



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PROGRAMA PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO E  
INOVAÇÃO TECNOLÓGICA EM MEDICAMENTOS - PPgDITM

**Paulo Ricardo da Silva**

**ESTUDO QUÍMICO E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO  
MEL E GEOPRÓPOLIS COLETADOS PELA ABELHA SEM  
FERRÃO MANDAÇAIA (*MELIPONA MANDACAIA*)**

Tese apresentada a Universidade Federal Rural de Pernambuco, para a obtenção de título de Doutor no curso de Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos.

RECIFE – PE, 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
LABORATÓRIO DE BIOPROSPECÇÃO FITOQUÍMICA  
PROGRAMA PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO E  
INOVAÇÃO TECNOLÓGICA EM MEDICAMENTOS - PPgDITM

**Paulo Ricardo da Silva**

**ESTUDO QUÍMICO E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO  
MEL E GEOPRÓPOLIS COLETADOS PELA ABELHA SEM  
FERRÃO MANDAÇAIA (*MELIPONA MANDACAIA*)**

Tese apresentada a Universidade Federal Rural de Pernambuco, para a obtenção de título de Doutor no curso de Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos.

**ORIENTADORA: Profa. Dra. Tania Maria Sarmiento da Silva**

RECIFE – PE, 2015

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Tese submetida ao corpo docente do Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos da UFRPE em 17 de julho de 2015 como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Desenvolvimento e Inovação tecnológica em Medicamentos.

Aprovada:

Dra. Tania Maria Sarmiento da Silva  
UFRPE – Orientadora/Presidente

---

Dr. Kristerson Reinaldo de Luna Freire  
CBIOTEC - UFPB – Membro Titular

---

Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira  
LAFI - UFAL – Membro Titular

---

Dra. Márcia Silva do Nascimento  
Antibióticos - UFPE – Membro Titular

---

Dr. Celso de Amorim Camara  
DCM - UFRPE – Membro Titular

---

Dra. Eva Monica Sarmiento da Silva  
Zootecnia - UNIVASF – Suplente

---

Dr. Antonio Claudio da Silva  
PNPD - UFRPE – Suplente

---

ESTUDO QUÍMICO E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO MEL E GEOPRÓPOLIS  
COLETADOS PELA ABELHA SEM FERRÃO MANDAÇAIA (*MELIPONA  
MANDACAIA*)

por

Paulo Ricardo da Silva

Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Recife – 2015

Ficha catalográfica

S586e Silva, Paulo Ricardo da  
Estudo químico e potencial antioxidante do mel e  
geoprópolis coletados pela abelha sem ferrão  
mandacaia  
(*Melipona mandacaia*) / Paulo Ricardo da Silva. –  
Recife,  
2015.  
66 f. : il.

Orientadora: Tania Maria Sarmiento da Silva.  
Tese (Doutorado em Desenvolvimento e Inovação  
Tecnológica de Medicamentos) – Universidade Federal  
Rural  
de Pernambuco, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-  
Graduação,  
Recife, 2015.  
Inclui referências e apêndice(s).

1. Mel mandacaia 2. Geoprópolis mandacaia 3.  
Testes  
antioxidante 4. Testes físico-químico 5. Análise de  
fenólicos

I. Silva, Tania Maria Sarmiento da, orientadora II. Título

CDD 615

“Todos deveríamos proceder como as abelhas acercando-se de flores na vida, que são as almas nobres, extraindo de cada uma a substância dos bons exemplos, para adquirir o mel da sabedoria”.

Francisco Cândido Xavier

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço:

- A minha esposa Vilma e seu filho Higo pela compreensão e incentivo.
  
- A professora Tania Maria Sarmiento da Silva minha orientadora pela sua paciência e benevolência.
  
- Ao CENAPESQ pela estrutura técnico científica.
  
- A professora Dra. Eva Mônica Sarmiento da Silva da Universidade do Vale do São Francisco pelas amostras de mel e geoprópolis
  
- Ao professor Dr. Francisco de Assis Ribeiro dos Santos do Laboratório de Micromorfologia Vegetal, Departamento de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Botânica, UEFS pelas análises palinológicas.
  
- Ao Biofito pelo uso de sua estrutura.
  
- Ao IFPE pela liberação parcial para meus estudos de pós- graduação.
  
- Ao professor Cícero da UFRN pelas análises térmicas.
  
- Telma Maria Guedes da Silva pela ajuda nos testes antioxidantes.
  
- A todas as pessoas que diretamente ou indiretamente colaboraram com esse trabalho.

## LISTA DE ESQUEMA

**Esquema 1.** Pesos dos méis, extratos metanólicos e frações das quatro amostras de méis.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Entrada da colmeia da abelha mandaçaia.
- Figura 2.** Divisão interna da colmeia com geoprópolis.
- Figura 3.** Inflorescência da espécie vegetal *Mimosa arenosa* presente em todos os méis analisados. Foto por Maia-Silva et al, 2012.
- Figura 4.** Inflorescência da espécie vegetal *Senna*. Foto por Maia-Silva et al, 2012).



## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Pesos da geoprópolis e extrato etanólico bruto obtidos da geoprópolis.
- Tabela 2.** Pesos do extrato EtOH bruto e das frações obtidas da geoprópolis.
- Tabela 3.** Gradiente de separação utilizado no método de análise dos aminoácidos.
- Tabela 4.** Tipos polínicos mostrados no mel.
- Tabela 5.** Parâmetros físico químicos para o mel.
- Tabela 6.** Minerais presentes no mel.
- Tabela 7.** Teor de flavonoides e ácidos fenólicos no mel.
- Tabela 8.** Teor de aminoácidos no mel.
- Tabela 9.** Teor de fenólicos totais e atividade sequestradora de radical livre para o mel.
- Tabela 10.** Análise palinológica das amostras de geoprópolis.
- Tabela 11.** Derivados de ácidos presentes na geoprópolis.
- Tabela 12.** Fenólicos totais nas frações de geoprópolis.
- Tabela 13.** DPPH nas frações de geoprópolis.
- Tabela 14.** ABTS nas frações de geoprópolis.
- Tabela 15.**  $\beta$ -Caroteno (% de clareamento) nas frações de geoprópolis.
- Tabela 16.** Correlação entre DPPH, ABTS e fenólicos totais da geoprópolis.

## Resumo

A espécie de abelha sem ferrão *Melipona mandacaia* é conhecida popularmente como mandaçaia e é nativa do Nordeste brasileiro. Neste estudo foi analisado o mel e a geoprópolis da mandaçaia. Foram realizadas as análises palinológicas, físico-químicas tais como umidade, pH, acidez livre, hidroximetilfurfural, teor de cinzas, açúcares redutores e atividade de água, aminoácidos, minerais e atividade antirradicalar em quatro amostras de mel. Os principais constituintes fenólicos do mel foram extraídos e analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD). A análise palinológica mostrou que o pólen predominante nas amostras de mel foi da espécie vegetal *Mimosa arenosa* (Fabaceae/Mimosoideae), variando de 44,4% a 61,7%. Os flavonoides identificados quercetina, luteolina, kampferol e os derivados de ácido: 3,4-dihidroxibenzoico, 1,2-dihidroxibenzoico, cafeico, cinâmico e ferúlico foram quantificados. Todas as amostras de mel apresentaram os aminoácidos prolina, alanina, serina e treonina. Os minerais predominantes foram o cálcio e potássio. Todos os méis apresentaram atividade sequestradora de radical livre frente ao DPPH e ABTS. A origem botânica da geoprópolis da mandaçaia foi determinada e os compostos fenólicos foram quantificados por CLAE-DAD e a atividade antioxidante foi determinada pelos testes com DPPH, ABTS e o sistema beta caroteno/ácido linoleico. A análise palinológica das nove amostras de geoprópolis mostraram a presença de 25 tipos de pólen representando quinze famílias. O tipo polínico *Senna* (Leguminosae) foi o predominante em oito das nove amostras analisadas. Os fenólicos presentes na geoprópolis da mandaçaia foram identificados como sendo ácidos cafeico, cumárico, trans-3-hidroxicinâmico, abscísico e 4-metoxicinâmico. Todas as amostras de geoprópolis apresentaram atividade antioxidante, exceto as frações hexânicas que foram inativas para o radical livre DPPH.

## Abstract

The species of stingless bee *Melipona mandacaia* is popularly known as mandaçaia and is native to northeastern Brazil. This study analyzed honey and geopropolis of mandaçaia. For honey were carried out pollen, physical and chemical analysis such as moisture, pH, free acidity, hydroxymethylfurfural, ash content, reducing sugars and water activity, amino acids, minerals and antiradical activity of four samples of honey. The major phenolic constituents of honey were extracted and analyzed by High Performance Liquid Chromatography Efficiency coupled to the Diode Array Detector (HPLC-DAD). Pollen analysis showed that the dominant pollen in honey samples was the plant species *Mimosa arenosa* (Fabaceae / Mimosoideae) ranging from 44.4% to 61.7%. The identified flavonoids quercetin, luteolin, and kaempferol acid derivatives: 3,4-dihydroxybenzoic, 1,2-dihydroxybenzoic, caffeic, cinnamic and ferulic were quantified. All honey samples showed the amino acid proline, alanine, serine and threonine. The minerals were the predominant calcium and potassium. All honeys showed scavenging activity of free radical front to DPPH and ABTS. For geopropolis of mandaçaia was determined to botanical origin, phenolics were quantified by HPLC-DAD and the antioxidant activity was determined by testing with DPPH, ABTS and beta carotene / linoleic acid system. Pollen analysis of nine samples geopropolis showed the presence of 25 types of pollen representing fifteen families. The *Senna* species (Leguminosae) was the predominant pollen in eight of the nine samples. The phenol content in the geopropolis of mandaçaia were identified as caffeic acid, coumaric acid, trans-3-hydroxycinnamic acid, 4-methoxycinnamic acid and abscisic. All samples geopropolis showed antioxidant activity, except hexanic fractions that have been inactive for the free radical DPPH.

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	21
2.1.	OBJETIVO GERAL.....	21
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
<b>3.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	21
3.1.	EQUIPAMENTOS E REAGENTES.....	21
3.2.	COLETA DAS AMOSTRAS.....	24
3.3.	ANÁLISES PALINOLÓGICAS E MELISSOPALINOLÓGICAS	24
3.4.	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO MEL.....	25
3.4.1.	Umidade.....	25
3.4.2.	Ph.....	26
3.4.3.	Condutividade.....	27
3.4.4.	Acidez livre.....	27
3.4.5.	Hidroximetilfurfural (HMF).....	27
3.4.6.	Teor de cinzas.....	28
3.4.7.	Açúcares redutores.....	28
3.4.8.	Atividade de água.....	29
3.4.9.	Análise de metais .....	29
3.5.	EXTRAÇÃO DE FENÓLICOS DO MEL UTILIZANDO A RESINA XAD-2.....	30
3.6.	EXTRAÇÃO DE FENÓLICOS NA GEOPRÓPOLIS.....	31
3.7.	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS NAS AMOSTRAS DE MEL E GEOPRÓPOLIS.....	32
3.8.	ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS DO MEL POR CLAE-DAD.....	33
3.9.	ANÁLISE DE FLAVONOIDES E ÁCIDOS FENÓLICOS NO MEL E GEOPRÓPOLIS POR CLAE-DAD.....	34
3.10.	TESTES ANTIOXIDANTES.....	35
3.10.1.	Atividade sequestradora de radicais livres com DPPH •.....	35
3.10.2.	Teste de descoloração do ABTS • <sup>+</sup> .....	35
3.11.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	36
4.1.	AMOSTRAS DE MEL.....	36
4.1.1.	Análise melissopalínológica.....	36
4.1.2.	Análises físico-químicas.....	39

4.1.3.	Análise de minerais nas amostras do mel.....	43
4.1.4.	Análise de flavonoides e ácidos fenólicos no mel por CLAE-DAD	44
4.1.5.	Análise de aminoácidos no mel por CLAE-DAD....	45
4.1.6.	Determinação do teor de fenólicos totais e potencial antioxidante do mel.....	45
4.2.	AMOSTRAS DE GEOPRÓPOLIS.....	46
4.2.1.	Análise palinológica.....	46
4.2.2.	Análise de ácidos fenólicos na geoprópolis por CLAE-DAD.....	49
4.2.3.	Teor de fenólicos totais e potencial antioxidante da geoprópolis..	50
5.	<b>CONCLUSÕES.....</b>	52
6.	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	53
7.	<b>ANEXOS.....</b>	67

## 1. INTRODUÇÃO

As abelhas sem ferrão são altamente diversificadas na região neotropical, com aproximadamente 43 gêneros e aproximadamente 350 espécies que estão sendo identificadas (Michener 2007). Estas abelhas desempenham um papel importante na caatinga, atuando como polinizadores específicos para esse bioma (Heard 1999). São conhecidas duas espécies de abelha popularmente chamadas de mandaçaia: (1) a *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepeletier, 1836, que não é encontrada nas localidades próximas às margens do Rio São Francisco e (2) a *Melipona mandacaia* Smith, 1863 esta espécie é endêmica para a caatinga e são generalizadas nos estados do Piauí, Ceará, Bahia, Paraíba e Pernambuco, normalmente encontrada perto do Rio São Francisco, Vaza Barris e suas áreas de influência (Batalha-Filho *et al.*, 2011). Essas abelhas são muito importantes e eficientes na polinização de muitas plantas da caatinga (p.ex., jurema - *Mimosa tenuiflora*). Como esses insetos são alados, isto lhes dá grande mobilidade e lhes permite a passagem de uma flor à outra, ou de uma planta a outra, com extrema rapidez (Pesson & Louveaux, 1984). e produzem um mel muito saboroso e de grande valor comercial.

A mandaçaia já foi muito abundante, mas atualmente é rara em algumas localidades do semi-árido baiano. Acredita-se que isso acontece principalmente devido à carência de árvores que formam ocos adequados na sua madeira para nidificação da mandaçaia como, por exemplo, quixabeira (*Syderoxylon obtusifolium*), juazeiro (*Zizyphus joazeiro*), pau ferro (*Caesalpinia férrea*), baraúna (*Schinopsis brasiliensis*) e umburana (*Commiphora leptophloeos*). Essas árvores são cortadas para serem usadas na construção de cercas e como lenha em olarias (Neves, 2006). A *Melipona mandacaia* utiliza diversos materiais para a construção e proteção dos seus ninhos contra inimigos, tais como resinas, cera e barro. A coleta de barro por esta espécie foi verificada, sendo este material utilizado principalmente para fechar as aberturas, na construção da entrada (Figura 1.), e do batume divisório misturado com resinas e própolis formando a geoprópolis.



**Figura 1.** Entrada da colmeia da abelha mandaçaia.

A geoprópolis da mandaçaia é de consistência dura e coloração vermelha, característica do barro da região. Nesta mistura é possível distinguir facilmente os constituintes resina e barro, o que é confirmado quando da manipulação da geoprópolis no preparo do extrato por criadores. As meliponas coletam barro com a finalidade de construir o batume divisório (Figura 2.) e que às vezes este pode ser crivado (perfurado) (Nogueira-Neto, 1948) Outro aspecto interessante é a utilização da geoprópolis pelas abelhas para a mumificação de inimigos ou de competidores por espaço, como os coleópteros, que nidificam na madeira (Alves *et al.*, 2007).



**Figura 2.** Divisão interna da colmeia com geoprópolis.

O Brasil possui indubitavelmente uma grande biodiversidade, e é também plausível especular que, devido ao maior estresse hídrico presente

nas espécies vegetais do semi-árido nordestino, a concentração de compostos fenólicos antioxidantes em suas espécies vegetais seja maior, haja vista que o estresse hídrico é comprovadamente um fator que contribui para que a planta aumente a síntese destes constituintes (Moltiva *et al.*, 2000). Antioxidante é "qualquer substância que atrasa, impede ou remove danos oxidativo a uma molécula alvo" (Erejuwa *et al.*, 2012). Além disso, o perfil fenólico de méis e, conseqüentemente, suas propriedades antioxidantes dependem das fontes florais usadas para coletar as substâncias necessárias a produção do mel pelas abelhas.

O mel das espécies meliponas tem várias características únicas em sua composição que diferem de outros méis, especialmente o teor de água (umidade), que o torna menos denso do que o mel de abelhas do gênero *Apis*. A cor varia de quase transparente para âmbar escuro, e os níveis de açúcar dependem da espécie, da região e especialmente das espécies vegetais. Além dos açúcares na solução, o mel de meliponas também contém ácidos orgânicos, flavonoides e uma ampla variedade de outros compostos orgânicos que contribuem para a sua cor, odor e sabor (Silva *et al.*, 2013, Almeida-Silva *et al.*, 2013). A demanda por este produto tem aumentado recentemente, elevando seu valor comercial, superando o mel da *Apis mellifera*. No entanto, não houve quaisquer estudos para quantificar os ácidos orgânicos, flavonoides, aminoácidos, minerais e atividade antioxidante do mel da mandacaia.

A atividade antioxidante nos produtos apícolas/meliponícolas é o resultado da presença de diversos constituintes em sua composição, incluindo proteínas, constituintes fenólicos, ácidos orgânicos e enzimas (Gheldolf, 2002). Os constituintes fenólicos merecem destaque, devido à variedade de atividades biológicas descritas para esta classe de substâncias, tais como antiviral, anti-inflamatória, anticâncer, entre outras (Ferreira *et al.*, 2005).

Os métodos para determinação da atividade antioxidante em alimentos e suplementos alimentares são bastante variados. Uma preocupação recente tem sido a padronização das condições experimentais em que estes métodos são aplicados, com vistas a possibilitar a comparação dos resultados publicados na literatura (Prior *et al.*, 2005, Beretta *et al.*, 2005). A atividade antioxidante é influenciada por diversos fatores extrínsecos a sua composição, incluindo o processamento, temperatura e outras condições de armazenamento



(Sgherri *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2004). Estes fatores devem, portanto ser levados em conta em todas as etapas da cadeia produtiva para que o mesmo possa conservar suas propriedades antioxidantes. Em relação aos produtos apícolas/meliponícolas brasileiros, os estudos praticamente não existem especialmente aqueles voltados para a obtenção de dados comparativos de méis de diferentes origens florais.

O perfil de fenólicos nos méis, e, conseqüentemente, a sua capacidade antioxidante, dependem das fontes florais utilizadas para produzir o mel. A predominância de uma fonte floral especial no mel é influenciada principalmente por fatores geográficos, sazonais e ambientais (Andrade *et al.*, 1997;. Silva *et al.*, 2013). Portanto, diferentes propriedades de méis são esperadas porque a composição dos compostos ativos no mel a partir de diferentes locais é susceptível de ser diferente.

A análise dos constituintes fenólicos dos produtos da mandaçaia pode ser feita via CLAE-DAD. O uso dessa técnica na análise dos produtos apícolas/meliponícolas é muito ampla, refletindo a grande versatilidade desta técnica analítica em função dos seus vários modos de detecção e mecanismos físico-químicos de separação.

Nos últimos anos, estudos das geoprópolis produzidas pelas abelhas meliponas revelaram a presença de benzofenonas preniladas, compostos fenólicos (Bankova *et al.*, 2000; Tomás-Barberán *et al.*, 1993; Souza *et al.*, 2014; Dutra *et al.*, 2014), di e triterpenos e ácido gálico (Velikova *et al.*, 2000). Além disso, as amostras de geoprópolis exibiram atividade antimicrobiana, bem como propriedades antioxidante (Dutra *et al.*, 2014; Souza *et al.*, 2014), anti-inflamatórias, anti-proliferativos e antinociceptivas (Franchin *et al.*, 2012;. Cunha *et al.*, 2013). As propriedades antioxidantes da geoprópolis, devido à sua alta concentração em fenóis e outros compostos antioxidantes (Souza *et al.*, 2014; Dutra *et al.*, 2014), apoia o seu uso na prevenção de doenças degenerativas crônicas.

O Brasil, depois da China, Espanha, Austrália, Argentina e Suíça é o sexto maior exportador de produtos apícolas do mundo (Yang *et al.*, 2013; Estevinho *et al.*, 2012). A destacada presença do Nordeste na exportação de mel foi resultado especialmente do incremento da produção familiar com o apoio institucional (Banco do Nordeste, Banco do Brasil e CNPq), fato que tem

mudado a realidade socioeconômica da população das regiões produtoras, em grande parte, localizadas em área de pobreza destacada. Mas o mel não é o único produto das abelhas a ter impacto na economia, o pólen que as abelhas coletam das flores é outro importante produto comercializável, além da geoprópolis. Para as abelhas o pólen constitui uma fonte de proteína (10-36%), sais minerais, vitaminas e enzimas e também é rico em açúcares (15-43%) (Santos *et al.*, 2006).

No livro da série de documentos do ETENE: Apicultura nordestina: principais mercados, riscos e oportunidades, pag. 29, claramente esta expressa a preocupação do banco do Nordeste quanto à certificação dos produtos apícolas/meliponícolas, onde se ressalta a importância à realização de pesquisas voltadas para o ponto “tecnologias para a exploração de outros produtos apícolas que não o mel, estudo sobre as propriedades do mel de abelhas nativas”, (Neto *et al.*, 2006).

A apicultura/Meliponicultura é uma das poucas atividades agropecuárias que atende aos três requisitos da sustentabilidade: o econômico, o social e o ecológico. Sendo assim, fornece renda para o apicultor/meliponicultor, ocupa mão de obra familiar ou contratada e contribui para a preservação da flora nativa, pois é dela que são extraídos o néctar e o pólen, componentes essenciais para a vida das colmeias (Neto *et al.*, 2006). É hoje considerada uma das mais importantes vertentes da agricultura familiar, proporcionando o aumento de renda, através da oportunidade de aproveitamento da capacidade produtiva do meio ambiente com a exploração de sua potencialidade natural.

O Nordeste brasileiro possui um dos maiores potenciais apícolas/meliponícolas do mundo, sendo que alguns estados também vocacionados para a produção de geleia real, própolis, pólen, cera e apitoxina, produtos que podem atingir preços superiores ao do próprio mel. A região também é uma das poucas do mundo com possibilidade de produzir o mel, pólen e geoprópolis em grande quantidade, devido à grande diversidade florística e de microclimas, aliados às vastas extensões ainda inexploradas e isentas de atividade agropecuária tecnificada, além disso, à existência de extensas áreas onde não se utilizam agrotóxicos nas lavouras, fazem dessa região a de maior potencial para a produção de produtos meliponícolas

orgânicos em todo o mundo (Morgano *et al.*, 2012), produto este que é bastante procurado e valorizado no mercado internacional.

Na região semiárida a atividade apícola/melipônica aproveita justamente as características locais: vegetação nativa diversificada, com pouca necessidade de água, e floradas o ano todo. Em seus primórdios, a apicultura/meliponicultura com uma produção artesanal e rudimentar, baseada em uma mão de obra em sua maioria desqualificada, e utilizando equipamentos de baixa qualidade, não atendia às necessidades e exigências sanitárias da legislação (Brasil, 2007), inviabilizando a expansão das atividades e comprometendo sua rentabilidade. A necessidade de expansão de novos mercados e a exigência cada vez maior das agências reguladoras exigiu uma maior preocupação com as tecnologias de produção, análise e caracterização do produto.

A renda gerada pela apicultura/meliponicultura é, sabidamente, maior e mais segura do que a das outras culturas (Neto *et al.*, 2006), tendo em vista o crescimento do mercado dos produtos orgânicos e os bons preços oferecidos aos produtos apícolas/melipônicas, em virtude de suas conhecidas propriedades alimentícias e terapêuticas. Além disso, é uma atividade agrícola com baixa dependência das chuvas. Em uma área extremamente carente de atividades geradoras de ocupação e renda para os seus habitantes, o semi-árido apresenta períodos de estiagem em determinadas épocas do ano que são importantes aliados dessa atividade, favorecendo o desabrochar das flores de importantes plantas melíferas, como o marmeleiro, a aroeira, o juazeiro, o cajueiro, entre outras.

Estudos indicam que os produtos produzidos destas fontes são aptos a receber o selo de qualidade, como produto orgânico (Neto *et al.*, 2006), por serem de origem de plantas silvestres, isentas de contaminação com agrotóxicos, sendo produzido por abelhas sadias, que não demandavam a utilização de antibióticos para o combate a doenças. O cenário de crescimento com rapidez e a magnitude econômica dessa atividade elevou significativamente a sua importância socioeconômica, estimulando os governos estaduais e o governo federal, a demonstrar preocupação em apoiar a atividade e seus integrantes, por intermédio de várias políticas públicas nesta área. Atualmente uma grande gama de produtos derivados da

apicultura/meliponicultura tem uma grande procura nos mercados internacionais.

Neste sentido, a caracterização físico-química e a determinação da atividade antioxidante serão fundamentais para definir o seu potencial como alimento funcional e nutricional. O Brasil é visto na comunidade internacional como um celeiro de espécies vegetais, animais, e notadamente rico em diversidade genética, apresenta um enorme potencial para consolidar-se neste mercado através da implantação de seus produtos que englobariam todas estas características. Para tanto, é necessário um estudo de caráter científico e tecnológico, visando identificar características próprias do produto, traduza nele homogeneidade de produção e identificação de procedência, e, se possível, atribuindo e consolidando características benéficas tanto do ponto de vista alimentar quanto da saúde dos consumidores.

Como dito anteriormente, muitas doenças crônico degenerativas envolvem dano oxidativo das células ou componentes celulares, e tem sido mostrado que muitos constituintes presentes na dieta podem prevenir o dano oxidativo e serem assim utilizadas como terapia complementar. Desta maneira, o presente trabalho se caracteriza como início para a determinação de características químicas, farmacológicas e nutricionais para importantes e essenciais para esses produtos, com vantagens do ponto de vista de sua aceitação de mercado alicerçado em análises científicas que efetivamente comprovem sua utilização como alimento nutricional e funcional. Este trabalho visa agregar valor aos produtos da mandaçaia, identificando a origem vegetal, suas potencialidades econômicas e equiparando o valor alimentar e nutricional.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Analisar a composição química e físico-químicas do mel e o perfil dos fenólicos totais e potencial antioxidante da geoprópolis e mel da mandaçaia (*Melipona mandacaia*)

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Determinar a origem botânica do mel e geoprópolis da mandaçaia.

Avaliar a composição, concentração dos fenólicos por CLAE-DAD e atividade antirradicalar do mel da mandaçaia.

Determinar a concentração dos fenólicos totais e potencial antioxidante da geoprópolis da mandaçaia.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. EQUIPAMENTOS E REAGENTES**

Para os testes físico-químicos foram utilizados, balança analítica (AW220, Shimadzu, Kyoto, Japan), Refratômetro IonLab, Estufa (TE 393/2-MP Tecnal, São Paulo, Brasil), microondas (Mars Xpress, CEM, Matthews, NC, EUA), Termoanalisador (TGA-50 Shimadzu, Kyoto, Japan), Karl Fischer (Coloumétrico modelo C20 da Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland), pHmetro (913 da Metrohm, Herisau, Switzerland), Condutivímetro (Tec - 4MP da Tecnal, São Paulo, Brasil), Espectrofotômetro UV-Visível (GENESIS 10S da Thermo Scientific, CA, USA), mufla por microondas (MFL 1000 da Provecto Analítica, São Paulo, Brasil), e equipamento medidor da atividade de água (AquaLab 4TE, Decagon Devices, WA, USA). Para estas análises os solventes e reagentes utilizados foram: éter etílico, metanol e formamida (Cinética, São Paulo, Brasil), hidróxido de sódio (Dinâmica, São Paulo, Brasil), ferrocianeto de potássio, sulfato de zinco, azul de metileno, sulfato de cálcio, sulfato de cobre(II), dióxido de selênio, sulfato de potássio, ácido bórico (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), tartarato de sódio e potássio (Petroquímicos, Rio de Janeiro, Brasil), ácido clorídrico, ácido sulfúrico (Merck, Darmstadt, Alemanha), fenolftaleína, vermelho de metila, verde de bromocresol (Synth, Diadema, Brasil), solução de Karl Fisher coloumétrico (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland).

A análise dos minerais foi feita em espectrômetro de absorção atômica sequencial com atomização em chama (AA240FS – Fast Sequential, Varian, Mulgrave, Austrália), com correção da radiação de fundo feita por lâmpada de deutério. Lâmpadas de cátodo oco foram utilizadas como fontes de radiação

primária para cada mineral e a chama ar/acetileno foi utilizada em todos os experimentos. Soluções padrão a 1000 ppm dos minerais Cálcio (Ca), Cobre (Cu), Ferro (Fe), Potássio (K), Manganês (Mn), Sódio (Na), Zinco (Zn) e Cádmi (Cd) (Qhemis-Hexis, São Paulo, Brasil) foram utilizados para obtenção das curvas padrão. Ácido nítrico (Merck, Darmstadt, Alemanha) foi utilizado para digestão das amostras, realizada em microondas (Mars Xpress, CEM, Matthews, NC, EUA).

A leitura de absorvância para determinação das atividades antirradicais foi realizada no aparelho (Asys HiTech UVM 340, Biochrom, EUA), utilizando placa de 96 poços. Para determinação atividade antioxidante frente ao sistema ácido linoleico/ $\beta$ -caroteno, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV-visível (LAMBDA 45 UV/Visível, Perkin Elmer, São Paulo, Brasil). Foram utilizados os seguintes reagentes: Folin-Ciocalteu, DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), *trans*- $\beta$ -caroteno, Trolox (6-hidroxi-2, 5, 7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico 97%), ABTS [2,2'-azinobis- (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) sal de diamônio 98%], ácido gálico, ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, Sternheim, Alemanha), carbonato de sódio, persulfato de potássio (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), ácido linoleico (Fluka, Rio de Janeiro Brasil) e tween 20 (Monopalmitato de polioxietileno sorbitan) (Dinâmica, Rio de Janeiro, Brasil),  $\beta$ -caroteno tipo I sintético (Sigma Aldrich), ácido linoléico (Fluka) e Tween 20 (atividade com o sistema  $\beta$ -caroteno / ácido linoléico).

A análise cromatográfica em coluna (CC) foi realizada tendo como suporte Sephadex LH-20 (Amersham Biosciences, Suécia) ou resina Amberlite XAD-2 (Sigma Aldrich). Para Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA) foram usadas cromatofolhas de sílica gel 60F<sub>254</sub> (Merck, Darmstadt, Alemanha) e como reveladores foram utilizados, o reagente NP (ácido difenilbórico etanolamina-MeOH) e detecção por irradiação ultravioleta 254 e 366 nm (LUB01, Boitton, Porto Alegre, Brasil). Para a extração em fase sólida foi utilizado cartuchos Strata C<sub>18</sub>-E (Phenomenex-Allcrom, São Paulo, Brasil). Foi utilizado o solvente etanol (EtOH), (Cinética, São Paulo, Brasil), metanol (MeOH) (J.T.Baker, Phillipsburger, EUA), água deionizada por osmose reversa, acetato de etila (AcOEt) (Dinâmica, São Paulo, Brasil), *n*-butanol (Tedia, Rio de

Janeiro, Brasil), e banho ultrassônico 3,5 L (Unic 1600A, Unique, São Paulo, Brasil) para extração do geopropolis.

Para as análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizou-se o cromatógrafo líquido (Shimadzu Prominence LC-20AT, Shimadzu, Kyoto, Japan), constituído por duas bombas LC-6AT, degaseificador DGU-20As, forno de coluna CTO-20AC, detector de arranjo diodos (DAD) SPDM-20A, injetor manual Rheodyne 7125i, com um loop 20 µl, ou autoinjeter (SIL-20A) e módulo de comunicação CBM-20A, controlado pelo software LcSolution. Foram usados filtros de membrana Millipore com poros de 0,45 µm de diâmetro (Supelco) para filtração das amostras e dos solventes: Metanol, (J.T.Baker, Phillipsburger, EUA), acetonitrila, (Merck, Darmstadt, Alemanha), tampão (Waters AccQ-Tag, Milford, EUA) e água Mili-Q (Millipore, EUA). O ácido fórmico (Tedia, Brasil) foi utilizado para o preparo de soluções acidificadas. Os padrões de aminoácidos foram adquiridos no kit Waters AccQ-Tag, que estavam em mistura de aminoácidos hidrolisados. Para a análise dos flavonoides do mel foi feita com uma coluna C-18 SULPELCO 5µm 100 x 4,0 mm e fluxo de 1mL/minuto. A fase móvel usado foi água: ácido fórmico 99:1 (solvente A) e MeOH (Solvente B), 0-5min 40% B, 5-15 min. 45% B, 15-17 min. 45% B, 17-25 min. 50% B, 25-27 min. 50% B, 27-35 min. 55% B, 35-37min. 55% B, 37-40 min. 70% B e 50 min. fim. Para monitoramento foi utilizado o comprimento de onda de 320 nm e temperatura 30°C e para as análises dos ácidos fenólicos no mel foi feita com uma coluna C-18 SULPELCO 5µm 100 x 4,0 mm e fluxo de 1mL/minuto. A fase móvel usada foi água: ácido fórmico 95:5 (solvente A) e MeOH (Solvente B), 0 min. 20% B, 0-15 min. 30% B, 15-20 min. 30% B, 20-30 min. 40% B, 30-0 min. 100% B e 55 min. fim. Para monitoramento foi utilizado o comprimento de onda de 290 nm e temperatura 30°C. Para a análise de flavonoides na geoprópolis foi feita com a coluna LC-18 Rexchrom (15 centímetros x 4,6 milímetros) e uma pré-coluna C-18, Shimadzu ODS. A fase móvel usado foi água: ácido fórmico 99:1 (solvente A) e MeOH (Solvente B), 0,01-3 min 40% de B, 5-15 min 45% B, 17-25 min 50% de B, 27-35 min 55% de B e 40 min 40% B. Para monitoramento foi utilizado o comprimento de onda de 320 nm e temperatura 30°C e para as análises dos ácidos fenólicos na geoprópolis foi feita com uma coluna Shimadzu LC-18 (25 cm x 4,6 milímetros) e fluxo de 1mL/minuto A fase móvel usada foi água: ácido

fórmico 95:5 (solvente A) e MeOH (Solvente B), 0,01-15% de B 20-30 min, 15-20 min 30% de B, 20-30 min 30-40% B e 40-50 min 100% de B. Para monitoramento foi utilizado o comprimento de onda de 290 nm e temperatura 30°C.

### 3.2. COLETA DAS AMOSTRAS

Quatro amostras de mel foram coletadas no segundo semestre de 2010 na região do Rio São Francisco, nos estados da Bahia e Pernambuco, nas cidades de Petrolina e Juazeiro por meliponicultores e pela professora Dra. Eva Mônica Sarmiento da Silva, colegiado de zootecnia, Universidade do Vale de São Francisco (UNIVASF). As amostras foram acondicionadas em frascos plásticos e mantidas a 4 °C até o momento das análises.

Nove amostras de geoprópolis também foram coletadas na mesma regiões do semi-árido nos estados da Bahia e Pernambuco. As amostras 1 (março de 2012), 3, 4 e 5 (abril de 2012) foram coletados no município de Juazeiro, Bahia, e as amostras 2 (Abril de 2012), 6 (Março de 2013), 7 (maio de 2013), 8 (junho 2013 ) e 9 (Outubro de 2013) foram coletados no campus da (UNIVASF), Petrolina, Pernambuco, por meliponicultores e pela professora Dra. Eva Mônica Sarmiento da Silva, colegiado de zootecnia da UNIVASF. As amostras foram mantidas a 4°C até o momento das análises.

### 3.3. ANÁLISES PALINOLÓGICAS E MELISSOPALINOLÓGICAS

As análises foram realizadas pela equipe sob a orientação do prof. Dr. Francisco de Assis Ribeiro dos Santos, Laboratório de Micromorfologia Vegetal, Departamento de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Botânica, UEFS. A análise palinológica seguiu a metodologia de Louveaux (1978) com modificações de Iwama & Melhem (1979) e a acetólise foi de acordo com Erdtman (1960) e foram tratadas usando métodos melissopalínológicos típicos (Louveaux *et al.*, 1978). Para as amostras da geoprópolis seguiu-se a metodologia de Matos *et al.* (2014). Os tipos polínicos foram distribuídos em quatro classes com percentuais, como determinado por Louveaux *et al.* (1978): pólen predominante (> 45%); pólen secundário (≤45%



a > 15%); pólen menos importante ( $\leq 15\%$  para  $\geq 3\%$ ) e pólen menor (<3%). Os tipos polínicos foram comparadas com as lâminas da Palinoteca da Universidade Estadual de Feira de Santana (Bahia, Brasil) e catálogos de pólen.

### 3.4. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO MEL

As análises físico-químicas realizadas para as amostras do mel foram: umidade (g/100g de mel), pH, condutividade ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ), acidez livre (mequiv./Kg de mel), HMF (mg/Kg de mel), teor de cinzas (g/100g de mel), açúcares redutores (g/100g de mel) e atividade de água de acordo com Vilhena & Almeida-Muradian (1999) e (ZENEBO, 2008).

#### 3.4.1. Umidade

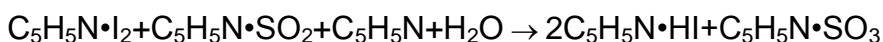
A umidade foi determinada pelos métodos descritos a seguir. O método refratômetro consiste na determinação do índice de refração do mel a 20 °C que é convertido para o conteúdo de umidade através de uma tabela de referência que fornece a concentração como uma função do índice de refração. Para esta análise foram pesados 5g de mel e colocados no refratômetro sendo anotado o valor dado chamado de índice de refração. Com o índice de refração e auxiliado pela Tabela de Chataway, calculou-se a umidade do mel. As medições do índice de refração são freqüentemente utilizadas para a determinação do teor de água no mel (Zenebon, 2008).

Para o método estufa foi pesado 1g de mel e aquecido a 105° C até peso constante. Para facilitar a evaporação da água a amostra foi distribuída uniformemente em um papel de filtro previamente seco e tarado.

O método de microondas emprega a radiação eletromagnética que se baseia no fato das moléculas de água serem dipolos elétricos naturais, os quais sofrem rotação quando expostos a um campo eletromagnético (Tavares *et al.*, (2008), o atrito molecular resultante gera calor instantâneo e de modo uniforme. A amostra (1 g) foi colocada em um digestor por microondas e distribuída uniformemente em um papel de filtro previamente seco e tarado. A potência utilizada foi de 800W e fixou-se a temperatura em 105°C, até peso constante.

O método termogravimétrico monitora a variação da massa de uma amostra em função da temperatura ou do tempo em um ambiente de temperatura e atmosfera controladas. Foi utilizado Termoanalisador e um cadinho de platina. Foram colocados 20 mg de mel, iniciando a temperatura de 50°C até 800°C com um taxa de aquecimento de 2°C/min.

O Método via Karl Fischer se baseia na reação abaixo:



Onde existe um excesso de SO<sub>2</sub> e piridina em metanol anidro, sendo a quantidade de água da amostra proporcional a quantidade de iodo consumido. Foi utilizado o titulador coulométrico onde uma corrente elétrica é usada para gerar a quantidade de iodo estequiometricamente correspondente, através do iodeto contido no reagente por eletrólise. Como o iodo é gerado eletroliticamente através do iodeto na solução, isso significa que a determinação coulométrica de água é um método absoluto. Como no caso do mel, a elevada viscosidade pode afetar a transferência de água para o solvente de titulação. Para diluição do mel (100 mg) foi utilizada uma mistura de metanol:formamida (1:1) em temperatura ambiente. O branco foi feito com a mistura de diluição para eliminar interferentes (Sanchez *et al.*, (2010).

#### 3.4.2. pH

O pH foi determinado pelo método potenciométrico, este método baseia-se na formação de um potencial elétrico através da parede de um eletrodo de vidro seletivo ao íon hidrogênio. Desta forma, o eletrodo mede a diferença de potencial decorrente de um potencial de difusão do íon hidrogênio, devido ao fato de existir uma diferença na concentração hidrogeniônica entre o interior do eletrodo (solução KCl 3M) e a solução onde o pH está sendo medido. Foi utilizado o pHmetro e para calibração usou-se uma solução tampão padrão pH = 7,0 e 2,0. Para a determinação do pH foi usada uma solução 20% peso/volume de massa seca da amostra de mel (Zenebon, 2008).

#### 3.4.3. Condutividade

Para a determinação da condutividade foi usada uma solução de 20%

peso/volume de massa seca da amostra de mel (Zenebon, 2008). Para medição foi utilizado um eletrodo de platina previamente calibrado com uma solução padrão de 146,9  $\mu\text{S}/\text{cm}$ .

#### 3.4.4. Acidez livre

A amostra de mel (10g) foi diluída em 75mL de água livre de  $\text{CO}_2$  e titulada com hidróxido de sódio 0,05N a 5mL por minuto até pH 8,5 (Zenebon, 2008). A calibração foi feita com uma solução tampão padrão pH = 7,0 e pH = 10,0. Para o cálculo da acidez livre foi utilizado a fórmula:

$$\frac{(V-V_b) \times 50 \times f}{P} = \text{acidez livre, em miliequivalentes por Kg}$$

V= volume de NaOH 0,05N gasto na amostra.

$V_b$  = volume de NaOH 0,05N gasto no branco.

f= fator da solução de NaOH 0,05N.

P= peso da amostra em g.

#### 3.4.5. Hidroximetilfurfural (HMF)

O mel (5 g) foi colocado em um balão volumétrico de 50 mL e adicionado 0,5 mL da solução de Carrez I (15 g de ferrocianeto de potássio  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  em 100 mL de água) e 0,5 mL da solução de Carrez II [30 g de acetato de zinco  $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  em 100 mL de água] e o volume foi completado com água. A solução foi filtrada sendo descartado os primeiros 10 mL e 5 mL foram transferidos para dois tubos de ensaio. Foram adicionados 5 mL de água em um dos tubos (amostra) e 5 mL de solução de bissulfito de sódio 0,2% no outro (referência). Os tubos de ensaio foram sonicados por 5 minutos e em seguida foram feitas leituras em um espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 284 e 336 nm (Zenebon, 2008).

$$\frac{(A_{284} - A_{336}) \times 149,7 \times m}{P} = \text{HMP mg/kg}$$

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

$A_{336}$  = leitura da absorvância em 336

P = massa da amostra em g

m = massa nominal da amostra

#### 3.4.6. Teor de cinzas

A amostra do mel (5g) foi transferida para um cadinho tarado e em seguida foi aquecido em placa aquecedora até a carbonização, depois levado para uma mufla aquecida a 600°C permanecendo por 5 horas (Zenebon, 2008).

$$\frac{n \times 100}{m} = \% \text{ cinzas}$$

n=massas em gramas das cinzas  
m=massa em gramas da amostra

#### 3.4.7. Açúcares redutores

O método de determinação de açúcares é baseado nas propriedades físicas das suas soluções ou no poder redutor dos açúcares mais simples (aos quais se pode chegar por hidrólise, no caso dos mais complexos). O método de redução resume-se em pesar ou titular a quantidade de óxido cuproso ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ) precipitado de uma solução de íons de  $\text{Cu}^{+2}$  por um volume conhecido da solução de açúcares ou medir o volume da solução de açúcares necessário para reduzir completamente um volume conhecido da solução de  $\text{Cu}^{+2}$ . Os resultados serão calculados mediante fatores e, geralmente, as determinações dos açúcares redutores são calculadas em glicose e as dos não redutores em sacarose (Zenebon, 2008).

A amostra de mel (2,5 g) foi dissolvida em água e transferida para um balão volumétrico de 500 mL. Pipetou-se 5 mL da solução de Fehling A (69,28 g de sulfato de cobre  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  e água em um balão volumétrico de 1 L) e 5 mL da solução de Fehling B (346 g de tartarato sódico e potássio- $\text{KNa}(\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6) \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  e 100 g de NaOH com água em um balão volumétrico de 1L) para um balão de fundo chato de 250 mL e foram adicionados 7 mL de água. 15 mL da solução de mel diluída foram colocadas em um balão de fundo chato e aqueceu-se por 2 minutos. Adicionou-se 1 mL de solução de azul de metileno (2 g de azul de metileno diluída em água para 1 L) enquanto ainda em ebulição e completou-se a titulação, dentro de um tempo total de ebulição de 3

minutos, adicionando gota a gota a solução diluída de mel até a descoloração do indicador (Zenebon, 2008).

$$\frac{2 \times 1000}{P \times V} = \text{açúcares redutores g/100 g}$$

P=massa de amostra em g

V=mL da solução amostra gasto na titulação

#### 3.4.8. Atividade de água

A melhor medida da concentração de água, em termos de propriedades físico-químicas, refere-se à medição de sua atividade de água ( $a_w$ ), ou seja, medição do teor de água livre no produto. A água pode ocorrer como água ligada e água livre, resultando em conteúdo total de água (umidade). O acondicionamento de um líquido em ambiente fechado permite a evaporação deste até determinado ponto de equilíbrio, onde, a partir de então, passa a ocorrer o fenômeno de compensação, ou seja, para cada molécula de água que evapora há uma que condensa, sendo denominado, este fenômeno, de pressão de vapor. A atividade da água define-se como a relação existente entre a pressão de vapor de uma solução ou de um alimento (P) com relação à pressão de vapor da água pura ( $P_o$ ) à mesma temperatura (Al-Habsi, 2012).

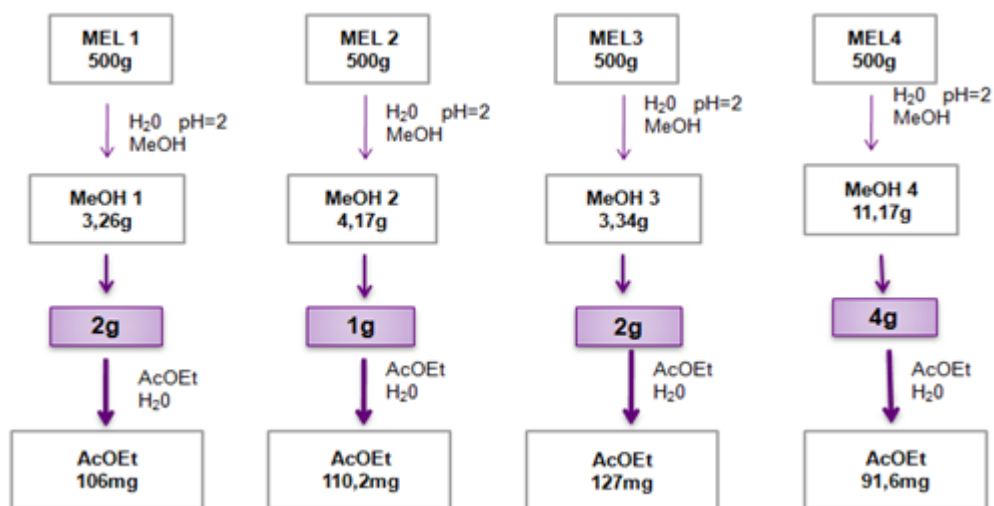
$$a_w = P / P_o$$

#### 3.4.9. Análise de metais

Os metais analisados foram magnésio, cobre, ferro, potássio, manganês, cádmio, zinco, sódio e cálcio. As amostras foram digeridas em digestor de amostras por microondas com controle de temperatura. Em 500 mg da amostra foram adicionado 5 mL de ácido nítrico concentrado, utilizando o seguinte método: 800W por 5 minutos com temperatura limitada a 120 °C, 5 minutos a 800W com temperatura limitada a 160°C e resfriado por 20 minutos, em seguida as amostras foram diluídas para 25 mL com água ultra pura e analisadas por absorção atômica utilizando lâmpadas de catodo oco individuais e padrões certificados.

### 3.5. EXTRAÇÃO DE FENÓLICOS DO MEL UTILIZANDO A RESINA XAD-2

As 4 amostras foram extraídas de acordo com Yao *et al.* (2003). Posteriormente 50g (10x) de mel foram dissolvidos em 250mL de água destilada e acidificada até pH=2 com ácido clorídrico concentrado. Nesta solução do mel foram adicionados 150 g da resina Amberlite XAD-2 e colocado em um agitador magnético por 30 minutos. Após este tempo a solução foi colocada em uma coluna de vidro e lavada 3 vezes com água destilada (100mL cada) para remoção de açúcares e constituintes polares. Em seguida a mistura foi eluída 3 vezes com metanol (100 mL cada). As soluções metanólicas foram concentradas em rotaevaporador fornecendo o extrato metanólico. Os pesos das amostras, extratos e frações estão no Esquema 1.



**Esquema 1.** Pesos dos méis, extratos metanólicos e frações das quatro amostras de méis.

O extrato metanólico foi particionado com água destilada e acetato de etila. As fases acetato de etila foram concentradas fornecendo a fração acetato de etila. Os extratos e frações foram guardados sob-refrigeração a 4°C para realização de testes antioxidantes e CLAE-DAD.

### 3.6. EXTRAÇÃO DOS FENÓLICOS DA GEOPRÓPOLIS

Nove amostras de geoprópolis foram trituradas em almofariz, em seguida submetidas a sucessivas extrações com EtOH. O material extraído foi filtrado e o solvente extrator foi evaporado a 40 °C sob pressão reduzida

forneendo o extrato etanólico (Tabela 1). Parte do extrato etanólico foi suspendida em MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1) (200 mL) mantida em sonicação por 30 minutos. A solução obtida foi submetida a sucessivas extrações com hexano (5x 150 mL) e acetato de etila (5x 100 mL). As fases obtidas foram filtradas e concentradas em rotavapor, obtendo-se as frações hexânica, acetato de etila e MeOH: H<sub>2</sub>O. As massas do material de partida, extratos e frações obtidos estão nas Tabelas 1 e 2.

**Tabela 1.** Massas da geoprópolis e extrato etanólico bruto obtidos da geoprópolis da mandacaria.

Amostras	Geoprópolis	Extrato EtOH	Rendimento %
1	50,2398g	3,1583g	6,2865
2	50,4132g	10,5587g	20,9443
3	49,9789g	4,9989g	10,0020
4	25,6327g	6,5150g	25,4167
5	25,2533g	3,5668g	14,1241
6	5,8863g	2,1559g	36,6257
7	4,9895g	2,7632g	55,3803
8	25,3177g	3,3087g	13,0687
9	25,6788g	3,8370g	14,9423

**Tabela 2.** Massas do extrato EtOH bruto e das frações obtidas da geoprópolis da mandacaria.

Amostras	Extrato EtOH	Fração AcOEt	Fração hexânica	Fração MeOH: H <sub>2</sub> O
1	3,1583g	1,4788g	1,1989g	0,4804g
2	10,5587g	3,6331g	6,0727g	0,8534g
3	4,9989g	1,7649g	3,0367g	0,1973g
4	6,5150g	3,2384g	2,9407g	0,3360g
5	3,5668g	1,6501g	1,6536g	0,2630g
6	2,1559g	0,8024g	1,0666g	0,2868g
7	2,7632g	1,3444g	1,2688g	0,1498g
8	3,3087g	1,2091g	1,8817g	0,2178g
9	3,8370g	1,5756g	2,0073g	0,2540g

### 3.7. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS NA AMOSTRAS DE MEL E GEOPRÓPOLIS

O teor de fenólicos totais das amostras de mel e geoprópolis da mandaçaia foram determinadas utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu, de acordo com o método de Slinkard e Singleton (1977) com modificações utilizando o ácido gálico composto fenólico padrão. Este método é baseado na reação de oxidação e redução dos polifenóis com o reagente Folin-Ciocalteu. O reagente consiste de mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstístico, no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação  $6^+$  porém, em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados molibdênio azul e tungstênio azul, nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre  $5^+$  e  $6^+$  e cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras, que não necessariamente precisam ter natureza fenólica (Souza *et al.*, 2007).

Inicialmente os extratos e frações do mel e geopropolis foram solubilizados em EtOH (1,0 mg/mL). Uma alíquota de 50  $\mu$ L das soluções foi transferida para um Eppendorf, adicionando-se 20  $\mu$ L do reagente de Folin-Ciocalteu e 870  $\mu$ L de água destilada, agitando-se por 1 min. Em seguida, 60  $\mu$ L de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (15%) foram acrescentados á mistura e agitados por 30 segundos, resultando na concentração final de 50  $\mu$ g/mL. Após duas horas, a absorbância de cada amostra foi medida em espectrofotômetro de Elisa UV-Visível em 760 nm, empregando-se placas de 96 poços.

### 3.8. ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS NO MEL POR CLAE-DAD

Para a análise dos aminoácidos livres presentes nas amostras de mel foram preparadas soluções 1:1 de mel em água ultrapura e filtradas em filtros de nylon, 0,45  $\mu$ m. A concentração de partida da solução padrão, contendo uma mistura de 17 padrões de aminoácidos, foi de 100,0 pmol/ $\mu$ L para cada aminoácido.

A derivatização dos aminoácidos com o reagente AccQ•Tag foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante (Waters). Alíquotas de 10,0 e 20,0  $\mu$ L das soluções iniciais da mistura de aminoácidos padrão ou da amostra de mel,



respectivamente, foram misturadas com 70,0 e 60,0 uL de tampão borato AccQ•Tag e 20 uL do reagente AccQ•Tag (previamente dissolvido em 1,0 mL de reagente diluente AccQ•Tag), perfazendo um volume final de 100,0 µL. As soluções foram deixadas em repouso durante 1 hora à temperatura ambiente, para que ocorresse a reação. Após a reação de derivatização, a concentração final das amostras foi de 2,0 mg/mL e da mistura de padrões foi de 10,0 pmol/µL. A partir da solução derivatizada foram obtidas, por diluição, as concentrações para curva de calibração: 9,0; 8,0; 7,0; 6,0; 5,0 e 4,0 pmol/µL. As amostras também foram diluídas para 1,0; 0,5; 0,25; 0,1; 0,025 e 0,02 mg/mL para que a concentração de cada aminoácido ficasse na faixa da curva de calibração.

Os padrões dos aminoácidos foram: ácido aspártico (Asp), serina (Ser), ácido glutâmico (Glu), glicina (Gli), histidina (His), arginina (Arg), treonina (Thr), alanina (Ala), prolina (Pro), cisteína (Cys), tirosina (Tyr), valina (Val), metionina (Met), lisina (Lys), isoleucina (Ile), leucina (Leu), e fenilalanina (Phe).

A coluna de separação foi de (Nova-Pak™ C<sub>18</sub>, 150mm x 3,9mm x 4µm, Waters AccQ • Tag). A temperatura da coluna foi estabelecida à 37°C. A taxa de fluxo da fase móvel foi mantido à 1,0 mL/min. A fase móvel foi composta por uma solução à 1,0% do tampão acetato-fosfato AccQ • Tag (Eluente A), acetonitrila (Eluente B) e água ultrapura (Eluente C). O gradiente utilizado está descrito na Tabela 3. Foram injetados 10,0 µL das soluções padrão e amostra. Os cromatogramas foram monitorados em um comprimento de onda de 254 nm.

**Tabela 3.** Gradiente de separação utilizado no método de análise dos aminoácidos.

Tempo (minutos)	% Tampão (Canal A)	% Acetonitrila (Canal B)	% Água (Canal C)
0,01	100	0	0
0,5	99	1	0
18,0	95	5	0
19,0	91	9	0
29,5	83	17	0
33,0	0	60	40
36,0	100	0	0
65,0	0	60	40
100,0	0	60	40

\*De acordo com o manual do kit AccQ • Tag (Waters).

### 3.9. ANÁLISE DE FLAVONOIDES E ÁCIDOS FENÓLICOS NO MEL E GEOPRÓPOLIS POR CLAE-DAD

As análises cromatográficas foram realizadas no sistema CLAE-DAD. Para a análise de flavonoides e ácidos fenólicos os extratos e frações do mel e geopropolis (5mg/mL) foram solubilizados em metanol, a separação cromatográfica dos flavonoides foi feita com uma coluna C-18 SULPELCO 5µm 150 x 4,0 mm e fluxo de 1mL/minuto. A fase móvel utilizada foi água:ácido fórmico 99:1 (solvente A) e MeOH (Solvente B), 0-5min 40% B, 5-15 min. 45% B, 15-17 min. 45% B, 17-25 min. 50% B, 25-27 min. 50% B, 27-35 min. 55% B, 35-37min. 55% B, 37-40 min. 70% B e 50 min. fim. Para monitoramento foi utilizado o comprimento de onda de 320 nm e temperatura 30°C e para as análises dos ácidos fenólicos no mel foi feita com uma coluna C-18 SULPELCO 5µm 150 x 4,0 mm e fluxo de 1mL/minuto. A fase móvel usada foi água:ácido fórmico 95:5 (solvente A) e MeOH (Solvente B), 0 min. 20% B, 0-15 min. 30% B, 15-20 min. 30% B, 20-30 min. 40% B, 30-0 min. 100% B e 55 min. fim. Para monitoramento foi utilizado o comprimento de onda de 290 nm e temperatura 30°C.

### 3.10. TETES ANTIOXIDANTES

#### 3.10.1. Atividade sequestradora de radicais livres com DPPH<sup>•</sup>

A atividade foi realizada seguindo-se a metodologia descrita por Silva *et al.*, (2006). As soluções estoque das amostras foram preparadas nas concentrações de 1,0 a 10 mg/mL. Através de análise preliminar quantidades apropriadas das soluções estoque e da solução de DPPH (23,6 µg/mL em EtOH) foram transferidas para Eppendorfs de 0,5 mL e o volume foi completado para 500 µL com EtOH. Após 30 minutos de agitação em aparelho de ultrassom a quantidade de radicais DPPH<sup>•</sup> foi registrada em aparelho UV-Visível no comprimento de onda de 517 nm, utilizando-se placas de 96 poços. Foi utilizado como controle positivo o ácido ascórbico.

A percentagem de atividade sequestradora (% AS) foi calculada pela equação:

$$\% AS = 100x (Abs_{controle} - Abs_{amostra})/Abs_{controle}$$

Onde  $A_{controle}$  é a absorvância do controle, contendo apenas a solução etanólica do radical DPPH $\cdot$ , e  $A_{amostra}$  é a absorvância do radical na presença das amostras ou do padrão ácido ascórbico. A eficiência antirradicalar foi estabelecida utilizando a análise de regressão linear. Os resultados foram expressos através da concentração da amostra necessária para obter metade da atividade sequestradora dos radicais DPPH mais ou menos o erro padrão médio ( $CE_{50} \pm E.P.M.$ ).

### 3.10.2. Teste de descoloração do ABTS $\cdot^+$

Essa análise foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Re *et al.*, (1999). A solução do cátion radical ABTS $\cdot^+$  foi preparada pela mistura de uma solução de ABTS (7,0 mM) com uma solução de persulfato de potássio (140,0 mM), ambas em água destilada. A solução foi mantida sob abrigo da luz à temperatura ambiente durante um período de 14 horas antes do uso. Em seguida a solução do radical ABTS $\cdot^+$  foi diluída com etanol (1:100 v/v, aproximadamente) até uma absorvância ( $A$ ) de  $0,7 \pm 0,05$  no comprimento de onda de 734 nm, em UV-Visível, a uma temperatura de 30 °C. As soluções estoque das amostras foram preparadas em EtOH nas concentrações e 1,0 e 10,0 mg/mL. Através de triagem preliminar quantidades apropriadas das soluções das amostras e da solução de ABTS $\cdot^+$  foram transferidas para Eppendorfs de 0,5 mL e o volume foi completado para 500  $\mu$ L com EtOH. As concentrações finais das amostras variaram de 1,0 a 100,0  $\mu$ g/mL. O Trolox, um análogo da vitamina E, solúvel em água, foi utilizado como composto padrão. As soluções foram agitadas e, após 6 minutos de reação, a absorvância das amostras e do padrão foram medidas em um espectrofotômetro de UV-Visível em comprimento de onda de 734 nm. A percentagem de atividade sequestradora (% AS) foi calculada pela equação:

$$\% AS = 100x (Abs_{controle} - Abs_{amostra})/Abs_{controle}$$

Onde  $Abs_{controle}$  é a absorvância do controle, contendo apenas a solução alcoólica do radical ABTS $\cdot^+$ , e  $Abs_{amostra}$  é a absorvância do radical na presença resina ou do padrão.

### 3.11. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todas as amostras foram analisadas em triplicata e os dados foram expressos como média±desvio padrão da média. A eficiência antirradicalar foi estabelecida utilizando a análise de regressão linear no intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ) obtido pelo programa estatístico GraphPad Prism 5.0 (DEMO).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. ANÁLISES DAS AMOSTRAS DE MEL

#### 4.1.1. Análise palinológica

O grão de pólen apresenta parede externa quimicamente estável e morfologicamente variada, o que permite através da análise palinológica das cargas de pólen coletadas pelas abelhas, a identificação dos diversos tipos polínicos constituintes, a verificação dos períodos de produção e a determinação da origem botânica e geográfica das amostras (Modro, 2009).

Os resultados das análises qualitativas do pólen para as amostras de mel de mandaçaia estão na Tabela 4. Todos os resultados são apresentados como percentagens do teor total de pólen em cada amostra. *Mimosa arenosa* (Mimosaceae) foi o pólen predominante nas quatro amostras de méis. Esta espécie vegetal representa um mínimo de 44,4% e um máximo de 61,7% do total de pólen. *Mimosa arenosa* (popularmente conhecida como 'calumbi' ou 'jurema-branca') é uma espécie muito comum na região da caatinga e sua presença no mel da mandaçaia em grandes quantidades é esperada. É um arbusto com inflorescências composta de flores brancas muito pequenas e aroma doce. Suas flores fornecem néctar e pólen para muitos insetos como moscas, besouros e abelhas nativas. *Mimosa arenosa* (Figura 3) é uma espécie de grande importância para a criação de abelhas sem ferrão e é essencial para a produção de mel (Maia-Silva *et al.*, 2013). Uma quantidade significativa da espécie *Mimosa tenuiflora* (Mimosaceae) foi encontrada em duas amostras do mel (21,80 e 29,49%). Este tipo de pólen já havia sido

observado em méis coletados pelas abelhas sem ferrão *Melipona subnitida* (Silva *et al.*, 2013). *Mimosa tenuiflora* é um arbusto conhecido popularmente como jurema-preta. Esta espécie se reproduz durante um longo período do ano, mas principalmente durante a estação seca. Suas inflorescências são formadas por pequenas flores brancas, aroma doce e fornecem recursos florais como néctar e pólen para muitas espécies de abelhas, vespas, moscas e outros insetos. Esta espécie é muito importante para a manutenção da biodiversidade e do ecossistema (Maia-Silva *et al.*, 2013). Outras variedades de plantas específicas apresentaram níveis que variaram de 0,3% a 11,0% dos grãos de pólen no total. Todas estas plantas são relativamente comuns na Caatinga.



**Figura 3.** Inflorescência da espécie vegetal *Mimosa arenosa* presente em todos os méis analisados. Foto por Maia-Silva *et al*, 2012.

Com relação ao mel ser ou não monofloral além do teor de pólen temos que considerar se a espécie visitada é boa fornecedora de néctar, existem espécies vegetais consideradas excelentes produtores de néctar que podem apresentar características diferenciadas no fornecimento de reservas florais para abelhas em função das condições climáticas. De acordo com a Instrução Normativa de 11 de outubro de 2000 do Ministério da Agricultura e Abastecimento o mel é considerado unifloral ou monofloral quando o produto procede principalmente da origem de flores de uma mesma família, gênero ou espécie e possua características sensoriais, físico-químicas e microscópicas

próprias. Pela análise dos tipos polínicos podemos dizer que as quatro amostras de mel são monoflorais (pólen dominante), todas da família Mimosaceae, com teor variando de 53,5 a 83,98% (Tabela 4).

**Tabela 4.** Tipos polínicos mostrados no mel da mandaçaia.

Família	Tipos polínicos	Frequência polínica (%)			
		Mel 01	Mel 02	Mel 03	Mel 04
Anacardiaceae	<i>Schinus</i>	0,3	0,5	0,3	-
Arecaceae	<i>Syagrus coronata</i>	-	0,3	1,0	-
Caesalpiniaceae	<i>Copaifera martii</i>	-	0,8	-	-
	<i>Chamaecrista nictitans</i>	-	-	-	0,64
	<i>Chamaecrista ramosa</i>	0,3	0,5	-	-
	<i>Chamaecrista repens</i>	0,7	0,8	0,3	-
Euphorbiaceae	<i>Senna rizzinii</i>	2,3	1,3	1,9	3,85
	<i>Croton</i>	-	-	0,3	-
Fabaceae	<i>Phyllanthus</i>	-	0,3	-	-
	Tipo Fabaceae	-	0,3	-	-
Cyperaceae	Cyperaceae	-	-	-	0,32
Mimosaceae	<i>Acacia</i>	0,3	-	-	-
	<i>Anadenanthera colubrina</i>		0,8	-	-
	<i>Mimosa adenophylla</i>	1,7	-	3,2	0,32
	<i>Mimosa arenosa</i>	61,7	44,4	59,4	53,53
	<i>Mimosa pudica/sensitiva</i>	4,3	3,0	4,8	0,32
	<i>Mimosa tenuiflora</i>	9,9	21,8	5,8	29,49
	<i>Parapiptadenia</i>		0,3	-	-
	<i>Piptadenia stipulacea</i>	0,3	0,5	-	0,32
	<i>Pithecelobium</i>	-	0,3	-	-
	<i>Plathymenia reticulata</i>	-	0,3	0,6	-
	<i>Ptyrocarpa moniliformis</i>	-	0,8	-	-
Myrtaceae	Tipo Mimosa	-	0,3		-
	<i>Myrcia sp1</i>	7,9	11,0	6,7	0,32
	<i>Myrcia sp2</i>	-	3,8	7,0	0,32
Rutaceae	<i>Psidium</i>	5,3	0,0	3,2	-
Solanaceae	<i>Citrus</i>	-	0,3	-	-
	<i>Solanum sp1</i>	4,0	4,6	2,2	3,53
	<i>Solanum sp2</i>	0,3	2,4	2,6	6,41
Indeterminados		0,7	0,8	0,6	0,64
Total		100,0	100,0	100,0	100,0

#### 4.1.2. Análises físico-químicas

O teor de umidade no mel é, sem dúvida, uma das suas características mais importantes, que irá influenciar na viscosidade, peso específico, maturidade, cristalização, sabor, e palatabilidade. O conhecimento da viscosidade do mel é útil para melhorar a sua conservação e armazenamento, impedindo o crescimento de bolores sobre a sua superfície (Gomes *et al.*, 2011; Estevinho *et al.*, 2012). O alto nível de umidade pode ser considerado importante para o mel das Meliponas porque afeta outras características como viscosidade, fluidez e conservação, este mel é menos doce e mais susceptível a fermentação (Silva *et al.* 2013, Almeida-Silva *et al.* 2013). Além disso, este mel exige maiores níveis de atenção durante a colheita e precisa ser refrigerado.

De acordo com a Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000 o valor máximo do teor de umidade é de 20g por 100g de mel, essa normativa foi baseada no mel da *Apis mellifera*, no caso do mel das meliponas o teor de umidade é maior. A medição refratométrica é oficial para essa determinação, e é indireta, ou seja, se faz a medição refratométrica a 20°C do mel que é convertido para o teor de umidade através de uma tabela de referência a qual, por sua vez, fornece a concentração como função do índice de refração. A origem botânica do mel tem influência sobre o índice de refração. O mel dependendo da temperatura e de outros fatores pode cristalizar, essa cristalização pode também alterar em até 5% o valor do teor de umidade pelo método refratométrico (Cano, 2007).

Pelos resultados de teor de umidade obtidos, de 23,8% a 26,4% (Tabela 5) observa-se que os méis dessa espécie apresentam valores acima dos encontrados para *Apis mellifera*. Entretanto estão próximos aos resultados de outras espécies do gênero *Melipona* (Souza, 2004; Silva *et al.*, 2006).

O teor de umidade obtido pelo método Karl Fisher apresentou valores semelhantes a análise refratométrica com valores variando de 24,78% a 27,39% (Tabela 5). Estes valores são esperados para o mel de Meliponas tornando o mel mais fluido (Silva *et al.*, 2013, Almeida-Silva *et al.*, 2013).

Os métodos utilizando estufa, microondas e termogravimétrico não apresentaram bons resultados, carbonizando parte das amostras, em função disso os resultados não foram considerados.

O valor de pH para os méis da mandaçaia variou de 3,00 a 3,17 (Tabela 5). Estes valores são semelhantes aos encontrados para os méis de Meliponas (Silva *et al.*, 2013, Almeida-Silva *et al.*, 2013) e menores do que os encontrados para os da *Apis mellifera*, os valores de pH para o mel das meliponas não estão padronizados pela legislação nacional ou internacional. Embora o pH não seja indicado, atualmente, como análise obrigatória no controle de qualidade dos méis brasileiros, mostra-se útil como variável auxiliar para avaliação da qualidade (silva *et al.*, 2004). O mel é naturalmente ácido, independentemente da sua origem geográfica, que pode ser devido à presença de ácidos orgânicos que contribuem para o seu sabor e a sua estabilidade contra a deterioração microbiana (Khalil, 2012). O pH das amostras de mel é importante durante o processo de extração, pois afeta a textura como a sua estabilidade e vida útil (Terrab, 2002). O pH do mel pode ser influenciado pelo solo ou associação de vegetais usados para composição do mel e pelo pH do néctar (Alves *et al.*, 2005). Substâncias mandibulares da abelha acrescidas ao néctar também podem alterar o pH do mel (Evangelista-Rodrigues *et al.*, 2005).

A análise da condutividade das amostras mostraram valores entre 377,2 e 418,4  $\mu\text{S}$  (Tabela 5). Os valores estão abaixo dos exigidos pelo *Codex Alimentarius* que é de 800  $\mu\text{S}$ . Este parâmetro não é padronizado pela Instrução Normativa de 11 de outubro de 2000 do Ministério da Agricultura e Abastecimento para o mel da *Apis mellifera*. Os valores são compatíveis para os encontrados para outras Meliponas, mas são maiores que os encontrados para o mel da *Apis mellifera* (Alves *et al.*, 2005). A condutividade elétrica do mel depende dos ácidos orgânicos e dos sais minerais, além das proteínas e de outras substâncias (Almeida & Marchini, 2004; Acquarone *et al.*, 2007). Apesar de não ser exigida pela Legislação Brasileira, a condutividade elétrica é considerada um bom critério para a determinação botânica do mel e atualmente substitui a análise do teor de cinzas, pois essa medição é diretamente proporcional ao teor de cinzas (Alves *et al.*, 2005).

A acidez livre do mel pode ser devido a presença dos ácidos orgânicos, em equilíbrio com as lactonas correspondentes e alguns ions inorgânicos, tais



como fosfato (Gomes *et al.*, 2010). Alta acidez pode ser um indicativo de fermentação de açúcares em ácidos orgânicos (Khalil, 2012). Os valores da acidez para as amostras analisadas variaram entre 46,3 e 49,7 meq/kg de mel (Tabela 5), estando em conformidade com as normas nacionais (menor que 50 meq/Kg) e pouco acima dos valores para o mel da *Apis mellífera* que é em média 26,5 meq/kg de mel (Khalil, 2012). A acidez livre do mel das abelhas sem ferrão é geralmente mais elevado, o que justifica o sabor mais ácido para este tipo de mel, responsável para a maior preferência dos consumidores (Mesquita *et al.*, 2007).

Os valores para o HMF foram encontrados entre 5,61 e 6,35 mg/Kg de mel (Tabela 5). Dentre os indicadores de qualidade do mel, o mais utilizado é o HMF uma vez que é gerado a partir de um processo químico sendo resultado da quebra de açúcares hexoses, tais como glicose e frutose, em meio ácido (Alcázar *et al.*, 2006; Nafea *et al.*, 2011). A importância da detecção no mel tem crescido, uma vez que a formação deste composto está relacionada a méis submetidos a altas temperaturas durante a estocagem e das diferentes composições (Vázquez *et al.*, 2008; Abadio Finco *et al.*, 2010). As elevadas temperaturas nos países subtropicais implicam, naturalmente, em valores altos de HMF (Ajlouni & Puripast, 2010).

O teor de cinzas representa a riqueza dos minerais no mel sendo um parâmetro que é frequentemente utilizado para fins de controle de qualidade, o valor encontrado para este teste foi de 0,269 a 0,289 g por 100 gramas de mel (Tabela 5). O conteúdo mineral no mel é geralmente pequeno e depende da composição do néctar das espécies vegetais e predominantes em sua formação, o tipo de solo também influencia a quantidade de minerais presentes nas cinzas. A variabilidade no teor de cinzas tem sido associado a diferentes origens botânicas e geográficas dos méis (Felsner *et al.*, 2004). Através da determinação de cinzas é possível também determinar algumas irregularidades no mel, como por exemplo, a falta de higiene e a não decantação e/ou filtração no final do processo de retirada do mel pelo apicultor/meliponicultor (Evangelista–Rodrigues *et al.*, 2005).

A percentagem de açúcares redutores nas amostras variou entre 73,9-76,34 g/100 gramas de mel (Tabela 5). Os dados indicam que os açúcares

reduzidores são os principais açúcares solúveis presentes nas amostras (Khalil, 2012).

Os valores encontrados para a atividade de água ( $A_w$ ) foram de 0,85 a 0,87 (Tabela 5). A  $A_w$  é muito importante na determinação da segurança e qualidade do produto sendo um indicador que determina a água disponível no alimento para reações químicas, enzimáticas e no desenvolvimento microbiano (Franco & Landgraf, 2008). A maioria das bactérias deteriorantes não se multiplica em  $A_w$  inferior a 0,91, e especialmente as bactérias patogênicas em alimentos, como o *Staphylococcus aureus* que tolera  $A_w$  de 0,86 para sua multiplicação, ao passo que *Clostridium botulinum* não cresce abaixo de 0,94 (Franco & Landgraf, 2008). Não houve correlação entre o teor de umidade com a  $A_w$ . Este parâmetro mede a quantidade de água livre, enquanto que o teor de umidade expressa o conteúdo total, ou seja, a água livre e ligada (Estevinho *et al.*, 2012).

**Tabela 5.** Parâmetros físico químicos para o mel de mandaçaia.

Parâmetros físico químicos	Amostras de mel			
	01	02	03	04
pH	3,00±0,01	3,11±0,02	3,16±0,02	3,17±0,02
Condutividade $\mu\text{S}/\text{cm}$	401,5±0,1	413,6±0,2	418,4±0,1	377,2±0,2
Acidez livre (mequiv./Kg de mel)	48,1±0,1	49,7±0,2	50,0±0,1	46,3±0,1
HMF (mg/Kg de mel)	6,02±0,04	5,87±0,04	5,61±0,05	6,35±0,04
Teor de cinzas (g/100g de mel)	0,273±0,01	0,280±0,02	0,269±0,02	0,289±0,01
Açúcares reduzidores (g/100g de mel)	75,04±0,30	76,34±0,33	76,07±0,42	73,9±0,37
Umidade (g/100g de mel) refratométrico	23,8±0,97	23,6±0,95	24,6±0,96	26,4±0,89
Umidade (g/100g de mel) Karl Fisher	24,78±0,56	24,47±0,83	25,79±1,05	27,39±0,98
Atividade de água	0,86 ± 0,07	0,85 ± 0,06	0,85±0,07	0,87±0,08

#### 4.1.3. Análise de minerais nas amostras do mel

Dentre os minerais analisados no mel da mandaçaia foram encontrados o Fe (16,73±0,01 a 37,35±0,02 mg/Kg), K (57,42±0,02 a 76,95±0,02 mg/Kg), Na (23,20±0,02 a 36,02±0,02 mg/Kg) e Ca (78,25±0,02 a 80,75±0,02 mg/Kg) (Tabela 6.). Os minerais têm funções bioquímicas com potencial de afetar o desempenho físico. Servem como componentes catalíticos, estruturais,

reguladores celulares e de enzimas nos organismos. Além disso, realizam transferência de energia, transporte de gases, defesa antioxidante, integração de sistemas fisiológicos, atuam como receptores de membrana e regulam o uso de macronutrientes (Lukaski, 2004).

O percentual de conteúdo mineral é considerado como critério de qualidade que indica a possível origem botânica do mel. A variabilidade do conteúdo mineral dos méis podem surgir a partir de processos de colheita, técnicas de apicultura e meliponicultura e o material coletado pelas abelhas para o forrageamento sobre a flora (Finola *et al.*, 2007). Os elementos minerais já foram quantificados em mel de *Melipona*, sendo o potássio o elemento mais abundante nos méis estudados de *Melipona fasciculata* e *Melipona flavoneata*, o sódio foi o segundo mineral mais abundante e o cálcio foi o terceiro elemento mais abundante (Silva *et al.*, 2013).

**Tabela 6.** Minerais presentes no mel da mandaçaia.

Metais (mg/Kg de mel)	Amostras de mel			
	01	02	03	04
Ferro	16,73±0,01	30,90±0,02	17,13±0,01	37,35±0,02
Potássio	76,95±0,02	70,69±0,02	69,07±0,02	-
Sódio	27,91±0,02	23,20±0,02	32,39±0,02	36,02±0,02
Cálcio	79,17±0,02	78,25±0,02	80,75±0,02	78,33±0,02

#### 4.1.4. Análise de flavonoides e ácidos fenólicos no mel por CLAE-DAD

Todas as amostras de mel da mandaçaia mostraram a presença de seis ácidos fenólicos: 3,4-di-hidroxibenzoico, 1,2-di-hidroxibenzoico, ácidos cafeico, cinâmico, ferúlico e sinápico, além de três flavonoides quercetina, luteolina e kaempferol (Tabela 7). O ácido cinâmico foi detectado em três das quatro amostras de mel analisadas. Os flavonoides luteolina (Almeida Silva *et al.* 2013) e quercetina (Silva *et al.* 2013) já foram relatados em méis de *Melipona* anteriormente. O kaempferol e ácido cafeico também foram detectados no mel monofloral de *Mimosa scabrella* coletado pela abelha *Melipona marginata* no sul do Brasil (Borsato *et al.*, 2014). Curiosamente, todos os méis analisados contém predominantemente a espécie vegetal *Mimosa arenosa*, sugerindo que

o flavonóide luteolina pode ser específico para o genero *Mimosa*; portanto pode ser um possível marcador para a classificação botânica. Nos méis produzidos no Equador (Guerrini *et al.*, 2009) e Venezuela (Truchado *et al.*, 2011) por *Melipona spp.* também foram relatados flavonoides agliconas incluindo kaempferol e quercetina.

**Tabela 7.** Teor de flavonoides e ácidos fenólicos no mel da mandaçaia.

Fenólicos		Concentração µg/100g			
		01	02	03	04
Flavonoide s	quercetina	47,89±0,23	31,98±0,24	31,11±0,27	17,40±0,21
	luteolina	1348,71±0,37	770,18±0,39	1047,89±0,35	1196,60±0,44
	kaempferol	18,25±0,15	34,19± 0,23	19,68±0,21	29,67±0,27
Ácidos	3,4-dihidroxi benzoico	39,40±0,22	139,33±0,31	37,11±0,29	60,47±0,34
	1,2-dihidroxi benzoico	851,59±0,43	345,57±0,44	931,05±0,37	669,05±0,32
	cafeico	13,06±0,19	27,76±0,13	16,85±0,12	11,87±0,11
	cumárico	107,81±0,22	101,83±0,44	103,05±0,36	67,32±0,39
	ferúlico	8,09±0,11	64,15±0,21	14,14±0,25	131,07±0,26
	sináptico	18,60±0,32	74,81±0,34	21,52±0,27	24,55±0,35
	cinâmico	21,42 ± 0,22	27,39±0,33	15,76±0,24	-

#### 4.1.5. Análise de aminoácidos no mel da mandaçaia por CLAE-DAD

A análise se refere aos aminoácidos livres presentes no mel. O aminoácido mais abundante em todas as amostras foi a prolina em concentrações de 184,79 a 232,29 mg/kg de mel (Tabela 8) sendo um aminoácido importante que se origina principalmente a partir das secreções salivares de *Apis mellifera* e das *meliponas* durante a conversão do néctar em mel. O conteúdo de prolina é uma indicação de maturação mel e, em alguns casos, a adulteração com açúcar. (Ouchemoukh *et al.*, 2007; Meda *et al.*, 2005). Geralmente em méis de abelhas o teor de prolina varia entre 202 e 680 mg/kg, sendo 180 mg/kg o mínimo valor aceito para o mel genuíno (Abdulaziz *et al.*, 2012). A prolina é um importante aminoácido que confere propriedades antioxidantes ao mel (Meda *et al.*, 2005).

**Tabela 8.** Teor de aminoácidos no mel da mandaçaia.

Aminoácidos	Concentração em mg/Kg de mel			
	Mel 01	Mel 02	Mel 03	Mel 04
Serina	13,46±0,26	36,72±0,44	32,81±0,33	41,89±0,27
Treonina	99,38±0,35	109,68±0,29	121,27±0,36	133,85±0,31
Alanina	55,61±0,41	61,67±0,37	70,07±0,42	79,48±0,43
Prolina	197,90±0,29	232,29±0,44	184,79±0,39	222,93±0,38
Valina	-	-	-	10,81±0,22
Metionina	-	15,07±0,23	33,36±0,29	-
Fenilalanina	64,13±0,43	-	-	-

#### 4.1.6. Determinação do teor de fenólicos totais e potencial antioxidante do mel

O teor de fenólicos totais para os méis da mandaçaia variou de 90,41±0,39 a 112,07±0,61 miligramas equivalente ao ácido gálico por grama de extrato metanólico (mgGAE/g). Os valores obtidos estão na Tabela 9. A amostra do mel 1 apresentou menor valor e o mel 4 o maior valor de fenólicos totais. O teor de fenólicos está relacionado com a origem botânica do néctar e pólen e também com as espécies de abelhas produtoras de mel (Gheldof & Engeseth, 2002). Todas as plantas produzem numerosos metabólitos secundários, entre eles estão os fenólicos (Michalak, 2006). Os resultados apresentados são semelhantes aos encontrados no mel de *Melipona subnitida* e maiores do que os valores para o mel de *Apis mellifera* (Escuredo *et al.*, 2013).

A atividade antioxidante é determinada em vários produtos alimentícios por cientistas e grupos de pesquisa ao redor do mundo. Foi mostrado que numerosos compostos naturais mostram atividade antioxidante diferente e depende da origem, estrutura química, biodisponibilidade, etc., sendo que alguns destes compostos agem como profiláticos contra várias doenças degenerativas incluindo o câncer, acidente vascular cerebral, doenças cardiovasculares, doenças de Alzheimer e Parkinson. Existem vários níveis diferentes de mecanismos que funcionam pela inibição da formação de espécies de radicais livres, impedindo os danos oxidativos (Du *et al.*, (2009). A elevada capacidade dos compostos fenólicos, para neutralizar as espécies de oxigênio ativo está fortemente associada com a sua estrutura, tais como as

ligações duplas conjugadas e o número de grupos hidroxila no anel aromático, principalmente atribuída aos flavonoides e derivados de ácido cinâmico (Pascoal *et al.*, 2014).

A ação antioxidante é uma combinação de vários eventos químicos distintos, tais como a quelação de metal, a eliminação de radicais livres por doação de hidrogênio a partir de grupos fenólicos, oxidação para não propagação do radical, potencial redox e inibição enzimática (Bouhlef *et al.*, 2010; 2009).

O potencial antioxidante do mel de jandaíra foi avaliado através dos testes antiradicalares com DPPH e ABTS. A atividade foi analisada no extrato metanólico. Para o DPPH, os valores da  $CE_{50}$  variaram entre  $49,89 \pm 0,55$  e  $53,19 \pm 0,51$   $\mu\text{g/mL}$  e para o ABTS de  $19,61 \pm 0,28$  a  $27,18 \pm 0,33$  (Tabela 9). Os extratos dos méis da mandaçaia foram mais ativos que os encontrados para os méis da jandaíra (*Melipona subnitida*) (Silva *et al.*, 2013). Isso pode estar relacionado com os flavonoides e derivados de ácidos presentes no mel mandaçaia.

**Tabela 9.** Teor de fenólicos totais e atividade sequestradora de radical livre para o mel da mandaçaia.

Amostras	mgGAE/g	DPPH ( $CE_{50}$ ) $\mu\text{g/mL}$	ABTS ( $CE_{50}$ ) $\mu\text{g/mL}$
1	$90,4 \pm 0,4$	$53,2 \pm 0,5$	$23,3 \pm 0,2$
2	$105,7 \pm 0,4$	$51,4 \pm 0,6$	$27,2 \pm 0,3$
3	$99,5 \pm 0,6$	$49,9 \pm 0,5$	$19,6 \pm 0,3$
4	$112,1 \pm 0,6$	$52,9 \pm 0,7$	$20,0 \pm 0,2$

## 4.2. Análises das amostras da geoprópolis da mandaçaia

### 4.2.1. Análise palinológica

As meliponas preparam a geoprópolis a partir de barro e uma mistura de exsudatos resinosos recolhidos de várias estruturas vegetais, cera de abelhas, óleos essenciais extraídos de flores e o pólen (Ghisalberti 1979, Warakomska & Maciejewicz, 1992; Barth *et al.*, 1999). É produzida em qualquer época do

ano sendo utilizada pelas abelhas com o intuito mecânico de vedar e calafetar a colmeia, atuando como um agente termorregulador, para a assepsia da colônia e para embalsamar insetos invasores (Freitas, 2010).

Os resultados da análise qualitativa do pólen nas amostras 1-9 da geoprópolis da mandacaia estão na Tabela 10. Está apresentado como percentagens do teor total de pólen em cada amostra. No geral, 25 tipos de pólen pertencentes a 15 famílias de espécies vegetais foram identificadas nas nove amostras de geoprópolis analisadas. O tipo polínico *Senna* (Leguminosae) é o predominante em oito das nove amostras de geoprópolis representando de 3,2% a 50,0% do total de polens. Espécies vegetais do gênero *Senna* são muito comuns na região de caatinga (Figura 4), e a presença na geoprópolis da mandacaia em grandes quantidades pode ser esperado. A amostra 7 contém apenas dois tipos de pólen: *Senna* (50%) e *Malpighia* (50%). Mimosa é o segundo tipo mais abundante de pólen, presente em seis amostras e predominante na amostra 6. As espécies deste gênero também são comuns na caatinga. (Matos *et al.*(2014) analisou vinte e duas amostras de própolis produzidos por *Apis mellifera* L. na região do semi-árido da Bahia e verificou que o tipo polínico *Mimosa pudica* foi abundante e presente em todas as amostras analisadas, indicando que uma possível fonte dessa própolis é uma espécie invasora muito comum, ocorrendo com frequência em áreas degradadas e estradas. Os grãos de pólen de outras espécies estão presentes em muitas das amostras da geoprópolis, embora em níveis mais baixos. Um número de variedades de plantas específicas estão presentes nas nove amostras da geoprópolis, em níveis que variam entre 3,00% e 42,86% dos grãos de pólen totais. Todas as espécies são relativamente comuns na Caatinga. Nas amostras 3, 7, 8 e 9, cinco tipos de pólen são desconhecidas. Os tipos polínicos que ocorrem em baixas frequências nas amostras de geoprópolis indicam que espécies botânicas estão fornecendo resina e que a flora da região de Caatinga são importantes (Matos *et al*, 2014). A abundância de plantas com alta produtividade de pólen é de alto potencial para a meliponicultura.

**Tabela 10.** Análise palinológica das amostras de geoprópolis.

Família	Tipos polínicos	Frequência polínica (%)								
		01	02	03	04	05	06	07	08	09
Amaranthaceae	<i>Alternanthera</i>	-	4,76	-	3,2	-	-	6,25	-	-
Anacardiaceae	<i>Anacardiaceae</i>	-	-	-	-	-	14,29	-	-	7,14
Arecaceae	<i>Arecaceae</i>	-	-	-	-	-	-	6,25	-	-
Asteraceae	<i>Vernonia</i>	-	-	-	-	-	-	6,25	3,33	-
Boraginácea	<i>Cordia</i>	-	-	10,0	-	-	-	-	-	-
Caryophyllaceae	<i>Caryophyllaceae</i>	12,5	4,76	-	6,45	-	-	-	-	14,29
Cecropiaceae	<i>Cecropia</i>	-	-	-	3,2	-	-	-	-	-
Commelinaceae	<i>Combretaceae</i>	-	-	-	3,2	-	-	-	-	-
Convolvulaceae	<i>Ipomoea</i>	-	-	-	-	-	-	-	3,33	-
	<i>Amburana</i>	-	-	-	3,33	-	-	-	-	-
	<i>Chamaecrista</i>	37,5	-	-	-	-	14,29	-	-	-
	<i>Mimosa</i>	-	14,28	-	6,45	-	42,84	12,5	13,33	14,29
	<i>Parapiptadenia</i>	12,5	4,76	-	9,7	-	-	-	3,33	-
Leguminosae	<i>Pithecelobium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Poincianella</i>	-	42,86	-	29,15	-	-	-	3,33	-
	<i>Senna</i>	12,5	14,28	20,0	3,2	50,0	14,29	18,75	23,33	-
	<i>Vigna</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Malpighiaceae	<i>Malpighia</i>	-	-	10,0	12,9	50,0	14,29	-	-	7,14
Malvaceae	<i>Sida</i>	-	-	-	3,2	-	-	-	-	-
	<i>Myrtaceae</i>	12,5	9,54	30,0	9,7	-	-	-	3,33	7,14
Myrtaceae	<i>Psidium</i>	-	-	20,0	-	-	-	-	-	-
Poaceae	<i>Poaceae</i>	-	4,76	-	6,45	-	-	25,0	-	7,14
	<i>Borreria</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	7,14
	<i>Faramea</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	14,29
Rubiaceae	<i>Mitracarpus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Richardia</i>	12,5	-	-	-	-	-	-	-	-
	Indet 1	-	-	-	-	-	-	6,25	10,05	-
	Indet 2	-	-	10,0	-	-	-	-	-	7,14
	Indet 3	-	-	-	-	-	-	-	36,64	14,29
Indeterminado	Indet 4	-	-	-	-	-	-	6,25	-	-
	Indet 5	-	-	-	-	-	-	12,5	-	-
	Total	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0





**Figura 4.** Inflorescência da espécie vegetal *Senna*. Foto por Maia-Silva *et al*, 2012.

Os espectros de pólen das nove amostras de geoprópolis analisadas refletem características da vegetação da região nordeste do Brasil, perto do rio São Francisco. A identificação das plantas para a meliponicultura é extremamente importante porque indica as fontes de alimentos utilizados para a coleta de néctar e pólen. É também muito importante nos esforços para crescer e manter a vegetação natural. Os resultados apresentados são a base para estudos futuros que poderiam ajudar a certificar novos produtos meliponicultural.

#### 4.2.2. Análise de ácidos fenólicos na geoprópolis por CLAE-DAD

O perfil dos fenólicos foi analisado na fração acetato de etila da geoprópolis. Nas amostras foram encontrados cinco derivados de ácidos, sendo que quatro deles os ácidos cafeico, cumárico, abscísico e 4-metoxi cinâmico estavam presentes em todas as amostras. O ácido 4-hidroxicinâmico só não foi encontrado nas amostras 3 e 8 (Tabela 11).

A composição química da geoprópolis de alguns países, incluindo o Brasil, tem sido analisada apenas recentemente. Onze compostos das classes de ácidos fenólicos, taninos hidrolisáveis (galotaninos e elagitaninos) (Dutra *et*

*al.*, 2014) e benzofenonas (Cunha *et al.*, 2013) foram mostrados na geoprópolis de *Melipona scutellaris*. Flavonoides glicosilados foram mostrados na geoprópolis de duas espécies de abelhas sem ferrão da Amazônia *Melipona interrupta* e *Melipona seminigra* (Silva *et al.*, 2013). Fenilpropanoides e flavonoides foram isolados da geoprópolis de *Melipona subnitida* (jandaíra) (Souza *et al.*, 2013), ácidos aromáticos, compostos fenólicos e terpenos foram detectados na geoprópolis de *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae) do Mato Grosso do Sul, Brasil (Campos *et al.*, 2014).

**Tabela 11.** Derivados de ácidos presentes na geoprópolis da mandaçaia.

Amostras	Ácidos fenólicos (µg/g da fração AcOEt)				
	cafeico	trans 3-hidroxicinâmico	cumárico	abscísico	4-metoxicinâmico
1	238,0 ± 0,44	39,4 ± 0,23	494,0 ± 0,35	649,5 ± 0,51	1851,2 ± 0,46
2	581,0 ± 0,39	201,3 ± 0,37	50,7 ± 0,15	2474,2 ± 0,48	2029,5 ± 0,44
3	47,9 ± 0,41	-	288,0 ± 0,48	559,0 ± 0,47	638,0 ± 0,39
4	578,0 ± 0,49	85,3 ± 0,43	595,0 ± 0,43	1878,1 ± 0,37	1284,0 ± 0,42
5	3899,0 ± 0,51	59,5 ± 0,29	211,4 ± 0,28	650,7 ± 0,41	1312,5 ± 0,33
6	214,0 ± 0,43	23,3 ± 0,13	891,0 ± 0,24	2211,7 ± 0,44	199,6 ± 0,37
7	35,5 ± 0,38	4,3 ± 0,17	148,0 ± 0,38	430,3 ± 0,42	65,8 ± 0,41
8	14,1 ± 0,21	-	5,4 ± 0,12	72,8 ± 0,35	13,2 ± 0,12
9	105,0 ± 0,33	14,7 ± 0,26	136,0 ± 0,34	495,7 ± 0,52	111,8 ± 0,37

#### 4.2.3. Teor de fenólicos totais e potencial antioxidante da geoprópolis

O teor de fenólicos totais para a geoprópolis da mandaçaia variou de 42,41-213 mg EAG/g para o extrato EtOH e de 17,50-41,39, 51,29-290,55 e 30,19-289,81 mg EAG/g para as frações hexânica, AcOEt e MeOH:H<sub>2</sub>O, respectivamente (Tabela 12). Os valores para os teores de fenólicos totais mostraram diferenças significativa pelo teste de Tukey (p<0,05) para as nove amostras de geoprópolis. Com exceção das amostras 7-9 todas mostraram alto teor de fenólicos totais, sendo as frações AcOEt com os menores teores de fenólicos totais. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Souza *et al.*, (2013) para a geoprópolis da jandaíra (*Melipona subnitida*) e também para a geoprópolis produzida pela *Melipona fasciculata* (Dutra *et al.*, 2014). Todas mostram que as frações AcOEt apresentam alto teor de fenólicos totais.

Os fenólicos presentes na geoprópolis são característicos da origem botânica e as diferenças observadas para a geoprópolis da mandaçaia pode ser correlacionada com a época da coleta, tempo e a vegetação próxima às colméias, embora todas tenham sido coletadas próximas ao rio São Francisco, região semi-árido do Nordeste brasileiro. Apenas cinco compostos fenólicos foram identificados nas amostras. Outras análises serão necessárias para identificação de outros compostos fenólicos na geoprópolis de mandaçaia.

**Tabela 12.** Fenólicos totais nas frações de geoprópolis.

Amostra	Fenólicos totais (mg GAE/g $\pm$ SD)			
	EtOH	hexano	AcOEt	MeOH:H <sub>2</sub> O
1	43,21 $\pm$ 2,77	22,96 $\pm$ 2,40	137,96 $\pm$ 5,94	125,93, $\pm$ 7,45
2	96,67 $\pm$ 2,80	17,50 $\pm$ 2,67	290,55 $\pm$ 4,24	289,81 $\pm$ 3,24
3	42,41 $\pm$ 6,12	37,78 $\pm$ 3,94	168,79 $\pm$ 2,60	52,31 $\pm$ 4,42
4	213,89 $\pm$ 5,56	34,63 $\pm$ 1,04	191,09 $\pm$ 4,35	67,59 $\pm$ 1,67
5	108,80 $\pm$ 4,63	30,19 $\pm$ 2,87	182,96 $\pm$ 0,92	298,15 $\pm$ 1,85
6	126,85 $\pm$ 3,71	41,39 $\pm$ 3,64	192,77 $\pm$ 6,67	123,61 $\pm$ 9,25
7	62,69 $\pm$ 1,40	38,06 $\pm$ 3,10	67,77 $\pm$ 1,37	47,04 $\pm$ 1,50
8	60,51 $\pm$ 1,18	38,98 $\pm$ 4,76	51,29 $\pm$ 2,00	30,19 $\pm$ 2,43
9	82,02 $\pm$ 1,54	37,87 $\pm$ 0,94	73,79 $\pm$ 2,17	65,37 $\pm$ 7,52

Os antioxidantes têm atraído muito interesse devido ao efeito protetor contra os danos dos radicais livres, sendo a causa de muitas doenças degenerativas, incluindo o câncer. A elevada capacidade dos compostos fenólicos de neutralizar as espécies ativas de oxigênio está associada a sua estrutura, tais como as ligações duplas conjugadas e o número de grupos hidroxila no anel aromático, principalmente atribuída aos flavonoides e derivados de ácido cinâmico (Pascoal *et al.*, 2014). Três métodos diferentes foram utilizados para determinar as propriedades antioxidantes da geoprópolis, o que permite obter informações sobre a atividade dos extratos e frações, durante as diferentes etapas da reação de oxidação (Prior *et al.*, 2005). Os métodos utilizados foram a atividade sequestradora de radicais livres com DPPH e ABTS, e atividade antioxidante com o sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico.

Os resultados para o radical DPPH estão na Tabela 13. As melhores atividades observadas foram para as frações MeOH:H<sub>2</sub>O, sendo as frações hexânicas inativas. Estes resultados mostram que a geoprópolis de duas regiões distintas do semi-árido diferem significativamente ( $p < 0,05$ ) nos valores de CE<sub>50</sub> para os extratos EtOH e as frações AcOEt e MeOH:H<sub>2</sub>O quando utiliza o DPPH. Nossos resultados diferem dos obtidos por Souza *et al* (2013) em que a fração AcOEt da geoprópolis da jandaíra foram mais ativas. A atividade antiradicalar foi atribuída aos compostos isolados: 6-*O-p*-coumaroil-*D*-galactopiranosose, 6-*O*-cinamoil-1-*O-p*-coumaroil- $\beta$ -*D*-glucopiranosose, 7-*O*-metil naringenina, 7-*O*-metil aromadendrina, 7,4'-di-*O*-metil aromadendrina, 4'-*O*-metil kaempferol, 3-*O*-metil quercetina, 5-*O*-metil aromadendrina e 5-*O*-metil kaempferol. Comparando os resultados deste estudo com os valores obtidos para duas amostras de geoprópolis coletadas pela melipona *fasciculata* (Dutra *et al.*, 2014) é possível observar que a fração hexânica foi inativa nas duas amostras e a atividade dos extratos EtOH, AcOEt e MeOH:H<sub>2</sub>O foram menores.

**Tabela 13.** DPPH nas frações de geoprópolis.

Amostra	DPPH (EC <sub>50</sub> ) <sup>b</sup> µg/mL			
	EtOH	Hexano	AcOEt	MeOH:H <sub>2</sub> O
1	49,80±0,54	-	83,44±0,44	33,25±0,56
2	32,01±0,34	-	50,97±0,46	6,95±0,08
3	54,15±0,81	-	54,15±0,35	57,85±0,30
4	10,73±0,06	-	48,87±0,50	16,09±0,27
5	14,23±0,11	-	57,56±0,55	9,85±0,08
6	95,44±0,71	-	41,84±0,74	12,58±0,18
7	311,33±0,54	-	176,87±0,72	55,11±0,58
8	488,07±1,02	-	199,70±0,99	19,03±0,03
9	97,24±0,69	-	151,23±0,73	44,47±0,52
trolox				3,21 ± 00

No ensaio com ABTS, as frações AcOEt e MeOH:H<sub>2</sub>O que apresentam altos teores de fenólicos totais, mostram menores valores de EC<sub>50</sub> e a fração hexânica apresentou atividade sequestradora de radical livre variando de 67.36±0.58 para 100.14±0.73 µg/mL (Tabela 14). No geral os valores para a atividade sequestradora do radical ABTS são melhores dos que observados

para o DPPH. Os valores para os extratos e frações apresentaram diferenças significantes ( $p < 0.05$ ). As diferenças nas atividades sequestradoras de radicais livres mostradas para diferentes ensaios pode ser explicada pelos diferentes mecanismos dos métodos. (Dutra *et al.*, 2014) também mostrou que os extratos obtidos da geoprópolis de *Melipona fasciculata* apresentaram melhor atividade para o radical ABTS que para o DPPH, exceto o extrato hexânico que foi inativo.

**Tabela 14.** ABTS nas frações de geoprópolis.

Amostra	ABTS (EC <sub>50</sub> ) µg/mL			
	EtOH	hexano	AcOEt	MeOH:H <sub>2</sub> O
1	32,44±0,22	82,49±0,68	15,42±0,15	14,46±0,12
2	16,73±0,11	98,79±0,33	5,33±0,07	4,62±0,06
3	21,23±0,20	88,39±0,73	11,56±0,10	14,80±0,21
4	10,94±0,02	74,65±0,26	12,50±0,07	16,18±0,07
5	14,82±0,04	85,90±0,69	7,65±0,09	6,16±0,07
6	28,44±0,20	100,14±0,73	12,61±0,07	10,80±0,13
7	44,36±0,41	76,94±0,51	12,99±0,10	41,27±0,22
8	41,43±0,11	67,36±0,58	13,39±0,19	13,57±0,13
9	27,44±0,18	88,02±0,78	13,76±0,08	35,27±0,52

Os resultados obtidos para o sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico (t = 60 min.) para os extratos e frações da geoprópolis estão na Tabela 15. Foi observada melhor atividade antioxidante para os extratos EtOH e as frações AcOEt. Para este teste não foi observado diferenças significativas entre as nove amostras analisadas da geoprópolis. Comparando estes resultados com os obtidos para a geoprópolis da jandaíra (Souza *et al.*, 2013), é possível verificar que a geoprópolis da mandaçaia é mais ativa, entretanto, as amostram apresentam valores diferentes da capacidade antioxidante.

**Tabela 15.**  $\beta$ -Caroteno (% de clareamento) nas frações de geoprópolis.

Amostra	$\beta$ -Caroteno (% de clareamento)			
	EtOH	hexano	AcOEt	MeOH:H <sub>2</sub> O
1	79,42 $\pm$ 2,09	69,25 $\pm$ 1,19	80,70 $\pm$ 3,83	20,84 $\pm$ 0,95
2	87,09 $\pm$ 0,13	33,19 $\pm$ 0,32	70,42 $\pm$ 3,45	43,47 $\pm$ 1,21
3	83,26 $\pm$ 2,50	57,43 $\pm$ 1,41	75,08 $\pm$ 1,50	6,48 $\pm$ 1,49
4	82,17 $\pm$ 0,88	53,29 $\pm$ 0,87	72,08 $\pm$ 3,89	45,76 $\pm$ 1,74
5	73,86 $\pm$ 0,34	39,32 $\pm$ 3,41	78,85 $\pm$ 0,79	51,15 $\pm$ 0,95
6	78,53 $\pm$ 0,33	40,21 $\pm$ 1,21	86,20 $\pm$ 1,16	40,78 $\pm$ 2,95
7	61,60 $\pm$ 1,68	57,28 $\pm$ 0,71	75,53 $\pm$ 2,95	19,25 $\pm$ 1,80
8	39,42 $\pm$ 1,41	28,31 $\pm$ 1,40	54,25 $\pm$ 2,80	39,18 $\pm$ 0,26
9	69,77 $\pm$ 1,05	41,24 $\pm$ 0,46	81,92 $\pm$ 1,12	19,44 $\pm$ 1,90
trolox	95,02 $\pm$ 0,29	78,34 $\pm$ 3,27	95,02 $\pm$ 0,30	78,34 $\pm$ 3,27

Os resultados mostram que existe uma forte correlação entre a capacidade antioxidante e o teor de fenólicos totais. As correlações entre os valores obtidos com o teor de fenólicos totais e os radicais DPPH e ABTS estão na Tabela 16, evidenciando que os compostos fenólicos são em grande parte os responsáveis pela boa capacidade antioxidante apresentada pelo geoprópolis de mandaçaia. Outros estudos serão necessários para identificação de todos os fenólicos da geoprópolis da mandaçaia.

**Tabela 16.** Correlação entre DPPH, ABTS e fenólicos totais da geoprópolis.

Fenólicos totais	DPPH	ABTS
Extrato etanol	- 0,71	- 0,59
Extrato hexano	-	-
Extrato acetato	- 0,88	- 0,73
Extrato metanol/água	- 0,75	- 0,62

## 5. CONCLUSÕES

A análise melissopalínológica dos méis de *Melipona mandacaia* da região semi-árida do nordeste brasileiro exibiu o tipo polínico predominante *Mimosa arenosa*. A análise físico-química revelou um perfil semelhante para todas as amostras. O flavonoides quercetina, kaempferol e luteolina e os ácidos 3,4-di-hidroxibenzoico, cafeico 1,2-di-hidroxibenzoico, ferúlico e sinápico são comuns a todas as amostras. O ácido cumárico foi detectado nas amostras 1-3. As amostras de mel revelaram a presença dos aminoácidos essenciais: prolina, alanina, serina, treonina, valina, metionina e fenilalanina. Quanto aos minerais foi verificado maior teor de cálcio seguido do potássio. Todas as amostras do de mel exibiram atividade sequestradora de radical livre com teor de fenólicos superiores aos dos méis da abelha *Apis mellifera*.

A análise palinológica para as nove amostras da geoprópolis da região semiárida mostrou a presença de 25 tipos de polens de 15 famílias. O tipo polínico *Senna* (Leguminosae) foi o predominante em oito das nove amostras analisadas. Todas as amostras de geoprópolis apresentaram atividade antioxidante, exceto as frações hexânicas que foram inativas para o radical livre DPPH. O presente estudo também mostrou que os fenólicos presentes na geoprópolis da mandaçaia são responsáveis pela atividade antioxidante e que foram identificados cinco derivados de ácidos fenólicos: ácidos cafeico, cumárico, trans-3-hidroxicinâmico, abscísico e 4-metoxicinâmico. O perfil cromatográfico das amostras é semelhante. Portanto geoprópolis parece ser, um produto natural promissor a ser estudado a fim de revelar novas moléculas com propriedades terapêuticas. sua composição química não foi integralmente descrita e seu potencial farmacológico apenas começou a ser desvendado e merece mais estudos.

Em um cenário competitivo é fundamental estabelecer meios de diferenciação do produto para agregar vantagem em relação aos concorrentes, pois os consumidores passaram de agentes passivos a ativos, reivindicando maior qualidade e garantia do produto. Desta forma, para participar do mercado, as organizações necessitam de investimentos em qualidade e padronização do processo produtivo

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADIO FINCO, F.D.B.; MOURA, L.L.; SILVA, I.G. Propriedades físicas e químicas do mel de *Apis mellifera* L. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 30(3), 706-712, 2010.

ACQUARONE, C.; BUERA, P.; ELIZALDE, B. Pattern of pH and electrical conductivity upon honey dilution as a complementary tool for discriminating geographical origin of honeys. **Food Chemistry**, 101(2), 695-703, 2007.

AJLOUNI, S.; PURIPAST, S. Hydroxymethylfurfuraldehyde and amylase contents in Australian honey. **Food Chemistry**, 119(3), 1000-1005, 2010.

AL-HABSI, N. A.; NIRANJAN, K. Effect of high hydrostatic pressure on antimicrobial activity and quality of Manuka honey. **Food Chemistry**, 135(3), 1448-1454, 2012.

ALCÁZAR, A.; JURADO, J.M.; PABLOS, F.A.; GONZÁLEZ, G.; MARTÍN, M.J. HPLC determination of 2-furaldehyde and 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde in alcoholic beverages. **Microchemical Journal**, 82(1), 22-28, 2006.

ALMEIDA, D.; MARCHINI, L.C. Physicochemical and pollinic composition of honey samples of stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) from the "cerrado" of Pirassununga campus, University of São Paulo, in Pirassununga, State of São Paulo, Brazil. In: **Proceedings of the 8th IBRA International Conference on Tropical Bees and VI Encontro sobre Abelhas**, Ribeirão Preto, SP, 2004, p. 585.

ALMEIDA-SILVA, I. A.; SILVA T. M. S.; CAMARA, C. A., QUEIROZ, N.; MAGNANI, M.; NOVAIS, J. S.; SOLEDADE, L. E. B.; LIMA, E. O.; SOUZA, A.L.; SOUZA, A. G. Phenolic profile, antioxidant activity and palynological analysis of stingless bee honey from Amazonas, Northern Brazil. **Food Chemistry**, 141(4), 3552-3558, 2013.



ALVES, R. M. O.; CARVALHO, C. A. L.; SOUZA, B. A.; SODRÉ, G. S.; MARCHINI L. C. Physico-chemical characteristics of honey samples of stingless bee *Melipona mandacaia* Smith (Hymenoptera: Apidae). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 25(4), 644-650, 2005.

ALVES, R. M. O.; SOUZA, B. A.; CARVALHO, C. A. L. Notas sobre a bionomia de *Melipona mandacaia* (Apidae: Meliponinae). **Magistra**, 19(3), 204-212, 2007.

ANDRADE. P.; FERRERES, F.; AMARAL, MT. Analysis of honey phenolic acids by HPLC, its application to honey botanical characterization. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, 20(14), 2281-2288, 1997.

BANKOVA, V. S.; DE CASTRO, S. L.; MARCUCCI, M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, 31(1), 3-15, 2000.

BARTH, O.M.; DUTRA, V.M.L.; JUSTO, R.L. Análise polínica de algumas amostras de própolis do Brasil Meridional. **Ciência Rural**, 29(4), 663-667, 1999.

BATALHA-FILHO, H.; WALDSCHMIDT, AM.; R ALVES, MO. 2011. Distribuição potencial da abelha sem ferrão endêmica da Caatinga, *Melipona mandacaia* (Hymenoptera, Apidae). **Magistra**, 23(3), 129-133, 2011.

BERETTA, G.; GRANATA P.; FERRERO M.; ORIOLI M.; FACINO R.M. Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. **Analytica Chimica Acta**, 533(2), 185-191, 2005.

BORSATO, D. M.; PRUDENTE, A. S.; DOLL-BOSCARDIN, P. M.; BORSATO, A. V.; LUZ, C. F. P.; MAIA, B.; CABRINI, D. A.; OTUKI, M. F.; MIGUEL, M. D.; FARAGO, P. V.; MIGUEL, O.G. Topical Anti-Inflammatory activity of a

monofloral honey of *Mimosa scabrella* provided by *Melipona marginata* during winter in Southern Brazil. **Journal of Medicinal Food**, 17(7), 817-825, 2014.

BOUHLEL, I.; LIMEM, I.; SKANDRANI, I.; NEFATTI, A.; GHEDIRA, K.; DIJOUX-FRANCA, M. G.; LEILA, C. G. Assessment of isorhamnetin 3-O-neohesperidoside from *Acacia salicina*: protective effects toward oxidation damage and genotoxicity induced by aflatoxin B1 and nifuroxazide. **Journal of Applied Toxicology**, 30(6), 551-558, 2010.

BOUHLEL, I.; SKANDRANI, I.; NEFATTI, A.; VALENTI, K.; GHEDIRA, K.; MARIOTTE, A. M.; HININGER-FAVIER, I.; LAPORTE, F.; DIJOUX-FRANCA, M. G.; CHEKIR-GHEDIRA, L. Antigenotoxic and antioxidant activities of isorhamnetin 3-O neohesperidoside from *Acacia salicina*. **Drug and Chemical Toxicology**, 32(3), 258-267, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 11**. Regulamento técnico de identidade e qualidade do mel. Diário Oficial da União, Brasília, 23 de outubro de 2000. Seção 1, p.16-17.

BRASIL. Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa 09**, de 30 de março de 2007. Diário Oficial da União, Brasília, 04 de abril de 2007. Seção 1, p.1-8.

CAMPOS, M. G. R.; BOGDANOV, S.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B.; SZCZESNA, T.; MANCEBO, Y.; FRIGERIO, C.; FERREIRA, F. Pollen composition and standardization of analytical methods. **Journal of Apicultural Research**, 47(2), 156-163, 2008.

CANO, C. B.; FELSNER, M. L.; BRUNS, R. E. Precision of the refractometric methods of moisture honey analysis. . **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 27(2), 328-332, 2007.

CUNHA, M. G.; FRANCHIN, M.; GALVÃO, L. C. C.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M.; KOO, H.; ROSALEN, P. L.

Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 13:23, 2013, doi:10.1186/1472-6882-13-23.

DU, G.; LI, M.; MA, F.; LIANG, D. Antioxidant capacity and relationship with polyphenol and vitamin C in *Actinidia* fruits. **Food Chemistry**, 113(2), 557-562, 2009.

DUTRA, R. P.; ABREU, B. V. B.; CUNHA, M. S.; BATISTA, M. C. A.; TORRES, L. M. B.; NASCIMENTO, F. R. F.; RIBEIRO, M. N. S.; GUERRA, R. N. M. Phenolic acids, hydrolyzable tannins, and antioxidant activity of geoprópolis from the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 62(2), 2549–2557, 2014.

ERDTMAN, G. The acetolysis method - a revised description. **Svensk Botanisk Tidskrift**, 54, 561-564, 1960.

EREJUWA, O.O.; SULAIMAN, S.A.; WAHAB, M.S.A. Honey: a novel antioxidant. **Molecules**, 17(4), 4400-4423, 2012.

ESCUREDO, O.; MIGUEZ, M.; FERNANDEZ-GONZALEZ, M.; SEIJO, C. M. Nutritional value and antioxidant activity of honeys produced in a European Atlantic area. **Food Chemistry**, 138(2-3), 851-856, 2013.

ESTEVINHO, L. M.; RODRIGUES, S.; PEREIRA, A. P.; FEÁS, X. Portuguese bee pollen: palynological study, nutritional and microbiological evaluation. **International Journal of Food Science and Technology**, 47(2), 429-435, 2012.

EVANGELISTA – RODRIGUES, A.; SILVA, E. M. S. da; BESERRA, M.F.; RODRIGUES, M. L. Análise físico – química de méis das abelhas *Apis mellifera* e *Melípona Scutellaris* produzidos em duas regiões no Estado da Paraíba. **Ciência Rural, Santa Maria**, 35(5), 1166- 1171, 2005.

FELSNER, M.L.; CANO, C.B.; BRUNS, R.E.; WATANABE, H.M.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; MATOS, J.R. Characterization of monofloral honeys by ash contents through a hierarchical design. **Journal of Food Composition and Analysis**, 17(6), 737-747, 2004.

FERREIRA, D.; GROSS, G. G.; KOLODZIEJ, H.; YOSHIDA, T. Tannins and related polyphenols: Fascinating natural products with diverse implications for biological systems, ecology, industrial applications and health protection. **Phytochemistry**, 66(18), 2124-2126, 2005.

FINOLA, M. S.; LASAGNO, M. C.; MARIOLI, J. M. Microbiological and chemical characterization of honeys from central Argentina. **Food Chemistry**, 100(4), 1649-1653, 2007.

FRANCHIN, M.; CUNHA, M. G.; DENNY, C.; NAPIMOGA M. H.; CUNHA, T. M.; KOO, H.; ALENCAR, S. M.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P. L. Geopropolis from *Melipona scutellaris* decreases the mechanical inflammatory hypernociception by inhibiting the production of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . **Journal of Ethnopharmacology**, 143(2), 709-715, 2012.

FRANCO, B. D. G. M. F.; LANDGRAF, M. Microbiologia dos alimentos. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

FREITAS, A. S.; BARTH, O. M.; LUZ, C. F. P. Própolis marrom da vertente atlântica do Estado do Rio de Janeiro, Brasil: uma avaliação palinológica. **Revista Brasileira de Botânica**, 33(2), 343- 354, 2010.

GHELDOLF, N.; WANG, X.H.; ENGESETH, N.J. Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50(21), 5870-5877, 2002.

GOMES, T.; FEÁS, X.; IGLESIAS, A.; ESTEVINHO, L. M. Study of organic honey from the Northeast of Portugal. **Molecules**, 16(7), 5374-5386, 2011.

GOMES, S.; DIAS, L. G.; MOREIRA, L. L.; RODRIGUES, P.; ESTEVINHO, L. Physicochemical, microbiological and antimicrobial properties of commercial honeys from Portugal. **Food and Chemical Toxicology**, 48(2), 544-548, 2010

GHISALBERTI, E.L. Própolis: a review. **Bee World**, 60, 59-84, 1979.

GUERRINI, A.; BRUNI, R.; MAIETTI, S.; POLI, F.; ROSSI, D.; PAGANETTO, G.; MUZZOLI, M.; SCALVENZI, L.; SACCHETTI, G. Ecuadorian stingless bee (Meliponinae) honey: A chemical and functional profile of an ancient health product. **Food Chemistry**, 114(4), 1413-1420, 2009.

HEARD, T. A. The role of stingless bees in crop pollination. **Annual Review of Entomology**, 44, 183-206, 1999.

IWAMA, S.; MELHEM, T. S. The pollen spectrum of the honey of *Tetragonisca angustula angustula* Latreille (Apidae, Meliponinae). **Apidologie**, 10(3), 275-295, 1979.

KHALIL, I.; MONIRUZZAMAN, M.; BOUKRAË, L.; BENHANIFIA, M.; ISLAM, I.; ISLAM, N.; SULAIMAN, S. A.; GAN, S. H. Physicochemical and Antioxidant Properties of Algerian Honey. **Molecules**, 17(9), 11199-11215, 2012.

LOUVEAUX, J.; MAURIZIO, A.; VORWOHL, G. Methods of melissopalynology. **Bee World** 59(4), 139-157, 1978.

LUKASKI, H. C. Vitamin and Mineral Status: Effects on Physical Performance. **Nutrition**, 20 (7-8), 632-44, 2004.

MAIA-SILVA, C.; SILVA, C. I.; HRNCIR, M.; QUEIROZ, R. T. Q.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Guia de plantas visitadas por abelhas na Caatinga. 1. ed. Fortaleza: Editora Fundação Brasil Cidadão, 2012.

MATOS, F. J. A. Introdução à fitoquímica experimental. 2. ed. Fortaleza: UFC

Edições, 1997.

MATOS, V. R.; ALENCAR, S. M.; SANTOS, F. A. R. Pollen types and levels of total phenolic compounds in propolis produced by *Apis mellifera* L. (Apidae) in an area of the Semiarid Region of Bahia, Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 86(1), 407-418, 2014.

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

MESQUITA, L. X.; SAMAKAMOTO, S. M.; MARACAJA, P. B.; PEREIRA, D. S.; MEDEIROS, P. V. Q. Análises físico-químicas de amostras de mel de Jandaira puro (*Melipona subnitida*) e com misturas. **Revista Verde**, 2(2), 65-68, 2007.

MICHALAK, A. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metals stress. **Polish Journal of Environmental Studies**, 15(4), 523-530, 2006.

MICHENER, C. D. The bees of the world. 1st. ed. Baltimore: Johns Hopkins Univ. Press, 2007.

MODRO, A. F. H.; MESSAGE, D.; LUZ, C. F. P.; NETO, J. A. A. M. Composição e qualidade de pólen apícola coletado em Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 42(8), 1057-1065, 2007.

MOLTIVA, M. J.; TOVAR, M. J.; ROMERO, M. P.; ALEGRO, S.; GIRONA, J. Influence of regulated deficit irrigation strategies applied to olive trees (*Arbequina cultivar*) on oil yield and oil composition during the fruit ripening period. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 80(14), 2037-2043, 2000.

MORGANO, M. A.; MARTINS, M. C. T.; RABONATO, L. C.; MILANI, R. F.; YOTSUYANAGIA, K.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. A. Comprehensive investigation of the mineral composition of Brazilian bee pollen: geographic and seasonal variations and contribution to human diet. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 23(4), 727-736, 2012.

NAFEA, E.A.; MOSELHY, W.A.; FAWZY, A.M. Does the HMF value affect the antibacterial activity of the Bee Honey? **Egypt Academic Journal biological Science**, 4(1), 13-19, 2011.

NETO, F. L. P.; NETO, R. M. A. Apicultura nordestina: principais mercados, riscos e oportunidades. **Documentos do ETENE**, 12, 2006.

NEVES, C. Mandaçaia: uma abelha-chave para a conservação da caatinga Candombá – **Revista Virtual**, 2 (1), 2006.

NOGUEIRA-NETO, P. Notas Biométricas sobre Meliponídeos I sobre a ventilação dos ninhos e as construções com ela relacionados. **Revista Brasileira de Biologia**, 8(4), 465-488, 1948.

OUCHEMOUKH, S.; LOUAILECHE, H.; SCHWEITZER, P. Physicochemical characteristics and pollen spectrum of some Algerian honeys. **Food Control**, 18(1), 52-58, 2007.

PASCOAL, A.; RODRIGUES, S.; TEIXEIRA, A.; FEÁS, X.; ESTEVINHO, L. M. Biological activities of commercial bee pollens: Antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. **Food and Chemical Toxicology**, 63, 233-239, 2014.

PESSON, P.; LOUVEAUX, J. Pollinisation et productions végétales. **Institut National de la Recherche Agronomique - INRA**, 1, 663-679, 1984.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary

supplements, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53(10), 4290-4302, 2005.

RE, R.; PELEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, 26(9-10), 1231-1237, 1999.

SANCHEZ, V.; BAEZA, R.; CIAPPINI, C.; ZAMORA, M. C.; CHIRIFE, J. Comparison between Karl Fischer and refractometric method for determination of water content in honey. **Food Control**, [21\(3\)](#), 339–341, 2010.

SANTOS, F. A. R.; OLIVEIRA, J. M.; OLIVEIRA, P. P.; LEITE, K. R. B.; CARNEIRO, C. E. Plantas do Semi-árido importantes para as abelhas. 1. ed. Recife: Instituto do Milênio do Semi-Árido, 2006.

SGHERRI, C.; CECCONAMI, S.; PINZINO, C.; NAVARI-IZZO, F.; IZZO, R. Levels of antioxidants and nutraceuticals in basil grown in hydroponics and soil. **Food Chemistry**, 123(2), 416-422, 2010

SILVA, T. M. S.; CAMARA, C; LINS, A. C. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; D.; SILVA, E. M. FREITAS, B.; SANTOS, F. A. R. Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. **Journal of Food Composition and Analysis**, 19(6), 507-511, 2006.

SILVA, C. L. DA; QUEIROZ, A. J. DE M.; FIGUEIREDO, R. M. F. de. Caracterização físico-química de méis produzidos no Estado do Piauí para diferentes floradas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, 8(2-3), 260-265, 2004.

SILVA, A. S.; ALVES, C. N.; FERNANDES, J. G.; MÜLLER, R. C. S. Classification of honeys from Pará state (Amazon Region, Brazil) produced by three different species of bees using chemometric methods. **Journal of the Brazilian chemical Society**, 24(7), 1135-1145, 2013.



SILVA, T. M. S.; SANTOS, F. P.; RODRIGUES, A. E.; SILVA, E. M. S.; SILVA, G. S.; NOVAIS, J. S.; SANTOS, F. A. R.; CAMARA, C. A. Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaira (*Melipona subnitida*) honey. **Journal of Food Composition and Analysis**, 29(1), 10-18, 2013.

SLINKARD, K.; SINGLETON, V. L. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. **American Journal of Enology and Viticulture**, 28(1), 49-55, 1977.

SOUZA, B. de A.; CARVALHO, C. A. L. de; SODRÉ, G. da S.; MARCHINI, L. C. Características físico-químicas de amostras de mel de *Melipona asilvai* (Hymenoptera: Apidae). **Ciência Rural**, 34(5), 1623-1624, 2004.

SOUZA, C. M. M.; SILVA H. R.; VIEIRA-Jr. G. M.; AYRES M. C. C.; COSTA C. L. S.; ARAÚJO D. S.; CAVALCANTE, L. C.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S. *et al.* Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, 30(2), 351-5, 2007.

SOUZA, S. A.; CAMARA, C. A.; SILVA, E. M. S.; SILVA, T. M. S. Composition and Antioxidant Activity of Geoprópolis Collected by *Melipona subnitida* (Jandaíra) Bees. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, vol. 2013, Article ID 801383, 5 pages, 2013. doi:10.1155/2013/801383

TAVARES, M. H. F.; CARDOSO D. L.; GENTELINI D. P.; GABRIEL FILHO A.; KONOPATSKI E. A.; Uso do forno de micro-ondas na determinação da umidade em diferentes tipos de solo. Seminario **Ciências Agrárias**, 29(3), 529-538, 2008.

TERRAB, A.; DIEZ, M.J.; HEREDIA, F.J. Characterisation of Moroccan unifloral honeys by their physicochemical characteristics. **Food Chemistry**, 79(3), 373-379, 2002.

TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; GARCÍA-VIGUERA, C.; VIT-OLIVIER, P.; FERRERES, F.; TOMÁS-LORENTE, F. Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. **Phytochemistry**, 34(1), 191-196, 1993.

TRUCHADO, P.; VIT, P.; FERRERES, F.; TOMAS-BARBERAN, F. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis allows the simultaneous characterization of C-glycosyl and O-glycosyl flavonoids in stingless bee honeys. **Journal of Chromatography**, 1218(42), 7601-7607, 2011.

VÁZQUEZ, L. C.; MAROTO, M. C. D.; VIÑAS, M. A.; GONZÁLEZ, E. L. F.; PÉREZ-COELLO, M. S. Influence of Storage Conditions on Chemical Composition and Sensory Properties of Citrus Honey. **Journal Agricultural Food Chemistry**, 56(6), 1999-2006, 2008.

VELIKOVA, M.; BANKOVA, V.; MARCUCCI, M. C.; TSVETKOVA, I.; KUJUMGIEV, A. Z. Chemical composition and biological activity of propolis from Brazilian Meliponinae. **Zeitschrift fur Naturforschung C**, 55(9-10), 785-789, 2000.

VILHENA, F.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Análises físico-químicas de méis de São Paulo. **Mensagem Doce**, 53, 17-19, 1999.

YANG, L.; YAN, Q. H.; MA, J. Y.; WANG, Q.; ZHANG, J. W.; XI, G. X. High Performance Liquid Chromatographic Determination of Phenolic Compounds in Propolis. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, 12(5), 771-776, 2013.

YAO, L.; DATTA, N.; TOMAS-BARBERAN, F.A.; FERRERES, F.; MARTOS, I.; SINGANUSONG, R. Flavonoids, phenolic acids and abscissic acid in Australian and New Zealand *Leptospermum* honeys. **Food Chemistry**, 81(2), 159–168, 2003.

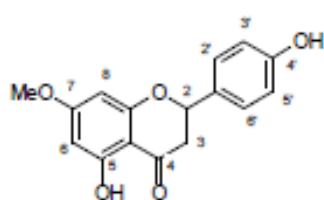
WANG, B.; LIEN, Y.; YU, Z. Supercritical fluid extractive fractionation – study of the antioxidant activities of propolis. **Food Chemistry**, 86(2), 237–243, 2004.

WARAKOMSKA, Z.; MACIEJEWICZ, W. Microscopic analysis of propolis from Polish regions. **Apidologie**, 23(4), 277-283, 1992.

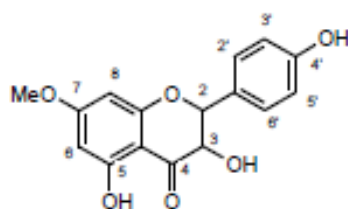
ZENEBON, O.; *et al.* Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 1. ed. digital. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

## Anexos

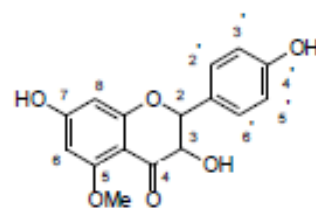
### Flavonóides isolados da geoprópolis da abelha jandaira



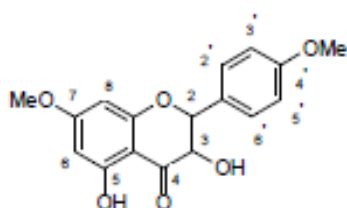
**7-metoxi-narigenina**



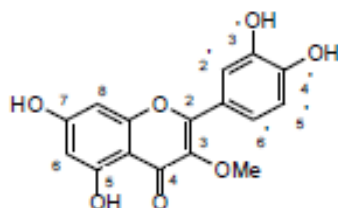
**7-metoxi-aromadendrina**



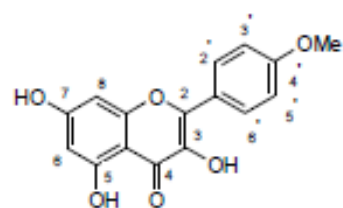
**5-metoxi-aromadendrina**



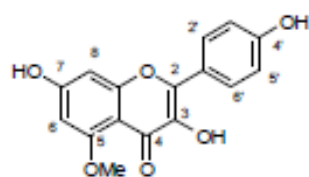
**7,4'-dimetoxi-aromadendrina**



**3-metoxi-quercetina**



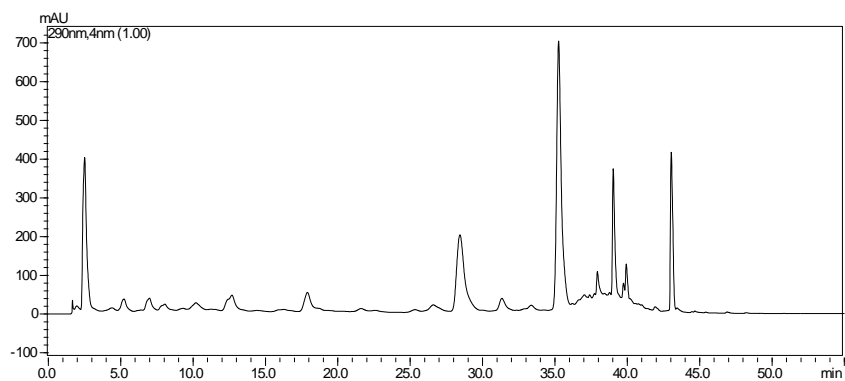
**4'-metoxi-kanferol**



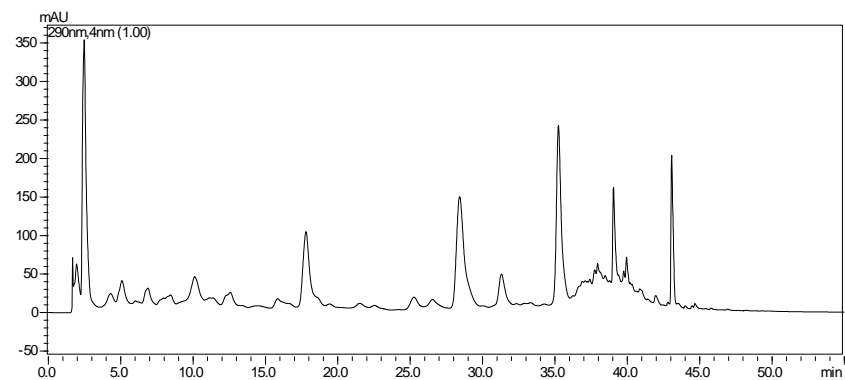
**5-metoxi-kanferol**

## Cromatogramas de flavonóides e ácidos fenólicos no mel por CLAE-DAD

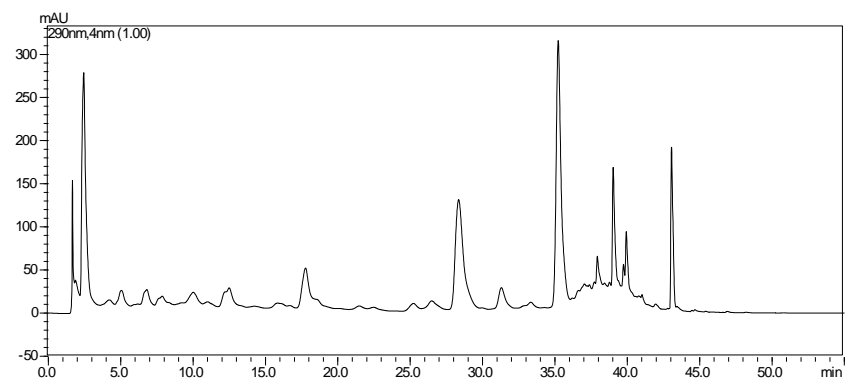
### Amostra 01



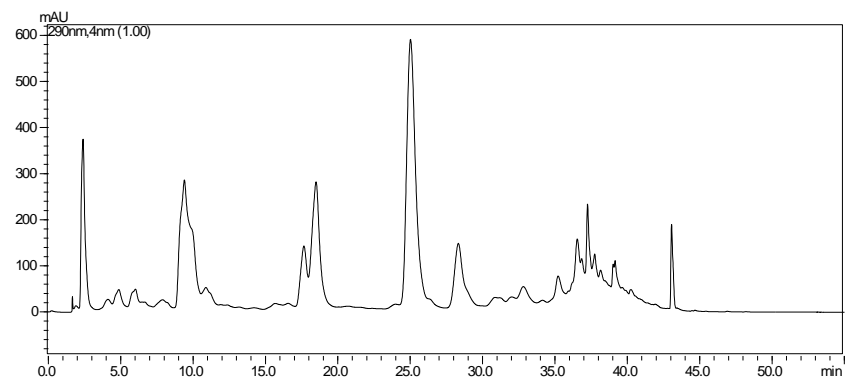
### Amostra 02



### Amostra 03



### Amostra 04



Patente frasco para armazenamento de fase móvel de aproveitamento total.

< Uso exclusivo do INPI >

**INPI** INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL  
PROTÓTIPO (DIRPA)  
04/12/2014 019140000298  
10:08 REPE  
  
BR 10 2014 030300 6

Espaço reservado para o protocolo

Espaço reservado para a etiqueta

Espaço reservado para o código QR



**INPI** INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

**INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL**  
Sistema de Gestão da Qualidade  
Diretoria de Patentes

<b>DIRPA</b>	Tipo de Documento:	<b>DIRPA</b>	Página:
	<b>Formulário</b>		<b>1/3</b>
Título do Documento:		Código:	Versão:
<b>Depósito de Pedido de Patente</b>		<b>FQ001</b>	<b>2</b>
		Procedimento:	<b>DIRPA-PQ006</b>

**Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:**

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas:

**1. Depositante (71):**

- 1.1 Nome: Universidade Federal Rural de Pernambuco  
1.2 Qualificação: Universidade  
1.3 CNPJ/CPF: 24416174000106  
1.4 Endereço Completo: RUA DOM MANOEL DE MEDEIROS, S/N, DOIS IRMÃOS  
1.5 CEP: 52.171-9  
1.6 Telefone: (81) 33206104 1.7 Fax: (81) 33206000  
1.8 E-mail: diretoria@inovatec.ufrpe.br

continua em folha anexa

- 2. Natureza:**  Invenção  Modelo de Utilidade  Certificado de Adição

**3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):**

Frasco para armazenamento de fase móvel com aproveitamento total

continua em folha anexa

- 4. Pedido de Divisão: do pedido Nº** **Data de Depósito:**

- 5. Prioridade:**  Interna (66)  Unionista (30)

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

País ou Organização do depósito	Número do depósito (se disponível)	Data de depósito

continua em folha anexa



**INPI** INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL  
Sistema de Gestão da Qualidade  
Diretoria de Patentes

<b>DIRPA</b>	Tipo de Documento: <b>Formulário</b>	<b>DIRPA</b>	Página: <b>2/3</b>
Título do Documento: <b>Depósito de Pedido de Patente</b>		Código: <b>FQ001</b>	Versão: <b>2</b>
Procedimento: <b>DIRPA-PQ006</b>			

**6. Inventor (72):**

Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seus nome(s), neste caso não preencher os campos abaixo.

6.1 Nome: Paulo Ricardo da Silva

6.2 Qualificação: Professor

6.3 CPF: 881.646.408-91

6.4 Endereço Completo: Rua Cristine Albert, 26, casa 50, Aldeia, Camaragibe-PE

6.5 CEP: 54.783-170

6.6 Telefone: (81) 3459 3339

6.7 FAX:

6.8 E-mail: paulocefet@bol.com.br

continua em folha anexa

**7. Declaração de divulgação anterior não prejudicial.**

Artigo 12 da LPI – período de graça.

Informe no item 11.13 os documentos anexados, se houver.

**8. Declaração na forma do item 3.2 da Instrução Normativa PR nº 17/2013:**

Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

**9. Procurador (74):**

9.1 Nome:

9.2 CNPJ/CPF:

9.3 API/OAB:

9.4 Endereço Completo:

9.5 CEP:

9.6 Telefone:

9.7 FAX:

9.8 E-mail:

continua em folha anexa

**10. Listagem de seqüências biológicas.**

Informe nos itens 11.9 ao 11.12 os documentos anexados, se houver.





**INPI** INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL  
Sistema de Gestão da Qualidade  
Diretoria de Patentes

<b>DIRPA</b>	Tipo de Documento: <b>Formulário</b>	<b>DIRPA</b>	Página: <b>3/3</b>
Título do Documento: <b>Depósito de Pedido de Patente</b>		Código: <b>FQ001</b>	Versão: <b>2</b>
		Procedimento: <b>DIRPA-PQ006</b>	

**11. Documentos Anexados:**

(Assinale e indique também o número de folhas);

(Deverá ser indicado o número total de somente uma das vias de cada documento).

	Documentos Anexados		folhas
<input checked="" type="checkbox"/>	11.1	Guia de Recolhimento da União (GRU).	2
<input checked="" type="checkbox"/>	11.2	Procuração.	4
<input type="checkbox"/>	11.3	Documentos de Prioridade.	
<input type="checkbox"/>	11.4	Documento de contrato de trabalho.	
<input checked="" type="checkbox"/>	11.5	Relatório descritivo.	3
<input checked="" type="checkbox"/>	11.6	Reivindicações.	1
<input checked="" type="checkbox"/>	11.7	Desenho(s) (se houver). Sugestão de figura a ser publicada com o resumo: n <sup>o</sup> , <u>1</u> por melhor representar a invenção (sujeito à avaliação do INPI).	2
<input checked="" type="checkbox"/>	11.8	Resumo.	1
<input type="checkbox"/>	11.9	Listagem de sequências em arquivo eletrônico: _____n <sup>o</sup> de CDs ou DVDs (original e cópia).	
<input type="checkbox"/>	11.10	Código de controle alfanumérico no formato de código de barras referente às listagem de sequências.	
<input type="checkbox"/>	11.11	Listagem de sequências em formato impresso.	
<input type="checkbox"/>	11.12	Declaração relativa à Listagem de sequências.	
<input checked="" type="checkbox"/>	11.13	Outros (especificar) Lista de Depositante (71) e Lista de Inventores (72)	2

**12. Total de folhas anexadas:** 15 **fls.**

**13. Declaro, sob as penas da Lei que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.**

Recife, 03 de Dezembro de 2014

Local e Data

*Prof. Dr. Ruyton G. Caldeira*  
Mat. Siga 272094  
Assinatura e Carimbo

Módulo de Inovação Tecnológica  
NIT / UFRPE

1. Depositante (71):

1.1. Nome: Instituto Federal de Pernambuco de Educação

1.2. Qualificação: Instituto Federal

1.3 CNPJ: 10.767.239/0001-45

1.4. Avenida Professor Luiz Freire, n 500, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco.

1.5. CEP: 50.540-74

1.6. Telefone: (81) 2125.1691

1.7 Fax: (81) 2125.1600

1.8. Email: [propeq@reitoria.ifpe.edu.br](mailto:propeq@reitoria.ifpe.edu.br)

---

6. Inventor (72):

6.1. Nome: Tania Maria Sarmiento da Silva

6.2. Qualificação: Professora - UFRPE

6.3 CPF: 951.205.054-19

6.4. Estrada do Encanamento 608, apt 301, Casa Amarela, Recife-PE.

6.5. CEP: 52.171-000

6.6. Telefone: (81) 3031 1801

6.7 Fax:

6.8. Email: sarmientosilva@gmail.com

---

## Frasco para armazenamento de fase móvel com aproveitamento total

### Relatório Descritivo

#### Campo da Invenção:

[001] A presente invenção altera o formato dos frascos utilizados para armazenamento de fase móvel em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) de tal forma que o aproveitamento de fase móvel seja total, sem restrição de solvente.

#### Antecedentes da Invenção:

[002] A presente invenção altera o formato dos frascos utilizados para armazenamento de fase móvel em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de tal forma que o aproveitamento de fase móvel seja total.

[003] Os frascos de armazenamento de fase móvel utilizados em CLAE, assemelham-se a frascos comuns de solventes, com volume de 1000 mL ou mais, dentro dos mesmos há um tubo e na ponta existe um filtro sinterizado, que tem a finalidade de reter partículas em suspensão para evitar danos ao pistão da bomba.

[004] A dimensão desse filtro sinterizado varia de acordo com o fabricante e em média mede 2 x 1 centímetros, ele fica no fundo do frasco. Como não podemos deixar que bolhas de ar entrem no sistema, pois poderiam alterar o fluxo de fase móvel comprometendo a análise, o nível de fase móvel dentro do frasco nunca de ser menor que a maior altura do filtro sinterizado, com isso aproximadamente 12% da fase móvel colocada no frasco não poderá ser usada, ou seja, se no frasco podemos colocar 1000 mL ou mais de fase móvel, na prática só poderemos utilizar 88% da mesma.

[005] Algumas patentes relatam frascos para utilização em CLAE como DE20212561(U1) de 02/06/2003 que se refere a um sistema para evitar o transbordamento do frasco para recolhimento de fase móvel utilizada na análise, JPS62255867(A) 07/11/1987 que se refere a um sistema para retirada de íons da fase móvel e WO2014153081(A1) de 25/09/2014 que se refere a um sistema para pressurização da fase móvel utilizando um gás. Estes documentos diferem da presente invenção porque não se referem a aproveitamento total da fase móvel o que constitui uma economia real de solvente e redução de custos na utilização de um sistema cromatográfico.

#### Descrição da Invenção:

[006] Para fins desta invenção, fase móvel é o eluente utilizado em CLAE. Para fins desta invenção filtro sinterizado, pode ser de metal ou plástico, é usado para reter partículas em suspensão que podem riscar o pistão da bomba do CLAE.

[007] O sistema proposto consiste de um frasco, com ou sem rosca, com capacidade de acordo com o volume de fase móvel a ser utilizada, geralmente de 1000 mililitros e que deve ser de material transparente, para que se possa ver o nível de fase móvel, e inerte a fase móvel utilizada, este frasco acondicionará a fase móvel a ser usada na CLAE. A tampa do frasco pode ser transparente ou não, com ou sem rosca e de qualquer material, desde que seja inerte a fase móvel utilizada, devendo ter um orifício para passagem de um tubo, que deve ser inerte a fase móvel utilizada, que leva a fase móvel do frasco para o equipamento, na ponta desse tubo que leva fase móvel do frasco para o equipamento, que está dentro do frasco, existe um filtro sinterizado de metal ou plástico, que tem a finalidade de reter as partículas em suspensão que estejam na fase móvel, para evitar danos ao pistão da bomba. O frasco de fase móvel na sua parte inferior interna tem um rebaixo, centralizado ou não, onde deve ficar o filtro sinterizado, ao redor do rebaixo tem-se uma inclinação para que toda a fase móvel escoe na direção do mesmo, com isso o

aproveitamento da fase móvel será total. A Figura 1 demonstra o sistema proposto comparando com o sistema atualmente usado descrito na Figura 2.

[008] Figura: 01 - Frasco para armazenamento de fase móvel com aproveitamento total (corte transversal), A – tampa com ou sem rosca com furo para passagem do tubo que liga o filtro sinterizado a bomba do CLAE, B – tubo que liga o filtro sinterizado a bomba do CLAE, C – frasco modificado com volume variável feito com material transparente e inerte a fase móvel utilizada, na parte inferior interna temos um rebaixo centralizado ou não que tem a dimensão aproximada do filtro sinterizado a ser utilizado, D - uma pequena inclinação do frasco para o rebaixo, E – filtro sinterizado.

[009] Figura: 02 – Frasco tradicional para armazenamento de fase móvel (corte transversal); A – tampa com ou sem rosca com furo para passagem do tubo que liga o filtro sinterizado a bomba do CLAE, B – tubo que liga o filtro sinterizado a bomba do CLAE, C – frasco tradicional de fase móvel para CLAE, D – nível mínimo de fase móvel e E – filtro sinterizado.

## REIVINDICAÇÕES

1. "Frasco para armazenamento de fase móvel com aproveitamento total" caracterizado por um frasco cujo fundo foi modificado de tal forma que a um rebaixo onde será colocado o filtro de fase móvel. No entorno deste rebaixo a uma leve inclinação de tal forma que toda a fase móvel vá para o rebaixo.
2. "Frasco para armazenamento de fase móvel com aproveitamento total", conforme reivindicação 1, caracterizado por este rebaixo que pode ser centralizado ou não, com uma inclinação maior ou menor desde de que seja suficiente para levar toda a fase móvel para o rebaixo.

## RESUMO

**"Frasco para armazenamento de fase móvel com aproveitamento total"** O sistema proposto consiste de um frasco, com ou sem rosca, com capacidade de acordo com o volume de fase móvel a ser utilizada, geralmente de 1000 mililitros. O material deve ser transparente, para que se possa ver o nível de fase móvel, e inerte a fase móvel utilizada, este frasco acondicionará a fase móvel a ser usada na Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. A tampa do frasco pode ser transparente ou não, com ou sem rosca e de qualquer material, desde que seja inerte a fase móvel utilizada, devendo ter um orifício para passagem de um tubo, que deve ser inerte a fase móvel utilizada, que leva a fase móvel do frasco para o equipamento, na ponta desse tubo que leva fase móvel do frasco para o equipamento, que está dentro do frasco, existe um filtro sinterizado de metal ou plástico, que tem a finalidade de reter as partículas em suspensão que estejam na fase móvel, para evitar danos ao pistão da bomba. O frasco de fase móvel na sua parte inferior interna tem um rebaixo, centralizado ou não, onde deve ficar o filtro sinterizado. Ao redor do rebaixo tem-se uma inclinação para que toda a fase móvel escoe na direção do mesmo, com isso o aproveitamento da fase móvel será total.



1/2

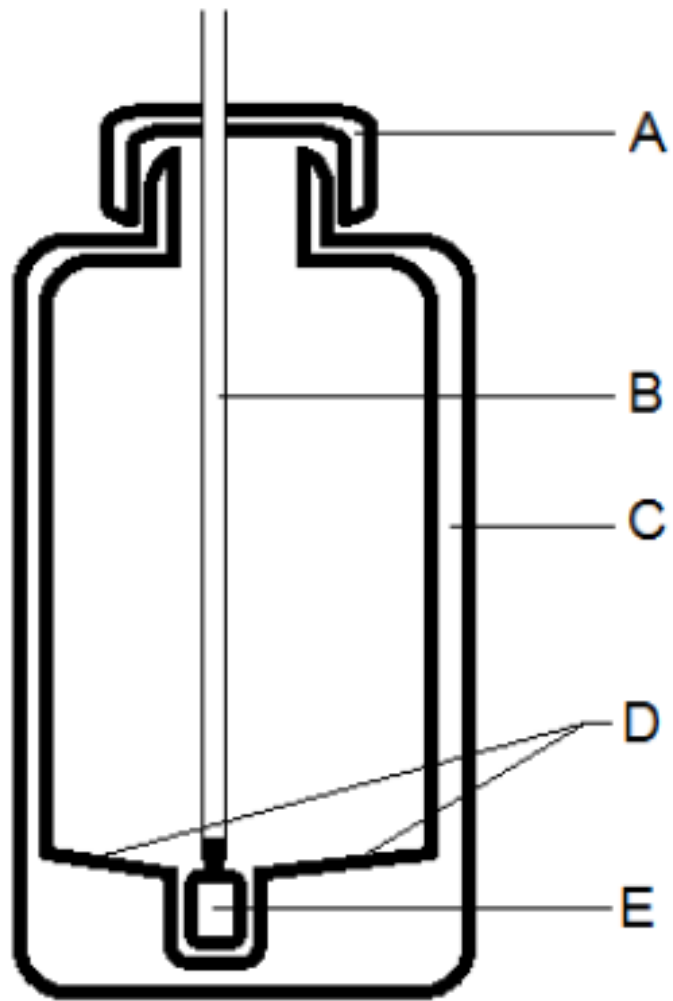


Figura 01

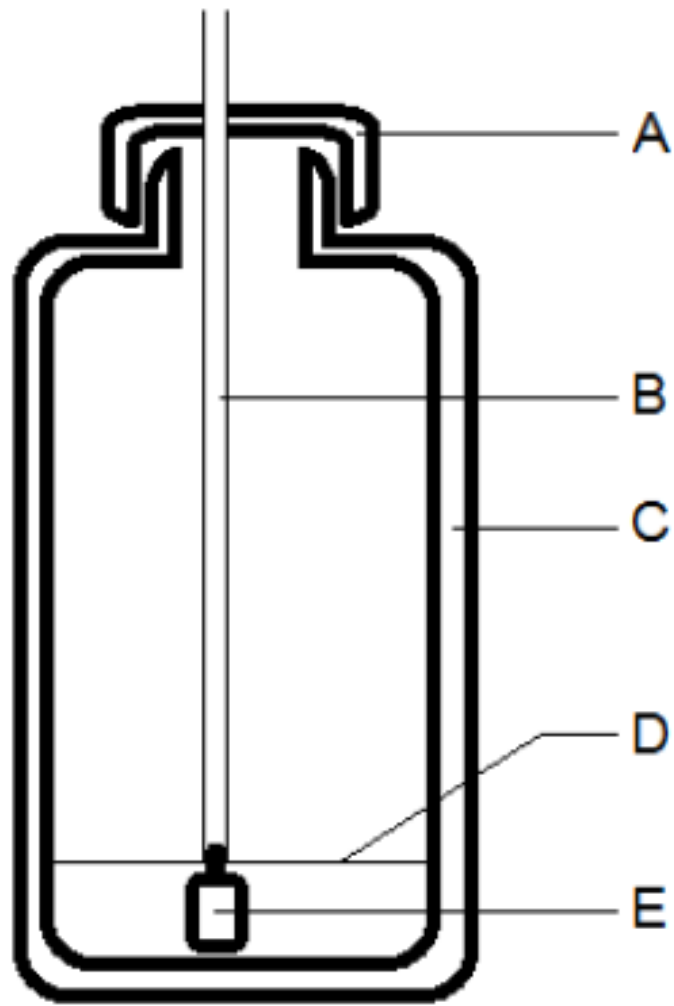


Figura 02

Artigo submetido a Anais da Academia Brasileira de Ciências

Chemical composition and free radical scavenging activity of honey from stingless *Melipona mandacaia* bees

Paulo Ricardo da Silva<sup>a</sup>, Celso Amorim Camara<sup>a</sup>, Eva Monica Sarmento da Silva<sup>b</sup>, Rodolfo França Alves<sup>c</sup>, Francisco de Assis Ribeiro dos Santos<sup>c</sup>, Tania Maria Sarmento Silva<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Ciências Moleculares, Universidade Federal Rural de Pernambuco, CEP 52171-900, Pernambuco, Brazil.

<sup>b</sup>Colegiado de Zootecnia, Universidade Federal do Vale de São Francisco, CEP 56300-990, Pernambuco, Brazil.

<sup>c</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, CEP 44036-900, Bahia, Brazil.

**Keywords:** Analysis, honey, *Melipona mandacaia*, bees.

**Palavras Chaves:** Análises, mel, *Melipona mandacaia*, abelhas.

Academy Section: Biological Sciences

\*Corresponding author: Tel.: +55 81 3320 6317

E-mail: taniasarmento@dcm.ufrpe.br

**Running title:** Honey from stingless *Melipona mandacaia* bees

## **Abstract**

*Melipona mandacaia* is a stingless bee species popularly known as 'mandaçaia' that is native to northeastern Brazil. In this study, we conducted both melissopalynological and physicochemical analyses to investigate the minerals and amino acids of four samples of mandaçaia honey. In addition, the major phenolic constituents of the honey samples were extracted and analyzed using high-performance liquid chromatography using a diode-array detector (HPLC-DAD). *Mimosa arenosa* (Fabaceae/Mimosoideae) was the predominant pollen type in the four honeys, and it represents a minimum of 44.4% to a maximum of 61.7% of the total pollen. All of the identified compounds, i.e., quercetin, luteolin, kaempferol and 3,4-dihydroxybenzoic, 1,2-dihydroxybenzoic, caffeic, cinnamic, and ferulic and sinapic acids, were quantified by HPLC-DAD. All of the samples of honey exhibited the presence of amino acids: proline, alanine, serine and threonine. The highest mineral contents consisted of calcium followed by potassium. All honey samples exhibited free-radical-scavenging activity.

## 1. Introduction

Stingless bees are highly diverse in the neotropics, with approximately 43 genera and approximately 350 species being identified (Michener 2000). These bees play an important role in Caatinga, acting as specific pollinators for this biome (Heard 1999).

*Melipona mandacaia* is a stingless bee popularly known as 'mandaçaia' that is native to Northeastern Brazil, where it faces extinction due to habitat loss. This species is endemic to Caatinga and is widespread in the states of Piauí, Ceará, Bahia, Paraíba and Pernambuco, usually found close to the São Francisco River (Batalha-Filho et al. 2011).

The honey from the *Meliponas* species has several unique features that differentiate its composition from other honeys, especially the water content (moisture), which makes it less dense than the honey of *Apis* bees. The color ranges from nearly transparent to dark amber, and the taste and sugar levels depend upon the species, region and, especially, the vegetal species. In addition to the sugars in the solution, the honey of *Meliponas* also contains organic acids, flavonoids and a wide variety of other organic compounds that contribute to its color, odor and flavor (Silva et al. 2013, Almeida-Silva et al. 2013). The demand for this product has increased recently, raising its commercial value higher than that of *Apis mellifera* honey. However, there have not been any studies to quantify the amino acids and minerals of *Melipona mandacaia* honey.

The phenolic profile of honeys, and consequently their antioxidant capacity, depend on the floral sources used to produce the honey. The predominance of a particular floral source in honey is primarily influenced by

geographical, seasonal and environmental factors (Andrade et al. 1997; Silva et al. 2013). Therefore, different properties of honeys are expected because the composition of the active compounds in honey from different locations is likely to be different.

In this study, we conducted both melissopalynological and physicochemical analyses to investigate the minerals and amino acids of mandaçaia honey. In addition, the major phenolic constituents of the honey samples were extracted and analyzed using high-performance liquid chromatography with a diode-array detector (HPLC-DAD). The identified phenolics were quantified. The total phenolic contents were determined using the Folin-Ciocalteu test. The radical activities of the honey and the extracts were also studied by testing their scavenging effect on the molecules DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl) and ABTS (2,2 azinobis 3- ethylbenzothiozoline-6-sulfonic acid).

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Honey samples**

Four samples of *M. mandacaia* “mandaçaia” honey were collected in the semiarid region in the state of Bahia, Brazil. The honey was collected into small storage bottles from the hives and was refrigerated at 4 °C until it was analyzed.

### **2.2. Reagents and standards**

Apigenin, isorhamnetin, kaempferol, 8-methoxykaempferol, luteolin, myricetin, quercetin, tricetin, dihydromyricetin, taxifolin and naringenin had been previously isolated and identified from the pollen loads (Silva et al. 2006, 2009, Freire et al. 2012). Ferulic acid, 3-hydroxy-4-methoxycinnamic acid, caffeic acid,

p-coumaric acid, cinnamic acid, sinapic acid, 4-methoxycinnamic acid, chlorogenic acid, 3,4,5-trihydroxybenzoic acid, 1,2-dihydroxybenzoic acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid, 4-hydroxybenzoic acid and syringic acid were obtained from Sigma-Aldrich (Hamburg, Germany); gallic and vanillic acids were obtained from Fluka Chemie AG (Buchs, Switzerland). All reagents used were of analytical grade. Folin-Ciocalteu's phenol reagent, DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl), potassium persulfate and Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) were supplied by Acros Organics (Belgium). ABTS (2,2 azinobis 3-ethylbenzothiozoline-6-sulfonic acid) was purchased from Fluka Chemie GmbH (Switzerland). Ascorbic acid was purchased from Vetec (Brazil). Formic acid (Vetec, Brazil) and methanol (TEDIA) were of analytical grade.

### **2.3 Melissopalynological analysis**

The honey samples were treated using the typical melissopalynological methods (Louveaux et al. 1978). The pollen sediment was acetolyzed (Erdtman 1960), mounted on glycerin jelly and sealed with paraffin. To determine the frequency classes, 500 pollen grains were counted from each sample. The pollen types were placed into four percentage classes, as determined by Louveaux et al. (1978): predominant pollen (>45%); secondary pollen ( $\leq 45\%$  to >15%); important minor pollen ( $\leq 15\%$  to  $\geq 3\%$ ); and minor pollen (<3%). The pollen slides from the Palynothecae of the Universidade Estadual de Feira de Santana (Bahia, Brazil) and pollen catalogs were used to identify the botanical affinities of the pollen types.



## **2.4 Physicochemical analysis**

The physicochemical analysis of the honey samples consisted of the following basic determinations, which were performed in triplicate: the electrical conductivity, pH and free acidity and the hydroxymethylfurfural, water, ash, reducing-sugar and moisture contents.

## **2.5 Extraction of the phenolic compounds from the honey**

The extraction was performed using previously described methods (Hadjmohammadi et al. 2009) with the following modification: 100 g of honey was dissolved into 200 mL of distilled water, and the solution was adjusted to pH 2.0 by adding concentrated HCl, stirring with a magnetic stirrer at room temperature for 10 min. The fluid samples were then filtered through a Celite layer to remove the solid particles. The C18 cartridge (SEP-PAK Waters) was sequentially conditioned with 30 mL of MeOH and 60 mL of distilled deionized water without allowing the cartridge to dry. The filtrate was passed through the cartridge and rinsed with 60 mL of water to remove all sugars and other polar constituents of honey, and the phenolic compounds were eluted with 8 mL of HPLC-grade methanol. The eluate was dried under reduced pressure in a rotatory evaporator at 40 °C and dissolved in methanol, filtered through a 0.45- $\mu\text{m}$  nylon syringe filter (Whatman) and injected into the HPLC system.

## **2.6 HPLC analysis of the phenolics and free amino acids**

All chromatographic analyses were performed using a Shimadzu Prominence LC-20AT equipped with an SPD-M20A diode-array detector (Shimadzu Corp. Kyoto, Japan). For amino acid analysis, the samples were injected into a

Rheodyne 7125i injector with a 20- $\mu$ L loop. Amino acid derivation with AccQ•Tag reagents was conducted according to the manufacturer's protocol. Briefly, 10 and 20  $\mu$ L of a standard amino acid mixed solution or the honey (0.2 g/mL), respectively, were mixed with 60  $\mu$ L AccQ•Tag borate buffer and 20  $\mu$ L AccQ•Tag reagent previously dissolved in 1.0 mL of AccQ•Tag reagent diluent. The reaction was allowed to proceed for 1 h at room temperature. The separation column was a Waters AccQ•Tag (3.9 mm i.d.  $\times$  150 mm, 4.0  $\mu$ m particles). The column heater was set at 37  $^{\circ}$ C, and the mobile-phase flow rate was maintained at 1.0 mL/min. Eluent A was 1% AccQ•Tag solvent A, eluent B was acetonitrile and eluent C was Milli-Q water. The separation gradient was 0-0.5 min (100-99% A), 18 min (95.0% A), 19 min (91% A), 29.5 min (83% A), 33 min (60% A and 40% C), 36 min (100% A) 65 min (60% A and 40% C) and 100 min (60% A and 40% C). Ten microliters of the sample were injected for analysis. The PDA detector was set at 254 nm.

For the flavonoids, the chromatographic separation was performed with a C-18 column (150  $\times$  4.6 mm  $\times$  5  $\mu$ m, Supelco). The flavonoids were separated using a mobile phase consisting of 1% aqueous formic acid (A) and methanol (B) at a flow rate of 1 mL/min. The mobile phase was delivered using the following solvent gradient: 0-3 min 40% B, 5-15 min 45% B, 17-25 min 45% B, 25-27 min 50% B and 35-40 min 70% B. The injection volume was 10  $\mu$ L. Chromatograms were recorded at 290 nm and 340 nm. The identification of the flavonoids was based on the retention times and the UV spectra with authentic markers. The flavonoids quercetin, luteolin and kaempferol were quantified using the external-standard method based on the peak area. The analyses were performed by plotting a calibration curve. To construct the calibration

curve for each flavonoid, working solutions with concentrations between 0.5 and 400 mg/mL were prepared from each stock solution by diluting appropriate volumes with methanol, which were then correlated with the measured area. For each sample, the quantitative analyses were performed in triplicate at 320 nm. For the analysis of the phenolic acids, the elution system was composed of 5% formic acid (solvent A) and MeOH (solvent B). The elution conditions were: 0.01-15 min 20-30% B, 15-20 min 30% B, 20-30 min 30-40% B and 40-50 min 100% B, at a flow rate of 1.0 mL/min. The wavelengths 254 and 290 nm were employed for monitoring.

## **2.7 Metal determination from the honey**

The digestion of the honey was performed in a closed microwave acid-digestion MARS 5 system (CEM Corporation, USA). The samples (500 mg) were diluted in concentrated nitric acid (5 mL). The program used had the following features: 800 W for 5 min at 120 °C and then 160 °C for 20 min. Upon cooling, the solution was filtered to remove any remaining solid material. The solution was diluted with deionized water prior to analysis. The analysis of metals (Cu, Fe, K, Mn, Cd, Zn, Na and Ca) was performed with a Varian AA 240 (Victoria, Australia) by flame atomic absorption spectrometry (FAAS). Under optimized parameters, the standard calibration curves for the metals were constructed by plotting the absorbance against the concentration in a fixed range for each metal, and good linearity was observed. All analyses were performed in triplicate, and the mean values were reported. All of the values obtained for the metal contents in the pollen samples were calculated as mg/kg pollen.

## **2.8 Determination of the total phenolic content and the DPPH<sup>•</sup> radical-scavenging assay and the ABTS<sup>•+</sup> radical cation-decolorization assay**

The total soluble phenolic content of the MeOH extract was determined with the Folin-Ciocalteu reagent according to the method of Slinkard and Singleton (1977) with the modification of using gallic acid as the standard phenolic compound. The MeOH extract was analyzed using DPPH (Silva et al. 2006) for the free-radical-scavenger activity and ABTS (Re et al. 1999) for the radical cation-decolorization assay.

## **2.9 Statistical Analysis**

All samples were analyzed in triplicate and the results are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation. All statistical analyses were performed using the Microsoft Excel software package (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA).

## **3. Results and Discussion**

All honey samples studied had a bright yellow color. The results from the physicochemical analyses of the honey samples are presented in Table I. The moisture values ranged from 24.47 to 27.39%, which are expected values for the honey of *Meliponas* because the water content is commonly very high and causes the honey to be more fluid. (Silva et al. 2013, Almeida-Silva et al. 2013). The results for the pH, free acidity, reducing sugars and moisture and water contents were similar to those found for the honey of *Melipona subnitida* (Silva et al. 2013), but the values for ash and HMF were lower and higher, respectively. The electrical conductivity ranged from 377.2 to 418.4  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . According to Almeida-Muradian et al. (2013), who analyzed the honeys of

*Melipona subnitida* (mean value of  $102.77 \pm 1.31 \mu\text{S/cm}$ ), the fact that the electrical-conductivity values were not higher than  $800 \mu\text{S/cm}$  suggests that the samples are from nectar honey. The electrical conductivity is directly related to the concentration of mineral salts, organic acids and proteins and is very useful in the determination of the floral origin (Acquarone et al. 2007).

The results from the qualitative pollen analysis for the mandaçaia honey samples are summarized in Table II. All results are listed as percentages of the total pollen content in each sample. *Mimosa arenosa* (Fabaceae/Mimosoideae) was the predominant pollen type in the four honeys, and it represents a minimum of 44.4% to a maximum of 61.7% of the total pollen. *M. arenosa* ('calumbi' ou 'jurema-branca') is a very common plant species in the Caatinga region, and its presence in mandaçaia honey in large amounts is expected. It is a shrub with inflorescences composed of very small, white, sweet-scented flowers. Its flowers provide nectar and pollen for many insects, such as flies, beetles and native bees. *M. arenosa* is a species of great importance for the creation of stingless bees and is essential for the production of honey (Maia-Silva et al. 2013). A significant amount of *Mimosa tenuiflora* (Fabaceae/Mimosoideae) was present in two samples of the honey (21.80 and 29.49%). This pollen type had already been observed in honeys collected by *Melipona subnitida* (Silva et al. 2013). *M. tenuiflora* is a shrub known popularly as jurema-preta. This species blooms over a long period of the year, but mostly during the dry season. Its inflorescences are formed by white, small, sweet-scented flowers and provide floral resources as pollen and nectar for many species of bees, wasps, flies and other insects. This species is very important for maintaining the biodiversity and the ecosystem (Maia-Silva et al. 2013).

Other specific plant varieties presented levels ranging from 0.3% to 11.0% of the total pollen grains. All of these are relatively common plants in Caatinga.

Regarding minerals, the highest content was determined for calcium (Ca), followed by potassium (K). The iron (Fe) and sodium (Na) contents vary in the samples (Table I). The mineral content percentage is considered as a quality criterion indicating the possible botanical origin of the honey. The variability in the mineral content of honeys can arise from harvesting processes, beekeeping techniques and the material collected by the bees while foraging on the flora (Finola et al. 2007). The mineral elements have already been quantified in honey from *Melipona*; K was the most abundant element in the honeys studied of *M. fasciculata* and *M. flavoneata*, Na was the second most abundant and Ca was the third most abundant element (Silva et al. 2013).

The samples of honey contained seven essential amino acids (Table III). Proline was found at the highest concentrations (184.8 mg/Kg and 232.3 mg/Kg), followed by threonine (99.4 mg/Kg and 133.9 mg/Kg). According to Bergner and Hahn, 1972, proline derives mainly from the salivary secretions of *A. mellifera* during the conversion of nectar into honey. The amino acid content of the honey of meliponas has not yet been reported.

All honey samples have been found to have six phenolic compounds: 3,4-dihydroxybenzoic, 1,2-dihydroxybenzoic, caffeic, cinnamic, ferulic and sinapic acids and the three flavonoids quercetin, luteolin and kaempferol (Table IV). Cinnamic acid was detected in samples 1-3. The existence of luteolin (Almeida Silva et al. 2013) and quercetin (Silva et al. 2013) in *Melipona* honey from Brazil was previously reported. Kaempferol and caffeic acid were also detected in the monofloral honey of *Mimosa scabrella* provided by *Melipona*

*marginata* in southern Brazil (Borsato et al. 2014). Interestingly, all of the honeys analyzed predominantly contain the vegetal species *Mimosa arenosa*, suggesting that the flavonoid luteolin may be specific for the *Mimosa* genus; therefore, its main compound may be a possible marker for the botanical classification. Honeys produced in Amazonian Ecuador (Guerrini et al. 2009) and Venezuela (Truchado et al. 2011) by *Melipona* spp. have also been reported to have a small content of flavonoid aglycones, including kaempferol and quercetin.

The amount of the total phenolics estimated using the Folin-Ciocalteu reagent in the various samples ranged from 90.4 to 112.1 mg GAE/g (gallic acid equivalent by gram of extract) in the MeOH extract. These results are similar to those found for *Melipona subnitida* honey but are larger than the values for the honey of *Apis mellifera* (Escuredo et al. 2013).

Two methods were used to determine the free-radical-scavenger activity of the mandaçaia honey. All honey samples exhibited free-radical-scavenging activity. As shown in Table V, the EC<sub>50</sub> values ranged from 49.9 to 53.2 µg/mL for the MeOH extract in the DPPH radical-scavenging assay. The EC<sub>50</sub> results for the ABTS test varied from 19.6 µg/mL to 27.2 µg/mL. These methanol extracts were more active than the methanol extracts from the honey of *Melipona subnitida* (Silva et al. 2013). This may be related to the phenolics present in mandaçaia honey.

#### **4. Conclusions**

The melissopalynological analysis of *M. mandacaia* honeys from a semiarid region of Brazil exhibited the predominant pollen type of *Mimosa arenosa*. The

physicochemical analysis revealed that all of the samples had a similar profile. The flavonoids quercetin, luteolin and kaempferol and the phenolics 3,4-dihydroxybenzoic, 1,2-dihydroxybenzoic caffeic, ferulic and sinapic acids were common in all of the samples. Coumaric acid was detected in samples 1-3. The samples of honey showed the presence of essential amino acids: proline, alanine, serine, threonine, valine, methionine and phenylalanine. Regarding minerals, the highest content was determined for calcium, followed by potassium. All honey samples exhibited free-radical-scavenging activity.

### **Acknowledgments**

This work was financially supported by grants from CNPq and FACEPE (Grant no. PRONEM APQ-1232.1.06/10 and CNPq-PPBio 503285/2009-9).

### **Referências**

ACQUARONE C, BUERA P, ELIZALDE B. 2007. Pattern of pH and electrical conductivity upon honey dilution as a complementary tool for discriminating geographical origin of honeys. *Food Chem* 101: 695-703.

ALMEIDA-SILVA IA, SILVA TMS, CAMARA CA, QUEIROZ N, MAGNANI M, NOVAIS JS, SOLEDADE LEB, LIMA EO, SOUZA AL, SOUZA AG. 2013. Phenolic profile, antioxidant activity and palynological analysis of stingless bee honey from Amazonas, Northern Brazil. *Food Chem* 141: 3552-3558.

ALMEIDA-MURADIAN LB, STRAMM KM, HORITA A, BARTH OM, FREITAS A. S, ESTEVINHO LM. 2013. Comparative study of the physicochemical and



palynological characteristics of honey from *Melipona subnitida* and *Apis mellifera*. International. Int J Food Technol 48: 1698-1706.

ANDRADE P, FERRERES F, AMARAL MT. 1997. Analysis of honey phenolic acids by HPLC, its application to honey botanical characterization. J Liq Chromatogr Relat Technol 20: 2281-2288.

BATALHA-FILHO H, WALDSCHMIDT AM, R ALVES MO. 2011. Distribuição potencial da abelha sem ferrão endêmica da Caatinga, *Melipona mandacaia* (Hymenoptera, Apidae). Magistra 23: 129-133, 2011.

BERGNER KG, HAHN H. 1972. Zum vorkommen und zur herkunft der freien aminoäuren in honig. Apidologie 3: 5-34.

BORSATO DM, PRUDENTE AS, DOLL-BOSCARDIN PM, BORSATO AV, LUZ CFP, MAIA BHLNS, CABRINI DA, OTUKI MF, MIGUEL MD, FARAGO PV, MIGUEL OG. 2014. Topical Anti-Inflammatory activity of a monofloral honey of *Mimosa scabrella* provided by *Melipona marginata* during winter in Southern Brazil. J Med Food 17: 817-25.

ERDTMAN G. 1960. The acetolysis method, a revised description. Svensk Botanisk Tidskrift 39: 561-564.

ESCUREDO O, MIGUEZ M, FERNANDEZ-GONZALEZ MM, SEIJO C. 2013. Nutritional value and antioxidant activity of honeys produced in a European Atlantic area. *Food Chem* 138: 851-856.

FREIRE KRL, LINS ACS, DÓREA MC, SANTOS FAR, CAMARA CA, SILVA TMS. 2012. Palynological origin, phenolic content, and antioxidant properties of honeybee-collected pollen from Bahia, Brazil. *Molecules* 17: 1652-1664.

FINOLA MS, LASAGNO MC., MARIOLI JM. 2007. Microbiological and chemical characterization of honeys from central Argentina. *Food Chem* 100: 1649-1653.

GUERRINI A, BRUNI R, MAIETTI S, POLI F, ROSSI D, PAGANETTO G, MUZZOLI M, SCALVENZI L, SACCHETTI G. 2009. Ecuadorian stingless bee (*Meliponinae*) honey: A chemical and functional profile of an ancient health product. *Food Chem* 114: 1413-1420.

HADJMOHAMMADI MR, NAZARI S, KAMEL K. 2009. Determination of flavonoid markers in honey with SPE and LC using experimental design. *Chromatographia* 69: 1291-1297.

HEARD TA. 1999. The role of stingless bees in crop pollination. *Annu Rev Entomol* 44: 183-206.

LOUVEAUX J, MAURIZIO A, VORWOHL G. 1978. Methods of melissopalynology. *Bee World* 59: 139-157.

MAIA-SILVA C, SILVA CI, HRNCIR M, QUEIROZ RT, IMPERATRIZ-FONSECA VL. 2012. Guia de plantas visitadas por abelhas na caatinga. Fundação Brasil Cidadão, Fortaleza.

MICHENER CD. 2000. The bees of the world. The Johns Hopkins Univ. Press, Maryland.

RE R, PELLEGRINI N, PROTEGGENTE A, PANNALA A, YANG M, RICE-EVANS C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med 26: 1123-1237.

SILVA AS, ALVES CN, FERNANDES JG, MÜLLER, R. C. S. 2013. Classification of honeys from Pará state (Amazon Region, Brazil) produced by three different species of bees using chemometric methods. J Braz Chem Soc 24: 1135-1145.

SILVA TMS, CAMARA CA, LINS ACS, BARBOSA-FILHO JM, SILVA EMS, FREITAS B, SANTOS FAR. 2006. Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 507-511.

Silva, T. M. S., Santos, F. P., Rodrigues, A. E., Silva, E. M. S., Silva, G. S., Novais, J. S., Santos, F. A. R., & Camara, C. A. (2013). Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaira (*Melipona subnitida*) honey. J Food Compos Anal 29: 10-18.

SILVA TMS, CAMARA CA, LINS ACS, AGRA MF, SILVA EMS, REIS IT, FREITAS BM. 2009. Chemical composition, botanical evaluation and screening of radical scavenging activity of collected pollen by the stingless bees *Melipona rufiventris* (Uruçu-amarela). An Acad Bras Cienc 81: 173-178.

SILVA TMS, CAMARA CA, LINS ACS, BARBOSA JM, SILVA EMS, FREITAS BM, SANTOS FAR. 2006. Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. J Food Compos Anal 19: 507–511.

SLINKARD K, SINGLETON VL. 1977. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. Am J Enol Vitic 28: 49-55.

TRUCHADO P, VIT P, FERRERES F, TOMAS-BARBERAN F. 2011. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis allows the simultaneous characterization of C-glycosyl and O-glycosyl flavonoids in stingless bee honeys. J Chromatogr A 1218: 7601–7607.

## **Resumo**

A espécie de abelha sem ferrão *Melipona mandacaia* é conhecida popularmente como mandaçaia e é nativa do Nordeste brasileiro. Neste estudo

foram realizadas análises palinológicas, físico-químicas, aminoácidos e minerais de quatro amostras de mel da mandaçaia. Os principais constituintes fenólicos foram extraídos e analisados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplado ao detector de arranjo de diodo (CLAE-DAD). A análise palinológica mostrou que o pólen predominante nas amostras de mel foi da espécie vegetal *Mimosa arenosa* (Fabaceae/Mimosoideae), variando de 44.4% a 61.7%. Os flavonóides identificados quercetina, luteolina, kanferol e os derivados de ácido: 3,4-dihidroxibenzoico, 1,2-dihidroxibenzoico, cafeico, cinâmico e ferúlico foram quantificados. Todas as amostras de mel apresentaram os aminoácidos prolina, alanina, serina e treonina. Os minerais predominantes foram o cálcio e potássio. Todos os méis apresentaram atividade sequestradora de radical livre.

Artigo formatado para submissão.

**Palynological origin, phenolic content and antioxidant properties of geopropolis  
collected by mandaçaia (*Melipona mandacaia*) stingless bees**

PR da Silva<sup>1</sup>, TMG da Silva<sup>1</sup>, CA Camara<sup>1</sup>, EMS Silva<sup>2</sup>, FAR Santos<sup>3</sup>, TMS Silva<sup>1\*</sup>

1- Laboratório de Bioprospecção Fitoquímica, Departamento de Ciências Moleculares,  
Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil

2- Colegiado de Zootecnia, Universidade Federal do Vale de São Francisco, 56300-990,  
Petrolina, Pernambuco, Brasil

3-Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana,  
CEP 44036-900, Bahia, Brazil.

**Corresponding author**

Tania Maria Sarmiento Silva

Biofito - Departamento de Ciências Moleculares

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n - Dois Irmãos

Recife, Pernambuco, Brazil

52171-900

Email: sarmentosilva@gmail.com

## Abstract

Meliponiculture is the breeding of indigenous stingless bees. This activity, which is generally undertaken by traditional communities, has local customs according to regional and traditional knowledge. The stingless bee *Melipona mandacaia* (mandacaia) (Smith 1863) is found only in the region of Caatinga in northeastern Brazil, in the states of Bahia and Pernambuco near the São Francisco River. The present work seeks to determine the botanical origin of mandacaia geopropolis and to evaluate its phenolic content and antioxidant properties ( $\beta$ -carotene/linoleic acid system; DPPH and ABTS scavenging). There are 25 pollen types from 15 families that have been identified from the nine geopropolis samples that have been analyzed. The contents of phenolic compounds vary between geopropolis EtOH extracts and hexane, EtOAc and MeOH:H<sub>2</sub>O fractions. Our results reveal that there is a strong relationship between phenolic compounds and antioxidant activity. These results suggest that phenols of mandacaia geopropolis are responsible for antioxidant activity and that mandacaia geopropolis is a rich source of bioactive compounds with potential health benefits.

**Keywords:** *Melipona mandacaia*, geopropolis, phenolic, antioxidant



Meliponiculture is the breeding of indigenous stingless bees. This activity, which is generally undertaken by traditional communities, has local customs according to regional and traditional knowledge. The honey produced by these bees is used as a source of food and medicine and, in some cases, represents an important improvement in family income when households are in supply of it. The primary importance of this species is its role in environmental conservation and fruit production, as it pollinates wild plants and cultivated crops in the semi-arid Caatinga, an area consisting of shrub vegetation, and in the humid pre-Amazonian forest regions (Silva et al., 2006). The stingless bee *Melipona mandacaia* (mandacaia) (Smith 1863) is found only in the region of Caatinga in northeastern Brazil, in the states of Bahia and Pernambuco near the São Francisco River. These bees are responsible for pollinating many plants in the Caatinga and for producing honey that is commercially valuable. The mandacaia also produces geopropolis, a special type of propolis or bee glue that is a mixture of earth and plant resins and waxes (Barth & da Luz, 2003).

Pollen that adheres to the resin in geopropolis contains grains deposited by bees and wind; the latter phenomenon is referred to as wind or anemophily pollination. Thus, pollen analysis is a valuable tool for identifying samples of this apicultural product, as it reveals the product's geographical origin and production season (Barth 1998; Matos et al., 2014).

In recent years, studies of the geopropolis produced by *Melipona* bees have discovered the presence of prenylated benzophenones (Tomás-Barberán et al., 1993), phenolic compounds (Bankova et al., 2000; Souza et al., 2014; Dutra et al., 2014), and di- and triterpenes and gallic acid (Velikova et al., 2000). In addition, samples of geopropolis have exhibited antimicrobial activity, as well as antioxidant (Dutra et al.

2014; Souza et al., 2014), anti-inflammatory, antinociceptive and antiproliferative properties (Franchin et al., 2012; Cunha et al., 2013).

Oxidative stress is thought to contribute to the development of chronic and degenerative diseases, such as cancer, autoimmune disorders, aging, cataracts, rheumatoid arthritis, and cardiovascular and neurodegenerative diseases. The antioxidant properties of geopropolis, due to its high concentration of phenols and other antioxidant compounds (Souza et al., 2014; Dutra et al., 2014), supports its use in preventing chronic degeneration diseases.

The aim of this work is to determine the botanical origin of mandaçaia geopropolis and to evaluate its phenolic content and antioxidant properties from two semi-arid regions in the states of Bahia and Pernambuco in Brazil.

## **Material and methods**

### **Geopropolis samples and fractionation**

Nine samples of geopropolis were collected from two semi-arid regions in the states of Bahia and Pernambuco in Brazil. Samples 1 (March 2012), 3, 4 and 5 (April 2012) were collected in the municipality of Juazeiro, Bahia, and samples 2 (April 2012), 6 (March 2013), 7 (May 2013), 8 (June 2013) and 9 (October 2013) were collected at the campus of Universidad Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF) in the municipality of Petrolina, Pernambuco. The geopropolis (4.9-50.4 g) was extracted with ethanol in an ultrasonic water bath. These ethanol extracts were evaporated thoroughly under reduced pressure to produce a brown residue. The extracts (2.0 g) were suspended in MeOH:H<sub>2</sub>O and partitioned with hexane and ethyl acetate to yield the following corresponding soluble fractions: hexane (795.2-1137.4 mg), ethyl acetate (700.6-994.0 mg) and MeOH:H<sub>2</sub>O (7.9-30.4 mg).

### **Pollen analyses**

The methodology of Matos et al. (2014) was used to analyze pollen grains of the geopropolis. Geopropolis samples (5 g) were ground and stored in ETOH (95%) for 24 hours. Preparations were centrifuged (10 min, 2,500 rpm) and the solid residues were collected. Sediments were treated with a 10% KOH solution (20 mL) for 10 min at boiling point. Preparations were then centrifuged at room temperature in order to concentrate the solid residues; glacial acetic acid (30 mL) was added to the sediments, allowing dehydration for up to 24 hours, and sediments were treated by acetolysis (Erdtman, 1960). Sediments containing pollen grains were mounted on slides containing glycerin gel, washed with distilled water, and incubated in aqueous glycerin (50%) for two hours. Pollen grains on each preparation were counted, and botanical affinity was measured according to Santos (2011).

### **Determination of phenolic content**

The total phenolic content of the samples was determined with the Folin Ciocalteu reagent, according to the method of Slinkard and Singleton (1977) and modified using gallic acid as a standard phenolic compound. EtOH extracts (100 µL) and hexane, EtOAc and MeOH:H<sub>2</sub>O fractions (1 mg/mL) were transferred to a 1-mL Eppendorf tube. The Folin Ciocalteu reagent (20 µL) and distilled water (820 µL) were added and mixed thoroughly. After 1 min, 60 µL of sodium carbonate (15%) was added; the mixture was then allowed to stand for 2 h, and the absorbance was measured at 760 nm in a spectrophotometer (ELISA). The total amount of phenolic compounds was determined in micrograms of gallic acid equivalents using the equation obtained from the standard gallic acid graph.

### **DPPH<sup>•</sup> radical scavenging assay**

Free radical scavenger activity was determined using the DPPH assay, as described previously (Silva et al., 2006) with modifications. Anti-radical activity was evaluated using a dilution series to obtain five concentrations (1-100 µg/µL). This process involved mixing the DPPH solution (23.6 µg/mL in ethanol) with appropriate EtOH extracts and hexane, EtOAc and MeOH:H<sub>2</sub>O fractions, followed by homogenization. After 30 min, the remaining DPPH radicals were quantified by measuring absorption at 517 nm with an automatic Biochrom Asys UVM 340 microplate reader (Cambridge, UK). The percentage of inhibition was given by the following formula: percent inhibition (%) = [(A<sub>0</sub> - A<sub>1</sub>)/A<sub>0</sub>] x 100, where A<sub>0</sub> is the absorbance of the control solution, and A<sub>1</sub> is the absorbance in the presence of samples and standards.

### **ABTS<sup>•+</sup> radical cation decolorization assay**

The radical cation decolorization assay is based on the method described by Re et al. (1999) with modifications. ABTS was dissolved in water to yield a final concentration of 7 mM. The ABTS radical cation (ABTS<sup>•+</sup>) was produced by mixing the ABTS stock solution with 2.45 mM potassium persulfate (final concentration) and allowing the mixture to stand in the dark at room temperature for 16 h. The ABTS<sup>•+</sup> solution was diluted with ethanol to give an absorbance of 0.70 ± 0.05 at 734 nm with an automatic Biochrom Asys UVM 340 microplate reader (Cambridge, UK). Appropriate amounts of the ABTS<sup>•+</sup> solution were then added into 0.5 mL of the sample solutions in ethanol at five concentrations (1-100 µg/mL). After 10 min, the percentage of inhibition of absorbance at 734 nm was calculated for each concentration, which was relative to the

blank absorbance (ethanol). The capability to scavenge the  $ABTS^{\bullet+}$  radical was calculated using the following equation:  $ABTS^{\bullet+}$  scavenging effect (%) =  $[(A_0 - A_1/A_0) \times 100]$ , where  $A_0$  is the initial concentration of  $ABTS^{\bullet+}$ , and  $A_1$  is absorbance of the remaining concentration of  $ABTS^{\bullet+}$  in the presence of the sample.

### **$\beta$ -carotene bleaching (BCB) assay**

The antioxidant activity of the EtOH extracts and hexane, EtOAc and MeOH:H<sub>2</sub>O fractions were evaluated using the  $\beta$ -carotene linoleate model system, as described by Emmons et al. (1999) with modifications.  $\beta$ -carotene (20 mg) was dissolved in 1 mL of chloroform, and 50  $\mu$ L was added to 80.0  $\mu$ L of linoleic acid and 660.0  $\mu$ L of Tween 20. Oxygenated deionized water (140 mL) was added, and the solution was mixed thoroughly. Aliquots (3 mL) of the carotene/linoleic acid emulsion were mixed with samples of EtOH extracts and hexane, EtOAc and MeOH:H<sub>2</sub>O fractions of geopropolis (20.0 and 40.0  $\mu$ g/mL) and incubated in a water bath at 40°C. The emulsion oxidation was monitored by spectroscope, measuring the absorbance at 470 nm over a period of 60 min. The control sample contained solvent in place of the extract. The antioxidant activity was expressed as the percentage of inhibition relative to the control after a 60 min incubation period using the following equation:  $AA = 100(DRC - DRS)/DRC$ . In this equation, AA is the antioxidant activity, DRC is the degradation rate in the presence of the control (= Abs<sub>i</sub>-Abs<sub>f</sub>), and DRS is the degradation rate in the presence of the sample (= Abs<sub>i</sub>-Abs<sub>f</sub>). Abs<sub>i</sub> is the initial absorbance at time 0 and Abs<sub>f</sub> is the absorbance at 20, 40, 60 and 80 min. Trolox (a water-soluble vitamin E analog) at a concentration of 16  $\mu$ g/mL was used as the reference antioxidant.

### **Statistical analysis**

All analyses were performed in triplicate. The results were expressed as the mean  $\pm$  standard deviation and analyzed using the GraphPad Prism 5.0 program (DEMO). Significance was accepted when the  $p$  value was  $\leq 0.05$ . The Pearson's correlation test was used to evaluate correlations. One-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's multiple-comparisons test were used to determine significant differences between the means.

## **Results and discussion**

Results from the qualitative pollen analysis of mandaçaia geopropolis samples 1-9 are summarized in Table 1 and listed as percentages of the total pollen content in each sample. Overall, 25 pollen types from 15 families have been identified from the nine geopropolis samples analyzed. *Senna* (*Leguminosae*) is the predominant pollen type in eight of the nine geopropolis samples. This pollen type is present in eight samples, representing 3.2% to 50.0% of the total pollen. *Senna* species are very common plant species in the Caatinga region, and its presence in mandaçaia geopropolis in large amounts is expected. Sample 7 contains only two types of pollen: *Senna* (50%) and *Malpighia* (50%). *Mimosa* is the second most abundant pollen type, present in six samples and predominant in sample 6. Species of this genus are also common in Caatinga. Matos et al. (2014) has analyzed twenty-two propolis samples produced by *Apis mellifera* L. in the semi-arid region of Bahia and has found that the pollen type *Mimosa pudica* is abundant and present in all samples analyzed, indicating that a possible source of this propolis is a very common invasive species, occurring frequently in degraded areas and roadsides. Pollen grains from other species are present in many of the geopropolis samples, although at lower levels. A number of specific plant varieties are present in the nine geopropolis samples, at levels ranging from 3.00% to 42.86% of

the total pollen grains. All of these are relatively common plants in Caatinga. In samples 3, 7, 8 and 9, five pollen types are unknown. The pollen types that occur at low frequencies in the geopropolis samples indicate which botanicals species are supplying resin and which flora of the Caatinga region are important (Matos et al, 2014). The abundance of plants with high pollen productivity is of high meliponicultural potential. The pollen spectra of the nine geopropolis samples studied reflect vegetation characteristics of the northeast region of Brazil near the São Francisco River. The identification of meliponicultural plants is extremely important because it indicates the food sources used for the collection of nectar and pollen. It is also very important in efforts to grow and maintain natural vegetation. The results presented are the basis for future studies that would help to certify new meliponicultural products.

The results obtained show that phenolic content varies in the geopropolis EtOH extracts (42.41-213 mg GAE/g) and fractions of hexane (17.50-41.39 mg GAE/g), EtOAc (51.29-290.55 mg GAE/g) and MeOH:H<sub>2</sub>O (30.19-289.81 mg GAE/g) (Table 2). Using the Tukey test ( $p < 0.05$ ), we observe significant differences in total phenolic content values obtained for each of the nine geopropolis samples. With the exception of samples 7-9, EtOAc fractions show higher total phenolic content and hexane fractions show a lower amount.

Our results agree with those obtained by Souza et al. (2013) in studies on the geopropolis of jandaira (*Melipona subnitida*) and by Dutra et al. (2014) in studies on the geopropolis produced by *Melipona fasciculata*. The samples in these studies show that the EtOAc fractions represent a higher total phenolic content than the other fractions examined.

The geopropolis shows characteristic amounts of polyphenols based on its botanical and geographical origins. These origins may explain the observed differences between

samples in this study. Although the samples have been collected in one general area, near the São Francisco River in a semi-arid region of northeastern Brazil, the differences in the amounts of phenolic compounds may be related to specific factors such as weather, time of collection and vegetation near the beehives. Further studies are needed to identify the phenolic compounds present in the geopropolis of mandaçaia.

Antioxidants have attracted much interest because of their protective effect against free radical damage, which is the cause of many diseases, including cancer. Three different methods were used to determine the antioxidant properties of the geopropolis, allowing us to obtain information about the activity of these extracts during the different stages of the oxidation reaction (Prior et al., 2005). The methods used include the inhibition of  $\beta$ -carotene, cooxidation in a linoleic acid model system, and DPPH and ABTS scavenging.

The results of DPPH radical scavenging activity of the geopropolis samples are summarized in Table 2. The highest effective activities are observed in the MeOH:H<sub>2</sub>O fractions. The hexane fractions are inactive. The results show that geopropolis from two distinct semi-arid regions differ significantly ( $p < 0.05$ ) in EC<sub>50</sub> measurements of DPPH radical scavenging in EtOH extracts and EtOAc and MeOH:H<sub>2</sub>O fractions. Our results also differ from data reported by Souza et al. (2013). These authors found that EtOAc fractions are more active. The antioxidant activity of this natural product is attributed to the phenolic compounds isolated from this fraction: 6-*O-p*-coumaroyl-*D*-galactopyranose, 6-*O*-cinnamoyl-1-*O-p*-coumaroyl- $\beta$ -*D*-glucopyranose, 7-*O*-methyl naringenin, 7-*O*-methyl aromadendrin, 7,4'-di-*O*-methyl aromadendrin, 4'-*O*-methyl kaempferol, 3-*O*-methyl quercetin, 5-*O*-methyl aromadendrin and 5-*O*-methyl kaempferol, compounds that have free radical scavenging properties. Comparing the results of this study with values obtained from the geopropolis collected by *Melipona*



*fasciculata* (Dutra et al., 2014), it appears that the hexane fraction is inactive in two samples and the activities of EtOH extracts and EtOAc and MeOH:H<sub>2</sub>O fractions are different.

In the ABTS assay, the EtOAc and MeOH:H<sub>2</sub>O fractions, which contain the highest levels of phenolic compounds, exhibit the lowest EC<sub>50</sub> value, and free radical scavenging is attributed to the hexane fraction, with an EC<sub>50</sub> ranging from 67.36 ± 0.58 to 100.14 ± 0.73 µg/mL (Table 2). Overall, free radical scavenging activity for ABTS in extracts and fractions of geopropolis is higher than for the DPPH radical. The EC<sub>50</sub> values of extracts and fractions show significant differences (p < 0.05). Differences in antioxidant activity from the same samples in different assays may be a result of the reaction mechanisms in each method. Dutra et al. (2014) also show that extracts obtained from *Melipona fasciculata* geopropolis have higher radical scavenging activity with ABTS compared with DPPH, except in the case of the inactive hexane extract.

The results obtained from the β-carotene/linoleic acid system (t = 60 min) with the geopropolis extracts and fractions are presented in Table 2. Our data indicate robust antioxidant capacity in EtOH extracts and EtOAc fractions. Among the nine samples analyzed, no significant differences are observed in the same geopropolis samples (Table 2). Comparing the results of this study with values obtained in studies of *jandaira geopropolis* (Souza et al., 2013), we have found that antioxidant activity for all extracts and fractions is higher in mandaçaia geopropolis. However, different samples exhibit varying degrees of antioxidant capacity. The results reveal that there is a strong relationship between phenolic compounds and antioxidant activity.

These results suggest that phenols of mandaçaia geopropolis are responsible for antioxidant activity. The correlation between results from the DPPH, ABTS and antioxidant methods and total phenolic content are shown in Table 3, suggesting that

geopropolis is a rich source of bioactive compounds with potential health benefits. Further studies are needed to identify the phenolic compounds present in mandaçaia geopropolis.

## **Conclusion**

The palynological analysis of nine *M. mandacaiá* geopropolis samples from semi-arid regions indicates the presence of 25 pollen types from 15 families. *Senna* (*Leguminosae*) is the predominant pollen type in eight of the nine geopropolis samples. All samples exhibit antioxidant activity except for the hexane fraction that is inactive against the DPPH radical. The present study demonstrates that the phenolic content of the mandacaiá geopropolis samples is responsible for antioxidant activity, suggesting that geopropolis is a rich source of bioactive compounds with potential health benefits.

## **Acknowledgments**

This work was financially supported by grants from CNPq (CNPq-PPBio 503285/2009-9), FACEPE (PRONEM APQ-1232.1.06/10) and CAPES.

## References

Bankova, V. S., de Castro, S. L., Marcucci, M. C. (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31: 3-15.

<http://dx.doi.org/10.1051/apido:2000102>

Barth, O. M. (1998). Pollen analysis of Brazilian propolis. *Grana*, 37: 97-101.

<http://dx.doi.org/10.1080/00173139809362650>.

Barth, O. M., da Luz, F. P. (2003). Palynological analysis of Brazilian geopropolis sediments. *Grana*, 42: 121-127. <http://dx.doi.org/10.1080/00173130310012512>

Cunha, M. G., Franchin, M., Galvão, L. C. C., Ruiz, A. L. T. G., Carvalho, J. E., Ikegaki, M., Alencar, S. M., Koo, H., Rosalen, P. L. (2013). Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13:23. <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6882-13-23>

Dutra, R. P., Abreu, B. V. B., Cunha, M. S., Batista, M. C. A., Torres, L. M. B., Nascimento, F. R. F., Ribeiro, M. N. S., Guerra, R. N. M. (2014). Phenolic acids, hydrolyzable tannins, and antioxidant activity of geopropolis from the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62: 2549–2557. <http://dx.doi.org/10.1021/jf404875v>

Emmons, C. L., Peterson, D. M., Paul, G. L. (1999). Antioxidant capacity of oat (*Avena sativa* L.) extracts. 2. In vitro antioxidant activity and contents of phenolic and tocol

antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 4894-4898.

<http://dx.doi.org/10.1021/jf990530i>

Erdtman, G. (1960). The acetolysis method. A revised description. *Svensk Botanisk Tidskrift*, 39: 561–564.

Franchin, M., Cunha, M. G., Denny, C., Napimoga M. H., Cunha, T. M., Koo, H., Alencar, S. M., Ikegaki, M., Rosalen, P. L. (2012). Geopropolis from *Melipona scutellaris* decreases the mechanical inflammatory hypernociception by inhibiting the production of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . *Journal of Ethnopharmacology*, 143: 709-715.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2012.07.040>

Matos, V. R., Alencar, S. M., Santos, F. A. R. (2014). Pollen types and levels of total phenolic compounds in propolis produced by *Apis mellifera* L. (Apidae) in an area of the Semi-arid Region of Bahia, Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 86:407-418. <http://dx.doi.org/10.1590/0001-376520142013-0109>

Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 4290-4302. <http://dx.doi.org/10.1021/jf0502698>

Re, R., Pelegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26:1231-1237. [http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)

Santos, F. A. R. (2011). Identificação botânica do pólen apícola. *Magistra*, 23: 4-9.

Silva, T. M. S., Camara, C. A., Lins, A.C.S., Barbosa-Filho, J. M., Silva, E. M. S., Freitas, B. M., Santos, F. A. R. (2006). Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19:507-511.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2005.12.011>

Slinkard, K., Singleton, V. L. (1977). Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology Viticulture*, 28: 49–55.

Souza, S. A., Camara, C. A., Silva, E. M. S., Silva, T. M. S. (2013). Composition and Antioxidant Activity of Geopropolis Collected by *Melipona subnitida* (Jandaíra) Bees. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013: 1-5.

<http://dx.doi.org/10.1155/2013/801383>

Tomás-Barberán, F. A., García-Viguera, C., Vit-Olivier, P., Ferreres, F., Tomás-Lorente, F. (1993). Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela, *Phytochemistry*, 34: 191-196. [http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)90804-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(00)90804-5)

Velikova, M., Bankova, V., Marcucci, M. C., Tsvetkova, I., Kujumgiev, A. Z. (2000). Chemical composition and biological activity of propolis from Brazilian Meliponinae, *Zeitschrift fur Naturforschung C*, 55: 785-789.

Velikova, M., Bankovaa, V., Tsvetkovab, I., Kujumgievb, A., Marcuccic, M. C. (2000).  
Antibacterial *ent*-kaurene from Brazilian propolis of native stingless bees. *Fitoterapia*,  
71:693-696. [http://dx.doi.org/10.1016/S0367-326X\(00\)00213-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0367-326X(00)00213-6)

Table 1. Palynological analysis of mandaçaia (*Melipona mandacaia*) geopropolis samples.

Family	Botanical origin	% Frequency								
		01	02	03	04	05	06	07	08	09
Amaranthaceae	Alternanthera	-	4.76	-	3.20	-	-	6.25	-	-
Anacardiaceae	Anacardiaceae	-	-	-	-	-	14.29	-	-	7.14
Arecaceae	Arecaceae	-	-	-	-	-	-	6.25	-	-
Asteraceae	Vernonia	-	-	-	-	-	-	6.25	3.33	-
Boraginaceae	Cordia	-	-	10.00	-	-	-	-	-	-
Caryophyllaceae	Caryophyllaceae	12.50	4.76	-	6.45	-	-	-	-	14.29
Cecropiaceae	Cecropia	-	-	-	3.20	-	-	-	-	-
Commelinaceae	Combretaceae	-	-	-	3.20	-	-	-	-	-
Convolvulaceae	Ipomoea	-	-	-	-	-	-	-	3.33	-
Leguminosae	Amburana	-	-	-	3.33	-	-	-	-	-
	Chamaecrista	37.50	-	-	-	-	14.29	-	-	-
	Mimosa	-	14.28	-	6.45	-	42.84	12.5	13.33	14.29
	Parapiptadenia	12.50	4.76	-	9.70	-	-	-	3.33	-
	Pithecelobium	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Poincianella	-	42.86	-	29.15	-	-	-	3.33	-
	Senna	12.50	14.28	20.00	3.20	50.00	14.29	18.75	23.33	-
Malpighiaceae	Malpighia	-	-	10.00	12.90	50.00	14.29	-	-	7.14
Malvaceae	Sida	-	-	-	3.20	-	-	-	-	-
Myrtaceae	Myrtaceae	12.50	9.54	30.00	9.70	-	-	-	3.33	7.14
	Psidium	-	-	20	-	-	-	-	-	-
Poaceae	Poaceae	-	4.76	-	6.45	-	-	25.00	-	7.14
Rubiaceae	Borreria	-	-	-	-	-	-	-	-	7.14
	Faramea	-	-	-	-	-	-	-	-	14.29
	Mitracarpus	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Richardia	12.50	-	-	-	-	-	-	-	-
Undetermined	Indet 1	-	-	-	-	-	-	6.25	10.05	-
	Indet 2	-	-	10.00	-	-	-	-	-	7.14
	Indet 3	-	-	-	-	-	-	-	36.64	14.29
	Indet 4	-	-	-	-	-	-	6.25	-	-
	Indet 5	-	-	-	-	-	-	12.50	-	-
Total		100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0



1 **Table 2.** Phenolic content and antioxidant activity of mandaçaia geopropolis samples.

Sample	Total phenolic content (mg GAE/g ± SD)				DPPH (EC <sub>50</sub> ) <sup>b</sup>				ABTS (EC <sub>50</sub> )				β-carotene bleaching (% O.I) <sup>c</sup>			
	EtOH	hexane	AcOEt	MeOH:H <sub>2</sub> O	EtOH	Hexane <sup>d</sup>	AcOEt	MeOH:H <sub>2</sub> O	EtOH	hexane	AcOEt	MeOH:H <sub>2</sub> O	EtOH	hexane	AcOEt	MeOH:H <sub>2</sub> O
1	43.21±2.77	22.96±2.40	137.96±5.94	125.93±7.45	49.80±0.54	-	83.44±0.44	33.25±0.56	32.44±0.22	82.49±0.68	15.42±0.15	14.46±0.12	79.42±2.09	69.25±1.19	80.70±3.83	20.84±0.95
2	96.67±2.80	17.50±2.67	290.55±4.24	289.81±3.24	32.01±0.34	-	50.97±0.46	6.95±0.08	16.73±0.11	98.79±0.33	5.33±0.07	4.62±0.06	87.09±0.13	33.19±0.32	70.42±3.45	43.47±1.21
3	42.41±6.12	37.78±3.94	168.79±2.60	52.31±4.42	54.15±0.81	-	54.15±0.35	57.85±0.30	21.23±0.20	88.39±0.73	11.56±0.10	14.80±0.21	83.26±2.50	57.43±1.41	75.08±1.50	6.48±1.49
4	213.89±5.56	34.63±1.04	191.09±4.35	67.59±1.67	10.73±0.06	-	48.87±0.50	16.09±0.27	10.94±0.02	74.65±0.26	12.50±0.07	16.18±0.07	82.17±0.88	53.29±0.87	72.08±3.89	45.76±1.74
5	108.80±4.63	30.19±2.87	182.96±0.92	298.15±1.85	14.23±0.11	-	57.56±0.55	9.85±0.08	14.82±0.04	85.90±0.69	7.65±0.09	6.16±0.07	73.86±0.34	39.32±3.41	78.85±0.79	51.15±0.95
6	126.85±3.71	41.39±3.64	192.77±6.67	123.61±9.25	95.44±0.71	-	41.84±0.74	12.58±0.18	28.44±0.20	100.14±0.73	12.61±0.07	10.80±0.13	78.53±0.33	40.21±1.21	86.20±1.16	40.78±2.95
7	62.69±1.40	38.06±3.10	67.77±1.37	47.04±1.50	311.33±0.54	-	176.87±0.72	55.11±0.58	44.36±0.41	76.94±0.51	12.99±0.10	41.27±0.22	61.60±1.68	57.28±0.71	75.53±2.95	19.25±1.80
8	60.51±1.18	38.98±4.76	51.29±2.00	30.19±2.43	488.07±1.02	-	199.70±0.99	19.03±0.03	41.43±0.11	67.36±0.58	13.39±0.19	13.57±0.13	39.42±1.41	28.31±1.40	54.25±2.80	39.18±0.26
9	82.02±1.54	37.87±0.94	73.79±2.17	65.37±7.52	97.24±0.69	-	151.23±0.73	44.47±0.52	27.44±0.18	88.02±0.78	13.76±0.08	35.27±0.52	69.77±1.05	41.24±0.46	81.92±1.12	19.44±1.90
Trolox								3.21 ± 00					95.02±0.29	78.34±3.27	95.02±0.30	78.34±3.27

2 <sup>a</sup>Mean value ± standard deviation: n=3

3 <sup>b</sup>Concentration of antioxidant required to reduce the original amount of the radicals by 50%.

4 <sup>c</sup>Oxidation inhibition.

5 <sup>d</sup>No activity.

6

Table 3. Pearson correlation coefficients correlating total phenolic content with DPPH, ABTS and antioxidant methods.

Total phenolic content	DPPH	ABTS
EtOH extract	-0.71	-0.59
Hexane fraction	-	-
EtOAc fraction	-0.88	-0.73
MeOH:H <sub>2</sub> O fraction	-0.75	-0.62