

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA**

**DIEGO AUGUSTO DOMINGUES**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E DO POTENCIAL  
ANTITUMORAL DE EXTRATOS DE MEL**

**SÃO GABRIEL**

**2017**

**DIEGO AUGUSTO DOMINGUES**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E DO POTENCIAL  
ANTITUMORAL DE EXTRATOS DE MEL**

Trabalho de conclusão de curso de graduação em  
Biotecnologia da Universidade Federal do Pampa,  
como requisito para obtenção do Título de  
Bacharel em Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Andrés Delgado Cañedo

**SÃO GABRIEL**

**2017**

**DIEGO AUGUSTO DOMINGUES**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E DO POTENCIAL  
ANTITUMORAL DE EXTRATOS DE MEL**

Trabalho de conclusão de curso de graduação em  
Biotecnologia da Universidade Federal do Pampa,  
como requisito para obtenção do Título de  
Bacharel em Biotecnologia

Defesa de Trabalho de Conclusão de Curso defendida e aprovada em:

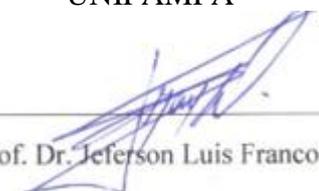
Banca examinadora:



---

Prof. Dr. Andrés Delgado Cañedo

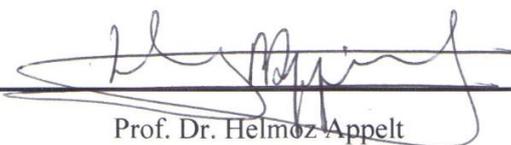
Orientador  
UNIPAMPA



---

Prof. Dr. Jeferson Luis Franco

UNIPAMPA



---

Prof. Dr. Helmoz Appelt  
UNIPAMPA

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais Cesar Augusto Domingues e Simoni Panovitch Ibrahim que não mediram esforços para me apoiar em todos os sentidos. À minha querida avó Dalva Panovitch, segunda mãe, sempre presente.

À minha namorada Rafaela de Oliveira Zanchi, que alegria o meu dia toda vez que a vejo.

## **AGRADECIMENTO**

Ao Prof. Dr. Andrés Delgado Cañedo, pela confiança, pelos momentos de aprendizado, orientação, e pelo estímulo para a condução deste trabalho;

Aos professores que, apesar das dificuldades, mantém o ímpeto para o desenvolvimento do curso de Biotecnologia no Campus São Gabriel;

Às técnicas Susiane Cavinatto Meira e Daiane Bevilaqua, aos professores Helmoz Appelt e Jeferson Franco, às doutorandas Giulianna Echeverria e Nathane Rodrigues, e aos colegas Hudson Marques e Josiely Machado, pessoas que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho;

Aos meus amigos e colegas, pelo convívio e momentos de descontração;

Muito obrigado!

“Mais cedo ou mais tarde, a teoria sempre acaba  
assassinada pela experiência”.

Albert Einstein

## RESUMO

O mel é um composto produzido pelas abelhas a partir de néctar, com a adição de algumas enzimas e posterior desidratação. Além do seu uso como alimento, o mel também é utilizado pelas suas várias propriedades biológicas, ou nutracêuticas. Neste trabalho foram realizadas extrações do tipo líquido-líquido (partição) com água e adição dos solventes orgânicos acetato de etila e hexano, polar e apolar, respectivamente; de modo a produzir extratos caracterizados pelo baixo teor de açúcar com o objetivo de purificar compostos bioativos do mel, que tenham atividade biológica referente à atividade antioxidante e potencial antitumoral. Brevemente, trinta gramas de mel foram pesados e misturados a 300 mL de água e a solução foi movida para um funil de separação onde continha cada solvente. Após devida agitação, a parte com solvente foi transferida para um rotaevaporador. Após total evaporação dos solventes, as amostras foram ressuspensas com álcool etílico, e as alíquotas foram movidas para tubos de ensaio e evaporadas em centrífuga à vácuo. As amostras foram ressuspensas novamente em solvente dimetilsulfóxido para posteriores análises. Amostras de extrato aceto-etílico, extrato hexânico, e mel bruto foram analisadas em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência gerando um perfil cromatográfico de picos que foi importante para verificar a diversidade de moléculas presentes em cada extrato. Posteriormente, cada amostra teve seu potencial antioxidante averiguado em ensaios químicos como Fenóis totais, FRAP (ferric reducing antioxidant power) e ABTS (sal de amônio do ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzenotiazolina6-sulfônico). O potencial antitumoral foi testado, através do parâmetro de viabilidade celular, utilizando-se 4 µL (10 mg/mL) de cada amostra em células de linhagens leucêmicas K562 e Jurkat em meio de cultura tipo RPMI-1640 contendo 10% de soro fetal bovino (SFB). Os resultados do trabalho demonstraram uma diferença entre a atividade antioxidante de amostras de extrato aceto-etílico comparadas com amostras de extrato hexânico e de mel bruto. Correlações entre as amostras para todos os ensaios antioxidantes denotam a diferença estatística da amostra de extrato aceto-etílico tendo o maior potencial antioxidante quando comparada com a amostra de extrato hexânico e amostra de mel bruto ( $p < 0,001$ ). Este resultado foi confirmado pelas análises de CLAE, onde o perfil cromatográfico do extrato aceto-etílico mostrou-se mais diversificado, apresentando diversos picos, diferentemente do extrato hexânico que apresentou poucos picos nos comprimentos de onda analisados. Os diferentes ensaios antioxidantes puderam comprovar que o extrato aceto-etílico purifica compostos antioxidantes, e sua atividade foi medida, indicando a possível presença principalmente de flavonoides e ácidos fenólicos. Os resultados de viabilidade celular evidenciam a baixa

citotoxicidade dos extratos testados, porém, a dispersão populacional das células indica que outro processo celular pode estar ocorrendo. Diante disso, outros parâmetros como análise de ciclo celular, diferenciação celular, proliferação celular, e níveis de expressão de proteínas pró e anti-apoptóticas devem ser testados e serão importantes para decidir o uso de extratos de mel como candidatos na prevenção do processo de tumorigênese. Somando-se a isso, todo estudo do mel da região do Pampa será importante para se obter dados de comparação com méis de outras regiões, e principalmente para agregar valor ao mel e à prática de apicultura na região.

Palavras-chave: mel, extratos de mel, potencial antioxidante, potencial antitumoral

## ABSTRACT

Honey is a complex mixture produced by honeybees from floral nectar, supplemented with enzymes and subsequent dehydration. In addition to its use in diet, honey is also used for its various biological properties, or nutraceuticals. In this work liquid-liquid extractions were performed using water plus the organic solvents ethyl acetate and n-hexane, polar and non-polar, respectively; aiming the production of extractions characterized by the absence of most sugars; the objective was to purify bioactive compounds present in honey which had some sort of biological activity including antioxidant activity and antitumoral potencial. Briefly, thirty grams of crude honey were obtained and mixed with 300 mL of water, consequently the solution was moved to a separatory funnel which contained each solvent. After correct agitation, the solvent fraction was transferred to a rotary evaporator. Following total solvent evaporation, samples were resuspended in ethanol, and the aliquots were moved to test tubes and evaporated in a vacuum centrifuge. Samples were again resuspended in dimethylsulfoxide (DMSO) to future analysis. Ethyl acetate extracts, hexanic extracts and crude honey samples were analysed in High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) achieving chromatography peak profiles that were crucial to verify the diversity of molecules present in each extract. Thereafter, each sample had its antioxidant power evaluated in chemical essays like Total Phenolics, FRAP (ferric reducing antioxidant power), and ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)]. The antitumor potential was tested through cell viability, using 4 $\mu$ L (10 mg/mL) of each sample on K562 and Jurkat leukemic cell lines in RPMI-1640 culture medium containing 10% of fetal bovine serum (FBS). Work results showed a difference between the ethyl acetate extract antioxidant activity and the hexanic extract and crude honey antioxidant powers. Correlations between samples for all the essays revealed statistical difference for the ethyl acetate extract sample owning the highest antioxidant power when compared to hexanic extract and crude honey samples ( $p < 0,001$ ). This result was confirmed by HPLC analysis, where the ethyl acetate extract chromatography profile exhibit itself diversified, displaying multiple peaks, differently from the hexanic extract, which displayed few peaks on the inspected wavelength. The antioxidant chemical essays were able to show purification of antioxidant compounds by the solvent ethyl acetate meaning that the compounds flavonoids and phenolic acids were present, and their activity was measured. Cell viability results showed low cytotoxicity effects for both extracts, although the population scattering indicate that other cellular process might be occurring. Beyond that, more parameters, for instance, cell cycle, cell differentiation, cell proliferation, and expression levels of pro and anti-apoptotic proteins must be tested, and will

be decisive to determine honey extracts as potential candidates for prevention of tumorigenesis process. In addition, further studies of Pampa region honey will be important to obtain comparison data to other region's honeys, and most of all, to incorporate value to this honey and stimulate region's beekeeping.

Keywords: honey, honey extracts, antioxidant power, antitumor capacity

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Abelha do gênero <i>Apis</i> e favo. ....	17
Figura 2 – Região de abrangência territorial do bioma Pampa .....	18
Figura 3 – Exportações brasileiras de mel, por valor exportado e por quantidade produzida..	19
Figura 4 – Composição do mel.....	20
Figura 5 – Alguns exemplos de compostos fenólicos .....	23
Figura 6 – Exemplo simplista de interação entre antioxidante e radical livre.....	26
Figura 7 – Possível efeito do mel na via apoptótica.....	27
Figura 8 – Estruturas moleculares dos solventes utilizados .....	28
Figura 9 – Esquema resumido mostrando a organização e condução do processo metodológico, desde a coleta até análises .....	30
Figura 10 – Procedimentos da extração.....	31
Figura 11 – Perfil cromatográfico dos extratos produzidos. Sendo A: extrato aceto-etílico comparado ao mel bruto, B: extrato hexânico comparado ao mel bruto, e C: comparação entre as três amostras .....	37
Figura 12 – Potencial antioxidante do mel e de extratos de acordo com cada ensaio químico	39
Figura 13 – Viabilidade celular dos grupos após 24, 48 e 72h de tratamento. A: Linhagem Jurkat e B: linhagem K562 .....	41

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Nutrientes do mel.....	21
Tabela 2 – Concentrações dos gradientes da fase móvel por tempo .....	32
Tabela 3 – Peso seco e rendimento relativos de cada extrato.....	35
Tabela 4 – Potencial antioxidante do mel bruto, e dos extratos aceto-etílico e extrato hexânico .....	39
Tabela 5 – Viabilidade das linhagens celulares em 24, 48 e 72h após tratamento. Valores em porcentagem.....	41
Tabela 6 – Distribuição de populações celulares de linhagem Jurkat dos grupos após 24, 48 e 72h, delimitando a porcentagem de células vivas (live).....	43
Tabela 7 – Distribuição de populações celulares de linhagem K562 dos grupos após 24, 48 e 72h, delimitando a porcentagem de células vivas (live).....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS

a.C. – antes de Cristo

ABEMEL – Associação Brasileira dos Exportadores de Mel

apud – expressão latina que designa “citado por”

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

et al. – et alii ou et alia, expressão em latim que significa “e outros”

Hep G2 – linhagem celular de hepatoma humano

HMF – Hidroximetilfurfural

DII – Doença inflamatória intestinal

ERO – Espécies reativas de oxigênio

ERN – Espécies reativas de nitrogênio

n. – número

p. – página

ton. – toneladas

v. – volume

## LISTA DE SÍMBOLOS

$p$  – valor p, nível de probabilidade de significância

mPA – miliPascal, unidade padrão de pressão

$n$  – número amostral

pH – potencial do hidrogênio, escala para medir acidez ou basicidade de uma solução

$t_R$  – tempo de retenção

$\mu\text{V}$  – microvolts, unidade de tensão elétrica

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	17
2.1 O mel.....	17
2.2 Mel no Brasil .....	18
2.3 Composição do mel .....	19
2.3.1 Carboidratos .....	20
2.3.2 Proteínas .....	20
2.3.3 Vitaminas e minerais.....	21
2.3.4. Outros compostos.....	22
2.4 Propriedades fisiológicas do mel .....	23
2.4.1 Propriedade antimicrobiana.....	23
2.4.2 Propriedade anti-inflamatória.....	24
2.4.3 Propriedade antioxidante.....	24
2.4.4 Propriedade antitumoral .....	26
2.5 Solventes para preparação de extratos .....	28
2.6 Linhagens leucêmicas Jurkat e K562 como modelo.....	28
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	29
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	30
4.1 Coleta e armazenamento .....	30
4.2. Extração de compostos bioativos do mel.....	30
4.3 Análise de picos em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....	31
4.4 Acesso à atividade antioxidante.....	32
4.4.1 Fenóis totais.....	32
4.4.2 FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power – Poder antioxidante de redução do ferro).....	33
4.4.3 ABTS <sup>+</sup> [sal de amônio do ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzenotiazolina6-sulfônico)].....	33
4.5 Teste de viabilidade celular .....	34
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	35
5.1 Rendimento da extração.....	35
5.2 Análise de picos em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....	36
5.3 Acesso à atividade antioxidante.....	38
5.4 Teste de viabilidade celular .....	40
<b>6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS</b> .....	45
<b>REFERÊNCIAS</b>	
<b>GLOSSÁRIO</b>	
<b>ANEXO</b>	



## 1. INTRODUÇÃO

O conceito de nutrição saudável vem se aprimorando nos últimos anos. As pessoas estão cada vez mais preocupadas na sua dieta e bem-estar. Busca-se uma dieta que ofereça produtos contendo qualidade nutricional em quantidades suficientes (carboidratos, proteínas, lipídios, vitaminas e minerais), e que possam reduzir os riscos de desenvolver certas doenças. Desse preceito surge a classe de alimentos terapêuticos (NAGAI; INOUE, 2004).

O mel é um produto natural considerado terapêutico; é uma solução altamente concentrada de açúcares e outros componentes, como minerais, proteínas, enzimas, vitaminas, ácidos orgânicos, flavonoides, ácidos fenólicos, e outros fitoquímicos (BERTONCELJ et al., 2007). Sabe-se que o mel contém mais de 200 substâncias diferentes, mas é composto majoritariamente por frutose (38%) e glicose (31%). Além disso, o mel contém outras substâncias em menor escala, muitas delas são relacionadas por terem efeito antioxidante, como ácidos fenólicos e flavonoides; enzimas (glicose oxidase, catalase); ácido ascórbico; substâncias carotenoides; aminoácidos e proteínas (GHELDOLF; WANG; ENGESETH, 2002). A concentração desses compostos depende da origem floral e geográfica da origem do mel; além disso, o processamento e o armazenamento também influenciam na sua composição (AL-MAMARY; AL-MEERI; AL-HABORI, 2002). Muitos estudos demonstram a correlação entre o potencial antioxidante e o conteúdo de fenóis totais presentes no mel (ALJADI; KAMARUDDIN, 2004). A importância biológica dos antioxidantes se deve à proteção da integridade celular, onde a função do radical oxidante é transferida para outras moléculas menos deletérias que interagem com outros substratos podendo regenerar-se, evitando assim o dano celular (SIES, 1997).

O mel possui diversas propriedades, entre elas, atividade antibacteriana e antiviral, capacidade anti-inflamatória, inibição das reações de escurecimento de frutas e vegetais, potencial antioxidante, e potencial antitumoral. Embora a região do Pampa Gaúcho seja uma das maiores produtoras de mel do Brasil, existem poucos trabalhos realizados sobre as características biológicas do mel da região (CRUZ et al., 2014). Dessa forma, é de suma importância caracterizar o mel da região do Pampa Gaúcho, localizada no Sul do Brasil, para se obter dados de comparação com méis de outras regiões, e principalmente para agregar valor ao mel e à prática de apicultura na região.

O trabalho de HASSAN et al. (2013) demonstrou que diferentes concentrações de mel

adicionados à um meio de cultura de células de linhagem Hep G2 (hepatoma humano) causam efeito antiproliferativo dose-dependente; porém suas conclusões não clarificam os mecanismos moleculares de morte celular pelo mel, e diante disso, sugere que ainda há muito o que se descobrir para confirmar o mel de uso terapêutico como candidato na prevenção ou tratamento do câncer.

Dentro deste contexto, o trabalho teve como objetivo analisar extratos de mel, visando a purificação de compostos bioativos, que possuam propriedades antioxidantes e/ou antitumorais realizando extrações de partição pela manipulação dos solventes orgânicos acetato de etila ( $C_4H_8O_2$ ) e hexano ( $C_6H_{14}$ ), de acordo com a polaridade. Para investigar a diversidade de moléculas presentes em cada extrato, foi elaborado um estudo do perfil cromatográfico de cada extrato e de mel bruto. Além disso, buscou-se verificar a atividade antioxidante dos extratos em ensaios químicos, e averiguar o potencial antitumoral a partir de testes de viabilidade em células de linhagem leucêmicas dos tipos K562 e Jurkat.

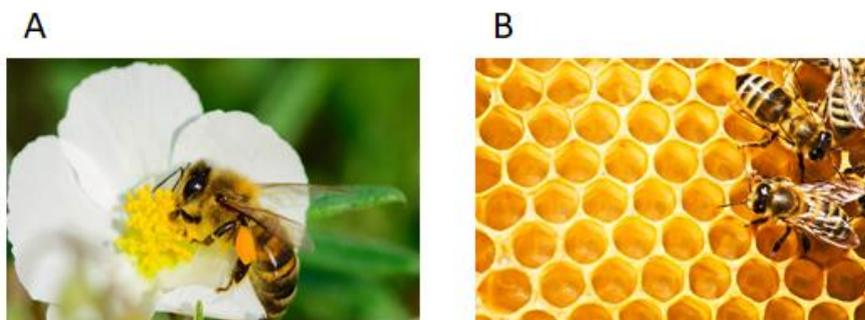
## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 O mel

A primeira utilização do mel na história humana é datada de 2000 a.C. em uma tabuleta suméria, onde era utilizado como curativo. Em muitas outras culturas, como a do Antigo Egito, o mel era utilizado com propósito nutricional e medicinal (WHITE, 1975). Hoje, há um ramo alternativo da medicina denominado apiterapia, onde os efeitos do mel e seus derivados são explorados contra diversas doenças (HELLNER et al., 2008). O uso do mel amplia-se na averiguação de seus efeitos no tratamento de ferimentos, queimaduras e infecções, além da capacidade antimicrobiana e antitumoral. Devido ao seu alto teor de carboidratos, e às suas propriedades o mel é uma excelente fonte de energia. Porém seus efeitos só são alcançados quando ingeridos em doses entre 50 e 80 gramas (KREIDER et al., 2002).

O mel é uma substância viscosa produzida por abelhas do gênero *Apis*. As abelhas adquirem néctar floral de diversas espécies de plantas, e através de atividade enzimática, evaporação de água e regurgitação, produzem o mel e o estocam nos alvéolos de favos (Figura 1). O mel coletado pelas abelhas é utilizado como fonte energética para o metabolismo e para a atividade muscular intensa realizada pelo processo do voo (SUAREZ et al., 1996).

Figura 1 – Abelha do gênero *Apis* e favo.

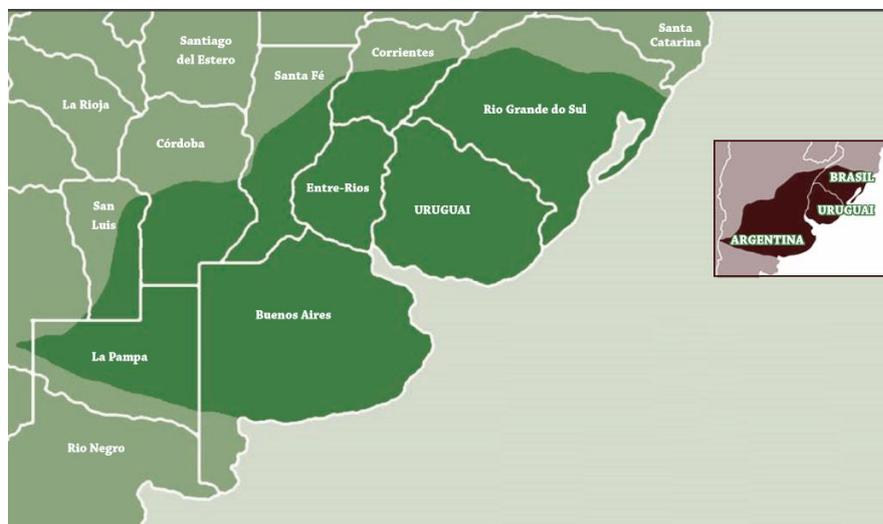


**A:** abelha em seu habitat natural e **B:** estrutura denominada favo, onde o mel é estocado  
Fonte: A: Pierre Guezingar/CCommons e B: shutterstock.com/honeycomb

## 2.2 Mel no Brasil

A apicultura no Brasil foi inserida em 1839, quando algumas colônias de abelhas da espécie *Apis Mellifera* foram trazidas de Portugal. Posteriormente outras raças da mesma espécie foram introduzidas principalmente nas regiões Sul e Sudeste, por imigrantes europeus. Com a introdução da abelha africana (*Apis Mellifera Scutellata*) em 1956, a apicultura brasileira tomou um novo rumo –com o cruzamento entre essas espécies e domesticação das mesmas (SEBRAE, 2015). Atualmente a atividade de apicultura é exercida por cerca de 350 mil produtores brasileiros, e segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o Brasil produziu, em 2013, 35 mil toneladas de mel, com destaque para o estado do Rio Grande do Sul, sendo o estado mais produtor. A região do Pampa Gaúcho é caracterizada pelo predomínio de campos, entremeados por capões de mata, matas ciliares e banhados (Ministério do Meio Ambiente). No Brasil, o bioma Pampa está restrito ao estado do Rio Grande do Sul, onde ocupa uma área de 176.496 km<sup>2</sup>, mas abrange todo o Uruguai e parte da Argentina, como demarcado na Figura 2 (IBGE, 2004).

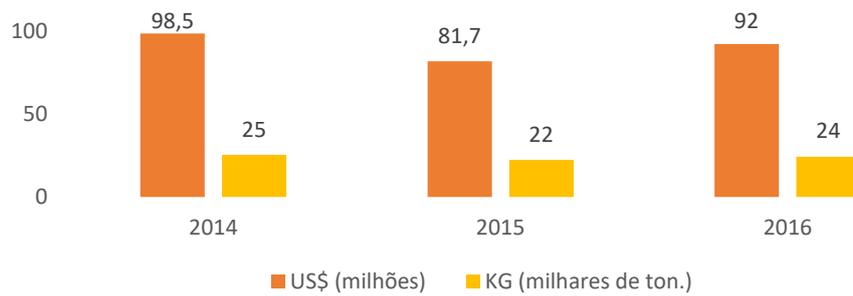
Figura 2 – Região de abrangência territorial do bioma Pampa



Fonte: Santino (2004), adaptado pelo Autor

Já nas exportações de mel, apesar do bom posicionamento do país, o Brasil costuma apresentar melhor ranking em quantidade quando comparado com o ranking em valor, como mostra a exportação entre os anos de 2014 e 2016, exemplificado na Figura 3. Essa tendência aponta a necessidade do país de buscar a produção de produtos com qualidade e valor agregados (SEBRAE, 2014).

Figura 3 – Exportações brasileiras de mel, por valor exportado e por quantidade produzida



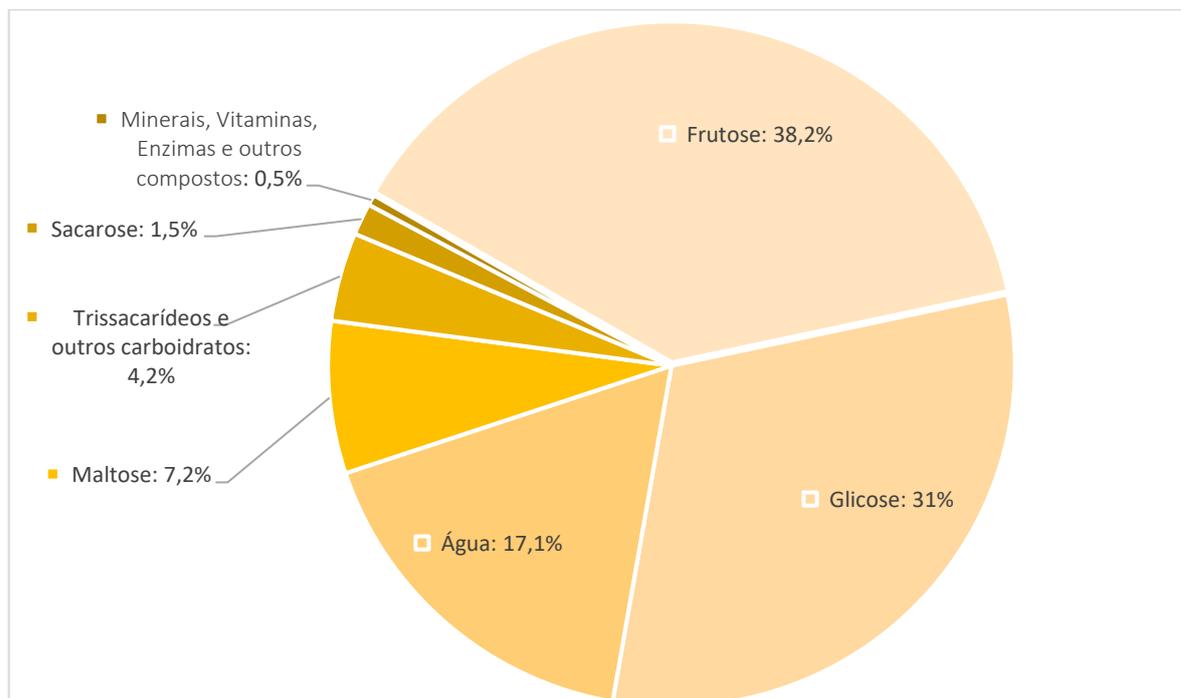
Fonte: ABEMEL (2017), adaptado pelo Autor

Dados preliminares apontam que em 2017 o Brasil passou a ser o 8º maior exportador mundial de mel em termos de valor (US\$/kg), subindo 6 posições no ranking mundial. Em termos de volume mundial de mel exportado, o Brasil subiu 3 posições no ranking de maior exportador, alcançando também o 8º lugar em volume exportado (ABEMEL, 2017).

### 2.3 Composição do mel

Ao todo já foram reportadas mais de 200 substâncias em diferentes tipos de méis. Segundo WHITE (1975), o mel é composto majoritariamente por frutose (38,2%) e glicose (31%), seguido de água (17,1%), maltose (7,2%), trissacarídeos e outros carboidratos (4,2%), sacarose (1,5%), e minerais, vitaminas e enzimas (0,5%), conforme ilustra a Figura 4. Porém, ocorre certa variação da concentração desses compostos de acordo com a região geográfica e a origem floral; além disso, o processamento e armazenamento do mel podem ser fatores modificantes na composição final (AL-MAMARY; AL-MEERI; AL-HABORI, 2002). O mel é rico em carboidratos, mas sua ingestão não apresenta altas taxas de nutrientes essenciais para a dieta diária, como vitaminas e minerais, apesar disso, sua importância fundamenta-se nas suas propriedades fisiológicas, listadas na seção 2.4.

Figura 4 – Composição do mel em porcentagem



Fonte: WHITE (1975), adaptado pelo autor

### 2.3.1 Carboidratos

Açúcares são os maiores constituintes do mel, totalizando 95% do peso seco. Os principais açúcares são os monossacarídeos frutose e glicose, formados a partir da hidrólise do dissacarídeo sacarose. Além disso, outros 25 tipos de açúcares já foram detectados em outros estudos (DONER, 1977).

### 2.3.2 Proteínas

O mel contém aproximadamente 0,5% de proteínas, a maioria delas sendo enzimas e aminoácidos livres. As três principais enzimas componentes do mel são a amilase (degrada amido ou glicogênio em açúcares menores), a invertase (degrada sacarose em frutose e glicose), e glicose oxidase (produz peróxido de hidrogênio e gluconato a partir da glicose) (BOGDANOV et al., 2008). Além disso, o mel possui diminuta concentração da enzima catalase, responsável pela degradação do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$ ).

### 2.3.3 Vitaminas e minerais

O mel é constituído de ínfimas porções de minerais como sódio, cálcio, potássio, magnésio, fósforo, zinco, cobre, ferro, manganês, entre outros; e vitaminas com a filoquinona (K), tiamina (B1), riboflavina (B2), ácido ascórbico (C), entre outros, como demonstrado a seguir na Tabela 1.

Tabela 1 – Nutrientes do mel

Nutriente	Quantidade em 100 g de mel	Ingestão diária recomendada
<b>MINERAIS</b>	mg	mg
Sódio	1,6	550
Cálcio	11383	1000-2000
Potássio	40-3500	2000
Magnésio	0,7-13	300-400
Fósforo	42036	700-1250
Zinco	0,05-2	7-10
Cobre	0,02-0,6	0,5-1
Ferro	0,03-4	10-15
Manganês	0,02-2	2-5
<b>VITAMINAS</b>	mg	mg
Filoquinona (K)	0,025	60-70
Tiamina (B1)	0-0,01	1-1,3
Riboflavina (B2)	0,01-0,02	1,2-1,5
Ácido ascórbico (C)	2,2-2,5	100

Tabela mostrando diversos nutrientes encontrados no mel, sua quantidade em 100g, e a ingestão diária recomendada para cada nutriente.

Fonte: WHITE (1975); ISKANDER (1995); CONTI (2000); BOGDANOV (2008), adaptado pelo autor

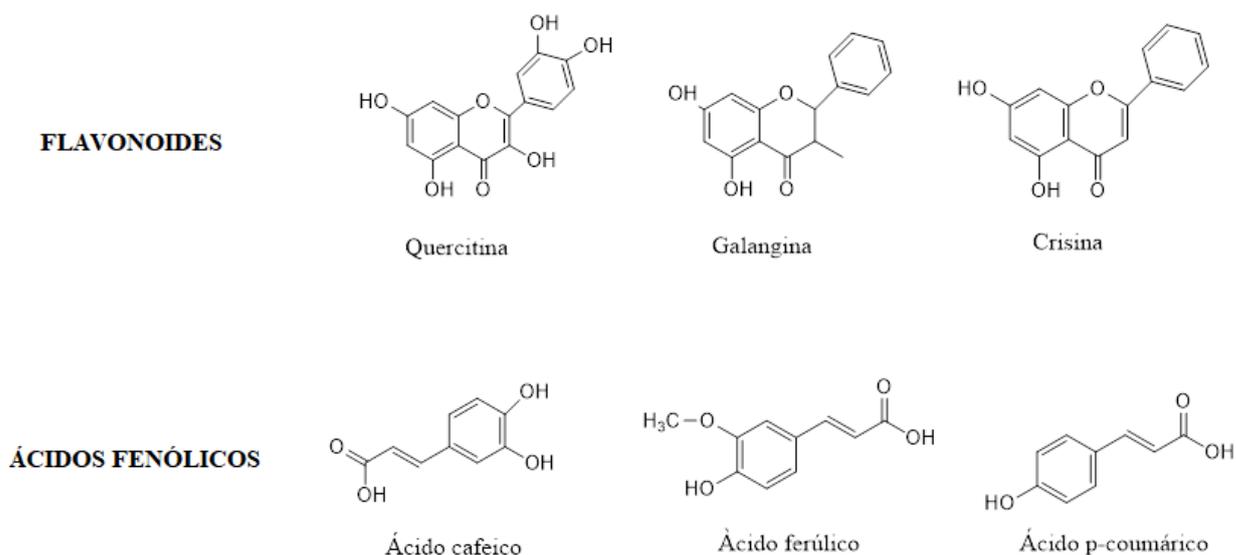
#### 2.3.4. Outros compostos

Polifenóis são um grupo de compostos que possuem atividade funcional no mel. Dentre a classe de polifenóis presentes no mel, destacam-se os flavonoides (quercetina, luteonina, canferol, apigenina, crisina, galangina, apigenina, pinocembrina, pinobanksina, genkwanina) e ácidos fenólicos (cafeico, p-cumárico, ferrúlico, clorogênico, vanílico, cis,trans-abscísico, cinâmico, siríngico) (GHELDOLF; ENGESETH, 2002, GHELDOLF; WANG; ENGESETH, 2002). Os compostos fenólicos caracterizam-se, por apresentar em sua estrutura, vários grupos benzênicos característicos, tendo como substituintes grupamentos hidroxilas. Alguns compostos fenólicos são exemplificados na Figura 5.

Hidroximetilfurfural (HMF), componente muitas vezes indesejado no mel, é o produto da decomposição por desidratação da frutose. A relevância sobre a presença desse composto se deve ao fato de que seus metabólitos apresentarem comprovada atividade genotóxica e carcinogênica (SURH; TANNENBAUM, 1994). Sua composição é aumentada dependendo do armazenamento e do possível aquecimento prolongado do mel –dessa forma sendo utilizado como padrão para controle de qualidade, já que sua elevada concentração retrata um mal processamento do mel (ROSATELLA et al., 2011)

Assim como qualquer outro alimento, o mel pode conter resquícios de contaminantes como metais pesados, pesticidas, antibióticos, entre outros (BOGDANOV, 2006). Acrescenta-se também o fato de algumas plantas naturalmente produzirem compostos tóxicos, como os dipertenoides e alguns alcaloides, os quais serão incorporados ao mel através do néctar coletado pelas abelhas. Apesar disso, os casos de envenenamento pelo mel são raríssimos (EDGAR; ROEDER; MOLYNEUX, 2002).

Figura 5 – Alguns exemplos de compostos fenólicos



Fonte: Autor

## 2.4 Propriedades fisiológicas do mel

### 2.4.1 Propriedade antimicrobiana

O mel é um inibidor do crescimento de microrganismos e alguns fungos e pode ser utilizado como substituinte de antibióticos, em alguns casos (MOHAPATRA; THAKUR; BRAR, 2011). O efeito bacteriostático e bactericida do mel é demonstrado em diversos estudos, principalmente contra estirpes gram-positivas, a maioria sendo patogênica (MOLAN, 1992, 1997). O trabalho de WAHDAN (1997) demonstrou que uma das causas para a atividade antimicrobiana do mel está na alta concentração de açúcares e na baixa concentração de água. Além disso, outras substâncias como ácidos fenólicos, flavonoides; bem como o baixo pH do mel também ajudam no processo bactericida.

Somando-se a isso, sabe-se que a enzima glicose oxidase produz o agente antibacteriano peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), porém a produção de peróxido de hidrogênio também depende

da atividade da enzima catalase presente no mel (WHITE; SUBERS; SCHEPARTZ, 1963 *apud* BOGDANOV, 2008).

O uso terapêutico do mel de forma direta em pacientes é limitada já que o mesmo pode conter esporos de *Clostridium* e *Bacillus spp.*, podendo aumentar riscos de infecções, como botulismo e gangrena e, portanto, deve ser esterilizado previamente através de radiação gama, e não esterilizado por aquecimento –processo que ocasionaria degradação das enzimas citadas (POSTMES; VAN DEN BOGAARD; HAZEN, 1993).

#### 2.4.2 Propriedade anti-inflamatória

A inflamação é uma resposta adaptativa que é desencadeada por estímulos e condições, como infecções ou lesões a tecidos (MAJNO; JORIS, 2004). O processo inflamatório é ativado por enzimas pró-inflamatórias, citocinas e outras moléculas de baixo peso molecular como eicosanoides. As enzimas mais relacionadas ao processo inflamatório são a ciclo-oxigenase-2 (COX-2), que catalisa a transformação de ácido araquidônico em prostaglandina, e ciclo-oxigenase-1 (COX-1), que regula processos homeostáticos. (DAO et al, 2004). Estudos prévios relataram redução de edema e dor em ratos com doença inflamatória intestinal (DII), os quais foram administrados doses de mel. Outro estudo mostra que o uso do mel é tão eficiente quanto o uso de prednisolona (anti-inflamatório esteroide) em modelos de tratamento de colite (inflamação do cólon) (BILSEL et al, 2002).

A razão para parte do efeito anti-inflamatório do mel se deve à presença de flavonoides, dentre eles, galangina o principal –molécula impactante na redução de expressão da COX-2; e ácido cafeico –inibindo a liberação de ácido araquidônico da membrana celular (MIRZOEVA; CALDER, 1996).

#### 2.4.3 Propriedade antioxidante

O termo “estresse oxidativo” refere-se à falta de equilíbrio entre a produção de radicais livres e a atividade protetora de antioxidantes numa determinada célula ou organismo.

Oxidantes são formados como produtos normais do metabolismo aeróbico, mas essa formação pode ser acelerada por algumas condições patológicas (SIES, 1997). Uma das possíveis teorias da ação antioxidante é exemplificada na Figura 6. Espécies reativas de oxigênio (ERO), e espécies reativas de nitrogênio (ERN), radicais hidroxilas (\*OH), superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), óxido nítrico (NO), e peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), entre outros, são agentes causadores de estresse oxidativo que promovem dano a lipídios, a proteínas, e ao ácido desoxirribonucleico (ADN) nas células (ORRENIUS; GOGVADZE; ZHIVOTOVSKY, 2007).

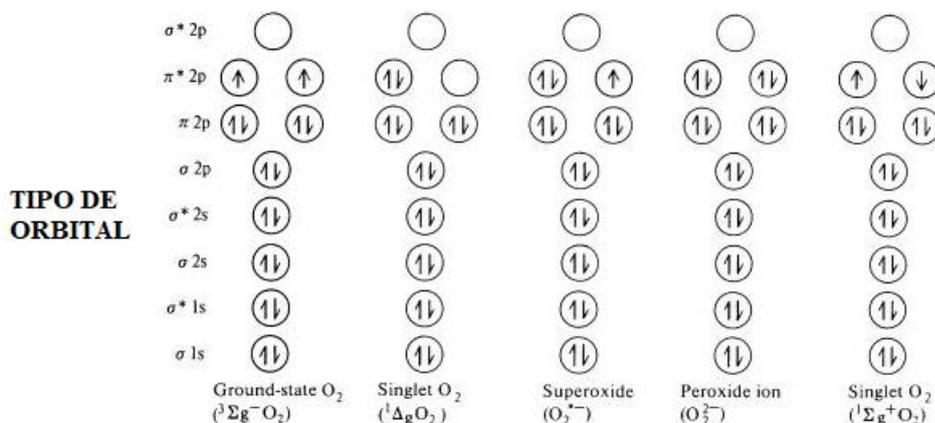
Sabe-se que uma dieta rica em antioxidantes ajuda na prevenção de certos males como doenças cardiovasculares, câncer, envelhecimento celular, e diabetes (AMES et al 1993; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1994). O efeito das moléculas antioxidantes em células é bem debatido na literatura. Sabe-se que as ERO são essenciais para a defesa contra infecções e importante na sinalização celular. Mas o fato de a simples ingestão de antioxidantes como suplemento não contribui diretamente para o aumento da expectativa de vida pois o metabolismo do corpo humano regula minuciosamente o balanço entre oxidantes e ERO; e a ingestão desses antioxidantes não é representativa no contexto desse balanço (HALLIWELL, 2006).

Muitos compostos encontrados no mel tem o potencial antioxidante, incluindo ácidos fenólicos, flavonoides, peptídeos, glicose oxidase, catalase, ácido ascórbico, carotenoides, ácidos orgânicos, e produtos da reação de Maillard (reações entre aminoácidos e açúcares) (AL-MAMARY; AL-MEERI; AL-HABORI, 2002).

ALJADI e KAMARUDDIN (2004) demonstraram uma correlação entre a atividade antioxidante do mel e o conteúdo fenólico total, indicando que a atividade antioxidante do mel é parcialmente devida à presença de compostos fenólicos e flavonoides –apesar dos mecanismos de ação ainda serem desconhecidos. O potencial antioxidante, dependente das concentrações desses compostos, também é variável de acordo com a origem floral e região geográfica, como citado anteriormente.

Dados de CRUZ et al (2014) relatam o efeito benéfico do mel da região do Pampa no aumento de expectativa de vida; bem como o efeito protetor contra estresse oxidativo (induzido por ferro e paraquat) em modelo de *Drosophila melanogaster*. Em seguida, o mel foi testado e comprovou-se a ação contra efeitos deletérios de processos de hipóxia, indicando seu potencial terapêutico em males que envolvem processos de baixas concentrações de oxigênio (CRUZ et al, 2015).

Figura 6 – Versão simplificada da ligação entre oxigênio diatômico e seus derivados, mostrando o desemparelhamento de elétrons nos oxidantes.



O átomo de oxigênio possui 8 elétrons e O<sub>2</sub> possui 16 elétrons

Fonte: HALLIWELL; GUTTERIDGE (2006)

#### 2.4.4 Propriedade antitumoral

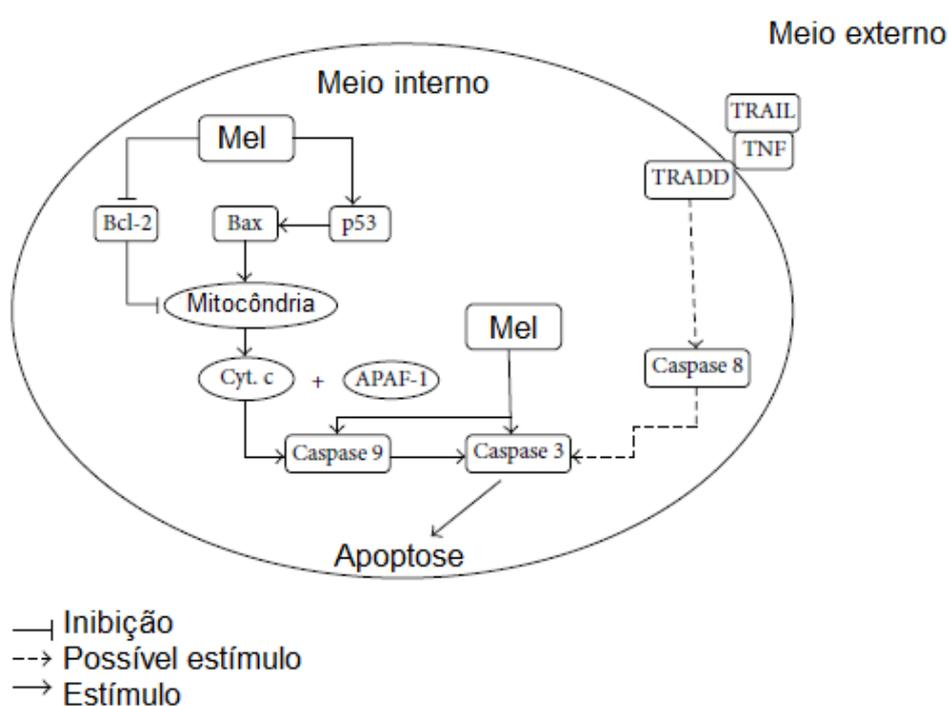
As duas principais características de células tumorais são a proliferação celular descontrolada e o controle de evasão do processo de apoptose. Morte celular programada ou apoptose é um processo celular complexo referente a diversos fenômenos e fenótipos ocorrendo dentro da célula, incluindo retração da célula, perda de aderência com a matriz extracelular, condensação da cromatina, fragmentação do ADN e formação de corpos apoptóticos (SARASTE; PULKKI, 2000). Compostos fenólicos isolados induzem apoptose em vários tipos de linhagem cancerígena através da despolarização da membrana mitocondrial (FAUZI; NORAZMI; YAACOB, 2011). O trabalho de FERNANDEZ-CABEZUDO et al (2013) demonstrou que o mel é indutor da enzima caspase-9, uma caspase iniciadora, que em seguida ativa a enzima efetora caspase-3, cuja função é desencadear a cascata de sinalização de morte celular programada. O mel atua como modulador, na superexpressão (*upregulation*) de proteínas pro-apoptóticas, como por exemplo p53, Bax, caspase-3, e caspase-9; e na diminuição de expressão (*downregulation*) de proteínas anti-apoptóticas, como Bcl2 –todas bem descritas na literatura, apesar do mecanismo não ter sido clarificado, como ilustra a Figura 7.

HASSAN et al. (2013) relatou um efeito antiproliferativo dose-dependente de mel adicionado à um meio de cultura de células de linhagem Hep G2 (hepatoma humano); porém

suas conclusões não clarificam os mecanismos moleculares de morte celular pelo mel.

ABUBAKAR, (2012) sintetiza diversos estudos com compostos fenólicos, isolados industrialmente, em células de linhagens leucêmicas; porém o próprio autor destaca o fato de as interações entre os compostos fenólicos presentes no mel ainda precisarem ser elucidadas; além disso o autor suscita a ausência de trabalhos sobre o efeito do mel nas linhagens leucêmicas.

Figura 7 – Possível efeito do mel na via apoptótica



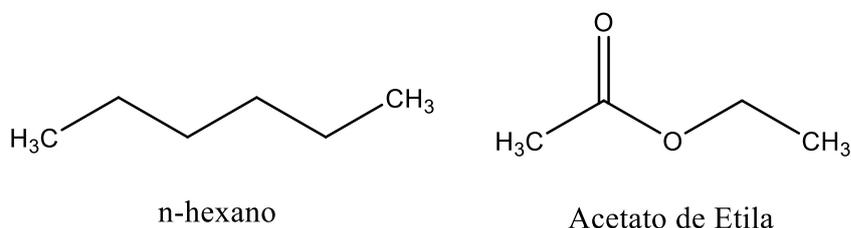
Bcl2: proteína reguladora anti-apoptótica, Bax: proteína reguladora pro-apoptótica, p53: proteína supressora de tumor, Cyt.c: Citocromo C, APAF-1: fator de ativação de protease associada à apoptose 1, TNF: fator de necrose tumoral, TRADD: proteína de domínio de morte associada ao receptor de TNF, TRAIL-TNF: ligante indutor de apoptose relacionado a TNF, caspase 8 e 9: proteases iniciadoras baseadas em cisteína, caspase 3: protease efetora baseada em cisteína.

Fonte: Adaptado de AHMED; OTHMAN (2013)

## 2.5 Solventes para preparação de extratos

No planejamento da produção de extratos naturais, a polaridade e a escolha do sistema de solvente são importantes fatores para a separação dos compostos bioativos do mel, já que este contém substâncias de interesse, tanto hidrofílicas quanto hidrofóbicas; e a interação entre esses dois tipos favorece o potencial antioxidante total do mel (ALJADI; KAMARUDDIN, 2004). As estruturas moleculares dos solventes escolhidos são exibidas na Figura 8.

Figura 8 – Estruturas moleculares dos solventes utilizados



Solventes orgânicos utilizados. Sendo acetato de etila, apolar aprótico, pertencente à família de ácidos carboxílicos e o solvente n-hexano, polar, pertencente à família dos alcanos acíclicos.

Fonte: Autor

## 2.6 Linhagens leucêmicas Jurkat e K562 como modelo

As células de linhagem leucêmica Jurkat remete a células de linfócitos T imortalizadas, isoladas inicialmente do sangue de um garoto de 14 anos com leucemia linfoblástica aguda por SCHNEIDER et al. (1977). Essa linhagem celular é amplamente utilizada como modelo de estudo de leucemia T aguda e sinalização de células T. Além disso, seu uso se estende a determinar mecanismos de susceptibilidade do câncer contra drogas e compostos químicos.

A linhagem celular K562 remete a células imortalizadas de leucemia mieloide e é empregada em estudos de diferenciação celular e proliferação celular. Essa linhagem celular é composta de células malignas hematopoiéticas, que possuem similaridades com células indiferenciadas de granulócitos e eritrócitos.

### 3. OBJETIVOS

O trabalho teve os seguintes objetivos, geral e específicos, respectivamente:

#### Objetivo geral

- Realizar a obtenção de extratos de mel visando a purificação de compostos bioativos que possuam propriedades antioxidantes e/ou antitumorais.

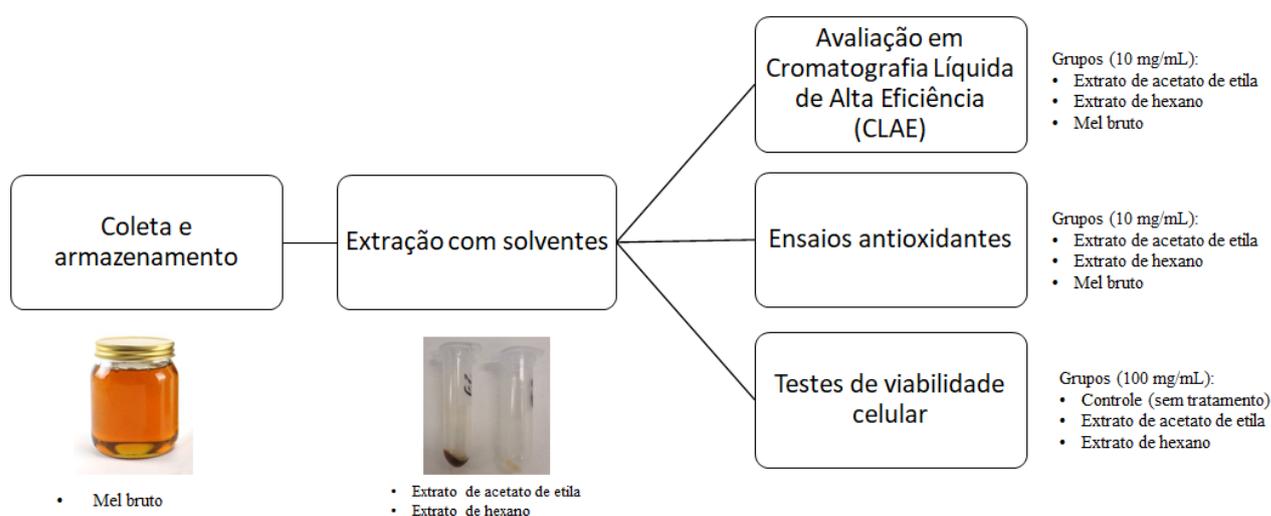
#### Objetivos específicos

- Analisar o perfil cromatográfico de amostras de extrato aceto-etílico, extrato hexânico, e de mel bruto em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Verificar o potencial antioxidante de ambos extratos de mel através de ensaios químicos;
- Investigar o potencial antitumoral de ambos extratos a partir de testes de viabilidade em células de linhagem leucêmica dos tipos K562 e Jurkat.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido e organizado da seguinte forma: o mel coletado foi armazenado até a extração com solventes, e as amostras geradas foram fracionadas para diferentes análises, como demonstra a Figura 9.

Figura 9 – Esquema resumido mostrando a organização e condução do processo metodológico, desde a coleta até análises



Fonte: Autor

### 4.1 Coleta e armazenamento

Amostras de mel da região do Pampa foram produzidas em apiários localizados na Universidade Federal do Pampa em São Gabriel no Estado do Rio Grande do Sul. O mel foi coletado na florada de outono de 2017. As amostras de mel foram estocadas em temperatura ambiente (20-25°C) até as análises.

### 4.2. Extração de compostos bioativos do mel

Extração líquido-líquido, também conhecida como extração por partição foi realizada para separação dos componentes bioativos do mel. Com base na polaridade, dois solventes foram escolhidos: acetato de etila ( $C_4H_8O_2$ ), e hexano ( $C_6H_{14}$ ); onde as extrações foram realizadas em paralelo para cada solvente. Para o preparo dos extratos foram pesados cerca de

trinta gramas de mel, os quais foram dissolvidos em 300 mL de água. Cada solução foi transferida para um funil de separação, onde cada solvente específico era adicionado em etapas de 120, 100 e 80 mL, como medida de eficácia de acordo com o coeficiente de partição. Seguidamente de gentis agitações, a fase com solução de solvente era coletada e filtrada através de papel filtro; e transferida posteriormente para um rotaevaporador, onde cada solvente foi totalmente evaporado. Cada extrato foi ressuspensionado em álcool etílico para retirá-lo do balão usado na evaporação dos solventes, e as alíquotas geradas foram transferidas para tubos de ensaio de vidro e evaporadas em centrífuga à vácuo. As amostras do extrato hexânico e acetoneo foram devidamente pesadas e ressuspensionadas para a concentração de 100 mg/mL em solvente dimetilsulfóxido (DMSO) para posteriores análises (Figura 10).

Figura 10 – Procedimentos da extração



Fonte: Autor

#### 4.3 Análise de picos em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A análise de picos em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi realizada utilizando-se uma coluna analítica SHIM-PACK C18 (250 mm X 4.6 mm). Gradientes foram gerados a partir de: **A)** 0.05% de ácido fórmico em água, e **B)** metanol, de acordo com protocolo de GHELDOF; WANG; e ENGESETH (2002), com algumas modificações. A fase móvel permaneceu nas concentrações relativas de A e B até a parada em 45 minutos, conforme a tabela 2. Cada amostra advinda das extrações foi diluída com água até a concentração de 10 mg/mL. Para a amostra de mel bruto, 1 g de mel foi pesado e diluído em água até a concentração de 10 mg/mL. O volume injetado de cada amostra foi de 20 µL. O fluxo manteve-se em 1,0 mL/min,

e a pressão em 30 miliPascal (mPa). Amostras de mel bruto, extrato aceto-etílico, e extrato hexânico na concentração de 10 mg/mL tiveram seu perfil de picos inspecionados na faixa de 270 nanômetros (nm) do espectro eletromagnético.

Tabela 2 – Concentrações dos gradientes da fase móvel por tempo

Tempo (min)	Concentração de A	Concentração de B
0-10	95%	5%
10-15	70%	30%
15-20	50%	50%
20-25	30%	70%
25-45 <sup>1</sup>	20%	80%
45-55 <sup>2</sup>	95%	5%

<sup>1</sup>: Fim da análise, <sup>2</sup>: Limpeza da coluna  
Fonte: Autor

#### 4.4 Acesso à atividade antioxidante

Todos os ensaios químicos de propriedades antioxidante foram efetuados em placas de 96 poços utilizando um leitor de placas EnSpire 2300 (PerkinElmer) em absorbâncias determinadas para cada tipo de ensaio, especificados nas seções a seguir. Amostras de mel bruto, extrato aceto-etílico e extrato hexânico situavam na concentração de 10 mg/mL. O experimento prosseguiu em triplicata para os ensaios de fenóis totais e FRAP, e em duplicata para o ensaio ABTS. Para cada ensaio foi realizado um “controle” para avaliar possível interferência da amostra na absorbância da reação; um poço contendo apenas água, e outro contendo água + amostras. As absorbâncias médias dos controles foram debitadas nos devidos ensaios. Análises estatísticas foram feitas a partir de testes ANOVA e teste de Tukey, onde gráficos de confiabilidade foram gerados (ANEXO) e a partir destes pôde-se verificar diferença estatística entre os grupos.

##### 4.4.1 Fenóis totais

As amostras de extrato de mel e mel bruto foram detectadas seguindo protocolo *Folin-Ciocalteu* (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENT`OS, 1998) com algumas

modificações. Brevemente, 4  $\mu\text{L}$  de cada amostra de mel bruto, extrato aceto-etílico e extrato hexânico (10 mg/mL) foi misturada com 35  $\mu\text{L}$  do reagente *Folin-Ciocalteu* 1 N. Após agitação, 70  $\mu\text{L}$  de carbonato de sódio 15% ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) foi adicionado junto de água ( $\text{H}_2\text{O}$ ) para a concentração final de 284  $\mu\text{L}$ . A reação permaneceu no escuro por 2 horas e a absorbância foi lida na faixa de 760 nm. Para a curva de calibração foi utilizado ácido gálico nas concentrações entre 0 e 400  $\mu\text{g}$ , e os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}$  de Ácido Gálico Equivalente (AGE)/g de amostra.

#### 4.4.2 FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power* – Poder antioxidante de redução do ferro)

A capacidade de redução das amostras de mel bruto, extrato aceto-etílico, e extrato hexânico foi investigada a partir do protocolo de BENZIE; STRAIN (1996), com algumas modificações. Em suma, 9  $\mu\text{L}$  de cada amostra (10 mg/mL) foram misturados a 270  $\mu\text{L}$  de reagente FRAP. A solução FRAP era constituída de 5 mL do tampão acetato 0.3 M + 500  $\mu\text{L}$  de solução 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) 10 mM + 500  $\mu\text{L}$  de solução de cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) 20 mM. A mistura foi levemente agitada e levada à banho maria onde permaneceu por 30 minutos, até leitura de absorbâncias na faixa de 595 nm. Para a curva de calibração foi utilizado sulfato de férrico de amônio (II) 10 mM nas concentrações entre 0 e 1500  $\mu\text{M}$ , e os resultados foram expressos em  $\mu\text{M}$  de Fe (II) equivalente/g de amostra.

#### 4.4.3 ABTS<sup>+</sup> [sal de amônio do ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzenotiazolina6-sulfônico)]

O poder antioxidante foi medido através da diminuição de captura do radical ABTS<sup>+</sup> a partir do protocolo de BALTRUS<sup>~</sup>AITYTEET et al (2007) com algumas modificações. Primeiramente, uma solução estoque de ABTS foi produzida adicionando-se 1 ml de ABTS 7 mM a 17,5  $\mu\text{L}$  de persulfato de potássio ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) 140 mM. Posteriormente, 200  $\mu\text{L}$  da solução ABTS<sup>+</sup> foram misturados a 10  $\mu\text{L}$  de cada amostra, e o volume foi completado com água até o valor de 250  $\mu\text{L}$ . O decréscimo da absorbância foi lido após 10 minutos. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{M}$  de Ácido Ascórbico Equivalente (AAE) /g de amostra.

#### 4.5 Teste de viabilidade celular

Células de linhagem leucêmicas K562 e Jurkat, cultivadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> foram utilizadas como modelo para experimentação no Laboratório de Cultura Celular Animal na Universidade Federal do Pampa - Campus São Gabriel. Células cultivadas foram transferidas para placa de 24 poços; cada poço contendo meio de cultura celular tipo RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Foi realizada contagem das células em câmara de Neubauer e após feitas diluições do cultivo inicial as células foram semeadas a  $1 \times 10^5$  células por poço no volume de 1 mL. Após 24h, as células, em triplicata, foram tratadas com 4 µL das amostras de extrato aceto-etílico e extrato hexânico na concentração de 100 mg/mL. Após 24h, 48h e 72h de tratamento, as células receberam o corante iodeto de propídeo (PI) seguido de análise em citômetro de fluxo C6 (BD Accuri), onde foram discriminadas em mortas e vivas. As populações celulares foram delimitadas e a porcentagem de células vivas foi determinada com a assistência do *software* FlowJo. A discriminação entre células vivas e mortas é feita por detectores que captam luz dispersa por lasers, e a partir da flutuação da detecção dessa luz é possível explorar informações como *Forward Scatter* (FSC) correspondente ao volume celular, e FL2 (detecção de fluorescência na faixa de 585 nm) correspondente à faixa de absorção do corante PI. Foi escolhida uma replicata de cada tratamento para facilitar a visualização da distribuição populacional, gerando as tabelas 4 e 5, explanadas na subseção 5.4 dos resultados. Análises estatísticas foram feitas a partir de testes ANOVA e teste de Tukey, onde gráficos de confiabilidade foram gerados (ANEXO) e a partir destes pôde-se verificar diferença estatística entre os grupos.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Rendimento da extração

O mel tem uma complexa matriz de substâncias polifenólicas, embora com baixos níveis de concentrações de algumas delas, e também possui alta viscosidade, o que limita alguns métodos de extração como Soxhlet, por exemplo. Portanto é necessário aplicar etapas de purificação, com o objetivo de se obter extratos enriquecidos com substâncias de interesse e livres de interferentes, como cera, por exemplo. Outro fator crucial no desenvolvimento de um método de extração é o rendimento, algo que retrata a viabilidade da extração como um todo.

Desempenhada a extração líquido-líquido utilizando os solventes acetato de etila e hexano, verificou-se o rendimento apresentado na Tabela 3. O rendimento foi medido através da relação percentual de peso seco após a evaporação dos solventes em centrífuga à vácuo. A comparação entre as extrações no sentido de rendimento não se aplica, pois já era esperada uma diferença, já que se trata de solventes de polaridades diferentes. Sendo assim, a presente tabela teve por objetivo expor dados relativos, e incitar que outros métodos de extração podem ser testados de modo que o rendimento seja aprimorado para cada solvente.

Tabela 3 – Peso seco e rendimento relativos de cada extrato

	Extração com acetato de etila	Extração com hexano
Peso seco <sup>1</sup>	55,8 mg	12,4 mg
Rendimento <sup>2</sup>	0,186 %	0,041 %

<sup>1</sup>:Valores referentes após total evaporação dos solventes, <sup>2</sup>:Valores referentes a partir de 30 g de mel iniciais  
Fonte: Autor

## 5.2 Análise de picos em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

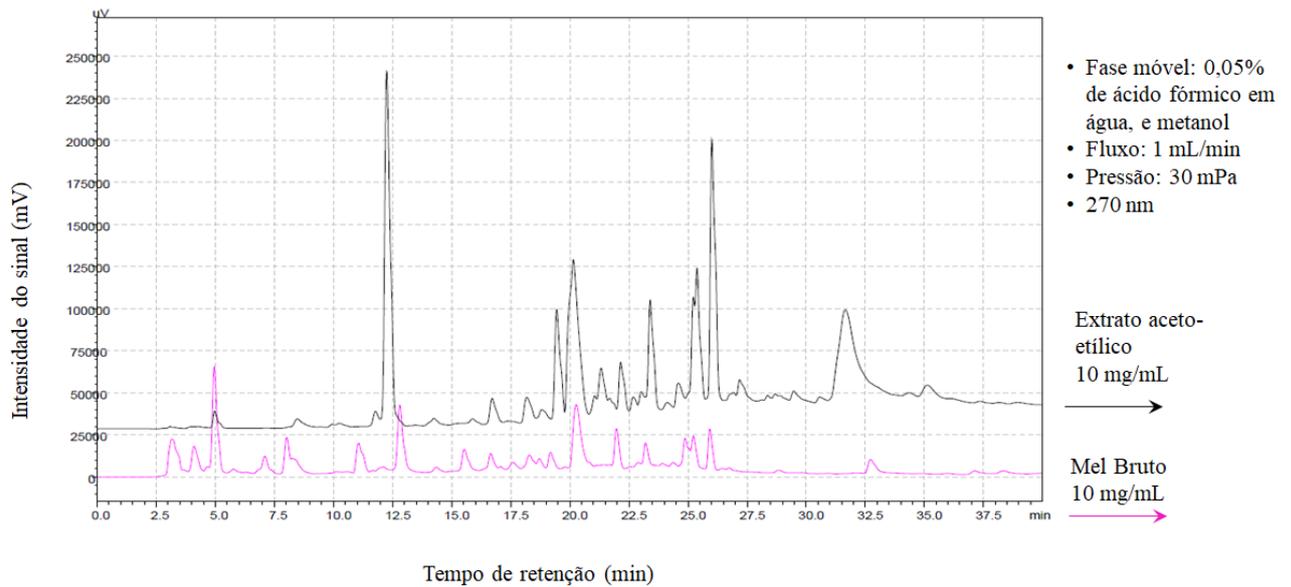
Devido à complexa composição do mel, interações entre diferentes componentes antioxidantes são importantes para a atividade antioxidante total do mel. As análises por CLAE permitiram a visualização dos tempos de retenção para várias substâncias na faixa de 270 nm.

Os perfis de picos demonstrados na Figura 11 denotam uma grande variedade de distintas moléculas sendo solubilizadas pelos solventes. No perfil de picos de extrato aceto-etílico + mel bruto (**A**), verifica-se a obtenção de vários compostos entre os tempos de retenção de 11 e 35 minutos, alguns alcançando intensidades de 250  $\mu\text{V}$ . Já no perfil de picos de extrato hexânico + mel bruto (**B**), verifica-se a obtenção de moléculas mais apolares com tempo de retenção entre 22 e 35,5 minutos, ao passo que alguns picos alcançaram a intensidade de 78  $\mu\text{V}$ . De modo a visualizar e comparar as três amostras, foi gerado o perfil de picos de mel bruto + extrato aceto-etílico + extrato hexânico (**C**) exibindo a característica do perfil de picos entre as amostras.

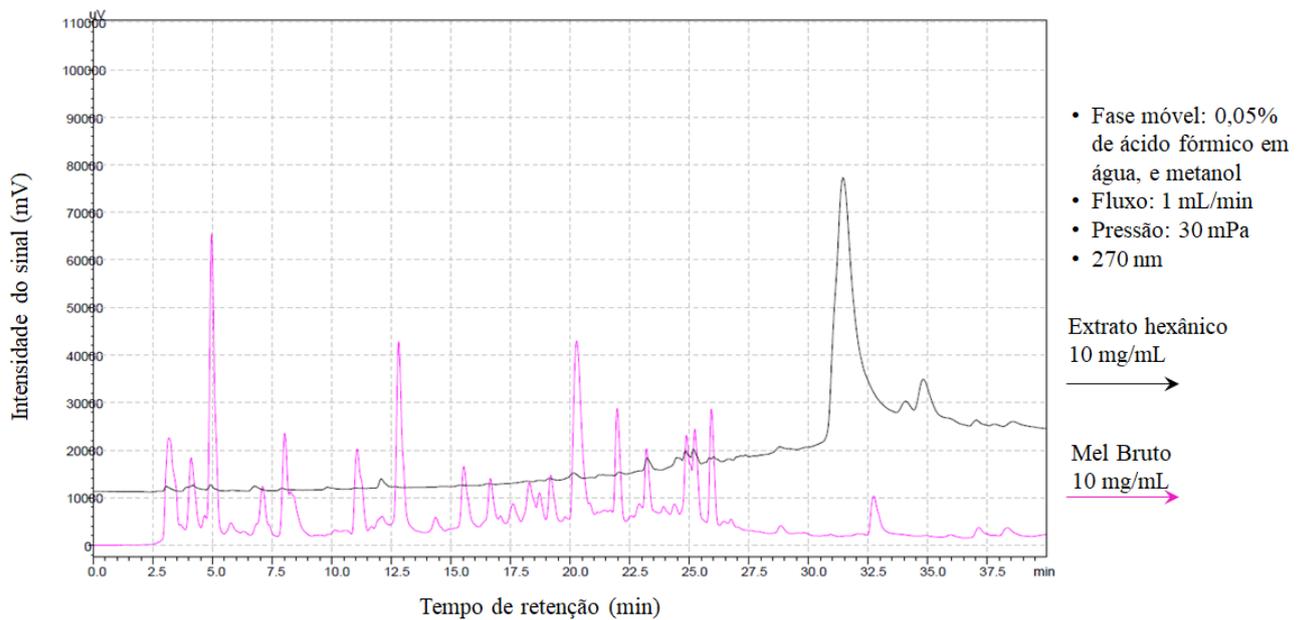
Apesar de não ser possível a identificação das moléculas referentes para cada pico, essa investigação foi importante para analisar a variedade de moléculas e o perfil de picos presentes em cada extrato. Além disso, essa investigação será crucial para futuros experimentos, que visariam o fracionamento dos extratos, de acordo com o tempo de retenção. Acrescenta-se também que os perfis de picos são referentes à faixa de 270 nm do espectro eletromagnético, ou seja, podem haver outras moléculas que não absorvem luz nessa faixa, de modo que estas não fossem detectadas.

Figura 11 – Perfil cromatográfico dos extratos produzidos. Sendo **A**: extrato aceto-etílico comparado ao mel bruto, **B**: extrato hexânico comparado ao mel bruto, e **C**: comparação entre as três amostras

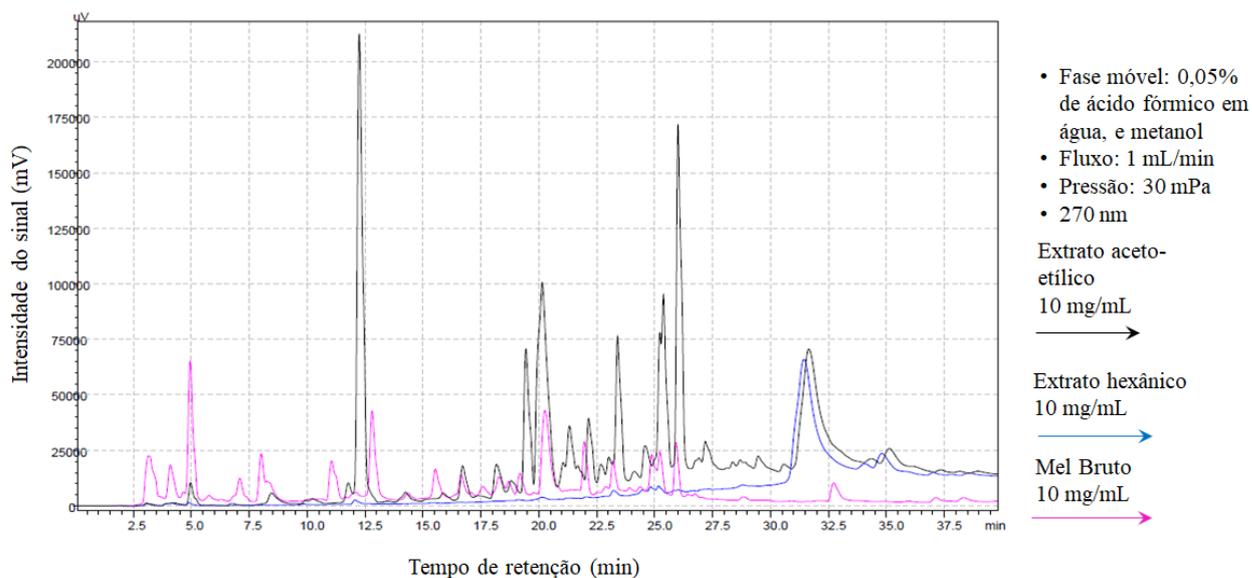
**A –**



**B –**



C –



Fonte: Autor

### 5.3 Acesso à atividade antioxidante

Após executados os ensaios químicos, amostras de extrato acetico-etilico, extrato hexânico, e mel bruto tiveram o potencial antioxidante calculado de acordo com a absorvância das curvas de calibração, gerando assim, valores relativos de equivalência.

Denota-se que a amostra com maior concentração de fenóis totais foi a de extrato acetico-etilico com diferença significativa em relação às outras amostras. Esse extrato também teve a maior concentração equivalente ao ácido gálico no ensaio FRAP, e maior concentração equivalente ao ácido ascórbico no ensaio ABTS, também com diferença significativa em relação às outras amostras (Tabela 4 e Figura 12).

Estes resultados confirmam a predição de que o solvente acetato de etila consegue solubilizar mais moléculas polares –incluindo as moléculas bioativas como ácidos fenólicos e flavonoides. Apesar disso, estima-se possivelmente que muitos compostos fenólicos acabam sendo eluídos na fase com água durante o processo de separação líquido-líquido.

Esse estudo investigou a capacidade antioxidante de extratos de mel realizados com solventes, que pudessem tanto remover o conteúdo em excesso de açúcares, quanto pudessem

solubilizar e purificar compostos bioativos como ácidos fenólicos e flavonoides. Analisando os resultados, neste trabalho-piloto, pode-se ponderar a utilização do extrato de aceto-etílico como possível candidato na suplementação de certos alimentos, visando os benefícios das propriedades antioxidantes.

Tabela 4 – Potencial antioxidante do mel bruto, e dos extratos aceto-etílico e hexânico

	Fenóis totais ( $\mu\text{g}$ de AGE/ g)	FRAP ( $\mu\text{M}$ de Fe II/ g)	ABTS ( $\mu\text{M}$ AAE/g)
Extrato aceto-etílico	186,6 $\pm$ 17,1	360,0 $\pm$ 1,3	330,0 $\pm$ 4,0
Extrato hexânico	72,4 $\pm$ 6,8	259,3 $\pm$ 0	110,4 $\pm$ 38,3
Mel Bruto	63,6 $\pm$ 1,8	257,6 $\pm$ 5,8	128,8 $\pm$ 8,0

Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão médio (n=3), AGE: Ácido Gálico Equivalente, AAE: Ácido Ascórbico Equivalente

Fonte: Autor

Figura 12 – Potencial antioxidante do mel e de extratos de acordo com cada ensaio químico

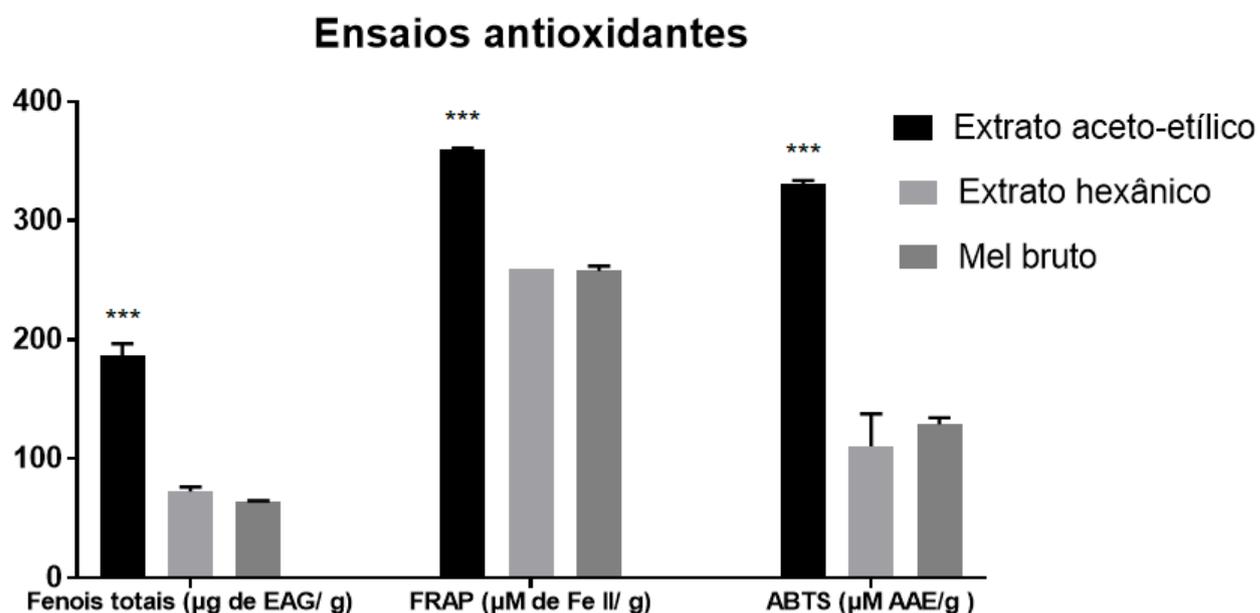


Figura mostrando o potencial antioxidante de cada amostra, de acordo com cada ensaio químico realizado. A amostra de extrato aceto-etílico mostrou-se estatisticamente diferente em todos ensaios.

\*\*\* $p < 0,001$  – extrato aceto-etílico comparado a extrato hexânico e mel bruto. EAG: Equivalente ao Ácido Gálico, EAA: Equivalente ao Ácido Ascórbico.

Fonte: Autor

#### 5.4 Teste de viabilidade celular

ABUBAKAR (2012) relata que a combinação de alguns polifenóis aumentam a atividade antileucêmica de alguns agentes conhecidos por terem efeito antitumorais, porém outros estudos reportam que a combinação direta de certos polifenóis não é sempre benéfica, ou seja, não potencializa o efeito antileucêmico. O mesmo autor menciona que as concentrações de diferentes polifenóis presentes no mel ainda não foram elucidados, e que muita informação é necessária para utilizar o mel como candidato na prevenção e terapia do câncer.

Os extratos aceto-etílico e extrato hexânico não causaram efeito citotóxico significativo como esperávamos. Comparando os extratos ao controle (sem tratamento) nota-se que a viabilidade se manteve em taxas bastante altas (+85%), conforme Tabela 5. Também segundo a figura 13, nota-se que apenas o extrato aceto-etílico teve diferença significativa em relação ao controle (sem tratamento) e ao extrato hexânico no tempo de 24 horas após tratamento para a linhagem celular K562. Porém após 48 e 72h, não houve diferença significativa. Este método é limitado pois se baseia apenas na discriminação de células viáveis, com isso pode-se inferir que algum outro mecanismo celular esteja se sucedendo. Essa suposição é sustentada pela diferença visual da distribuição do volume celular das populações de células de tratamento para tratamento, como demonstram as tabelas 6 e 7. Confirma-se também a importância dos açúcares, ou componentes altamente polares (que não foram diluídos pelos solventes usados), no desencadeamento do processo de apoptose celular, bastante relatado na bibliografia. Como salientado na Figura 7, a abstração do mel sendo usado como desencadeador dos processos celulares é justamente por causa da falta de conhecimento sobre quais são os compostos específicos responsáveis pelo efeito biológico.

Em nossos resultados, a variedade de moléculas extraídas por dois solventes orgânicos não foi eficiente pelo menos no parâmetro de citotoxicidade. Todavia, novos experimentos são necessários para confirmar essa hipótese. Além disso estudos com outros parâmetros como análise de ciclo celular, diferenciação celular, proliferação celular, níveis de expressão gênica de proteínas p53, p21, caspase-3 e caspase-9 serão importantes para elucidar o propósito dos extratos aceto-etílico e extrato hexânico.

Tabela 5 – Viabilidade das linhagens celulares em 24, 48 e 72h após tratamento. Valores em porcentagem

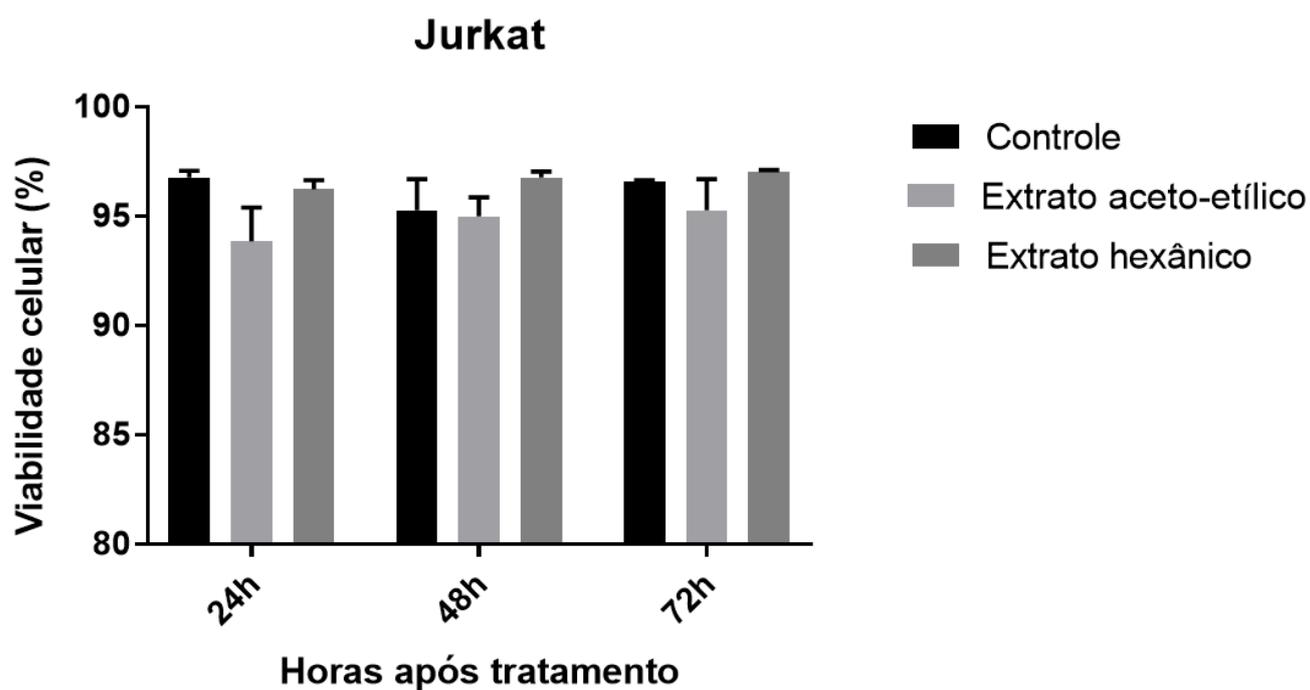
Linhagem celular	Horas após tratamento	Controle (sem tratamento)	Extrato aceto-etílico	Extrato hexânico
Jurkat	24h	96,8 ± 0,5	93,8 ± 2,3	96,2 ± 0,7
	48h	95,3 ± 2,4	95 ± 1,5	96,8 ± 0,4
	72h	96,6 ± 0,1	95,3 ± 3,1	97 ± 0,1
K562	24h	93,7 ± 2,4	86,9 ± 2,5	93 ± 1,5
	48h	95 ± 0,7	89,8 ± 5,4	92,8 ± 1,5
	72h	95,4 ± 0,3	93 ± 0,9	95,5 ± 0,6

Dados expressos em média ± desvio padrão médio (n=3)

Fonte: Autor

Figura 13 – Viabilidade celular dos grupos após 24, 48 e 72h de tratamento. **A:** Linhagem Jurkat e **B:** linhagem K562

A–



B-

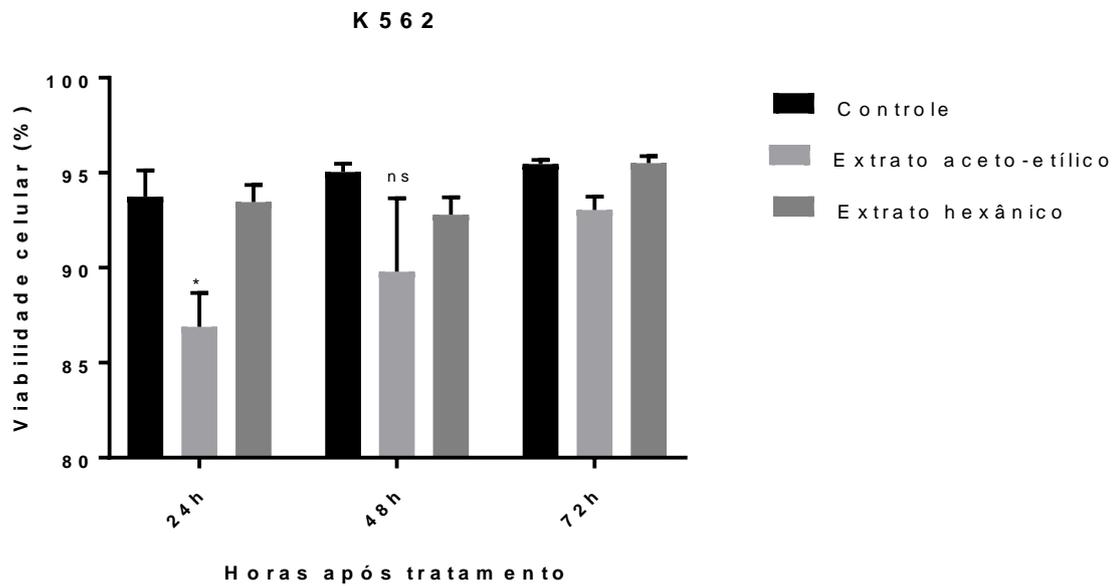


Figura mostra a viabilidade celular de ambas as linhagens celulares testadas. Em A, não houve diferença estatística entre os tratamentos para nenhum dos dias. Em B, houve diferença estatística apenas para a amostra de extrato aceto-etílico após 24h de tratamento. Dados representados em média + desvio padrão médio (n=3); \* $p < 0,05$ —extrato aceto-etílico comparado ao controle e a extrato hexânico; ns:  $p < 0,1$ — extrato aceto-etílico comparado ao controle.

Fonte: Autor

Tabela 6 – Distribuição de populações celulares de linhagem Jurkat dos grupos após 24, 48 e 72h, delimitando a porcentagem de células vivas (live).

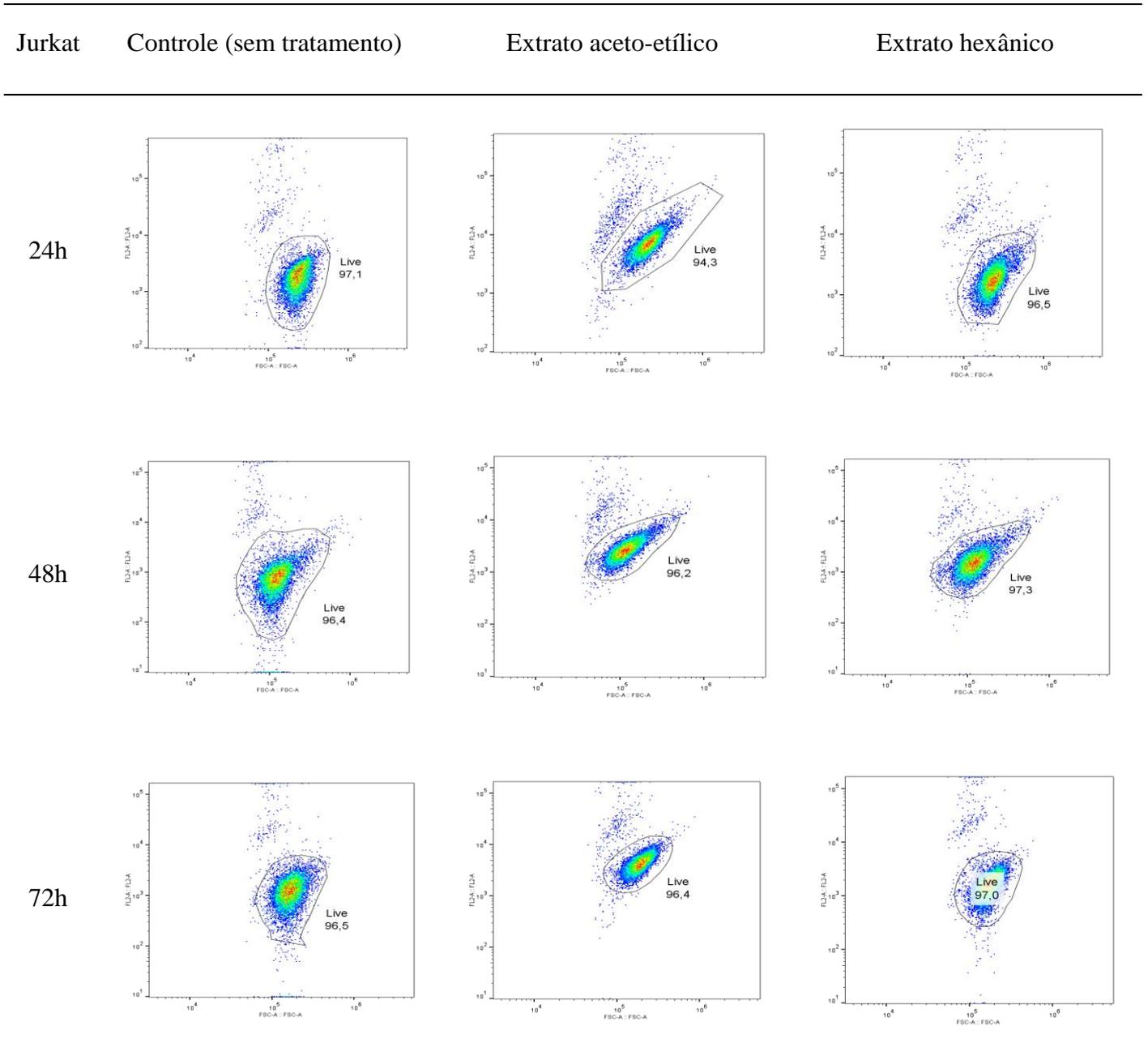


Tabela mostra a dispersão populacional analisada em citômetro de fluxo. A delimitação denota a porcentagem de células viáveis. Quanto mais vermelha a cor da população de células, maior a concentração naquela região. Eixo x: FSC:A::FSC:A (*Forward Scattering*) equivalente ao volume celular; Eixo y: FL2A::FL2A (detecção de fluorescência a 585 nm) equivalente à faixa de absorção do corante PI.

Fonte: Autor

Tabela 7 – Distribuição de populações celulares de linhagem K562 dos grupos após 24, 48 e 72h, delimitando a porcentagem de células vivas (live).

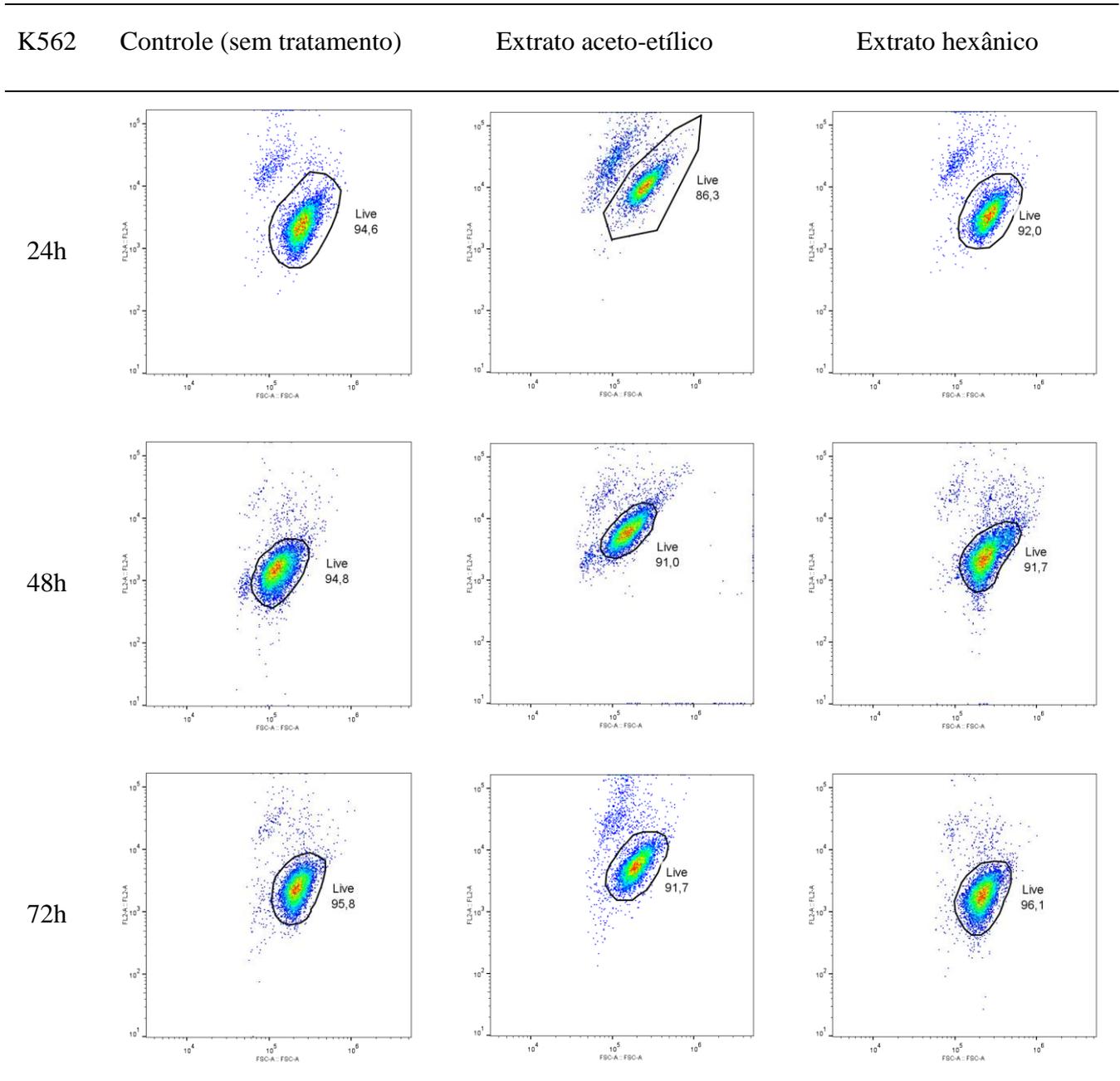


Tabela mostra a dispersão populacional analisada em citômetro de fluxo. A delimitação denota a porcentagem de células viáveis. Quanto mais vermelha a cor da população de células, maior a concentração naquela região. Eixo x: FSC:A::FSC:A (*Forward Scattering*) equivalente ao volume celular; Eixo y: FL2A::FL2A (detecção de fluorescência a 585 nm) equivalente à faixa de absorção do corante PI.

Fonte: Autor

## 6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Sabe-se que o mel possui diversas propriedades, entre elas antibacteriana e antiviral, capacidade anti-inflamatória, potencial antioxidante, e potencial antitumoral. Muitas dessas propriedades só são atingidas com o consumo de altas doses de mel (50-80 g). E essas doses podem ser problemáticas para pessoas com diabetes, por exemplo. Portanto busca-se a obtenção de extratos que possam purificar componentes bioativos para ser adicionados à alimentação, substituindo o mel bruto que contém altas taxas de açúcares. Os extratos aceto-etílico e hexânico de mel obtidos pela extração líquido-líquido apresentaram um perfil diferente de picos em análise por CLAE, como esperado. O extrato aceto-etílico consegue solubilizar uma maior variedade de moléculas polares. Enquanto que o extrato hexânico purifica poucos compostos apolares. Esses perfis serão importantes para futuros experimentos, que visam o fracionamento desses extratos, para assim testar frações enriquecidas com um ou mais tipos de moléculas e descobrir o efeito individual de cada fração. Outros métodos de extração devem ser realizados, como extração assistida por micro-ondas (MAE) e extração em banho de ultrassom (US) de modo a otimizar o tempo e o rendimento para cada extrato. Os resultados mostram que não existe correlação entre a atividade antioxidante e o potencial antitumoral.

Os diferentes ensaios antioxidantes puderam comprovar que o extrato aceto-etílico purifica compostos antioxidantes, e sua atividade foi medida, indicando a possível presença principalmente de flavonoides e ácidos fenólicos. Este extrato mostrou-se significativamente superior na concentração dessas moléculas bioativas quando comparado com o extrato hexânico e a amostra de mel bruto. Dessa forma, pode-se estabelecer uma relação entre a atividade antioxidante demonstrada pelos extratos e as substâncias fenólicas presentes no mel da região do Pampa gaúcho. Entretanto, outros estudos devem ser feitos para elucidar o mecanismo de ação e a biodisponibilidade das substâncias fenólicas presentes.

Os extratos aceto-etílico e hexânico mostraram-se pouco citotóxicos contra células de linhagens leucêmicas. Porém, este resultado é limitado, já que apenas o fator de viabilidade foi levado em consideração. A diferença na distribuição populacional das células em cada tratamento demonstra que outro processo celular esteja ocorrendo, logo outros estudos como análise de ciclo celular, diferenciação celular, proliferação celular, e níveis de expressão de proteínas pró e anti-apoptóticas serão importantes para decidir o uso de extratos de mel como candidatos na prevenção do processo de tumorigênese.



## REFERÊNCIAS

ABEMEL. **Setor apícola brasileiro em números**, 2017. Disponível em <brazilletsbee.com.br/o-setor.aspx>. Acesso em 18/10/2017.

ABUBAKAR, M. B. et al. **A review of molecular mechanisms of the anti-leukemic effects of phenolic compounds in honey**. International Journal of Molecular Sciences, v. 13, n. 11, p. 15054–15073, 2012.

AHMED, S.; OTHMAN, N. **Honey as a potential natural anticancer agent: a review of its mechanisms**. v. 2013, n. c, 2013.

ALJADI, A. M.; KAMARUDDIN, M. Y. **Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys**. Food Chemistry, v. 85, n. 4, p. 513–518, 2004.

AL-MAMARY, M.; AL-MEERI, A.; AL-HABORI, M. **Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey**. Nutrition research v. 22, p. 2–3, 2002.

AMES, B. N. **Dietary carcinogens and anticarcinogens: oxygen radicals and degenerative diseases**. Advances in Risk Analysis, vol 220. Springer, 1985.

BERTONCELJ, J. et al. **Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey**. Food Chemistry, v. 105, n. 2, p. 822–828, 2007.

BILSEL et al. **Could honey have a place in colitis therapy? effects of honey, prednisolone, and disulfiram on inflammation, nitric oxide, and free radical formation**. Digestive Surgery, v. 19, n. 4, p. 306–312, 2002.

BOGDANOV, S. et al. **Honey for nutrition and health: A review**. Journal of the American College of Nutrition, v. 27, n. 6, p. 677–689, 2008.

BOGDANOV, S. **Honey composition**. Book of Honey, n. May, p. 1–13, 2011.

CRUZ, L. C. et al. **A study on the quality and identity of Brazilian Pampa biome honey: Evidences for its beneficial effects against oxidative stress and hyperglycemia**. International Journal of Food Science, v. 2014, 2014.

CRUZ, L. C. et al. **Brazilian pampa biome honey protects against mortality, locomotor deficits and oxidative stress induced by hypoxia/ reperfusion in adult *Drosophila melanogaster***. *Neurochemical Research*, v. 41, n. 1–2, p. 116–129, 2016.

DAO, T. T. et al. **Synthesis and inhibitory activity against COX-2 catalyzed prostaglandin production of chrysin derivatives**. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, v. 14, n. 5, p. 1165–1167, 2004.

DONER, L. W. **The sugars of honey—a review**. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 28, n. 5, p. 443–456, 1977.

EDGAR, J. A.; ROEDER, E.; MOLYNEUX, R. J. **Honey from plants containing pyrrolizidine alkaloids: A potential threat to health**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, n. 10, p. 2719–2730, 2002.

FAUZI, A. N.; NORAZMI, M.; YAACOB, N. **Tualang honey induces apoptosis and disrupts the mitochondrial membrane potential of human breast and cervical cancer cell lines**. *Food and Chemical Toxicology*, v. 49, n. 4, p. 871–878, 2011.

FERNANDEZ-CABEZUDO, M. J. et al. **Intravenous administration of manuka honey inhibits tumor growth and improves host survival when used in combination with chemotherapy in a melanoma mouse model**. *PLoS One*, 2013.

GHELDOF, N.; ENGESETH, N. J. **Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum samples**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, n. 10, p. 3050–3055, 2002.

GHELDOF, 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*, v. 50, n. 21, p. 5870–5877, 2002.

HALLIWELL, B. **Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life**. *Plant physiology*, 141(2), 312–322, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. MC. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford University Press, USA, 1985.

HASSAN, M. **The inhibitory, antioxidant and anti-inflammatory effects of bee honey on hepatocellular carcinoma cell line hepg2**. v. 4, n. 12, p. 933–937, 2013.

HELLNER, M. et al. **Apitherapy: usage and experience in german beekeepers**. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, v. 5, n. 4, p. 475–479, 2008.

KREIDER, R.B. Honey: **An alternative sports gel**. Strength Conditioning n.24, p. 50–51, 2002.

MAJNO, G; JORIS, I. **Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death**. The American journal of pathology, v. 146, n. 1, p. 3–15, 1995.

MINISTERIO DO MEIO AMBIENTE. **Pampa**. Folder Pampa - Conhecimentos e descobertas. Disponível em < <http://www.mma.gov.br/biomas/pampa>>, Acesso em 02/11/2017.

MIRZOEVA, O. K.; CALDER, P. C. **The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response**. Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids, v. 55, n. 6, p. 441–449, 1996.

MOHAPATRA, D. P.; THAKUR, V.; BRAR, S. K. **Antibacterial efficacy of raw and processed honey**. Biotechnology Research International, v. 2011, p. 1–6, 2011.

NAGAI, T.; INOUE, R. **Preparation and the functional properties of water extract and alkaline extract of royal jelly**. Food Chemistry, v. 84, n. 2, p. 181–186, 2004.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **PubChem Compound Database**; CID=8058. Disponível em <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8058>>, Acesso em 18/10/2017.

ORRENIUS, S.; GOGVADZE, V.; ZHIVOTOVSKY, B. **Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death**. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, v. 47, n. 1, p. 143–183, 2007.

POSTMES, T.; VAN DEN BOGAARD, A.; HAZEN, M. **Honey for wounds, ulcers, and skin graft preservation**. The lancet, v. 341, n. 8847, p. 756-757, 1993.

ROSATELLA, A. A. et al. **5-Hydroxymethylfurfural (HMF) as a building block platform: biological properties, synthesis and synthetic applications**. Green Chemistry, v. 13, n. 4, p. 754-793, 2011.

SARASTE, A; PULKKI, K. **Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis**. Cardiovasc Res, 2000.

SCHNEIDER et al. **Characterization of EBV-genome negative “null” and “T” cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma.** International Journal of Cancer, v. 19, n. 5, p. 621–626, 1977.

SEBRAE NACIONAL. **Conheça o histórico da apicultura no Brasil**, 2015. Disponível em <[sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/artigos/conheca-o-historico-da-apicultura-no-brasil](http://sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/artigos/conheca-o-historico-da-apicultura-no-brasil)> Acesso em 18/10/2017.

SIES, H. **Oxidative stress: oxidants and antioxidants.** Experimental physiology, v. 82, p. 291–295, 1997.

SUAREZ, R. K. et al. **Energy metabolism , enzymatic flux capacities , and metabolic flux rates in flying honeybees.** v. 93+, n. December, p. 12616–12620, 1996.

SURH, Y. J.; TANNENBAUM, S. R. **Activation of the maillard reaction product 5-(hydroxymethyl)furfural to strong mutagens via allylic sulfonation and chlorination.** Chemical Research in Toxicology, v. 7, n. 3, p. 313–318, 1994.

WAHDAN, H. **Causes of the antimicrobial activity of honey.** Infection, v. 26, n. 1, p. 26–31, 1997.

WHITE JR, J. W. **Honey: a comprehensive survey.** E. Crane, ed, 1975.

## GLOSSÁRIO

AAE – ácido ascórbico equivalente

AGE – ácido gálico equivalente

APAF-1 – fator de ativação de protease associada à apoptose 1,

Bax – proteína reguladora pro-apoptótica

Bcl2 – proteína reguladora anti-apoptótica

Botulismo – intoxicação causada por neurotoxinas de bactérias

Caspase 3 – protease efetora baseada em cisteína

Caspases 8 e 9 – proteases iniciadoras baseadas em cisteína

Coeficiente de partição – definido como a relação das concentrações do mel em solvente e em água, o coeficiente será maior quanto menor for a polaridade da substância. Quanto maior essa relação, com maior facilidade a substância passa através das membranas celulares.

DMSO – dimetilsulfóxido, solvente polar pouco tóxico

Gangrena – necrose pela falta de irrigação sanguínea

Hep G2 – linhagem celular de hepatoma humano

Jurkat – linhagem celular de leucemia linfoblástica aguda

K562 – linhagem celular de leucemia mielóide

p53 – proteína supressora de tumor, Cyt.c: Citocromo C

Sohxlet – instrumento de laboratório concebido para extração de materiais

TNF – fator de necrose tumoral

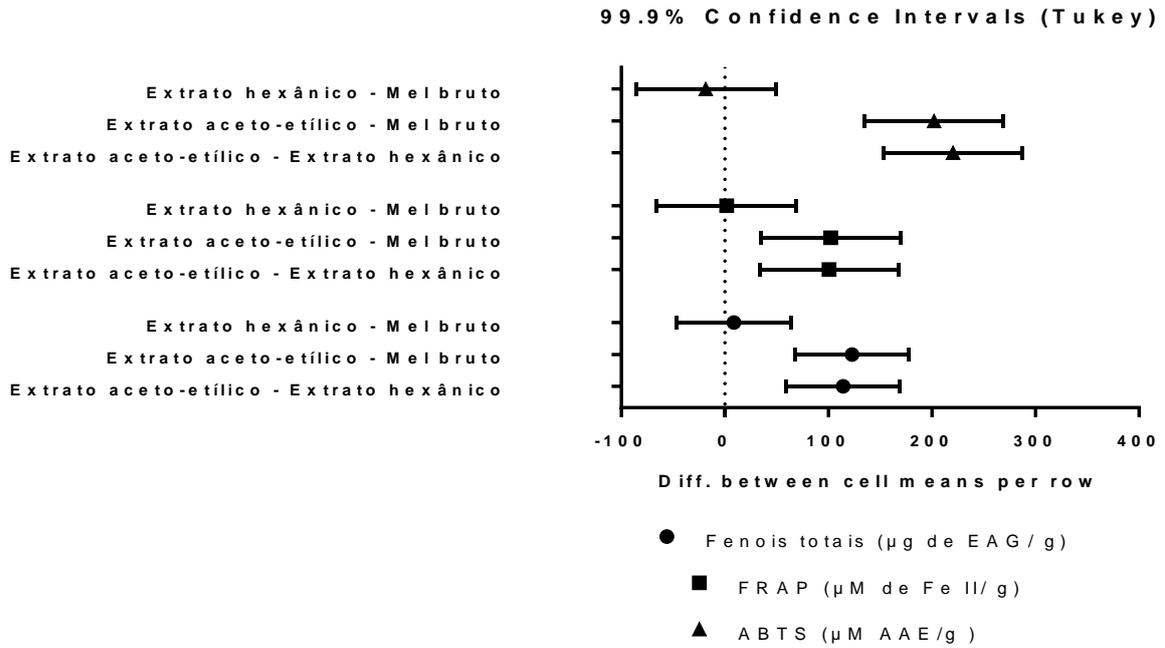
TRADD – proteína de domínio de morte associada ao receptor de TNF

TRAIL-TNF – ligante indutor de apoptose relacionado a TNF

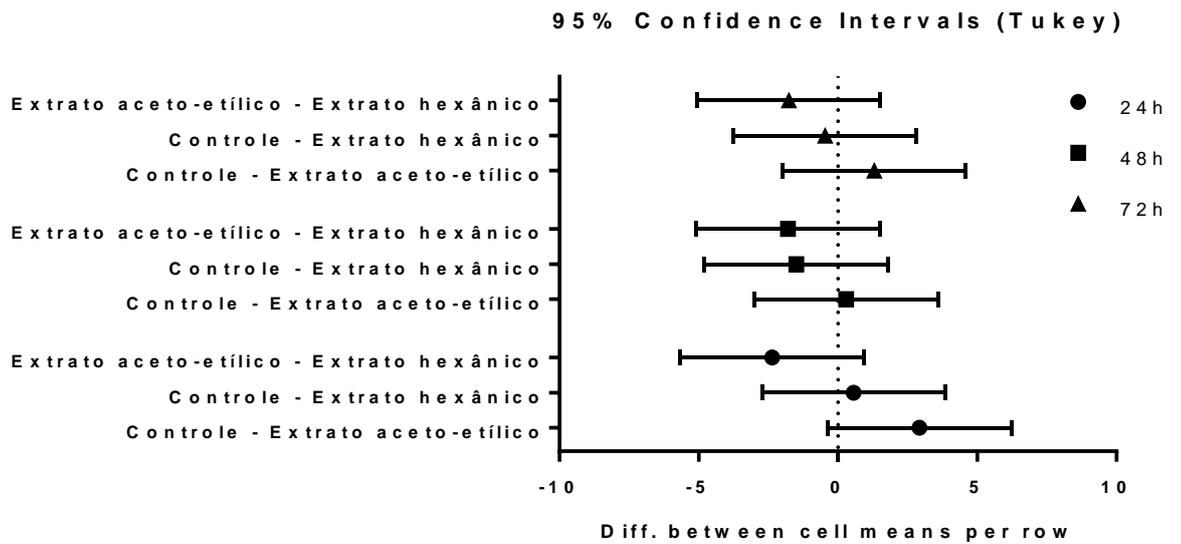
## ANEXO

### Gráficos de intervalo de confiança

- Ensaio antioxidantes:



- Potencial antitumoral (Jurkat):



- Potencial antitumoral (K562)

