Avaliação da atividade antioxidante de diferentes amostras de mel por métodos *in vitro*

Julie Wisniewski (PIBIC/Fundação Araucária/UEPG), Luana Castilho (IC), Ana Carolina M. Hacke (PG), Inês Janete Mattozo Takeda (PQ), José Carlos R. Vellosa (PQ), Romaiana Picada Pereira (Orientadora), e-mail: romaiana@yahoo.com.br.

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Química

Área: Química e Subárea: Bioquímica

Palavras-chave: Mel, atividade antioxidante, estresse oxidativo.

Resumo

O mel possui efeitos benéficos como, por exemplo, a ação antioxidante, a qual é de extrema importância por prevenir o estresse oxidativo associado a diversas doenças. Porém, os efeitos do mel podem variar conforme a sua composição que, por sua vez, é influenciada por vários fatores, dentre eles o local de sua produção. Assim, neste estudo, foi avaliada a atividade antioxidante de extratos fenólicos de amostras de mel provenientes de diferentes regiões do Brasil. Para isso, três métodos *in vitro* (ensaio do poder redutor, DPPH e ABTS) foram empregados. De forma geral, o mel 1, de origem botânica polifloral e proveniente da região General Carneiro – PR, apresentou maior atividade antioxidante ($p<0,05$) nos três métodos empregados. Desta forma, a referida amostra será melhor investigada em relação a sua composição química e mecanismos de ação antioxidante *in vitro* e *in vivo*.

Introdução

Os antioxidantes são substâncias capazes de bloquear ou inibir espécies reativas, podendo prevenir a sua formação, bloquear a ação ou reparar as biomoléculas afetadas. Quando existe um desequilíbrio na formação de espécies reativas e na ação dos antioxidantes, ocorre o chamado estresse oxidativo, o qual causa efeitos nocivos ao organismo, estando relacionado ao desenvolvimento de doenças como o Parkinson, diabetes e câncer (Scalbert et al., 2005). Desta forma, produtos naturais com propriedades antioxidantes são alvo crescente de estudo, como exemplo o mel, que possui propriedades bioativas como: antioxidantes, anti-inflamatória e antimicrobiana (Aljadi et al., 2004). Contudo, tais propriedades dependem da sua origem botânica, clima e temperatura. Considerando as possíveis variações no perfil de componentes bioativos em decorrência da região de produção, origem botânica entre outros fatores, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antioxidante de extratos fenólicos de mel de diferentes procedências.

Materiais e Métodos

Extração dos compostos fenólicos de mel

Na resina Amberlite® XAD-2 a fração fenólica foi separada dos açúcares. O extrato foi concentrado sob pressão reduzida à 60 ºC. Em seguida, a amostra foi liofilizada e utilizou-se metanol para obter o extrato a 10 mg mL^{-1}.

Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH•
Esse método foi descrito por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (2002) e baseia-se na capacidade do antioxidante em sequestrar o radical DPPH•. Os extratos foram diluídos em etanol nas seguintes concentrações: 10, 25, 50, 100, 200, 500 µg mL^{-1}. O ácido ascórbico foi utilizado como controle. A placa foi incubada por 30 minutos na ausência de luz e então a leitura de absorbância foi realizada a 518 nm em um espectrofotômetro de placas.

Determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS•+
Este método foi descrito por Pellegrini e colaboradores (1999) e baseia-se na capacidade dos compostos com atividade antioxidante em capturar o radical ABTS•+. O ácido ascórbico foi utilizado como controle positivo. A placa foi incubada na ausência de luz por 30 minutos e a leitura foi realizada a 734 nm em um espectrofotômetro de placas.

Ensaio do poder redutor
Esse método foi descrito por Mathew e Abraham (2006), e por meio deste ensaio é possível determinar a capacidade que o composto tem em reduzir o Fe^{3+} a Fe^{2+}, que na presença de $FeCl_3$ forma um complexo de coloração azul intensa, o Azul da Prússia. As leituras foram realizadas a 700 nm em um espectrofotômetro.

Análise Estatística
Os resultados das análises foram expressos como a média ± desvio padrão. Os dados foram analisados estatisticamente pela comparação das médias através do teste *Student-Newman-Keuls*, e $p < 0,05$ foi considerado significativo para todos os casos.

Resultados e Discussão

A determinação da atividade antioxidante foi feita por três métodos distintos, pois os antioxidantes podem atuar por diferentes mecanismos químicos (Koury et al., 2003). A análise de dados dos métodos DPPH• e ABTS•+ foi realizada pelo cálculo de CI_{50}, que é a quantidade do extrato necessária para inibir 50% dos radicais. Os valores calculados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Valores de CI_{50} (µg mL^{-1}) dos extratos fenólicos de mel.

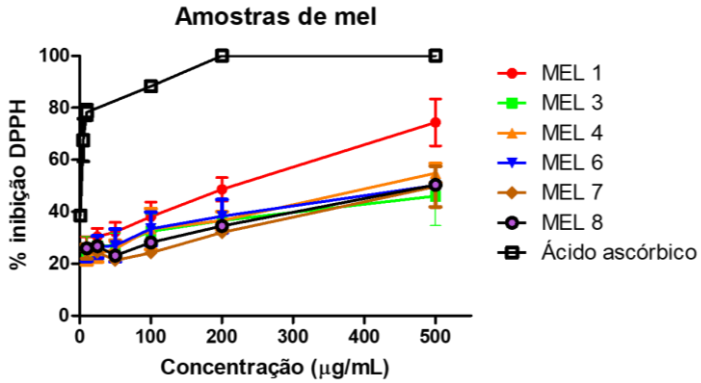
	DPPH•	ABTS•+
	CI_{50} (µg mL^{-1})*	CI_{50}(µg mL^{-1})*
Ácido ascórbico	2,28 ± 0,21 a	8,54 ± 0,61 a
1 – Mel polifloral – General Carneiro PR	178,10 ± 4,31 b	13,39 ± 1,12 b
2 – Mel de angico – Pitanga PR	-	-
3 – Mel de eucalipto – Divinolândia MG	259,46 ± 6,26 c	29,66 ± 2,93 c
4 – Mel silvestre polifloral – Bituruna PR	229,05 ± 2,04 c	32,90 ± 2,36 c
5 – Mel de Baccharis – Caçador SC	-	-
6 – Mel silvestre polifloral – Pitanga PR	550,22 ± 45,43 e	35,03 ± 3,99 c
7 – Mel silvestre polifloral – mistura Bituruna, Campo Largo e União da Vitória	320,60 ± 1,06 d	38,47 ± 3,26 d
8 – Mel silvestre polifloral – Guanhães MG	260,41 ± 27,68 c	44,34 ± 2,60 e

*Valores apresentados como a média ± desvio padrão (n=3). Médias seguidas por letras diferentes (a-e) diferem estatisticamente na mesma coluna (Newman-Keuls a $p < 0,05$).

Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH•

Esse método demonstrou que o extrato fenólico do mel 1 tem maior atividade antioxidante (CI_{50}=178,10 ± 4,31 µg mL^{-1}), sendo possivelmente o extrato com maior teor de compostos fenólicos. Quanto menor o valor de CI_{50} maior a atividade antioxidante do extrato, pois requer uma menor concentração para inibir 50% do radical DPPH•. A Figura 1 apresenta o gráfico de porcentagem de inibição do radical DPPH• em função das concentrações dos extratos de mel.

Figura 1 – Gráfico da porcentagem de inibição do radical DPPH• em função das concentrações dos extratos de mel.

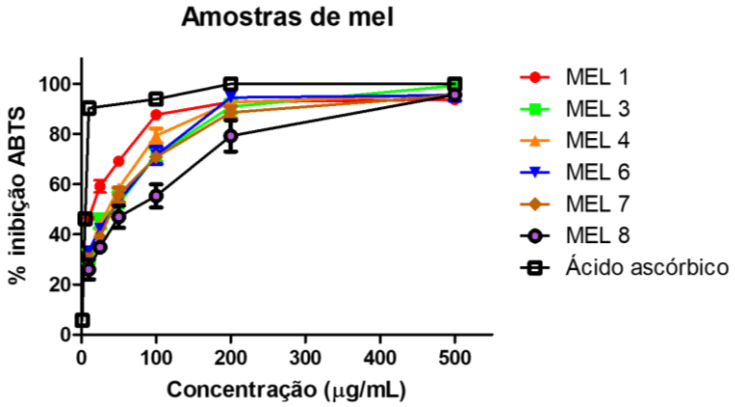


Fonte: A autora.

Determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS•+

Novamente, o extrato fenólico do mel 1 apresentou maior atividade antioxidante ($p<0,05$), como pode ser visto por seu menor valor de CI_{50} demonstrado na Tabela 1. Assim como no método anterior, todas as amostras inibiram 50% deste radical, confirmando a ação dos antioxidantes presentes no mel como mostra a Figura 2.

Figura 2 – Gráfico da porcentagem de inibição do radical ABTS•+ em função das concentrações dos extratos de mel.

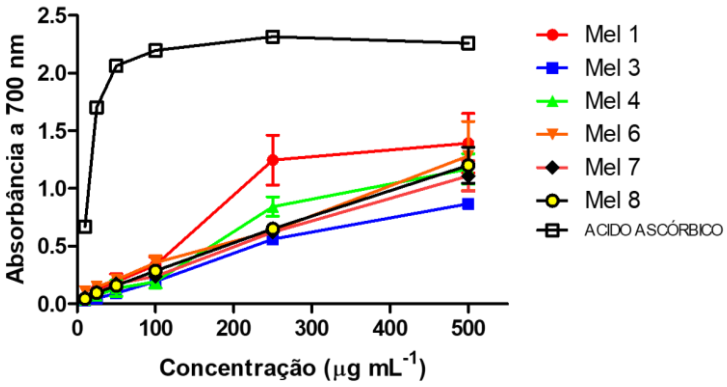


Fonte: A autora.

Determinação do poder redutor

Quanto maior o valor de absorbância da amostra, maior é sua capacidade redutora. A absorbância a 700 nm do extrato do mel 1 é maior, o que indica que sua capacidade redutora é maior que a dos demais extratos testados, o que pode ser explicado pela presença de compostos com capacidade redutora, como mostra a Figura 3.

Figura 3 – Valores de absorbância a 700 nm dos extratos fenólicos de mel.



Fonte: A autora.

Conclusões

Este estudo demonstrou que, de maneira geral, os extratos fenólicos de mel exibiram atividade antioxidante frente aos métodos empregados. No entanto, o extrato fenólico do mel 1 demonstrou os melhores resultados, com CI_{50} 178,10 ± 4,31 pelo método DPPH• e 13,39 ± 1,12 pelo método ABTS•+, além de apresentar maior absorbância a 700 nm no ensaio do Poder Redutor. Pode-se concluir que diferentes mecanismos químicos estão envolvidos na atividade antioxidante observada. Desta forma, a amostra com maior potencial antioxidante será melhor investigada em relação à sua composição química e relação com efeitos biológicos através de estudos *in vivo*.

Agradecimentos

UEPG, PIBIC Fundação Araucária.

Referências

Aljadi, A. M. e Kamaruddin, M. Y. Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. **Food Chemistry**, 85: 513-518, 2004.

Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenchaft und-Technologie**, v. 28, p. 25-30, 1995.

Mathew, S.; Abraham, T. E. Studies on the antioxidant activities of cinnamon (Cinnamomum verum) bark extracts, through various in vitro models**. Food Chemistry**, v. 94, p. 520-528, 2006.

Pellegrini, N.; Re, R.; Yang, M.; Evans, C. R. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azinobis(3-ethylenebenzothiazoline-6 sulfonic acid radical cation decolorization assay. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 379-389, 1999.

Scalbert, A., Johnson, I. T. e Saltmarsh, M. Polyphenols: antioxidants and beyond. **The American Journal of Clinical Nutrition**. 81: 215S-217S, 2005.