

AVALIAÇÃO DO PERFIL DE BIOATIVOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS VERMELHA PROVENIENTE DA BAHIA

Raimundo Evangelista dos Santos Junior¹; Katharine Valéria Saraiva Hodel²; Bruna Aparecida Souza Machado²

¹ Bolsista de Iniciação Científica – CNPq; raimundosantosjr95@outlook.com

² Instituto Senai de Sistemas Avançados de Saúde (ISI-SAS); Salvador - BA; bruna.machado@fieb.org.br

RESUMO

A própolis é material resinoso e balsâmico coletado pelas abelhas da espécie *Apis mellifera*, sendo utilizado para cobrir aberturas existentes na colmeia, auxiliando na sua proteção contra o ataque de microrganismos, assim como para a mumificação de insetos. A sua composição química é complexa, tendo em vista que se relaciona com a diversidade da flora e o período de coleta, sendo, portanto, de suma importância o seu estudo para determinar a sua aplicação industrial. Neste trabalho foram determinadas características químico-biológicas de própolis vermelha de Belmonte-BA visando correlacionar a sua composição química com a sua atividade antioxidante, no interesse de qualificar o material como composto ativo para a formulação de biocurativos. A partir de análise de compostos fenólicos e flavonoides verificou-se que o seu perfil de bioativos era condizente com aquele de uma amostra pertencente ao grupo 13, ao passo que também o resultado quanto a atividade antioxidante se mostrou promissor.

PALAVRAS-CHAVE: Própolis, vermelha, caracterização, química.

1. INTRODUÇÃO

A própolis é uma mistura complexa, formada por material resinoso e balsâmico coletado pelas abelhas melíferas de ramos, flores, pólen, brotos, botões florais e exsudatos de plantas. Em virtude disso, a composição da própolis é dependente da biodiversidade da região que as abelhas visitaram, motivo pelo qual a própolis do Brasil apresenta uma vasta variedade com atualmente 13 grupos distintos reconhecidos, os quais foram classificados conforme a sua composição química e atividade biológica.¹⁻²

Uma das descobertas mais recentes diz respeito a própolis vermelha, classificada como o 13º tipo de própolis brasileira existente (grupo 13), cujo interesse em seu estudo tem sido crescente nos últimos anos devido as suas várias atividades biológicas, tais como a ação antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória etc., demonstradas em ensaios *in vitro*. Por exemplo, tem se conhecimento do uso do extrato etanólico de própolis vermelha em sprays antissépticos bucais e nasais devido às suas propriedades farmacológicas.³ De acordo com a literatura, o fracionamento é a etapa inicial quando se deseja avaliar a composição química e atividades biológicas de compostos ativos. Nesse aspecto, o presente trabalho teve como objetivo fracionar e avaliar a composição química em fenólicos totais e flavonoides, assim como a atividade biológica antioxidante através do sequestro do radical DPPH visando avaliar o seu uso futuro como composto bioativo em formulações de biocurativos.

2. METODOLOGIA

O perfil de bioativos, especificamente fenólicos e flavonoides, na amostra de própolis vermelha, assim como a sua atividade antioxidante foram determinados conforme as metodologias descritas a seguir.

Obtenção e processamento da própolis

Aproximadamente 1000g de amostra bruta de própolis vermelha oriunda do município de Belmonte (Bahia), serão trituradas em um moinho (Cadence – Brasil) e peneiradas (60 mesh), a fim de obter uma granulometria adequada (aproximadamente 0,250 mm), aumentando a área superficial e homogeneizando o material de partida dos processos de extração. Pequenas quantidades (250g) de própolis serão mantidas no freezer a -10 °C, em frascos protegidos com papel laminado em condições atmosféricas inertes (N₂), a fim de evitar a degradação do material.⁴

Obtenção do extrato etanólico

O extrato etanólico da própolis vermelha será obtido a partir da adição de 15 mL de etanol (80%) a 2 g de própolis vermelha processada. A extração foi realizada a 70 °C por 30 minutos sob agitação constante em incubadora Shaker (MARCONI – modelo MA 420), a 710 rpm. Dessa etapa, o extrato será centrifugado (CENTRIFUGE - modelo SIGMA 2–16 KL) a 8800 rpm a 5 °C durante 10 minutos e o sobrenadante será

transferido para tubos de ensaio de vidro (15x160 mm). 10 mL de etanol (80%) será adicionado ao resíduo no tubo de centrifuga, e a centrifugação será repetida. O extrato será mantido em condições atmosféricas inertes (N₂) numa temperatura de 5°C para evitar a degradação.⁵

Caracterização do extrato de própolis vermelha

Determinação dos Compostos Fenólicos totais

O teor de fenólicos totais será determinado usando o reagente de Folin Ciocalteau por meio da metodologia proposta por Singleton et al.⁶ Será preparada a reação contendo uma alíquota de 0,5 mL da solução etanólica da amostra (0,5 mg. mL⁻¹), 2,5 mL de solução aquosa de Folin-Ciocalteau 10% e 2,0 mL de carbonato de sódio 7,5%. A mistura será mantida em banho-maria a 50 °C durante 5 minutos e então realizada a leitura em espectrofotômetro a uma absorvância de 765 nm. A quantidade de fenólicos totais será expressa como grama equivalentes de ácido gálico por 100 gramas de amostra (gEAG.g⁻¹) através da construção de uma curva de calibração utilizando soluções conhecidas do padrão ácido gálico nas mesmas condições ($\lambda = 765 \text{ nm}$).

Determinação do teor de Flavonoides

O teor total de flavonoides será determinado de acordo com o método proposto por Meda et al.⁷, com adaptações. Inicialmente, 2,0 mL do extrato (0,5 mg. mL⁻¹) serão transferidos para o tubo de ensaio e adicionados 2,0 mL de solução metanólica de cloreto de alumínio (AlCl₃) a 2%. As amostras serão homogeneizadas em um vórtex (IKA - modelo Lab Dancer) e deixadas sob o abrigo da luz por um período de 30 minutos. A leitura será em espectrofotômetro a 415 nm. O mesmo procedimento será realizado utilizando soluções conhecidas de quercetina (de 5 a 105 µg.mL⁻¹) para elaborar uma curva padrão. A quantidade de flavonoides totais será expressa como equivalentes de quercetina por grama de amostra (mgEQ.g⁻¹).

Determinação da Atividade Antioxidante *in vitro* por meio do sequestro do radical DPPH (1,1-diphenil-2-picrilhidrazil)

A atividade antioxidante *in vitro* do extrato será avaliada utilizando o reativo 1,1-diphenil-2-picrilhidrazil (também chamado de capacidade de sequestrar o radical DPPH).⁸ Serão preparadas 5 diluições (20 a 400 µg.mL⁻¹) do extrato, em triplicata. Uma alíquota de 1 ml de cada diluição do extrato será transferida para tubos de ensaio com 3,0 ml da solução etanólica do radical DPPH (0,004%). Após 30min de incubação no escuro e à temperatura ambiente, a redução do radical livre DPPH será mensurada pela leitura da absorvância em 517 nm. O mesmo procedimento será adotado com etanol no lugar da amostra, sendo considerado como branco. A capacidade de sequestrar radicais livres será expressa como percentual de inibição de oxidação do radical e calculado conforme a equação 1. O valor de CE50 (concentração de extrato necessária para sequestrar 50% do radical DPPH) será calculado através da equação da reta feita com base nas concentrações dos extratos e suas respectivas porcentagens de sequestro do radical DPPH.

$$\% \text{ sequestro} = 100 - [(\text{absorvância final da amostra} * 100) / \text{absorvância branco}] \quad (1)$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizadas as análises em triplicata para quantificar os compostos fenólicos, flavonoides, e atividade antioxidante (DPPH) no extrato de própolis vermelha. A Tabela 01 apresenta os resultados referentes a quantificação de cada uma das caracterizações mencionadas anteriormente. Constata-se que o teor de flavonoides (47,66 mg EAG/g) é inferior à média dos valores encontrados por Daugh et al. (2007),⁹ referente às análises de própolis pertencentes ao grupo 13 (65,76 mg EAG/g \pm 35,07), mas compreendido no intervalo do desvio padrão. De acordo com o autor essa variação se deve ao fato que algumas amostras foram coletadas em regiões onde a resina *D. ecastophyllum* era escassa.⁹

De semelhante modo, a quantidade de compostos flavonoides na amostra de própolis vermelha analisada apresentou um resultado abaixo do esperado (4,85 mg EQ/g) quando comparado ao identificado em amostras do grupo 13 originárias da região Nordeste analisadas por Daugh et al. (2007) (15,73 mg EQ/g \pm 8,01).⁹ Ressalta-se que, apesar da atividade antioxidante da própolis ser atribuída principalmente aos flavonoides, a quantidade de ácidos fenólicos pode apresentar um caráter relevante, portanto sua identificação e quantificação é de extrema importância.^{4,9-10}

Contudo, a determinação da atividade antirradical livre (DPPH) mostrou um percentual de inibição (PI) de 88,91%, percentual este superior ao identificado na referência (71,4% \pm 6,8) e que permite inferir que a amostra possui uma elevada capacidade de sequestrar radicais livres portanto, uma atividade antimicrobiana relevante. Deve-se ressaltar que a quantidade de flavonoides possui uma relação diretamente proporcional com o PI, pois quanto maior o teor de flavonoides, maior será a atividade antimicrobiana.⁹

Tabela 01 – Resultados preliminares das análises de caracterização químico-biológica do extrato de própolis vermelha oriunda de Belmonte (BA)

Análises		
Fenólicos (mg EAG/g)	Flavonoides (mg EQ/g)	DPPH (% inibição)
47,66	4,85	88,91%

Fonte: Própria

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados das análises para identificação do perfil de bioativos e atividade antioxidante do extrato de própolis vermelha apresentaram resultados satisfatórios, tendo em vista que os teores de fenólicos e flavonoides se mostraram condizentes com o retratado na literatura, enquanto que a sua atividade antioxidante obteve uma resposta além do esperado, em virtude do alto percentual de inibição da oxidação do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (88,91%), resultado este superior àquele encontrado na bibliografia utilizada para esse trabalho. De modo que o material em questão possui um potencial para atuação como composto bioativo, o que corrobora para um futuro crescimento dos estudos por parte do SENAI CIMATEC a acerca dos benefícios advindos do uso da própolis vermelha em aplicações biomédicas, tendo em vista que esse trabalho faz parte de um projeto a longo prazo que visa desenvolver formulações de biomateriais capazes de atuar como biocurativos em queimaduras de maneira a acelerar a recuperação do paciente.

Agradecimentos

Ao CNPq pelo apoio financeiro e pela bolsa de iniciação científica concedida.
 As pesquisadoras Dr^a Bruna Machado e Msc. Katharine Hodel pela confiança em mim depositada.
 À equipe do Instituto de Tecnologias da Saúde (ITS) do SENAI CIMATEC pela estrutura disponibilizada.

5. REFERÊNCIAS

- CRANE, E. **The past and present importance of bee products to man**. New York: Plenum Press, 1997.
- PEREIRA, A; SEIXAS, F.; NETO, F. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Quim Nova**. 2002;25(2):321-326.
- PARK, et al. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Cienc Tecnol Aliment**. 1998;18(3):313-318.
- MACHADO, et al. Chemical composition and biological activity of extracts obtained by supercritical extraction and ethanolic extraction of brown, green and red propolis derived from different geographic regions in Brazil. **PLoS One**, 2016, 11(1), 1-26.
- DEVEQUI-NUNES, et al. Chemical characterization and biological activity of six different extracts of propolis through conventional methods and supercritical extraction. **PLoS One**, 2018, 1-20.
- SINGLETON, V.L. et al. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods Enzymol**, 1999, 299, 152-178.
- MEDA, A. et al. Determination of the total phenolic flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chem**, 2005, 91(3), 571-577.
- MOLYNEUX, P. The use of stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin J Sci Technol**, 2004, 26, 211-219.
- DAUGSH, A. **A própolis vermelha do nordeste do Brasil e suas características químicas e biológicas**. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, p.72-74. 2007.