

Determinação da capacidade antioxidante em amostras de mel de abelhas sem ferrão

Determination of antioxidant capacity in stingless bee honey samples

RESUMO

O objetivo deste estudo foi determinar a capacidade antioxidante das amostras de mel de abelha da espécie *Scaptotrigona bipunctata*, coletadas na Fazenda Experimental de Iguatemi– FEI/UEM, Maringá, Paraná, Brasil. As soluções de 0,8 g mel mL⁻¹ de água deionizada foram avaliadas quanto à capacidade antioxidante pelos métodos DPPH, ABTS e FRAP, as quais variaram de abaixo do limite de quantificação a 80,94 ± 10,18 µmol ET 100 g⁻¹ de mel, < LQ a 86,65 ± 6,11 µmol ET 100 g⁻¹ e 22,84 ± 13,78 a 285,82 ± 90,64 µmol ET 100 g⁻¹, respectivamente. A atividade antioxidante determinada pelos métodos variou nas amostras de diferentes datas das coletas, mesmo sendo produzidas pela mesma espécie de abelha. Os métodos empregados foram eficientes para a quantificação da capacidade antioxidante, demonstrando esse tipo de mel ser um alimento fonte desses compostos. Comparando os resultados obtidos neste estudo com a literatura, verifica-se que há uma grande variabilidade na capacidade antioxidante nas amostras de mel de abelhas sem ferrão. Isso pode ocorrer, principalmente, devido as diferentes origens botânicas do néctar coletado para a produção do mel, origem geográfica e espécies de abelhas.

PALAVRAS-CHAVE: Mel. Meliponíneos. Antioxidantes. *Scaptotrigona bipunctata*.

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the antioxidant capacity of bee honey samples of the species *Scaptotrigona bipunctata*, collected at the Experimental Farm of Iguatemi - FEI / UEM, Maringá, Paraná, Brazil. The 0.8 g honey mL⁻¹ solutions of deionized water were evaluated for antioxidant capacity by DPPH, ABTS and FRAP methods, which ranged from below the limit of quantification (LQ) to 80.94 ± 10.18 µmol ET 100 g⁻¹ honey, <LQ at 86.65 ± 6.11 µmol ET 100g⁻¹ and 22.84 ± 13.78 at 285.82 ± 90.64 µmol ET 100g⁻¹, respectively. The antioxidant activity determined by the methods varied in the samples of different collection dates, even being produced by the same bee species. The methods employed were efficient to quantify the antioxidant capacity, demonstrating that honey is a food rich in these compounds. Comparing the results obtained in this study with the literature, it is verified that there is a great variability in antioxidant capacity in stingless bee honey samples. This is mainly due to the different botanical origins of nectar collected for honey production, geographical origin and bee species.

KEYWORDS: Honey. Meliponin. Antioxidants. *Scaptotrigona bipunctata*.

Bárbara Trancoso Lopes
barbaralopes@alunos.utpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil

Eliane Sloboda Rigobello
elisloboda@hotmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil

Maria Josiane Sereia
mjsereia@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil

Priscila Wielewski
priscilawielewski@gmail.com
Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil

Recebido: 19 ago. 2019.

Aprovado: 01 out. 2019.

Direito autorial: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



INTRODUÇÃO Página | 2

Denomina-se mel, de acordo com a legislação Brasileira, o alimento natural produzido por distintas espécies de abelhas melíferas a partir do néctar das flores ou das secreções oriundas de partes vivas das plantas, ou ainda secreções de insetos sugadores de plantas (BRASIL, 2000).

As abelhas denominadas nativas, indígenas ou Meliponinae são as abelhas sem ferrão pertencentes à família Apidae, subfamília Apinae e tribo Meliponini (OLIVEIRA et al., 2013). As Meliponinae são eussociais, desta forma, são excepcionalmente organizadas, formando colônias permanentes, habitadas por zangões, rainhas e predominantemente pelas operárias (VILLAS-BÔAS, 2012).

As abelhas sem ferrão apresentam variação em sua coloração, podendo ser claras (amarelas) ou escuras (marrom, pretas. Por não possuírem ferrão, não são ofensivas, contudo, expelem líquidos ácidos ou básicos a fim de se defenderem, estes líquidos causam irritação na pele de seus predadores. Podem também se enrolar nos cabelos ou pelos, ou ainda tentar adentrar nas vias respiratórias (NOGUEIRA, 1997).

Os agentes antioxidantes que são encontrados com maior frequência em alimentos são os grupos fenóis que representam os ácidos fenólicos e os flavonoides. O mel possui uma atividade antioxidante significativa, pois nele são encontradas grandes concentrações desses compostos, que são provenientes do néctar das plantas que as abelhas coletam. Os compostos antioxidantes, embora sejam oriundos de uma fonte vegetal, são influenciados pelo processamento, manipulação e armazenamento da amostra, no entanto a origem floral tem influência maior. Diante disso, o objetivo do presente trabalho é caracterizar e determinar a atividade antioxidante das amostras de mel de abelha da espécie *Scaptotrigona sp* (CHEN, 2000).

MATERIAL E MÉTODOS

Os solventes e reagentes empregados nas determinações analíticas foram: água purificada pelo sistema de osmose reversa, metanol grau pureza 99,8%, hidróxido de sódio PA, carbonato de sódio aquoso, ácido clorídrico PA, cloreto férrico PA (97% pureza), nitrito de sódio PA, cloreto de alumínio PA e persulfato potássico da marca VETEC com 99% de pureza, 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) com 85% pureza, 2,2'-azino-bis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) sal diamônio (ABTS) com 98% pureza, 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ), 6-hidróxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico (Trolox) da marca SIGMA com 97% pureza. Todos os reagentes utilizados foram de elevada pureza.

As coletas das amostras de mel de abelhas da espécie *Scaptotrigona bipunctata* utilizadas neste trabalho, foram realizadas entre os meses de janeiro de 2016 e dezembro de 2017, na Fazenda Experimental de Iguatemi- FEI/UEM, Maringá-Paraná, Brasil. As amostras de mel foram transportadas até o município de Campo Mourão, PR, Brasil em recipientes plásticos com tampa, armazenados em caixa de isopor. Nas dependências da UTFPR Campo Mourão, onde as análises foram realizadas, as amostras foram armazenadas em refrigerador.

Todas as análises pelos métodos DPPH, ABTS e FRAP foram realizadas em triplicata, seguindo os métodos descritos por Sereia et al. (2017) e em laboratório com cortinas fechadas e luzes apagadas e envolvendo os tubos em papel alumínio. Para realizar a leitura das absorbâncias, em todas as análises, utilizou-se um espectrofotômetro UV-Vis (modelo Global GTA-97). As amostras de mel e os reagentes foram pesadas em balança analítica (modelo Bioscale 2204). Empregou-se um banho-maria termostático (modelo MA 156 CIRMarconi).

Para a determinação pelo DPPH foi construída uma curva analítica com padrão de trolox (T) no intervalo de concentração de 50, 275, 500, 700, 850 e 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$, em triplicata cada nível de concentração. Foi feita a conversão em resultados expressos em micromol equivalentes de trolox por grama de matriz ($\mu\text{mol ET g}^{-1}$). O limite de quantificação foi a menor concentração com precisão e exatidão da respectiva curva analítica. Para realizar as análises, foram homogeneizados 100 μL de solução padrão de trolox diluída de acordo com cada nível de concentração (para as amostras foi adicionada solução aquosa de mel 0,8 g mL^{-1} de água) e 3.900 μL de solução de DPPH 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Após 30 minutos, as absorbâncias foram lidas em 515 nm. Para a análise do branco, de cada amostra de mel, foram misturados 100 μL da solução da amostra de mel 0,8 g mL^{-1} com 3.900 μL de água. O controle negativo foi preparado misturando 100 μL de água com 3.900 μL de solução de DPPH 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Para a determinação pelo ABTS a curva analítica foi construída com padrão de trolox (T) com os valores de concentração de 50, 140, 230, 320, 410 e 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$, em triplicata cada nível. Para avaliar as soluções de mel por meio do método ABTS, foram preparadas duas soluções estoque, a primeira de 7,4 mmol L^{-1} de ABTS e a segunda de 2,6 mmol L^{-1} de persulfato de potássio. As soluções foram misturadas para formar a solução de trabalho, a qual reagiu durante 12 horas em ambiente escuro e à temperatura ambiente. A solução de trabalho foi diluída com metanol até obtenção de Absorbância 1.100. Em seguida, 2.850 μL desta solução foram misturados com 150 μL de solução padrão de trolox (para as amostras foi adicionado solução aquosa de mel 0,8 g mL^{-1}). A leitura das absorbâncias foi feita após 2 horas em 734 nm. Para o branco, 150 μL da solução da amostra de mel 0,8 g mL^{-1} foram misturados com 2.850 μL de metanol, para cada solução da amostra foi preparado seu próprio branco. O controle negativo foi preparado misturando 150 μL de água com 2.850 μL de solução trabalho diluída.

Para as análises pelo FRAP, foi preparado o complexo férrico TPTZ com 20,83mL de solução TPTZ 10 mmol L^{-1} , 20,83mL de solução de FeCl_3 20mM e 208,33mL de solução tampão acetato 300 mmol L^{-1} com $\text{pH} = 3,6$, totalizando 250mL (1:1:10 v v⁻¹). A mistura foi mantida em banho maria à temperatura constante de 37°C durante 30 minutos, e a leitura das absorbâncias foi feita em 593 nm. A curva analítica foi construída com padrão de trolox (T) com valores de concentração de 50, 250, 500, 750 e 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$, em triplicata cada nível de concentração.

Para fazer as análises, foram transferidos para tubos de ensaio 100 μL da solução padrão de trolox diluídas em triplicatas (para as amostras solução aquosa de mel 0,8 g mL^{-1}), 300 μL de água deionizada e 3000 μL de complexo férrico TPTZ. A solução foi mantida em banho térmico à 37 °C durante 30 minutos e a leitura das absorbâncias foi feita em 593 nm. Para o branco, 100 μL da solução da

amostra de mel foram misturados com 3.000µL de metanol e 300 µL de água, para cada solução da amostra foi preparado seu próprio branco. O controle negativo foi preparado misturando 100 µL de metanol com 3.000µL complexo férrico TPTZ e 300µL de água destilada. Depois de preparada, a mistura foi agitada manualmente por 15 segundos e deixada em repouso à temperatura ambiente na ausência da luz, por 30 min. As absorvâncias das amostras foram medidas em cubetas de quartzo em 593nm.

O limite de quantificação de cada método DPPH, ABTS e FRAP foi considerado a menor concentração com precisão e exatidão da respectiva curva analítica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as curvas analíticas apresentaram valor de coeficiente de correlação linear maior que 0,99, dentro do recomendado pela RE nº 899, de 29 de maio de 2003 da ANVISA (ANVISA, 2003), com base nos requisitos para métodos bioanalíticos.

Na Tabela 1 são apresentadas as respostas da capacidade antioxidante para as diferentes amostras de mel de abelhas sem ferrão estudadas. A capacidade antioxidante dos extratos avaliados pelos métodos DPPH, ABTS e FRAP variou de não detectado a 80,94 µmol ET 100g⁻¹ de mel, abaixo do limite de quantificação (50 µmol L⁻¹) a 86,65 µmol ET 100g⁻¹ e 22,84 a 285,82 µmol ET 100g⁻¹, respectivamente. Observou-se discrepância entre os valores que medem a capacidade antioxidante pelo DPPH. De acordo com Thaipong et al., (2006), isso pode ocorrer devido ao tempo de reação dos reagentes utilizados nos métodos com os compostos sólidos da matriz e pela própria característica da amostra.

Praticamente todas as amostras de mel avaliadas pelos métodos propostos apresentaram teores de capacidade antioxidante, o que comprovou a existência de compostos antioxidantes. Pode-se confirmar ainda a importância do mel como fonte desses compostos. Segundo Avila (2019), para a espécie *Scaptotrigona bipuncata*, foram encontrados valores capacidade antioxidante pelo método DPPH entre 1,46 µmol ET 100 g⁻¹ e 3,91 µmol ET 100 g⁻¹. De acordo com Kus et al. (2017), os valores apresentados para abelhas sem ferrão em geral variaram de 61,1 a 5060,0 µmol ET100 g⁻¹, e de 200,00 µmol ET 100 g⁻¹ a 500,0 µmol ET100 g⁻¹ para *Apis melífera*.

De acordo com o estudo de Avila (2019), para o método de ABTS, em amostras de mel da espécie *Scaptotrigona bipuncata*, foram encontrados valores entre 1,13 µmol ET 100g⁻¹ e 3,47 µmol ET 100g⁻¹. Já em Lira et al. (2014) a atividade antioxidante variou de 90,52 a 201,07 µgET 100 g⁻¹ para ABTS nos méis de *A. melífera*. Para os méis da espécie de abelha *Scaptotrigona sp* variou de 3,73 a 33,08 µgET 100 g⁻¹, enquanto para os méis de *T. angustula* variou 85,41 a 93,07 µgET 100 g⁻¹. Comparando os resultados obtidos neste estudo com a literatura, verifica-se que há uma grande variabilidade na capacidade antioxidante nas amostras de mel de abelhas sem ferrão. Isso pode ocorrer, principalmente, devido as diferentes origens botânicas do néctar coletado para a produção do mel, a origem geográfica e as espécies de abelhas (DAS, et al., 2015).

Tabela 1 – Resultados da capacidade antioxidante das amostras mel de abelhas *Scaptotrigona bipunctata* pelos métodos DPPH, FRAP e ABTS.

Data da Coleta	Amostras	DPPH	FRAP	ABTS	
		$\mu\text{mol de ET } 100 \text{ g}^{-1} \pm \text{DP}$	$\mu\text{mol de ET } 100 \text{ g}^{-1} \pm \text{DP}$	$\mu\text{mol de ET } 100 \text{ g}^{-1} \pm \text{DP}$	
PRIMAVERA 01/12 a 05/12/2016	T001	46,08 ± 10,93	25,16 ± 6,23	82,17 ± 3,11	
	T002	65,04 ± 119,59	31,05 ± 6,23	62,32 ± 40,0	
	T003	ND	96,89 ± 13,2	70,76 ± 26,25	
	T004*	48,51 ± 6,31	64,98 ± 6,55	83,99 ± 0,29	
	T005*	67,75 ± 8,82	76,95 ± 13,63	79,76 ± 5,97	
	T006	66,15 ± 2,55	130,58 ± 10,82	82,17 ± 3,11	
	T007	16,08 ± 3,33	165,70 ± 33,47	82,55 ± 2,35	
	T008	17,82 ± 4,19	112,66 ± 39,82	76,21 ± 13,55	
	T009	ND	139,21 ± 2,18	86,65 ± 6,11	
	T011	47,68 ± 3,47	90,04 ± 2,97	80,31 ± 20,94	
	T012	31,57 ± 65,62	59,21 ± 4,36	84,79 ± 4,26	
	T013	ND	63,43 ± 12,96	76,88 ± 45,8	
	T015	ND	111,35 ± 3,6	79,47 ± 15,54	
	T016	44,69 ± 12,62	85,82 ± 68,96	81,85 ± 7,34	
	T017	38,65 ± 18,73	75,46 ± 15,67	69,09 ± 67,47	
	VERÃO 16/01 a 26/01/2017	T002	ND	123,61 ± 40,16	74,44 ± 5,98
		T003	ND	142,36 ± 14,38	72,07 ± 15,47
T005*		67,75 ± 8,82	112,84 ± 86,79	75,95 ± 21,54	
T008		37,26 ± 29,12	225,10 ± 111,12	78,64 ± 2,35	
T009		25,88 ± 49,1	182,84 ± 64,71	81,91 ± 6,63	
T011		66,15 ± 2,55	36,47 ± 8,12	80,15 ± 5,12	
T012		49,28 ± 40,70	194,33 ± 4,59	<LQ	
T015		10,18 ± 15,75	182,18 ± 77,49	80,02 ± 10,35	
T016		33,38 ± 6,01	55,76 ± 15,28	82,26 ± 3,11	
T017		61,15 ± 9,48	250,58 ± 60,48	77,07 ± 8,44	
OUTONO 26/05 a 02/06/2017	T002	ND	137,24 ± 6,44	75,21 ± 2,04	
	T003	7,75 ± 6,67	160,76 ± 10,82	70,76 ± 26,25	
	T005*	54,63 ± 7,26	55,46 ± 15,67	75,63 ± 3,11	
	T006	80,94 ± 10,18	43,73 ± 11,34	71,78 ± 5,12	
	T008	67,75 ± 8,82	37,54 ± 5,77	74,54 ± 1,33	
	T009	42,68 ± 11,71	285,82 ± 90,64	70,92 ± 1,9	
	T011	2,26 ± 9,48	147,24 ± 91,13	82,58 ± 22,3	
	T015	ND	196,47 ± 62,09	83,45 ± 11,95	
	T016	77,06 ± 46,08	22,84 ± 13,78	83,13 ± 4,64	
	T017	58,93 ± 10,05	59,33 ± 4,59	82,78 ± 4,7	
INVERNO 26/06/2017	T013	25,53 ± 21,10	182,42 ± 280,79	15,21 ± 72,7	
PRIMAVERA 16/11 a 23/11/2017	T002	48,51 ± 6,31	108,32 ± 4,36	85,6 ± 5,33	
	T003	ND	130,46 ± 11,46	75,34 ± 7,47	
	T006	ND	129,57 ± 73,9	74,31 ± 6,27	
	T010	23,51 ± 15,75	145,28 ± 66,97	77,58 ± 15,41	
	T012	14,97 ± 5,85	147,18 ± 7,05	72,32 ± 1,6	
	T013	16,08 ± 3,33	43,97 ± 3,6	74,28 ± 12,44	

**Scaptotrigona postica* ND: Não detectado LQ: limite de quantificação

Fonte: Autoria Própria (2019).

CONCLUSÃO Página | 6

A atividade antioxidante determinada pelos métodos variou nas amostras de diferentes datas das coletas, mesmo sendo produzidas pela mesma espécie de abelha. Diante dos resultados obtidos neste estudo, foi identificada a presença de atividade antioxidante praticamente em todas as amostras de mel estudadas, indicando a eficiência dos métodos analíticos empregados e demonstrando que esse tipo de mel é um alimento fonte desses compostos.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Guias para validação de métodos analíticos e bionalíticos**. Resolução nº 899 de 29 de maio de 2003. Disponível em:

http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RE_899_2003_COMP.pdf/ff6fdc6b-3ad1-4d0f-9af2-3625422e6f4b. Acesso em: 19 julho de 2019.

AVILA, Suelen. **Determinação de parâmetros de qualidade de mel de abelhas sem ferrão utilizando ferramentas quimiométricas**. 2019. 136 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2019.

BRASIL. Ministério da agricultura pecuária e abastecimento. **Instrução normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000**. Regulamento técnico de identidade e qualidade do mel. Diário Oficial, Brasília, 20 de outubro de 2000, Seção 001, p.16-170.

CHEN, L.; MEHTA, A.; BERENBAUM, M.; ZANGER, A. R.; ENGESETH, N. J. Honeys from different floral sources as inhibitors of enzymatic browning in fruit and vegetable homogenates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 4997–5000, 2000.

DAS, A.; DATTA, S.; MUKHERJEE, S.; BOSE, S.; GHOSH, S.; DHAR, P. Evaluation of antioxidative, antibacterial and probiotic growth stimulatory activities of *Sesamum indicum* honey containing phenolic compounds and lignans. **LWT-Food Science and Technology**, v. 61, p. 244-250, 2015.

KUŚ, P. M.; JERKOVIĆ, I.; MARIJANOVIĆ, Z.; TUBEROSO, C. I. G. Screening of Polish fir honeydew honey using GC-MS, HPLC-DAD and physicalchemical parameters: benzene derivatives and terpenes as chemical markers. **Chemistry & Biodiversity**, v. 12, n. 10, p. 3218–3221, 2017.

LIRA, A. F.; SOUSA, J. P. L. M.; LORENZON, M. C. A.; VIANNA, C. A. F. J.; CASTRO, R. N. Estudo comparativo do mel de *Apis mellifera* com méis de meliponíneos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 8, n. 3, p. 169-178, 2014.

NOGUEIRA-NETO, P. ^{Página | 7} Vida e criação de abelhas sem ferrão. São Paulo: Nogueirapis, 1997.

OLIVEIRA, F. F.; RICHERS, B. T. T.; SILVA, J. R.; FARIAS, R. C.; MATOS, T. A. L. Guia ilustrado das abelhas “sem-ferrão” das reservas Amanã e Mamirauá, Brasil (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). Tefé: IDSM, 2013.

SEREIA, M. J. et al. Techniques for the evaluation of physicochemical quality and bioactive compounds in honey. In: TOLEDO, V. de A. A. de. Honey Analysis. [S.l.]: Intech, 2017. p. 195-209.

THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; BYRNE, D. H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 19, n. 6–7, p. 669–675, 2006.

VILLAS-BÔAS, J. Manual tecnológico: Mel de abelhas sem ferrão. Brasília: Instituto Sociedade, População e Natureza (ISPN), 2012.