



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**JÚLIO DA SILVA FÉLIX**

**CAPACIDADE ANTIOXIDATIVA DE GEOPRÓPOLIS, PÓLEN E  
RESINA E IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES VOLÁTEIS DO  
MEL DE *MELIPONA FLAVOLINEATA* FRIESE (APIDAE:  
MELIPONINA), COLETADOS EM MUNICÍPIOS DO ESTADO DO  
PARÁ.**

**BELÉM  
2010**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**JÚLIO DA SILVA FÉLIX**

**CAPACIDADE ANTIOXIDATIVA DE GEOPRÓPOLIS, PÓLEN E  
RESINA E IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES VOLÁTEIS DO  
MEL DE *MELIPONA FLAVOLINEATA* FRIESE (APIDAE:  
MELIPONINA), COLETADOS EM MUNICÍPIOS DO ESTADO DO  
PARÁ.**

Dissertação apresentada ao curso de mestrado em Engenharia Química da Universidade Federal do Pará como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de mestre em Engenharia Química.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Produtos Naturais

ORIENTADOR: Prof. Dr. José Guilherme Soares Maia

**BELÉM  
2010**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Biblioteca do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química**

---

Félix, Júlio da Silva

Capacidade antioxidativa de geoprópolis, pólen e resina e identificação dos constituintes voláteis do mel de *Melipona flavolineata* Friese (Apidae: Meliponina), coletados em municípios do Estado do Pará / Júlio da Silva Félix; orientador, José Guilherme Soares Maia.- Belém, 2011.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará. Instituto de Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2010

1. Mel 2. Própolis 3. Pólen 4. Abelha - produtos 5. Antioxidantes I.  
Título

CDD 22.ed. 638.16

---

**JÚLIO DA SILVA FÉLIX**

**CAPACIDADE ANTIOXIDATIVA DE GEOPRÓPOLIS, PÓLEN E RESINA E IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES VOLÁTEIS DO MEL DE *MELIPONA FLAVOLINEATA* FRIESE (APIDAE: MELIPONINA), COLETADOS EM MUNICÍPIOS DO ESTADO DO PARÁ.**

Dissertação apresentada ao curso de mestrado em Engenharia Química da Universidade Federal do Pará como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de mestre em Engenharia Química.

Área de concentração: Produtos Naturais

DATA DA AVALIAÇÃO: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

CONCEITO: \_\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. José Guilherme Soares Maia  
(PPEQ/UFPA) – Orientador

---

Davi do Socorro Barros Brasil  
(FEQ/ITEC/UFPA) – Membro

---

Prof. Dr. Jesus Nazareno Silva de Souza  
(PPGCTA/UFPA) – Membro

---

Prof. Dr. Giorgio Cristino Venturieri  
(EMBRAPA/CPATU) - Externo

*Ao Senhor nosso Deus pelo dom da vida*

*Aos meus pais Célia e José pelo carinho, incentivo, confiança depositados que colaboraram para melhora do meu desempenho pessoal e profissional.*

*À toda minha grande família exemplo de unidade e alegria.*

*Ao meu filho Thomas, um presente de Deus para minha vida.*

*Em especial aos meus avós José Tenório e Luiza Ribeiro por serem exemplo de força, amor e perseverança.*

*Eu dedico*

## AGRADECIMENTOS

Ao professor e orientador **José Guilherme Soares Maia** pela oportunidade e infra-estrutura oferecidas, por todo incentivo, seriedade e companheirismo.

A professora **Eloísa Andrade** pela grande contribuição na análise e identificação dos constituintes das amostras de mel, além da amizade.

Aos professores do PPEQ pelo incentivo e contribuição para a minha formação, em especial, ao professor **Marcos Pontes** pela ajuda nas coletas e ao professor **Lênio Faria** pela concessão de infra-estrutura do Laboratório de Engenharia de Produtos Naturais e pela amizade.

Aos profissionais da EMBRAPA Amazônia Oriental, o **Prof. Giorgio Venturieri** e **Enilson Solano** pela valiosa contribuição no acesso das áreas de coleta e importantes informações a respeito dos produtos da abelha *Melipona flavolineata*.

Aos meus colegas de turma da pós-graduação por todos os momentos, confraternizações e experiências boas compartilhadas.

Aos alunos da usina de alimentos, em especial a aluna Tatiane pela ajuda no auxílio da utilização da estufa de secagem.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório **Patrícia Lira, Nathalie Azedo, Caroline Franco, Nayla Nunes, Bruno Gonçalves, Lidiane Diniz, Lucélia Moraes, Márcio Ronald, Rosilene Costa, Erika Milene e Matheus Braga**, por todo incentivo, troca de informações e experiências vivenciadas além do vínculo criado.

Em especial, a **Joyce Kelly**, pelo auxílio nos testes de antioxidantes e atividades do laboratório e pelos conhecimentos teóricos e práticos repassados, pelas melhorias e sugestões no trabalho e por toda amizade e momentos companheirismo.

Ao **Sr. Ferdinando** pela ajuda na secagem dos materiais e pela amizade e convivência desenvolvidas.

A bibliotecária do PPEQ **Ivone Costa** pela importante contribuição na normalização do trabalho.

Aos Professores **Jesus Souza e Davi Brasil**, pelas importantes modificações, sugestões e melhorias no trabalho.

A minha valiosa família, em especial, minha mãe **Maria Célia**, meu tio **João Tenório** e minha avó **Luiza Ribeiro**, que me forneceram toda educação e incentivo e carinho necessários.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização deste trabalho.

*"Consulte não a seus medos, mas a suas esperanças e sonhos.  
Pense não sobre suas frustrações, mas sobre seu potencial  
não usado. Preocupe-se não com o que você tentou e falhou,  
mas com aquilo que ainda é possível a você fazer."*

*Papa João XXIII*



## RESUMO

As abelhas sem ferrão (tribo Meliponini) são um grupo diverso de abelhas altamente sociais distribuídas nos trópicos e subtropicais. *Melipona flavolineata*, conhecida popularmente como "uruçu-amarela", ocorre nas regiões de terra firme ao Nordeste Amazônico. Há evidências de que alguns produtos destas abelhas possuem atividades biológicas como anti-séptica, antifúngica, antibacteriana, antiviral, anti-inflamatória e antioxidante. Foram coletadas amostras de mel, geoprópolis, pólen e cerume de *M. flavolineata* em quatro municípios do Estado do Pará com determinados tipos de vegetação: Vigia (capoeira alta/floresta secundária), Tracuateua (localidade próxima de mangue), São João de Pirabas (localidade próxima de mangue) e Baião (capoeira/floresta secundária). Após extração com etanol (sohxlet, 2h) da geoprópolis, pólen e cerume, foram medidos os teores de fenólicos totais pelo método colorimétrico de Folin Ciocalteu e suas capacidades antioxidativas pelo seqüestro do radical DPPH. O teor de compostos capazes de reduzir o reagente Folin Ciocalteu variou de 39,1 a 337,7 mg EAG/g. Para a geoprópolis, os maiores teores foram encontrados nas amostras dos municípios de Tracuateua e Vigia ( $337,7 \pm 5,2$  mg EAG/g e  $118 \pm 7,9$  mg EAG/g) e nas amostras de cerume e pólen os maiores índices são das amostras da cidade de São João de Pirabas ( $79,8 \pm 6,3$  e  $84,0 \pm 2,0$  mg EAG/g). No ensaio de DPPH, os valores de  $CE_{50}$  foram obtidos por regressão linear ( $P < 0,05$ ). Com base neles foi verificado que as amostras de geoprópolis e cerume mais ativas foram as coletadas nos municípios de Tracuateua e Vigia ( $CE_{50}$ ,  $6,0 \pm 0,1$   $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $7,8 \pm 0,5$   $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), seguidas pelos extratos de cerume de Vigia e São João de Pirabas ( $CE_{50}$ ,  $11,1 \pm 0,4$   $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $10,3 \pm 0,4$   $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Nas amostras de pólen, o mais ativo foi obtido na cidade de São João de Pirabas ( $CE_{50}$ ,  $43,6 \pm 2,6$   $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Das amostras de mel, foram extraídos os constituintes voláteis utilizando a técnica de micro-extração/destilação. A identificação e quantificação foram feitas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) comparando os espectros de massas com registros da literatura. Compostos das classes dos monoterpenos oxigenados, álcoois, aldeídos, cetonas e hidrocarbonetos alifáticos foram predominantes em todas as amostras. Os compostos com maiores concentrações nas 4 amostras analisadas foram: 3,7-dimetil-1,5,7-octatrien-3-ol e o fenilacetaldéido. Estes resultados expressam uma elevada capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos de algumas amostras quando comparadas aos padrões comerciais como o Trolox ( $CE_{50}$ ,  $4,9 \pm 0,1$   $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), destacando a importância do estudo dos materiais formulados por esta espécie de abelha.

Palavras chave: Mel, Geoprópolis, Pólen, Cerume, *M. flavolineata*, Atividade antioxidante, Fenólicos totais, Compostos voláteis.

## ABSTRACT

Stingless bees (Tribe Meliponini) are a diverse group of highly social bees distributed throughout the tropics and subtropics. *Melipona flavolineata* is a stingless bee popularly known as “uruçu-amarela” occurring in the highland areas of Northeast Amazon. There is evidence that some of bee products possess biological activities such as bee antiseptic, antifungal, antibacterial, antiviral, anti-inflammatory and antioxidant. Were collected samples of honey, geopropolis, pollen and cerumen of *M. flavolineata* in four municipalities of Pará state and with certain types of vegetation: Vigia (secondary and capoeira high forest), Tracuateua (town close to mangrove), São João de Pirabas (town close to mangrove) and Baião (secondary and capoeira forest) there is substantial evidence to indicate that these products has biological properties. These products were extracted with ethanol (Sohxlet, 2h) and was mensured the total phenolic levels by colorimetric method (Folin Ciocalteu) and antioxidative capacities by scavenging of DPPH radical method. The total phenolic contents (TP) with capacity to reduce Folin Ciocalteu reagent in various extract samples ranged from 39.1 to 337.7 mg EAG/g. Between the extracts of geopropolis the highest TP contents were found in the samples collected in the cities of Tracuateua and Vigia ( $337.7 \pm 5.2$  mg GAE/g and  $118 \pm 7.9$  mg GAE/g) and in the samples of cerumen and pollen the highest TP contents were obtained in the city of São João de Pirabas ( $79,8 \pm 6.3$  and  $84.0 \pm 2.0$  mg GAE/g). In the DPPH assay the  $EC_{50}$  values were obtained by linear regression ( $P < 0,05$ ) and based on them was verified that the geopropolis and cerumen samples collected in the cities of Tracuateua and Vigia were the most active ( $CE_{50}$ ,  $6,0 \pm 0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $7,8 \pm 0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), followed by the cerumen of Vigia and São João de Pirabas ( $EC_{50}$ ,  $11.1 \pm 0.4 \mu\text{g.mL}^{-1}$  and  $10.3 \pm 0.4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), all with significant activities and comparable to Trolox ( $EC_{50}$ ,  $4.9 \pm 0.1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Between the samples of pollen, the most active was obtained in the city of São João de Pirabas ( $EC_{50}$ ,  $43.6 \pm 2.6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). The volatile constituents of honey samples of *M. flavolineata* were extracted using the technique of micro-extraction/distillation. The identification and quantification was performed gas chromatography/mass spectrometry (GC-MS) by comparing the mass spectra with literature records (Adams, 2007). Compounds of the classes of oxygenated monoterpenes, alcohols, aldehydes, ketones and aliphatic hydrocarbons were predominant in all samples. The compound with higher concentration in the four samples was 3,7-dimethyl-1,5,7-octatrien-3-ol. These results show a high antioxidant capacity and phenolic content of some samples when compared to commercial standards such as Trolox ( $EC_{50}$ ,  $4.9 \pm 0.1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), highlighting the importance of studying the materials made by this bee species.

Keywords: Honey, Propolis, Polen, cerumen, *M. flavolineata*, Antioxidant activity, Total phenolics, Volatile compounds.

## ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

µg	micrograma
µL	microlitro
µM	micromolar
Abs <sub>517</sub>	Absorbância a 517 nm
AH	Antioxidante
BHA	Butil-hidroxianisol
BHT	Butil-hidroxitolueno
CE <sub>50</sub>	Concentração eficaz
CG/EM	Cromatografia gasosa/espectrometria de massas
°C	Graus Celsius
DPPH	2,2-difenil-1-picrilidrazila
DPPH•	2,2-difenil-1-picrilidrazila na forma radicalar
DPPH-H	2,2-difenil-1-picrilidrazila na forma reduzida
EAG	equivalentes de ácido gálico
EEGP (1, 2, 3 e 4)	Amostras de geoprópolis coletadas nos 4 municípios do Pará (Vigia, Tracuateua, São João de Pirabas e Baião)
EEPO (1, 3 e 4)	Amostras de Pólen coletadas em 3 municípios do Pará (Vigia, São João de Pirabas e Baião)
EER (1, 2, 3 e 4)	Amostras de cerume coletadas nos 4 municípios do Pará (Vigia, Tracuateua, São João de Pirabas e Baião)
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EtOH	Etanol
eV	Eletronvolt
Fig.	Figura
FT	Fenólicos totais
g	grama
MEOH	metanol

mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
nm	nanômetros
p.	página
P. A.	Para análise
R•	Espécie radicalar
Tab.	Tabela
TR	Tempo de retenção
TBHQ	Ter-butil-hidroquinona
Trolox	Ácido 6-hidróxi-2,5,7,8-tetrametil-2-cromanóico

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Quadro 1.</b> Classificação taxonômica das abelhas sem ferrão.....	<b>20</b>
<b>Mapa 1.</b> Localização de alguns Meliponíneos no Brasil.....	<b>22</b>
<b>Fotografia 1.</b> Rainha entre outras abelhas <i>M. flavolineata</i> .....	<b>23</b>
<b>Fotografia 2.</b> Operária guarda de <i>M. flavolineata</i> ou “uruçu-amarela”.....	<b>23</b>
<b>Quadro 2.</b> Classes de compostos da própolis de algumas espécies de abelhas sem ferrão de diferentes localidades.....	<b>26</b>
<b>Fotografia 3.</b> Pólens de diferentes origens botânicas.....	<b>28</b>
<b>Fotografia 4.</b> Potes contendo pólen armazenado pelas abelhas <i>M. flavolineata</i> .....	<b>29</b>
<b>Fotografia 5.</b> Potes de cerume para armazenamento de mel e pólen de <i>M. flavolineata</i> .....	<b>30</b>
<b>Quadro 3.</b> Estruturas de compostos com atividade antioxidante identificados na própolis.....	<b>32</b>
<b>Gráfico 1.</b> Atividade de seqüestro do radical DPPH das amostras de pólen da região sul do Brasil e dos padrões em percentual e em termos de CE <sub>50</sub> .....	<b>33</b>
<b>Esquema 1.</b> Formação de radicais livres (RL) (espécie reativa de oxigênio) e mecanismos de defesa antioxidantes em sistemas biológicos.....	<b>39</b>
<b>Estruturas 1.</b> Principais antioxidantes sintéticos.....	<b>41</b>
<b>Esquema 2.</b> Seqüestro do radical DPPH frente um antioxidante RH.....	<b>44</b>
<b>Quadro 4.</b> Municípios e tipos de vegetação circundante dos locais de coleta do geoprópolis, pólen e resina e mel de <i>M. favolineata</i> .....	<b>46</b>
<b>Fotografia 6.</b> Imagem de satélite do estado do Pará com a localização aproximada dos municípios de coleta dos materiais de <i>M. flavolineata</i> .....	<b>46</b>
<b>Quadro 5.</b> Nomenclatura codificada dos extratos brutos de geoprópolis, pólen e resina.....	<b>47</b>

<b>Fotografia 7.</b> Extração com etanol utilizando o conjunto soxhlet, manta aquecedora e condensador.....	<b>48</b>
<b>Fotografia 8.</b> Aspecto da extração líquido-líquido dos extratos brutos.....	<b>49</b>
<b>Fluxograma 1.</b> Processo de obtenção dos extratos brutos e frações de geoprópolis, pólen e resina de <i>M. flavolineata</i> .....	<b>50</b>
<b>Estruturas 2.</b> Ácido gálico, um ácido fenólico usado como padrão fenólico.....	<b>52</b>
<b>Gráfico 2.</b> Valores de CE <sub>50</sub> para os extratos brutos de geoprópolis, pólen e cerume das 4 localidades e dos padrões Trolox e BHA.....	<b>61</b>
<b>Gráfico 3.</b> Valores de CE <sub>50</sub> das frações de geoprópolis de Vigia e Tracuateua e dos padrões Trolox e BHA.....	<b>63</b>
<b>Gráfico 4.</b> Valores de CE <sub>50</sub> das frações de pólen de Vigia e São João de Pirabas e dos padrões Trolox e BHA.....	<b>65</b>
<b>Gráfico 5.</b> Valores de CE <sub>50</sub> das frações de cerume de Vigia e São João de Pirabas com os padrões Trolox e BHA.....	<b>66</b>
<b>Gráfico 6.</b> Correlações estatísticas entre teor de fenólicos totais e valores de CE <sub>50</sub> para os extratos brutos de geoprópolis.....	<b>68</b>
<b>Gráfico 7.</b> Correlações estatísticas entre teor de fenólicos totais e valores de CE <sub>50</sub> para os extratos brutos de pólen.....	<b>68</b>
<b>Gráfico 8.</b> Correlações estatísticas entre teor de fenólicos totais e valores de CE <sub>50</sub> para os extratos brutos de cerume.....	<b>68</b>
<b>Dendograma 1.</b> Percentual de similaridade entre pares de amostras de mel de <i>M. flavolineata</i> .....	<b>72</b>
<b>Quadro 6.</b> Estruturas dos componentes majoritários do mel das 4 localidades do estado do Pará.....	<b>73</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Capacidade de seqüestro do radical DPPH dos extratos de pólen de <i>Melipona subnitida</i> .....	<b>34</b>
<b>Tabela 2.</b> Capacidade antioxidativa (CE <sub>50</sub> ) de amostras de mel de abelhas sem ferrão Amazônicas.....	<b>34</b>
<b>Tabela 3.</b> Fenólicos totais dos extratos brutos do geoprópolis, pólen e resina das 4 localidades.....	<b>56</b>
<b>Tabela 4.</b> Fenólicos totais das frações e dos extratos brutos de geoprópolis de Vigia e Tracuateua.....	<b>57</b>
<b>Tabela 5.</b> Fenólicos totais das frações e dos extratos brutos de pólen de Vigia e São João de Pirabas.....	<b>58</b>
<b>Tabela 6.</b> Fenólicos totais das frações e dos extratos da resina de Vigia e São João de Pirabas.....	<b>59</b>
<b>Tabela 7.</b> Componentes voláteis das amostras de mel coletados nos 4 municípios do Pará.....	<b>75</b>

## SUMÁRIO

### ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

### LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### LISTA DE TABELAS

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
<b>3.</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>20</b>
3.1	AS ABELHAS INDÍGENAS SEM FERRÃO.....	20
3.2	<i>MELIPONA FLAVOLINEATA</i> FRIESE, 1900.....	22
3.3	CARACTERÍSTICAS E COMPOSIÇÃO DOS PRODUTOS DE <i>M.</i> <i>FLAVOLINEATA</i> .....	24
<b>3.3.1</b>	<b>Própolis e Geopropolis.....</b>	<b>24</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Pólen.....</b>	<b>28</b>
<b>3.3.3</b>	<b>Cerume.....</b>	<b>30</b>
<b>3.3.4</b>	<b>Mel.....</b>	<b>30</b>
3.4	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS PRODUTOS DE <i>M. FLAVOLINEATA</i> ...	32
<b>3.4.1</b>	<b>Atividade antioxidante identificada na própolis.....</b>	<b>32</b>
<b>3.4.2</b>	<b>Atividade antioxidante identificada no pólen.....</b>	<b>33</b>
<b>3.4.3</b>	<b>Atividade antioxidante identificada no mel.....</b>	<b>34</b>
3.5	COMPOSTOS VOLÁTEIS PRESENTES NO MEL.....	35
3.6	DANOS OXIDATIVOS E O SISTEMA DE PROTEÇÃO DO ORGANISMO....	37
<b>3.6.1</b>	<b>Radicais livres e as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.....</b>	<b>38</b>
<b>3.6.2</b>	<b>Antioxidantes.....</b>	<b>40</b>
<b>3.6.3</b>	<b>Antioxidantes Sintéticos.....</b>	<b>41</b>
<b>3.6.4</b>	<b>Antioxidantes Naturais.....</b>	<b>42</b>
3.7	CAPACIDADE ANTIOXIDATIVA PELO MÉTODO INDIRETO DO SEQÜESTRO DO RADICAL DPPH (1,1-difenil-2- picrilidrazila).....	42
<b>4.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>45</b>
4.1	MATERIAIS UTILIZADOS.....	45
<b>4.1.1</b>	<b>Equipamentos e Acessórios.....</b>	<b>45</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Reagentes e solventes utilizados para análise de antioxidantes e extração dos aromas.....</b>	<b>45</b>



4.2	METODOLOGIA PARA ANÁLISE DA GEOPRÓPOLIS, PÓLEN E CERUME DE <i>M. FLAVOLINEATA</i> .....	46
4.2.1	<b>Coleta dos materiais de <i>M. flavolineata</i></b> .....	46
4.2.2	<b>Secagem e processamento dos extratos</b> .....	47
4.2.3	<b>Partição líquido-líquido dos extratos</b> .....	49
4.2.4	<b>Cálculo do Rendimento dos extratos e frações</b> .....	51
4.3	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS EXTRATOS E FRAÇÕES PELO MÉTODO FOLIN CIOCALTEAU.....	51
4.3.1	<b>Teor de Fenólicos totais utilizando o método colorimétrico Folin Ciocalteu</b> .....	51
4.3.2	<b>Curva de calibração com o padrão Ácido Gálico</b> .....	52
4.4	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDATIVA DOS EXTRATOS DE GEOPRÓPOLIS, PÓLEN, CERUME E FRAÇÕES PELO MÉTODO INDIRETO DO SEQÜESTRO DO RADICAL DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila).....	53
4.4.1	<b>Procedimento da técnica e preparo da mistura reacional</b> .....	53
4.4.2	<b>Cálculos para avaliação da capacidade antioxidativa</b> .....	54
4.5	OBTENÇÃO E ANÁLISE DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS DO MEL.....	54
4.5.1	<b>Obtenção dos compostos voláteis do mel</b> .....	54
4.5.2	<b>Cromatografia gasosa/espectrometria de massas dos voláteis do mel</b> ..	54
4.6	MÉTODOS ESTATÍSTICOS.....	55
4.6.1	<b>Análise de Agrupamentos</b> .....	55
4.6.2	<b>Análise de Agrupamento Hierárquico</b> .....	55
5.	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	56
5.1	TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS DE GEOPRÓPOLIS, PÓLEN E CERUME PELO MÉTODO FOLIN CIOCALTEAU.....	56
5.1.1	<b>Fenólicos Totais (FT) dos extratos etanólicos brutos de geoprópolis, pólen e cerume</b> .....	56
5.1.2	<b>Fenólicos Totais (FT) das frações do geoprópolis de Vigia (1) e Tracuateua (2)</b> .....	57

5.1.3	<b>Fenólicos Totais (FT) das frações do pólen de Vigia (1) e São João de Pirabas (3).....</b>	58
5.1.4	<b>Fenólicos Totais (FT) das frações do cerume de Vigia (1) e São João de Pirabas (3).....</b>	59
5.2	CAPACIDADE ANTIOXIDATIVA PELO MÉTODO DE SEQUESTRO DO RADICAL DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila).....	61
5.2.1	<b>Capacidade antioxidante dos extratos brutos de geoprópolis, pólen e cerume.....</b>	61
5.2.2	<b>Capacidade antioxidante das frações dos extratos mais ativos.....</b>	63
5.2.2.1	<b>Capacidade antioxidante das frações de Geoprópolis de Vigia (1) e Tracuateua (2).....</b>	63
5.2.2.2	<b>Capacidade antioxidante das frações de pólen de Vigia (1) e São João de Pirabas (3).....</b>	65
5.2.2.3	<b>Capacidade antioxidante das frações de cerume de Vigia (1) e São João de Pirabas (3).....</b>	66
5.3	CORRELAÇÕES ENTRE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E FENÓLICOS TOTAIS.....	67
5.4	ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS AMOSTRAS DE MEL.....	69
5.4.1	<b>Composição química dos voláteis do mel</b>	69
5.4.2	<b>Análise Hierárquica de Agrupamento (HCA) dos constituintes voláteis das amostras de mel das 4 localidades.....</b>	72
6.	<b>CONCLUSÃO.....</b>	75
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	76

## 1 INTRODUÇÃO

As abelhas indígenas sem ferrão ocupam grande parte das regiões de clima tropical do planeta, além de algumas importantes áreas de clima temperado e subtropical. São encontradas na região Neotropical e presentes também em menor número na Ásia, ilhas do pacífico, Austrália, África e Nova Guiné (COSTA JR, 2000).

A criação dessas abelhas é uma atividade antiga, que remonta até os tempos da Civilização Maia (VILLANUEVA, ROUBIK & COLLI-UCÁN, 2005, CORTOPASSI – LAURINO, 2006), e que atualmente está em franca expansão em todo Brasil.

As abelhas indígenas, assim como as melíferas, coletam substâncias de plantas que são misturadas com resinas que elas produzem e transformadas em produtos que têm demonstrado variadas atividades biológicas e usos terapêuticos.

Os produtos processados pelas abelhas (própolis, pólen e mel) têm sido muito estudados no mundo todo por apresentarem diversas propriedades como antibacteriana (GARCÍA et al., 2001), antifúngica (ÖZCAN et al., 2004), antiinflamatória (BORELLI et al., 2002, BOGDANOV, 2004, DI PAOLA-NARANJO et al., 2004), anticariogênica (ALMAS, MAHMOUD e DAHLAN, 2001, GEBARA, LIMA e MAYER, 2002) e imunomodulatória (ORSOLIC, 2003).

Os produtos naturais desempenham um papel altamente significativo na descoberta e no desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de várias doenças humanas. Para o combate ao câncer e às doenças infecciosas, 60% a 75% dos fármacos utilizados são originários de produtos naturais (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003).

Recentemente, aprofundaram-se os estudos de compostos com atividade antioxidante, ou seja, capacidade de seqüestrar radicais livres que podem agir no corpo humano e causar diversos danos à célula, como câncer, doenças neurodegenerativas, anemia, isquemia, além da oxidação do LDL, o que pode levar a problemas cardiovasculares. Compostos fenólicos, principalmente os flavonóides,

possuem atividade de seqüestro de espécies reativas de oxigênio, incluindo radicais hidroxila, peroxila e superóxido, além da propriedade de quelar metais de transição, impedindo assim, a formação dessas espécies (HALLIWELL, 2000).

A propriedade antioxidante das especiarias e de outros vegetais também está relacionada, principalmente, com os seus compostos fenólicos. A maioria dos antioxidantes naturais é composta de grupos funcionais ativos. (MADSEN; BERTELSEN; SKIBSTED, 1997; NAMIKI, 1990; POKORNÝ, 1991).

Torna-se complexa a padronização da fonte botânica e da composição química da própolis e dos outros produtos explorados pelas abelhas devido à grande diversidade vegetal que estas utilizam para retirada de suas resinas, entre outros fatores. Além disso, nas regiões norte e nordeste, poucos trabalhos foram feitos a respeito da sua composição química e das propriedades biológicas destes produtos. (AGA et al., 1994; TOMÁS-BARBERÁN et al., 1993; BANKOVA et al., 1995; PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002).

## 2 OBJETIVOS

- **Objetivo geral**

- Estudar os teores de fenólicos totais e as propriedades antioxidantes dos produtos da Abelha *Melipona flavolineata*, conhecida como uruçú-amarela, em quatro localidades com ocorrência nos municípios de Vigia, Tracuateua, São João de Pirabas e Baião, Estado do Pará.

- **Objetivos específicos**

- Analisar a composição química do aroma dos méis de *M. flavolineata*;

- Determinar a atividade antioxidante de extratos e frações dos extratos de geoprópolis, pólen e cerumes de *M. flavolineata*, utilizando o método de seqüestro do radical DPPH.

- Determinar o teor de fenólicos totais dos extratos e frações dos extratos de geoprópolis, pólen e cerumes de *M. flavolineata*, utilizando o método colorimétrico Folin Ciocalteau.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 AS ABELHAS INDÍGENAS SEM FERRÃO

Visando formas alternativas de exploração sustentável dos recursos naturais, o manejo dos meliponíneos (abelhas sem ferrão) vem se tornando uma saída viável para geração de renda principalmente para agricultores familiares (VENTURIERI, 2006). A criação de abelhas da subtribo Meliponina (SILVEIRA et al., 2002), se enquadra perfeitamente dentro dos conceitos de diversificação e uso sustentado da terra da Amazônia. Os meliponíneos são abelhas dóceis, de fácil manejo e que necessitam de pouco investimento para a sua criação. É uma atividade que pode ser integrada a plantios florestais, de fruteiras e de culturas de ciclo curto, podendo contribuir através da polinização, com o aumento da produção agrícola e regeneração da vegetação natural (VENTURIERI, RAIOL & PEREIRA, 2003).

A meliponicultura é uma atividade sustentável e ecológica, onde as abelhas são parte integrante dos nossos ecossistemas e da biodiversidade mundial. É economicamente viável, tendo o mel como um produto diferenciado no mercado (OLIVEIRA, 2004). A classificação taxonômica dos meliponíneos é mostrada no quadro 1.

Reino	Animal
Filo	Arthropoda
Classe	Insecta
Ordem	Hymenoptera
Subordem	Apocrita
Superfamília	Apoidea
Família	Apidae
Tribo	Meliponini
Gênero	<i>Melipona</i>

**Quadro 1:** Classificação taxonômica das abelhas sem ferrão (KERR, CARVALHO E NASCIMENTO, 1996).

As abelhas, Insetos pertencentes à ordem dos Himenópteros e à família dos Apídeos, representam os principais polinizadores da vegetação natural (SOUZA; CAMPOS, 2008).

A maioria dos Meliponini nidifica em cavidades pré-existentes (que podem estar em troncos ou galhos ocos de árvores) de tamanho apropriado, com uma pequena abertura por onde se movimentam (MICHENER, 1974).

As abelhas indígenas se caracterizam principalmente por terem ferrão reduzido e constroem ninhos muito peculiares, que auxiliam na identificação da espécie (NATES-PARRA, 2001).

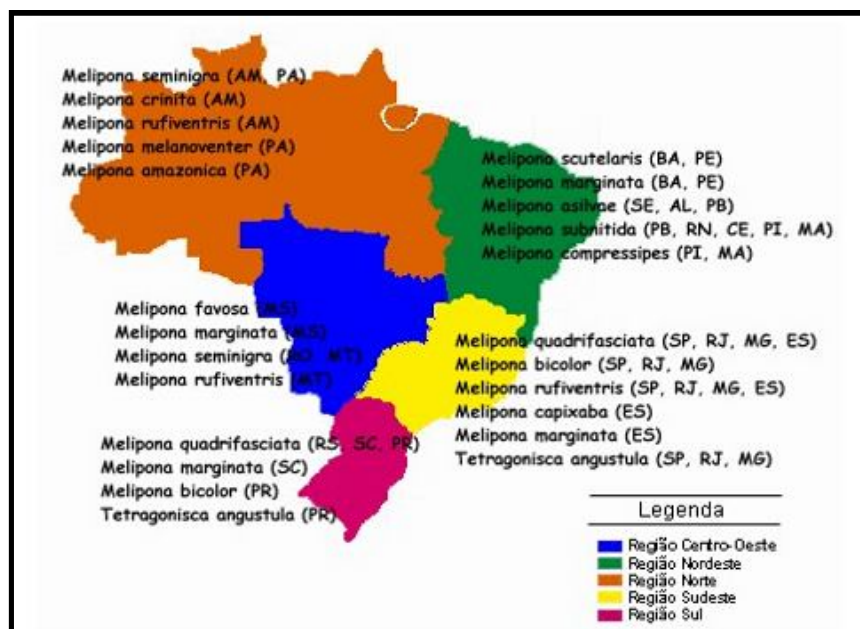
Apesar de possuírem ferrão atrofiado, são compensados por mandíbulas afiadas, operadas por fortes músculos (SAKAGAMI, 1982). Além disso, algumas espécies podem também apresentar glândulas produtoras de substâncias tóxicas, que podem causar irritações e queimaduras nas pessoas e outros animais (NOGUEIRA-NETO, 1997).

Tem distribuição pan-tropical, mas alcançam partes subtropicais da Austrália, África e América e pouco além do Trópico de Câncer, no Hemisfério Norte (SAKAGAMI, 1982; CORTOPASSI – LAURINO et al., 2006). No entanto, o gênero, *Melipona* tem distribuição restrita a região Neotropical (SILVEIRA; MELO; ALMEIDA, 2002), sendo este um dos mais bem estabelecidos dentre os meliponíneos, com um grande número de espécies (MOURE; KERR, 1950).

A Amazônia abriga grande diversidade de espécies de *Melipona* com ampla variedade de ninhos, com dúzias de colônias por hectare. Várias espécies são criadas para a polinização de cultivares de importância econômica, como tomate, feijão, milho, etc. (ROUBIK, 1989).

Existem mais de 129 espécies de meliponíneos descritos na Amazônia (SILVEIRA et al., 2002). As principais espécies do gênero *Melipona* são: *Melipona Crinita* (AC), *M. eburnea fuscopilosa* (AC, AM), *M. flavolineata* (PA, AC), *M. fasciculata* (PA, MA, AP), *M. lateralis*, (AM), *M. manausensis* (AM, PA), *M.*

*melanoventer* (PA), *M. nebulosa* (AM), *M. paraensis* (AM, PA, AP), entre outras. (ASSIS, 2001; VENTURIERI et al., 2003; CARVALHO-ZILSE, 2005 e CORTOPASSI-LAURINO et al., 2006).



**Mapa 1:** Localização de alguns Meliponíneos no Brasil (KERR, CARVALHO & NASCIMENTO 1996).

### 3.2 MELIPONA FLAVOLINEATA Friese (1900)

*Melipona flavolineata*, espécie conhecida popularmente como “uruçu-amarela” (Fotografia 1, Pág. 23), ocorre ao nordeste da Região Amazônica, nos Estados do Pará e Maranhão, em áreas de terra firme. Possui hábitos de coleta de substâncias de cheiro forte, logo não é tão higiênica quanto a espécie *M. fasciculata*. Geralmente é encontrada na base de troncos de árvores. Na região Bragantina são encontradas principalmente em árvores grossas próximas dos igapós (matas ciliares ou parcialmente inundáveis), onde hoje encontramos a maioria dos ninhos naturais desta espécie. A entrada do seu ninho é bem característica formando uma pequena plataforma com a borda recortada (Fotografia 2, pág. 23) (VENTURIERI, 2003).





**Fotografia 1:** Rainha entre outras abelhas *M. flavolineata* (VENTURIERI, G. C. Disponível em: <http://mel.cpatu.embrapa.br/especies>.



**Fotografia 2:** Operária guarda de *M. flavolineata* ou “uruçu-amarela”. (VENTURIERI, 2008)

### 3.3 CARACTERÍSTICAS E COMPOSIÇÃO DOS PRODUTOS DE *M. FLAVOLINEATA*

#### 3.3.1 Própolis e Geoprópolis

A palavra própolis é de origem grega e derivada de pro, em defesa de, e polis, cidade. Isto implica em um produto usado na defesa da comunidade das abelhas (SALATINO et al., 2005).

A própolis, substância natural coletada pelas abelhas do néctar de flores e dos exudatos de árvores, é conhecida na medicina tradicional desde 3000 anos antes de Cristo. É indicada no tratamento da saúde e prevenção de doenças do coração, nos processos de inflamação, em diabetes e câncer (BANSKOTA et al., 2001; BURDOCK, 1998). É extensamente usada no campo da medicina, da cosmetologia e na indústria de alimentos, bebidas e suplementos nutricionais. Dentre as muitas propriedades biológicas relatadas para a própolis produzidas por abelhas, as mais importantes são as atividades antimicrobiana, antiinflamatória, antioxidante e anti-proliferativa de doenças do coração, diabetes e câncer (GHISALBERTI, 1979).

Segundo Nogueira-Neto (1997), a própolis é constituída basicamente pelas resinas vegetais geralmente coletadas pelas abelhas nas plantas lenhosas trazidas para as colméias.

Geoprópolis ou “batume”, como as comunidades locais costumam denominar, é um tipo especial de própolis produzido por abelhas sem ferrão, do gênero *Melipona*, formado por uma mistura de resinas vegetais, cera e terra (BARTH, 2006).

A própolis é um produto complexo das abelhas que varia de acordo com diversos fatores. A cor pode ser creme, amarela, verde, marrom claro ou escuro. Algumas amostras têm uma textura friável e dura, enquanto outras são elásticas e colantes (SALATINO et al., 2005).

Em muitas espécies da tribo Meliponini, são coletadas resinas, geralmente de árvores feridas, danificadas ou, às vezes, perfuradas por brocas, ou seja, pelas larvas de certos insetos. São processadas pelas abelhas nos seus ninhos, seja numa forma pura ou misturada com um pouco de cera, essa substância é denominada própolis puro ou misto. (NOGUEIRA – NETO, 1997).

A própolis é utilizada pelas abelhas na entrada das colméias, fechando frestas para redução da entrada do vento frio e, principalmente, dos inimigos naturais (formigas, abelhas, fungos e bactérias), além de ser utilizada para embalsamar pequenos animais mortos pelas abelhas e que não puderam ser retirados, evitando a putrefação. Também é utilizado como material de construção no interior da colméia, soldando favos, quadros e envernizando o interior dos alvéolos para que a rainha faça a postura. A literatura mostra a atividade biológica desta resina natural contra uma variedade de patógenos humanos e animais (SALOMÃO et al., 2004).

A própolis possui constituintes que variam de acordo com o período do ano e do tipo de vegetação disponível na região onde é coletado (AHN et al., 2007).

Velikova et al. (2000) analisaram 20 amostras de própolis de 12 espécies diferentes de Meliponinae através da técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) e constatou-se diferentes tipos químicos de própolis de acordo com os componentes majoritários, como são mostrados no Quadro 2, págs. 26 e 27.

Sua composição química é determinada principalmente pelas características fitogeográficas existentes ao redor da colméia (KUMAZAWA; HAMASAKA; NAKAYAMA, 2004), e também das reservas de pólen e mel. Como consequência desta composição química diferenciada, ocorre também uma variação na sua atividade farmacológica (MENEZES, 2005).

<b>Espécie de abelha sem ferrão</b>	<b>Origem</b>	<b>Classes de compostos</b>
<i>Friesomellita silvestrii</i>	<i>Goiás, Brasil</i>	<i>Monoterpenos Sesquiterpenos</i>
<i>Friesomellita silvestrii languida</i>	<i>Minas Gerais, Brasil</i>	<i>Monoterpenos Sesquiterpenos Diterpenos Triterpenos</i>
<i>Friesomellita varia</i>	<i>São Paulo, Brasil</i>  <i>Venezuela</i>	<i>Monoterpenos Sesquiterpenos Triterpenos</i>  <i>Prenilados Benzofenonas</i>
<i>Lestrimelatta ssp</i>	<i>Paraná, Brasil</i>	<i>Diterpenos Triterpenos</i>
<i>Melipona beechei</i>	<i>Yucatán, México</i>	<i>Monoterpenos Sesquiterpenos</i>
<i>Melipona compressipes</i>	<i>Piauí, Brasil</i>  <i>Venezuela</i>	<i>Sesquiterpenos Ác. fenólicos Flavonóides Açúcares Diterpenos Triterpenos Ác. graxos</i>  <i>Benzofenonas preniladas</i>
<i>Melipona farvora orlinge</i>	<i>Mato Grosso do Sul, Brasil</i>	<i>Diterpenos Triterpenos</i>
<i>Melipona farvosa</i>	<i>Venezuela</i>	<i>Benzofenonas preniladas</i>
<i>Melipona marginata</i>	<i>Pernambuco, Brasil</i>	<i>Ác. Fenólicos Açúcares</i>

<i>Melipona quadrifasciata</i>	<i>Paraná, Brasil</i>	<i>Ác. Fenólicos</i> <i>Açúcares</i> <i>Monoterpenos</i> <i>Sesquiterpenos</i> <i>Diterpenos</i> <i>Triterpenos</i> <i>Ác. Graxos</i>
	<i>Espírito Santo, Brasil</i>	<i>Ác. Fenólicos</i> <i>Diterpenos</i>
	<i>São Paulo, Brasil</i>	<i>Ác. Fenólicos</i> <i>Triterpenos</i> <i>Açúcares</i>
	<i>Minas Gerais, Brasil</i>	<i>Ác. Fenólicos</i> <i>Triterpenos</i> <i>Açúcares</i>
	<i>Pernambuco, Brasil</i>	<i>Ác. Fenólicos</i> <i>Açúcares</i>
<i>Melipona scutellaris</i>	<i>Pernambuco, Brasil</i>	<i>Ác. Fenólicos</i> <i>Açúcares</i>
<i>Melipona testaceicornis</i>	<i>Minas Gerais, Brasil</i>	<i>Diterpenos</i> <i>Triterpenos</i>

**Quadro 2:** Classes de compostos da própolis de algumas espécies de abelhas sem ferrão de diferentes localidades. (Adaptado de VELIKOVA et al., 2000).

Devido à popularidade na medicina tradicional, a própolis tem se tornado foco de intensos estudos de química e farmacologia nos últimos trinta anos (BANKOVA, 2005). Várias atividades biológicas, como anticâncer (BANSKOTA et al., 1999; AHN et al., 2007), antiinflamatória (MENEZES, 2005), antibiótica (SALOMÃO et al., 2004; SCAZZOCHIO et al., 2005), anti-HIV (ITO et al., 2001), antifúngica (SALOMÃO et al., 2004) e anti-cárie (DUARTE et al., 2003; HAYACIBARA et al., 2005; DUARTE et al., 2006) têm sido relatadas para a própolis e seus constituintes.

Os componentes da própolis apresentam também efeitos múltiplos em bactérias, fungos e vírus. Possuem efeito antiinflamatório e atividades imunomodulatórias, além de terem demonstrado atividades hipotensora e hipocolesterolêmica (CASTALDO & CAPASSO, 2002).

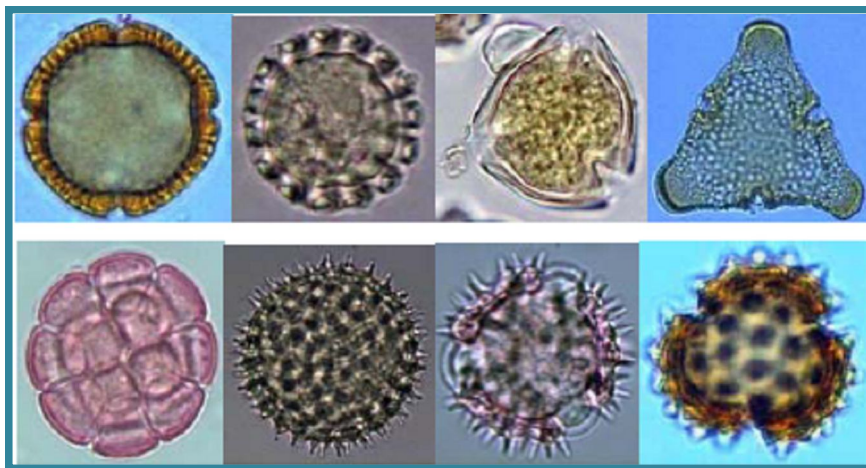
A atividade anticâncer da própolis brasileira é devida principalmente aos compostos fenólicos e está intrinsecamente relacionada à atividade antioxidante. Os constituintes identificados que apresentam atividade são ácido caféico e seus derivados, flavonóides, ácido 2,2-dimetil-8-prenilcromona-6-propenóico, artepelina e ácido 17-hidroxicleroda-3-dien-15-óico (BANSKOTA et al., 1999).

A própolis tem aplicação nas indústrias farmacêutica e alimentícia na forma de alimento funcional. Atualmente, tem sido utilizado como creme dental, sabonete, solução para bochecho, em forma de balas, chocolates, cápsulas, entre outros produtos (ACKERMANN, 1991).

### 3.3.2 Pólen

O pólen, um pequeno grânulo de dimensões microscópicas (Fotografia 3), em média 50  $\mu\text{m}$ , é o elemento reprodutivo masculino das plantas mais evoluídas do sistema biológico vegetal (Apicultura, 2009).

O pólen coletado pelas abelhas é formado por uma mistura do pólen de flores, do néctar secreções das abelhas. É de importante valor nutricional. Contendo açúcares, proteínas, lipídios, vitaminas e flavonóides (TOMAS-LORENTE et al., 1992).



**Fotografia 3:** Pólens de diferentes origens botânicas (Apicultura. Disponível em <<http://www.breyer.ind.br/apicultura/apicultura.htm>>).

Geralmente pode-se observar que as abelhas colhem o pólen das flores pela manhã e/ou quando estão úmidas, facilitando assim a colheita (BREYER, 1980). Transportam-no para a colméia, onde é depositado. Esse material armazenado sofre transformações (Fotografia 4), não só pelo alto índice de umidade e temperatura interna da colméia, além da ação de secreções salivares das abelhas, ricas em enzimas. As abelhas colhem o pólen como alimento principal, utilizando-o como fonte de proteínas, tanto para elas como para a alimentação da procria das larvas, e ainda para reforçar as funções glandulares que produzem a geléia real, a cera, os fermentos e as enzimas (BREYER, 1980).



**Fotografia 4:** Potes contendo pólen armazenado pelas abelhas *M. flavolineata*

O pólen possui diversas classes de substâncias como vitaminas: tiamina, riboflavina, nicotinamida, ácido pantotênico, piridoxina, meso-inositol, biotina, ácido fólico, cianocobalamina, ácido ascórbico, vitamina D, tocoferol e caroteno, os aminoácidos: ácido aspártico, ácido glutâmico, alanina, arginina, cistina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptofano, tirosina e valina e os sais minerais: cálcio, cloro, magnésio, fósforo, silício, enxofre, ferro e potássio (Apicultura, 2009).

### 3.3.3 Cerume

O cerume (Fotografia 5) é basicamente, uma mistura de cera branca e pura secretada pelas abelhas com a resina (própolis) que as abelhas recolhem de árvores ou arbustos feridos. A cor do cerume dos meliponíneos pode variar de um amarelo bem claro, a uma cor quase negra (Fotografia 5), dependendo da qualidade e quantidade da própolis misturada à cera branca (NOGUEIRA – NETO, 1997).

Os meliponíneos utilizam o cerume em diversas partes de seus ninhos, como na construção dos potes, dos invólucros e dos favos de cria (NOGUEIRA – NETO, 1997).



**Fotografia 5:** Potes de cerume para armazenamento de mel e pólen de *M. flavolineata*

### 3.3.4 Mel

O mel é uma matriz cujos elementos majoritários são a água (cerca de 20%) e os glicídios (70%), particularmente, a glicose e a frutose e onde, também, coexistem pequenas quantidades de oligossacarídeos, predominando, particularmente, a sacarose e a maltose (DONER, 1977). Os compostos minoritários produzidos pelas abelhas nativas e africanizadas, contém nutrientes básicos necessários a saúde humana, como ácidos orgânicos, enzimas, vitaminas, acetilcolina, flavonóides, minerais e uma extensa variedade de compostos orgânicos



que contribuem para cor, odor e sabor e que não são totalmente conhecidos e caracterizados. (VILHENA; ALMEIDA-MURADIAN, 2004).

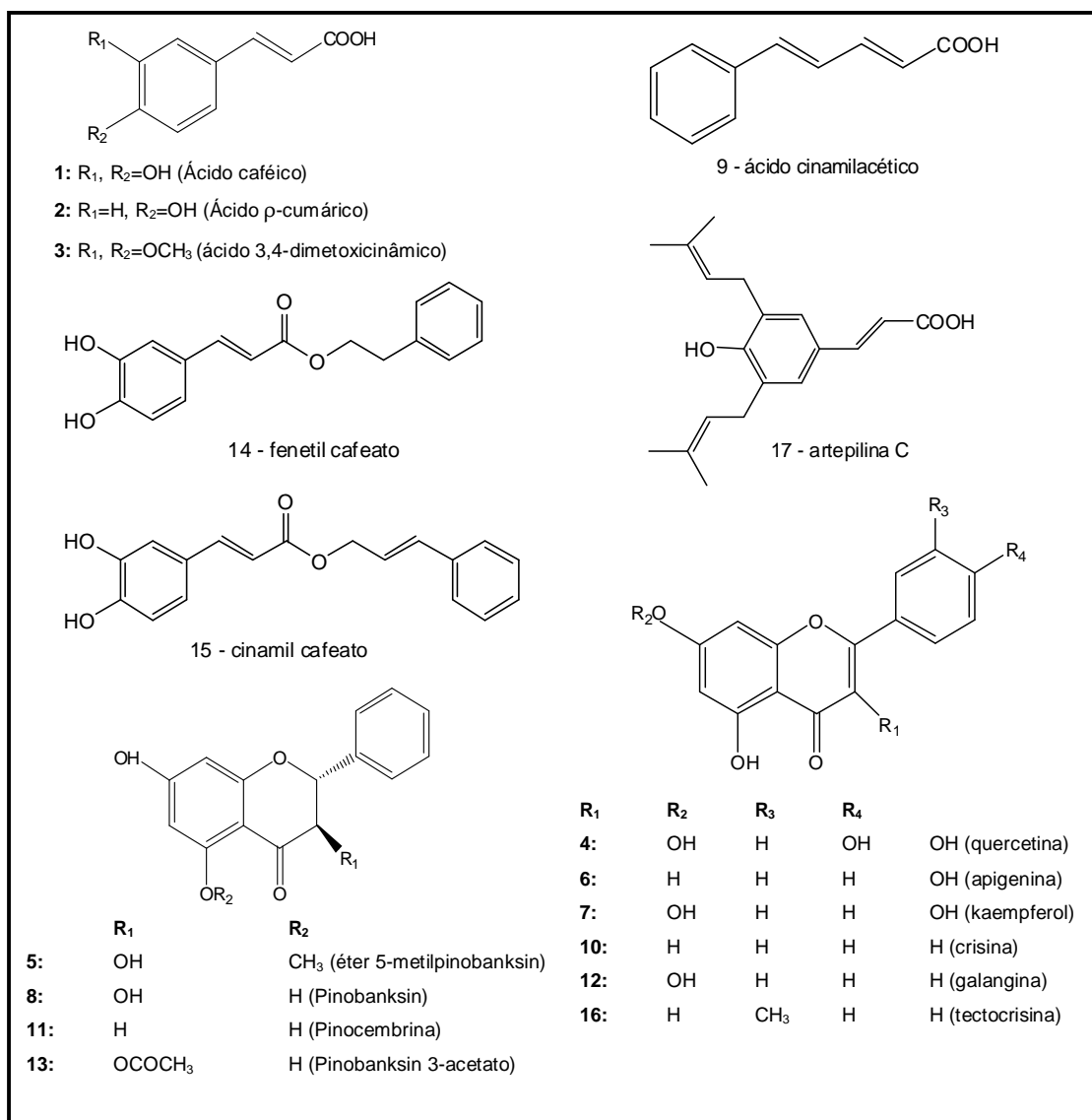
Apesar dos carboidratos encontrados no mel serem objetos de diversas revisões (SIDDIQUI, 1970; WHITE, 1975, 1978; DONER, 1977), outros componentes presentes não foram extensivamente estudados, como por exemplo, os compostos fenólicos. Existem evidências de flavonóides no mel (FERRERES et al., 1991) e AMIOT et al., 1989). Dentre os presentes no mel, a flavanona pinocembrina tem sido relatada e estudada por sua atividade antibacteriana (BERAHIA et al., 1993). Outros estudos também demonstraram a presença dos flavonóides pinobanksina (RIBEIRO-CAMPOS et al., 1990), galangina e crisina (SABATIER et al., 1992), kanferol (FERRERES et al., 1998) e ácidos benzóico e cinâmico (WESTON et al., 1999).

A análise de flavonóides e outros compostos fenólicos pode ser utilizada para a determinação da origem botânica e autenticidade de cada tipo de mel (SABATIER et al., (1988), AMIOT et al., (1989), FERRERES et al., (1998), MARTOS et al., (2000) e TOMÁS-BARBERÁN et al., (2001).

### 3.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS PRODUTOS DE *M. FLAVOLINEATA*

#### **3.4.1 Atividade antioxidante identificada na própolis**

A própolis possui atividade antioxidante comprovada em muitos estudos. Alguns compostos foram identificados como responsáveis pela ação antioxidante de amostras de própolis de diferentes origens. Estas estruturas foram isoladas e identificadas como: ácido caféico, ácido  $\rho$ -cumárico, ácido dimetoxicinâmico, quercetina, apigenina, kaempferol, artepelina C, entre outros (Quadro 3). (KUMAZAWA, HAMASAKA e NAKAYAMA , 2004).

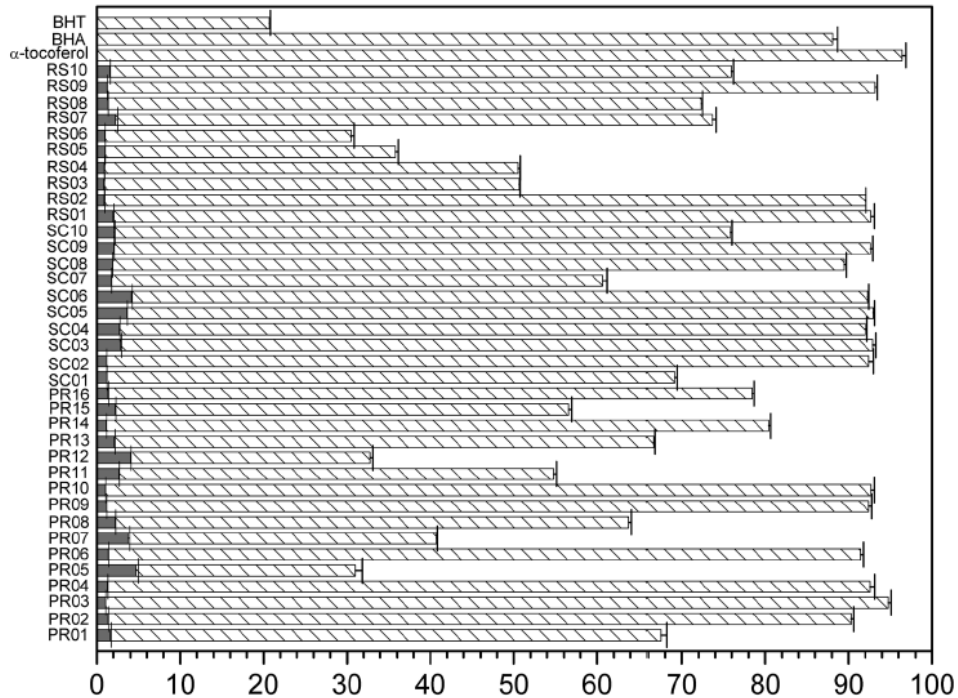


**Quadro 3:** Estruturas de compostos com atividade antioxidante identificados na própolis (Adaptado de KUMAZAWA; HAMASAKA; NAKAYAMA, 2004).

### 3.4.2 Atividade antioxidante identificada no pólen

A atividade antioxidante de 36 amostras de pólen apícola da região sul do Brasil, coletados nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul foi medida segundo a metodologia do seqüestro do radical DPPH e comparada aos padrões comerciais BHA (Butil-hidroxianisol), BHT (Butil-hidroxitolueno) e  $\alpha$ -tocoferol. Observou-se que os resultados foram expressivos, e exemplo do pólen do Rio Grande do Sul (RS09) que mostrou atividade antioxidante superior aos padrões

BHA e BHT e igual a do  $\alpha$ -tocoferol. As amostras com alta atividade antioxidante foram as de Santa Catarina (SC03) e Rio Grande do Sul (RS09) e Paraná (PR03). Os resultados com valores de CE<sub>50</sub> estão ilustrados no gráfico 1(CARPES et al., 2008).



**Gráfico 1:** Atividade de seqüestro do radical DPPH das amostras de pólen da região sul do Brasil e dos padrões em percentual e em termos de CE<sub>50</sub>. As barras tracejadas indicam o potencial antioxidante, as barras escurecidas representam os valores de CE<sub>50</sub> de cada amostra e padrões(CARPES et al., 2008).

Extratos etanólicos, hexânicos e de acetato de etila obtidos de cargas de pólenes com duas colorações (amarelo e marrom) da abelha indígena sem ferrão *Melipona subnitida* Ducke também indicam uma capacidade antioxidante de alguns destes extratos frente o seqüestro do radical DPPH. Os resultados expressos em valores de CE<sub>50</sub> estão presentes na tabela 1 (SILVA, T. M. S. et al., 2006).

**Tabela 1:** Capacidade de seqüestro do radical DPPH de extratos de pólen de *Melipona subnitida*.

Amostras	Extrato	CE <sub>50</sub> (µg.mL <sup>-1</sup> )	
		Pólen amarelo	Pólen marrom
1	Etanólico	104,5 ± 0,5	106,1 ± 1,3
2	Hexânico	212,0 ± 0,5	236,5 ± 2,3
3	Acetato de etila	41,9 ± 0,2	43,7 ± 0,3

Valores expressos em média ± desvio padrão (SILVA T. M. S. et al., 2006).

### 3.4.3 Atividade antioxidante identificada no mel

Estudos mostram que o mel possui, assim como o pólen e o própolis, propriedades antioxidantes. Classes de compostos fenólicos, como os flavonóides podem estar correlacionados com tal atividade. Amostras de mel de abelhas indígenas sem ferrão amazônicas foram analisadas pelo método do seqüestro do radical DPPH e mostraram resultados significativos em termos de concentração efetiva (CE<sub>50</sub>), ilustrados na Tabela 2 (SANTOS, MENDOÇA & BASTOS, 2005).

**Tabela 2:** Capacidade antioxidativa (CE<sub>50</sub>) de amostras de mel de abelhas sem ferrão Amazônicas.

Amostras	Espécie de abelha	CE <sub>50</sub> (µg.mL <sup>-1</sup> )
1	<i>Melipona seminigra</i>	5,9
2	<i>Melipona seminigra</i>	12,4
3	<i>Melipona seminigra</i>	9,6
4	<i>Melipona seminigra</i>	26,3
5	<i>Melipona compressipes</i>	7,5
6	<i>Tetraagonisca angustula</i>	2,1
7	<i>Melipona scutellaris</i>	1,0

### 3.5 COMPOSTOS VOLÁTEIS PRESENTES NO MEL

A primeira análise de compostos voláteis em mel foi realizada em 1929 (SCHMALFUB & BARTHMEIER, 1929). Desde então, mais de 300 compostos foram identificados em méis mono florais de diversos tipos florais (VAN STRATEN & MAARSE, 1983).

O mel floral, onde estão presentes os compostos voláteis, pode ser monofloral quando o néctar é, predominantemente, originário de uma única fonte floral, ou polifloral se mais de uma espécie vegetal contribui, de forma expressiva, com o néctar.

Os compostos de aroma podem ser originados de: 1 - transferência de constituintes voláteis da planta; 2 - conversão de constituintes da planta pela abelha; 3 - produção de compostos pelas abelhas; 4 - produção de compostos durante o processamento pós-colheita; 5 - ações de microrganismos (BLANK, FISCHER & GROSCH, 1989).

As enzimas da classe reductase oriundas das abelhas poderiam catalisar reações de redução onde, por exemplo, o feniletanal (fenilacetaldeído) poderia ser convertido a feniletanol (álcool feniletílico). Já como ácidos voláteis (ex. ácido acético e butírico) poderiam ser produzidos durante o metabolismo da abelha. (BOUSETA & COLLIN, 1992)

É bem conhecido que o aroma e sabor dos alimentos são dependentes dos compostos orgânicos voláteis presentes no vapor de equilíbrio sobre o produto (*headspace*) e da interação destes compostos com a matriz do alimento, principalmente carboidratos e lipídeos (TERANISHI, FLATH & HIROSHI, 1986).

A sensação do aroma é mais complexa que o sabor, pois o olfato humano pode discriminar entre milhares de compostos voláteis. São estes os responsáveis pelo sabor característico dos alimentos (THOMAZINI & FRANCO, 2000).

Um dos atributos sensoriais mais apreciados pelos consumidores de mel é o aroma. O perfil de compostos voláteis representativos desse aroma serviria como método complementar para atestar a autenticidade do mel mono floral, bem como auxiliar no monitoramento da qualidade básica do produto. (De MARIA & MOREIRA, 2003).

Em outro trabalho, cerca de 160 compostos voláteis foram identificados em méis monoflorais da Austrália. Alguns como o fenil-metanal (fenilacetaldéido), álcool benzílico e o álcool 2-feniletílico foram identificados positivamente, enquanto os outros como óxido de linalol e butirato de hexenila foram somente identificados por tentativa (GRADDON & MORRISON, 1979).

Em outra investigação do aroma de méis mono e poliflorais oriundos da região de Piemonte, na Itália, os autores identificaram cerca de 52 compostos por CG/EM e concluíram que alguns compostos voláteis estiveram presentes em todas as amostras, enquanto outros variaram de uma amostra para outra contribuindo, consideravelmente, para os aromas distintos de cada mel (BICCHI, BELLIARDO & FRATTINI, 1983).

### 3.6 DANOS OXIDATIVOS E O SISTEMA DE PROTEÇÃO DO ORGANISMO

O estresse oxidativo está associado com um distúrbio no balanço pró-oxidante/antioxidante em favor do pró-oxidante. A ocorrência de espécies reativas de oxigênio é um atributo da vida aeróbica normal. A existência e desenvolvimento de células em ambiente contendo oxigênio poderiam não ser possíveis sem a presença de sistemas de defesa que incluem enzimas e antioxidantes não enzimáticos. A vida aeróbica é caracterizada por uma formação constante de pró-oxidantes sendo seu consumo balanceado por antioxidantes (SIES, 1991).

A vida aeróbica consiste em uma constante produção destes radicais livres, a qual é contrabalaneada por uma produção equivalente de mecanismos antioxidantes visando neutralizar seus efeitos deletérios. Quando esta neutralização não é possível devido a uma sobrecarga do mecanismo antioxidante, diz-se que há uma situação de estresse oxidativo, levando a geração de diversos danos aos

sistemas biológicos. Frente ao estresse oxidativo ocorrem os seguintes processos: 1) adaptação, por aumento da resposta antioxidante; 2) dano tecidual por agressão a lipídeos, carboidratos e proteínas; 3) morte celular por necrose ou apoptose (OLDONI, 2007).

Os principais mecanismos antioxidantes ocorrem pela inibição das reações envolvendo íons metálicos; pela interceptação dos radicais gerados pelo metabolismo das células ou gerados por fontes exógenas como ozônio, radiações gama e ultravioleta, medicamentos, dieta e uso de cigarro; pelo reparo das lesões no DNA e reconstituição das membranas celulares danificadas; pela resposta do organismo à geração das ERO's com o aumento das enzimas antioxidantes (BIANCHI E ANTUNES, 1999).

Os antioxidantes podem ser classificados em enzimáticos e não-enzimáticos. Os primeiros compreendem a superóxido desmutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx) (FERREIRA, MATSUBARA, 1997). A SOD é responsável por neutralizar a formação do ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) na mitocôndria e por neutralizar  $O_2^{\cdot-}$  e  $H_2O_2$  do citosol. A CAT está presente em todas as células, principalmente em peroxissomos, que usam oxigênio para converter  $H_2O_2$  em água. A GPX está na mitocôndria e no citosol, catalisando a reação da glutathione reduzida (GSH) como  $H_2O_2$  para formar glutathione oxidada (GSSG) e água (FINALD LAC, FILAIRE, 2006).

### **3.6.1 Radicais Livres e as Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio**

Radical livre pode ser definido como um átomo ou molécula com menos um elétron não pareado na orbita mais externa (CLARKSON, THOMPSON, 2000). Esta característica confere a esses átomos e moléculas meia vida curta e alta reatividade a outras biomoléculas, principalmente proteínas, lipídeos e ácido desoxirribonucléico (DNA) (MATSUBARA, FERREIRA, 1997; BIANCHI, ANTUNES, 1999; CLARKSON, THOMPSON, 2000; SCHNEIDER, de OLIVEIRA, 2004).

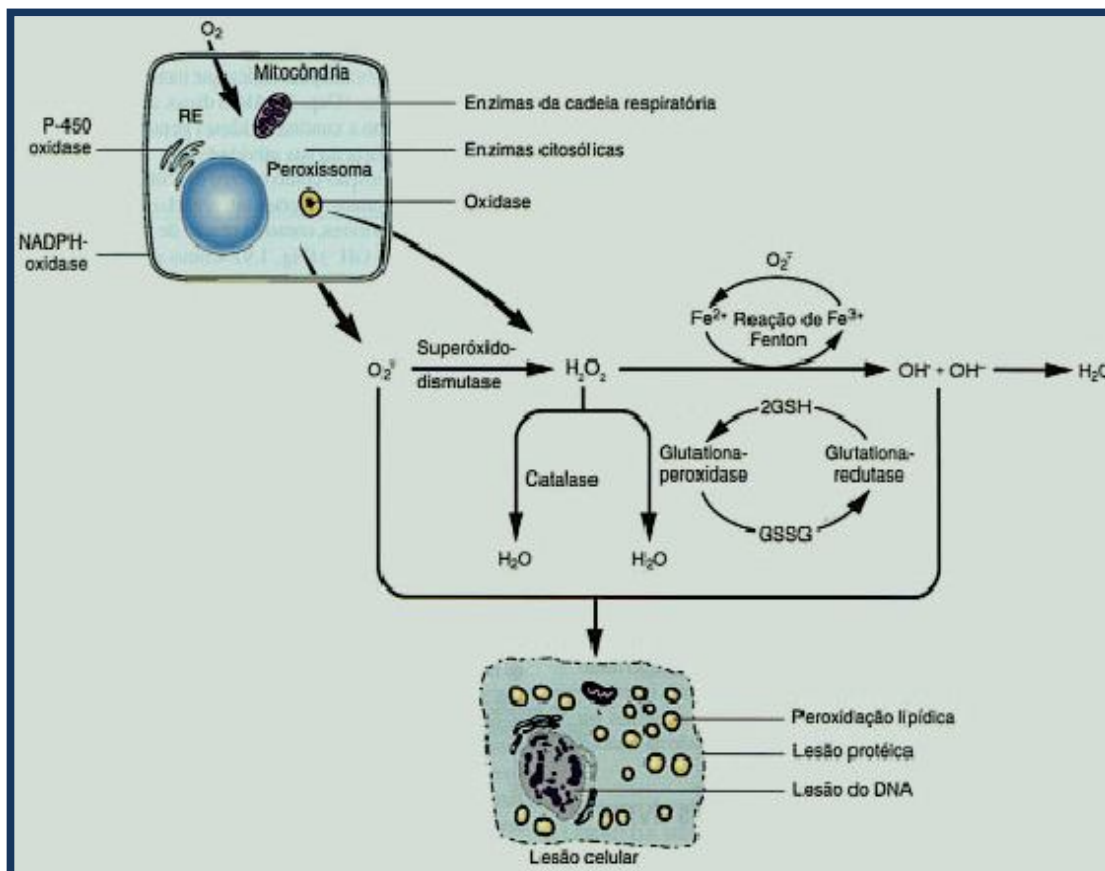
Os radicais livres podem ser gerados por todas as células vivas aeróbicas (BIANCHI & ANTUNES, 1999; COOPER et al., 2002), sendo principais o ânion

superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o radical hidropoxila ( $HO_2^{\cdot}$ ), e o radical hidroxil ( $HO^{\cdot}$ ). Existem, porém, moléculas altamente reativas, mas que não apresentam elétrons desemparelhados na última camada e dessa forma, não podem ser classificadas como radical livre. Estas moléculas são derivadas do metabolismo do oxigênio, conhecidas como espécies reativas de oxigênio (ERO's). Dentre estas, podemos citar o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o oxigênio singlete ( $^1O_2$ ). (MATSUBARA, FERREIRA, 1997; BIANCHI, ANTUNES, 1999; CLARKSON, THOMPSON, 2000).

O Nitrogênio e os íons metálicos, dentre eles o cobre e o ferro, também podem gerar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. O ferro é o metal mais abundante no organismo e o que está biologicamente mais capacitado a gerar EROs e catalisar reações de oxidação das biomoléculas (FERREIRA, MATSUBARA, 1999). As principais espécies reativas de nitrogênio são o óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ), o dióxido de nitrogênio ( $NO_2^{\cdot}$ ) e o peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ ) (COOPER et al., 2002).

Estes radicais, gerados com a ação do  $O_2$  na célula, irão causar alterações, agindo diretamente sobre alguns componentes celulares (Esquema 1). Os ácidos graxos poliinsaturados das membranas, por exemplo, são muito vulneráveis ao ataque de radicais livres. Estas moléculas desencadeiam reações de oxidação nos ácidos graxos da membrana lipoprotéica, denominadas de peroxidação lipídica, que afetarão a integridade estrutural e funcional da membrana celular, alterando sua fluidez e permeabilidade. A reação de Fenton também promove uma série de reações como radicais, na presença de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), gerando o radical hidroxil ( $HO^{\cdot}$ ) (HALLIWELL et al., 1992). Além disso, os produtos da oxidação dos lipídios da membrana podem causar alterações em certas funções celulares (RICE-EVANS; BURDON, 1993). As enzimas antioxidantes superóxido desmutase (SOD), catalase (CAT) e a glutathiona peroxidase (GPx) agem de forma a neutralizar a formação de espécies reativas ou converter  $H_2O_2$  em água ou em outras formas não reativas.





**Esquema 1:** Formação de radicais livres (RL) (espécie reativa de oxigênio) e mecanismos de defesa antioxidantes em sistemas biológicos (SISTEMA NERVOSO, Disponível em: <http://www.sistemanervoso.com>. Acesso em: 13/01/2010).

Estas moléculas reativas são produzidas pelo metabolismo normal e por influências externas ao indivíduo. Por exemplo, luz UV e carcinogênese. Quando produzidos em quantidades que ultrapassam a produção natural de antioxidantes no corpo humano, cuja função é reparar o sistema de defesa, estes radicais podem levar a uma quebra da produção de coenzimas, neurotransmissores e macromoléculas de ácidos nucleicos, proteínas, lipídeos e carboidratos. Ingestões de antioxidantes exógenos, como vitaminas C e E,  $\beta$ -caroteno, podem promover a proteção dos componentes das células e, desta maneira, a sua função fisiológica. Tais antioxidantes exógenos são obtidos em alimentos e incluem uma variedade de compostos fenólicos, incluindo os flavonóides (YUNTING et al. 1990).

### 3.6.2 Antioxidantes

Devido à produção contínua de radicais livres nos processos metabólicos, mecanismos de defesa antioxidante foram desenvolvidos para impedir a indução de danos e para limitar os níveis intracelulares de oxidantes. Assim, os antioxidantes são os agentes responsáveis por inibir e reduzir as lesões causadas pelos oxidantes (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Antioxidantes podem ser definidos como qualquer substância que, em baixa concentração, quando comparada à do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz (SIES; STAHL, 1995).

Outra definição é dita pelos antioxidantes em alimentos, “substância que em pequena quantidade é capaz de prevenir ou retardar fortemente a oxidação de materiais, como por exemplo, as gorduras” (BECKER; NISSEN; SKIBSTED; 2004).

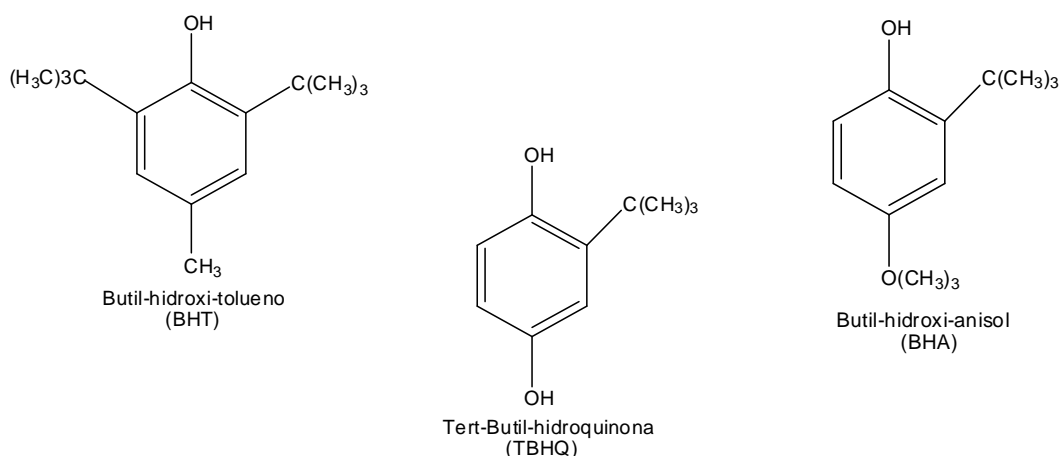
Os antioxidantes são capazes de inibir a oxidação de diversos substratos, de moléculas simples a polímeros e biosistemas complexos, por meio de dois mecanismos: o primeiro envolve a inibição da formação de radicais livres que possibilitam a etapa de iniciação; o segundo abrange a eliminação de radicais importantes na etapa de propagação, como alcoxila e peroxila, através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia (NAMIKI, 1990).

Há ainda diferenças entre os três principais mecanismos que podem suprimir a formação de radicais livres: antioxidantes, sequestrantes de radicais livres e quelantes. Antioxidantes e seqüestrantes de radicais livres são usualmente considerados sinônimos, embora nem sempre o sejam. Por exemplo, etanol é um seqüestrante de radicais hidroxila, mas nunca foi considerado um antioxidante. Antioxidante é o termo mais antigo, que no início foi aplicado para a descrição de inibidores de processos oxidativos, os quais eram capazes de reagir com radical peroxila. Agora, este termo é aplicado a todos os inibidores de radicais livres. Em adição aos antioxidantes diretos, há dois outros grupos importantes de inibidores de

radicais livres: enzimas antioxidantes e os compostos que possuem propriedades antioxidantes indiretas (DENISOV; AFANAS, 2005).

### 3.6.3 Antioxidantes Sintéticos

Os antioxidantes sintéticos (Estruturas 1) são bastante utilizados como inibidores da oxidação lipídica na indústria. Os mais comuns são o tert-butil-tolueno (BHT) tert-butil-anisol (BHA) e o tert-butil-hidroquinona (TBHQ). A escolha e a concentração de cada um deles varia de acordo com o alimento empregado. (FKI, ALLOUCHE e SAYADI, 2004; HAN, RHEE, 2004).



**Estruturas 1:** Principais antioxidantes sintéticos

Entretanto, seu uso em produtos alimentícios tem sido restrito devido a instabilidade, bem como a suspeita de promover carcinogênese. Por esta razão, há um grande interesse no estudo dos aditivos naturais com potencial antioxidante. As propriedades antioxidantes de ervas e condimentos naturais têm sido descritas como sendo efetivas na redução do processo de peroxidação de lipídios (POKORNY, 1991).

### 3.6.4 Antioxidantes Naturais

Os antioxidantes naturais são formados por compostos presentes nas plantas, principalmente os tocoferóis, vitamina C, carotenóides e os compostos

fenólicos. Entretanto, devido aos efeitos deletérios que os antioxidantes sintéticos podem causar sobre o fígado e da marcada proliferação do retículo endoplasmático, entre outras alterações causadas por doses elevadas dos mesmos, tem ocorrido o aumento do interesse terapêutico e de medição do potencial e eficácia dos antioxidantes provenientes de fontes naturais (DURÁN; PADILLA, 1993).

Estes compostos, especialmente os flavonóides, exibem grandes efeitos biológicos, incluindo as atividades antibacterianas, antiinflamatórias, antialérgicas, antitrombóticas e com ação vasodilatadora (COOK; SAMMAN, 1996).

### 3.7 CAPACIDADE ANTIOXIDATIVA PELO MÉTODO INDIRETO DO SEQÜESTRO DO RADICAL DPPH (1,1-DIFENIL-2-PICRILIDRAZILA)

O radical DPPH (1,1 difenil-2-picrilhidrazila) é muito utilizado para avaliar a capacidade seqüestrante de produtos de abelhas, como o pólen, própolis e mel. Esse radical orgânico é muitas vezes adotado nas análises em função de sua rapidez e facilidade (KOLEVA et al., 2002; LU, CHEN & CHOU, 2003).

Esse método é baseado na redução de soluções alcoólicas de DPPH em 517 nm na presença de um antioxidante doador de hidrogênio. Também permite testar substâncias lipofílicas e hidrofílicas, ou seja, independe da polaridade do substrato (KOLEVA et al., 2002). A lipofilicidade e hidroflicidade dos antioxidantes não afetam as reações com o DPPH, uma vez que foi observada similaridade entre as atividades de seqüestro de radicais livres do Trolox e  $\alpha$ -tocoferol (YAMAGUSHI et al., 1998).

Para valores de  $CE_{50}$  inferiores a 30  $\mu\text{g/mL}$ , há indicativo de potenciais seqüestradores de radicais livres (RAMOS et al., 2003). Alguns extratos e frações analisados apresentaram esta característica.

Deve-se levar em conta a cinética da reação, que dependendo da natureza do antioxidante testado, pode ser rápida, quando atinge o final em menos de 1 minuto, intermediária, quando leva até 30 min para se processar e lenta quando

chega ao seu final em mais de uma hora. (BRAND-WILLIAMS, CURVELIER, BERST, 1995).

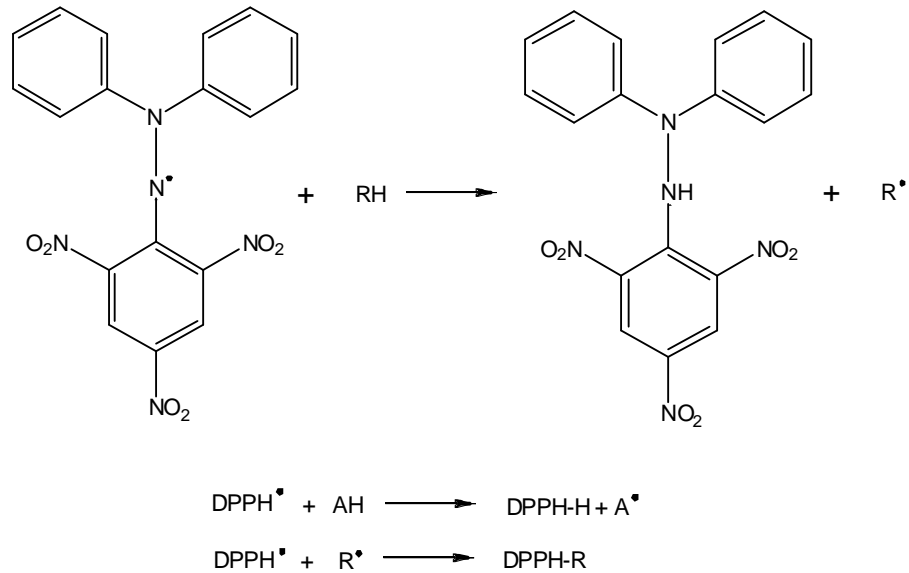
O método de seqüestro de radical é realizado pela medida direta da doação do átomo de hidrogênio ou transferência de elétron de um antioxidante em potencial às moléculas do radical livre em sistemas “livres de lipídeos”. Entretanto, esses métodos necessitam de substratos de oxidação e não refletem a situação *in vivo* ou a peroxidação em alimentos (BECKER, NISSEN e SKIBSTED, 2004; ARNAO, 2000).

Os métodos mais comumente utilizados são aqueles envolvendo compostos cromogênicos de um radical natural que simula as espécies reativas de oxigênio (ERO), por serem de usos fácil, rápidos e sensíveis. A presença do antioxidante leva ao desaparecimento desses radicais cromogênicos. Um dos radicais muito utilizados para medir a atividade antioxidante é o DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazila). Apresenta uma excelente estabilidade em certas condições e importantes diferenças nas suas respostas antioxidantes e na sua manipulação (ARNAO, 2000; BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). O radical DPPH é um reagente usado para dissolução em meio orgânico (especialmente em meio alcoólico) (BLOIS, 1958; MILLER; RICE-EVANS, 1997; ARNAO; CANO; ACOSTA, 2001).

Pode-se verificar pela estrutura do DPPH, que o composto pode aceitar um elétron ou radical hidrogênio para se tornar uma molécula estável, que apenas raramente pode ser oxidada irreversivelmente (BLOIS, 1958). O radical livre DPPH• é um cromóforo extremamente estável que apresenta um pico de absorção no comprimento de onda de 517 nm, em meio metanólico e sua solução possui uma coloração violeta intensa (ARNAO, 2000; BLOIS, 1958). Conforme o DPPH vai sendo reduzido por um antioxidante, seu elétron se torna emparelhado e a absorvidade desaparece (BRAND-WILLIAMS, CUVELIER & BERSET, 1995).

A redução do DPPH (Esquema 2) pode ocorrer na presença de um antioxidante (AH) ou de uma espécie radicalar (R<sup>\*</sup>). O desenvolvimento da reação pode ser acompanhado pelo decréscimo da absorbância a 517 nm, podendo ser

analisado por espectrofotometria ou por CLAE (SILVA, J. K. R., 2006). Assim, quanto maior o decréscimo da absorvância, maior será a capacidade de doação de átomos de hidrogênio, ou seja, de porcentagem de atividade antioxidante.



**Esquema 2:** Seqüestro do radical DPPH frente um antioxidante RH (SILVA, J. K. R., 2006)

A porcentagem de atividade antioxidante corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante. A quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração eficiente ( $CE_{50}$ ) ou concentração inibitória ( $CI_{50}$ ). Este valor é obtido por regressão linear onde a abcissa representa a concentração das amostras testadas e a ordenada à porcentagem de inibição do radical DPPH (MOREIRA et al., 2005).

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 MATERIAIS UTILIZADOS**

#### **4.1.1 Equipamentos e acessórios**

- Balança analítica CHYO, modelo JL-200
- Banho criostático de circulação HAAKE
- Cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas THERMO ELECTRON CORPORATION, modelo FOCUS DSQ
- Cubetas de plástico para espectrofotometria com 1 cm de caminho óptico
- Espectrofotômetro de UV/Visível GBC 916
- Evaporador rotativo HEIDOLPH, modelo LABOROTA 4000
- Estufa com circulação de ar FABBE
- Estufa de secagem á vácuo Quimis, modelo Q819V2
- Micro extrator/destilador Likens - Nickerson
- Micro-pipetas Labmate (volumes de 10 – 100 µL; 100 – 1000 µL e 1000 – 5000 µL)
- Banho de ultra-som BRASON 1200

#### **4.1.2 Reagentes e solventes utilizados para análise de antioxidantes e extração dos aromas**

- Água destilada
- Ácido gálico SIGMA
- Água ultrapura
- Folin Ciocalteau 1N
- Solventes P.A (hexano, diclorometano, clorofórmio, acetato de etila, etanol e metanol)
- Metanol e diclorometano para HPLC/UV
- DPPH: 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (85% de pureza), FLUKA
- TROLOX: Ácido 6-hidróxi-2,5,7,8-tetrametil-2-cromanóico (98% de pureza), FLUKA.

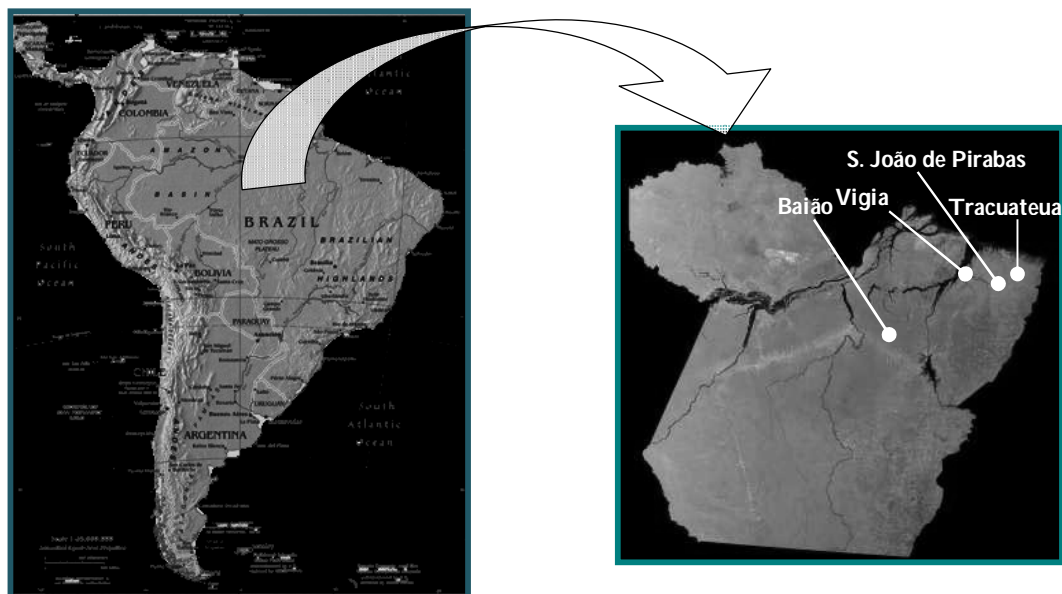
## 4.2 METODOLOGIA PARA ANÁLISE DA GEOPRÓPOLIS, PÓLEN E CERUME DE *M. FLAVOLINEATA*

### 4.2.1 Coleta dos materiais de *M. flavolineata*

O quadro 4 relaciona os municípios de coleta dos produtos de *M. flavolineata* com os respectivos índices utilizados para diferenciar cada tipo vegetacional visitado. A imagem de satélite do Estado do Pará (Fotografia 6) mostra a localização geográfica aproximada de cada uma das localidades visitadas.

Amostra	Local de coleta	Tipo Vegetacional
1	Vigia	Capoeira alta/floresta secundária
2	Tracuateua	Localidade próxima de mangue
3	São João de Pirabas	Localidade próxima de mangue
4	Baião	Capoeira/floresta secundária

**Quadro 4:** Municípios e tipos de vegetação circundante dos locais de coleta do geoprópolis, pólen e cerume e mel de *M. favolineata*.



**Fotografia 6:** Imagens de satélite do continente latino-americano (esquerda) e do Estado do Pará (direita) com a localização aproximada dos municípios de coleta dos materiais de *M. flavolineata*. (Adaptada do site:

[http://www.zonu.com/imapa/americas/Mapa\\_Satelital\\_Foto\\_Imagem\\_Satelite\\_Estado\\_ParaBrasil.jpg](http://www.zonu.com/imapa/americas/Mapa_Satelital_Foto_Imagem_Satelite_Estado_ParaBrasil.jpg))



Os materiais foram coletados da seguinte forma: o mel foi retirado dos potes de cerume com uma seringa de 10 ml com ponta de borracha. Outros potes continham também o pólen, que pôde ser retirado com uma pequena colher. O cerume, que armazenava tanto mel quanto pólen, foi também coletado inclusive em maior quantidade. O geoprópolis foi raspado com uma espátula da superfície dos ninhos onde serve de proteção contra a entrada de invasores. Após a retirada dos materiais, que foi realizada uma única vez em cada localidade, os mesmos foram colocados em sacos plásticos, potes de plástico e de vidro (no caso do mel), acondicionados em isopor para transportá-los até a universidade onde passaram a ser armazenados a 5°C em um refrigerador do Laboratório de Engenharia de Produtos Naturais.

#### **4.2.2 Secagem e processamento dos extratos**

Os materiais coletados, com exceção do mel, foram secos em estufa com circulação de ar a 50 °C por um período aproximado de 6h, no caso do geoprópolis, 4h no caso da resina e em estufa á vácuo (60° C) para o pólen (12h). Em seguida, foram triturados visando o aumento da área de interação com o solvente. Os materiais brutos foram então pesados, separou-se uma quantidade adequada e extraiu-se exaustivamente com etanol, utilizando Soxhlet (Fotografia 7) à 60 °C. Os extratos obtidos foram concentrados em evaporador rotativo sob vácuo. A codificação dos extratos foi feita segundo o quadro abaixo com índices correspondentes a cada local de coleta (1- Vigia, 2- Tracuateua, 3- São João de Pirabas , 4- Baião):

<b>EEGP</b>	<b>Extrato Etanólico de Geoprópolis</b>
<b>EEPO</b>	<b>Extrato Etanólico do Pólen</b>
<b>EER</b>	<b>Extrato Etanólico do Cerume</b>

**Quadro 5:** Nomenclatura codificada dos extratos brutos de geoprópolis, pólen e cerume.



**Fotografia 7:** Extração com etanol utilizando o conjunto soxhlet, manta aquecedora e condensador.

#### **4.2.3 Partição líquido-líquido dos extratos**

Após obtenção dos extratos, separaram-se massas proporcionais aos rendimentos de cada amostra para realização de partição líquido-líquido em um funil de decantação (Fotografia 8). Preparou-se inicialmente uma solução com o extrato bruto de 150 mL metanol/água (8:2) que foi solubilizada em ultrassom por 15 min. Em seguida, transferida para o funil de decantação.

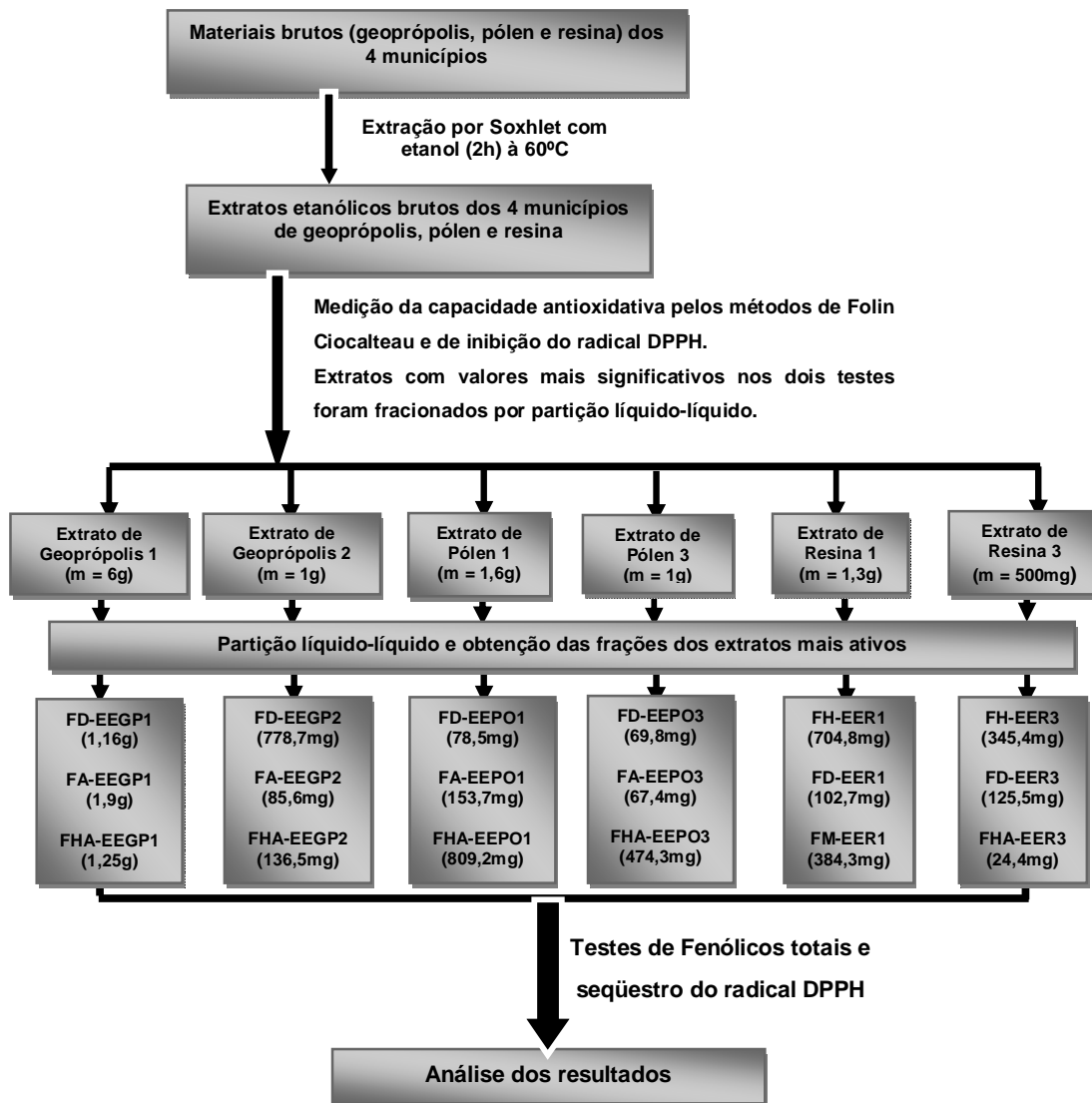
Os eluentes utilizados inicialmente foram diferenciados para cada material, tendo em vista a presença de componentes apolares no cerume e pólen. O primeiro eluente adicionado, no caso do geoprópolis, responsável pela formação das duas fases foi diclorometano (75 mL). Retirou-se a fase diclorometano e adicionou-se 50 ml de acetato de etila. Para melhor visualização das fases, neste caso, foi necessário adicionar água destilada. Foi retirada então a fase acetato de etila. No caso da resina, por ser um material com características apolares, o fracionamento foi iniciado com a adição de hexano na solução metanol/água, seguido de diclorometano.

A fase remanescente da interação com os dois eluentes foi denominada fase hidroalcoólica, com exceção da resina da região de Vigia, na qual foi separada a fração metanólica das demais no lugar da hidroalcoólica. Todas as frações foram concentradas em evaporador rotativo e colocadas em dessecador.



**Fotografia 8:** Aspecto da extração líquido-líquido dos extratos brutos.

A seqüência para obtenção dos extratos e frações além dos testes nas metodologias de capacidade antioxidativa está ilustrada no fluxograma 1.



**Fluxograma 1:** Processo de obtenção dos extratos brutos e frações de geoprópolis, pólen e resina de *M. flavolineata*.

FH – Fração hexânica; FD – Fração diclorometano; FA – Fração acetato de etila; FHA – Fração hidroalcoólica; FM – Fração metanólica.

#### **4.2.4 Cálculo do Rendimento dos extratos e frações**

O cálculo do rendimento bruto dos extratos e frações foi realizado através da relação entre a massa de extrato obtido pela massa de material bruto seco utilizado para extração.

### **4.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS EXTRATOS E FRAÇÕES PELO MÉTODO FOLIN CIOCALTEAU**

#### **4.3.1 Teor de Fenólicos totais utilizando o método colorimétrico Folin Ciocalteu**

O conteúdo de fenólicos totais dos extratos brutos e frações foram determinados pelo método colorimétrico de Folin Ciocalteu (SINGLETON et al., 1999). Este método envolve a oxidação de fenóis por um reagente amarelo heteropoliácido de fosfomolibdato e fosfotungstênio (reagente de Folin Ciocalteu) e a medida colorimétrica de um complexo azul Mo-W que se forma na reação em meio alcalino (SINGLETON e ROSSI, 1965).

Para cada extrato e frações dos mesmos, foram preparadas soluções-mãe a  $10 \text{ mg.mL}^{-1}$  em metanol, as quais foram colocadas alguns minutos no ultrassom, retirando-se em seguida uma alíquota para diluição em água ultra pura obtendo uma concentração de  $5 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Em seguida, as amostras foram diluídas e testadas até que se obtivessem resultados de absorvância na faixa linear compreendida entre 0,3 e 0,8.

A uma alíquota de  $500 \mu\text{L}$  da solução dos extratos e frações diluídas, foram adicionados  $250 \mu\text{L}$  do reagente Folin Ciocalteu (1N) e  $1250 \mu\text{L}$  de carbonato de sódio ( $75 \text{ g.L}^{-1}$ ). A reação foi mantida em ambiente escuro e após 30 minutos. Absorvância foi verificada em espectrofotômetro / UV - visível no comprimento de onda de  $760 \text{ nm}$ . As diluições das amostras foram ajustadas a uma faixa linear de absorvância final compreendida entre 0,3 a 0,8. Todas as análises foram feitas em triplicata.

O cálculo das concentrações de fenólicos totais (C) das amostras, expressas em miligramas de equivalente de ácido gálico por grama de material (mg EAG/g), foi feito segundo a fórmula:

$$C = (Abs_{(am)} - Abs_{(br)}) \times Dil. \times \alpha_{(AG)} \quad (1)$$

Onde,

C = Concentração de fenólicos expressa em mg EAG/g de extrato;

Abs<sub>(am)</sub> = Absorbância da amostra;

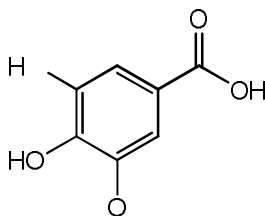
Abs<sub>(br)</sub> = Absorbância do branco;

Dil. = Diluição da amostra;

$\alpha_{(AG)}$  = Coeficiente angular da curva padrão do ácido gálico.

#### 4.3.2 Curva de calibração com o padrão Ácido Gálico

Foi construída uma curva de calibração com o padrão ácido gálico nas concentrações de 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0 ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), seguindo os mesmos procedimentos descritos no item 4.3.1, em relação a proporção da mistura reacional, realizados para as amostras. A leitura da absorbância foi feita em triplicata a 760 nm.



**Estruturas 2:** Ácido gálico, um ácido fenólico usado como padrão fenólico

#### 4.4 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDATIVA DOS EXTRATOS DE GEOPRÓPOLIS, PÓLEN, CERUME E FRAÇÕES PELO MÉTODO INDIRETO DO SEQUESTRO DO RADICAL DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila)

##### 4.4.1 Procedimento da técnica e preparo da mistura reacional

A capacidade antioxidativa das amostras foi medida pela técnica de seqüestro do radical DPPH, estável em solução alcoólica que sofre descoloração do violeta para amarelo na presença de antioxidantes (BRAND – WILLIAMS, CURVELIER & BERST, 1995).

Cada amostra foi pesada (10 mg) e solubilizada em 1 mL de metanol (concentração de  $10.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Após isso, foram diluídas em diferentes concentrações decrescentes, que variaram de 250 a  $1,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , correspondendo a uma faixa de diluição de 40 a 6525 vezes, levando em conta o fator de diluição da mistura reacional (40 vezes). Estas diluições foram obtidas após sucessivos testes até que se conseguisse uma curva linear com, no mínimo, quatro pontos bem ajustados. O radical DPPH também foi inicialmente solubilizado em metanol a uma concentração de aproximadamente  $60 \mu\text{M}$ , cuja absorbância inicial ficou em torno de  $0,620 \pm 0,02$ , a  $517\text{nm}$ , em temperatura ambiente.

A mistura reacional foi preparada em uma cubeta para cada amostra. Foram adicionados  $1950 \mu\text{L}$  de DPPH ( $60 \mu\text{M}$ ) a alíquotas de  $50 \mu\text{L}$  das amostras diluídas em concentrações decrescentes, compondo uma mistura reacional de 2 ml. A absorbância foi monitorada a  $517 \text{ nm}$  até que seu valor permanecesse constante. As análises foram feitas em triplicata. A reação controle foi lida com  $50 \mu\text{L}$  de metanol no lugar da amostra.

##### 4.4.2 Cálculos para avaliação da capacidade antioxidativa

###### a) Inibição do radical DPPH

Os valores de inibição do radical (*I DPPH (%)*) para cada concentração das amostras foram calculados de acordo com a equação 2:

$$I_{DPPH}(\%) = [1 - (Abs_{(am)} - Abs_{(br)})] \times 100 \quad (2)$$

Onde  $Abs_{(am)}$  e  $Abs_{(br)}$  são absorvância da amostra e absorvância do branco, respectivamente.

A atividade antioxidante foi expressa em termos de Concentração efetiva ( $CE_{50}$ ), que é a capacidade que de redução de 50% da concentração do radical DPPH na presença de amostra, calculada por regressão linear, onde a abcissa representa a concentração e a ordenada representa a inibição. Os valores foram comparados aos encontrados para os antioxidantes comerciais sintéticos Trolox e BHA (butilidróxi-anisol).

## 4.5 OBTENÇÃO E ANÁLISE DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS DO MEL

### 4.5.1 Obtenção dos compostos voláteis do mel

Os compostos voláteis do mel coletado nas quatro regiões distintas foram extraídos por meio do aparato de micro extração-destilação denominado Likens-Nickerson. O solvente de extração utilizado foi diclorometano. Após extração, as amostras foram mantidas sob refrigeração (5°C) até posterior injeção no cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas (CG-EM) do Laboratório de Engenharia de Produtos Naturais (LEPRON).

### 4.5.2 Cromatografia gasosa/espectrometria de massas dos voláteis do mel

Foi utilizado um CG-EM Thermo, modelo FOCUS DSQ, equipado com coluna capilar de sílica fundida (30m x 0,25mm d. i.) com fase estacionária DB-5 MS (0,25m de espessura do filme). As condições de operação foram as seguintes: injetor a 240°C, interface a 240°C e coluna programada para operar a 60°C a 240°C, com gradiente de temperatura de 3°C/min, gás de arraste hélio, em velocidade linear de 32 cm/s (medidos a 100°C); tipo de injeção sem divisão de fluxo (volume de injeção de 0,1µL de uma solução do aroma do mel em diclorometano), espectrômetro de massas: impacto eletrônico, energia do elétron a 70 eV;



temperatura da fonte de íons: 200°C. Os componentes voláteis do mel foram identificados e quantificados por comparação de seus espectros de massas (massa molecular e padrão de fragmentação) com os registros obtidos da literatura (ADAMS, 2007). Não foi necessário o cálculo dos índices de retenção.

## 4.6 MÉTODOS ESTATÍSTICOS

### 4.6.1 Análise de Agrupamentos

A análise de agrupamento (A.A) tem por objetivos classificar uma amostra de  $n$  objetos, caracterizados por  $p$  variáveis, em número  $g$  de grupos ou classes homogêneas, de acordo com as suas similaridades ou dissimilaridades.

Um conceito fundamental para AA é a medida da distância entre dois objetos, ou a quantificação do quanto são parecidos. Esta medida é o coeficiente de parença. Nas medidas de similaridade, quanto maior o valor observado, mais similares são os objetos. Nas medidas de dissimilaridade, vale o inverso. Um exemplo de medida de similaridade é o coeficiente de correlação, enquanto que a distância euclidiana é um exemplo de dissimilaridade (BASSAD et al., 1990).

### 4.6.2 Técnicas Hierárquicas de Agrupamento

Nesta técnica, objetos são classificados em diferentes etapas, de modo hierárquico, produzindo uma árvore de classificação (BASSAD et al., 1990).

Na Análise Hierárquica de Clusters (HCA), os compostos identificados nos aromas do mel de *M. flavolineata* foram tomados como variáveis. Foi utilizado o método por ligação completa e distância Euclidiana com base na similaridade entre os grupos, utilizando o software MINITAB 14.0.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS DE GEOPRÓPOLIS, PÓLEN E CERUME PELO MÉTODO COLORIMÉTRICO DE FOLIN CIOCALTEAU

#### 5.1.1 Fenólicos Totais (FT) dos extratos etanólicos brutos de geoprópolis, pólen e cerume

As concentrações de fenólicos Totais foram calculadas com base nos fatores da curva obtida para o ácido gálico ( $y = 11,99 X$ ,  $r^2 = 1,00$ ). A tabela 3 exibe o teor de compostos fenólicos, expressos em média  $\pm$  desvio padrão, dos extratos etanólicos de geoprópolis, pólen e cerume das 4 localidades.

**Tabela 3:** Fenólicos totais dos extratos brutos do geoprópolis, pólen e cerume das 4 regiões

Extratos	FT (mg EAG/g)
EEGP1	118,6 $\pm$ 8,0
EEGP2	337,7 $\pm$ 5,2
EEGP3	52,4 $\pm$ 2,3
EEGP4	39,8 $\pm$ 0,9
EEPO1	69,2 $\pm$ 0,8
EEPO2	-
EEPO3	84,0 $\pm$ 2,0
EEPO4	62,7 $\pm$ 2,6
EER1	63,4 $\pm$ 4,5
EER2	39,0 $\pm$ 3,0
EER3	79,8 $\pm$ 6,3
EER4	63,5 $\pm$ 3,8

EEGP – Extrato etanólico de geoprópolis; EEPO – Extrato etanólico do pólen; EER – Extrato etanólico do cerume; 1 – Vigia; 2 – Tracuateua; 3 – São João de Pirabas; 4 – Baião; (-) Não foi coletado

O índice de fenólicos nas amostras de extratos variou de 39,0 a 337,7 mg EAG/g. Para as amostras de cerume e geoprópolis da região de Tracuateua, respectivamente.

### 5.1.2 Fenólicos Totais (FT) das frações do geoprópolis de Vigia (1) e Tracuateua (2)

As frações de geoprópolis das regiões de Vigia (1) apresentaram valores equivalentes ou superiores aos teores de fenólicos totais obtidos para o extrato bruto (Tab. 4), com destaque para as frações acetato de etila (FA-EEGP1, FT = 182 ± 4,9 mg EAG/g) e hidroalcoólica (FHA-EEGP1, FT = 304,5 ± 8,6 mg EAG/g). Porém, as frações de geoprópolis de Tracuateua curiosamente apresentaram teores muito abaixo quando comparadas aos obtidos com o extrato bruto. O maior teor de fenólicos obtidos na fase acetato de etila de Tracuateua (FA-EEGP2, FT = 58,5 ± 4,0), mostrou-se aproximadamente 6 vezes menor que o valor do extrato bruto.

**Tabela 4:** Fenólicos totais das frações e dos extratos brutos de geoprópolis de Vigia e Tracuateua.

Amostras de geoprópolis	FT (mg EAG/g)
EEGP1	118,6 ± 8,0
FD-EEGP1	116,2 ± 11,5
FA-EEGP1	182,0 ± 4,9
FHA-EEGP1	304,5 ± 8,6
EEGP2	337,7 ± 5,2
FD-EEGP2	45,5 ± 0,6
FA-EEGP2	58,5 ± 4,0
FHA-EEGP2	13,9 ± 0,6

EEGP – Extrato etanólico de geoprópolis ; 1 – Vigia; 2 – Tracuateua

### 5.1.3 Fenólicos Totais (FT) das frações do pólen de Vigia e São João de Pirabas.

A capacidade de redução do reagente Folin Ciocalteu das frações de pólen das regiões de Vigia (1) e São João de Pirabas (3) mostraram resultados bastante significativos e superiores aos obtidos para o extrato bruto (Tab. 5). Destacaram-se as frações acetato de etila e diclorometano das duas localidades (FA-EEPO1; FT = 291,7 ± 4,4 mg EAG/g e FD-EEPO1; FT = 115,4 ± 8,6) e (FA-EEPO3; FT = 196,4 ± 1,4 mg EAG/g e FA-EEPO3; FT = 267,1 ± 1,8 mg EAG/g), com valores bastante expressivos. A fração hidroalcoólica de Vigia também exibiu resultado aproximadamente 50% maior em relação ao extrato bruto.

**Tabela 5:** Fenólicos totais das frações e dos extratos brutos de pólen de Vigia e São João de Pirabas

Amostras de pólen	FT (mg EAG/g)
EEPO1	69,2 ± 0,8
FD-EEPO1	115,4 ± 8,6
FA-EEPO1	291,7 ± 4,4
FHA-EEPO1	96,8 ± 7,2
EEPO3	84,0 ± 2,0
FD-EEPO3	267,1 ± 1,8
FA-EEPO3	196,4 ± 1,4
FHA-EEPO3	30,0 ± 1,3

EEPO – Extrato etanólico do pólen; 1 – Vigia; 3 – São João de Pirabas

O teor de compostos fenólicos das frações de pólen de *M. flavolineata* variou de 30 – 291,7 mg EAG/g. Estes valores são consideravelmente maiores que os teores de fenólicos de extratos de pólen das abelhas *Apis mellifera*, coletados na região sul do Brasil, que variaram de 19,3 a 48,9 mg EAG/g (CARPES et al., 2008).

#### 5.1.4 Fenólicos Totais (FT) das frações da cerume de Vigia e São João de Pirabas.

Nas frações de cerume de Vigia (1), obteve-se valores próximos aos obtidos no extrato (Tab. 6), com exceção da fração metanólica que acumulou um teor de fenólicos totais maior que todas as amostras de resina (FT =  $127,8 \pm 11,0$  mg EAG/g), uma quantidade que chega ao dobro do valor obtido para o extrato bruto.

Nas frações de cerume de São João de Pirabas (3), os maiores teores foram obtidos nas frações diclorometano (FT =  $83,4 \pm 1,5$  mg EAG/g) e hidroalcoólica (FT =  $94,6 \pm 2,7$  mg EAG/g). Porém, estes valores se mostraram próximos ao valor obtido com o extrato bruto.

**Tabela 6:** Fenólicos totais das frações e dos extratos da cerume de Vigia e São João de Pirabas.

Amostras de cerume	FT (mg EAG/g)
EER1	$63,4 \pm 4,5$
FH-EER1	$43,1 \pm 3,3$
FD-EER1	$62,2 \pm 2,2$
FM-EER1	$127,8 \pm 11,0$
FAq-EER1	$44,0 \pm 6,2$
EER3	$79,8 \pm 6,3$
FH-EER3	$60,1 \pm 2,4$
FD-EER3	$83,4 \pm 1,5$
FHA-EER3	$94,6 \pm 2,7$

EER – Extrato etanólico do cerume ; 1 – Vigia; 3 – São João de Pirabas;

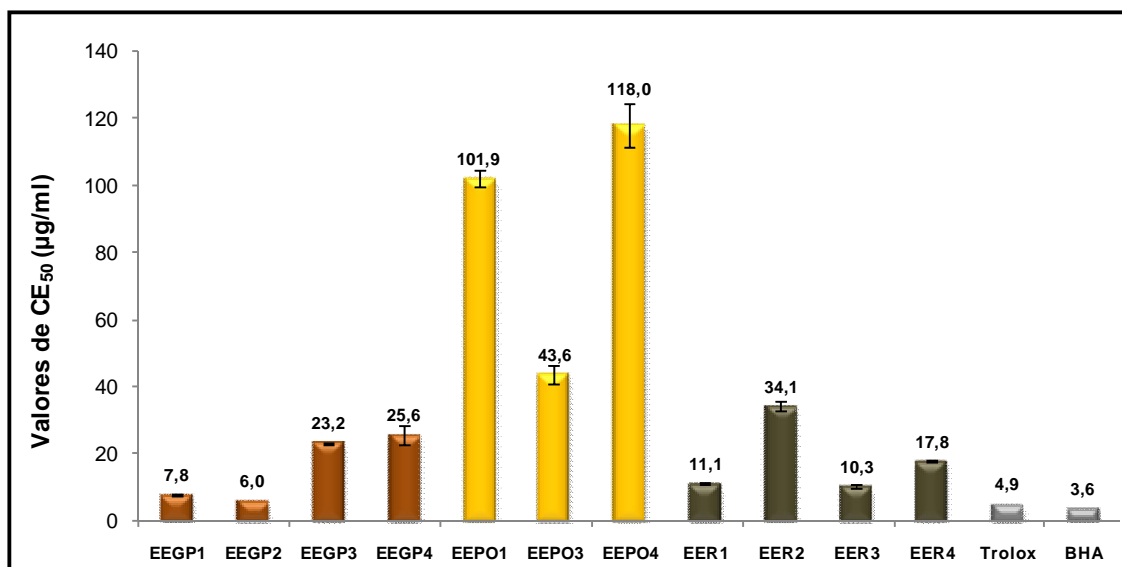
Analisando os três produtos da abelha, observa-se que nas amostras de geoprópolis, o valor máximo obtido foi de  $304,5 \pm 8,6$  mg EAG/g (FHA-EEGP1). Nas frações do pólen, os maiores valores foram para FA-EEPO1 ( $291,7 \pm 4,4$  mg EAG/g) seguida de FD-EEPO3 ( $267,1 \pm 1,8$  mg EAG/g). O maior valor obtido com as frações de cerume foi na partição metanólica ( $127,8 \pm 11,0$  mg EAG/g).

Comparando o teor de fenólicos do extrato e frações da geoprópolis de *M. flavolineata* com o teor de fenólicos obtidos em outro trabalho desenvolvido com extrato etanólico, frações e sub-frações da própolis vermelha da abelha *Apis mellifera* (CABRAL et al., 2009), observa-se que o extrato etanólico da própolis vermelha apresentou um teor de fenólicos igual a 258 mg EAG/g e suas frações hexânica e clorofórmica exibiram os valores 154,8 mg EAG/g e 249,8 mg EAG/g. Similarmente, o geoprópolis de *M. flavolineata* de duas regiões (Vigia e Tracuateua) apresentou teores de fenólicos de 118,6 mg EAG/g e 337,7 mg EAG/g, respectivamente. As frações diclorometano, acetato de etila e hidroalcoólica de geoprópolis de Vigia também apresentaram consideráveis teores (116,2 mg EAG/g, 182 mg EAG/g e 304,5 mg EAG/g, respectivamente), que são comparáveis e até superiores aos obtidos do trabalho com a própolis vermelha da abelha *Apis mellifera*.

## 5.2 CAPACIDADE ANTIOXIDATIVA PELO MÉTODO DE SEQUESTRO DO RADICAL DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila)

### 5.2.1 Capacidade antioxidante dos extratos brutos de geoprópolis, pólen e cerume.

O gráfico 2 exibe os valores de concentrações efetiva responsáveis pela redução do radical DPPH em 50% de sua concentração inicial ( $CE_{50}$ ). Dos três materiais testados, o que se mostrou menos ativo foi o pólen. O valor de  $CE_{50}$  mais significativo encontrado neste material foi da amostra de São João de Pirabas (EEPO3,  $CE_{50} = 43,6 \pm 2,6 \mu\text{g/mL}$ ). Nas amostras de geoprópolis, destacaram-se as da região de Vigia (EEGP1) ( $CE_{50} = 7,8 \pm 0,5 \mu\text{g/mL}$ ) e Tracuateua (EEGP2) ( $CE_{50} = 6,0 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$ ). Os resultados mais expressivos para o cerume foram das amostras de Vigia (EER1) ( $CE_{50} = 11,1 \pm 0,4 \mu\text{g/mL}$ ) e São João de Pirabas (EER3) ( $CE_{50} = 10,3 \pm 0,4 \mu\text{g/mL}$ ). Estas amostras exibiram valores de  $CE_{50}$  comparáveis aos padrões Trolox ( $CE_{50} = 4,9 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$ ) e BHA ( $CE_{50} = 3,6 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$ ). Os extratos acima destacados foram separados e particionados. Suas frações foram avaliadas em termos de fenólicos totais e capacidade antioxidativa.



**Gráfico 2:** Valores de  $CE_{50}$  para os extratos brutos de geoprópolis, pólen e cerume das 4 localidades e dos padrões Trolox e BHA.

EEGP – Extrato etanólico de geoprópolis; EEPO – Extrato etanólico do pólen; EER – Extrato etanólico do cerume; 1 – Vigia; 2 – Tracuateua; 3 – São João de Pirabas; 4 – Baião.

Trabalhos de Manrique & Santana (2004) em que analisaram a atividade antioxidante de extratos etanólicos da própolis de Meliponíneos (*Melipona quadrifasciata*, *Tetragonisca angustula* e *Nannotrigona sp.*) obtiveram resultados que indicaram alta atividade antioxidante.

O extrato bruto da própolis de *Melipona Scutellaris* (Uruçu) foi analisado por Camilo (2008), utilizando o método do seqüestro do radical DPPH e apresentou um percentual de inibição do radical livre de 89,1%, na concentração de 90 µg/mL. Comparando com os resultados da geoprópolis de *M. flavolineata* da região de Tracuateua (EEGP2), extrato que apresentou maior atividade antioxidante, utilizou-se uma concentração de 10 µg/mL para se obter um percentual de inibição de 79%. Isso mostra que o geoprópolis de *M. flavolineata* é uma potente fonte de compostos antioxidantes, mesmo comparados a própolis de outra espécie de abelha sem ferrão.

Frações etanólicas de dois tipos de pólen da abelha sem ferrão *Melipona Subnitida* (amarelo e marrom) foram testadas na metodologia de captura do radical DPPH e foram calculados seus valores de CE<sub>50</sub> (SILVA, T. M. S. et al., 2006). Estas frações das amostras de pólen amarelo e marrom exibiram valores de CE<sub>50</sub> (104,5 ± 0,5 e 106,1 ± 1,3 µg/mL) similares aos obtidos no pólen da região de Vigia (CE<sub>50</sub> = 101,9 ± 2,4 µg/mL) assim como o valor obtido para o pólen de Baião (CE<sub>50</sub> = 118,5 ± 6,5).

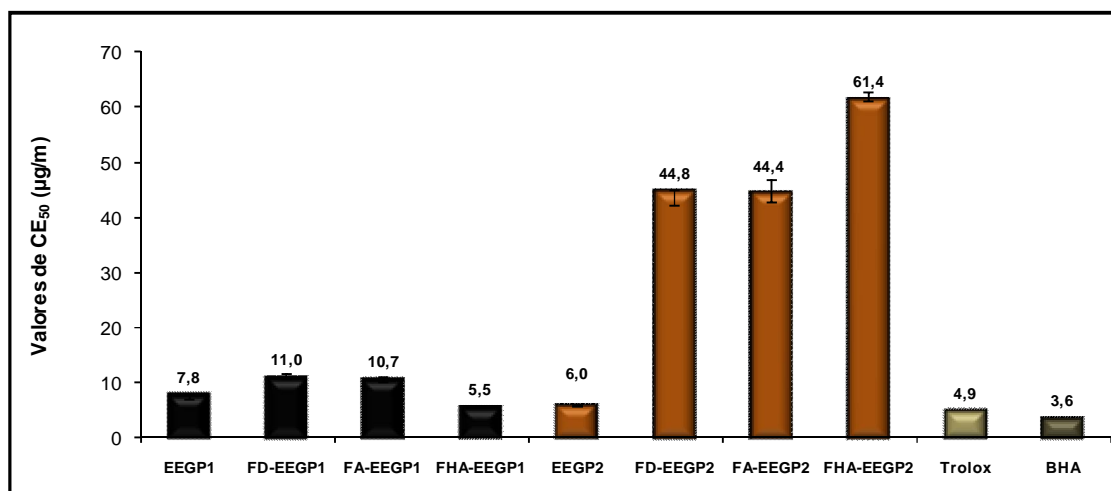


## 5.2.2 Capacidade antioxidante das frações dos extratos mais ativos

Os extratos que apresentaram menores valores de  $CE_{50}$  frente ao método do seqüestro do radical DPPH foram fracionados por partição líquido-líquido e suas frações testadas. Os resultados para os três materiais são mostrados nos gráficos 3, 4 e 5.

### 5.2.2.1 Capacidade antioxidante das frações de Geoprópolis de Vigia (1) e Tracuateua (2).

As frações de geoprópolis de Vigia mostraram maiores atividades que as da região de Tracuateua (Gráfico 3), que inicialmente havia apresentado o valor de  $CE_{50}$  ( $6,0 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$ ) mais próximo dos padrões. O valor de  $CE_{50}$  de FHA-EEGP1 ( $5,5 \pm 0,4 \mu\text{g/mL}$ ) similar aos dos padrões Trolox ( $CE_{50} = 4,9 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$ ) e BHA ( $CE_{50} = 3,6 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$ ). Isso mostra que esta fração é uma potencial fonte de compostos fenólicos com capacidade antioxidante. Enquanto que os menores valores de  $CE_{50}$  para as frações de EEGP2 foram obtidos da FA-EEGP2 ( $44,4 \pm 2,6 \mu\text{g/mL}$ ) e FD-EEGP2 ( $44,8 \pm 0,3 \mu\text{g/mL}$ ), ou seja, são aproximadamente 9 vezes menos ativos que o Trolox ( $CE_{50} = 4,9 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$ ) e 12 vezes menos ativos que o BHA ( $CE_{50} = 3,6 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$ ).

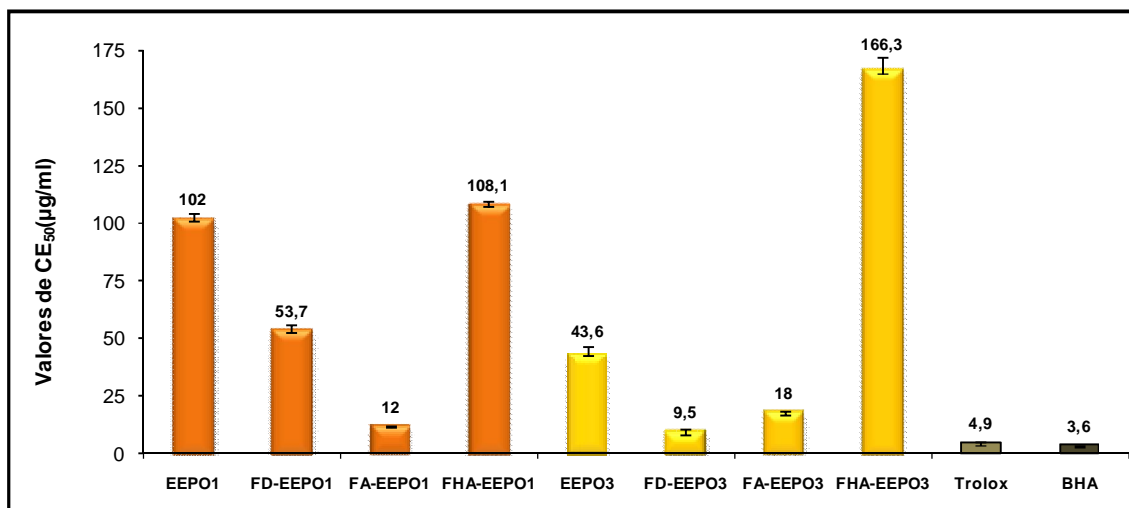


**Gráfico 3:** Valores de  $CE_{50}$  das frações de geoprópolis de Vigia e Tracuateua e dos padrões Trolox e BHA. EEGP – Extrato etanólico de geoprópolis; 1 – Vigia; 2 – Tracuateua.

Os valores de  $CE_{50}$  mais significativos dos extratos metanólicos de geoprópolis de duas espécies de abelha sem ferrão foram: para *Melipona compressipes* ( $15,0 \pm 7,1 \mu\text{g/mL}$  e  $18,4 \pm 0,3 \mu\text{g/mL}$ ) e para a abelha *Melipona seminigra* ( $162,0 \pm 0,4 \mu\text{g/mL}$  e  $181,0 \pm 3,0 \mu\text{g/mL}$ ) (MUNIZ et al., 2009). Todas as amostras apresentadas são menos ativas que os extratos etanólicos de geoprópolis de *M. flavolineata* das localidades de Vigia e Tracuateua, os quais apresentam valores de  $CE_{50}$  inferiores aos destas amostras ( $7,8 \pm 0,5 \mu\text{g/mL}$  e  $6,0 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente).

### 5.2.2.2 Capacidade antioxidante das frações de pólen de Vigia (1) e São João de Pirabas (3).

As frações obtidas dos extratos de pólen das regiões de Vigia e São João de Pirabas exibiram valores satisfatórios quando comparadas aos obtidos com os extratos brutos (Gráfico 4). As frações mais ativas foram a acetato de etila de Vigia (FA-EEPO1,  $CE_{50} = 12 \pm 0,4 \mu\text{g/mL}$ ) e as frações diclorometano (FD-EEPO3,  $CE_{50} = 9,5 \pm 1,2 \mu\text{g/mL}$ ) e acetato de etila (FA-EEPO3,  $CE_{50} = 18 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$ ), ambas de São João de Pirabas. Estas amostras foram, em média, 3 vezes menos ativas que o padrão Trolox. Porém, as frações hidroalcoólicas apresentaram valores de  $CE_{50}$  acima de  $100 \mu\text{g/mL}$ . A fração diclorometano de Vigia (FD-EEPO1,  $CE_{50} = 53,7 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$ ) apresentou uma atividade moderada com valor de  $CE_{50}$  11 vezes menor que a do padrão Trolox ( $CE_{50} = 4,9 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$ ) e 15x menor que a do padrão BHA ( $CE_{50} = 3,6 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$ ). Estes dados são mostrados no gráfico 4.

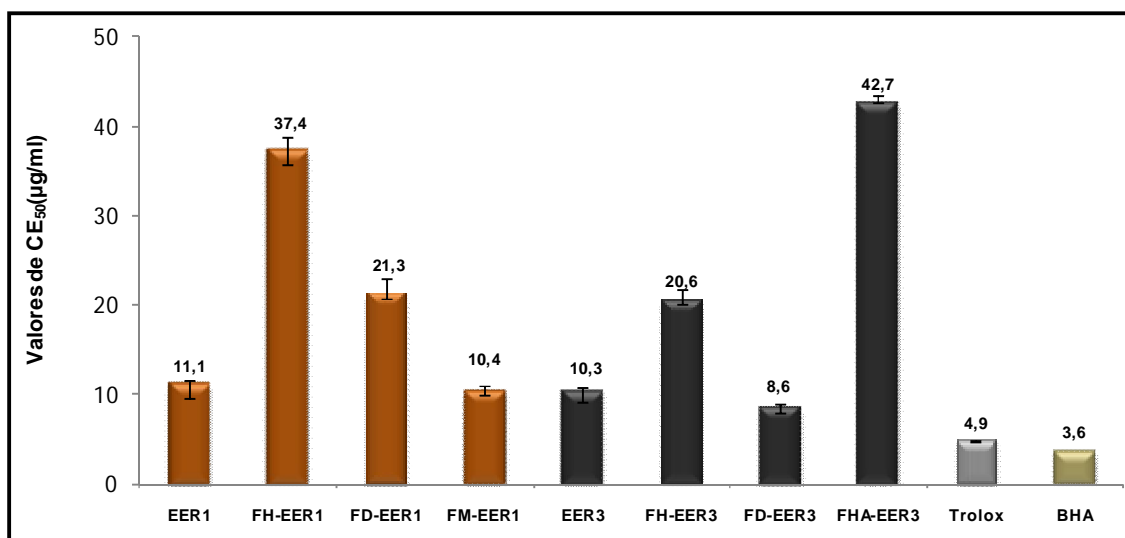


**Gráfico 4:** Valores de  $CE_{50}$  das frações de pólen de Vigia e São João de Pirabas e dos padrões Trolox e BHA. EEPO – Extrato etanólico do pólen ; 1 – Vigia; 3 – São João de Pirabas

Estudos realizados com 12 amostras de pólen de diferentes regiões da Cracóvia, constataram que uma grande variabilidade de compostos fenólicos e na maioria dos pólenes examinados a alta atividade estava relacionada com o nível de fenilpropanóides nas amostras (LEJA et al., 2008).

### 5.2.2.3 Capacidade antioxidante das frações de cerume de Vigia (1) e São João de Pirabas (3)

Para as frações de cerume das localidades de Vigia e São João de Pirabas (Gráfico 5), destacou-se que a fração metanólica de Vigia (FM-EER1,  $CE_{50} = 10,4 \pm 0,6 \mu\text{g/mL}$ ) e a diclorometânica de São João de Pirabas (FD-EER3,  $CE_{50} = 8,6 \pm 0,4 \mu\text{g/mL}$ ), Estas apresentaram os melhores resultados de atividades antioxidante com valores em média 2 vezes menos ativos que o padrão Trolox ( $CE_{50} = 4,9 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$ ) e 3 vezes menos ativos que a do padrão BHA ( $CE_{50} = 3,6 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$ ). Isto indica que são importantes fontes de agentes antioxidantes.



**Gráfico 5:** Valores de  $CE_{50}$  das frações de resina de Vigia e São João de Pirabas e dos padrões Trolox e BHA. EER – Extrato etanólico do cerume ; 1 – Vigia; 3 – São João de Pirabas

Uma explicação para uma considerável atividade antioxidante das frações menos polares quando comparadas as frações hidroalcoólicas ou aquosas do cerume, é de que a afinidade dos antioxidantes com o método DPPH não é afetada pela polaridade do substrato (KOLEVA et al., 2002).

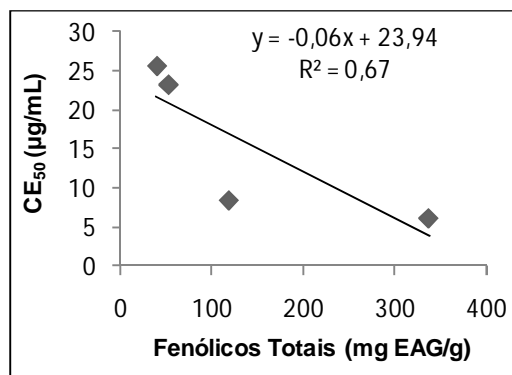
A literatura, não fornece dados que relatam atividade antioxidante de extratos do cerume de abelhas indígenas sem ferrão o que torna estes resultados importantes para o estudo deste produto explorado pela abelha *M. flavolineata* que possui consideráveis teores de fenólicos e atividade antioxidativa.

### 5.3 CORRELAÇÕES ENTRE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E FENÓLICOS TOTAIS

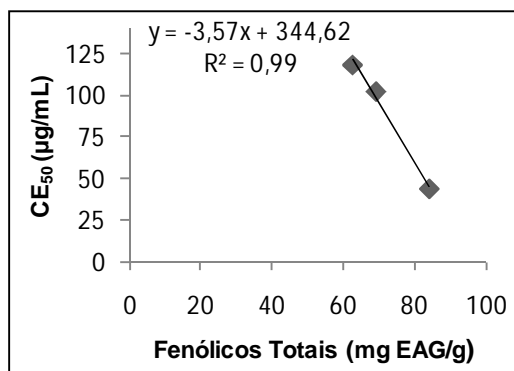
Analisando os extratos de geoprópolis, pólen e cerume, foram observadas correlações positivas entre teor de fenólicos totais e atividade antioxidante.

As correlações podem ocorrer devido a similaridade nos mecanismos de seqüestro do radical DPPH e da determinação de compostos fenólicos totais, já que em ambos os casos há transferência de elétrons de um composto antioxidante para um oxidante, por meio da doação de um hidrogênio (KATSUBE et al.,2004).

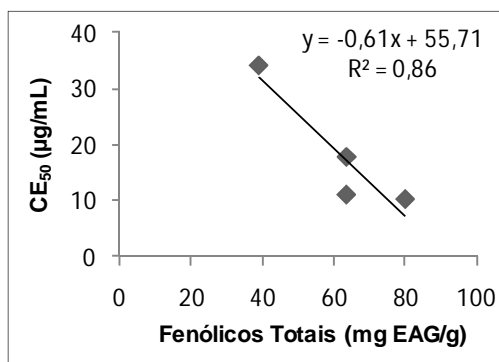
Os coeficientes de correlação obtidos para os 3 materiais (geoprópolis, pólen e cerume) por comparação de pares de valores, em relação aos teores de fenólicos totais e capacidades antioxidantes, apresentaram-se todos positivos. O maior valor obtido foi para os extratos de pólen ( $R^2 = 0,99$ ), seguido pelo coeficiente do cerume ( $R^2 = 0,86$ ). O menor valor de correlação foi dos extratos de geoprópolis ( $R^2 = 0,67$ ). Isto é indicativo de que em todas as amostras a atividade antioxidante está diretamente ligada a presença de compostos fenólicos na composição dos materiais produzidos por *M. flavolineata*. Os gráficos 6, 7 e 8 (Pág. 68) com as equações da reta e os respectivos coeficientes de correlação são mostrados.



**Gráfico 6.** Correlações estatísticas entre teor de fenólicos totais e valores de CE<sub>50</sub> para os extratos brutos de geoprópolis de *M. flavolineata*.



**Gráfico 7.** Correlações estatísticas entre teor de fenólicos totais e valores de CE<sub>50</sub> para os extratos brutos de pólen de *M. flavolineata*.



**Gráfico 8.** Correlações estatísticas entre teor de fenólicos totais e valores de CE<sub>50</sub> para os extratos brutos do cerume de *M. flavolineata*.

## 5.4 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS AMOSTRAS DE MEL

### 5.4.1 Composição química dos voláteis do mel

Foram identificados um total de 17 constituintes, sendo 10 presentes na amostra de Vigia (1), 10 em Tracuateua (2), 10 para a de São João de Pirabas (3) e 13 componentes na amostra de Baião (4), que representaram 98,3%, 97%, 97,9% e 97,6% do conteúdo total destes compostos nas amostras de mel, respectivamente.

Os componentes voláteis presentes no mel foram identificados e quantificados por comparação visual de seus espectros de massas (massa molecular e padrão de fragmentação) com os registros obtidos da literatura (ADAMS, 2007).

Todas as amostras apresentaram substâncias das classes dos monoterpenos oxigenados, álcoois, aldeídos, cetonas e hidrocarbonetos alifáticos. As estruturas dos principais constituintes são mostradas no quadro 6, p. 77.

Os constituintes predominantes nas amostras de cada localidade, em percentual de área relativa, foram:

Vigia – Região 1 (Capoeira alta/ Floresta secundária)

Na amostra de mel coletada em Vigia, as classes de substâncias com maior ocorrência foram álcoois e aldeídos, e monoterpenos oxigenados. Dentre os principais estão o 3,7-dimetil-1,5,7-octatrien-3-ol (58,4%), fenilacetaldéido (22,5%), feniletanol (5,2%). Em percentuais menores estão o óxido de nerol (2,7%), o óxido de cis-linalol (furanóide) (2,6%), o óxido de trans-linalol (piranóide) (2,3%) e o óxido de trans-linalol (furanóide) (1,6%), álcool perílico (0,42%) e o hidrocarboneto tricosano (0,22%).

#### Tracuateua – Região 2 (Manguezal)

A amostra de mel de Tracuateua se caracterizou pela predominância, como ocorreu na amostra de Vigia, das mesmas classes de substâncias, porém, em percentuais de área relativa diferentes. Ficaram assim descritos: 3,7-dimetil-1,5,7-octatrien-3-ol (71,8%), fenilacetaldéido (9,6%) e óxido de nerol (3,5%). Em quantidades menores estão o óxido de cis-linalol (furanóide) (3,4%), óxido de trans-linalol (furanóide) (2,6%), o óxido de cis-linalol (piranóide) (1,2%) e o hidrocarboneto tricosano (0,4%).

#### São João de Pirabas – Região 3 (Manguezal)

O álcool 3,7-dimetil-1,5,7-octatrien-3-ol (64,2%) também foi o componente majoritário na amostra de mel de São João de Pirabas, seguido pelo monoterpenos óxido de cis-linalol (furanóide) (10,2%) e piranóide (4,7%), feilacetaldéido (5,7%) e óxido de trans-linalol (furanóide) (5,6%). Em menores proporções encontram-se o óxido de nerol (2,8%), o hidrocarboneto alifático E,E-2,6-dimetil-1,3,5,7-octatetraeno (2,5%), feniletanol (1,4) e tricosano (0,75%).

#### Baião – Região 4 (Capoeira/Floresta secundária)

Assim como nas amostras anteriores, o mel de Baião também continha predominantemente o composto 3,7-dimetil-1,5,7-octatrien-3-ol (44,7%), seguido por fenilacetaldéido (19,8%), pelos óxidos de cis-linalol (piranóide) (6,5%) e furanóide (6,1%). Em proporções menores estão o feniletanol (2,4%), tricosano (2,3%), óxido de nerol (2,1%), E,E-2,6-dimetil-1,3,5,7-octatetraeno (1,8%), álcool benzílico (0,8%), pentacosano (0,4%), delta-decalactona (0,3%), heneicosano (0,2) e  $\alpha$ -terpineol (0,1%).

Os resultados da análise dos voláteis das amostras de mel das 4 localidades do Estado Pará (Vigia, Tracuateua, São João de Pirabas e Baião) com o percentual de área relativa de cada constituinte estão descritos na tabela 7, pág. 71.



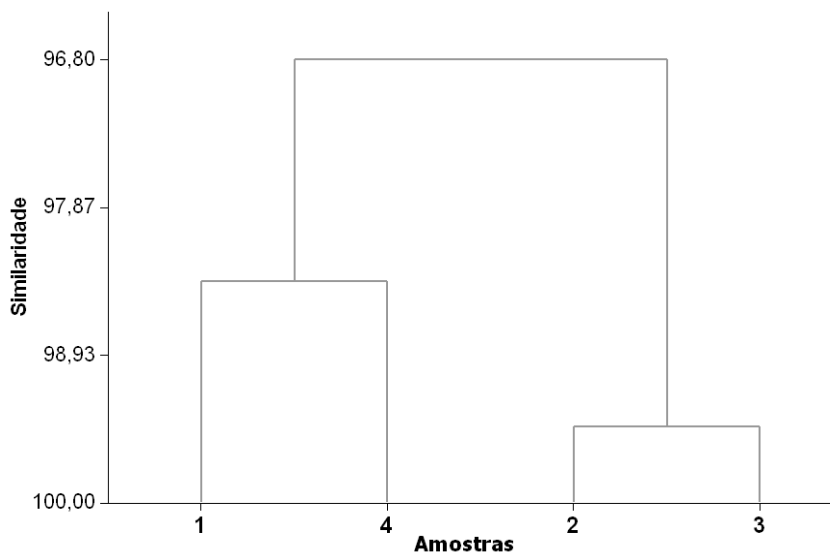
**Tabela 7:** Componentes voláteis das amostras de mel coletados nos 4 municípios do Pará

	Componente	TR (min)	Amostras de mel			
			1	2	3	4
1	Não identificado	5,9 – 8,5	1,1	0,8	-	-
2	Álcool benzílico	8,8	-	-	-	0,76
3	Fenilacetaldéido	9,1 – 9,2	22,5	9,6	5,7	19,8
4	Óxido de cis-linalol (furanóide)	10,1 – 10,2	2,6	3,4	10,2	6,1
5	Óxido de trans-linalol (furanóide)	10,7 – 10,8	1,6	2,6	5,6	10,1
6	Linalol	11,2	-	0,8	-	-
7	3,7-dimetil-1,5,7-octatrien-3-ol	11,3 – 11,4	58,4	71,8	64,2	44,7
8	Feniletanol	11,6 – 11,7	5,2	1,2	1,4	2,4
9	E,E-2,6-dimetil-1,3,5,7-octatetraeno	12,4 – 12,5	2,6	2,5	2,5	1,8
10	Óxido de nerol	13,3 – 13,4	2,6	3,5	2,8	2,1
11	$\alpha$ -terpineol	14,1	-	-	0,1	-
12	Óxido de cis-linalol (piranóide)	14,0 – 14,1	-	1,2	4,8	6,5
13	Óxido de trans-linalol (piranóide)	14,3	2,3	-	-	-
14	Não identificado	15,2 – 19,1	0,3	1,6	-	-
15	Álcool perílico	19,1	0,4	-	-	-
16	Delta decalactona	27,5	-	-	-	0,3
17	Heneicosano	48,9	-	-	-	0,2
18	Não identificado	50,8	-	0,2	-	-
19	Tricosano	54,7	0,2	0,4	0,7	2,3
20	Não identificado	58,8 – 58,9	-	0,2	1,7	1,6
21	Pentacosano	59,1	-	-	-	0,4
22	Não identificado	59,3	-	-	-	0,4
<b>TOTAL (%) identificado</b>			<b>98,3</b>	<b>97</b>	<b>97,9</b>	<b>97,6</b>

1 - Vigia; 2 - Tracuateua; 3 - São João de Pirabas; 4 - Baião.  
TR – Tempo de retenção (min.)

#### 5.4.2 Análise Hierárquica de Agrupamento (HCA) dos constituintes voláteis das amostras de mel das 4 localidades.

A análise estatística de HCA resultou no seguinte dendograma:



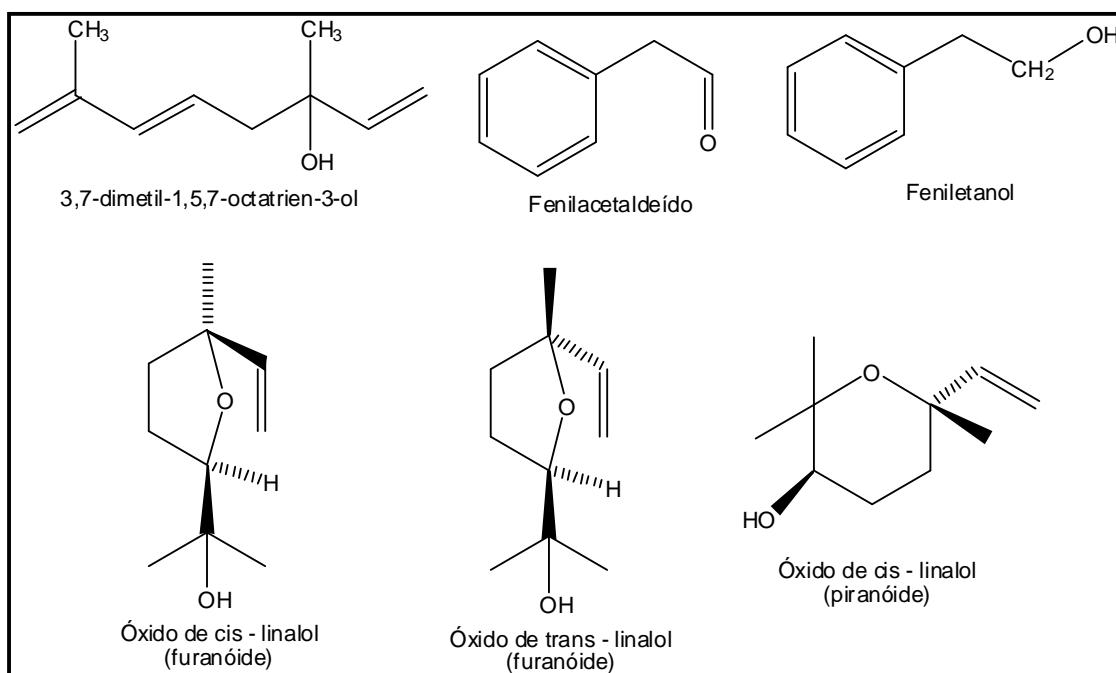
**Dendograma 1:** Percentual de similaridade entre pares de amostras de mel de *M. flavolineata*. 1 - Vigia; 2 - Tracuateua; 3 - São João de Pirabas; 4 - Baião.

O dendograma dividiu-se em dois grupos. A maior similaridade encontrada (99,45%) foi entre as amostras 2 e 3, que apresentam as maiores concentrações de 3,7-dimetil-1,5,7-octatrien-3-ol (71,8%; 64,2%). As amostras 1 e 4 formaram outro grupo com 98,40% de similaridade. Além da alta concentração de 3,7-dimetil-1,5,7-octatrien-3-ol (58,4%; 44,7%) estas amostras possuem quantidades semelhantes de fenilacetaldéido (22,5%; 19,8%). A elevada similaridade (96,8%) entre todas as amostras (1, 2, 3 e 4) mostrou que a composição química do aroma dos méis das quatro localidades não diferem significativamente.

O componente determinante para a formação de dois grupos foi o segundo mais abundante (Fenilacetaldéido).

Portanto, as amostras de mel de *M. flavolineata* coletas nos municípios do Pará, possuem similaridade significativa em termos de componentes majoritários (Quadro 6, pág. 73). Por outro lado, componentes minoritários como o óxido de

trans-linalol (piranóide) (2,3%) e o álcool perílico (0,4%) foram identificados somente na amostra de mel de Vigia. A presença do linalol (0,8%) foi detectada unicamente na amostra da região de Tracuateua. Os hidrocarbonetos alifáticos heneicosano, pentacosano e a cetona delta-decalactona só foram identificados na amostra de mel de Baião. Um percentual mínimo de  $\alpha$ -terpineol (0,1%) foi observado na amostra de mel de São João de Pirabas. Finalmente, o hidrocarboneto insaturado E,E-2,6-dimetil-1,3,5,7-octatetraeno foi identificado em 3 das 4 amostras analisadas (Tracuateua, São João de Pirabas e Baião).



**Quadro 6:** Estruturas dos componentes majoritários do mel das 4 localidades do estado do Pará.

A similaridade entre os dois grupos de amostras formados pode ser atribuída às localidades de coleta dos materiais. Pois nos municípios de Vigia (1) e Baião (4) são caracterizados pela predominância de uma vegetação semelhante (capoeira alta e mata secundária), explicando a alta similaridade entre eles (99,45%). O mesmo ocorreu para as outras duas localidades (Tracuateua – 2 e São João de Pirabas – 3), cuja vegetação predominante nos arredores é manguezal, com percentual de similaridade de 98,40%. Portanto, a vegetação circundante dos ninhos das abelhas influencia diretamente na composição dos componentes principais do mel produzido pelas abelhas, no caso, da espécie *M. flavolineata*.

Foram analisados méis provenientes da Rússia e identificaram componentes com as mesmas classes daqueles encontrados nas amostras de mel de *M. flavolineata*: terpenóides e ésteres, como por exemplo  $\alpha$ -terpineno, citronelol, nerol, linalol, mentol, formato de citronelina e acetato de linalina, os quais provavelmente originaram-se diretamente da fonte floral (TSCHOSGOWADSE, KOBLIANIDSE & DEMBIZKII, 1973).

Os pesquisadores Ferber & Nursten (1977) usaram CG acoplada à espectrometria de massas (EM) para estudar os compostos voláteis obtidos por destilação a vácuo. Cerca de 50 compostos foram identificados, principalmente, hidrocarbonetos e compostos aromáticos, tais como o fenilmetanol (álcool benzílico) e o álcool 2-feniletílico.

Em um estudo com amostras de mel de duas espécies de abelhas sem ferrão (*Partamona cupira* e *Melipona marginata*) da região do Piauí, observou que estas apresentaram similaridade com a abelha *M. flavolineata* em termos de classes de componentes principais:  $\alpha$ -pineno, feniletanal, feniletanol, (cis) óxido de linalol, (trans) óxido de linalol, fenilpropanona e hexadecanoato de metila, foram comuns a todos os méis na técnica de extração por micro-hidrodestilação (SILVA, I. S. et al., 2006).

É necessário um aprofundamento do estudo a respeito das floras visitadas pelas abelhas em cada localidade de coleta das amostras de mel.

## 6 CONCLUSÃO

Geoprópolis, pólen e cerume se apresentaram como importantes fontes de compostos fenólicos e elevada capacidade antioxidativa. Os resultados foram surpreendentes e promissores, principalmente quando comparados aos padrões fenólicos Trolox e BHA.

Observou-se correlações positivas entre os teores de fenólicos totais e atividade antioxidante para os três tipos extratos. Isto indica que a alta atividade antioxidante de algumas amostras de geoprópolis, pólen e cerume pode estar diretamente relacionada com a presença de compostos fenólicos nesses materiais.

Foi possível a identificação de 17 constituintes voláteis nas amostras de mel de *M. flavolineata* dos 4 municípios. Pela análise hierárquica de agrupamento, foi comprovado um alto grau de similaridade entre os pares e entre as 4 amostras de mel. As similaridades estabelecidas, em termos de componentes principais, entre as amostras de mel de Vigia e Baião e entre os méis de Tracuateua e São João de Pirabas podem ser explicadas pela semelhança de vegetação circundante dos ninhos. No primeiro grupo (Vigia e Baião), predomina a capoeira e mata secundária. No segundo grupo (Tracuateua e São João de Pirabas), as localidades estão próximas a região de mangue.

Os resultados obtidos são de suma importância no sentido de se ampliar informações mais precisas a respeito da fonte e de quais são dos produtos coletados e transformados pelas abelhas indígenas amazônicas, bem como a identificação de suas possíveis atividades biológicas.

## REFERÊNCIAS

ACKERMANN, T. Fast chromatographic study of propolis crudes. **Food chemistry**, Barking, v.42, n.2, p.135-138, Nov. 1991.

ADAMS, R. P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy. **Allured Publishing Corporation**, Carol Stream, Illinois. 2007.

ADELMANN, J. **Própolis: variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana/antioxidante**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005. 186p.

AGA, H.; SHIBUYA, T.; SUGIMOTO, K.; NAKAJIMA, S. Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v.58, n.5, p.945-946, 1994.

AHN, M. R.; KUNIMASA, K.; OHTA, T.; KUMAZAWA, S.; KAMIHIRA, M.; KAJI, K.; UTO, Y.; HORI, H.; NAGASAWA, H.; NAKAYAMA, T. Suppression of tumor-induced angiogenesis by Brazilian propolis: Major component artepillin C inhibits in vitro tube formation and endothelial cell proliferation. **Cancer Letters**, doi:10.1016/j.canlet.2006.12.039, 2007.

ALMAS, K.; MAHMOUD, A.; DAHLAN, A. A comparative study of propolis and saline application on human dentin. A SEM study. **Indian Journal of Dental Research**, Karnataka. v.12, n.1, p.21-27, 2001.

AMIOT, M. J.; AUBERT, S.; GONNET, M.; TACCHINI, M. Les composés phénoliques des miels: étude préliminaire sur l'identification et la quantification par familles. **Apidologie**, v.20, p.115-125, 1989.

APICULTURA. Disponível em: <<http://www.breyer.ind.br/apicultura/apicultura.htm>>. Acesso em: 10 de dezembro de 2009.

ARNAO, M. B et al. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v.11, p.419-421, 2000.

ASSIS, M. da G. P. **Criação prática e racional de abelhas sem ferrão da Amazônia**. Manaus: INPA/SEBRAE. 2001. 46p

BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; KUJUMGIEV, A.; MARCUCCI, M. C.; POPOV, S. Chemical composition and antibacterial activity of brazilian propolis. **Zeitschrift fur Naturforschung**, Tubingen. v.50, n.2, p.167-172, 1995.

BANKOVA, V. Recent trends and important developments in propolis research. **Evid.-based Compl. Aletrn. Med.**, v.2, n.1, p.29-32, 2005.

BANKOVA, V.; POPOVA, M. Propolis of stingless bees: a promising source of biologically active compounds. **Pharmac. Rev.** v.1, n.1, p.88-92, 2007.

BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; PRASAIN, J. K.; MATSUSHIGE, K.; SAIKI, I.; KADOTA, S. Chemical Constituents of Brazilian Propolis and Their Cytotoxic Activities. **Journal of Natural Products**, v.61, p.896-900, 1999.

BARTH, O. M. Monofloral and wild flower honey pollen spectra at Brazil. **Ciência e Cultura**, v.48, p.163-165, 1996.

BARTH, O. M. Palynological analysis of geopropolis samples obtained from six species of Meliponinae in the Campus of the Universidade de Ribeirão Preto, USP, Brazil. **Apiacta**, v.41, p.71- 85, 2006.

BASSAD, W. O.; MIAZAKI, E. B.; ANDRADE, D. F. Introdução à análise de agrupamentos. **9º simpósio Brasil de probabilidade e estatísticas**. IME- USP. 1990.

BECKER, E. M.; NISSEN, L. R.; SKIBSTED, L. H. Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. **European Food Research Technology**, Berlin, v.219, p.561–571, oct, 2004.

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

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição de Campinas**, v.12, n.2, p.123-130, 1999.

BICCHI, C., BELLIARDO, F., FRATTINI, C. Identification of the volatile components of some piedmontese honeys. **Journal of Apicultural Research**. v.22, p.130-6, 1983.

BLANK, I.; FISCHER, K.-H.; GROSCHE, W. Intensive neutral odourants of linden honey. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung**. v.189, n.5, p.426-433, 1989.

BLOIS, M. S. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. **Nature**, Paris, v.26, p.1199–1200, **1958**.

BOGDANOV, S.; Quality and Standards of Pollen and Beeswax. **Apiacta**, v.38, p.334, 2004.

BORELLI F., MAFFIA P., PINTO L., IANARO A., RUSSO A., CAPASO F. AND IALENTI A. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. **Fitoterapia**, n.73, p.53, 2002.

BOUSETA, A., COLLINS, S. & DUFOUR, J.P. Characteristic aroma profiles of unifloral honeys obtained with a dynamic Headspace CG-MS system. **Journal of Apicultural Research**. n.31, v.2, p.96-109, 1992

BRAND - WILLIAMS, W., CURVELIER, M. E., BERST, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**. n.28, p.25-30, 1995.

BREYER, E. U. **Abelhas e saúde**. União da Vitória: Uniporto Gráfica e Editora Ltda., 1980. 40p.

CABRAL, I. S. R. et al. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova** v.32, n.7, p.1523-1527, 2009.

CAMILO, M. B. B. de O. **Análise da biológica da própolis de urucu (*Melipona Scutellaris*)**. Dissertação (Mestrado em Ciências farmacêuticas). Universidade Federal de Alfenas. Bahia. 2008. 54p.

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

CARVALHO-ZILSE, G. A.; SILVA, C. G. N. Da; ZILSE, N.; VILAS-BOAS, H. C.; SILVA, A. C. Da; LARAY, J. P.; FREIRE, D. Da C. B.; KERR, W. E. **Criação de abelhas sem ferrão**. Manaus: IBAMA/PRÓVARZEA. 2005. 27p.



CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis: An old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**. v.73, supl. 1, p.S1-S6, 2002.

CLARKSON, P. M., THOMPSON, H. S. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? **American Journal of Nutrition**, v.72 (suppl), p.637s-46s, **2000**.

COOK, N. C.; SAMMON, S. Flavonoids – Chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. **Journal of Nutritional and Biochemistry**, New York, v.7, p.66-76, 1996.

COOPER, C. E., VOLLAARD, N. B. J., CHOUERI, T., WILSON, M. T. Exercise, free radicals and oxidative stress. **Biochemical Society Transactions**, v.30, p.280-285, 2002.

CORTOPASSI-LAURINO, M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V.L., ROUBIK, D.W., DOLLIN, A., HEARD, T., AGUILAR, I., VENTURIERI, G.C., EARDLEY, C. & NOGUEIRA-NETO, P. Global Meliponiculture: challenges and opportunities. **Apidologie**. v.37, p.275-292, 2006.

COSTA-JR, N. **Casa do Apicultor de campinas**. Apostila para o curso básico de meliponicultura. Campinas. São Paulo, 2000.

De MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Compostos voláteis em méis florais. **Química Nova** v.26, n.1, p.90-96, 2003.

DENISOV, E. T.; AFANAS EV, I. B. **Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology**. Boca Raton: CRC Taylor & Francis Group.2005. 981p

DI PAOLA-NARANJO, R. D.; SÁNCHEZ, J. S.; PARAMÁS, A. M. G.; GONZALO, J. C. R. Liquid chromatographic - mass spectrometric analysis of anthocyanin composition of dark blue bee pollen from *Echium plantagineum*. **Journal Chromatography A**, v.1054, n.1/2, p.205-210, 2004.

DONER, L. W.; The sugars of honey. **Journal of Science Food Agricultural** n.28, p.443. 1977.

DUARTE, S.; KOO, H.; BOWEN, W. H.; HAYACIBARA, M. F.; CURY, J. A.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P. L. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of mutans streptococci. **Biol. Pharm. Bull.**, v.26, n.4, p.527-531, 2003.

DUARTE, S. et al. The influence of a novel propolis on mutans streptococci biofilms and caries development in rats. **Archives of Oral Biology**, n. 51, p. 15-22, 2006.

DURÁN, R. M.; PADILLA, R. B. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. **Grasas y Aceites**, v.44, n.2, p.101-106, 1993.

FERBER, C. E. M.; NURSTEN, H. E. The aroma of beeswax. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v.28, p.511. 1977.

FEREIRA, A. L. A., MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e stress oxidativo. **Revista da Associação de Medicina Brasileira**, v.43, n.1, p.61-68, 1997.

FERRERES, F.; TOMAS-BARBERAN, F. A.; GIL, M. I.; TOMAS-LORENTE, F. An HPLC technique for flavonoid analysis in honey. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.56, n.1, p.49-56, 1991.

FERRERES, F.; JUAN, T.; PEREZ-ARQUILLUE, C.; HERRERA-MARTEACHE, A.; GARCIA-VIGUERA, C.; TOMAS-BARBERAN, F. A. Evaluation of pollen as a source of Kaempferol in rosemary honey. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.77, n.4, p.506-510, 1998.

FINALD, J., LAC, G., FLAIRE, E. Oxidative stress: relationship with exercise and training. **Sports Medicine** v.36, n.4, p.327-358, 2006.

FKI, I.; ALLOUCHE, N.; SAYADI, S. The use of polyphenolic extract, purified hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid from olive mill wastewater for the stabilization of refined oils: a potential alternative for synthetic antioxidants. **Food Chemistry**. Amsterdam, v.93, p.1-8, 2004.

GALINDO, A. B. **Caracterização do extrato da própolis vermelha, avaliação de suas propriedades biológicas e desenvolvimento do gel à base do extrato**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2007. 86p.

GARCÍA, M.; PÉREZ-ARQUILLUE, C.; JUAN, T.; JUAN, M. I.; HERRERA, A. Note: Pollen analysis and antibacterial activity of Spanish honeys. **Food Science and Technology International**, London, v.7, n.2, p.155-158, 2001.

GEBARA, E. C. E.; LIMA, L. A.; MAYER, M. P. A. Propolis antimicrobial activity against periodontopathic bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.33, p.365-369, 2002.

GOMES, F. P. **Curso de Estatística experimental**. 13<sup>a</sup> edição, Piracicaba, Ed. Livraria Nobel S. A. 1990, 468p.

GRADDON, A.D., MORRISON, J.D. & SMITH, J.F. Volatile constituents of some unifloral australian honeys. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.27, n.4, p.832-837, 1979.

HALLIWELL, B. Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward? **Cardiovascular Research**, London, v.47, n.3, p.410–418, Aug. 2000.

HALLIWELL, B.; et al. Free radicals, antioxidants and human diseases: Where are we now? **Journal of laboratory clinical medicine**, London, v.119, p.568–620. 1992.

HAN, J.; HEE, J. S. Antioxidant properties of selected non-culinary/nutraceutical herb extracts as evaluated in raw and cook meat. **Meat Sci.**, Amsterdam. v.70, p.25-33, 2004.

HAYACIBARA, M. F. et al. In vitro effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. **Journal of Ethnopharmacology**, n.101, p.110-115, 2005.

HODGE, J. E.; The chemistry of browning reactions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.15, p.928.1953.

ITO, J. et al. Anti-AIDS Agents. Anti-HIV Activity of Moronic Acid derivatives and the new melliferone-related triterpenoid isolated from Brazilian propolis. **Journal of Natural Products**, n.64, p.1278-1281, 2001.

KATSUBE, T.; TABATA, H.; OHTA, Y.; YAMASAKI, Y.; ANUURAD, E.; SHIWAKU, K.; YAMANE, Y. Screening for antioxidant activity inedible plant products: Comparison of low-density lipoprotein oxidation assay, DPPH radical scavenging assay, and Folin–Ciocalteu assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.2391–2396. 2004.

KERR, W. E; CARVALHO, G. A. & NASCIMENTO, V. A. **Abelha Uruçu** - Biologia, manejo e conservação. Belo Horizonte (MG), Fundação Acungau. 1996. Coleção Manejo da vida silvestre nº 2.

KOLEVA, I. I.; VAN BEEK, T. A.; LINSSEN, J. P. H.; GROOT, A.; EVSTATIEVA, L. N. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. **Phytochemical Analysis**. v.13, p.8-17, 2002.

KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Secondary Food Chemistry**, v.84, p. 329-339, 2004.

LEJA, M., MARECZEK, A., WYZGOLIK, G., KLEPACZ-BANIAK, J., & CZEKONSKA, K. Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. **Food Chemistry**, v.100, p.237–240. 2007.

LU, L. C., CHEN, Y. W. and CHOU, C. C. Antibacterial and DPPH free radical-scavenging activities of the ethanol extract of propolis collected in Taiwan. **Journal of Food and Drug Analysis**. v.11, p.277, 2003.

MANRIQUE, A. J.O.; SANTANA, Y. W. Antibacterial and antioxidant activities of propolis of native (Brazil and Venezuela) stingless bees (*Melipona quadrifasciata* Lep. *Tetragonisca angustula* and *Nannotrigona* sp.) In: IBRA INTERNATIONAL CONFERENCE ON TROPICAL BEES 8TH E 6º ENCONTRO SOBRE ABELHAS. Brasil. (**Proceedings**). Ribeirão Preto, 2004, 710 p. CD-ROM.

MARTOS, I.; FERRERES, F.; TOMAS-BARBERAN, F. A. Identification of flavonoid markers for the botanical origin of Eucalyptus honey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, n.5, p.1498-1502, 2000.

MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arquivo Instituto Biologia de São Paulo**, v.72, n.3, p.405-411, 2005.

MICHENER, C. D. **The social behavior of the bees**. Massachusetts. Harvard University Press. 404p, 1974.

MILLER, N. J.; RICE-EVANS, C. A. Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS+ radical cation assay. **Free Radical Research**, London, v.26, p.195–199, 1997.

MOREIRA, D. L.; LEITÃO, S. G.; GONÇALVES, J. L. S.; WIGG, M. D.; LEITÃO, G. G. Antioxidante and antiviral properties of *Pseudopiptadenia conferta* (Leguminosae) and quebracho (*Schinopsis* sp.) extracts. **Química Nova**, v.28, n.3, p.421-425, 2005.

MOURE, J.S.; KERR, W.E. Sugestões para a modificação da sistemática do gênero *Melipona* (Hymen. – Apoidea). **Dusenya**, v.1, n.2, p.125-131. 1950.

MUNIZ, M. P. et al. Avaliação da atividade antioxidante do extrato metanólico da própolis de abelhas sem ferrão amazônicas. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 32<sup>a</sup>. **Resumo**. Fortaleza - CE. 2009.

NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagens in food. **Journal of Nutrition**, Boca Raton, v.29, n.4, p.273-300, 1990.

NATES-PARRA, G. Las Abejas sin aguijón (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) de Colômbia. **Biota Colomb.**, v.2, n.3, p.233-248, 2001.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v.66, p.1022-1037, 2003.

NOGUEIRA NETO, P. **A criação de abelhas indígenas sem ferrão**. ed. Chácaras e Quintais. 1953. 280p.

NOGUEIRA NETO, P. **Vida e Criação de abelhas indígenas sem ferrão**. São Paulo: Nogueirapis, 1997. 445p.

OLDONI, T. L. C. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie *Apis Melífera***. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, 2007 p.37-42.

OLIVEIRA, F. A arte de manejar abelhas indígenas sem ferrão na região Amazônica. Disponível em: <<http://www.projetoiraquara.com.br/>>. Acesso em: 26 de novembro de 2009.

ORSOLIC, N.; BASIC, I. Immunomodulation by water-soluble derivative of propolis: a factor of antitumor reactivity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.84, p.265-273, 2003.

ÖZCAN, M., ÜNVER, A., CEYLAN, D. A., YETİŞİR, R. Inhibitory Effect Of Pollen And Propolis Extracts, **Nahrung - Food**, v.48, p.188 - 194, 2004.

PARK, Y. K. ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.50, n.9, p.2502-2506, 2002.

PARK, Y. K.; PAREDES-GUZMAN, J. F. AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; FUJIWARA, F. Y. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian Propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.52, n.5, p.1100-1103, 2004.

POKORNY, J. Natural antioxidant for food use. **Trends in Food Science Technology**, v.9, p.223-227, 1991.

RAMOS, A.; VISOZO, A.; PILOTO, J.; GARCIA, A.; RODRIGUES, C. A.; RIVEIRO, R. Screening of antimutagenicity via antioxidant activity in Cuban medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**. v.87, p.241-246, 2003.

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

RICE-EVANS, C., BURDON, R. Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. **Progress in Lipid Research**. Oxford, v.32, p.71-110, 1993.

ROGINSKY, V.; LISSI, E.A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, Barking, v.92, p.235-254, 2005.

ROUBIK, D. W. **Ecology and natural history of tropical bees**. New York, Cambridge University. Press.1989. 514p.

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

SAKAGAMI, S.F. Stingless Bees. In: HERMAN, H.R. (ed) **Social Insects**, v. 3. New York, Acad. Press. p.361-423, 1982.

SALOMÃO, K.; DANTAS, A. P.; BORBA, C. M.; CAMPOS, L. C.; MACHADO, D. G.; AQUINO NETO, F. R.; CASTRO, S. L. Chemical composition and microbicidal activity of extracts from Brazilian and Bulgarian propolis. **Let. Appl. Micr.**, v.38, p.87-92, 2004.

SALATINO, A. et al. Origin and chemical variation of brazilian propolis. **Journal and Oxford University Press**, 2005.

SANTOS, M. C. M. dos; MENDONÇA, S.; BASTOS, D. H. M. Avaliação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos de méis de abelhas indígenas. **(Resumo)**, 2005.

SCAZZUCHIO, F. et al. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. **Microbiological Research**, doi: 10.1016/j.micres.2005.12.003, 2005.

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

SIDDIQUI, I. R. The sugars of the honey. **Advanced Carbohydrate Chemical Biochemical**. v.25, p.285, 1970.

SILVA, T. M. S. et al. Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.19, p.507–511, 2006.

SILVA, J. K. R. **Avaliação da capacidade antioxidativa e toxicidade do óleo essencial e do extrato metanólico de *Aniba Canelilla* (HBK) Mez.** Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Pará. Belém, 2006. 91p

SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R.; ALMEIDA, E. A. B. **Abelhas brasileiras: sistemática e identificação.** Belo Horizonte. Min. Meio Ambiente/Fund. Araucária. 2002. 253p.

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

SISTEMA NERVOSO. Disponível em: <<http://www.sistemanervoso.com>>. Acesso em: 13 de janeiro de 2010.

SOUZA, L.; CAMPOS, M. J. O. Composição e diversidade de abelhas (Hymenoptera) coletadas por armadilhas Moericke em uma área agrícola de Rio Claro, Estado de São Paulo, Brasil. *Iheringia, Sér. Zool.*, v.98, n.2, p.236-243, 2008.

TOMAS-BARBERAN, F. A.; MARTOS, I.; FERRERES, F.; RADOVIC, B. S.; ANKLAM, E. HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.81, n.5, p.485-496, 2001.

TOMAS-LORENTE, F., GARCIAGRAU, M. M., NIETO, J. L., TOMAS-BARBERAN, F. A., Flavonoids from Cistus-Ladanifer bee pollen. *Phytochemistry* v.31, p.2027–2029, 1992.

THOMAZINI, M.; FRANCO, M. R. B. Metodologia para análise dos constituintes voláteis do sabor. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos* v.34, p.52-59, 2000.

TSCHOGOWADSE, SCH. K.; KOBLIANIDSE, G. L.; DEMBIZKII, A. D.; *Lebensm. Ind.* v.20, p.225.1973.

VAN STRATEN, S.; MAARSE, H.; **Volatile compounds in food**. TNO, Zeist: The Netherlands. Division for Nutrition and Food Research. 5th ed, 1983.

VELIKOVA, M. et al. Chemical composition and biological activity of propolis from Brazilian Meliponinae. *Zeitschrift für Naturforschung*, v.55, p.785-789, 2000.

VENTURIERI, G. C. **Caracterização e avaliação de abelhas indígenas e de plantas melíferas utilizadas para a produção de mel, entre os pequenos agricultores da Amazônia Oriental**. Embrapa Amazônia Oriental. Belém, 2003a. 75p.

VENTURIERI, G. C.; RAIOL, V. de F. O. PEREIRA, C. A. B. Avaliação da introdução da criação racional de *melipona fasciculata* (apidae: meliponina), entre os agricultores familiares de Bragança - PA, Brasil. 2003. *Biota Neotropica*, v.3, n.2.



VENTURIERI, G. C. et al. **Caracterização e avaliação de abelhas indígenas e de plantas milíferas utilizadas para produção de mel entre os pequenos agricultores da Amazônia Oriental**. Relatório de pesquisa. Belém: EMBRAPA. 2003. 84p.

VENTURIERI, G. C. **Meliponicultura I: Criação de Abelhas Indígenas Sem Ferrão**, Caixa Racional para Criação. Belém, PA, Embrapa Amazônia Oriental. 2003b. Rec. Téc.

VENTURIERI, G. C. **Contribuições para a Criação Racional de Meliponíneos Amazônicos**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental. 2008. Documentos, 330.

VENTURIERI, G. C. **Conservação e geração de renda: Meliponicultura entre agricultores familiares da Amazônia Oriental**. VII Encontro sobre abelhas. Ribeirão Preto: USP, 2006. Disponível em: <[www.cpatu.embrapa.br/publicacoes.../PublicacaoArquivo](http://www.cpatu.embrapa.br/publicacoes.../PublicacaoArquivo)>. Acesso em: 15/10/2009.

VILHENA, F.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. **Manual de análises físico-químicas do mel**. São Paulo: Apacame. 1999, 23p.

VILLANUEVA-G, R.; ROUBIK, D. W.; COLLI-UCÁN, W. Extinction of *Melipona beecheii* and traditional beekeeping in the Yucatán peninsula. **Bee World**, v.86 n.2, p.35-41, 2005.

WESTON, R. J.; MITCHELL, K. R.; ALLEN, K. L. Antibacterial phenolic components of New Zealand manuka honey. **Food Chemistry**, v.64, n.3, p.295-301, 1999.

YAMAGUCHI, T.; TAKAMURA, H.; MATOBA, T.; TERAU, J. HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. v.62, n.6, p.1201, 1998.

YUTING, C., RONGLIANG, Z., ZHONGJIAN, J., YONG, J. Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. **Free Radical Biology and Medicine**, v.9, p.19-21, 1990.