

## **AVALIAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS EM METANOL E ETANOL DA PRÓPOLIS DE ABELHAS SEM FERRÃO AMAZÔNICAS**

Magno Perêa MUNIZ<sup>1</sup>; Gislene Almeida CARVALHO-ZILSE<sup>2</sup>; Rita de Cássia Saraiva NUNOMURA<sup>3</sup>; Sergio Massayoshi NUNOMURA<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>Bolsista PIBIC/FAPEAM/INPA; <sup>2</sup>Orientadora CPCA/ INPA; <sup>3</sup>Co-orientadora UFAM/ICE; <sup>4</sup>Colaborador CPPN/ INPA.

### **1.Introdução**

Os Meliponíneos são as abelhas indígenas sem ferrão e sua criação constitui a Meliponicultura (Nogueira-Neto, 1997). Diversas espécies destas abelhas sem ferrão (Apidae, Meliponinae) habitam a região amazônica e mantêm uma intrínseca relação ecológica prestando serviços de polinização e dispersão de sementes (Bacelar-Lima *et al.*, 2006) à flora nativa em troca de alimentos (néctar e pólen) e de material para construção (resinas, sementes, etc). Conforme ocorre o desenvolvimento do trabalho das abelhas, vários produtos são obtidos tais como o mel, o pólen, a geléia real, a cera e a própolis. Esses produtos servem como alimentos nutracêuticos e apresentam grande importância biológica para o homem devido às suas muitas propriedades antibacteriana (Sforcin *et al.*, 2000), antiviral (Vynograd *et al.*, 2000), antiinflamatória (Khayyal *et al.*, 1993), antioxidante (Bankova *et al.*, 2000), entre outras. A própolis é uma resina vegetal de composição complexa com variabilidade química devido à exploração de diferentes plantas e a influência do clima. Quando misturada com barro é denominada de geoprópolis (Nogueira-Neto, 1997). É utilizada popularmente como antibacteriana, antifúngica, antioxidante, antiviral, entre outras atividades biológicas. A composição da própolis varia conforme a vegetação da área de influência do meliponário, onde as abelhas são criadas. No geral, 50 a 60% da própolis é composta por resinas e bálsamos; entre 30 a 40%, cera; 5 a 10% de óleos essenciais, aproximadamente 5% de grãos de pólen e outras substâncias (Burdock, 1998). Um dos principais componentes presentes são os compostos fenólicos (CF) que provavelmente são os responsáveis pela maioria das atividades já verificadas (Ghisalberti, 1979). Considerando a importância dos fenólicos como antioxidantes, o presente trabalho teve como objetivo determinar por ensaios espectroscópicos a quantidade de fenólicos totais, pelo método Folin-Ciocalteu, e avaliar a atividade antioxidante (AA), pelos ensaios de DPPH e FRAP dos extratos metanólicos e etanólicos da própolis, obtidas da geoprópolis de *Melipona interrupta manausensis* Schwarz, 1932 conhecida popularmente como Jupará e *M. seminigra merrillae* Cockerell, 1919 conhecida como Uruçu Boca-de-renda, cultivadas em Manaus e Boa Vista do Ramos - AM, uma vez que nenhum trabalho foi realizado com geoprópolis procedente de espécies de abelhas amazônicas.

### **2.Material e métodos**

Conforme o uso popular, 3,0 g do material (geoprópolis da duas espécies) foram submetidos à maceração, e completou-se o volume para 100 mL de etanol 70%, ficando assim por três semanas, renovando-se o solvente a cada 7 dias em temperatura ambiente e com agitação moderada. Ao término da extração, a amostra foi filtrada, concentrada em rotaevaporador, e seca ao banho de areia, resultando no extrato etanólico. O restante do material de geoprópolis foi submetido à extração em metanol em aparelho do tipo Soxhlet, por 18 horas, renovando-se o solvente a cada 6 horas. Após esse procedimento os extratos foram concentrados em rotaevaporador, em seguida foram transferidos a frascos e secos em banho de areia sob leve aquecimento. Os extratos resultantes foram submetidos a um tratamento prévio envolvendo a ressolubilização, centrifugação, filtração e concentração das amostras com o objetivo de separar a terra remanescente. Após esse tratamento as amostras foram secas e submetidas às análises. No total, foram obtidas cinco amostras de *Melipona interrupta* (Mi) e cinco amostras de *M. seminigra* (Ms). Preliminarmente, por cromatografia em camada delgada, verificou-se a presença de compostos fenólicos utilizando o reagente de detecção FeCl<sub>3</sub> e o DPPH (0,2 mg/mL) para identificar antioxidantes.

A quantificação do teor de fenólicos totais nos extratos da própolis foi determinada pelo método de Folin-Ciocalteu (Velioglu *et al.*, 1998). A concentração desses compostos é determinada com auxílio da construção de uma curva de calibração utilizando como padrão o ácido gálico. Tal método baseia-se na redução em meio alcalino do fosfomolibdato-fosfotungstato pelos fenóis, a molibdênio, o que proporciona a mudança da coloração amarela para azul. A concentração de fenólicos totais presentes na amostra é medida pela intensidade da coloração azul a 725 nm. O primeiro teste antioxidante analisa a capacidade da amostra em reduzir o complexo de  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  por redutores, no caso, os antioxidantes presentes na amostra (Figura 1), pelo qual o complexo de  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ tem uma cor azul intensa e pode ser monitorado, a 593 nm, em espectrofotômetro. Para a determinação da redução do ferro foi feita uma curva de calibração de sulfato ferroso nas concentrações de 125 a 2000  $\mu\text{M}$  segundo procedimento descrito por Luximon-Ramma (2002).

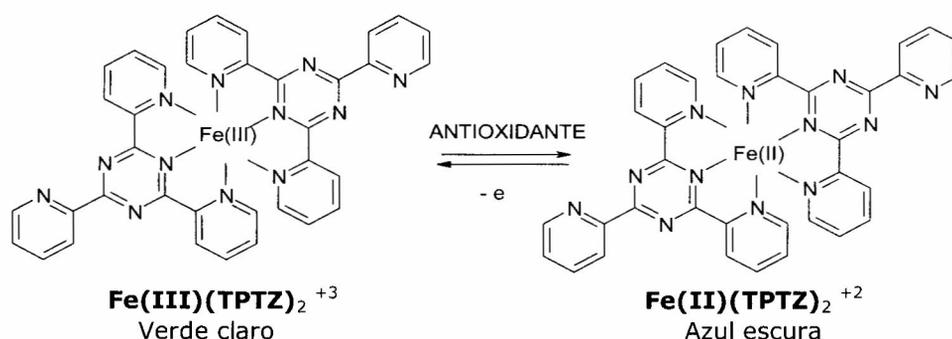


Figura 6. Reação de redução do complexo de Fe(III) para Fe(II).

O segundo teste aplicado para determinar a atividade antioxidante utiliza como fonte de radical livre o DPPH (2,2-difenil-picril-hidrazila). Esse método avalia a habilidade que uma substância, ou mistura de substâncias, têm de seqüestrar o radical livre estável DPPH (Figura 2). Ele está baseado no descolorimento de uma solução composta pelo radical estável, de cor violeta, quando a adição de substâncias que podem ceder um átomo de hidrogênio, determinando a capacidade da amostra de seqüestrar 50% de radicais livres de DPPH (Choi *et al.*, 2002).

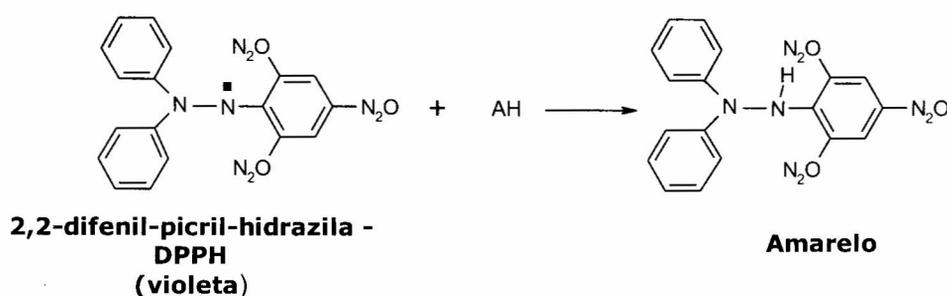


Figura 7. Reação entre o radical livre (DPPH) e o antioxidante.

### 3. Resultados e discussão

Após a obtenção dos extratos foram calculados os rendimentos a partir da massa inicial da própolis. Os resultados mostraram um teor de extrativo baixo para os dois métodos de extração aplicado indicando, portanto, pouca quantidade de material orgânico, visto que durante o processamento da própolis as abelhas normalmente misturam-na com terra, gerando uma própolis com grande quantidade de material inorgânico e resultando em um baixo rendimento.

As massas obtidas pela extração em metanol foram relativamente maiores que os extratos obtidos em etanol (Tabela 1 e 2).

Tabela 2 – Extração da própolis em metanol

Tabela 3 - Extração da própolis em etanol

Código Amostra (g)	Rendimento (%)	1.1. Código			
		Amostra (mg)	Rendimento (%)		
Mi2	0,7439	0,5998	Mi2	17,2	0,572
Mi3	1,1232	0,4196	Mi3	22,5	0,749
Mi4	1,3287	2,5999	Mi4	68,2	2,269
Mi5	5,3105	2,3359	Mi5	153,1	5,095
Mi6	38,7574	11,7163	Mi6	357	11,875
Ms1	0,4855	1,1518	Ms1	26,8	0,893
Ms2	0,6875	0,8858	Ms2	29,5	0,983
Ms3	12,1526	18,9588	Ms3	324,4	10,8
Ms4	10,9737	16,1094	Ms4	392	13,039
Ms5	1,7365	11,1457	Ms5	417,4	13,892

Os extratos então foram submetidos a um tratamento, conforme descrito nos métodos, para separar a terra residual e após serem secos foi preparado uma solução de cada extrato na concentração de 1 mg/mL seguidos da análise do teor de fenólicos totais e sua atividade antioxidante (Tabela 3 e 4).

Tabela 3 – Análises dos extratos em metanol

Ext. metanólico	DPPH ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	FRAP*	Fenólicos Totais ( $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ )**
Mi2	690,9 ± 1,9	173,0 ± 2,4	26,9 ± 2,9
Mi3	184,1 ± 1,9	465,9 ± 2,4	51,8 ± 3,1
Mi4	18,4 ± 3,0	1857,4 ± 0,03	222,7 ± 1,8
Mi5	15,0 ± 7,1	3134,8 ± 0,5	325,0 ± 0,5
Mi6	28,7 ± 1,5	1016,7 ± 0,9	137,1 ± 1,8
Ms1	162,0 ± 0,4	205,2 ± 4,1	38,5 ± 0,4
Ms2	217,9 ± 3,2	138,9 ± 5,2	24,0 ± 3,24
Ms3	328,2 ± 4,0	185,9 ± 18,7	100,5 ± 4,0
Ms4	181,0 ± 3,0	320,0 ± 1,7	74,8 ± 3,0
Ms5	225,3 ± 3,3	151,8 ± 5,7	37,7 ± 3,3

\*  $\mu\text{mol Fe(II)}/\text{g}$  de extrato seco

Tabela 4 – Análise dos extratos em etanol

Ext. etanólico	DPPH ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	FRAP*	Fenólicos Totais ( $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ )**
Mi2	869,05 ± 2,9	96,3 ± 2,3	26,2 ± 0,9
Mi3	302,1 ± 0,9	159,7 ± 1,2	39,2 ± 1,7
Mi4	23,9 ± 4,9	1175,9 ± 0,4	208,4 ± 0,8
Mi5	14,0 ± 0,5	1527,8 ± 0,3	273,6 ± 0,1
Mi6	36,8 ± 5,1	924,3 ± 0,7	178,8 ± 0,6
Ms1	236,1 ± 0,7	158,2 ± 1,2	39,6 ± 5,0
Ms2	197,1 ± 4,4	192,0 ± 3,6	46,7 ± 2,6
Ms3	403,0 ± 6,1	141,3 ± 4,7	88,2 ± 1,5
Ms4	454,6 ± 0,07	127,4 ± 5,9	60,8 ± 0,2
Ms5	589 ± 5,4	112,0 ± 13	31,4 ± 0,6

\*\* Equivalentes de ácido gálico

Os resultados mostram que os teores de fenólicos apontaram valores ligeiramente próximos para os dois métodos de extração. Entre as amostras das duas espécies, observa-se maior concentração de fenólicos nas amostras Mi4, Mi5 e Mi6 de *M. interrupta* e um resultado relevante na amostra Ms3 de *M. seminigra*. Nos testes de atividade antioxidante foi possível confirmar uma correlação entre a atividade antioxidante e a concentração de fenólicos das amostras analisadas. No teste de atividade antioxidante pelo método FRAP, as amostras Mi4, Mi5 e Mi6 de *M. interrupta*, obtidas das duas extrações apresentaram uma ótima atividade antioxidante, pela capacidade redutora de ferro (Figura 4), em comparação com as amostras Mi2 e Mi3 que expressaram valores baixos, juntamente com as amostras de *M. seminigra*. Os resultados observados apontam nos dois métodos de extração que as mesmas amostras com alto teor de fenólicos também mostraram certa

atividade antioxidante, sendo que as amostras com maior atividade antioxidante foram aquelas extraídas em metanol. A atividade antioxidante dos extratos de geoprópolis também foi analisada frente ao método de seqüestro de radicais livres de DPPH. Quanto menor a concentração necessária para seqüestrar 50 % dos radicais livres de DPPH (valores de  $CS_{50}$ ), maior a atividade antioxidante. Entre as amostras de geoprópolis da espécie *M. interrupta*, as amostras Mi4, Mi5 e Mi6 das duas extrações apresentaram atividade antioxidante mais expressiva, com valores próximos ao controle positivo (quercetina) que apresentou  $CS_{50}$  com 5,7  $\mu\text{g/mL}$ . Não foi possível observar resultados satisfatórios para as amostras Mi2. Os dois extratos (metanólico e etanólico) da geoprópolis de *M. seminigra*, comparadas com a quercetina, apresentaram atividade antioxidante muito baixa frente esse método, indicando que a atividade antioxidante não é satisfatória nessas amostras. Em pesquisas realizadas com a própolis de origem de diversas áreas da Província de San Juan – Argentina, Lima *et al.* (2009) mostraram correlação entre a presença de compostos fenólicos e sua atividade antioxidante. A própolis originada de Bornes apresentou 329,0  $\mu\text{g/mg}$  de compostos fenólicos e uma atividade antioxidante pela capacidade de seqüestro de radical livre de 6  $\mu\text{g/mL}$ , indicando uma ótima atividade quando comparado com o controle positivo utilizado no método (5,7  $\mu\text{g/mL}$ ). Outra amostra analisada de origem de Fundão apresentou um teor mais baixo com 151,00  $\mu\text{g/mg}$  com atividade antioxidante de 52  $\mu\text{g/mL}$ , confirmando então a correlação existente entre os compostos fenólicos e sua capacidade de seqüestrar radicais livres.

#### 4. Conclusão

Os resultados obtidos dos ensaios de fenólicos totais e os testes antioxidantes dos extratos metanólicos e etanólicos da geoprópolis das duas espécies, apresentaram certa correlação entre a presença de substâncias fenólicas e a atividade antioxidante. Os mesmos componentes extraídos em metanol, que é um solvente mais polar, também são encontrados quando extraídos em etanol, garantindo que o extrato de própolis comercial é eficiente. As amostras de geoprópolis de *M. interrupta* apresentaram melhor atividade antioxidante em relação à geoprópolis coletada por *M. seminigra*, portanto, as espécies vegetativas visitadas por abelhas *M. interrupta* apresentam substâncias ricas em compostos fenólicos que proporcionam sua atividade antioxidante.

#### 5. Referências

- Bacelar-Lima, C.G.; Freire, D.C.B.; Coletto-Silva, A.; Costa, K.B., Laray, J.P.B.; Vilas-Boas, H.C.; Carvalho-Zilse, G.A. 2006. Melitocoria de *Zygia racemosa* (Ducke) Barneby & Grimes por *Melipona seminigra merrillae* Cockerell, 1919 y *Melipona compressipes manaosensis* Schwarz, 1932 (Hymenoptera, Meliponina) en la Amazonía Central, Brasil. *Acta Amazonica*, 36(3): 343 – 348.
- Bankova, V.; Castro, S. L.; Marcucci, M. C. 2000. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31: 3-15.
- Burdock, G. A., 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology*, 36: 347-363.
- Choi, C. W.; Kim, S. C.; Hwang, S. S.; Choi, B. K.; Ahn, H. J.; Lee, M.Y.; Park, S. H.; Kim, S. K. 2002. Antioxidant Activity and Free Radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Science*, 163: 1161-1168.
- Ghisalberti E. 1979. Propolis: a review. *Bee World*, 60(2), 59-84.
- Khayyal, M. T.; el-Ghazaly, M. A.; el-Khatib, A. S. 1993. Mechanisms involved in the antiinflammatory effect of propolis extract. *Drugs Experimental and Clinical Research*, 19: 197-203.
- Luximon-Ramman, B. T., Soobratee, M. A., Aruoma, O. I., 2002. Antioxidant activities of phenolic, proanthocyanidin and flavonoid components in extracts of *Cassia fistula*. *Jornal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 5042-5047.
- Nogueira-Neto, P. 1997. *Vida e criação de Abelhas Indígenas Sem Ferrão*. São Paulo - SP, Editora Nogueiraapis, Brasil, 445pp.

Sforcin, J. M. Fenandes, Jr. A.; Lopes, C. A.; Bankova, V.; Funari, S. R. 2000. Seasonal effect on Brazilian própolis antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 73: 243-249.

Velioglu, Y. S.; Mazza, G.; Gao, L.; Oomah, B. D. 1998. Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruts, Vegetables, and Grain Products. *Jornal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 4113-4117.

Vynograd, N.; Vynograd, I.; Sosnowski, Z. 2000. A comparative multi-centre study of the efficacy of propolis, acyclovir and placebo in the treatment of genial herpes (HSV). *Phytomedicine*, 7: 1-6.