

Compostos bioativos, atividade antioxidante e antibacteriana de própolis

CRISTINA JANSEN¹; TAILISE ZIMMER²; SUZANA TREPTOW²; ELIEZER AVILA GANDRA³; RUI CARLOS ZAMBIAZI³

¹Faculdade de Nutrição- Universidade Federal de Pelotas 1 – cris-jansen@hotmail.com

2 Acadêmicas do curso de Tecnologia de Alimentos – UFPel – zimmertailise@gmail.com; suh_treptow@hotmail.com

³Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos–Universidade Federal de Pelotas- gandraea@hotmail.com; zambiazi@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A própolis é um produto elaborado pelas abelhas, através de substâncias resinosas e balsâmicas coletadas de brotos e flores, sendo parcialmente digeridos pelas abelhas, que ainda acrescentam cera e pólen (SILVA et al., 2012). A própolis vem sendo utilizada no tratamento de diversas doenças, devido à sua propriedade antimicrobiana, anti-inflamatória, antitumoral, cicatrizante, anestésica e antioxidante. Estas propriedades são atribuídas à complexa composição química, principalmente pela presença de compostos bioativos, oriundos do metabolismo especializado das plantas, sendo encontrados em maior concentração os compostos fenólicos da classe dos flavonoides (MOREIRA et al., 2008).

Estudos demonstraram que o Brasil possui clima e vegetação que torna possível às abelhas produzirem uma própolis de alta qualidade, o que se torna um diferencial dentre os países produtores. Porém, a própolis apresenta variações na sua composição química e, portanto, nas suas propriedades biológicas, de acordo com as diferentes regiões do país onde são coletadas, e esta variação ocorre em virtude da grande biodiversidade de plantas encontradas no Brasil (PEREIRA et al., 2002). Por essa razão, a própolis brasileira têm se tornado objeto de grande interesse por parte dos pesquisadores de todo o mundo (TRUSHEVA et al., 2006).

A substituição dos conservantes sintéticos por agentes antimicrobianos mais eficientes e com menos efeitos adversos na saúde humana, despertou o interesse de pesquisas para a descoberta de novas substâncias com efeito antimicrobiano (FRANCO et al., 2007). Os compostos naturais, elaborados a partir de matérias-primas como a própolis, podem ser uma alternativa para utilização como antimicrobianos.

Por esta razão, se tornam muito importantes pesquisas que caracterizem a própolis de diferentes regiões, distinguindo a composição e a atividade biológica das amostras. Diante do exposto, este estudo visa analisar amostras de própolis oriundas do Rio Grande do Sul, quanto ao conteúdo de compostos bioativos, capacidade antioxidante e ação antibacteriana para inibir a *Listeria monocytogenes*.

2. METODOLOGIA

As amostras de própolis foram coletadas por apicultores, na primavera de 2013, a partir de quatro cidades da região Sul do Estado do Rio Grande do Sul do Brasil: Pelotas 1(Zona Norte) (31°42'10.3"S e 52°22'34.9"W) e Pelotas 2 (Zona Rural) (31°35'55.0"S e 52°31'06.0"W); Rio Grande (32°02'06.2"S e 52°05'56.4"W); Canguçu (31°23'33.8"S e 52°39'58.8"W); e Pedro Osório (31°52'37.4"S e 53°01'25.2"W).

Para a preparação dos extratos hidroalcoólicos de própolis (EHP), a própolis foi triturada com auxílio de nitrogênio líquido de acordo com Silva et al. (2012), dissolvendo 10g de própolis em etanol 80%.

A determinação do teor de flavonoides foi realizada pelo método colorimétrico, utilizando cloreto de alumínio (AlCl_3), conforme metodologia descrita por Mello, Petrus e Hubinger (2010). Foram adicionados 100 μL de AlCl_3 , e a absorbância da mistura foi determinada a 415 nm em espectrofotômetro (JENWAY 6705 UV/Vis.). Para a curva de calibração, soluções de quercetina em etanol (80%), com concentrações variando de 10 a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foram utilizados. Os resultados foram expressos em termos de equivalentes de miligrama de quercetina por grama de matéria seca de própolis (mg eq.g^{-1}).

A determinação do teor total de carotenoides foi realizada segundo o método descrito por Rodriguez-Amaya (1999), com adaptações. A leitura foi realizada diretamente dos EHP em espectrofotômetro (JENWAY 6705 UV/Vis.) a 450nm, sendo o teor total de carotenoides determinado pela equação 1. Os resultados foram expressos em μg de β -caroteno. g^{-1} de matéria seca de própolis.

$$\frac{\text{C} = \text{ABS} \times 50\text{mL} \times 1000000}{2620 \times 100 \times \text{g}} \quad (\text{eq. 1})$$

Em que: C= teor de carotenoides da amostra, ABS= absorbância, g= gramas de amostra.

Para determinar a capacidade antioxidante utilizou-se metodologia descrita por Gülcin et al. (2010). A solução do ABTS foi diluída, e em seguida 3,9 mL de ABTS foram adicionadas a 0,1 mL do EHP na concentração de 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Após 7 minutos realizou-se a leitura em espectrofotômetro à 734nm (JENWAY 6705 UV/Vis.). Os resultados foram expressos em capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) por mL de extrato seco ($\mu\text{g.TEAC.mL}^{-1}$).

A atividade antibacteriana foi realizada pela técnica de microdiluição em caldo, por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de acordo com a metodologia descrita por Cabral et al. (2009). Foram utilizadas cepas padrão de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, devido à importância desta bactéria para a indústria alimentar. As cepas foram inoculadas em Ágar BHI, sendo a concentração do inóculo de 0,5 da escala Mc Farland, equivalente a $1-2 \times 10^8 \text{UFC.mL}^{-1}$, após 100 μL da suspensão bacteriana foi inoculado em 30 mL do caldo BHI, para se obter uma concentração de $1-2 \times 10^5 \text{UFC.mL}^{-1}$. Em microplacas foram adicionados 100 μL de caldo BHI e 100 μL do EHP em concentrações de 0,1-12 mg.mL^{-1} (diluição seriada de razão 2). Como controle negativo foi utilizado o etanol 80% (v/v). As microplacas foram incubadas a 37°C/24 h, e após adicionado 30 μL do corante Resazurina (0,01%; m/v). Após 3 h de incubação, nos poços em que não houve mudança na cor do corante (permaneceu roxo), foi considerada a ausência de bactérias viáveis.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A importância dos resultados em termos de conteúdo dos compostos bioativos consiste no fato de que as ações biológicas atribuídas à própolis têm sido diretamente relacionadas com a presença desses compostos.

Houve grande variação para o teor total de flavonoides (tabela 1), sendo a amostra de Rio Grande a que apresentou maior teor. Segundo Falcão et al. (2010), a diversidade de compostos fenólicos presentes na própolis está relacionada com a complexidade das resinas vegetais utilizadas pelas abelhas, e também pela combinação de várias espécies botânicas visitadas.

Tabela 1. Teor total de flavonoides e carotenoides de extratos de própolis oriundos de diferentes cidades do RS.

Amostras	Flavonoides mg EQ.g ⁻¹	Carotenoides µg β-caroteno.g ⁻¹
Canguçu	10,04 e	8,72 d
P. Osório	16,70 d	22,20 c
Pelotas	60,40 c	44,08 b
Pelotas 2	102,87 b	24,90 c
Rio Grande	112,48 a	55,67 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Para o teor total de carotenoides, a amostra de própolis oriunda de Rio Grande apresentou resultado significativamente superior às demais, assim como ocorreu para o teor de flavonoides. Houve uma relação positiva entre o teor de flavonoides com o teor de carotenoides, sendo que as amostras de Rio Grande e de Pelotas foram as que apresentaram concentrações desses compostos.

A capacidade antioxidante da amostra da cidade de Canguçu foi superior às demais (tabela 2), mesmo não apresentando os maiores teores de flavonoides e de carotenoides, o que sugere a presença de outros compostos com capacidade de sequestro de radicais livres que não foram analisados neste estudo, tais como a presença dos ácidos fenólicos, terpenos e compostos voláteis. A amostra de Pedro Osório mesmo sendo a que apresentou menor capacidade antioxidante pelo método com o radical ABTS, apresentou boa atividade antibacteriana.

Tabela 2. Capacidade antioxidante pelo método ABTS e concentração inibitória mínima (CIM) frente a *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 de extratos hidroalcoólicos de própolis do RS.

Amostras	Capacidade antioxidante ABTS (µg TEAC.mL ⁻¹)	Atividade antibacteriana CIM (mg.mL ⁻¹)
Canguçu	18,00 a	0,36 b
Pedro Osório	2,45 d	0,65 b
Pelotas	16,16 b	1,33 a
Pelotas 2	14,13 c	1,04 a
Rio Grande	14,30 c	0,91 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). µg TEAC.mL⁻¹ = µg equivalente ao Trolox por mL de extrato seco.

Todas as amostras de própolis testadas apresentaram atividade antibacteriana, porém os resultados variaram de acordo com concentração e com a origem da amostra (tabela 2). As amostras de Canguçu e Pedro Osório foram superiores na atividade antibacteriana frente a *Listeria monocytogenes*, pois inibiram o crescimento bacteriano em menor concentração do extrato.

O efeito inibitório da própolis de diversas regiões está sendo amplamente estudado contra uma variedade de bactérias, apresentando até o momento maior efetividade nas espécies Gram-positivas (CARDOSO et al., 2010). Estes resultados têm sido atribuídos às diferenças na estrutura celular das bactérias, como a presença do lipopolissacarídeo nas Gram-negativas. Acredita-se que os

compostos presentes na própolis atuem na parede celular destas bactérias (VARGAS et al., 2004).

4. CONCLUSÕES

As amostras que apresentam maior teor de flavonoides e carotenoides foram menos eficazes na inibição da *Listeria monocytogenes* e apresentaram menor capacidade antioxidante que as demais amostras, o que mostra que as atividades biológicas analisadas neste trabalho não estão diretamente relacionadas com o teor dos compostos bioativos analisados. Estes resultados sugerem que a ação antioxidante e antibacteriana da própolis do Rio Grande do Sul pode ser atribuída à presença de outros compostos, que não os flavonoides e carotenoides.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CABRAL I. S. R.; OLDONI T. L. C.; PRADO A.; BEZERRA R. M. N.; ALENCAR S. M.; IKEGAKI M.; ROSALEN P. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1523-27, 2009.
- FALCÃO, S.; VILAS- BOAS, M; ESTEVINHO, L.M.; BARROS, C.; DOMINGUES, M.R.M.; CARDOSO, S.M. Phenolic characterization of Northeast Portuguese Propolis: usual and unusual compounds. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, p. 887-897, 2010.
- FRANCO, S.S.; ROSA A.P.; LENGLER S.; UTPATEL R.; ZANELLA I.; GRESSLER C.; SOUZA H. M. Índices produtivos e rendimento de carcaça de frangos de corte alimentados com dietas contendo níveis de extrato etanólico de própolis ou promotores de crescimento convencionais. **Ciência Rural**, v. 37, p.1765-1771, 2007.
- GÜLÇİN, I.; BURSAL ; SEHITOGLU, M. H.; BİLSEL M.; GÖREN, A. C. Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 2227–2238, 2010.
- MELLO, B. C. B. S.; PETRUS, J. C. C.; HUBINGER, M. D. Concentration of flavonoids and phenolic compounds in aqueous and ethanolic propolis extracts through nanofiltration. **Journal of Food Engineering**, v. 96, p. 533–539, 2010.
- MOREIRA, L.; DIAS, L. G.; PEREIRA, J. A.; ESTEVINHO, L. Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 3482 – 3485, 2008.
- PEREIRA, A. dos S. SEIXAS, F. R. M. S.; NETO, F. R. de A. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, 25 (2), 321-326, 2002.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A guide to carotenoids analysis in foods**. ILSI Press: Washington, 1999, 64p.
- SILVA, J. C.; RODRIGUES, S.; FEÁS, X.; ESTEVINHO, L. M. Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of própolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 1790–1795, 2012.
- TRUSHEVA, B., POPOVA, M., BANKOVA, V., SIMOVA, S., MARCUCCI, M. C., MIORIN, P. L. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 3, p. 249–254, 2006.