

Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonoides totais em amostras de pólen apícola de *Apis mellifera*

*Determination of antioxidant activity, total phenolic compounds and total flavonoids of samples of apicultural pollen from *Apis mellifera**

Autores | Authors

Letícia Corassa NEVES

Universidade de São Paulo (USP)
Escola Superior de Agricultura Luiz de
Queiroz (ESALQ)
Departamento de Agroindústria, Alimentos
e Nutrição (LAN)
e-mail: lcneves@esalq.usp.br

✉ Severino Matias de ALENCAR

Universidade de São Paulo (USP)
Escola Superior de Agricultura Luiz de
Queiroz (ESALQ)
Departamento de Agroindústria, Alimentos
e Nutrição (LAN)
Av. Pádua Dias, 11
Caixa Postal: 9
CEP: 13418-900
Piracicaba/SP - Brasil
e-mail: alencar@esalq.usp.br

Solange Terezinha CARPES

Universidade Tecnológica Federal do
Paraná (UTFPR)
e-mail: carpes@utfpr.edu.br

Resumo

O pólen coletado pelas abelhas, por conter substâncias nutricionais como carboidratos, proteínas, aminoácidos, lipídeos, vitaminas e minerais e traços de micronutrientes, pode ser utilizado como suplemento alimentar. O pólen apícola é também rico em compostos fenólicos com ação antioxidante, despertando ultimamente o interesse de vários pesquisadores. O objetivo deste trabalho foi avaliar a composição fenólica e a atividade antioxidante de amostras de pólen apícola do Sudeste e Nordeste do Brasil. Foi feita a quantificação do teor de compostos fenólicos e flavonoides totais por métodos colorimétricos. A atividade antioxidante foi avaliada por meio da capacidade sequestrante do radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazil). A amostra de pólen apícola de Maceió (AL) apresentou o maior valor de atividade antioxidante com 93,46% e a maior quantidade de compostos fenólicos 13,78 mg GAE.g⁻¹ de pólen, sendo que a concentração de flavonoides, no valor de 4,68 mg de quercetina.g⁻¹ de pólen, não foi significativa. A atividade antioxidante da amostra de Saúde (BA) foi de 89,32%, com o teor de compostos fenólicos de 8,33 mg GAE.g⁻¹ de pólen; já a concentração de flavonoides totais dessa amostra foi a menor, no valor de 3,46 mg de quercetina.g⁻¹ de pólen. A alta atividade antioxidante e a significativa concentração de compostos fenólicos em contrapartida com a baixa concentração de flavonoides totais nas amostras de Maceió (AL) e Saúde (BA) indica que deve haver outros compostos bioativos, além dos flavonoides, nas amostras de pólen dessas cidades. Esses compostos conferem ao pólen a característica de antioxidante e também, a habilidade de sequestrar radicais livres.

Palavras-chave: Pólen apícola; Atividade antioxidante; Compostos fenólicos.

Summary

The pollen collected by bees can be used as nutritive supplement, for embracing nutritional substances like carbohydrates, proteins, aminoacids, lipids, vitamins and minerals and small quantity of micronutrients. The apicultural pollen is also rich in phenolic compounds as antioxidant, the interest of some researchers have been increased lately. The objective was to evaluate the phenolic composition and the antioxidant activity of the apicultural pollen of the samples in the southeastern and northeastern of Brazil. It had been made the quantify of the phenolic compounds and total flavonoids substance by coloring measure methods. The antioxidant activity was evaluated by the linking capability of the free radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazil). The sample of the apicultural pollen from Maceió (AL) showed more value of the antioxidant activity with 93.46% and more quantity of phenolic compounds 13.78 mg GAE.g⁻¹ of pollen, however the flavonoids concentration 4.68 mg quercetina.g⁻¹ of pollen was not significant. The sample from Saúde (BA) was 89.32% of antioxidant activity, and the substance of phenolic compounds 8.33 mg GAE.g⁻¹ of pollen; but the concentration of the total flavonoids in the sample was minor, 3.46 g quercetina.g⁻¹ of pollen. The highest antioxidant activity and the significant concentration of the phenolic compounds regardind to small concentration of the total flavonoids in the samples from Maceió (AL) and Saúde (BA) point out other bioactive compounds, besides of flavonoids, in the pollen samples from the cities. Those compounds give to the pollen the antioxidant feature and also links the radicals.

Key words: Apicultural pollen; Antioxidant activity; Phenolic compounds.

Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonoides totais em amostras de pólen apícola de *Apis mellifera*

NEVES, L. C. et al.

1 Introdução

O pólen apícola tem sido utilizado há muitos anos tanto na medicina tradicional quanto na nutrição suplementar e em dietas alternativas, devido principalmente as suas propriedades nutricionais e benéficas à saúde humana (ALMEIDA-MURADIAN et al., 2005; ISLA et al., 2001; KROYER e HEGEDUS, 2001; SERRA BONVEHÍ e ESCOLÁ JORDÁ, 1997). Sua composição nutricional consiste de proteínas, lipídios, açúcares, fibras, sais minerais (cálcio, cloro, cobre, ferro, magnésio, iodo, molibdênio, selênio, estrôncio, estanho, boro, flúor, vanádio, cromo, fósforo, potássio, enxofre, alumínio, ferro, manganês, e zinco), aminoácidos e vitaminas (A, B, C, D, E) (WESH e MARSTON, 1983; MARCHINI et al., 2006).

Além disso, o pólen também contém altos teores de substâncias polifenólicas, principalmente flavonoides com atividade antioxidante (CAMPOS et al., 2003; KROYER e HEGEDUS, 2001) e antimicrobiana (BASIM et al., 2006; GARCÍA et al., 2001).

Atualmente o interesse no estudo dos compostos fenólicos tem aumentado muito, devido principalmente à habilidade antioxidante destas substâncias em sequestrar radicais livres, os quais são prejudiciais a saúde humana (DORMAN et al., 2003). As propriedades biológicas dos compostos fenólicos estão relacionadas com a atividade antioxidante que cada fenol exerce sobre determinado meio. A atividade dos antioxidantes, por sua vez, depende de sua estrutura química, podendo ser determinada pela ação da molécula como agente redutor (velocidade de inativação do radical livre, reatividade com outros antioxidantes e potencial de quelação de metais). Alguns estudos *in vitro* demonstram que a atividade antioxidante dos flavonoides é maior que a das vitaminas E e C (RICE-EVANS et al., 1996). Estudos epidemiológicos têm mostrado correlação entre o aumento do consumo de compostos fenólicos com ação antioxidante (JAVANMARDI et al., 2003) e a redução do risco de doenças cardiovasculares e de certos tipos de câncer (RICE-EVANS et al., 1996; COOK e SAMMAN, 1996).

A produção de pólen apícola no Brasil representa uma atividade recente que teve início no final da década de 80. Entretanto, o Brasil tem potencial para ser um grande produtor de pólen, principalmente pela riqueza e diversidade da flora aliada ao clima tropical e resistência das abelhas africanizadas *Apis mellifera*.

A caracterização físico-química e biológica do pólen faz-se importante em um controle de qualidade e até mesmo em uma padronização do pólen brasileiro para possíveis utilizações nas indústrias alimentícias e farmacêuticas (ALENCAR, 2002).

A procura no mercado por alimentos funcionais também cresce muito; o consumidor espera reduzir despesas com saúde, causadas por várias doenças

que afetam a população. Na última década do século passado, os consumidores dos países ocidentais mostraram grande interesse pelo conceito de alimentos funcionais, considerando nessa categoria todo produto alimentício ou ingrediente, seja de natureza convencional ou não, capaz de fornecer benefícios à saúde. Diante do que foi citado, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade antioxidante e determinar os teores de compostos fenólicos e flavonoides totais em extratos etanólicos de pólen apícola de *Apis mellifera*.

2 Material e métodos

2.1 Origem dos grãos de pólen e coleta das amostras

As amostras de pólen apícola, que vieram diretamente dos apicultores, foram coletadas nas cidades de Contagem (MG), Saúde (BA), São Cristóvão (SE) e Maceió (AL), conforme Tabela 1. As amostras coletadas foram armazenadas em freezer (-18 °C), até o momento das análises.

2.2 Preparo das amostras

O preparo dos extratos etanólicos das amostras de pólen apícola foram de acordo com a metodologia proposta por Park et al. (1998), Kroyer e Hegedus (2001) e Alencar (2002). As amostras desidratadas de pólen (2 g) foram trituradas, homogeneizadas extraídas com 15 mL de etanol a 70%. A extração foi feita a 50 °C, em banho de água termostaticado, por 30 min sob agitação constante. Após essa etapa as amostras foram centrifugadas a 7000 x g por 10 min a 5 °C. Os sobrenadantes foram transferidos para tubos de ensaio com tampa de rosca e armazenados a 5 °C em freezer.

2.3 Análises físico-químicas dos extratos

2.3.1 Análise de compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu utilizando ácido gálico como padrão de referência. O reagente de Folin Ciocalteu é uma solução de íons complexos poliméricos formados a partir de heteropolímeros de fosfomolibdicos e fosfotungsticos. Esse reagente oxida os fenolatos, reduzindo os ácidos a um complexo azul Mo-W. A leitura foi realizada a 740 nm em espectrofotômetro Shimadzu Modelo UV 1240V. Os extratos de pólen foram filtrados em papel ou fibra de vidro e diluídos

Tabela 1. Locais de amostragem de pólen apícola.

Estados/cidades			
Minas Gerais	Bahia	Sergipe	Alagoas
Contagem	Saúde	São Cristóvão	Maceió

Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonoides totais em amostras de pólen apícola de *Apis mellifera*

NEVES, L. C. et al.

em etanol 70% a uma concentração de 3 mg.mL⁻¹. Uma alíquota de 0,5 mL de amostra diluente foi transferida para um tubo com tampa de rosca e lhe foram adicionados 2,5 mL do reagente Folin Ciocalteau (Sigma Aldrich Chemical Co.) diluídos em água destilada 1:10. Esses reagentes ficaram em repouso de 3 a 8 min e a eles foram adicionados 2 mL de carbonato de sódio a 4%. Os tubos foram deixados em repouso por 2 h ao abrigo da luz e, na sequência, feita a leitura da absorbância a 740 nm. Um reagente branco foi conduzido nas mesmas condições. Foi construída uma curva analítica contendo 100, 80, 60, 40, 20, 10 µg.mL⁻¹ de ácido gálico e os resultados expressos em mg GAE.g⁻¹ de pólen. GAE: equivalente em ácido gálico (MINUSSI et al., 2003; KROYER e HEGEDUS, 2001; SINGLETON et al., 1965).

2.3.2 Análise de flavonoides totais

A concentração de flavonoides totais foi determinada pelo método descrito por Park et al. (1998), com algumas modificações. Os extratos de pólen foram diluídos 1:3, em etanol 70%. Alíquota de 0,5 mL de amostra diluída foi transferida para um tubo de ensaio e a ela foram adicionados 4,3 mL de etanol a 70%, 0,1 mL de nitrato de alumínio a 10% e 0,1 mL de acetato de potássio. Após repouso de 40 min as leituras foram efetuadas em espectrofotômetro Shimadzu (Modelo UV-Mini 1240) a 415 nm. Tubos em branco foram conduzidos nas mesmas condições, sem adição de nitrato de alumínio. Foi construída uma curva analítica contendo 40, 30, 20, 10 e 5 µg.mL⁻¹ de quercetina, os resultados expressos em mg quercetina.g⁻¹ de pólen apícola (DOWD, 1959) e a concentração final dos extratos foi de 44 mg.mL⁻¹.

2.4 Análise da atividade antioxidante

2.4.1 Avaliação da atividade sequestrante do radical DPPH

A medida da atividade sequestrante do radical DPPH foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Brand-Williams e Berset (1995). DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazil) é um radical livre estável que aceita um elétron ou um radical de hidrogênio para tornar-se uma molécula diamagnética estável e, desta forma, é reduzido na presença de um antioxidante. Para avaliação da

atividade antioxidante, os EEP (extratos etanólicos do pólen) foram reagidos com o radical estável DPPH em uma solução de etanol. Na forma de radical, o DPPH possui uma absorção característica a 517 nm, a qual desaparece após a redução pelo hidrogênio arrancado de um composto antioxidante. As soluções estoques de pólen (133,33 mg.mL⁻¹) foram diluídas a concentrações finais de 10 mg.mL⁻¹.

A mistura de reação foi constituída da adição de 0,5 mL das amostras, 3 mL de etanol absoluto e 0,3 mL da solução do radical DPPH 0,3 mM em etanol. As substâncias de referência (BHT, BHA e α-tocoferol) foram avaliadas na concentração final de 90 µg.mL⁻¹. A redução do radical do DPPH foi medida através da leitura da absorbância a 517 nm em 100 min de reação.

A atividade antioxidante foi expressa de acordo com a Equação 1 de Mensor et al. (2001), descrita abaixo:

$$\%AA = 100 - \left[\frac{(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100}{Abs_{controle}} \right] \quad (1)$$

onde Aa = absorbância da amostra; Ab = absorbância do branco; Ac = absorbância do controle. Desta forma, leva-se em consideração o branco específico dos extratos nas várias concentrações utilizadas em cada amostra. O branco específico da amostra foi determinado usando-se 3,3 mL de etanol e 0,5 mL da amostra em cada concentração e as absorbâncias lidas a 517 nm após 100 min de reação. Um tubo contendo 3 mL de etanol absoluto, 0,5 mL de etanol 70% e 0,3 mL de DPPH 0,5 mM serviu como controle negativo.

3 Resultados e discussão

A amostra de pólen apícola de Maceió (AL) apresentou o maior valor de atividade antioxidante (93,46%) e a maior quantidade de compostos fenólicos (13,78 mg GAE.g⁻¹ de pólen), sendo que a concentração de flavonoides no valor de 4,68 mg de quercetina.g⁻¹ de pólen não foi significativa. A amostra de Contagem (MG) apresentou o menor valor de atividade antioxidante (60,13%) e de teor de compostos fenólicos totais (6,9 mg GAE.g⁻¹ de pólen), entretanto, foi encontrada a maior concentração de flavonoides totais (6,87 mg de quercetina.g⁻¹ de pólen) (Tabela 2).

Tabela 2. Atividade antioxidante, teor de compostos fenólicos e flavonoides totais nas amostras de pólen apícola analisadas.

Amostras de pólen apícola	Atividade antioxidante (%)	Compostos fenólicos (mg GAE.g ⁻¹)	Flavonoides totais (mg de quercetina.g ⁻¹)
Maceió (AL)	93,46	13,78	4,68
Saúde (BA)	89,32	8,33	3,46
São Cristóvão (SE)	62,09	7,01	4,97
Contagem (MG)	60,13	6,9	6,87

GAE: equivalente em ácido gálico.

Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonoides totais em amostras de pólen apícola de *Apis mellifera*

NEVES, L. C. et al.

A alta atividade antioxidante e a significativa concentração de compostos fenólicos totais, em contrapartida com a baixa concentração de flavonoides totais nas amostras de Maceió (AL) e Saúde (BA), indicam que outras substâncias fenólicas, que não os flavonoides, são os compostos bioativos presentes nessas amostras. Maiores estudos para se identificar os compostos bioativos responsáveis pela atividade antioxidante nessas amostras de pólen são necessários.

4 Conclusões

O pólen apícola pode ser considerado como fonte de substâncias polifenólicas, como os flavonoides, que podem agir como antioxidantes e sequestradores de radicais livres prejudiciais à saúde humana.

Referências

- ALENCAR, S. M. **Estudo fitoquímico da origem botânica da própolis e avaliação da composição química de mel de *Apis mellifera* africanizada de diferentes regiões do Brasil.** 2002. 120 p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- ALMEIDA-MURADIAN, L. B.; PAMPLONA, L. C.; COIMBRA, S.; BARTH, O. M. Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 18, n. 1, p. 105-111, 2005.
- BASIM, E.; BASIM, H.; ÖZCAN, M. Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens. **Journal of Food Engineering**, Oxon, v. 77, n. 4, p. 992-996, 2006.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, London, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- CAMPOS, M. G.; WEBBY, R. F.; MARKHAM, K. R.; MITCHELL, K. A.; CUNHA, A. P. Age-induced diminution of free radical scavenging capacity in bee pollens and the contribution of constituent flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, n. 3, p. 742-745, 2003.
- COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids: chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **Journal of Nutrition Biochemistry**, Woburn, v. 7, n. 2, p. 66-76, 1996.
- DORMAN, H. J. D.; KOSAR, M.; KAHLOS, K.; HOLM, Y.; HILTUNEN, R. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, Hybrids, Varieties, and Cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, n. 16, p. 4563-4569, 2003.
- DOWD, L. E. Spectrophotometric determination of quercetin. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 7, p. 1184-1187, 1959.
- GARCÍA, M.; PÉREZ-ARQUILLUE, C.; JUAN, T.; JUAN, M. I.; HERRERA, A. Note: Pollen analysis and antibacterial activity of Spanish honeys. **Food Science and Technology International**, London, v. 7, n. 2, p. 155-158, 2001.
- ISLA, M. I.; MORENO, M. I. N.; SAMPIETRO, A. R.; VATTUONE, M. A. Antioxidant activity of Argentine propolis extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v. 76, n. 2, p. 165-170, 2001.
- JAVANMARDI, J.; STUSHNOFF, C.; LOCKE, E.; VIVANCO, J. M. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. **Food Chemistry**, Oxon, v. 83, n. 4, p. 547-550, 2003.
- KROYER, G.; HEGEDUS, N. Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, Kidlington Oxford, v. 2, n. 3, p. 171-174, 2001.
- MARCHINI, L. C.; REIS, V. D. A.; MORETI, A. C. C. C. Composição físico-química de amostras de pólen coletado por abelhas africanizadas *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) em Piracicaba, estado de São Paulo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 3, p. 949-953, 2006.
- MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 2, p. 127-130, 2001.
- MINUSSI, R. C.; ROSSI, M.; BOLOGNA, L.; CORDI, L.; ROTILIO, D.; PASTORE, G. M.; DURÁN, N. Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines. **Food Chemistry**, Oxon, v. 82, n. 3, p. 409-416, 2003.
- PARK, Y. K.; HIKEGAKI, M.; ABREU, J. A. S.; ALCICI, N. M. F. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 3, p. 313-318, 1998.
- RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, Oxford, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.
- SERRA BONVEHÍ, J.; ESCOLÀ JORDÀ, R. Nutrient composition and microbiological quality of honeybee-collected pollen in Spain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 45, n. 3, p. 725-732, 1997.
- SINGLETON, V. L.; JOSEPH, A.; ROSSI, J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 16, p. 144-149, 1965.
- WESH, S. O.; MARSTON, R. M. Nutritional Bioavailability of Zinc. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1983. 591 p.