE, 1993; PAULA, 2008).

Quando se considera os produtos apícolas para consumo humano, o mel, por seu valor energético e o pólen, pelo seu valor nutricional, têm importância comercial como produtos naturais e de valor nutricional. Em relação ao mel, por se tratar de um produto de amplo conhecimento do público em geral e para que seu valor alimentício seja validado é necessário que suas características físico-químicas, organolépticas e de origem botânica, estejam de acordo com as normas específicas de qualidade (BRASIL, 1981; BRASIL, 2000).

O pólen apícola, de forma semelhante ao mel, e mesmo não sendo utilizado correntemente na alimentação pelo homem na mesma proporção, também é uma fonte importante de nutrientes (BRASIL, 2006). Embora a composição química do pólen seja variável em função de sua origem botânica, poderá apresentar teores de nitrogênio em torno de 97,0 % e de proteína bruta de 28,0 %. São ainda constituídos por vitaminas C, D, A, E e do complexo B, enzimas, hormônios, pigmentos e antibióticos. O pólen apícola tem sido empregado na alimentação humana com a finalidade de suplementação alimentar, contudo é necessário conhecer suas características químicas, físicas e biológicas para que sejam estabelecidas normas para o consumo humano (KEVAN; BAKER, 1983; MARCHINI; REIS; MORETI, 2006; MODRO et al., 2009; MELO et al., 2009).

Uma das maneiras de se avaliar a qualidade alimentar do mel e do pólen para a alimentação humana é por meio da quantificação do teor total de compostos fenólicos. Essas substâncias secundárias são formadas por estruturas

químicas que apresentam hidroxilas e anéis aromáticos, sobformas simples ou de polímeros sendo que, tais compostos podem estar em forma livre ou complexada. Os compostos fenólicos têm sido estudados, entre outros aspectos, em razão da influência exercida sobre a qualidade dos alimentos (CARPES et al., 2008).

Ácidos fenólicos, flavonóides e taninos são exemplos de compostos fenólicos encontrados em alimentos, inclusive no mel e no pólen apícola. A propriedade antioxidante exercida pelos compostos fenólicos é decorrente da constituição química das moléculas desses produtos, que permite atuarem como sequestradores de radicais livres e algumas vezes como quelantes de metais, agindo tanto na etapa inicial como durante a propagação do processo oxidativo (ÂNGELO; JORGE, 2007). Esses compostos agem no metabolismo humano neutralizando os radicais livres gerados, os quais se encontram associados a determinadas enfermidades, inclusive certos tipos de câncer e doenças cardiovasculares (TOVANI, 2009). Carpes et al. (2008) constataram que a atividade antioxidante (AAT) de extratos de pólen apícola foi semelhante ao  $\alpha$ -tocoferol e maior que o butil-hidroxi-tolueno (BHT) e também do butil-hidroxi-anisol (BHA). Esses compostos são amplamente utilizados na indústria como conservantes de alimentos.

Outro método para se avaliar e quantificar com maior precisão os ácidos fenólicos em alimentos é por meio da cromatografia líquida de fase reversa (CARPES et al., 2008).

Um dos métodos usuais para a determinação do teor total de compostos fenólicos no mel e no pólen é por meio da espectrofotometria (MARCUCCI; WOISKY; SALATINO, 2003). Nesse caso, emprega-se o espectrofotômetro com leitura colorimétrica realizada a 760 nanômetros e utilizando o reagente de Folin-Ciocalteau, sendo o ácido gálico utilizado como padrão de referência (WATERHOUSE, 2002). Esse reagente é uma solução de íons poliméricos

complexos formados a partir de heteropoliácidos fosfomolibdicos e fosfotúngsticos. Nessa reação, ocorre a oxidação dos fenolatos, reduzindo os ácidos a um complexo cuja coloração é medida por meio da leitura da absorbância (MEDA et al., 2005; NEVES; ALENCAR; CARPES, 2009).

Ângelo e Jorge (2007) relataram a necessidade de se estabelecer um método padronizado para a preparação de amostras e de determinação de substância fenólicas em alimentos de uma maneira geral. Todavia, sabe-se que para a extração dos compostos fenólicos em amostras de pólen, o solvente mais utilizado é o metanol. Esse extrator pode também ser substituído por soluções aquosas de etanol, uma vez que o tipo e a concentração do solvente poderão influenciar na quantidade de compostos fenólicos extraídos (KROYER; HEGEDUS, 2001). As pesquisas realizadas por Moure et al. (2001) e Andreo e Jorge (2006) demonstraram que teor total dos compostos fenólicos extraídos é dependente do tipo de solvente. Foi ainda observado que a polaridade pode afetar a transferência de elétrons e de átomos de hidrogênio, sendo esse um dos principais aspectos durante o processo de extração dos compostos fenólicos.

Considerando a importância do mel e do pólen quanto ao seu emprego como alimento para o homem e a necessidade de conhecer as propriedades físico-químicas desses produtos, avaliou-se:

- a) os teores de compostos fenólicos dos méis e pólenes coletados por *A. mellifera* na região de Lavras;
- b) a composição físico-química dos méis produzidos por *A. mellifera* e seu enquadramento nas especificações da legislação brasileira;
- c) os teores de compostos fenólicos do pólen apícola com o uso de diferentes solventes;
- d) a atividade antioxidante do mel e pólen apícola pelo método DPPH e  $\beta$ -caroteno ácido-linoleico.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Produção e mercado de mel e pólen apícola no Brasil

Apesar da apicultura no Brasil existir desde a introdução de *A. mellifera* em 1839, durante a década de 1950 se tornou iminente a necessidade de implantar melhorias no material genético aqui existente e, em 1956, ocorreu a introdução da espécie africana *A. m. scutellata*. A partir de 1970, a atividade apícola passou por uma transformação total, até que em meados da década de 2000, o Brasil se posicionou entre os principais exportadores mundiais de mel (STORT; GONÇALVES, 1978; BRAND, 1988; BRASIL, 2006).

Durante a década de 2000 a 2010, mudanças ocorridas no mercado internacional proporcionaram ao Brasil a oportunidade de ocupar lugar de destaque mundial na exportação de mel. No ano de 2000, aproximadamente 270 toneladas de mel foram exportadas, sendo que em 2003, o volume de mel exportado foi da ordem de 19 mil toneladas, um aumento de 7,2 mil % em produção (BRASIL, 2006). Nos anos seguintes, ocorreu uma redução nesses índices, em razão da concorrência oferecida por méis produzidos pela China e Argentina no mercado internacional. Porém, a União Europeia promoveu um embargo à importação do mel brasileiro, pelo descumprimento quanto ao não credenciamento de laboratórios para realização de análises de qualidade físico-químicas e as validações dos métodos de análise além da não realização de estudos sobre doenças apícolas no Brasil (GONÇALVES, 2004; RESENDE; VIEIRA, 2006).

No entanto, quando China e Argentina tiveram suas exportações de mel embargadas por seus importadores, o Brasil novamente se destacou como exportador de mel. O principal motivo do embargo promovido pelo mercado europeu às importações dos méis produzidos na China foi de ordem sanitária,

tendo sido constatada a presença de clorafenicol nesses méis. O medicamento foi empregado pelos apicultores chineses para o controle de enfermidades em abelhas. Em relação à Argentina a causa do embargo foi uma medida “antidumping” promovido por importadores, sendo que esses dois países eram responsáveis por 21% e 18%, da exportação mundial de mel, respectivamente (RESENDE; VIEIRA, 2006).

A saída da China e Argentina nos anos de 2005 e 2006 do cenário internacional, criou a oportunidade de mercado às exportações do mel brasileiro. Essas se estabilizaram em um patamar de 14,5 mil toneladas/ano, índices que permaneceram estáveis após o retorno desses dois fornecedores ao comércio internacional, espaço que o Brasil conquistou como exportador de mel (RESENDE; VIEIRA, 2006; PAULA, 2008).

Segundo a ABEMEL (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS EXPORTADORES DE MEL, 2014), o Brasil exportou em 2013 um volume superior a 16 mil de toneladas de mel com uma receita de US\$54,1 milhões de dólares, ocupando o 10º lugar entre os países exportadores mundiais de mel. No mesmo período, o estado de Minas Gerais exportou apenas 520 toneladas, ocupando o 7º lugar entre os estados exportadores. Ressalta-se que até 1956 a produção de mel no Brasil não ultrapassava 4 mil toneladas/ano e somente após a introdução da abelha do Continente Africano foi possível aprimorar cada etapa da atividade apícola, melhorando significativamente a produção de mel (GONÇALVES, 2004).

Pesquisas sobre o perfil do consumidor de mel demonstram que há uma relação direta entre o poder aquisitivo e o consumo “per capita”. No Brasil, esse valor é de aproximadamente de 22 g/pessoa/ano, ao contrário, em alguns países europeus o consumo ultrapassa 1000 g/pessoa/ano. O baixo consumo de mel pelo brasileiro pode ser explicado pela falta de hábito em utilizá-lo como alimento. O mel ainda é visto apenas como medicamento pela maioria e não

mais de 29% da população brasileira consome mel diariamente, portanto, são consumidores eventuais do produto (BRASIL, 2006).

Em relação ao pólen, as abelhas o utilizam como fonte de proteínas, sais minerais e outros nutrientes necessários ao seu metabolismo (ROUBIK, 2006). O pólen apícola se tornou importante para a alimentação humana, a partir de estudos que comprovaram sua contribuição para o metabolismo como alimento funcional (OLIVEIRA et al., 2002). A produção de pólen apícola no Brasil, em escala comercial, foi iniciada no final da década de 1980. Essa exploração comercial foi incentivada pelo mercado de alimentos funcionais que resultou em mais uma especialização dentro da atividade apícola (BARRETO; FUNARI; ORSI, 2005).

Quanto à produção de pólen apícola no Brasil não há dados precisos, mas sabe-se que é insuficiente para atender à demanda potencial e não existem números oficiais sobre o volume de pólen consumido no mercado brasileiro. A estimativa do setor é de que sejam produzidas 50 toneladas de pólen no país, e que a demanda potencial seja da ordem de 150 toneladas (BRASIL, 2006; PAULA, 2008).

Desse modo, é fundamental para as exportações de produtos apícolas e também para o comércio interno desses produtos, a realização de análises de índices de qualidade. Nesse contexto, as análises físico-químicas são as principais ferramentas para a avaliação dos indicadores de qualidade do mel e do pólen apícola (BRASIL, 2000).

Entre os fatores que influenciam a qualidade dos produtos apícolas os principais são a espécie vegetal e a origem botânica, os quais são dependentes das condições edafoclimáticas locais (COLLI et al., 2003; OLIVEIRA; CUNHA, 2005).

## 2.2 O forrageamento por *Apis mellifera*

Quanto maior a diversidade de fontes florais utilizadas para a coleta de alimento por uma colmeia, nutricionalmente mais enriquecido será o mel e o pólen nela armazenados (KEVAN; BAKER, 1983; KEVAN; PHILLIPS, 2001). Todavia, a interferência antrópica em áreas silvestres tem provocado à redução de biomas, motivo pelo qual a apicultura encontra-se cada vez mais dependente das áreas agrícolas (COLLI et al., 2003). Considerando a busca de recursos alimentares, a polinização é a contribuição de maior relevância promovida pelas abelhas nos sistemas de plantios agrícolas e em áreas silvestres, permitindo a produção de frutos e sementes (FREE, 1983).

Entre as principais culturas produzidas no Brasil e constantes da pauta de exportação brasileira, tem-se a soja, café, algodão, citros e derivados, melão, maçã, morango etc., sendo essas culturas diretamente dependentes da polinização realizada por *A. mellifera* para a produção de frutos. Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2006) os agronegócios representam 37% das exportações brasileiras, sendo a apicultura uma atividade diretamente associada ao manejo de áreas de produção agrícola.

Estudos sobre o hábito alimentar de *A. mellifera* demonstraram que essa abelha desempenha seletividade quanto às espécies botânicas utilizadas como recurso alimentar, evidenciando a existência de fatores que determinam a preferência floral durante a coleta dos recursos. Alguns estímulos florais são utilizados para sinalizar a localização das fontes alimentares às abelhas com a finalidade de garantir a visita floral e durante esse processo ocorre a polinização (RAMALHO; KLEINERT-GIOVANNINI; IMPERATRIZ-FONSECA, 1989; PIRANI; CORTOPASI-LAURINO, 1994).

Os estímulos florais usuais são odor, cor e composição química do néctar e do pólen (GOULSON, 1999; LIU et al., 2007). Pesquisas indicam que

acomposição química do néctar e do pólen é determinante no momento da escolha da fonte botânica e que as estratégias de forrageamento e coleta, variam de acordo com a composição nutricional e, também, de acordo com a distribuição geográfica das fontes alimentares (KEVAN; BAKER, 1983; BARTH, 2004; LAWRENCE; BARRET, 2006; MODRO et al., 2009).

A abelha *A. mellifera* é capaz de associar a presença de substâncias no ar ou em meio líquido em diferentes espécies botânicas e isso orienta as operárias durante a escolha das fontes alimentares, principalmente do néctar. Estudos ecológicos demonstram que os visitantes florais aprendem a associar o aroma e o sabor do recurso alimentar oferecido pelas plantas, com o contraste visual apresentado por suas flores. Estas, por sua vez, atraem seus polinizadores efetivos por meio de odores presentes nesses recursos, exercendo o efeito atrativo e/ou repelente no momento da visita floral (DALY; DOYEN; PURCELL, 1998; RAGUSO, 2008).

Liu et al. (2007) verificaram que a presença de carboidratos no néctar definem um mecanismo atrativo aos polinizadores. Testes realizados com *Apis cerana* Fabricius, 1793 alimentadas com sacarose em concentrações de 10 a 40% e associadas a flavonoides, evidenciaram que concentrações de sacarose menor ou igual a 35% apresentaram respostas significativas e diretamente proporcionais à presença de flavonoides. Néctares com menores teores de carboidratos e com a presença de compostos fenólicos, favoreceram o consumo desse alimento pelas abelhas. Em estudo semelhante, Roubik e Buchmann (1984) verificaram a preferência de *A. mellifera* para soluções de sacarose com concentrações menores ou iguais a 45%.

Considerando que compostos fenólicos ocorrem no néctar e exercem influência sobre a atração de polinizadores, seus teores se expressam no mel (LIU et al., 2007). Assim, análises quantitativas dos teores de compostos fenólicos nos méis são essenciais para a caracterização da qualidade desses

produtos. Embora não exista uma padronização no método de extração dos compostos fenólicos para amostras de méis, as metodologias relatadas na literatura demonstram serem adequadas para a realização dessas análises (MALERBO-SOUZA et al., 2003; MEDA et al., 2005; BALTRUSAITYTE; VENSKUTONIS; CEKSTERYTE, 2007; NEVES; ALENCAR; CARPES, 2009; IURLINA et al., 2009).

### **2.3 Compostos fenólicos no mel, pólen e a utilização como alimentos funcionais**

Compostos fenólicos são metabólitos secundários produzidos por vegetais e essenciais ao seu metabolismo nas etapas de crescimento e reprodução. Várias substâncias constituem esse grupo de compostos químicos, destacando-se entre outros os ácidos fenólicos: gálico, tânico, resveratrol, os quais por sua constituição química possuem propriedades antioxidantes (McCLANAHAN; FEENSTRA, 2012).

A função antioxidante exercida no metabolismo de seus consumidores é decorrente da neutralização dos radicais livres, os quais são agentes causadores de algumas patologias como as doenças cardiovasculares, isquemias cerebral e cardíaca, doença de Parkinson, distúrbios gastrointestinais, aceleração do envelhecimento. Compostos fenólicos também podem atuar como substâncias anti-inflamatórias e antimicrobianas no organismo de seus consumidores (MORAES; COLLA, 2006; ÂNGELO; JORGE, 2007).

Levando-se em consideração a constituição química e a contribuição nutricional dos alimentos torna-se possível compreender o conceito de alimento funcional, que surgiu em meados dos anos 1980, devido ao crescimento da população de idosos no mundo e também ao aumento da expectativa de vida da população mundial. Estudos com o objetivo de promover o uso de uma

alimentação humana mais saudável motivaram pesquisas sobre a funcionalidade dos nutrientes presentes nos alimentos. Esse conceito foi lançado inicialmente por pesquisadores japoneses e tornou-se amplamente conhecido (McCLANAHAN; FEENSTRA, 2012).

Alimentos funcionais por definição são aqueles que apresentam naturalmente em sua composição química algum composto que favoreça funções metabólicas de seus consumidores, eliminando ou atenuando patologias. No entanto, é comum os alimentos funcionais serem confundidos com outra categoria de alimentos, conhecidos como alimentos nutracênticos, que são aqueles que recebem adição de nutrientes durante um processamento industrial (OLIVEIRA et al., 2002).

Nesse contexto, o mel e o pólen apícola são considerados alimentos funcionais e para serem comercializados devem estar em acordo com padrões e normas de qualidade vigentes em legislação própria. Visto que orientações e normas específicas sobre as informações nutricionais devem constar nos rótulos desses alimentos de maneira a fornecer ao consumidor informações nutricionais sobre esses produtos (BRASIL, 1999a; BRASIL, 1999b; BRASIL, 2000).

Os compostos fenólicos são componentes que conferem características funcionais ao mel e ao pólen e podem ser quantificados por meio de análises físico-químicas com a extração e posterior quantificação dos teores de fenólicos totais (LEE, 2004; MEDA et al., 2005; NEVES; ALENCAR; CARPES, 2009). A espectrofotometria é uma metodologia usual para esse processo, apresentando a vantagem de produzir resultados confiáveis a custos menores para a realização do processo (KROYER; HEGEDUS, 2001; MEDA et al. 2005; NEVES; ALENCAR; CARPES, 2009). Os principais fatores de influência na extração dos compostos fenólicos são: o solvente, tempo de extração e a temperatura utilizada durante o processo de extração (ANDREO; JORGE, 2006).

Entre os métodos de extração para análises de compostos fenólicos, os que utilizam solventes orgânicos são mais usuais, onde os solventes necessariamente são substâncias polares como a água, álcoois, éteres ou acetonas (MORAES; COLLA, 2006). A natureza química dos compostos fenólicos encontrados no mel e no pólen, cuja constituição molecular varia desde a mais simples até a altamente polarizada, permite a utilização de metodologia diferenciada das demais utilizadas para outras amostras vegetais. A origem botânica das amostras, partes anatômicas, tamanho das partículas analisadas, tempo e temperatura de extração e, principalmente, o solvente empregado durante a produção dos extratos vegetais, são fatores que influenciam os resultados das análises de teor compostos fenólicos em alimentos (KROYER; HEGEDUS, 2001; LEE, 2004; NACZK; SHAHIDI, 2004).

No caso do pólen apícola, os solventes etanol e metanol são os mais utilizados como extratores dos compostos fenólicos e o tempo de extração utilizado nessas análises é de aproximadamente 30 minutos (KROYER; HEGEDUS, 2001; NEVES; ALENCAR; CARPES, 2009).

O mel, por sua vez, por se tratar de alimento viscoso, geralmente sem partículas sólidas é preparado a partir de extratos aquosos e filtragem, utilizando-se alíquotas desse extrato sem sofrer novas diluições (BOGDANOV, 2011). O mel pode sofrer alterações em sua qualidade físico-química, devido à origem botânica, tipo de vasilhame, exposição à luz, tempo e temperatura de armazenamento, entre outros. A qualidade do pólen apícola, assim como a do mel, dependerá da fonte botânica utilizada (BRASIL, 2000; BERA; ALMEIDA-MURADIAN, 2007).

## REFERÊNCIAS

ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 24, n. 2, p. 319-336, jul./dez. 2006.

ÂNGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos, uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 66, n. 1, p. 232-240, jan./fev. 2007.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS EXPORTADORES DE MEL. **Dados das exportações de mel**. Janeiro: ABEMEL, 2014. Disponível em: <[http://www.beebrazil.com/inteligencia\\_comercial\\_abemel\\_dezembro.pdf](http://www.beebrazil.com/inteligencia_comercial_abemel_dezembro.pdf)>. Acesso em: 08 fev. 2014.

BALTRUŠAITYTĖ, V.; VENSKUTONIS, P. R.; ČEKŠTERYTĖ, V. Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts. **Food Chemistry**, London, v. 101, n. 2, p. 502-514, 2007.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 113-123, fev. 2006.

BARRETO, L. M. R. C.; FUNARI, S. R. C.; ORSI, R. O. Pólen apícola: perfil da produção no Brasil. In: CONGRESSO DE APICULTURA DEL MERCOSUR. 1., 2005, Punta Del Este. **Anais...** Punta del Este: [s.n], 2005. p. 1-20.

BARTH, O. M. Melissopalynology in Brazil: a review of pollen analysis of honeys, própolis and pollen loads of bees. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 61, n. 3, p. 342-350, May/June 2004.

BERA, A.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Propriedades físico-químicas de amostras comerciais de mel com própolis do estado de São Paulo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 49-52, 2007.

BOGDANOV, S. Honey as nutrient and functional food. In: BOGDANOV, S. (Ed.). **The bee products: the wonders of the bee hexagon**. Muehlethurnen: Bee Product Science, 2011. p. 57-88.

BRAND, D. D. The honeybee in New Spain and Mexico. **Journal of Cultural Geography**, Stillwater, v. 9, n. 1, p. 71-81, 1988.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Pecuária e Abastecimento. **Contribuições das câmaras setoriais e temáticas à formulação de políticas públicas e privadas para o agronegócio**. Brasília: MAPA, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 11 de 20 de outubro de 2000. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel. **Diário Oficial da União**, Brasília, 20 out. 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. **Defensivos agrícolas: guia informativo**. Brasília: Laboratório Nacional de Referência Animal, 1981.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 18 de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 30 abr. 1999a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 19. de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimento com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde em sua Rotulagem. **Diário Oficial da União**, Brasília, 30 abr. 1999b.

CARPES, S. T. et al. Avaliação do potencial antioxidante do pólen apícola produzido na região Sul do Brasil. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 7, p. 1660-1664, set./out., 2008.

COLLI, G. R. et al. Fragmentação dos ecossistemas e a biodiversidade brasileira: uma síntese. In: RAMBALDI, D. M.; OLIVEIRA, D. A. O. (Org.). **Fragmentação de ecossistemas: causas, efeitos sobre a biodiversidade e recomendações de políticas públicas**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2003. p. 317-324.

CRANE, E. **O livro do mel**. 2. ed. São Paulo. Nobel, 1983.

DALY, H. V.; DOYEN, J. T.; PURCELL, A. H. **Introduction to insect biology and diversity**. Oxford: Oxford University Press, 1998.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 61-68, jan./mar. 1997.

FREE, J. B. **Insect pollination of crops**. 2. ed. London, Academic Press, 1993.

GONÇALVES, L. S. Expansão da apicultura brasileira e suas perspectivas em relação ao mercado apícola internacional. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA; CONGRESSO BRASILEIRO DE MELIPONICULTURA, 15., 1., 2004, Natal. **Anais...** Natal: Sebrae, 2004.

GOULSON, D. Foraging strategies of insects for gathering nectar and pollen and implications for plant ecology and evolution. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, Jena, v. 2, n. 2, p. 185–209, 1999.

IURLINA, M. O. et al. Major flavonoids of Argentinean honeys. Optimisation of the extraction method and analysis of their content in relationship to the geographical source of honeys. **Food Chemistry**, London, v. 115, n. 3, p. 1141-1149, Aug. 2009.

KEVAN, P. G.; PHILLIPS, T. P. The economic impacts of pollinator declines: an approach to assessing the consequences. **Conservation Ecology**, Oxford, v. 5, n. 1, p. 51-58, Apr. 2001.

KEVAN, P. G.; BAKER, H. G. Insects as flower visitors and pollinators. **Annual Review of Entomology**, Paulo Alto, v. 28, p. 407-53, 1983.

KROYER, G.; HEGEDUS, N. Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 2, n. 3, p. 171-174, Sept. 2001.

LAWRENCE, D. H.; BARRETT, S. C. H. **Ecology and evolution of flowers**. London: Oxford University Press, 2006.

LEE, H. S. Phenolic compounds in food. In: NOLLET, L. M. L. (ED.). **Handbook Food Analysis: methods and instruments in applied food analysis: v. 1**. New York: CRC PRESS, 2004. P. 657-715.

LIU, F. et al. Adaptative functions of defensive plant phenolics and a non-linear response to nectar components. **British Ecological Society**, Amsterdam, v. 21, p. 69-100, 2007.

MALERBO-SOUZA, D. T. et al. Atrativo para as abelhas *Apis mellifera* e polinização em café (*Coffea arabica* L.). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, Saint Louis, v. 40, n. 4, p. 272-278, 2003.

MARCHINI, L. C.; REIS, V. D. A.; MORETI, A. C. C. C. Composição físico-química de amostras de pólen coletado por abelhas Africanizadas *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) em Piracicaba, Estado de São Paulo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 3, p. 949-953, jun. 2006.

MARCUCCI, M. C.; WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Uso do cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis. **Associação Paulista de Apicultores**, São Paulo, v. 46, p. 3-8, maio 2003. Disponível em: <<http://www.bichoonline.com.br/artigos/apa0014.htm>>. Acesso em: 29 set. 2012.

McCLANAHAN, C.; FEENSTRA, M. Dietary bioactives. **Biofiles**, Saint Louis, v. 7, n. 6, p. 1-35, 2012.

MEDA, A. et al. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, London, v. 91, n. 1, p. 571-577, July 2005.

MELO, I. L. P. et al. Relação entre a composição nutricional e a origem floral de pólen apícola desidratado. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 68, n. 3, p. 346-353, 2009.

MODRO, A. F. H. et al. Analysis of pollen load based on color, physicochemical composition and botanical source. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, Rio de Janeiro, v. 81, n. 2, p. 281-285, jun. 2009.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 2, p. 109-122, 2006.

MOURE, A. et al. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, London, v. 72, n. 2, p. 145-171, Feb. 2001.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. **Phenolics in food and nutraceuticals**. Washington: CRC Press, 2004.

NEVES, L. C.; ALENCAR, S. M. de; CARPES, S. T. Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonóides totais em amostras de pólen apícola de *Apis mellifera*. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 7, p. 107-110, jun. 2009.

NOGUEIRA-NETO, P. N. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. São Paulo. Nogueirapis, 1997.

OLIVEIRA, M. L.; CUNHA, J. A. Abelhas africanizadas *Apis mellifera scutellata* Lapeletier. 1836 (Hymenoptera: Apidae: Apinae) exploram recursos na floresta amazônica? **Acta Amazonica**, Manaus, v. 35, n. 3, p. 389-394, 2005.

OLIVEIRA, M. N. et al. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 38, n. 1, p. 1-21, jan./mar. 2002.

PAULA, J. **Mel do Brasil: as exportações brasileiras de mel no período 2000/2006 e o papel do Sebrae**. Brasília. SEBRAE, 2008.

PIRANI, J. R.; CORTOPASSI-LAURINO, M. **Flores e abelhas em São Paulo**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1994.

RAGUSO, R. A. Wake up and smell the roses: the ecology and evolution of floral scent. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, London, v. 39, p. 549–569, 2008.

RAMALHO, M.; KLEINERT-GIOVANNINI, A.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Utilization of floral resources by species of *Melipona* (Apidae. Meliponinae): floral preferences. **Apidologie**, Amsterdam, v. 20, n. 3, p. 185-195, 1989.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

RESENDE, R.; VIEIRA, A. Rede Apis – Elos integrados para uma apicultura sustentável. **Revista SEBRAE Agronegócios**, Brasília, n. 3, p. 6-7, maio 2006.

ROUBIK, D. W. **Ecology and natural history of tropical bee**. Cambridge: Tropical Biology Series, 1989.

ROUBIK, D. W. Stingless bee nesting biology. **Apidologie**, Amsterdam, v. 37, n. 7, p. 124–143, Mar./Apr. 2006.

ROUBIK, D. W.; BUCHMANN, S. L. Nectar selection by *Melipona* and *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) and the ecology of nectar intake by bee colonies in a tropical forest. *Oecologia*, Berlin, v. 61, n. 1, p. 1-10, 1984.

SHALINI, S. Natural antioxidants. *International Journal of Phytotherapy*, Oxford, v. 2, n. 1, p. 7-15, 2012.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C,  $\beta$ -carotene, and other carotenoids as antioxidants. American *Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda, v. 62, n. 6, p. 1315-1321, 1995.

STORT, A. C.; GONÇALVES, L. S. Abelha africanizada e a situação atual da apicultura no Brasil. *Ciência e Cultura*, São Paulo, v. 31, p. 32-43, 1978.

TOVANI, B. Dossiê antioxidantes. *Food Ingredients Brasil*, São Paulo, n. 6, 2009. Disponível em: <[www.revista-fi.com](http://www.revista-fi.com)>. Acesso em: 14 jun. 2012.

WATERHOUSE, A. L. Polyphenolics: determination of total phenolics. In: WROLSTAD, R. E. *Current protocols in food analytical chemistry*. New York: John Wiley & Sons, 2002. Cap. 1, p. 1-4.

**CAPÍTULO 2 Características físico-químicas de méis produzidos pela abelha africanizada *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae) em Lavras-MG**

**RESUMO**

O mel é o principal produto derivado da atividade apícola, sendo utilizado como alimento e também para fins terapêuticos. Assim, objetivou-se avaliar as características físico-químicas de méis coletados em Lavras – MG, no período de outubro/2012 a setembro/2013, para os parâmetros: a) teores de compostos fenólicos utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu; b) atividade antioxidante pelos métodos DPPH e  $\beta$ -caroteno ácido-linoleico; c) caracterização do perfil cromatográfico dos compostos fenólicos por cromatografia líquida. Também foram analisados os parâmetros determinantes dos índices de qualidade recomendados pela legislação brasileira. Os teores de compostos fenólicos foram variáveis ao longo do período de estudo e influenciados pelos fatores climáticos. O maior teor foi obtido no outono, seguido pelo verão, inverno e primavera. A atividade antioxidante determinada pelo método do DPPH e  $\beta$ -caroteno ácido-linoleico apresentaram variações durante os meses amostrados. Os compostos fenólicos ocorrentes nas amostras de méis com maior frequência foram: ácido-gálico; catequina; ácido clorogênico; ácido caféico e p-cumárico. O ácido gálico foi constatado em todas as amostras dos méis analisados e os demais ocorreram em pelo menos 83% dos méis amostrados. Constatou-se, por meio das análises físico-químicas, que os méis analisados encontravam-se em acordo com a legislação brasileira, regulamentadora para produtos de origem apícola.

Palavras-chave: Abelha. Folin-Ciocalteu. Antioxidante. HPLC. Ácido fenólico.

## ABSTRACT

Honey is the main product originated from apiculture activity, being used as food and for therapeutic purposes. Thus, the objective of this work was to evaluate the physical-chemical characteristics of honeys collected in Lavras-MG, Brazil, in the period from October/2012 to September/2013, for the following parameters: a) content of phenolic compounds using the Folin-Ciocalteu reagent; b) antioxidant activity by the DPPH and  $\beta$ -carotene linoleic-acid methods; c) characterization of the chromatographic profiles of the phenolic compounds by liquid chromatography. The quality index determining parameters, recommended by Brazilian legislation, were also analyzed. The content of phenolic compounds of the honeys varied over the period of study and were influenced by climate factors. The highest content was obtained during autumn, followed by summer, winter and spring. The antioxidant activity determined by the DPPH and  $\beta$ -carotene linoleic-acid methods presented variations during the sampled months. The phenolic compounds occurring in the honey samples with higher frequency were: gallic acid; catechin; chlorogenic acid; caffeic and p-cumaric acids. Gallic acid was found in all analyzed honey samples and the others occurred in at least 83% of the sampled honeys. It was observed by means of the physical-chemical analyses that the analyzed honeys were found to be in accordance with Brazilian legislation, regulation entity for products of apiculture origin.

Keywords: Bee. Folin-Ciocalteu. Antioxidant. HPLC. Phenolic acid.

## 1 INTRODUÇÃO

O néctar, principal matéria - prima utilizada na elaboração do mel por *Apis mellifera* Linnaeus, 1758, é produzido durante a fotossíntese. É composto por 95,0% de açúcares; 0,05% de aminoácidos; 0,02-0,45% de minerais, ácidos orgânicos, vitaminas e compostos aromáticos (BOGDANOV, 2011). Os nectários são estruturas especializadas na produção do néctar e constituídos de epiderme com ou sem tricomas e um parênquima especializado. Podem ocorrer superficialmente sobre a epiderme ou, ainda, apresentam-se em cavidades, em alguns casos muito profundas, conhecidas como nectários septais (FANH, 2000).

O aroma, paladar, coloração, viscosidade e propriedades medicinais do mel estão diretamente relacionados com a fonte de néctar que o originou (KEARNS; INOUYE, 1993; FANH, 2000). O mel é produzido pelas abelhas a partir do néctar das flores e constituído pela glicose e frutose até valores próximos a 80 % do total de açúcares ocorrentes nesse alimento. Durante o processo de transformação do néctar em mel, ocorrem transformações físico-químicas promovidas pelas abelhas, entre essas a desidratação e a transformação enzimática dos açúcares são as mais importantes (SHUEL, 2010). Ao final do tempo dos processos de desidratação e de ação enzimática, parte da água presente no néctar é eliminada, atingindo um teor final próximo de 18% e a ação das enzimas transforma o néctar produzindo uma mistura complexa de carboidratos, enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos, minerais e pólen (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985; BRASIL, 2002; BOGDANOV, 2011).

O mel é um alimento agradável ao paladar humano e sua qualidade alimentar depende das suas características físico-químicas, as quais fornecerão critérios que ajudarão a determinar a identidade e a qualidade nutricional (BRASIL, 1981; BRASIL, 2002).

O teor de compostos fenólicos e a capacidade de atividade antioxidante presentes no mel variam em função das fontes florais utilizadas pelas abelhas durante a coleta e essas, por sua vez, dependem entre outros aspectos, dos fatores climáticos e das condições edafoclimáticas predominantes (MENEZES et al., 2010; SHUEL, 2010). Os métodos para avaliação da atividade antioxidante total são diversos, porém alguns são mais apropriados, dependendo da natureza dos compostos presentes no alimento sob análise (SUCUPIRA et al., 2012).

Considerando os atributos do mel quanto à composição físico-química e sua importância como fonte de nutrientes, no presente trabalho, objetivou-se:

- a) Determinar as características físico-químicas dos méis produzidos por *Apis mellifera*, em Lavras-MG e seu enquadramento nas especificações da legislação brasileira;
- b) determinar os teores de compostos fenólicos dos méis, por meio de espectrofotometria e cromatografia líquida;
- c) determinar a capacidade antioxidante dos méis analisados pelos testes de DPPH e  $\beta$ -caroteno ácido-linoleico.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

As amostras de méis foram obtidas no apiário da Universidade Federal de Lavras, UFLA, sendo retiradas de quadros de melgueira, cujas células encontravam-se totalmente operculadas. Posteriormente, foram desoperculados e submetidos à centrifugação para coleta final das amostras. As coletas foram realizadas entre os dias 15 e 20 nos meses de abril de 2012 a setembro de 2013, totalizando 18 amostras, as quais foram usadas para as análises físico-químicas. Após a coleta, os méis eram processados para as análises físico-químicas de pH, cor e acidez. Para a execução das demais análises, as amostras foram armazenadas a 25°C e ao abrigo da luz.

Para as análises dos teores de compostos fenólicos, atividade antioxidante por meio do DPPH e  $\beta$ -caroteno ácido-linoleico e cromatografia líquida, foram empregados os méis coletados nos meses de outubro de 2012 a setembro de 2013.

Para se fazer a correlação de Pearson, utilizaram-se os dados climatológicos de temperatura, umidade relativa, precipitação e número de horas de luz nos meses considerados e obtidos na estação climatológica da UFLA.

### **2.1 Teores de compostos fenólicos totais**

Os teores de compostos fenólicos das amostras foram determinados segundo a metodologia proposta por Meda et al. (2005), utilizando-se o reagente de Folin-Ciocalteu. A concentração do reagente foi de 10 % (v/v) e a concentração do carbonato de sódio foi 4% (p/v). Cada amostra, denominada extrato de mel, foi preparada pesando-se 5,0 g de mel e diluindo-os em água destilada até completar o volume de 50 mL, seguido de filtração da mistura em filtro de papel Whatman nº 3.

As amostras foram acondicionadas em tubos de ensaio envolvidos em papel alumínio, sendo utilizadas alíquotas de 0,5 mL do extrato, que recebeu 2,5 mL da solução do reagente de Folin-Ciocalteu e, em seguida, 2,0 mL da solução de carbonato de sódio. Posteriormente, foram levadas ao agitador de tubos tipo vortex até a obtenção de mistura homogênea e mantidas em repouso por 120 minutos. A absorbância a 760 nanômetros (nm) foi realizada em temperatura ambiente. O branco para esse teste foi preparado com 0,5 mL de etanol absoluto P.A; 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu (10%) e 2,0 mL de carbonato de sódio (4%). As amostras foram preparadas em triplicata, sendo o valor do conteúdo total de compostos fenólicos das amostras expresso mg GAE / 100g de mel.

Os teores de compostos fenólicos foram calculados segundo Singleton; Orthofer e Lamuela-Raventos (1999) e Waterhouse (2002) construindo-se uma curva padrão de calibração do ácido gálico, contendo 10; 25; 40; 70; 85 e 100 ppm desse mesmo ácido dissolvido em álcool etílico absoluto. Os resultados foram expressos em mg GAE/100 g de mel (GAE: equivalente em ácido gálico).

## **2.2 Determinação da atividade antioxidante pelo radical DPPH**

Empregou-se o método desenvolvido por Rufino et al. (2007), utilizando-se uma alíquota de 0,1 mL da solução do extrato de mel de forma semelhante àquela usada na análise anterior e referente a cada mês de coleta. As alíquotas foram preparadas triplicata e colocadas em tubos de ensaio protegido da incidência de luz, por papel alumínio e adicionados 3,9 mL da solução do radical 2,2-difenil-1-picrylhydrazil (DPPH) a 0,06 mM. Cada tubo foi homogeneizado em agitador de tubos tipo vortex e mantidos em repouso por um período de 90 minutos para se fazer as leituras no espectrofotômetro ajustado para o comprimento de onda de 515 nm, calibrado com metanol a 100% PA e

utilizado como teste em branco. A porcentagem de atividade sequestrante (% AA) foi determinada pela fórmula de Mensor et al. (2001).

$$\% \text{ AA} = 100 - \left\{ \frac{(\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}}) * 100}{\text{Abs}_{\text{controle}}} \right\}$$

### **2.3 Determinação da atividade antioxidante pelo sistema $\beta$ -caroteno ácido-linoleico**

Para determinar a atividade antioxidante, foram adotados os procedimentos propostos por Rufino et al. (2006). Utilizou-se uma solução sistema contendo 50  $\mu$ l de  $\beta$ -caroteno, 40  $\mu$ L de ácido linoleico, 530  $\mu$ L de Tween 40 e 1,0 mL de clorofórmio PA, o qual foi posteriormente evaporado em capela de exaustão. De forma concomitante, 500 mL de água destilada foram oxigenados por borbulhamento, durante 30 minutos, com o auxílio de uma bomba de vácuo. Ao final do processo, obtinha-se água tratada com oxigênio a qual foi utilizada para diluir a solução sistema. Após a evaporação total do clorofórmio, adicionou-se gradativamente a água tratada com oxigênio à solução até obter uma coloração amarela-alaranjada, cujos valores de absorbância poderiam variar entre 0,6 nm e 0,7 nm. As leituras de absorbância foram realizadas em triplicata com espectrofotômetro ajustado para um comprimento de onda de 470 nm e zerado utilizando-se água destilada e deionizada como branco.

A determinação da atividade antioxidante foi feita empregando-se uma alíquota de 0,4 mL de cada extrato de mel acrescidos de 5,0 mL da solução sistema, em tubos de ensaio protegidos da incidência de luz. A primeira leitura foi realizada em até dois minutos após a mistura do extrato de mel com a solução sistema. Após a primeira leitura, os tubos contendo as amostras de mel e os que continham a solução sistema foram colocados em banho de água

termostetizada a 40°C, durante 120 minutos até ocorrer todo o processo da reação e, então, foi realizada a segunda leitura de absorvância. Os resultados foram expressos em percentual de proteção do  $\beta$ -caroteno (% P), obtido aplicando-se as fórmulas:

Porcentual de Oxidação (%O)

$$\% O = (Ac - Am).100/Ac$$

Ac = absorvância inicial do controle – absorvância final do controle

Am = absorvância inicial da amostra – absorvância final da amostra

Porcentual de Proteção (%P)

$$\% P = 100 - \%O$$

#### **2.4 Análise dos dados**

Aos dados obtidos, aplicou-se o teste de médias de Skott-Knott a 5%. As correlações com os fatores climáticos umidade, fotoperíodo, temperatura e precipitação foram realizadas segundo Figueiredo Filho; Silva Júnior (2009) empregando-se o teste de correlação de Pearson ( $p = 0,05$ ).

#### **2.5 Características organolépticas e físico-químicas do mel**

Os parâmetros utilizados como referência para os índices de qualidade do mel (Tabela 1) foram aqueles estabelecidos pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel, Brasil (2000). As análises foram feitas segundo as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985) e Laboratório Nacional de

Referência Animal (BRASIL, 1981), as quais descrevem os protocolos para as análises de rotina.

Tabela 1 Índices de qualidade do mel recomendados pela Instrução Normativa nº 11 Ministério da Agricultura e Abastecimento de 20 outubro de 2000.

Parâmetros	Valores de referência
Açúcares totais	65 %
Glicose	65 a 72 %
Sacarose	6 %
Umidade	20 %
Sólidos solúveis	72,45±5,66 ° Brix
Cinzas	0,6 a 1,0 %
pH	3,3 a 4,6
Acidez	20 meq/kg
Atividade diastásica	mínimo 3,0 (escala Göthe) se
HMF	HMF ≤ 15 mg/kg
	Até 40 mg/kg

Fonte: BRASIL, 2000.

## 2.6 pH

Os valores de pH dos méis foram determinados segundo o método eletrométrico, utilizando-se um pH metro digital de bancada. Foi preparada uma solução aquosa de mel, contendo 5,0g de mel e volume completado para 50 mL com água destilada e deionizada. A solução foi homogeneizada, filtrada em papel de filtro qualitativo e realizadas as leituras dos valores de pH. Ao término das leituras, as amostras foram utilizadas para o teste de acidez.

## 2.7 Acidez

Esse parâmetro foi avaliado baseando-se nas recomendações de Rodgers (1979) e Bogdanov (2011). A acidez livre não se encontra diretamente

relacionada com os valores de pH, estando em função do efeito tamponante dos ácidos e minerais que compõem o mel e que são produzidos pela ação da enzima glicose-oxidase, que influenciam diretamente na concentração de açúcares e, conseqüentemente, a fração sabor do mel

O método utilizado na determinação da acidez livre (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985) foi obtido pela titulação da amostra com hidróxido de sódio 0,1 N, até atingir pH 8,3 e considerado ponto de equivalência. O volume de solução de NaOH titulado foi anotado e o valor da acidez (meq/kg) calculado pela fórmula:

$$\text{Acidez} = V * f * 10$$

Sendo:

V = volume gasto da solução em mL de NaOH (0,1N);

f = normalidade real ÷ normalidade teórica = 1.016.

## **2.8 Sólidos solúveis nos méis**

Uma das variáveis agroindustriais amplamente utilizadas é o grau Brix (%), cuja medida corresponde a 1,0 g de sólidos solúveis dissolvidos em 100 g de solução a 20°C. Para as análises de mel, os valores de graus Brix indicam o teor de sólidos solúveis, sendo o índice expresso em porcentagem.

## **2.9 Umidade e matéria seca**

A determinação dos teores de umidade nos méis foi realizada por meio do método refratométrico indireto, onde os valores registrados para cada amostra, durante a leitura de sólidos solúveis, são convertidos em índice de

refração (BERA, 2010). Os índices obtidos foram comparados na tabela de Chataway, fazendo-se as correções e considerando a temperatura no momento da leitura de sólidos solúveis. O teor matéria seca foi calculado pela diferença do valor do teor de umidade, pela fórmula: Matéria seca= (100-valor umidade).

### **2.10 Cinzas**

O teor de cinzas presente nos méis foi determinado pelo método do resíduo por incineração obtida em temperatura próxima a 550°C (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985). Alíquotas de 2,0 g de mel foram colocadas em placas de porcelana apoiadas em tela de amianto e incineradas. Após a incineração completa do material as amostras foram levadas a mufla regulada a 550°C até a eliminação completa do carvão. As cinzas apresentavam coloração próxima do branco e, nessa fase, não apresentam variações de peso. O teor foi calculado pela fórmula:

$$\text{Porcentagem de cinzas} = (P * 100) / p',$$

Sendo:

P = peso do resíduo em g; p' = peso da amostra em g.

### **2.11 Prova quantitativa de hidroximetilfurfural (HMF) e diástase**

Os teores de HMF e índice de diástase foram avaliados pelo Laboratório de Controle de Qualidade de Produtos Apícolas - EMBRAPA - Meio Norte; Teresina – PI. Os valores de HMF foram determinados por análise colorimétrica, utilizando-se comprimento de onda = 284nm para evitar interferência de outros componentes. A atividade diastásica foi determinada pelo método colorimétrico

que se fundamenta na hidrólise do amido pela ação das amilases existente no mel, utilizou-se comprimento de onda = 660nm e os resultados foram expressos em unidades da escala Göthe/g de mel.

### **2.12 Açúcares**

Os açúcares foram determinados segundo a técnica Somogyi e modificados por Nelson (1944), sendo os resultados expressos em porcentagem (g/100g mel). Empregando-se esse método, há a formação de óxido cuproso que se reduz a óxido de molibdênio a partir da reação com arsênico-molibídico. A solução final apresenta coloração azul, cuja intensidade é proporcional à quantidade de açúcares redutores existentes na amostra. Os teores de açúcares totais e as frações de glicose e sacarose foram calculados por espectrofotometria a 450 nm, utilizando-se uma curva de calibração de glicose com intervalos de 0 a 120 mg/1000 mL por meio da equação:

$$Y = 0,005x - 0,0056 (R^2 = 0.9989).$$

Sendo: Y = Absorbância

### **2.13 Análise cromatográfica**

Foi utilizada a técnica de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) para determinar o perfil e quantificação de compostos fenólicos presentes nas amostras de mel.

### 2.13.1 Descrição dos reagentes

Os padrões empregados para análise dos compostos fenólicos foram ácido gálico, ácido caféico, ácido clorogênico, ácido rosmarínico, ácido transcinâmico, catequina, vanilina e quercetina da Sigma-Aldrich®. Os padrões dos ácidos: ferúlico, *p*-cumárico, *o*-cumárico e *m*-cumárico foram adquiridos da Fluka Chemie®. Os reagentes químicos eram de grau analítico para CLAE-Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, sendo o metanol e ácido acético glacial - Sigma Aldrich, a água ultrapura obtida a partir de Milli-Q Integral Water Purification System. Para as análises cromatográficas, amostras e solventes foram filtrados utilizando membranas de 0.45µm (Millipore).

### 2.13.2 Preparação das amostras e padrões

As amostras foram quantificadas pelo método de padronização externa, sendo as curvas analíticas construídas por diluições das soluções-estoque, contendo 1000 mg L<sup>-1</sup> de cada padrão solubilizado em metanol. As curvas analíticas foram obtidas por regressão linear, considerando o coeficiente de determinação R<sup>2</sup>=0,99.

As amostras e os padrões foram filtrados em uma membrana de polietileno de 0.45 µm (Millipore) e, em seguida à filtração, foram injetados no sistema cromatográfico. As injeções das amostras foram realizadas em duplicata e a identidade dos analitos confirmada pelo tempo de retenção e perfil dos picos da amostra comparados aos dos padrões.

### 2.13.3 Equipamentos e condições cromatográficas

As análises foram realizadas em cromatógrafo de alta eficiência Shimadzu®, equipado com quatro bombas de alta pressão LC-20AT, detector de arranjo de diodos SPD-M20A, degaseificador DGU-20A<sub>5</sub>, interface CBM-20A, forno CTO-20AC e injetor automático com autoamostrador modelo SIL-20A. As separações foram realizadas utilizando-se uma coluna Shimadzu® – Shim-pack GVP-ODS-C18 (4,6 x 250 mm, 5 µm) conectada a uma pré-coluna Shimadzu® – Shim-pack GVP-ODS-C18 (4,6 x 10 mm, 5 µm). Os solventes de eluição utilizados foram: solução de ácido acético 2% em água ultrapura, obtida a partir de Milli-Q Integral Water Purification System na Fase A; metanol; água, ácido acético (70: 20: 2% v/v) na Fase B. As amostras foram eluídas de acordo com o gradiente apresentado na Tabela 2. O comprimento de onda utilizado foi de 280 nm, fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, temperatura da coluna de 35°C e volume de injeção de 20 µL.

### 2.13.4 Identificação e quantificação dos compostos

A identificação dos compostos foi realizada por comparação do tempo de retenção das amostras em relação aos padrões. A quantificação foi calculada utilizando a padronização externa com concentrações que variaram para: ácido gálico, catequina, ácido clorogênico, ácido cafêico, ácido p-cumárico, vanilina, ácido transcinâmico, ácido ferúlico, ácido o-cumárico, ácido rosmarínico e ácido m-cumárico. Para o cálculo da concentração dos compostos fenólicos em pregou-se a equação:

$$F = X - Y \text{ mg L}^{-1},$$

Sendo:

X = a área obtida na leitura cromatográfica;

Y = tempo de retenção em minutos.

Tabela 2 Gradiente de eluição para análise dos compostos fenólicos.

Tempo (min)	Fase móvel*	
	Solvente A (% v/v)	Solvente B (% v/v)
0,01	100	0
5,00	70	30
25,00	60	40
43,00	55	45
50,00	20	80
55,00	100	0
65,00	100	0

\*Fase móvel: Solvente A – solução de ácido acético 2% em água

Solvente B – metanol: água: ácido acético (70: 28: 2% v/v)

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Compostos fenólicos totais

Observou-se variação significativa nos teores de compostos fenólicos das amostras de mel ao longo dos meses, destacando-se os resultados obtidos nos meses de março a julho/2013, os quais demonstraram maior teor de compostos fenólicos, sendo o valor médio destes de 42,96 mg GAE. 100 g<sup>-1</sup>. Os méis colhidos nos meses de dezembro/2012, janeiro e fevereiro/2013, constituíram as amostras que apresentaram médias significativamente menores, representando teores da ordem de 36,0 mg GAE. 100 g<sup>-1</sup> (Figura 1).

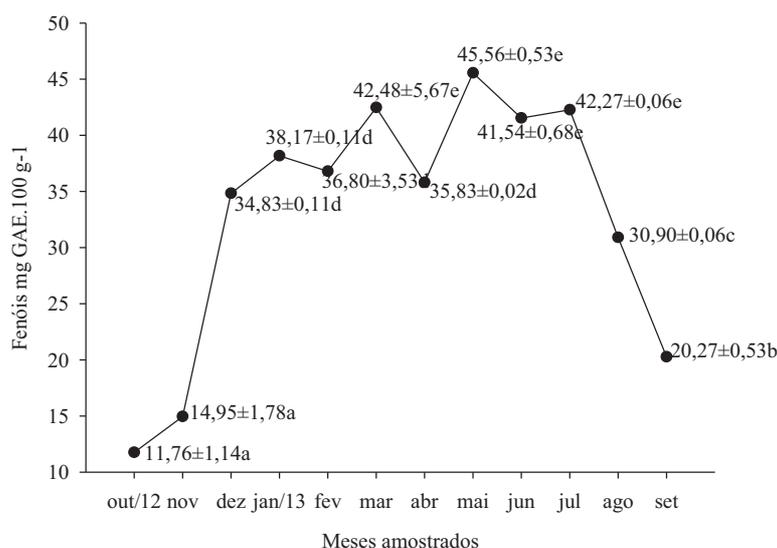


Figura 1 Teores de compostos fenólicos em méis ( $\pm$  dp) em amostras coletadas de outubro/2012 a setembro/2013, Lavras – MG.

Os teores de compostos fenólicos em méis são variáveis em função de fatores intrínsecos às espécies botânicas utilizadas pelas abelhas para

composição dos méis analisados aos fatores geográficos determinantes do vegetal (RAMALHO; KLEINERT-GIOVANNINI; IMPERATRIZ-FONSECA, 1990; ANDREO; JORGE, 2006). Os resultados obtidos na presente pesquisa foram semelhantes aqueles obtidos por Lianda, Castro e Echevarria (2009), ao analisarem méis de origem silvestre coletados nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais. Entretanto, Bertoldi et al. (2012) encontraram resultados significativos e divergentes para teores de compostos fenólicos em méis silvestres oriundos de duas localidades do Pantanal do Mato Grosso do Sul, os quais oscilaram entre 61,5 a 222,0 mg GAE. 100 g<sup>-1</sup>. A preferência das abelhas, no momento da escolha das fontes botânicas usadas como recurso alimentar, é influenciada pelas alterações climáticas decorrentes da sazonalidade (KEVAN; BAKER, 1983; BARTH, 2004).

A atividade antioxidante também apresentou variações ao longo dos meses amostrados. Quando determinada pelo DPPH, constatou-se que as médias foram significativamente diferentes durante os meses amostrados, obtendo-se um máximo de 80,54% no mês de maio de 2013 e um mínimo de 35,69% no mês de setembro de 2013. Verificou-se que durante os meses março a junho de 2013, obtiveram-se as maiores porcentagens com uma média de 78,8%, sendo que nos demais meses amostrados houve redução dessas (Figura 2). A atividade antioxidante avaliada pelo método  $\beta$ -caroteno ácido-linoleico mostrou que as porcentagens de proteção não diferiram significativamente, exceto para o mês de fevereiro de 2013 cujo resultado foi de 74,28%. Nos demais meses amostrados, a média geral foi da ordem de 61,3% e não diferiram significativamente entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% (Figura 3).

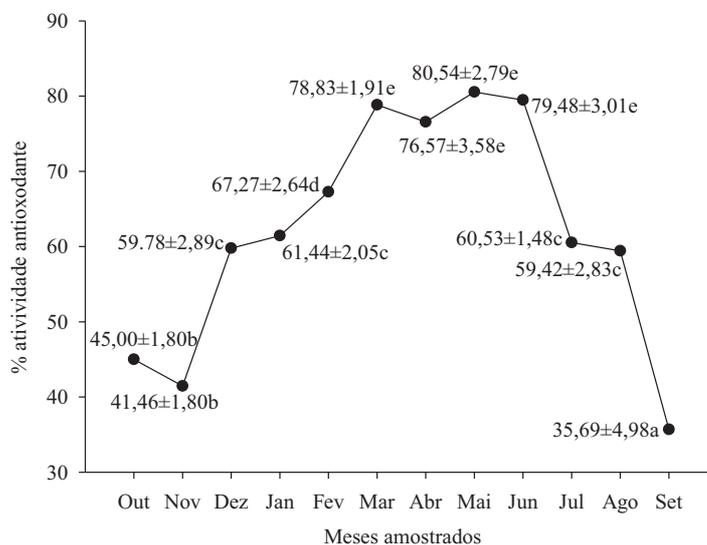


Figura 2 Atividade antioxidante em méis ( $\pm$  dp), determinadas pelo método DPPH em amostras coletadas de outubro/2012 a setembro/2013, Lavras – MG.

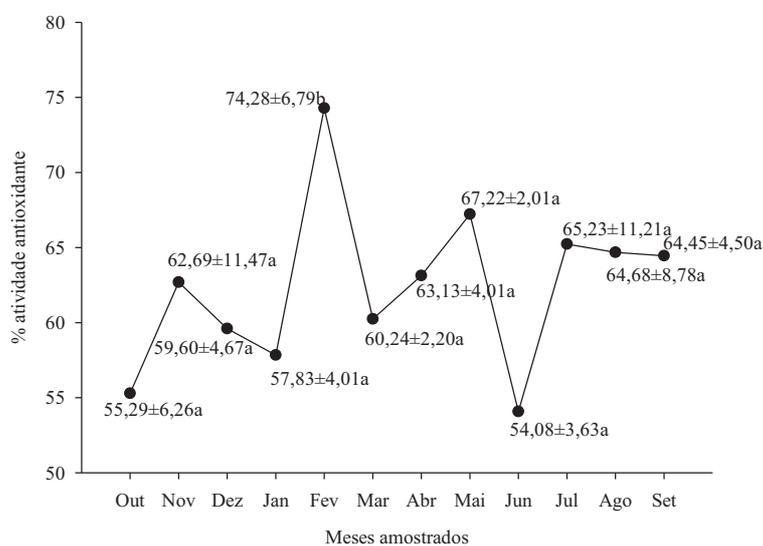


Figura 3 Atividade antioxidante em méis ( $\pm$  dp), determinadas pelo método  $\beta$ -caroteno ácido-linoleico coletados de outubro/2012 a setembro/2013, Lavras – MG.

Verificou-se por meio da correlação de Pearson que a atividade antioxidante medida pelo teste de DPPH apresentou correlação direta com a variação dos teores de compostos fenólicos totais ( $r=0,8520$ ;  $p<0,01$ ), enquanto que a correlação medida entre os resultados obtidos pelo teste de  $\beta$ -caroteno ácido-linoleico com os teores de compostos fenólicos foi não significativa ( $r=0,1084$ ;  $p<0,01$ ). Almeida et al. (2011), constataram a existência de correlação entre atividade antioxidante pelo método DPPH e conteúdo de fenólicos totais ( $r=0,880$ ;  $p\leq 0,01$ ), não ocorrendo correlação significativa entre demais testes avaliados utilizados para avaliar atividade antioxidante e teor de compostos fenólicos.

Apesar da não ocorrência de diferenças significativas nas médias do teste  $\beta$ -caroteno ácido-linoleico, e também para a correlação entre as médias desse teste e conteúdo total de compostos fenólico, é importante ressaltar que esse método é recomendado na determinação do poder antioxidante em produtos termossensíveis. Sendo o mel um composto cujo efeito do aquecimento em temperaturas acima de  $40^{\circ}\text{C}$  favorece a formação do Hidroximetilfurfural, verifica-se a validade do teste de  $\beta$ -caroteno ácido-linoleico para se avaliação da atividade antioxidante em amostras de mel (SUCUPIRA et al., 2012).

Outra forma de se avaliar os resultados referentes aos teores de compostos fenólicos e atividade antioxidante é agrupando-os de acordo com as estações anuais (Tabela 3). Considerando a existência de correlação entre os teores de compostos fenólicos e a atividade antioxidante do mel foi realizada análise para determinar a ocorrência de variação em função dos fatores climáticos. Uma vez que as fontes botânicas disponíveis como recurso alimentar são modificadas ao longo das estações anuais (RAMALHO; KLEINERT-GIOVANNINI; IMPERATRIZ-FONSECA 1990; CAMPOS et al., 2008). Observou-se que o maior teor de compostos fenólicos foi registrado para o

outono, representando 40,97 mg GAE. 100 g<sup>-1</sup>, seguindo em ordem decrescente, os resultados obtidos para o verão, inverno e primavera (Tabela 3 e Figura 4).

Tabela 3 Teores de compostos fenólicos e atividade antioxidante em méis e médias em amostras coletadas de outubro/2012 a setembro/2013, Lavras – MG.

Estações do ano	Compostos fenólicos (mg GAE. 100 g <sup>-1</sup> )	Atividade antioxidante	
		DPPH (%)	β-caroteno (%)
Primavera	20,51 a	48,74 a	58,82 a
Verão	39,14 c	51,88 a	61,47 a
Outono	40,97 c	69,17 b	64,19 a
Inverno	31,14 b	78,86 c	64,78 a

Teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade.

A atividade antioxidante medida pelo DPPH foi maior na estação do inverno com 78,86%, seguida dos resultados apresentados no outono, verão e primavera. A atividade antioxidante pelo método β-caroteno ácido-linoleico, apesar de não significativa, seguiu a mesma variação apresentada pelos testes de DPPH.

Ao investigar a existência de correlação entre as variáveis climáticas ocorridas e os teores de compostos fenólicos e atividade antioxidante, constataram-se, por meio da correlação de Pearson ( $r$ ); ( $p < 0,05$ ), respostas variáveis (Tabela 4 e Figura 5).

Tabela 4 Coeficientes de correlação de Pearson a 5% para umidade relativa do ar, precipitação, temperatura, insolação de outubro/2012 a setembro/2013 e os teores de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante em mel, Lavras – MG.

Períodos do ano	COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS	Atividade antioxidante	
		DPPH (%)	$\beta$ -caroteno(%)
Seco <sup>1</sup>			
Umidade	0,773	0,850	-0,323
Precipitação	0,181	0,591	-0,293
Temperatura	-0,611	-0,302	0,215
Insolação	-0,607	-0,667	0,256
Chuvoso <sup>2</sup>			
Umidade	0,620	0,405	-0,008
Precipitação	0,509	0,321	-0,407
Temperatura	0,460	0,513	0,226
Insolação	-0,579	-0,395	0,135

1- abril, maio, junho, julho, agosto e setembro; 2- outubro, novembro dezembro, janeiro, fevereiro, março.

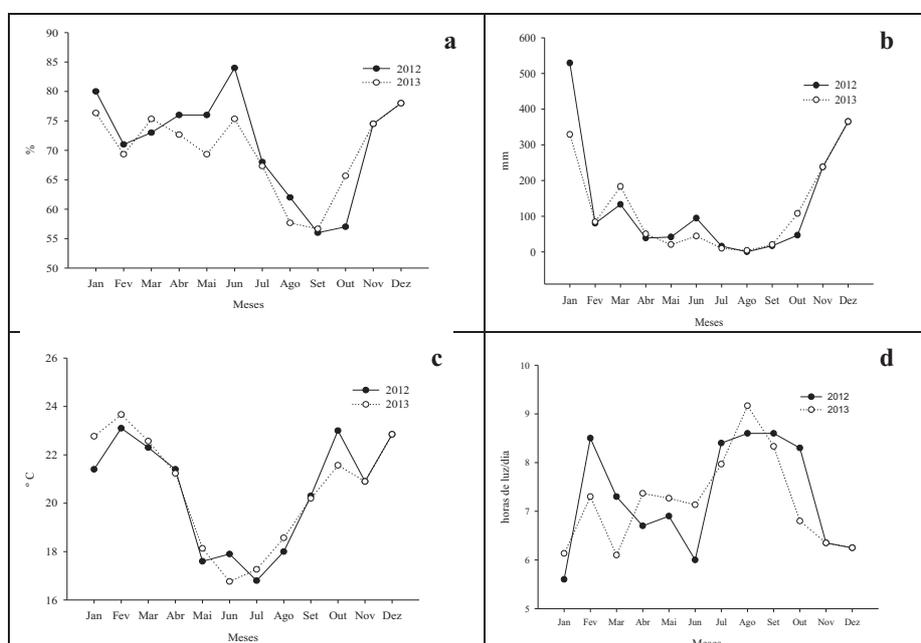


Figura 4 a) Umidade relativa do ar (%); b) precipitação (mm); c) temperatura média do dia (°C) e c) luminosidade (h luz/dia), registrados durante os anos de 2012 e 2013. UFLA, 2013.

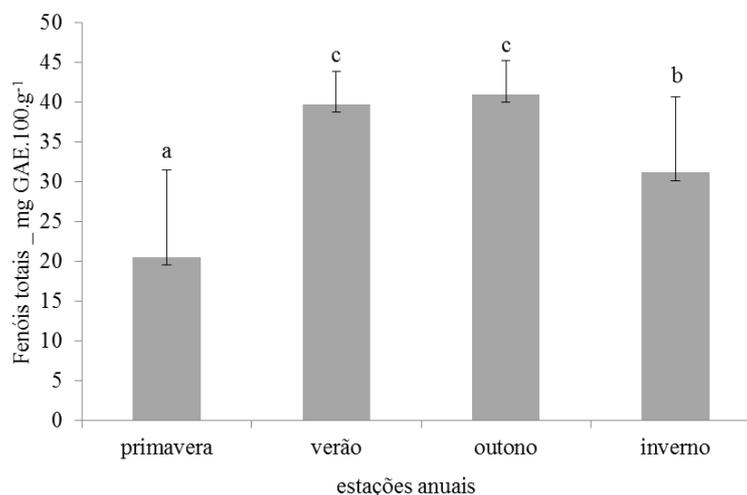


Figura 5 Teores de compostos fenólicos em méis ( $\pm$  dp), em função das estações anuais de outubro/2012 a setembro/2013, Lavras – MG.

A umidade relativa do ar exibiu correlação significativa com os teores de compostos fenólicos totais, no período seco  $r = 0,773$  e no período chuvoso  $r = 0,620$ , ambas diretamente proporcionais. A correlação entre a precipitação e os teores de compostos fenólicos, apresentou-se não significativa durante o período seco  $r = 0,181$ , sendo significativa apenas no período chuvoso  $r = 0,509$ , apesar de diretamente proporcional para os dois períodos. Entre a temperatura e os teores de compostos fenólicos, a correlação apresentou-se significativa para o período seco  $r = -0,611$ , embora inversamente proporcional, sendo não significativa, mas diretamente proporcional no período chuvoso,  $r = 0,460$ . Entre insolação e teores de compostos fenólicos, as correlações obtidas foram significativas tanto no período seco  $r = -0,607$  como no período chuvoso  $r = -0,579$ , sendo que nos dois períodos avaliados, foram inversamente proporcionais (Tabela 4).

A síntese dos metabólitos secundários, como exemplo, os compostos fenólicos é afetada em decorrência da interação química entre a planta e os fatores ambientais, sendo a sazonalidade um desses fatores (RAVEN, EVERT; EICHHORN, 2001; TAIZ; ZEIGER, 2009). Constatou-se que a umidade relativa do ar e a insolação foram determinantes sobre o teor de compostos fenólicos totais para ambos os períodos, seco e chuvoso. Entretanto, a umidade relativa do ar foi diretamente proporcional, enquanto que a insolação influenciou de maneira inversa a produção de compostos fenólicos. As correlações dos demais fatores analisados foram variáveis, a precipitação e a temperatura apresentaram correlação significativa em apenas um dos dois períodos (Tabela 4).

Quanto à atividade antioxidante pelo método DPPH, no período seco a umidade relativa do ar exibiu correlação significativa para atividade antioxidante, no período seco  $r = 0,850$  e não significativa no período chuvoso  $r = 0,405$ , sendo diretamente proporcional para ambos (Tabela 4). Entre a precipitação e a atividade antioxidante, a correlação foi significativa durante o

período seco  $r = 0,591$  e não significativa no período chuvoso  $r = 0,321$  apresentando-se diretamente proporcional nos dois períodos. A temperatura demonstrou correlação inversa com a atividade antioxidante, sendo não significativa durante o período seco  $r = -0,302$ , por outro lado, a correlação ocorrida no período chuvoso foi diretamente proporcional e significativa  $r = 0,513$ . A insolação foi inversamente proporcional nos dois períodos, sendo significativa no período seco  $r = -0,667$  e não significativa no período chuvoso  $r = -0,395$  (Tabela 4 e Figura 5).

Os resultados das correlações entre fatores climáticos e atividade antioxidante avaliada pelo método  $\beta$ -caroteno ácido-linoleico, não demonstraram resultados significativos durante os períodos avaliados. Registrou-se que a umidade ( $r_{\text{seco}} = -0,323$ ;  $r_{\text{chuvoso}} = -0,008$ ) e a precipitação ( $r_{\text{seco}} = -0,293$ ;  $r_{\text{chuvoso}} = -0,407$ ) apresentaram correlação inversamente proporcional em ambos os períodos. Enquanto que para a temperatura ( $r_{\text{seco}} = 0,215$ ;  $r_{\text{chuvoso}} = 0,226$ ) e a insolação ( $r_{\text{seco}} = 0,256$ ;  $r_{\text{chuvoso}} = 0,135$ ) as correlações foram diretamente proporcionais nos dois períodos (Tabela 4). É importante destacar que o método  $\beta$ -caroteno ácido-linoleico não detecta o mesmo grupo de antioxidantes que método DPPH.

No caso dos resultados encontrados entre fatores climáticos e atividade antioxidante pelo método  $\beta$ -caroteno ácido-linoleico em méis, observou-se que os fatores climáticos não exerceram influência significativa sobre o conteúdo de antioxidante detectáveis pelo método  $\beta$ -caroteno ácido-linoleico. É possível que os fatores climáticos não sejam os mais influentes sobre a síntese de substâncias detectadas por esse método (RAMALHO; KLEINERT-GIOVANNINI; IMPERATRIZ-FONSECA, 1990 e GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

### 3.2 Compostos fenólicos presentes no mel

As análises de cromatografia líquida detectaram onze compostos fenólicos nas amostras de méis (Tabelas 5 e 6). A constituição molecular dessas substâncias caracteriza-se pela presença de um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula. O ácido gálico foi encontrado em todas as amostras analisadas. O ácido clorogênico e o ácido *p*-cumárico ocorreram em 92% das amostras. O ácido cafêico e catequina em 83% e a vanilina e o ácido trânsclinâmico em 58% das amostras. Os demais compostos fenólicos foram menos frequentes nas amostras, sendo o ácido ferúlico em 33%, o ácido *o*-cumárico em 25%, o rosmarínico em 17% e *m*-cumárico em 8%.

Os compostos fenólicos encontrados nas amostras de mel apresentam propriedades antioxidantes, como relatado por Kerry e Abbey (1997); Bravo (1998); Croft (1998); Ferguson e Harris (1999); Soares (2002); Moreira; Mancini-Filho (2004); Rosso (2005). Segundo Soares (2002) e Andreo e Jorge (2006), essa é a função metabólica de maior relevância dessas substâncias, sendo indicadas para o tratamento e prevenção de algumas enfermidades que acometem o homem.

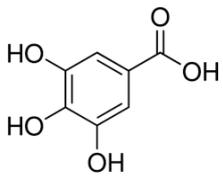
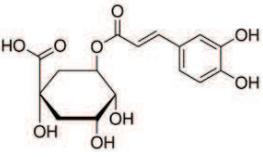
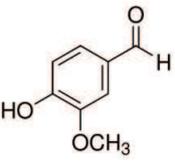
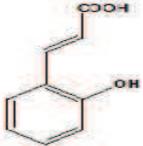
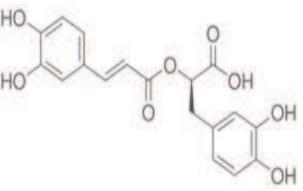
O ácido gálico é uma substância pertencente à classe dos ácidos fenólicos. Em estudos conduzidos por Kerry e Abbey (1997); Bravo (1998); Croft (1998); Ferguson e Harris (1999); Soares (2002), constataram a eficiência desse composto para o tratamento e prevenção de enfermidades tais como doenças cardiovasculares e neurológicas. Nesse contexto e sob o ponto de vista nutricional, torna-se necessária a realização de pesquisas para avaliar o efeito do ácido gálico sobre o metabolismo humano, a partir de uma dieta que o forneça por meio do consumo regular de mel, fim de se avaliar efeitos do consumo desse ácido fenólico sobre a saúde.

Outros compostos fenólicos constatados foram os ácidos clorogênico, cafêico e p-cumárico e, segundo Stalmach et al. (2010); Yoon et al. (2013); Dziejic e Hudson (1984), essas substâncias apresentam funções importantes no metabolismo humano. A catequina por sua vez, um composto fenólico classificado como flavonóide, cuja ocorrência também foi importante, estando presente em praticamente todos os meses, exceto janeiro e março e sendo o composto fenólico que ocorreu em maior quantidade nas amostras. Segundo Kroyer e Hegedus (2001) e García et al. (2001), esse flavonóide tem importante função antimicrobiana para diversos microrganismos.

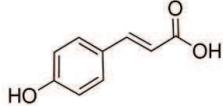
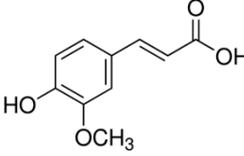
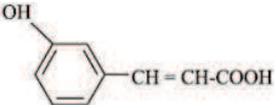
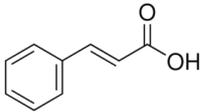
Tabela 5 Compostos fenólicos ( $\mu\text{g/L}$ ) determinados por cromatografia em méis coletados de outubro/2012 a setembro/2013, Lavras-MG.

Meses	Compostos fenólicos					
	Gálico	Catequina	Clorogênico	Cafêico	p-cumárico	Vanilina
Out/2012	2289,27	1692,09	1109,685	430,08	963,40	98,88
Nov	2213,68	5151,30	1097,37	433,61	1150,99	296,34
Dez/2013	1066,21	4488,60	1123,02	669,14	1318,39	407,06
Jan	994,72	ND	1027,05	537,78	1091,06	202,18
Fev	114,02	4490,37	1110,58	185,94	329,05	ND
Mar	3187,25	ND	1414,05	439,04	1422,74	97,40
Abr	119,82	6632,43	930,60	571,18	914,91	240,00
Mai	223,48	6541,65	1373,14	ND	ND	ND
Jun	1890,49	8106,78	1993,71	734,56	417,74	ND
Jul	1808,07	6523,56	1412,01	341,03	576,05	125,32
Ago	1917,70	5310,63	ND	311,85	1206,63	ND
Set	107,38	4438,20	356,42	ND	1767,76	224,58
	Transeinâmico	Ferúlico	o-cumárico	Rosmarinico	m-cumárico	
Out/2012	4334,75	ND	ND	ND	ND	
Nov	ND	ND	ND	ND	ND	
Dez	ND	ND	ND	ND	ND	
Jan/2013	1234,65	ND	ND	ND	ND	
Fev	ND	ND	199,61	ND	ND	
Mar	ND	235,87	158,58	831,35	ND	
Abr	2154,85	ND	ND	ND	ND	
Mai	ND	ND	ND	ND	ND	
Jun	3048,05	693,16	ND	ND	352,17	
Jul	1074,65	ND	90,04	ND	ND	
Ago	619,65	223,38	ND	ND	ND	
Set	3704,65	212,17	ND	2396,85	ND	

Tabela 6 Fórmula molecular, classificação dos compostos fenólicos e tempo de retenção (minutos) dos padrões observados durante a produção da curva de calibração para análise das amostras de méis coletados em Lavras – MG.

Compostos	Classe*	Tempo de retenção
	ácido gálico	ácido fenólico
	catequina	flavonóide
	ácido clorogênico	ácido fenólico
	vanilina	tanino
	ácido o-cumárico	ácido fenólico
	ácido rosmarínico	ácido fenólico

“Tabela 6, conclusão”

Compostos	Classe*	Tempo de retenção	
	ácido cafêico	ácido fenólico	15,521
	ácido p-cumárico	ácido fenólico	22,633
	ácido ferulico	ácido fenólico	25,786
	ácido m-cumárico	ácido fenólico	28,726
	ácido transcinamico	ácido fenólico	52,365

\* Fontes utilizadas para classificação: Soares (2002); Andreo; Jorge (2006); Moreira; Mancini-Filho (2004).

### 3.3 Análises físico-químicas do mel

As análises físico-químicas das amostras de mel, foram baseadas nos índices de qualidade do mel recomendados pela Instrução Normativa nº 11 Ministério da Agricultura e Abastecimento de 20 outubro de 2000 (BRASIL, 2000).

### 3.3.1 Açúcares, umidade e sólidos solúveis

Os teores de açúcares totais obtidos durante o período variaram significativamente demonstrando maiores médias nos meses de novembro/2012 a março/2013, com média de 70,15%. O menor resultado foi de 52,24% e verificado no mês de agosto/2013. É importante destacar a ocorrência de médias que não diferiram significativamente pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ) em onze meses do período, com média de 60% (Tabela 7). Os teores de glicose, também apresentaram variação significativa, porém os resultados obtidos em novembro e dezembro/2012 foram os maiores, com média de 79,73%. Os menores teores de glicose foram encontrados nos meses de maio/2012 e agosto/2013, para os quais o resultado médio foi de 55,24%. O teor de sacarose apresentou resultados significativos para os meses de março, agosto e setembro/2013, quando a média foi de 6,15%. Constatou-se que em cinco meses do período avaliado, os resultados de sacarose obtidos foram de 0,0%. Outros seis meses registraram resultados menores do que 1,0%. Portanto, quanto aos teores de açúcares totais, glicose e sacarose, os méis analisados podem ser considerados em acordo com o recomendado pela Instrução Normativa nº 11 Ministério da Agricultura e Abastecimento (BRASIL, 2002).

Em relação aos teores de umidade, foram encontradas diferenças significativas para os méis analisados. Constataram-se em cinco amostras do período resultados superiores ao preconizado na legislação vigente (Tabela 7). Contudo, permaneceram próximos ao estabelecido pelas normas vigentes na legislação brasileira, que recomenda um teor de 20,0% (BRASIL, 2002). A análise das médias gerais obtidas para os parâmetros umidade, teor de açúcares redutores (glicose) e sacarose demonstram que os resultados encontram-se em acordo com os requisitos estabelecidos em legislação. Esses parâmetros devem ser analisados em conjunto, pois permitem avaliar o grau de maturidade do mel,

como relatado por Crane (1983) e Brasil (2002). No caso das amostras em questão não ocorreram discrepâncias para os valores obtidos das análises.

Os teores de sólidos solúveis avaliados apresentaram variações significativas, sendo a média geral de 72,45% (Tabela 7). Esse índice é empregado quando se deseja detectar adulterações no mel pela adição de açúcares, se os resultados obtidos de sólidos solúveis estiverem próximos ou maiores daqueles encontrados para açúcares totais, indicam méis com elevado teor de pureza, ou seja, sem adulterações. Constatou-se que os méis analisados demonstram índices de pureza, conforme recomenda a legislação vigente (BRASIL, 2002; CHITARRA; CHITARRA, 2005).

Tabela 7 Teores de açúcares totais, glicose, sacarose, umidade e Brix em % em mel coletados de abril/2012 a setembro/2013 em Lavras – MG.

Anos	Meses	Açúcares totais %	Glicose %	Sacarose %	Umidade (%)	Sólidos solúveis (%)
2012	Abr	59,79 b	65,97 c	0,00 a	22,0 j	68,2 a
	Mai	61,10 b	55,84 a	4,99 c	13,4 b	79,5 d
	Jun	59,94 b	58,74 b	1,41 b	13,0 a	68,9 a
	Jul	60,39 b	59,40 b	0,93 b	21,4 i	64,8 a
	Ago	59,77 b	59,66 b	0,77 b	23,0 l	71,0 b
	Set	60,13 b	58,95 b	1,11 b	17,4 f	74,3 c
	Out	60,00 b	60,60 b	0,07 b	16,2 d	79,3 d
	Nov	71,55 d	81,65 f	0,00 a	13,0 a	80,3 d
	Dez	72,91 d	77,81 e	0,00 a	18,2 g	76,7 c
2013	Jan	65,13 c	65,76 c	0,85 b	16,0 c	75,6 d
	Fev	68,37 c	70,15 d	0,56 b	16,0 c	74,0 d
	Mar	72,80 d	65,84 c	6,76 e	16,4 e	78,3 d
	Abr	67,68 c	67,08 c	1,13 b	21,4 i	67,2 a
	Mai	56,96 b	69,65 d	0,15 b	21,4 i	66,1 a
	Jun	57,48 b	59,77 b	0,00 a	16,2 d	76,0 a
	Jul	59,16 b	63,58 c	0,00 a	16,4 e	60,4 c
	Ago	52,24 a	54,64 a	4,97 e	19,0 h	71,0 b
	Set	60,73 b	61,75 b	6,73 e	14,6 b	72,5 b
Média±dp		62,85±5,34	64,27±7,16	1,69±2,37	17,53±3,25	72,45±5,66

Médias com mesma letra nas colunas, não diferiram entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

### 3.3.2 Teores de cinza, pH e cor

Os teores de cinza, resultados de pH e escala de cores determinados para as amostras de méis coletados durante os dezoito meses do ensaio, não apresentaram diferenças significativas pelo teste de Scott-Knott, ( $p < 0,05$ ) (Tabela 8). As variações ocorridas possivelmente encontram-se associadas a fatores que segundo Crane (1983) podem ser os de natureza edafoclimáticas, características fisiológicas das plantas fornecedoras do néctar e teor de minerais presentes. Lacerda et al. (2010) ao avaliarem os minerais que conferem cor ao mel, constataram que a especificidade do mineral presente no mel e não apenas a quantidade de resíduos minerais, são fatores determinantes da cor. Méis mais escuros apresentam maiores teores de ferro e cálcio e o conjunto dos elementos tem influência acentuada na determinação da cor. Igualmente Crane (1983) e Bogdanov (2011) mencionaram que méis de cores mais claras contenham menores níveis desses minerais. Segundo a legislação brasileira, os resultados obtidos dos méis analisados enquadram-se nas recomendações preconizadas pelas normas expressas em Brasil (2002).

Tabela 8 Teores de cinzas (%), pH, absorvância (nm) para classificação das cores de méis coletados de abril/2012 a setembro/2013 em Lavras – MG.

Anos	Meses	Cinzas %	pH	Absorvância (560nm)	Cores
2012	Abr	0,342	4,01	0,320	Âmbar Claro
	Mai	0,303	3,79	0,648	Âmbar Escuro
	Jun	0,476	4,05	0,811	Âmbar Escuro
	Jul	0,382	4,07	0,929	Âmbar Escuro
	Ago	0,360	3,89	0,386	Âmbar Claro
	Set	0,386	4,00	0,461	Âmbar
	Out	0,365	3,92	0,222	Âmbar Claro
	Nov	0,345	3,74	0,286	Âmbar Claro
	Dez	0,284	3,76	0,337	Âmbar Claro
	2013	Jan	0,355	3,97	0,676
Fev		0,365	3,88	0,319	Âmbar Claro
Mar		0,376	3,91	0,749	Âmbar Escuro
Abr		0,062	3,93	0,360	Âmbar Claro
Mai		0,384	3,91	0,660	Âmbar Escuro
Jun		0,247	3,88	0,330	Âmbar Claro
Jul		0,232	3,79	0,354	Âmbar Claro
Ago		0,062	3,79	0,456	Âmbar
Set		0,251	3,80	0,314	Âmbar Claro
Média±dp		-	0,310±0,11	3,90±0,09	0,478±0,206

### 3.3.3 Acidez, atividade diastásica e HMF

Os resultados obtidos para os parâmetros acidez, atividade diastásica e HMF, não exibiram diferenças significativas pelo teste de Scott-Knott, ( $p < 0,05$ ) (Tabela 9). As análises de acidez livre apresentaram um resultado médio de 19,21 meq. Kg<sup>-1</sup>. De modo semelhante, foram exibidos os resultados para: atividade diastásica que alcançou média de 15,88 na escala Göthe e o teste de HMF que obteve média de 15,17 mg/kg. A análise conjunta desses três testes, fornece evidências sobre a ocorrência de processo de deterioração do mel. Todos os parâmetros analisados encontravam-se dentro do previsto pelas normas,

indicando que os méis analisados atenderam aos requisitos dos índices de qualidade para consumo (BRASIL, 1981).

Tabela 9 Acidez livre (meq/kg), atividade diastásica (escala de Göthe) e teores de HMF (mg/kg) em méis coletados de abril/2012 a agosto/2013, Lavras – MG.

Anos	Meses	Acidez meq.kg <sup>-1</sup>	Atividade diastásica (escala de Göthe)	HMF (mg/kg)
2012	Abr	18,30	8,01	4,78
	Mai	18,30	15,18	40,19
	Jun	18,29	7,25	4,80
	Jul	18,70	7,44	8,20
	Ago	18,30	14,10	22,72
	Set	20,82	14,46	19,06
	Out	18,60	10,08	8,49
	Nov	21,84	10,33	12,29
	Dez	18,00	12,32	18,51
2013	Jan	21,80	13,13	17,46
	Fev	18,30	20,39	9,75
	Mar	18,29	28,60	12,27
	Abr	18,10	16,41	21,12
	Mai	18,40	32,25	1,99
	Jun	21,80	22,73	15,44
	Jul	21,65	18,38	23,82
	Ago	18,19	18,92	16,85
Média ± dp		19,21±1,56	15,88±7,12	15,17±9,20

#### 4 CONCLUSÕES

Os teores de compostos fenólicos foram variáveis ao longo do período de estudo e influenciados pelos fatores climáticos. O maior teor foi obtido no outono, seguido pelo verão, inverno e primavera.

As análises de cromatografia líquida detectaram onze compostos fenólicos nas amostras de méis, tendo sido o ácido gálico encontrado em todas as amostras analisadas.

A catequina foi detectada em 83% das amostras, porém, foi o composto fenólico ocorrido em maiores concentrações nas amostras analisadas.

A atividade antioxidante determinada pelo método do DPPH e  $\beta$ -caroteno ácido-linoleico apresentaram variações durante os meses amostrados.

As análises das características físico-químicas dos méis colhidos nos apiários da UFLA, apresentaram-se dentro das especificações e normas recomendadas pela legislação brasileira.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, M. M. B. et al. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. **Food Research International**, Barking, v. 44, n. 7, p. 2155–2159, Aug. 2011.
- ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 24, n. 2, p. 319-326, jul./dez. 2006.
- BARTH, O. M. Melissopalynology in Brazil: a review of pollen analysis of honeys, própolis and pollen loads of bees. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 61, n. 3, p. 342-350, maio/jun. 2004.
- BERA, A. **Efeitos nas características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais em amostras de mel de abelhas submetidas à radiação gama**. 2010. 112 p. Tese (Doutorado) -Instituto de pesquisas energéticas e nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- BERTOLDI, F. C. et al. Avaliação da atividade antioxidante e determinação de compostos fenólicos totais de méis produzidos no pantanal. **Evidência**, Joaçaba, v. 12 n. 2, p. 155-164, jul./dez. 2012.
- BOGDANOV, S. Honey as nutrient and functional food: a review. **Bee Product Science**, New York, p. 1-31, Oct. 2011. Disponível em: <[http:// www.bee-hexagon.net](http://www.bee-hexagon.net)>. Acesso em: 11 mar. 2013.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 11 de 20 de outubro de 2000. Regulamento técnico de identidade e qualidade do mel. **Diário Oficial da União**, Brasília, 23 out. 2002.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. **Produção animal: recursos humanos em zootecnia e saúde animal**. Brasília: Laboratório Nacional de Referência Animal, 1981.
- BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, New York, v. 56, n. 11, p. 317-333, Nov. 1998.

CAMPOS, F. M. et al. Estabilidade de compostos antioxidantes em hortaliças processadas: uma revisão. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 19, n. 4, p. 481-490, out./dez. 2008.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2 ed. rev. e ampl. Lavras: Editora da UFLA, 2005.

CRANE, E. **O livro do mel**. 2. ed. São Paulo. Nobel, 1983.

CROFT, K. D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. **Annals of the New York Academy of Science**, New York, v. 854, p. 435-442, Nov. 1998.

DZIEDZIC, S. Z.; HUDSON, B. J. F. Phenolic acids and related compounds as antioxidants for edible oils. **Food Chemistry**, London, v. 14, n. 1, p. 45-51, 1984.

FAHN, A. Structure and function of secretory cells. **Advances in Botanical Research**, London, v. 31, p. 37-75, 2000.

FERGUSON, L. R.; HARRIS, P. J. Protection against cancer by wheat bran: role of dietary fibre and phytochemicals. **European Journal of Cancer Prevention**, Oxford, v. 8, n. 1, p. 17-25, Feb. 1999.

FIGUEIREDO FILHO, D. B.; SILVA JÚNIOR, J. A. Desvendando os mistérios do coeficiente de correlação de Pearson (r). **Revista Política Hoje**, Pernambuco, v. 18, n. 1, p. 115-46, 2009.

GARCIA, J. et al. Produção de própolis em colônias de *Apis mellifera* africanizadas pelas técnicas convencional de raspagem e coletor de própolis inteligente. In: REUNIÃO ESPECIAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 5., 1997, Maringá. **Anais...** Maringá: UEM, 1997.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Açúcares e produtos correlatos. In: INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. Cap. 7, p. 321-343.

KEARNS, C. A.; INOUIYE, D. W. **Techniques for pollination biologists**. Colorado: University Niwot, Press of Colorado, 1993.

KERRY, N. L.; ABBEY, M. Red wine and fractionated phenolic compounds prepared from red wine inhibit low density lipoprotein oxidation *in vitro*. **Atherosclerosis**, Limerick, v. 135, n. 1, p. 93-102, Nov. 1997.

KEVAN, P. G.; BAKER, H. G. Insects as flower visitors and pollinators. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto. v. 28, p. 407-453, Jan. 1983.

KROYER, G.; HEGEDUS, N. Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 2, n. 3, p. 171-174, Sept. 2001.

LACERDA, J. J. J. et al. Influência das características físico-químicas e composição elementar nas cores de méis produzidos por *Apis mellifera* no sudoeste da Bahia utilizando análise multivariada. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 5, p. 1022-1026, 2010.

LIANDA, R. L. P.; CASTRO, R. N.; ECHEVARRIA, A. Determinação de flavonóides totais em méis brasileiros de *Apis mellifera*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 32., 2009, Fortaleza. **Resumos...** Fortaleza: RASBEC, 2009.

MEDA, A. et al. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey. As well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, London, v. 91, n. 3, p. 571-577, July 2005.

MENEZES, J. D. S. et al. Compostos bioativos e potencial antioxidante do pólen apícola produzido por abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.). **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 69, n. 2, p. 233-42, 2010.

MENSOR, L. L. et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, London, v. 15, n. 2, p. 127-130, Mar. 2001.

MOREIRA, A. V. B.; MANCINI-FILHO, J. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 17, n. 4, p. 411-424, out./dez. 2004.

NELSON, N.A photometric adaptation of the somogyi method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 153, p. 375-380, 1944.

RAMALHO, M.; KLEINERT-GIOVANNINI, A.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Important bee plants for stingless bees (Meliponini and Trigonini) and Africanized honeybees (*Apis mellifera*) in Neotropical habitats: a review. **Apidologie**, Versailles, v. 21, n. 5, p. 469-488, 1990.

RAVEN, P. H.; EVERT, F. R.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2001.

RODGERS, P. E. W. Honey quality control. In: CRANE, E. (Ed.). **Honey: a comprehensive survey**. London: Heinemann, 1979. p. 314-325.

ROSSO, R. **Avaliação das propriedades antioxidantes de derivados ésteres do ácido gálico**. 2005. 143 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2005.

RUFINO, M. S. M. et al. **Determinação da atividade antioxidante total em frutas no Sistema B-caroteno/Ácido Linoléico**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2006. (Comunicado Técnico, 126).

RUFINO, M. S. M. et al. **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH**. Fortaleza: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2007. (Comunicado Técnico, 127).

SHUEL, R. W. The production of néctar and pollen. In: GRAHAM, J.M. **The hive and the honey bee Langstroth on the hive and the honeybee**. Hamilton: Dadant & Sons, 2010. p. 401-436.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin- Ciocateau reagent. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 299, p. 152- 78, 1999.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 71-81, Jan. 2002.

SOMOGYI, M. A. New reagent for determination of sugars. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 160, p. 61-68, Sept. 1945.

STALMACH, A. et al. Bioavailability of chlorogenic acids following acute ingestion of coffee by humans with an ileostomy. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 501, n. 1, p. 98–105, Sept. 2010.

SUCUPIRA, N. R. et al. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 14, n 4, p. 263-269, 2012.

TAIZ, L, ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

WATERHOUSE, A. L. Polyphenolics. In: WROSTALD, R. E. et al. **Handbook of food analytical chemistry**. New York: John Wiley, 2002. Chap. 28, p. 461–535.

YOON, S. A. et al. p-Coumaric acid modulates glucose and lipid metabolism via AMP-activated protein kinase in L6 skeletal muscle cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 432, n. 4, p. 553–557, Mar. 2013.

**CAPÍTULO 3 Extração de fenólicos totais e atividade antioxidante em pólen apícola coletado por *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera:Apidae)**

**RESUMO**

O pólen coletado por *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 contém substâncias de valor nutricional, entre essas os compostos fenólicos que apresentam ação antioxidante. O objetivo do presente trabalho foi testar solventes para a extração de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante pelos métodos DPPH e  $\beta$ -caroteno ácido-linoleico, em amostras de pólen apícola. No primeiro ensaio os solventes acetona (Ac); etanol (Et), metanol (Me) foram testados nas concentrações de 50; 60; 70; 80; 90 e 100%, e a água destilada (testemunha) em experimentos inteiramente casualizados com 19 tratamentos e três repetições. O segundo ensaio foi realizado com o objetivo de se avaliar as combinações de extratores em concentrações selecionadas a partir do primeiro experimento, utilizando-se Ac60Et50; Ac60Et70; Ac60Et80; Ac70Et50; Ac70Et70 com cinco tratamentos em três repetições. Entre os extratores utilizados isoladamente, aqueles que mostraram resultados significativos para compostos fenólicos foram o Et70 com 16,61mg GAE/g, a Ac60 com 15,23mg GAE/g e Ac70 com 15,49mg GAE/g, sendo que a água permitiu a extração de 14,48mg GAE/g. Em relação à atividade antioxidante, o Me50 expressou resultado significativo (81,66%) em resposta ao método DPPH, enquanto que pelo  $\beta$ -caroteno ácido-linoleico, foi o Me100 (79,21%). Quando empregados de forma associada, o extrator Ac70Et70 diferiu significativamente das demais combinações, apresentando 16,68mg GAE/g para teor de compostos fenólicos totais, 57,14% para atividade antioxidante pelo DPPH e 76,02% pelo  $\beta$ -caroteno ácido-linoleico.

Palavras-chave: Etanol. Metanol. Acetona. Extrator. Abelha.

## ABSTRACT

The pollen collected by *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 contains substances of nutritional value, among them the phenolic compounds which present antioxidant activity. The objective of the present work was to test solvents for the extraction of total phenolic compounds and antioxidant activity using the DPPH and  $\beta$ -carotene linoleic-acid methods in apiculture pollen samples. In the first trial, the solvents acetone (Ac), ethanol (Et) and methanol (Me) were tested in the concentrations of 50; 60; 70; 80; 90 and 100%, as well as in distilled water (witness) in completely randomized experiments with 19 treatments and three replicates. The second trial was performed with the objective of evaluating the combination of extractors in concentrations selected from the first experiment, using Ac60Et50, Ac60Et70, Ac70Et50, Ac70Et70 with five treatments in three replicates. Among the extractors used in isolation, those showing significant results for phenolic compounds were Et70 with 16.61 mg GAE/g, Ac60 with 15.23 mg GAE/g and Ac70 with 15.49 mg GAE/g, with the water allowing the extraction of 14.48 mg GAE/g. In regard to the antioxidant activity, the Me50 expressed a significant result (81.66%) in response to the DPPH method, while by  $\beta$ -carotene linoleic acid, was the Me100 (79.21%). When employed in association, the extractor Ac70Et70 differed significantly from the remaining combinations, presenting 16.68 mg GAE/g for the content of total phenolic compounds, 57.14% for antioxidant activity by DPPH and 76.02% by  $\beta$ -carotene linoleic acid.

Keywords: Ethanol. Methanol. Acetone. Extractor. Bee.

## 1 INTRODUÇÃO

O pólen apícola é resultante da aglutinação de grãos de pólen de diferentes espécies botânicas colhidos pelas abelhas *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 e transportados até a colmeia. As abelhas o utilizam como fonte de proteínas, sais minerais e outros nutrientes necessários ao seu metabolismo. (ROUBIK, 2006). Inúmeras pesquisas evidenciam que o pólen apícola é importante para a alimentação humana e com contribuição significativa para o metabolismo como alimento funcional (OLIVEIRA et al., 2002; JONES; RICHARD, 2011; BODGANOV, 2014).

A produção de pólen apícola no Brasil representa uma atividade pouco desenvolvida pela maioria dos apicultores. Sabe-se que é insuficiente para atender a demanda potencial e não existem números oficiais sobre o volume de pólen que é produzido e consumido no mercado brasileiro. A estimativa é de que sejam produzidas 50 toneladas de pólen, contudo a demanda é da ordem de 150 toneladas (PEREIRA et al., 2003; BRASIL, 2006; PAULA, 2008).

O pólen apícola tem sido utilizado como fonte suplementar de nutrientes no enriquecimento de dietas alimentares, devido as suas propriedades nutricionais. Na sua composição, são encontradas substâncias polifenólicas com atividade antioxidante, entre as quais podem-se citar, o ácido p-cumárico, a catequina, a quercetina e a rutina (NEVES; ALENCAR; CARPES, 2009). Os compostos fenólicos são metabólitos secundários produzidos por vegetais e essenciais ao seu metabolismo nas etapas de crescimento e reprodução. Nesse grupo de compostos químicos, destacam-se os ácidos fenólicos gálico, clorogênico e ácido tânico (MOREIRA; MANCINI-FILHO, 2004; COLLI et al., 2003). Esses compostos são substâncias polares e podem ser quantificados por meio de análises físico-químicas fazendo-se a extração de seus componentes e sua quantificação por meio da espectrofotometria (MORAES; COLLA, 2006).

Colli et al. (2003) mencionaram que a diversidade florística encontrada no Brasil, possibilita a produção de pólen apícola tanto em quantidade quanto em qualidade. Moraes e Colla (2006) relataram que o fator qualidade é um ponto relevante do produto que deverá ser colocado no mercado para consumidor. Assim, foi sugerido que análises físico-químicas desse composto serão importantes, a fim de se obter conhecimento preciso do pólen a ser comercializado.

Entre os métodos de extração de compostos fenólicos e atividade antioxidante, o usual são aqueles que utilizam solventes orgânicos. As características de polarização dessas substâncias apontam para a eficiência desses solventes na extração de compostos fenólicos (LEE, 2004; NACZK; SHAHIDI, 2004). Considerando a importância que o pólen representa para as abelhas e também para o homem, objetivou-se:

- a) Avaliar a eficácia de diferentes extratores no pólen coletado por *Apis mellifera*;
- b) Avaliar os teores de compostos fenólicos a atividade antioxidante no pólen apícola.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O pólen apícola utilizado para as análises foi oriundo em Neópolis – SE, Brasil, município localizado a 10°19'12 de latitude sul e 36°34'46 de longitude oeste. O pólen foi coletado em área com diversas espécies vegetais, com predominância de Arecaceae. O teor de umidade da amostra era 16,23%. Para a realização das análises laboratoriais, o material foi triturado em moinho multiuso até se transformar em um pó fino. Foram preparadas alíquotas de 2,0 g e produzidos os extratos de pólen (KROYER; HEGEDUS, 2001; CARPES et al., 2008). Posteriormente, as amostras foram submetidas à extração dos compostos fenólicos e determinação da atividade antioxidante pelos métodos do DPPH e  $\beta$ -caroteno ácido-linoleico.

Foram empregados em um primeiro ensaio, os extratores acetona (Ac), etanol (Et), metanol (Me) nas concentrações de 50; 60; 70; 80; 90 e 100%. Utilizou-se a água destilada como extrator testemunha, totalizando 19 tratamentos com três repetições. Um segundo ensaio foi realizado com o objetivo de se avaliar extratores associados em concentrações selecionadas, a partir do primeiro experimento, utilizando Ac60Et50; Ac60Et70; Ac60Et80; Ac70Et50; Ac70Et70 e água destilada, totalizando seis tratamentos com três repetições. Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado e os dados submetidos à análise estatística empregando-se o software SISVAR (FERREIRA, 2011) e as médias comparadas pelo de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

### 2.1 Produção dos extratos e determinação de compostos fenólicos

O processo de extração foi realizado adicionando-se 15 mL de solvente nas concentrações a serem testadas, em banho de água termostetizada a 60°C

com agitação por 30 minutos e posteriormente filtrado em filtro Watman N° 3 (KROYER; HEGEDUS, 2001; CARPES et al., 2008). O resíduo da filtração foi submetido novamente à extração com o mesmo. Após a segunda filtração, o material obtido foi diluído em água destilada até completar o volume de 25 mL. Para a produção de extratos a partir de extratores combinados foram realizados os mesmos procedimentos, sendo que utilizou-se um solvente diferente em cada etapa da extração.

Os teores de fenólicos totais foram determinados, utilizando o método proposto por Waterhouse (2002). Uma alíquota de 0,5 mL de cada extrato obtido foi transferida para um tubo de ensaio, adicionando-se 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu (Sigma Aldrich®, 2 N) a 10% v/v e 4,0 mL de carbonato de sódio a 4%, permanecendo em repouso por 2 horas ao abrigo da luz e, posteriormente, foram realizadas leituras de absorvância em espectrofotômetro a 750 nanômetros. Utilizou-se como branco a mistura de 0,5 mL de etanol 95%; 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu a 10% e 2,0 mL de carbonato de sódio a 4%. Para calcular os teores de compostos fenólicos totais, foi construída uma curva analítica de acordo com a metodologia empregada (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999), contendo 10; 25; 40; 70; 85 e 100 ppm de ácido gálico dissolvido em álcool etílico absoluto, sendo que cada amostra foi analisada em triplicata. Os resultados foram expressos em mg GAE/g de pólen (GAE: equivalente em ácido gálico). Os teores de compostos fenólicos foram calculados (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999), utilizando-se a curva padrão de calibração do ácido gálico por meio da equação:  $y = 0,017x + 0,0144$  ( $R^2=0,999$ ).

## 2.2 Atividade antioxidante: método radical do DPPH

Para verificar a atividade antioxidante presente nos extratos de pólen, foi realizada análise da capacidade sequestrante do radical DPPH, adotando-se a metodologia (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995) e modificada (RUFINO et al., 2007). Preparou-se uma solução de DPPH na concentração 0,06 mM em álcool metílico absoluto P.A. Posteriormente, adicionaram-se 3,7 mL dessa solução em tubos de ensaio contendo 0,3 mL do extrato de cada amostra. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 517 nm, após 90 minutos. Utilizou-se como branco o álcool metílico absoluto P.A. Os resultados foram expressos em percentual de sequestro do radical (%SR) DPPH empregando-se a equação (MENSOR et al., 2001):

$$\%SR = 100 - \{[(Abs_{amostra} - Abs_{controle}) \times 100] / Abs_{controle}\}$$

## 2.3 Método da solução sistema $\beta$ -caroteno ácido-linoleico

A determinação da atividade antioxidante, por esse método, foi realizada empregando-se o método proposto por Rufino et al. (2006). Preparou-se uma solução sistema contendo 50  $\mu$ L de  $\beta$ -caroteno dissolvido em clorofórmio PA na concentração de 20 mg/mL, adicionada de 40  $\mu$ L de ácido linoleico, 530  $\mu$ L de Tween 40 e 1,0 mL de clorofórmio PA o qual foi evaporado com auxílio de um oxigenador. Posteriormente, adicionou-se água tratada com oxigênio até a solução apresentar absorvância, cujo valor variasse entre o mínimo de 0,6 nm até o máximo de 0,7 nm a 470 nm. Foram adicionados 0,4 mL de extrato a 5 mL de solução sistema, sendo as leituras realizadas no tempo 2 minutos e 120 minutos em espectrofotômetro a 470nm e os resultados expressos em percentual de proteção da oxidação do  $\beta$ -caroteno (%P).

a) Porcentual de inibição da oxidação do  $\beta$ -caroteno (%I).

$$\% I = (A_c - A_m) \cdot 100 / A_c$$

$A_c$  = absorvância inicial do controle – absorvância final do controle

$A_m$  = absorvância inicial da amostra – absorvância final da amostra

b) Porcentual de Proteção (% P)

$$\% P = 100 - \%O$$

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os teores de fenólicos totais de pólen apícola variaram com o tipo de solvente e concentração (2,33 a 16,61 mg EAG.g<sup>-1</sup>), sendo que foram significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) nos extratos obtidos com Ac 60 e Ac 70 e Et 70 (Tabela 1). As concentrações de acetona e etanol acima de 70% reduziram a eficiência de extração desses solventes. O extrato obtido com água destilada pura apresentou o segundo maior teor de fenólicos totais, juntamente com a acetona 50% e o metanol 100%. Os extratos obtidos com diferentes concentrações de metanol foram os que apresentaram menor variação do teor de fenólicos totais (11,84 a 14,49 mg EAG.g<sup>-1</sup>), enquanto que os demais extratores variaram consideravelmente.

O uso da acetona e etanol como extratores de compostos fenólicos em alimentos, seguidos do metanol e água (LEE, 2004; NACZK; SHAHIDI, 2004). O fundamento para essa afirmativa é a constituição química do substrato, o qual poderá influenciar sobre os resultados da extração de metabólitos. Esses solventes podem variar sua eficiência de extração, de acordo com a natureza dos compostos fenólicos presentes na amostra e quanto à origem do material sob análise (NACZK; SHAHIDI, 2004; ANDREO; JORGE, 2006; CARPES et al., 2008).

A atividade antioxidante avaliada pelos métodos de radical DPPH e oxidação do  $\beta$ -caroteno ácido-linoleico foi dependente do tipo de solvente e concentração utilizados para obtenção dos extratos de pólen (Tabela 1). Foi encontrado resultado semelhante à Kroyer e Hegedeus (2001) ao verificar que o conteúdo de compostos fenólicos em extratos de pólen variou em função do solvente e da concentração utilizada. Os resultados mais expressivos para fenólicos totais em amostras de pólen foram encontrados quando utilizou-se a solução de etanol com concentração entre 60 e 80% para produção de extrato.

Os extratos produzidos com Me50 e Ac100 apresentaram, respectivamente, o maior e o menor resultado para atividade antioxidante (81,66 e 19,30%) pelo método do DPPH. No método  $\beta$ -caroteno ácido-linoleico, os maiores resultados de atividade antioxidante foram observados nos extratos Me 100, seguido de Ac70 e 80 e Et70, 80 e 90. Nesse método, os menores resultados de atividade antioxidante foram observados nos extratos Ac90 e Ac100.

Tabela 1 Compostos fenólicos (mg GAE.g-1) e atividade antioxidante (%) pelo DPPH e  $\beta$ -caroteno ácido-linoleico empregando os extratores acetona (Ac), metanol (Me) e etanol (Et).

Extratores/ Concentrações	Compostos fenólicos	Atividade antioxidante	
		DPPH (%SR)	$\beta$ -caroteno (%P)
Ac 50	14,90 e	52,66 d	50,19 d
Ac 60	15,23 f	61,66 f	53,25 d
Ac 70	15,49 f	57,66 e	60,05 e
Ac 80	12,50 c	50,66 d	59,38 e
Ac 90	9,47 b	51,33 d	23,10 a
Ac100	2,33 a	19,30 a	22,29 a
Me 50	12,99 c	81,66 g	52,59 c
Me 60	13,99 d	61,00 f	58,75 d
Me 70	13,67 d	56,33 e	54,65 c
Me 80	14,14 d	61,00 f	62,72 d
Me 90	11,84 c	52,00 d	56,52 d
Me 100	14,49 e	61,33 f	79,21 f
Et 50	13,94 d	54,66 d	49,41 d
Et 60	13,19 c	57,66 e	60,90 d
Et 70	16,61 f	58,00 e	68,65 e
Et 80	14,98 e	59,00 e	65,50 e
Et 90	12,71 c	50,33 d	67,44 e
Et 100	8,62 b	39,66 c	61,02 d
Água	14,48 e	33,66 b	41,19 b

\* Valores calculados em gramas de matéria seca. Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem significativamente entre si a 5,0 % pelo teste de Scott-Knott.

Entre os solventes testados no primeiro ensaio, Ac60; Ac70; Et50; Et70 e Et80, destacaram-se em resultados e foram utilizados como extratores em um segundo ensaio de forma associada compondo os tratamentos: Ac60Et50; Ac60Et70; Ac60Et80; Ac70Et50 e Ac70Et70 (Tabela 2).

Tabela 2 Compostos fenólicos (mg GAE.g-1), atividade antioxidante (%) pelo DPPH e  $\beta$ -caroteno ácido-linoleico empregando os extratores acetona (Ac) e etanol (Et) associados.

Extratores/ concentrações	Compostos fenólicos	Atividade antioxidante	
		DPPH	$\beta$ -caroteno
Ac60Et50	7,71 a	32,33 a	51,82 a
Ac60Et70	7,18 a	33,32 a	51,97 a
Ac60Et80	7,71 a	32,04 a	54,01 a
Ac70Et50	8,61 a	30,59 a	54,86 a
Ac70Et70	16,68 b	57,14 b	76,02 b

\* valores calculados em gramas de matéria seca. Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem significativamente entre si a 5,0% pelo teste de Scott-Knott.

A extração com Ac70Et70 proporcionou teores de fenólicos totais e também da atividade antioxidante com resultados significativos em comparação aos demais extratores compostos testados (Tabela 2). Nota-se que os teores de fenólicos totais e a atividade antioxidante pelo método do DPPH obtido no extrato Ac70Et70 foram semelhantes aos resultados dos extratos Ac70 e Et70 (Tabela 1). No entanto, a atividade antioxidante no método oxidação do  $\beta$ -caroteno ácido-linoleico foi maior para extrato Ac70Et70 comparado ao Ac70 e Et70 isoladamente ( $p < 0,05$ ). Verificou-se que o teor total de compostos fenólicos e a atividade antioxidante em extratos de pólen variaram em função da concentração dos solventes utilizados. Os resultados para fenólicos totais em amostras de polens de diferentes origens, encontrados por Naczki e Shahidi (2004) e Kroyer e Hegedus (2001) e Carpes et al. (2008) evidenciaram a necessidade de utilizar diferentes solventes e concentrações para se obter

extratos com maior concentração de compostos fenólicos e atividade antioxidante.

Possivelmente a combinação da acetona e do etanol tenha sido o fator que contribuiu para a obtenção dos resultados significativos e está relacionado à interação desses solventes com os compostos fenólicos. Considera-se que polaridade da acetona (momento dipolar -  $\mu = 2.88D$ ) e do etanol ( $\mu=1,69D$ ), foram capazes de extrair maior quantidade de compostos fenólicos do que o metanol ( $\mu=1.70D$ ) e água ( $\mu=1.85D$ ) também utilizados como extratores (NACZK; SHAHIDI, 2004; HAYNES; LIDE, 2010).

Os resultados obtidos nos testes de atividade antioxidante, ao se utilizar solventes não associados (Tabela 1), demonstraram a ocorrência de resultados significativos para os extratores Me50 (DPPH) e Me100 ( $\beta$ -caroteno ácido-linoleico). O extrator Ac70Et70 foi selecionado objetivando-se utilizar uma solução que fosse capaz de extrair as frações a serem analisadas quanto ao teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante pelos métodos DPPH e  $\beta$ -caroteno ácido-linoleico, ao mesmo tempo.

Singleton, Orthofer e Lamuela- Raventós (1999) relataram que o radical DPPH é um composto estável e capaz de sequestrar radicais livres que aumentam solubilidade em solventes orgânicos. Haynes e Lide (2010) verificaram a ocorrência de alta correlação ( $r=0.88$ ,  $p\leq 0.001$ ) entre o conteúdo de fenólicos totais em extratos de frutas e as respostas obtidas pelo teste de DPPH. O sistema do  $\beta$ -caroteno ácido-linoleico, por sua vez, é um método que avalia a presença de compostos antioxidantes capazes de proteger esse ácido, prolongando a inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoléico (RUFINO et al., 2006; SUCUPIRA et al., 2012). A expressão da atividade antioxidante depende dos componentes dessa fração e do conteúdo de substâncias presentes no extrato.

#### 4 CONCLUSÕES

- a) Os teores de fenólicos totais de pólen apícola variaram com o solvente e a concentração, sendo que os resultados foram significativos com Ac60 e Ac70 e Et70;
- b) A água pode ser empregada como extrator de compostos fenólicos totais, porém, permitirá apenas a extração dos compostos hidrossolúveis;
- c) Pelo método DPPH e sem associações de solventes o extrator Me50 foi aquele que revelou resultado significativo pelo método  $\beta$ -caroteno ácido-linoleico;
- d) A associação dos solventes Ac70Et70 apresentou resultados significativos para os teores de compostos fenólicos e a avaliação da atividade antioxidante;
- e) Os teores de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante, determinada pelo DPPH e  $\beta$ -caroteno ácido-linoleico, foram influenciados pelos extratores utilizados.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, M. M. B. et al. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. **Food Research International**, Barking, v. 44, n. 7, p. 2155–2159, Aug. 2011.
- ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 24, n. 2, p. 319-326, jul./dez. 2006.
- BOGDANOV, S. **Pollen: production, nutrition and health: a review**. New York: CRC Press, 2014.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, London, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Contribuições das câmaras setoriais e temáticas à formulação de políticas públicas e privadas para o agronegócio**. Brasília: MAPA, 2006.
- CAMPOS, F. M. et al. Estabilidade de compostos antioxidantes em hortaliças processadas: uma revisão. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 19, n. 4, p. 481-490, out./dez. 2008.
- CARPES, S. T. et al. Avaliação do potencial antioxidante do pólen apícola produzido na região sul do Brasil. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 7, p. 1660-1664, 2008.
- COLLI, G. R. et al. A fragmentação dos ecossistemas e biodiversidade brasileira: uma síntese. In: RAMBALDI, D. M.; OLIVEIRA, D. A. O. (Org.). **Fragmentação de ecossistemas: causas, efeitos sobre a biodiversidade e recomendações de políticas públicas**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2003. Cap. 3, p. 317-324.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.
- FREIRE, K. R. L. et al. Palynological origin, phenolic content, and antioxidant properties of honeybee-collected pollen from Bahia, Brazil. **Molecules**, Washington, v. 17, n. 2, p. 1652-1654, 2012.

HAYNES, W. M.; LIDE, D. R. **CRC handbook of chemistry and physics. a ready-reference book of chemical and physical data.** 91.ed. New York: CRC Press, 2010.

JONES, S. L.; RICHARD, J. Disseminating research about bee products. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, London, v. 3, n. 3, p. 105-116, July 2011.

KROYER, G.; HEGEDUS, N. Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 2, n. 3, p. 171-174, Sept. 2001.

LEE, H. S. Phenolic compounds in foods. In: NOLLET, L. M. L. (Org.). **Handbook of food analysis: physical characterization and nutrient analysis: volume 1.** New York: Marcel Dekker, 2004. p. 657-715.

MCCLANAHAN, C.; FEENSTRA, M. Dietary bioactives. **Biofiles**, Oxford, v. 7, n. 6, p. 35-42, 2012.

MENSOR, L. L. et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, London, v. 15, n. 2, p. 127-130, Mar. 2001.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica Farmacêutica**, São Paulo, v. 3, p. 109-122, 2006.

MOREIRA, A.V.B.; MANCINI-FILHO, J. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 17, n. 4, p. 441-424, 2004.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extractions and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1054, n. 1-2, p. 95-111, 2004.

NEVES, L. C.; ALENCAR, S. M.; CARPES, S. T. Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonóides totais em amostras de pólen apícola de *Apis mellifera*. **Brazilian Journal of Food Technology**, Oxford, n. 7, p. 108-110, June 2009.

OLIVEIRA, K. C. L. S. et al. Caracterização do pólen apícola e utilização de vitaminas antioxidantes como indicadores da eficiência do processo de desidratação. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 5, p. 1099-1102, 2009.

OLIVEIRA, M. N. et al. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos.. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 38, n. 1, p. 1-21, jan./mar. 2002.

PAULA, J. **Mel do Brasil**: as exportações brasileiras de mel no Período 2000/2006 e o papel do Sebrae. Brasília: Sebrae, 2008.

PEREIRA, F. de Melo et al. **Boas práticas na produção e beneficiamento de pólen apícola desidratado**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2003.

ROUBIK, D. W. Stingless bee nesting biology. **Apidologie**, Versailles, v. 37, n. 2, p. 124-143, Mar./Apr. 2006.

RUFINO, M. S. M. et al. **Determinação da atividade antioxidante total em frutas no Sistema B-caroteno/Ácido Linoléico**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2006. (Comunicado Técnico, 126).

RUFINO, M. S. M. et al. **Metodologia científica**: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. Fortaleza: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2007. (Comunicado Técnico, 127).

SERRA-BONVEHÍ, J.; SOLIVA-TORRENTO, M. Evaluation of polyphenolic and flavonoid compounds in honeybee collected pollen produced in Spain. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 4, 1848-1853, Apr. 2001.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin- Ciocateau reagent. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 299, p. 152- 78, 1999.

SUCUPIRA, N. R. et al. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 14, n 4, p. 263-269, 2012.

WATERHOUSE, A. L. Determination of total phenolics. In: WATERHOUSE, A. L. **Current protocols in food analytical chemistry**. New York: Jonh Wiley, 2002. p. 464-465.