

POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO *IN VITRO* DE MEL DE MELATO DE BRACATINGA

B. Silva¹, F. C. Biluca¹, E. T. B. Mohr², T. Caon³, E. M. Dalmarco², A.C.O. Costa¹

1 – Departamento de Ciências dos Alimentos – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias – CEP: 88034-000 – Florianópolis – SC – Brasil, Telefone: (48) 99600-3580 – e-mail: (bibianaengenheira@hotmail.com).

2 – Departamento de Análises Clínicas - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde - Florianópolis – SC – Brasil.

3 – Departamento de Ciências Farmacêuticas - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde - Florianópolis – SC – Brasil.

RESUMO – O potencial anti-inflamatório de méis de melato de bracatinga (MMB) foi avaliado considerando a modulação de mediadores inflamatórios em macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS (lipopolissacarídeo). Duas amostras foram avaliadas quanto ao teor de compostos fenólicos e quanto à modulação de óxido nítrico e das citocinas TNF- α e IL-6. A viabilidade celular dos macrófagos não foi afetada pelo tratamento com MMB e as amostras avaliadas modularam significativamente a expressão dos mediadores testados. A amostra MMB da cidade de Urupema, SC (UP) se destacou pelo potencial de modulação em concentração de apenas 3 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e esse efeito parece estar fortemente relacionado ao seu perfil de compostos fenólicos, que se apresentou mais variado e em concentração maior. Este estudo confirmou que o consumo de mel de melato de bracatinga é recomendado, mesmo em pequenas quantidades, e pode contribuir para o tratamento de distúrbios inflamatórios.

ABSTRACT – The anti-inflammatory potential of bracatinga honeydew honeys was evaluated considering the modulation of inflammatory mediators in RAW 264.7 macrophages stimulated by LPS. Two samples were evaluated regarding the content of phenolic compounds and the modulation of nitric oxide and the cytokines TNF- α and IL-6. The cell viability of macrophages was not affected by treatment with honeys and the tested samples significantly modulated the expression of the evaluated mediators. The MMB sample from Urupema was highlighted for its modulation potential at a concentration of only 3 $\mu\text{g mL}^{-1}$, and this effect seems to be strongly related to its phenolic compounds profile, which was more varied and in greater concentration. This study confirmed that the consumption of bracatinga honeydew honey in low doses is recommended and can improve the treatment of inflammatory disorders.

PALAVRAS-CHAVE: *Mimosa scabrella* Bentham; células RAW 264.7; citocinas; óxido nítrico; compostos fenólicos.

KEYWORDS: *Mimosa scabrella* Bentham; cells RAW 264.7; cytokines; nitric oxide; phenolic compounds.

1. INTRODUÇÃO

O mel de melato de bracatinga foi caracterizado por seu elevado teor de compostos fenólicos quando comparado aos méis florais (SERAGLIO et al., 2017; SILVA et al., 2019a), sendo que a ação destes compostos é frequentemente sugerida como estratégia para remissão de desordens inflamatórias crônicas (HAM et al., 2016; KHAJEVAND-KHAZAEI et al., 2018), cuja incidência tem aumentado de forma significativa. Alguns relatos sobre o desempenho do uso tópico de méis de melato contra respostas inflamatórias já foram publicados (MAJTANOVA et al., 2015; MAYER et al., 2014), porém ainda não existem estudos em nível celular.

O potencial de compostos fenólicos como mediadores de processos inflamatórios desencadeados por macrófagos estimulados por lipopolissacarídeos (LPS) já foi relatado (WANG et al., 2019). Os LPS são compostos encontrados na parede celular de bactérias gram-negativas, e são potentes iniciadores de processos inflamatórios. Os macrófagos ativados por LPS produzem diversos mediadores inflamatórios, como óxido nítrico e algumas citocinas, que desempenham diferentes funções no organismo (GASPARRINI et al., 2018).

Sendo assim, é imprescindível a investigação dos benefícios à saúde humana relacionados com consumo do mel de melato de bracatinga, a fim de valorizar um produto regional ainda pouco consumido no Brasil, mas apreciado nos países da Europa principalmente. Neste estudo, foi avaliado o potencial anti-inflamatório *in vitro* de méis de melato de bracatinga contra mediadores inflamatórios em macrófagos RAW 264.7 estimulados por LPS.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Padrões e reagentes

Padrões de ácidos ferúlico, gálico, siríngico, clorogênico, *p*-cumárico, 3,4-dihidroxibenzóico, benzoico, salicílico e cafeico, além dos flavonoides campferol, luteolina, quercetina, hesperidina, naringenina, pinobanksina, rutina e isoramnetina e coniferaldeído foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, E.U.A.) assim como metanol, acetonitrila, tetraidrofurano, dimetilsulfóxido, ácido fórmico, dexametasona e lipopolissacarídeo (LPS). Os adsorventes amina primária secundária (PSA) e octadecilsilano (C₁₈) foram adquiridos da Agilent Technologies Inc. (Santa Clara, CA, E.U.A.). O meio DMEM, soro bovino fetal, penicilina e estreptomicina foram obtidas de Gibco (Grand Island, Nova York, E.U.A.); os macrófagos RAW 264.7 foram obtidos da *American Type Cell Culture* (ATCC, Rockville, MD).

2.2 Amostras

Duas amostras de mel de melato de bracatinga (MMB) foram coletadas e fornecidas por apicultores das cidades de Urupema (MMB UP) em Santa Catarina e General Carneiro (MMB GC) no Paraná, durante a safra de 2018. Os favos de mel foram drenados, homogeneizados e armazenados em frascos de polipropileno a -20 ± 2 °C, até sua análise.

2.3 Determinação de compostos fenólicos

O método de QuEChERS foi empregado para extração de compostos fenólicos nas amostras de mel de melato de bracatinga de acordo com Silva et al. (2019). A identificação dos compostos foi realizada por HPLC-DAD (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, E.U.A.) de acordo com Silva et al. (2019b).

2.4 Viabilidade celular

A viabilidade celular dos macrófagos RAW 264.7 foi avaliada após o tratamento com MMB, pelo ensaio MTT (3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazol) de acordo com Mosmann (1983). Antes dos tratamentos, o número de células viáveis foi determinado pelo método de exclusão do azul de tripano. As células foram distribuídas em microplacas de cultura de 96 poços (1 x 10⁴ células por poço) e incubadas com MMB em diferentes concentrações (1, 3, 10, 30 e 100 µg mL⁻¹) por 24 h. Após o período de incubação, o meio foi removido e foram adicionados 100 µL de solução de 0,5 mg mL⁻¹ de MTT e as placas foram incubadas por 2 h. Após este período, o meio foi removido e o precipitado de formazan foi dissolvido em 100 µL de DMSO em cada poço. Finalmente, a absorbância da amostra foi determinada em 540 nm. A absorbância obtida para o grupo controle (células não tratadas, incubadas apenas com meio de crescimento) foi considerada como 100% de células viáveis.

2.5 Indução da inflamação em macrófagos por LPS

Os macrófagos foram cultivados em placas de 96 poços (2 x 10⁵ células por poço) por 48 h para aderência e confluência completa e após a adesão total dos macrófagos na placa, as células foram distribuídas em diferentes grupos, sendo eles: (a) branco (não exposto ao LPS); (b) controle negativo (inflamado com LPS); (c) controle

positivo, células pré-tratadas com dexametasona ($7 \mu\text{mol L}^{-1}$); e (d) grupos experimentais, células pré-tratadas com MMB em diferentes concentrações (1, 3, 10, 30 e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$). Após 1 h de incubação, as células foram estimuladas com LPS ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) por 24 h.

2.6 Avaliação da produção de óxido nítrico em macrófagos

O acúmulo de nitrito no meio foi medido como indicador da produção de óxido nítrico com base na reação de Griess (GREEN et al., 1982). Após o tratamento dos macrófagos com MMB (1, 3, 10, 30 e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$) seguido de estimulação com LPS ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$), foram coletados $100 \mu\text{L}$ de meio de cultura celular. O mesmo foi misturado com volume igual de reagente de Griess e incubado à temperatura ambiente por 10 min. A absorbância foi determinada em 540 nm e uma curva de calibração para o padrão nitrito ($0 - 100 \mu\text{mol L}^{-1}$) foi construída. Para análises posteriores da secreção de citocinas (TNF- α e IL-6), foi empregada a concentração de MMB, que proporcionou maior redução significativa dos níveis de óxido nítrico.

2.7 Quantificação de citocinas em macrófagos

Os níveis de fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6) foram determinados nos sobrenadantes do meio de cultura celular por citometria de fluxo (BD Biosciences FACS Verse[®], San Jose, Califórnia, E.U.A.) usando o kit inflamatório BD[®] Cytometric Bead Array (CBA) (San Jose, Califórnia, E.U.A.). Os dados foram analisados usando o *software* FCAP Array[®].

2.8 Análise estatística

Os experimentos foram realizados em três replicatas independentes e os resultados expressos como média \pm desvio padrão ou erro padrão da média. O intervalo de confiança de 95% foi adotado para todas as análises. Análise de variância (ANOVA) e teste *post hoc* de Tukey foram realizados, usando o *software* GraphPad Prism[®] v5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, Califórnia, E.U.A.).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente as amostras de MMB foram avaliadas quanto ao teor de compostos fenólicos, apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Compostos fenólicos ($\mu\text{g g}^{-1}$) em amostras de mel de melato de bracinga.

Composto	MMB UP	MMB GC	Composto	MMB UP	MMB GC
Ácido gálico	n.d.	<LD	Ácido benzoico	$15,2 \pm 0,8$	n.d.
Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	$28,8 \pm 0,5$	n.d.	Ácido salicílico	$20,1 \pm 0,3$	n.d.
Ácido clorogênico	n.d.	n.d.	Hesperedina	n.d.	<LD
Ácido siríngico	n.d.	$14,5 \pm 2,4$	Luteolina	$9,8 \pm 0,2$	n.d.
Ácido cafeico	n.d.	n.d.	Quercetina	n.d.	n.d.
Ácido <i>p</i> -cumárico	n.d.	n.d.	Pinobanksina	n.d.	n.d.
Ácido ferúlico	n.d.	n.d.	Naringenina	$1,2 \pm 0,2$	n.d.
Coniferaldeído	n.d.	n.d.	Campferol/isoramnetina	n.d.	<LD
Rutina	$21,5 \pm 1,8$	n.d.	Total	96,6	14,5

Resultados expressos como média \pm desvio padrão, $n = 3$. n.d, não detectado. <LD, abaixo do limite de detecção. LD determinado de acordo com Silva et al. (2019b).

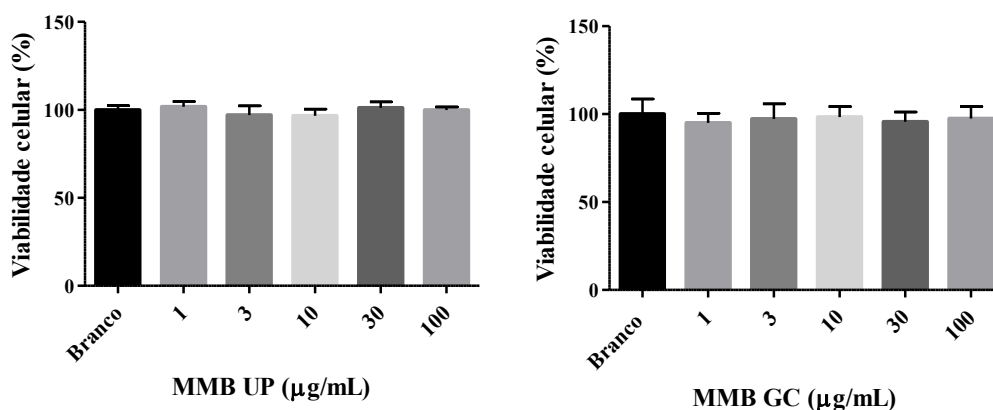
Fonte: o próprio autor.

Dentre os 18 compostos fenólicos avaliados, sete foram quantificados nas amostras de mel (ácidos 3,4-dihidroxibenzoico, siríngico, benzoico, salicílico, e os flavonoides luteolina, naringenina e rutina). A soma total dos compostos fenólicos foi maior na amostra MMB UP, totalizando seis compostos (1,2,3,4,5,6), e na amostra MMB GC somente o ácido siríngico foi quantificado. Os compostos fenólicos encontrados nas amostras

analisadas foram previamente identificados em outros tipos de mel de melato (CAN et al., 2015; HALOUZKA; TARKOWSKI; ZELJKOVIĆ, 2016).

Foi avaliado o efeito dos méis de melato de bracatinga na viabilidade dos macrófagos RAW 264.7, conforme apresentado na Figura 1. A viabilidade celular não foi afetada pela presença de nenhuma das amostras, independentemente da concentração aplicada (1 - 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Figura 1 – Viabilidade de macrófagos RAW 246.7 após tratamento com MMB.



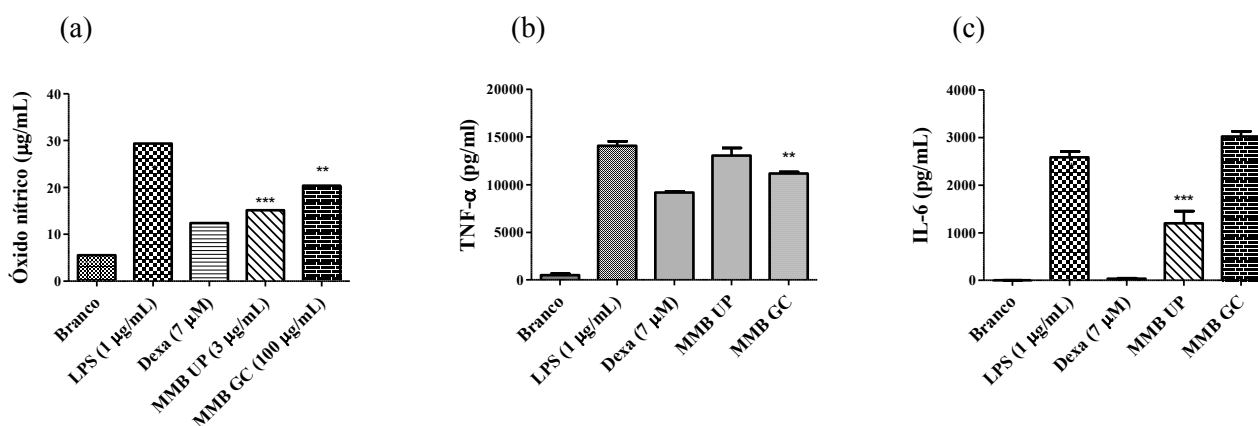
Resultados expressos como média \pm erro padrão da média.

MMB, mel de melato de bracatinga, UP, Urupema, GC, General Carneiro.

Fonte: o próprio autor.

Os níveis de óxido nítrico, TNF- α e IL-6 nos diferentes grupos de tratamento estão apresentados na Figura 2. Dentre as concentrações testadas (1 - 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$), apenas as concentrações de MMB UP e MMB GC que propiciaram máxima inibição significativa dos níveis de óxido nítrico foram selecionadas para a avaliação da inibição dos níveis de TNF- α e IL-6. Após a incubação dos macrófagos com LPS, a produção de óxido nítrico aumentou aproximadamente 5,3 vezes quando comparada às células não expostas ao LPS (branco), e os níveis de óxido nítrico foram significativamente inibidos pelo tratamento com MMB (Figura 2a).

Figura 2 - Efeitos do MMB nos níveis de (a) óxido nítrico, (b) TNF- α e (c) IL-6 em macrófagos tratados com LPS.



Resultados expressos como média \pm erro padrão da média, $n = 3/\text{grupo}$. *** $p < 0,001$ e ** $p < 0,01$ em comparação com o grupo controle negativo (LPS), pelo teste de Tukey, intervalo de confiança de 95%. Concentrações empregadas: MMB UP, 3 $\mu\text{g mL}^{-1}$; MMB GC, 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Fonte: o próprio autor.



A amostra MMB UP inibiu significativamente a produção de óxido nítrico independentemente da concentração empregada, enquanto que a amostra MMB GC demonstrou eficiência nesta inibição somente quando maiores concentrações foram aplicadas (10, 30 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$), portanto apenas as concentrações de cada amostra que proporcionaram máxima inibição foram consideradas. A produção de óxido nítrico está associada à ativação de macrófagos, resultando em várias desordens inflamatórias, portanto, pode ser um indicativo do estágio da inflamação, tanto aguda quanto crônica (FLORENTINO et al., 2017). A inibição de óxido nítrico em outros estudos foi relacionada à presença de compostos fenólicos, especialmente flavonoides (WANG; MAZZA, 2002). Compostos como naringenina, e luteolina, encontrados na amostra MMB UP em concentrações mais elevadas, podem explicar sua distinção na inibição de óxido nítrico.

A partir dos efeitos causados na viabilidade celular e na produção de óxido nítrico, foram selecionadas as concentrações de MMB UP (3 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e MMB GC (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) para os ensaios posteriores, que avaliaram os diferentes níveis de inibição de citocinas TNF- α e IL-6 pelas amostras de mel.

A secreção de TNF- α nos macrófagos tratados com LPS aumentou em aproximadamente 29 vezes em comparação com as células não expostas ao LPS (Figura 2b), e o uso de dexametasona inibiu esse parâmetro em 35%. Apenas a amostra MMP GC inibiu significativamente a produção de TNF- α , em apenas 20%. Apenas o ácido siríngico foi quantificado nesta amostra, o que pode indicar um relação estrutura-atividade para os compostos fenólicos. Por sua vez, a secreção de IL-6 (Figura 2c) foi significativamente reduzida após o tratamento com MMB UP em 53,7%, e o tratamento com MMB GC provocou aumento da expressão da citocina. A dexametasona reduziu a secreção de IL-6 em 98,6% e os macrófagos tratados com LPS produziram 680 vezes mais IL-6 quando comparados às células não expostas ao LPS.

A principal função do TNF- α é iniciar a comunicação celular em condições patológicas, interagindo com outros mediadores e amplificando os sinais celulares (LAGHA; GRENIER, 2019). Gasparrini et al. (2018), relataram inibição da expressão de TNF- α em 40% usando 8 mg mL^{-1} de mel de Manuka em macrófagos estimulados por LPS. Os resultados mostraram que o MMB apresentou relevante ação na inibição da citocina usando concentrações notadamente mais baixas. A IL-6 é produzida na área inflamada e promove a produção de proteínas da fase aguda da inflamação. Essas proteínas caracterizam a presença e a intensidade da inflamação, podendo contribuir para seu diagnóstico e controle (HUSSEIN et al., 2012). Os resultados relatados para o MMB são importantes considerando a capacidade de redução da expressão de IL-6 observada quando concentrações de apenas 3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram usadas.

Os resultados deste estudo mostraram que o efeito das amostras de MMB frente aos mediadores inflamatórios pode estar associado à variedade ou a concentração de determinados compostos fenólicos. Alguns dos compostos fenólicos avaliados neste estudo já foram relacionados à supressão de respostas inflamatórias em estudos *in vitro* e *in vivo*, como o ácido 3,4-di-hidroxibenzoico (ADEDARA et al., 2019), ácido siríngico (HAM et al., 2016), rutina (KHAJEVAND-KHAZAEI et al., 2018), naringenina e luteolina (LÓPEZ-POSADAS et al., 2008). O MMB pode ser ingerido em baixas concentrações, o que é aconselhável considerando o alto conteúdo de açúcar, e mesmo assim fornecer efeitos benéficos. Vale ressaltar que a bioacessibilidade dos compostos fenólicos encontrados em MMB já foi avaliada por Seraglio et al. (2017), que relataram estabilidade e elevada bioacessibilidade de compostos fenólicos presentes em MMB durante a simulação da digestão *in vitro*.

4. CONCLUSÃO

Duas amostras de MMB foram avaliadas quanto à composição fenólica e o potencial anti-inflamatório *in vitro*. O perfil e a concentração fenólica das amostras foram diversificados e alguns dos compostos encontrados foram apontados como mediadores de inflamação *in vitro* e *in vivo* em outros estudos. As duas amostras de MMB se mostraram capazes de mitigar as cascatas inflamatórias estimuladas por LPS em macrófagos RAW 264.7, reduzindo a expressão de mediadores inflamatórios importantes como óxido nítrico e as citocinas TNF- α e IL-6. Os efeitos anti-inflamatórios observados podem estar associados aos compostos fenólicos presentes nas amostras. Com base nos resultados encontrados, foi possível afirmar que o consumo de mel de melato de bracatinga pode ser relevante como adjuvante no tratamento ou prevenção de desordens inflamatórias. Estudos

futuros são necessários tanto para avaliação do potencial de compostos isolados do mel em inibir a inflamação quanto para a avaliação do potencial anti-inflamatório *in vivo*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEDARA, I. A. et al. Protocatechuic acid ameliorates neurobehavioral deficits via suppression of oxidative damage, inflammation, caspase-3 and acetylcholinesterase activities in diabetic rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 125, n. December 2018, p. 170–181, 2019.
- CAN, Z. et al. An investigation of Turkish honeys: Their physico-chemical properties, antioxidant capacities and phenolic profiles. **Food Chemistry**, v. 180, p. 133–141, 2015.
- FLORENTINO, I. F. et al. Potential anti-inflammatory effect of LQFM-021 in carrageenan-induced inflammation: The role of nitric oxide. **Nitric Oxide**, v. 69, p. 35–44, 2017.
- GASPARRINI, M. et al. Protective effects of Manuka honey on LPS-treated RAW 264.7 macrophages. Part 2: Control of oxidative stress induced damage, increase of antioxidant enzyme activities and attenuation of inflammation. **Food and Chemical Toxicology**, v. 120, n. August, p. 578–587, 2018.
- GREEN, L. C. et al. Analysis of Nitrate, Nitrite, and [15N] Nitrate in Biological Fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 138, p. 131–138, 1982.
- HALOUZKA, R.; TARKOWSKI, P.; ZELJKOVIĆ, S. Č. Characterisation of phenolics and other quality parameters of different types of honey. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 34, n. No. 3, p. 244–253, 2016.
- HAM, J. R. et al. Anti-steatotic and anti-inflammatory roles of syringic acid in high-fat diet-induced obese mice. **Food & function**, v. 7, p. 689–697, 2016.
- HUSSEIN, S. Z. et al. Gelam Honey Inhibits the Production of Proinflammatory Mediators NO, PGE₂, TNF- α , and IL-6 in Carrageenan-Induced Acute Paw Edema in Rats. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1–13, 2012.
- KHAJEVAND-KHAZAEI, M.-R. et al. Rutin, a quercetin glycoside, alleviates acute endotoxemic kidney injury in C57BL/6. **European Journal of Pharmacology**, v. 833, p. 307–312, 2018.
- LAGHA, A. BEN; GRENIER, D. Tea polyphenols protect gingival keratinocytes against TNF- α -induced tight junction barrier dysfunction and attenuate the inflammatory response of monocytes / macrophages. **Cytokine**, v. 115, n. May 2018, p. 64–75, 2019.
- LÓPEZ-POSADAS, R. et al. Effect of flavonoids on rat splenocytes, a structure-activity relationship study. **Biochemical Pharmacology**, v. 76, n. 4, p. 495–506, 2008.
- MAJTANOVA, N. et al. Complementary treatment of contact lens-induced corneal ulcer using honey: A case report. **Contact Lens and Anterior Eye**, v. 38, n. 1, p. 61–63, 2015.
- MAYER, A. et al. Treatment of non-healing leg ulcers with honeydew honey. **Journal of Tissue Viability**, v. 23, n. 3, p. 94–97, 2014.
- MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.
- SERAGLIO, S. K. T. et al. Effect of *in vitro* gastrointestinal digestion on the bioaccessibility of phenolic compounds, minerals, and antioxidant capacity of *Mimosa scabrella* Benth honeydew honeys. **Food Research International**, n. April, p. 0–1, 2017.
- SILVA, B. et al. Improved strategy based on QuEChERS method followed by HPLC/DAD for the quantification of phenolic compounds from *Mimosa scabrella* Benth honeydew honeys. **LWT - Food Science and Technology**, v. 116, n. July, p. 108471, 2019a.
- SILVA, B. et al. Simplex-centroid design and Derringer's desirability function approach for simultaneous separation of phenolic compounds from *Mimosa scabrella* Benth honeydew honeys by HPLC/DAD. **Journal of Chromatography A**, v. 1585, p. 182–191, 2019b.
- WANG, J.; MAZZA, G. Inhibitory Effects of Anthocyanins and Other Phenolic Compounds on Nitric Oxide Production in LPS / IFN- γ -Activated RAW 264.7 Macrophages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 850–857, 2002.
- WANG, Y. et al. Identification of phenolic compounds from a unique citrus species, finger lime (*Citrus*



australasica) and their inhibition of LPS-induced NO-releasing in BV-2 cell line. **Food and Chemical Toxicology**, v. 129, n. April, p. 54–63, 2019.