

APLICAÇÃO DA CLAE PARA DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO 10-HIDRÓXI-2-DECENÓICO (10-HDA) EM GELÉIA REAL PURA E ADICIONADA A MEL BRASILEIRO

Shinnosuke Koshio e Ligia Bicudo de Almeida-Muradian*

Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 580, 05508-900 São Paulo - SP

Recebido em 8/8/02; aceito em 6/1/03

HPLC APPLICATION FOR 10-HDA DETERMINATION IN PURE ROYAL JELLY AND HONEY WITH ROYAL JELLY. The aim of this paper was to determine the 10-HDA in pure royal jelly and products containing royal jelly, using HPLC methodology. 10-HDA is the natural indicator of the presence of royal jelly in products and also gives the authenticity of pure royal jelly. The chromatographic conditions used were: isocratic system, C₁₈-H column, auto sampler, diode array UV-VIS detector (225 nm), mobile phase with methanol/water (45:55), pH= 2.5 and α -naphthol as internal standard. The results obtained using laboratory samples for pure royal jelly were 2.37%, varying from 0.15% for honey with 10% of royal jelly to 2.10% for honey with 90% of royal jelly respectively. For commercial products, the 10-HDA content varied from no detectable to 0.026%. The recovery test presented a minimum of 100.44% The detection limit was 45.92 ng/mL and the quantification limit was 76.53 ng/mL.

Keywords: royal jelly; 10-HDA; authenticity.

INTRODUÇÃO

A geléia real é secretada pelas glândulas mandibulares hipofaríngeas das abelhas operárias jovens denominadas nutrizas (entre o 5º e o 14º dia de sua existência). Ela é uma substância viscosa, de coloração branco-amarelada ou branco-acinzentada, levemente opalescente, de odor e sabor "sui-generis", porém não desagradável¹.

A fertilidade e o longo período de vida da rainha, que é alimentada exclusivamente com geléia real, têm interessado as pessoas acreditando-se que a geléia real produza efeitos similares em seres humanos^{1,2}. Baseados em literatura não científica e depoimentos pessoais, alguns efeitos são atribuídos à ingestão da geléia real, como eliminação do cansaço físico e mental, normalização do apetite, ativação das funções cerebrais, fortalecimento da energia vital, melhoria da visão, aumento da resistência frente a infecções virais e rejuvenescimento da pele^{1,2}.

Em testes com animais a geléia real reduz os níveis plasmáticos de colesterol e triglicérides, assim como tem ação anti-inflamatória. Alguns trabalhos citam que há uma inibição no crescimento de tumores².

O componente responsável pelas atividades antibióticas da geléia real é o ácido-10-hidroxi-2-decenóico (10-HDA)². Esta ação antibiótica tem efeito contra os microorganismos: *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Proteus*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*². Trabalhos *in vitro*, utilizando animais, sugerem efeitos antivirais e melhora na resistência contra infecções virais².

A composição da geléia real é complexa contendo várias proteínas, aminoácidos, ácidos orgânicos, esteróides, fenóis, açúcares, minerais dentre outros³. O ácido 10-hidroxi-2-decenóico (10-HDA) é o principal componente da sua fração lipídica⁴ e é considerado também o mais importante princípio ativo da geléia real^{5,6}. A sua concentração pode ser considerada como um indicador da qualidade ou frescor de geléia real adicionada nos produtos⁷. Até o momento, o uso de 10-HDA para comprovar a autenticidade de produtos conten-

do geléia real não é uma prática comum. Além do Brasil, apenas quatro países - Austrália, Coréia, Japão e Tailândia - especificam a presença deste ácido como pré-requisito de autenticidade da própria geléia real ou da sua adição em produtos⁸. Segundo Genç e Aslan⁹ na especificação tailandesa, por exemplo, o teor de 10-HDA não pode ser menor que 1,5 e 0,16% (v/v), respectivamente, para a geléia real e para produtos adicionados com geléia real. No estudo de Bloodworth e colaboradores⁸, as análises das amostras indicaram que nenhuma geléia real pura continha teores menores que 1,5% de 10-HDA e esses autores sugerem a determinação de 10-HDA como indicador da presença de geléia real em produtos.

A mesma conclusão sobre a presença de 10-HDA como indicador foi obtida em um estudo realizado com amostras de geléia real fornecidas por apicultores produtores do Estado de São Paulo e também com o produto adulterado propositalmente. Verificou-se que o teor de 10-HDA em amostras puras de geléia real ocorre em duas faixas de percentual: 1,8 e 3%¹⁰.

No Brasil, publicou-se a Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001, que aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Geléia Real¹¹. Neste regulamento estabelecem-se os requisitos físico-químicos para a geléia real e o valor preconizado para o 10-HDA é, no mínimo, 2% em base seca.

A legislação atual de mel é regida pela Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000, que não prevê a adição de outros componentes no mel¹² e a Portaria SIPA nº 006, de 25 de julho de 1985¹³, somente determina como requisito mínimo de qualidade de mel composto a adição mínima de 0,20% de geléia real.

Assim, o presente trabalho teve a finalidade de validar a determinação do 10-HDA para autenticar o produto geléia real e também como indicador da presença de geléia real em mel composto (adicionado com geléia real).

PARTE EXPERIMENTAL

Material

Amostras de mel e de geléia real foram obtidas em entrepostos de comercialização de produtos apícolas idôneos. Foi efetuada a adi-

*e-mail: ligiabi@usp.br

ção de geléia real em mel ao nível laboratorial, observando-se a técnica utilizada em uma das empresas visitadas. A técnica consiste em misturar suavemente a geléia real e o mel com um pequeno batedor de claras de ovos manual (de 150 mm de comprimento e 15 mm de cabeça) até a formação de uma massa homogênea. As proporções de mel e de geléia real estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Proporções de mel e de geléia real das misturas laboratoriais

Mistura	Proporção (%)	
	Mel	Geléia real
A (Mel Puro)	100	0
B	90	10
C	80	20
D	70	30
E	60	40
F	50	50
G	40	60
H	30	70
I	20	80
J	10	90
K (Geléia real Pura)	0	100

Amostras de méis compostos com geléia real foram adquiridas no comércio da cidade de São Paulo, de empresas registradas no Ministério da Agricultura e inspecionadas pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF). Foram analisadas 9 amostras (lote único de cinco empresas e dois lotes de duas empresas).

Método

Determinação de 10-HDA

Foi utilizado o método analítico por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), de fase reversa com eluição isocrática, baseado nos procedimentos de Bloodworth *et al.*⁸ modificando-se o tipo de coluna¹⁴.

a) Condições de análise

Utilizou-se cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) Shimadzu modelo LC-9A em sistema isocrático composto por bomba, controlador de sistema e auto-injetor Shimadzu SCL-6B, forno de coluna Shimadzu CTO-6A com a coluna Shimadzu ODS-H (C₁₈-H de fase reversa, dimensões 4,0 x 150 mm, cód 228-21336-01) à temperatura ambiente e detector UV-VIS com arranjos de fotodiodo Shimadzu SPD-M6A, ajustado para 225 nm. A fase móvel foi composta por metanol-água ultrapura (obtido do sistema Millipore MilliQ-plus) na proporção 45:55 (v/v) com ajuste de pH para 2,5 com ácido fosfórico, filtrada com membrana Millipore de 0,45 µm e degaseificada durante 10 min com gás hélio antes do uso. A vazão da fase móvel foi ajustada para 0,5 mL/min. O tempo total de corrida foi de 40 min e os dados foram integrados por meio do "software" Shimadzu SPD-MXA.

Conforme recomendado na revisão de O'Neil e Schwartz¹⁵, a coluna foi freqüentemente lavada, na posição normal e invertida, com uma solução de metanol:clorofórmio na proporção 50:50 (v/v), previamente filtrada com membrana Millipore de 0,45 µm e degaseificada durante 10 min com gás hélio antes do uso, com a finalidade de limpeza de possíveis substâncias retidas na coluna.

b) Preparação dos padrões e das amostras

b1) Solução padrão interno de α -naftol: 100 mg do padrão de α -

naftol (Sigma) foram pesados e dissolvidos em 100 mL de fase móvel (1,0 mg/mL). Uma alíquota desta solução foi diluída na proporção 1:10 com fase móvel (0,1 mg/mL). Desta segunda solução foram pipetados 30 mL, completando-se com fase móvel para 100 mL (30 µg/mL).

b2) Curva padrão de 10-HDA utilizada na quantificação do teor de 10-HDA das misturas laboratoriais de mel e de geléia real: 4,20 mg do padrão de 10-HDA (Azwell Inc.) foram pesados e dissolvidos com a fase móvel para 25 mL (168 µg/mL). Desta solução foi retirada uma alíquota de 10 mL e diluída com fase móvel para 25 mL (67,2 µg/mL). A partir desta solução, alíquotas de 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; e 8,0 mL foram pipetadas em balões volumétricos de 10 mL e 1,0 mL da solução padrão de α -naftol foi adicionado em todos os balões (1,72; 3,36; 6,72; 13,44; 26,88; e 53,76 µg/mL, respectivamente). As soluções foram filtradas por membrana Millex 0,45 µm (Millipore) e uma alíquota de 5 µL foi injetada no cromatógrafo. Por meio de uma análise de regressão, foi obtida uma curva padrão de 10-HDA com os seis pontos de concentração.

b3) Curva padrão de 10-HDA utilizada no teste de recuperação: 16,4 mg do padrão de 10-HDA foram pesados e dissolvidos na fase móvel para 50 mL (328 µg/mL). Desta solução foram pipetadas alíquotas de 0,3, 0,6, 1,2, 2,4 e 4,8 mL para balões volumétricos de 10 mL adicionando-se 1 mL de α -naftol, completando-se o volume com fase móvel. As soluções foram filtradas por filtro Millex 0,45 µm e uma alíquota de 5 µL foi injetada no cromatógrafo. As concentrações das cinco soluções foram 9,84; 19,68; 39,36; 78,92 e 157,44 µg/mL e por meio de uma análise de regressão foi obtida uma curva de calibração.

b4) Curva padrão de 10-HDA utilizada na quantificação do teor de 10-HDA dos méis compostos com geléia real: da solução de 328 µg/mL (preparada no item b3), foi diluída na proporção 1:100 com a fase móvel obtendo-se uma solução de 3,28 µg/mL. Desta solução foram pipetadas alíquotas de 0,24; 0,48; 0,96; 1,92 e 3,84 mL em balão volumétrico de 10 mL, foi adicionado 1 mL de α -naftol e completados ao volume com a fase móvel. A solução foi filtrada por filtro Millex 0,45 µm e uma alíquota de 5 µL foi injetada no cromatógrafo. As respectivas concentrações das cinco soluções foram 0,079; 0,157; 0,315; 0,630 e 1,26 µg/mL e por meio de uma análise de regressão foi obtida uma curva de calibração.

b5) Preparo das amostras: cerca de 30 mg de cada amostra foram pesados em balão volumétrico de 10 mL, adicionados cerca de 5 mL de fase móvel, ultrassonicados até completa dissolução da amostra (10 a 30 min), adicionados 1 mL de α -naftol, completados ao volume com a fase móvel e filtrados por filtro Millex 0,45 µm. Uma alíquota de 5 µL de cada solução foi injetada no cromatógrafo.

b6) Teste de recuperação: o teste de recuperação foi baseado no trabalho de Bloodworth *et al.*⁸. Utilizou-se uma quantidade conhecida de padrão de 10-HDA para enriquecimento das amostras, em concentrações de 50, 100 e 150%, preparadas em triplicata. As respectivas concentrações das três soluções foram 39,36; 78,92 e 157,44 µg/mL.

b7) Determinação do limite de detecção e de quantificação: baseados nos trabalhos de Dadgar e Kelly¹⁶ e de Moreno e Salvadó¹⁷, os limites de detecção e de quantificação foram estabelecidos de forma que o teor de 10-HDA fornecesse um pico com altura de três e de cinco vezes maior que a média das alturas do ruído da linha base, respectivamente.

b8) Análises estatísticas: foram realizadas análises estatísticas de regressão e de variância dos dados obtidos por meio do "software" Microsoft Excel 2000^{18,19}.

b9) Tratamento de resíduos químicos: os resíduos químicos gerados foram encaminhados para serem incinerados, junto ao programa de tratamento de resíduos químicos da FCF/USP (Comissão de Descartes Laboratoriais).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta a comparação dos cromatogramas típicos da solução padrão de referência de 10-HDA (linha a), de uma amostra de mel puro (linha b) e de uma amostra de geléia real pura (linha c). Em todos os cromatogramas foi observado um pico representativo do padrão interno (α -naftol) e somente nas análises da geléia real pura e do padrão aparece o pico representativo do 10-HDA.

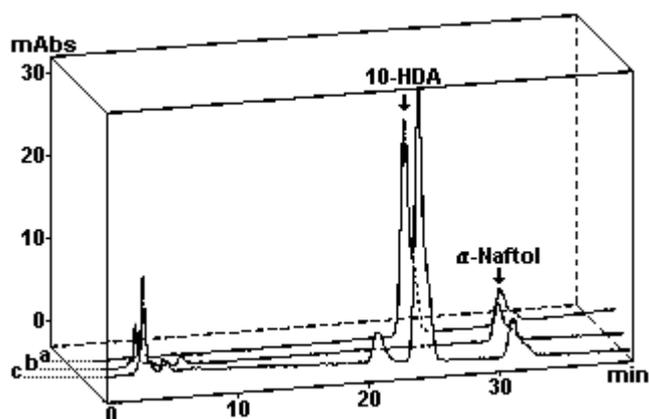


Figura 1. Cromatograma típico da análise para o ácido 10-hidroxi-2-decenóico (10-HDA). Solução padrão de referência do 10-HDA (linha a), amostra de mel puro (linha b) e amostra de geléia real pura (linha c). Condições de análise - coluna: SHIMADZU® ODS-H (4,0X150 mm), vazão: 0,5 mL/min, temperatura ambiente, fase móvel: metanol:água ultrapura (45:55) com pH 2,5, $\lambda = 225$ nm

Por meio do “software” SPD-MXA foi obtida uma sobreposição do espectro de absorção no pico representativo do 10-HDA das amostras analisadas e da solução padrão de referência. O grau de similaridade de 99,85% nos espectros de absorção indica a confirmação da identificação do 10-HDA (Figura 2).

Na determinação quantitativa do teor de 10-HDA das misturas laboratoriais de mel e de geléia real foi realizada uma análise de regressão simples da relação entre a concentração de 10-HDA e a proporção das áreas sob as curvas representativas do 10-HDA e do α -naftol. Foi obtida uma equação de reta linear $y = 0,0942x - 0,0667$ com o coeficiente de determinação $R^2 = 0,999$, onde y é a proporção das áreas dos picos de 10-HDA em relação ao α -naftol e x é a concentração de 10-HDA na solução injetada (ANOVA: $\alpha = 0,05$; F de significação = $3,87 \times 10^{-5}$; $S_e = 0,1024$).

Os resultados dos teores de 10-HDA variaram de não-detectáveis no mel puro até 2,37% na geléia real pura e estão apresentados na Tabela 2. Foi realizada uma análise de regressão da relação entre a porcentagem de geléia real adicionada no mel e o teor percentual de 10-HDA quantificado. Foi obtida uma equação de reta linear $y = 0,024x - 0,125$ com o coeficiente de determinação $R^2 = 0,9896$, onde y é o teor percentual de 10-HDA e x é a porcentagem de geléia real no mel (ANOVA: $\alpha = 0,05$; F de significação = $9,25 \times 10^{-9}$; $S_e = 0,1269$). Os resultados demonstraram que o teor percentual de 10-HDA quantificado nas misturas laboratoriais é proporcional à porcentagem de geléia real adicionada no mel.

No teste de recuperação foi realizada uma análise de regressão

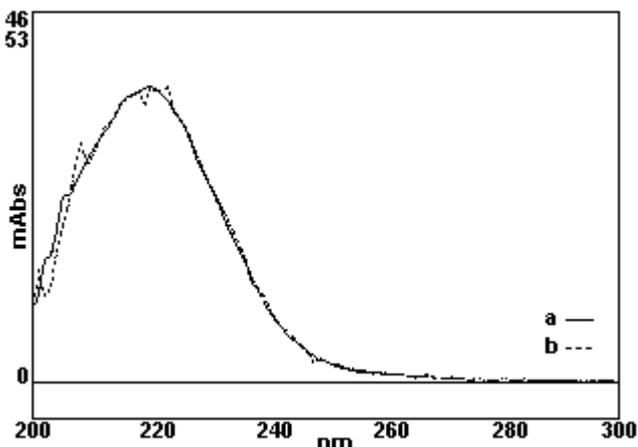


Figura 2. Sobreposição dos espectros de absorção no pico representativo do ácido 10-hidroxi-2-decenóico (10-HDA) de uma solução padrão de referência (linha a) e de uma amostra de geléia real pura (linha b) do cromatograma da Figura 1. Grau de similaridade = 99,85%. Condições de análise - coluna: SHIMADZU® ODS-H (4,0X150 mm), vazão: 0,5 mL/min, temperatura ambiente, fase móvel: metanol:água ultrapura (45:55) com pH 2,5

Tabela 2. Teores percentuais do ácido 10-hidroxi-2-decenóico (10-HDA) quantificado nas misturas laboratoriais de mel e de geléia real. (média e desvio padrão; n = 3)

Mistura	Proporção Mel:Geléia Real	Teor de 10-HDA (%)	
		Média	Desvio Padrão
A	10:0 (Mel Puro)	n.d.	n.d.
B	9:1	0,15	0,01
C	8:2	0,31	0,01
D	7:3	0,56	0,01
E	6:4	0,84	0,02
F	5:5	0,94	0,06
G	4:6	1,31	0,01
H	3:7	1,44	0,02
I	2:8	1,83	0,07
J	1:9	2,10	0,08
K	0:10 (Geléia real Pura)	2,37	0,12

n.d.: teor não detectado

simples da relação entre a concentração de 10-HDA e a proporção das áreas sob as curvas representativas do 10-HDA e do α -naftol. Foi obtida uma equação de reta linear $y = 0,0891x + 0,1638$ com o coeficiente de determinação $R^2 = 0,9988$, onde y é a proporção das áreas do pico de 10-HDA em relação ao α -naftol e x é a concentração de 10-HDA na solução injetada (ANOVA: $\alpha = 0,05$; F de significação = $2,01 \times 10^{-3}$; $S_e = 0,2235$). As taxas de recuperação obtidas estão apresentadas na Tabela 3. Pelo método de adição do padrão de 10-HDA, a taxa de recuperação variou de 100 a 102% nos três níveis testados.

Os limites de detecção e de quantificação foram de 45,92 ng/mL e de 76,53 ng/mL, respectivamente.

Na determinação quantitativa do teor de 10-HDA das amostras de méis compostos com geléia real comerciais foi realizada uma análise de regressão simples da relação entre a concentração de 10-HDA e a proporção das áreas sob as curvas representativas do 10-HDA e

Tabela 3. Taxa de recuperação do ácido 10-hidroxi-2-decenóico (10-HDA). (média e desvio padrão; n = 3)

Concentração de 10-HDA ($\mu\text{g/mL}$)		Taxa de Recuperação			
Inicial	Adicionado	$(\mu\text{g/mL})$		$(\%)$	
		Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
n.d.	39,36	40,01	0,67	101,65	1,71
n.d.	78,72	79,07	2,95	100,44	3,75
n.d.	157,44	158,89	10,37	100,92	6,58

n.d. = teor não detectado

do α -naftol. Foi obtida uma equação de reta linear $y = 0,0769x - 0,0026$ com o coeficiente de determinação $R^2 = 0,9975$, onde y é a proporção das áreas dos picos de 10-HDA em relação ao α -naftol e x é a concentração de 10-HDA na solução injetada (ANOVA: $\alpha = 0,05$; F de significação = $1,01 \times 10^{-4}$; $S_e = 0,0026$).

Os resultados dos teores de 10-HDA variaram de não-detectáveis nas amostras A lote a, A lote b e F lote b até 0,0260% na amostra E (Tabela 4). Os dados obtidos demonstraram que não existe nenhuma correlação entre a quantidade declarada de geléia real adicionada no mel composto e o teor de 10-HDA quantificado. Como não existe até o momento um padrão de identidade e qualidade para méis adicionados de geléia real na legislação brasileira, utilizou-se para uma comparação dos dados a legislação tailandesa⁸, onde o teor de 10-HDA em produtos adicionados com geléia real não pode ser menor que 0,16%. Neste caso, as amostras analisadas estariam fora desta especificação.

Tabela 4. Teores percentuais do ácido 10-hidroxi-2-decenóico (10-HDA) quantificado nas amostras de méis compostos com geléia real comerciais. (média e desvio padrão; n = 3)

Marca	Proporção Mel:GR declarada no rótulo	Teor de 10-HDA (%)	
		Média	Desvio Padrão
A lote a	98:2	n.d.	n.d.
A lote b	98:2	n.d.	n.d.
B	99:1	0,0072	0,0014
C	99:1	traços	traços
D	98:2	0,0194	0,0045
E	98:2	0,0260	0,0022
F lote a	99,8:0,2	0,0030	0,0011
F lote b	99,8:0,2	n.d.	n.d.
G	99,7:0,3	0,0028	0,0013

n.d.: teor não detectado

Podemos presumir que esta diversidade nos teores percentuais de 10-HDA nos produtos analisados seja resultado da variação na qualidade da geléia real pura adicionada no preparo do mel composto, que pode apresentar diversos valores distintos no conteúdo de 10 HDA de 1,58 até 3,39%¹⁰.

Neste sentido, quando da elaboração de uma futura legislação brasileira de mel composto com geléia real, sugere-se a inclusão do teor mínimo de 10-HDA como requisito de qualidade, da mesma forma que a especificação tailandesa.

CONCLUSÕES

Os resultados permitem as seguintes conclusões:

- a determinação do ácido 10-hidroxi-2-decenóico (10-HDA) por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em amostras de geléia real e de méis adicionados com geléia real pode ser considerada um método bastante satisfatório por apresentar uma taxa de recuperação que variou de 100 a 102% e limite de detecção de 45,92 ng/mL;
- não existiu nenhuma correlação entre a quantidade de geléia real declarada no rótulo de méis compostos comerciais analisados e o teor de 10-HDA quantificado. No entanto, pode-se afirmar que a ausência de 10-HDA pode indicar a fraude do produto, uma vez que a geléia real é o único produto que possui 10-HDA em sua composição.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES e ao CNPq pelas bolsas concedidas.

REFERÊNCIAS

1. Puttkammer, E.; *Geléia real - métodos e técnicas de produção, coleta e armazenamento*, EPAGRI: Florianópolis, 1994.
2. <http://www.fao.org/docrep/w0076e/w0076e00.htm>, acessada em Outubro 2002.
3. Yang, Y. F. *apud* Jia, L.; Zhang, H. X.; Hu, Z. D; *Chromatographia* **1995**, *41*, 605.
4. Blum, M. S.; Novak, A. F.; Taber, S.; *Science* **1959**, *130*, 452.
5. Maeda, T.; Kuroda, H.; Motoyoshi, K. *apud* ref. 3.
6. Murata, T.; Chen, Z. H.; Zou, L. S. *apud* ref. 3.
7. Matsui, M.; *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* **1988**, *29*, 297.
8. Bloodworth, B. C.; Harn, C. S.; Hock, C. T.; Boon, Y. O.; *J. AOAC Int.* **1995**, *78*, 1019.
9. Genç, M.; Aslan, A.; *J. Chromatogr. A* **1999**, *839*, 265.
10. Garcia-Amoedo, L. H.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 1999.
11. [http://www.agricultura.gov.br/das/dipoa/instrução normativa03 01.htm](http://www.agricultura.gov.br/das/dipoa/instrução%20normativa03%2001.htm), acessada em Abril 2001.
12. http://www.agricultura.gov.br/sda/dipoa/anexo_instrnorm11.htm, acessada em Novembro 2000.
13. BRASIL, Portaria SIPA nº 006, de 25 de julho de 1985, *Diário Oficial da União*, Brasília, 2 de ago. de 1985, Seção 1, p. 11100.
14. Koshio, S.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2001.
15. O'Neil, C. A.; Schwartz, S. J.; *J. Chromatogr.* **1992**, *624*, 235.
16. Dadgar, D.; Kelly, M.; *Analyst* **1988**, *113*, 229.
17. Moreno, P.; Salvadó, V.; *J. Chromatogr. A* **2000**, *870*, 207.
18. Costa Neto, P. L. O.; *Estatística*, Edgard Blücher: São Paulo, 1997.
19. Laponi, J. C.; *Estatística usando excel 5 e 7*, Laponi Treinamento e Editora: São Paulo, 1997.