

# ESPECTROSCOPIA UV-VIS E REAÇÃO COM O RADICAL DPPH PARA A DETECÇÃO DE FLAVONOIDES E DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS

*UV-VIS SPECTROSCOPY AND DPPH RADICAL REACTION FOR THE DETECTION OF FLAVONOIDS AND DETERMINATION OF THE ANTIOXIDANT POTENTIAL OF PROPOLIS EXTRACTS*

**Maria Cristina Marcucci<sup>1</sup>, Laís Farias Azevedo de Magalhães Oliveira<sup>2</sup>, Carolina Passarelli Gonçalves<sup>3</sup>, Claudemir de Carvalho<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Docente Colaboradora do Programa de Pós-graduação em Biociências e Diagnóstico Bucal da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Ciências e Tecnologia, São José dos Campos-SP

<sup>2</sup>Instituto Beeva-Via Riacho Velho, Marechal Deodoro-AL

<sup>3</sup>Programa de Pós-graduação em Farmácia e Biotecnologia da Universidade Anhanguera de São Paulo, São Paulo-SP.

<sup>4</sup>Pró-Reitor de Pesquisa, Pós-Graduação e Extensão, Centro Universitário FUNVIC, Pindamonhangaba-SP

\*Correspondência: [cris.marcucci@yahoo.com.br](mailto:cris.marcucci@yahoo.com.br)

RECEBIMENTO: 14.07.20 ACEITE: 01.09.20

## Resumo

A própolis é uma substância resinosa coletada pelas abelhas de brotos de folhas e flores principalmente, de diversas plantas. É composta por 50% de resina, onde se encontram as principais substâncias responsáveis pela ação terapêutica da própolis, como os flavonoides por exemplo (fração polifenólica), 30% de cera, 10% de óleos essenciais, 5% de pólen e 5% de vários compostos orgânicos. A própolis não pode ser utilizada como matéria-prima e deve ser extraída e purificada com solventes. Esse processo deve remover o material inerte e preservar a fração polifenólica. Para garantir a ação benéfica da própolis é importante que o controle de qualidade seja rigoroso, evitando assim a comercialização e consumo de extratos que não apresentem as quantidades de polifenóis mínimas estabelecidas. Com isso, o presente trabalho apresenta uma técnica para a detecção de flavonoides por espectroscopia UV-VIS e determinação do potencial antioxidante pela reação com o radical 2,2-difenilpicrilhidrazila. Os resultados demonstraram que as técnicas são capazes de emitir resultados precisos em relação a detecção de flavonoides e para a determinação do potencial antioxidante. Todas as amostras utilizadas nos testes estavam de acordo com o que a legislação brasileira preconiza.

Palavras-chave: Própolis. Extratos. Controle de qualidade. Fenóis. Flavonoides.

## Abstract

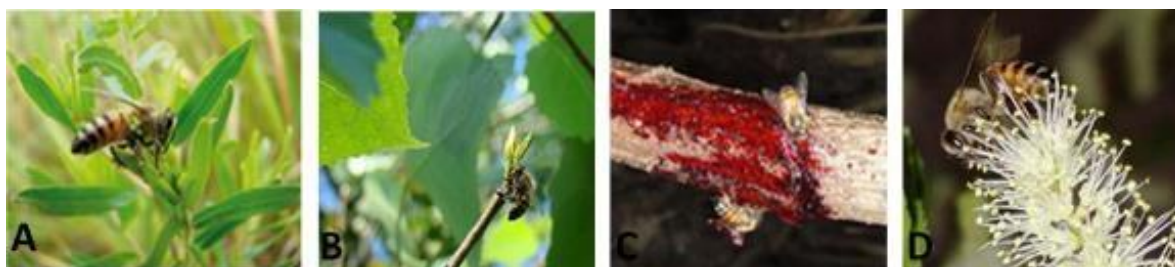
Propolis is a resinous substance collected by bees from leaf and flower buds, mainly, from various plants. It consists of 50% resin, which includes the main substances responsible for its therapeutic action, such as flavonoids for example (polyphenolic fraction), 30% wax, 10% organic oils, 5% pollen and 5 % of various organic compounds. Propolis can not be used as a raw material and must be extracted and purified with solvents. This process should remove the inert material and preserve the polyphenolic fraction. To ensure the beneficial action of propolis, it is important that the quality control be strict, avoiding the commercialization and consumption of extracts that do not have the minimum polyphenols concentrations required. Thus, the present work presents a technique for flavonoids detection by UV-VIS spectroscopy and for the antioxidant potential determination through the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical reaction. The results demonstrated that the techniques are capable of delivering accurate results in relation to the detection of flavonoids and to determine the antioxidant potential. All samples used in the tests were in accordance what Brazilian legislation recommends.

Keywords: Propolis. Extracts. Quality control. Phenols. Flavonoids.

## Introdução

A própolis é um produto elaborado pelas abelhas a partir de brotos e exsudatos de plantas. As abelhas coletam esse material (Figura 1), misturam com saliva e cera e calafetam a colmeia, impedindo a putrefação de insetos e pequenos animais, como camundongos, os quais não conseguem expulsar da colmeia, mesmo que tenham conseguido matá-los. Esse mesmo material, resinoso e às vezes balsâmico, é utilizado para vedar frestas na colmeia e para “esterilizar” os favos que estão sendo preenchidos com mel (SAWAYA et al., 2004; MARCUCCI, 2006). O próprio termo “própolis” quer dizer em defesa da cidade ou em defesa da colmeia. A resina coletada pelas abelhas é constituída de metabólitos secundários produzidos pelas plantas (Figura 2) os quais são substâncias que as mesmas produzem para a sua defesa contra predadores, vírus, bactérias e fungos. Devido à enorme biodiversidade existente no Brasil, vários tipos de própolis, incluindo a verde, a vermelha e a marrom, são classificadas de acordo com a região produtora (CARVALHO et al., 2019).

Figura 1- Abelhas coletando resinas em plantas

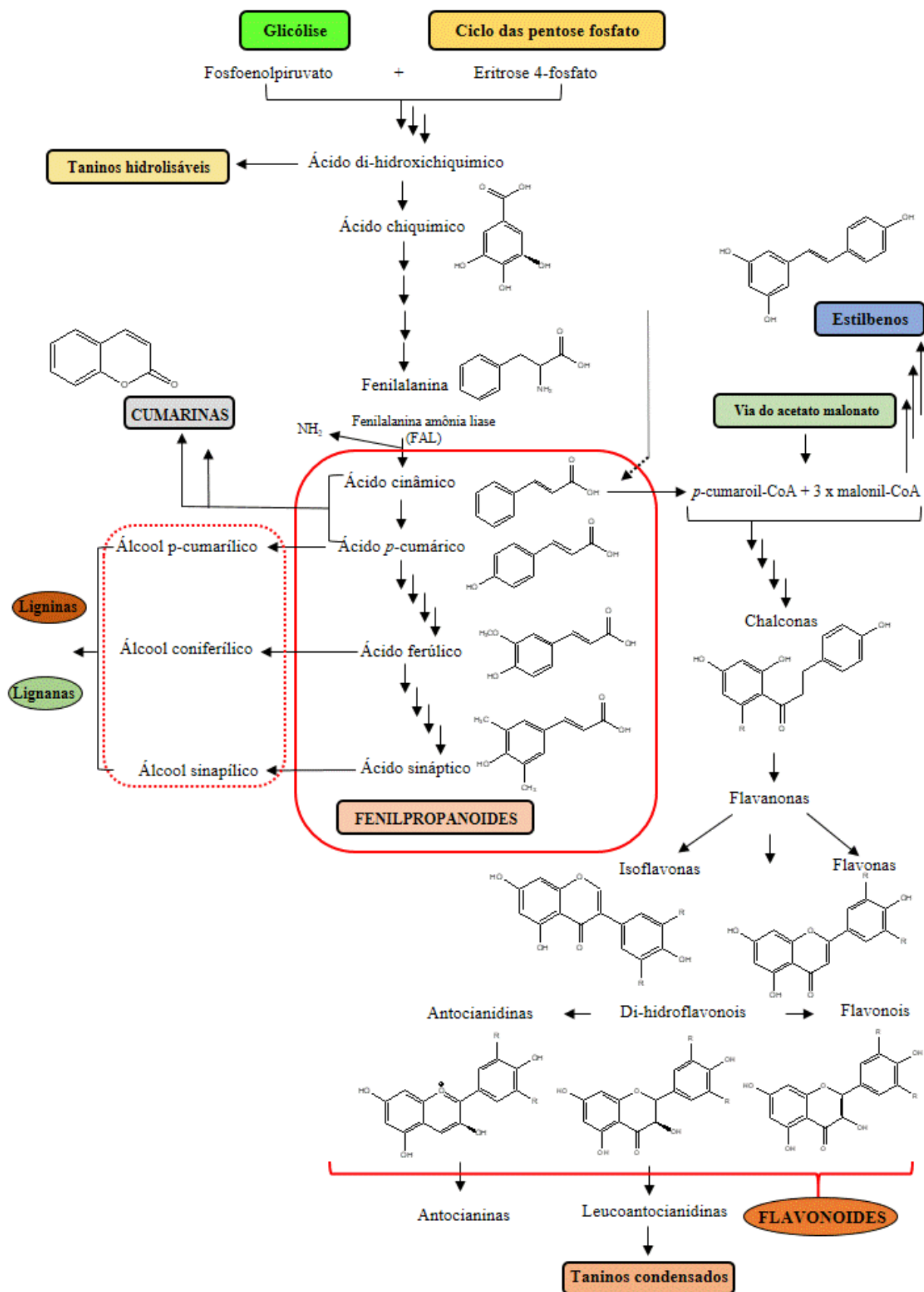


Coleta de resina (corbícula) em **A** *Baccharis dracunculifolia* (alecrim do campo) para a elaboração da própolis verde; **B** *Populus* sp (álamo) para a elaboração da própolis marrom do sul do Brasil; **C** *Dalbergia ecastaphyllum* (rabo de bugio) para a elaboração da própolis vermelha e **D** *Mimosa hostilis* Benth (jurema preta) da caatinga para a elaboração da própolis silvestre (AL). (A) Natucentro, com permissão. (B) (BREYER; BREYER; CELLA, 2016) com permissão. (C) (RODRIGUES, 2015) com permissão (D) Abelha visitando a flor de jurema preta (SILVA et al., 2015) com permissão.

As abelhas utilizam os mesmos metabólitos secundários produzidos pelas plantas, para a elaboração da própolis, os quais apresentam na resina, as mesmas propriedades de defesa que nas plantas. Dados de pesquisa ao longo de quase um século, em diferentes partes do mundo com diferentes tipos de própolis, evidenciaram a sua eficácia contra microrganismos, tumores e como reforçadora do sistema imunológico (MARCUCCI, 1995). Dependendo da fonte vegetal, a própolis terá diferentes constituintes químicos, apresentando cor, odor e sabores distintos (Figura 3) (MARCUCCI et al., 2008). As própolis mais estudadas e com melhores resultados, são a BRP (própolis verde) e BRV (própolis vermelha), além de outras, como a BRG (marrom, originária do álamo) (MARCUCCI et al., 2008).

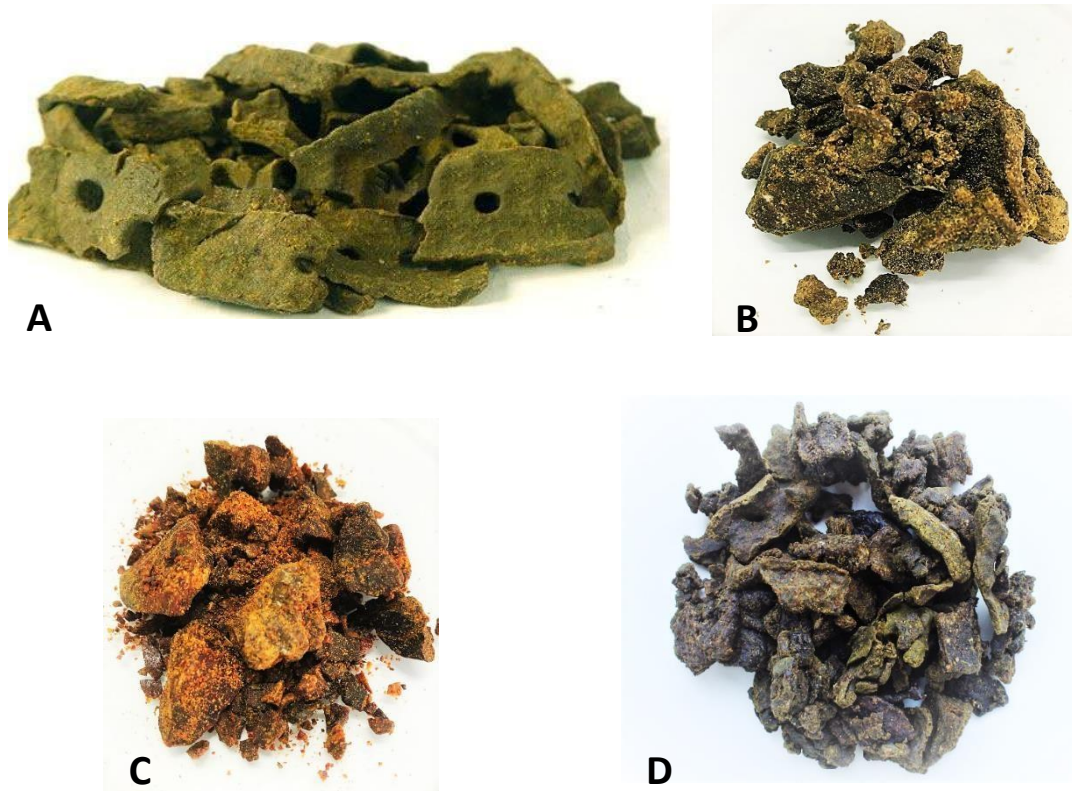
A própolis verde é a mais conhecida entre elas e a que tem sido disseminada como a melhor de todas pela excelência da qualidade. Atualmente, existem outros tipos de própolis, praticamente ainda não estudados, como a mencionada no presente trabalho, denominada de silvestre originária da planta jurema preta (*Mimosa hostilis* Benth) que cresce em regiões ao norte do país (SILVA et al., 2015). Baseado no exposto, a proposta do presente trabalho foi realizar, espectroscopia UV-Vis para a determinação do teor de sólidos solúveis e o método de descoloração do radical livre 2,2-difenil-picrilhidrazila (DPPH) para a atividade antioxidante, análises estas primordiais no controle de qualidade da própolis.

Figura 2- Rota biossintética de compostos fenólicos\* nas plantas



\* Os compostos fenólicos fazem parte do grupo dos metabólitos secundários nas plantas. Adaptado de Rezende et al. (2016).

Figura 3- Diferentes aspectos de algumas própolis brasileiras



A- Própolis verde (BRP) de alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*); B- Própolis silvestre de jurema preta; C- Própolis vermelha (BRV) de jacarandazinho de Maceió-AL. e D- Própolis marrom (BRG) de álamo do Paraná. A [https://images.tcdn.com.br/img/img\\_prod/584955/propolis\\_bruta\\_in\\_natura\\_kg\\_201\\_1\\_20190502133407.jpg](https://images.tcdn.com.br/img/img_prod/584955/propolis_bruta_in_natura_kg_201_1_20190502133407.jpg) com permissão. B e C Instituto Beeva, com permissão e D Natucentro, com permissão.

## Método

### Preparo dos extratos

Os extratos foram preparados pelo método de maceração em etanol e água na proporção de 70:30 (v/v). Pesou-se 50 g da matéria-prima de própolis para 100 mL da solução de álcool, que foram mantidos sob agitação mecânica durante 5 horas. Após esse período, a solução foi mantida em repouso durante 72 horas e, posteriormente, foi filtrada em funil de vidro com papel de filtro, obtendo assim, os extratos.

### Identificação de flavonoides por absorção no UV-Vis

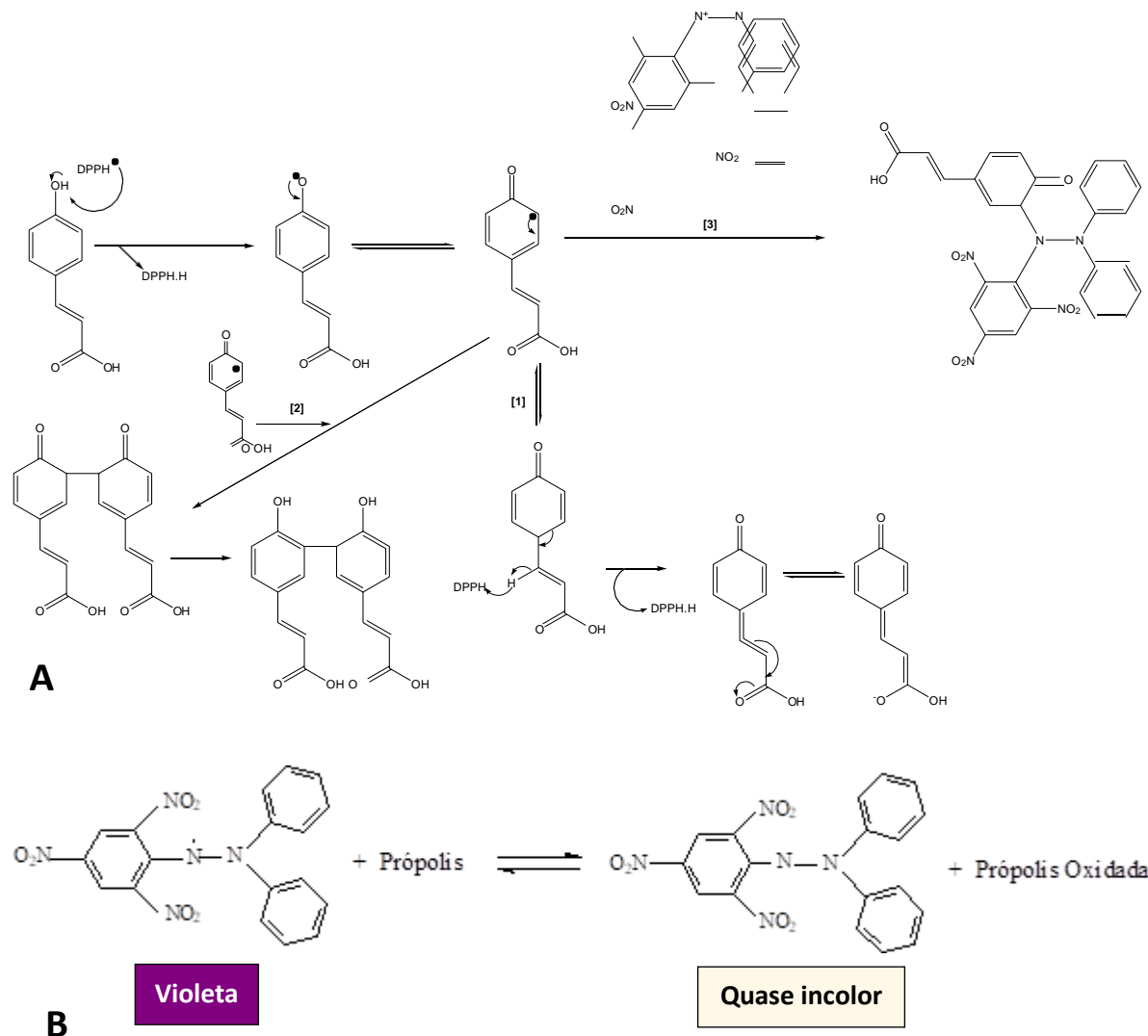
Coletou-se uma gota de cada um dos extratos etanólicos de própolis e transferiu-se para um alão volumétrico de 10 mL, completando-se o volume com etanol. Em seguida, pipetou-se 300  $\mu$ L dessa solução para um novo balão volumétrico completando-se o volume até 10 mL com etanol. Procedeu-se a determinação no espectrofotômetro UV-Vis (Metash, UV-5100 – UV/VIS Spectrophotometer) entre 200 a 400 nm, fazendo-se a leitura de 5 em 5 nm. O espectro deve apresentar um ou mais picos entre 250 - 350 nm. Para a confecção dos gráficos da regressão linear, foi utilizada planilha de cálculos em Excel.

### Determinação da atividade antioxidante

Primeiramente foi preparada uma solução de DPPH (Sigma, EUA) na concentração de 30  $\mu$ M. Preparou-se em seguida, uma solução de cada extrato etanólico de própolis a 0,01% v/v. Foram organizados 11 tubos, enumerando-os de 0 até 10. Adicionou-se o volume de etanol e em seguida a solução de própolis diluída nas proporções: 2,0; 4,0; 6,0; ... 20,0  $\mu$ g/mL. O tubo zero foi o controle, ou seja, 100% de DPPH sem própolis. Adicionou-se o volume de DPPH no primeiro tubo e ligou-se o cronômetro. Desligou-se depois de um minuto. Adicionou-se o DPPH nos outros tubos a cada um minuto. Agitou-se os tubos de tempos em tempos. Fez-se a leitura do branco (etanol) no espectrofotômetro no comprimento de onda de 517 nm. A leitura de absorbância de cada ponto foi feita após 30 minutos da adição do DPPH no primeiro tubo. Com os

resultados obtidos, foram confeccionados gráficos da % de DPPH restante em função da concentração de própolis ( $\mu\text{g/mL}$ ). A  $\text{CE}_{50}$  (concentração que elimina 50% dos radicais livres) foi calculada pelo método dos mínimos quadrados (VEIGA et al., 2017). A Figura 4 mostra o mecanismo de reação do DPPH com um dos marcadores da própolis de *Baccharis dracunculifolia*, o ácido *p*-cumárico.

Figura 4- Esquema de reação do DPPH com um dos componentes da própolis de *Baccharis dracunculifolia*, o ácido *p*-cumárico\*



A- Mecanismo de reação; B- Resumo da reação, mostrando a mudança de cor do DPPH. Adaptado de Brand-Williams; Cuvelier; Berset (1995)

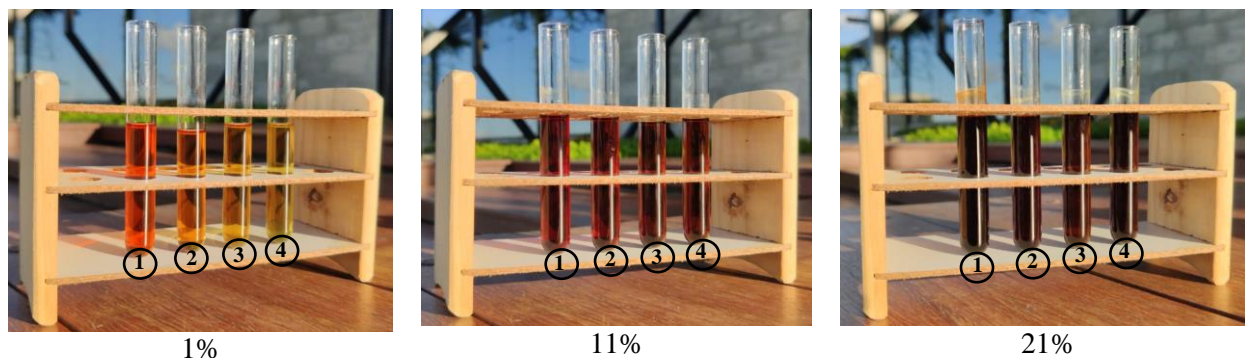
A reação do DPPH com a própolis, transforma a solução de cor violeta em quase incolor, medindo-se a cinética da reação no comprimento de onda de 517 nm.

## Resultados

### Cor dos extratos

A Figura 5 apresenta os resultados da cor dos diferentes extratos de própolis avaliados no presente trabalho.

Figura 5- Aspectos dos extratos etanólicos de própolis em diferentes concentrações

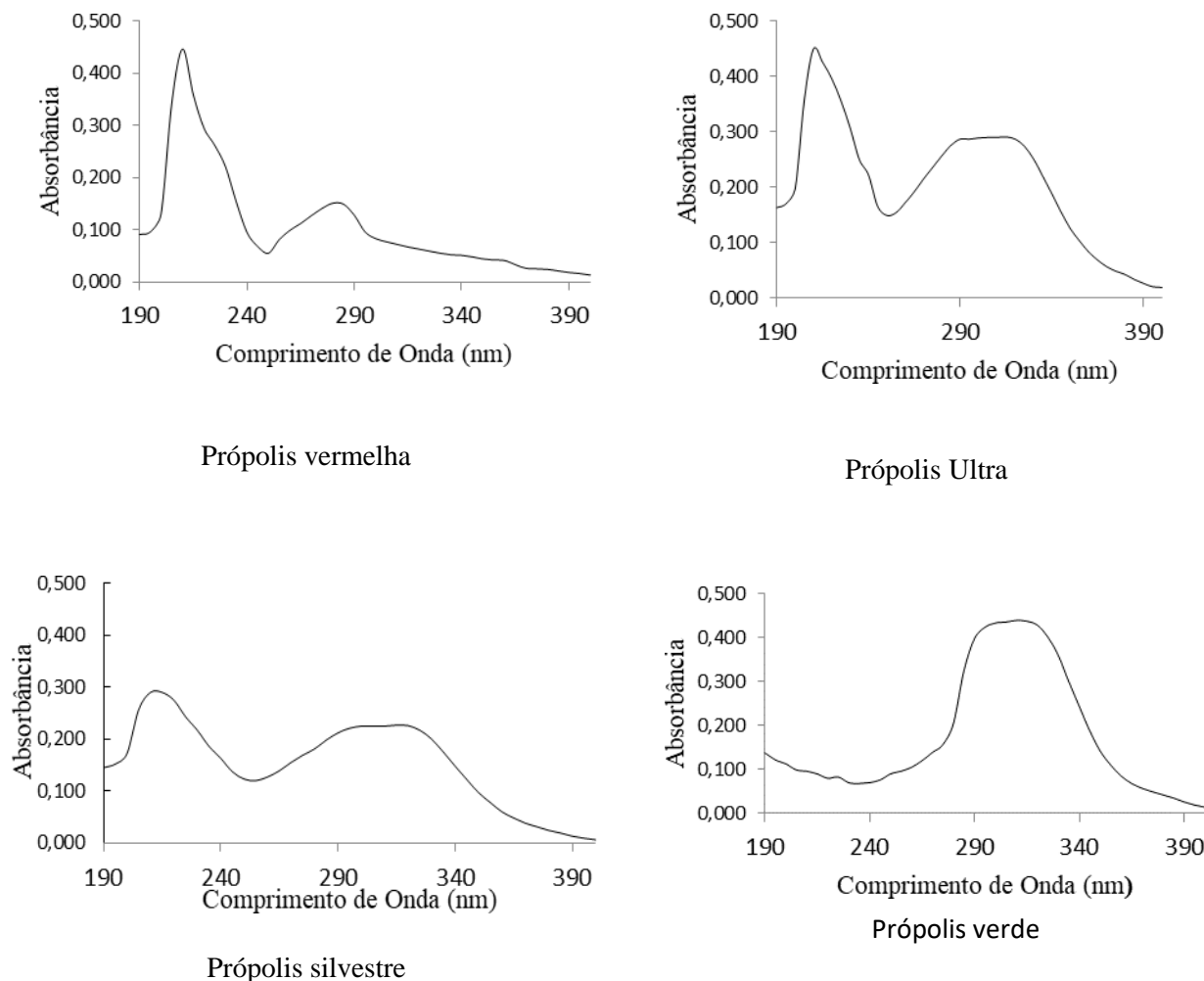


Legenda: (1) vermelha, (2) ultra (junção do extrato de três própolis diferentes: a vermelha, a silvestre e a verde), (3) silvestre e (4) verde.

*Identificação de flavonoides por absorção no UV-Vis*

A Figura 6 mostra os espectros UV-Vis dos quatro extratos avaliados no presente estudo, numa concentração de 50 mg/mL.

Figura 6- Espectros UV dos extratos da própolis vermelha, ultra, silvestre e verde.



Todos os extratos na concentração de 50 mg/mL

### Determinação da atividade antioxidante

A Tabela 1 mostra os valores da  $CE_{50}$  (dose que elimina 50% dos radicais livres) em  $\mu\text{g/mL}$ , através do método do DPPH.

Tabela 1- Valores de  $CE_{50}$  para as amostras de própolis analisadas\*

|                                | Amostra  |       |           |       |
|--------------------------------|----------|-------|-----------|-------|
|                                | Vermelha | Ultra | Silvestre | Verde |
| $CE_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) | 4,82     | 8,39  | 12,38     | 12,80 |

\*Para uma solução estoque de própolis de 0,01%

## Discussão

### Cor dos extratos

A Figura 5 mostra as diferentes cores dos mesmos extratos de própolis na concentração de 50 mg/mL. Pode-se observar que quanto maior a concentração de sólidos solúveis, mais escura é a amostra. Existem empresas produtoras de extratos de própolis que operam com o extrato no teor de 11%, que é o mínimo preconizado pela IN 3 do MAPA (BRASIL, 2001). Entretanto, sabe-se que quanto maior a concentração do extrato, maior o teor de polifenóis (incluindo os flavonoides). Conseqüentemente, maiores teores de polifenóis implicam em maior atividade antioxidante e melhor efeito antimicrobiano e farmacológico. Por outro lado, a resina bruta de própolis (como se pode ver na Figura 5) é extraída parcialmente em etanol ou misturas etanol:água. Isto porque praticamente 50% da resina é insolúvel nestes solventes. Portanto, muitas vezes, quando é declarado, no rótulo de um extrato de própolis, que está a 30%, isso quer dizer que, no processo produtivo, foi utilizada a razão 30g de própolis para 100 mL do solvente. O produto final, considerando a eficiência de extração de 50%, terá uma concentração final dos bioativos de no máximo 15%, dependendo do tipo de própolis, nunca mais do que isso. Extratos que possuem maiores teores que o preconizado pela legislação brasileira, possuem teor de bioativos com mais alta concentração, conseqüentemente, maior atividade antioxidante e melhores efeitos para a saúde humana, considerando que esta é a concentração real do extrato informada ao consumidor (CUNHA et al., 2004).

### Identificação de flavonoides por absorção no UV-Vis

A Figura 6 apresenta os espectros UV-Vis para os extratos mostrados na Figura 5. Neste caso, as medidas analíticas foram feitas com as amostras na mesma concentração. Todos os espectros atendem a IN 3 (BRASIL, 2001) que preconiza que os picos de absorção devem estar entre 250 a 350 nm. Entretanto, cada extrato de própolis apresenta a sua peculiaridade, isto é, perfis espectrofotométricos distintos. Esse perfil está diretamente ligado à absorção dos diferentes compostos presentes no extrato. No caso da própolis ultra, que é a junção do extrato de três própolis diferentes, a vermelha, a silvestre e a verde, observa-se que o espectro é uma mescla dos perfis dos extratos em separado, indicando que neste se encontram os compostos extraídos nos três extratos em separado.

### Atividade antioxidante

Os dados apresentados para os espectros UV-Vis são confirmados pela atividade antioxidante utilizando-se o DPPH, mostrada na Tabela 1. Os resultados são interpretados da seguinte maneira: quanto menor o valor da  $CE_{50}$ , maior a atividade antioxidante. Observa-se que os valores da  $CE_{50}$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) para os extratos separados é de 4,82 (vermelha), 12,38 (silvestre) e 12,80 (verde). Quando se junta os três extratos para se produzir a própolis ultra, observa-se uma melhora na atividade antioxidante, em relação à silvestre e a verde, o valor baixa para 8,39  $\mu\text{g/mL}$ . A própolis silvestre obtida da jurema preta é ainda muito pouco conhecida, o valor da sua atividade antioxidante indica o potencial que a mesma apresenta sob o ponto de vista de apresentar possíveis atividades biológicas. Existem vários métodos na literatura sobre a avaliação da atividade antioxidante, utilizando vários reagentes distintos, ficando às vezes difícil realizar uma comparação entre esses valores e os relatados no presente trabalho. O emprego da regressão linear é praticamente não relatado na literatura para o cálculo da  $CE_{50}$  pelo método do DPPH (VEIGA et al., 2017). Kumazawa e colaboradores em 2004 encontraram valores de  $CE_{50}$  para a própolis verde brasileira ao redor de 25  $\mu\text{g/mL}$  e para o ácido p-cumárico, ao redor de 7  $\mu\text{g/mL}$ . Foram relatados os valores da  $CE_{50}$  para a própolis vermelha

de Alagoas, variando ao longo do ano e em três apiários diferentes, variando de 1,95 a 51,03 µg/mL (KUMAZAWA; HAMASAKA; NAKAYAMA, 2004).

Os resultados apresentados neste trabalho para a própolis vermelha, estão condizentes com os relatados por esses autores. Ccana-Ccapatinta e colaboradores mostraram que, ao contrário do que se sabia sobre a origem botânica da própolis vermelha, esta é originária não só de *Dalbergia ecastaphyllum*, mas de *Symphonia globulifera*, que possuem na sua composição isoflavonoides e benzofenonas polipreniladas, sendo totalmente distinta da própolis verde, que possui principalmente ácidos prenilados derivados do *p*-cumárico. Estes compostos da própolis vermelha podem promover a melhor atividade antioxidante (CCANA-CCAPATINTA et al., 2020), conforme descrito no presente trabalho.

## Conclusões

Foram apresentados no trabalho alguns resultados que remetem à importância do controle de qualidade da própolis em extrato. Foi mostrado que diferentes concentrações dos extratos apresentam cores diferentes, levando à conclusão de que um maior teor de substâncias fenólicas esteja presente nos mesmos. Os espectros UV-Vis mostraram perfis de absorção entre 250 a 350 nm, confirmando o preconizado nas normas brasileiras para o controle de qualidade de extratos de própolis. Todos os extratos apresentaram atividade antioxidante, confirmando essa ação da própolis, seja de que origem botânica for. Para a própolis de jurema preta, foi encontrada uma excelente atividade antioxidante, demonstrando ser um produto natural com grande potencial biológico.

## Agradecimentos

Às empresas Natucentro (Bambui, MG) Breyer (União da Vitória, PR) e Instituto Beeva (Marechal Deodoro, AL) que gentilmente cederam as imagens das abelhas visitando as plantas e as da própolis bruta.

## Referências

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRASIL (2001). Instrução Normativa no. 3 de 19 de janeiro de 2002. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis. Disponível em <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1798>. Acesso em 30 jun 2020.

BREYER, H.; BREYER, E.; CELLA, I. **Produção e beneficiamento da própolis. Florianópolis**, 1. ed. Florianópolis: Diosec, 2016.

CARVALHO, C. et al. Evidence-Based Studies and Perspectives of the Use of Brazilian Green and Red Propolis in Dentistry. **European journal of dentistry**, v. 13, n. 3, p. 459-465, jul. 2019.

CCANA-CCAPATINTA, G. V et al. *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub. and *Symphonia globulifera* L.f.: The Botanical Sources of Isoflavonoids and Benzophenones in Brazilian Red Propolis. **Molecules**, v. 25, 2060-2065, 2020.

CUNHA, I. B. S. et al. Factors that Influence the Yield and Composition of Brazilian Propolis Extracts. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 6, 964-970, 2004.

REZENDE, F. M. et al. **Vias de síntese de metabólitos secundários em plantas in VI Botânica no Inverno**. Org. Miguel Peña H. [et al.]. – São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Botânica, 2016. 223p.: il., 93-107.

KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, v. 84, n. 3, p. 329-339, 2004.



MARCUCCI, M. C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v. 26, n. 2, p. 83-99, 1995.

MARCUCCI, M. C. Própolis Tipificada: Um Novo Caminho para a Elaboração de Medicamentos de Origem Natural, Contendo este Produto Apícola. **Fitos**, v. 3, p. 36-46, 2006.

MARCUCCI, M. C. et al. HPLC and ESI-MS typification: New approaches for natural therapy with Brazilian propolis. **Scientific Evidence of the Use of Propolis in Ethnomedicine**, p. 33-54, 2008.

RODRIGUES, M. Capricho da natureza faz de Alagoas terra da própolis vermelha. 26 abr. 2015. <https://www.jornaldealagoas.com.br/negocios/1038/2015/04/26/capricho-da-natureza-faz-de-alagoas-terra-da-propolis-vermelha>.

SAWAYA, A. C. H. F. et al. Analysis of the composition of Brazilian propolis extracts by chromatography and evaluation of their in vitro activity against gram-positive bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 104-109, 2004.

SILVA, A. S. et al. Florescimento induzido da jurema preta para fornecer pólen à abelha melífera na estiagem da caatinga. **Revista Caatinga, Mossoró**, v. 28, n. 2, p. 197-206, 2015.

VEIGA, R. S. et al. Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and *Baccharis dracunculifolia* DC. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, n. 4, p. 911-920, 2017.