

1.06.01 - Química / Química Orgânica

PERFIL ÓTICO DE DIFERENTES PRÓPOLIS E COMPLEXAÇÃO COM METAIS: POSSÍVEL APLICAÇÃO EM TERAPIA FOTODINÂMICA (FTD)Bruna Wendler¹, Daiane Finger Ferreira².

1. Estudante do curso de graduação em Química Bacharelado da Universidade Estadual do Centro- Oeste do Paraná (UNICENTRO)
2. Professora Doutora da UNICENTRO – Departamento de Química/Orientadora

Resumo

A terapia fotodinâmica (FTD) vem sendo aplicada para tratamento de diversas patologias, como câncer e feridas crônicas. Este trabalho objetivou complexar extrato de própolis marrom com íon cobre II a fim de verificar o aparecimento de banda de absorção na região do visível do espectro eletromagnético, e verificar a atividade anti-radicalar do extrato antes e após complexação. O extrato de própolis foi complexado e foram obtidos seus espectros UV-Vis. A atividade anti-radicalar foi investigada pelo ensaio do DPPH. Os resultados indicaram o aparecimento de uma banda larga entre 650 e 1100 nm, comprovando a complexação. Os resultados do ensaio DPPH mostraram que houve uma diminuição de 62% do potencial de inibição do radical. Dessa forma, a banda de absorção na região visível do espectro possibilita que a própolis seja utilizada como fotossensibilizador, enquanto a diminuição do potencial anti-radicalar é positiva, uma vez que a FTD depende da geração de espécies reativas de oxigênio.

Palavras-chave: Fotossensibilizador; atividade anti-radicalar; Espectros UV-Visível.

Introdução

A terapia fotodinâmica (FTD) consiste em uma reação fotoquímica com o objetivo de causar a destruição de um tecido. É uma modalidade clínica de fotoquimioterapia baseada no uso de uma substância fotossensibilizante nas células-alvo, seguida pela irradiação de luz de um comprimento de onda específico (Shanmugapriya & Kang, 2019; Oyama et al., 2020).

A própolis é uma resina produzida pelas abelhas do gênero *Apis*, através da mistura de diferentes partes das plantas, cera e secreções salivares. Na colmeia, a própolis é utilizada para proteção tanto física, fechando a entrada da colmeia, evitando a entrada de vento e chuva, quanto química, garantindo o ambiente asséptico. A composição química da própolis é bastante variada e dependente, principalmente, da flora da região visitada pelas abelhas (Pasupuleti et al., 2017; Anjum et al., 2019). As propriedades farmacológicas da própolis são bastante conhecidas e relatadas na literatura, como antimicrobiana, antioxidante, cicatrizante, anestésica, antitumoral, entre outras (Carvalho et al., 2011; Moğ et al., 2011; Finger et al., 2013; Pasupuleti et al., 2017; Ibrahim et al., 2018; Doğan et al., 2020).

Apesar da própolis ter sido estudada em associação à terapia fotodinâmica, oportunidade em que houve comprovação do efeito sinérgico positivo dessa associação (Wang et al., 2017), nunca foi reportada a própolis como fotossensibilizador. Provavelmente, se deve ao fato desse produto natural não apresentar elevada absorvância na região visível do espectro, condição necessária para aplicação da FTD.

A presente pesquisa visou verificar se complexar a própolis com metais promove geração de banda de absorção no comprimento de onda da região visível para que esta possa ser utilizada como fotossensibilizador na FTD, e ainda se a complexação interfere nas propriedades biológicas originais da própolis.

Objetivo Geral: Estabelecer o perfil ótico na região do visível de extratos de própolis *in natura* e complexados com metais.

Objetivos específicos: Preparar extratos etanólicos de própolis marrom; realizar a varredura na região do visível (380nm a 740nm) do perfil ótico dos extratos; complexar extratos com o íon Cu(II); avaliar o perfil UV-Vis dos extratos complexados; avaliar a atividade anti-radicalar antes e após a complexação.

Metodologia

A amostra de própolis marrom foi gentilmente cedida por apicultor e coletada no município de Prudentópolis-PR, no ano de 2019.

O extrato foi preparado por maceração com agitação ocasional por 7 dias, para tanto pesou-se 1,0034 g de própolis marrom e o solvente extrator utilizado foi 50 mL de etanol 95% v/v. Após esse período o extrato foi filtrado a vácuo e armazenado em freezer por uma noite para precipitação das ceras. No dia seguinte, procedeu-se nova filtração a vácuo. O solvente foi então evaporado em equipamento Speed Vac resultando em 0,3909 g de extrato seco.

O extrato de própolis foi ressuspenso em etanol 95%v/v resultando em uma solução de 33 mg.mL⁻¹. Solução de CuCl₂ a 5% (m/v) foi preparada em água ultrapura. Ambas as soluções foram diluídas 20 vezes e em seguida, utilizando o espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu® UV-1800) obteve-se os espectros de varredura (200-1100 nm) do extrato de própolis e do CuCl₂ separadamente.

Para a reação de complexação adicionou-se em um balão volumétrico de 5 mL, 250 µL da solução de CuCl₂ 5% (m/v) e 500 µL da solução 33 mg.mL⁻¹ de própolis. Completou-se o volume do balão com etanol 95% v/v. Após 30 minutos foi obtido o espectro de varredura (200 a 1100 nm).

A atividade antirradicalar foi determinada pelo método espectrofotométrico e leitura de absorbância a 515 nm, através da reação entre o DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila) e os antioxidantes presentes nos extratos ou complexos formados, de acordo com Rufino (2009) com algumas modificações (Schmidt et al., 2014). Para tanto, preparou-se solução estoque de DPPH na concentração de 1,3 mM.

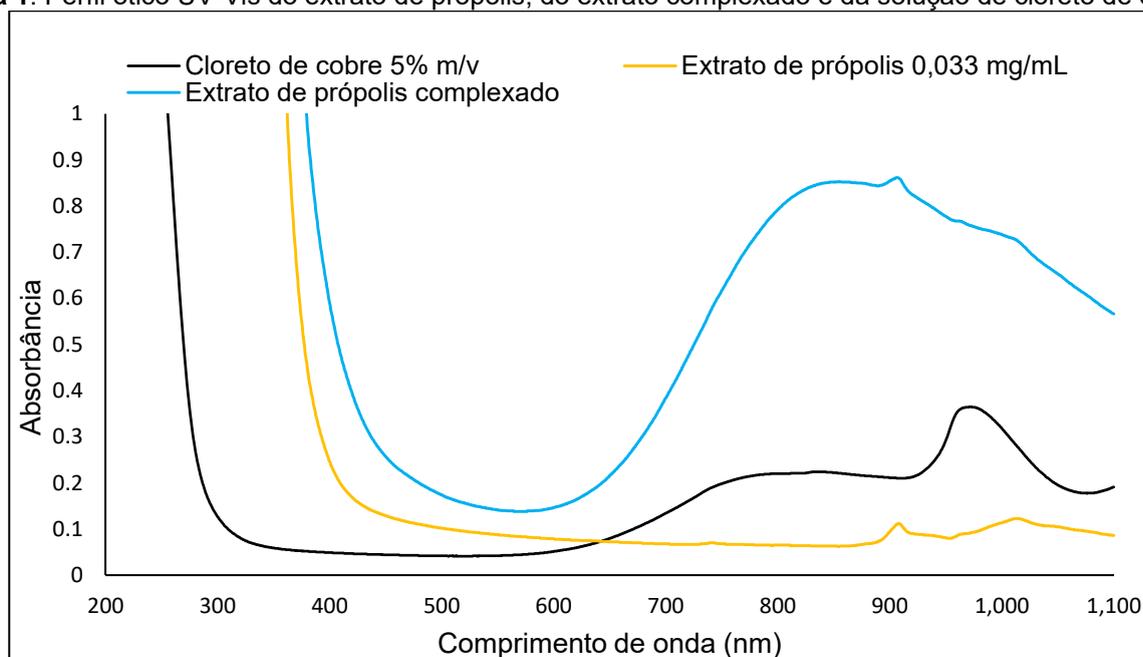
Para determinar o tempo de reação entre o extrato de própolis sem complexar e o radical estável DPPH, adicionou-se 100 μL do extrato de própolis (33 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 120 μL de DPPH (1,3mM) e 2780 μL de etanol 95% v/v. A solução ficou ao abrigo da luz, e fez-se a leitura da absorbância em 515 nm de cinco em cinco minutos durante 50 minutos. A solução controle consistiu em 120 μL de solução de DPPH (1,3mM) e 2880 μL de etanol 95% v/v, que apresentou absorbância de 0,73, e a solução utilizada como branco foi o etanol 95% v/v.

Para determinar a capacidade de inibição do radical estável DPPH pelo extrato de própolis antes e após complexação com o cloreto de cobre, adicionou-se 100 μL do extrato de própolis (33 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) ou do extrato após a reação de complexação, 120 μL de DPPH (1,3mM) e 2780 μL de etanol 95% v/v. A solução ficou ao abrigo da luz, e fez-se a leitura da absorbância em 515 nm após 25 minutos. Todo o procedimento foi realizado em triplicata.

Resultados e Discussão

Ao observar a figura 1 percebe-se que a própolis analisada absorve radiação ultravioleta e tem seu máximo de absorção em comprimentos de onda menores de 400 nm. Apresenta ainda, uma banda de absorção de baixa intensidade em aproximadamente 900 nm. Esse achado corrobora com outros trabalhos que estabeleceram o perfil UV-Vis de extratos de vários tipos de própolis de diferentes partes do mundo, que demonstraram máximos de absorção na região de absorção dos compostos fenólicos (280-400 nm) e pouca ou nenhuma absorção na região do visível (Tomazzoli et al., 2015; Moç et al., 2011; Barbeira et al., 2013). O cloreto de cobre possui 2 bandas na região do visível, com máximos de absorção em 830 e 970 nm, aproximadamente. Também na figura 1, é possível perceber que após a reação de complexação, observa-se a formação de uma banda larga de absorção, que vai de 650 a 1100 nm. Sugere-se que o aparecimento dessa banda se deve a reação entre os flavonoides, presentes na composição química da própolis e o metal utilizado na reação, no caso, o cobre.

Figura 1: Perfil óptico UV-Vis do extrato de própolis, do extrato complexado e da solução de cloreto de cobre II



De fato, a característica de complexação dos flavonoides da própolis com metais é bem explorada na literatura como um método para quantificação do teor de flavonoides totais em amostras de própolis. Nesse caso, geralmente o composto empregado para promover a complexação é o cloreto de alumínio (Sawaya et al., 2011). Neste trabalho optou-se por utilizar o cobre por ser menos tóxico, uma vez que o objetivo futuro é de utilizar a própolis como fotossensibilizador na terapia fotodinâmica aplicada no tratamento de feridas crônicas.

Os resultados obtidos da avaliação da capacidade anti-radicalar dos extratos de própolis antes e após a complexação com cloreto de cobre estão presentes na tabela 1.

Tabela 1: Dados de inibição do radical DPPH (absorbância controle de 0,73) após reação com extrato de própolis e extrato de própolis após complexação com CuCl_2

	Extrato de própolis	Extrato de própolis após complexação com CuCl_2
Absorbância	$0,133 \pm 0,017$	$0,349 \pm 0,033$
% de Inibição	82%	52%

Percebe-se que houve uma diminuição de cerca de 62% dessa capacidade, uma vez que a percentagem de inibição da absorbância do radical passou de 82 a 52%.

Conclusões

A complexação dos extratos de própolis com o íon Cu (II) foi confirmada pela banda na região visível observada nos espectros obtidos, de forma que a hipótese inicial de que ocorreria um deslocamento batocrômico pela reação da própolis com íons metálicos foi comprovada.

Devido a composição química da própolis e pelo fato de metodologia semelhante ser empregada para determinar o teor de flavonoides totais na própolis, espera-se que os flavonoides presentes na sua composição que se complexaram com o cloreto de cobre (Sawaya et al., 2011). Provavelmente, esta complexação tornou essa classe de compostos indisponíveis para reagir com o DPPH na avaliação da atividade anti-radicalar, e assim, inibir sua absorção característica.

Ao pensar na aplicação a que se almeja para o extrato de própolis complexado, a diminuição da atividade anti-radicalar observada é promissora, uma vez que a terapia fotodinâmica depende da geração de espécies reativas de oxigênio, e uma atividade anti-radicalar muito significativa pode indicar uma possível atividade antioxidante, e, portanto, a própolis acabar inibindo as espécies que são necessárias para a aplicação da terapia fotodinâmica. Vale ressaltar que a capacidade anti-radicalar não foi totalmente inibida e para a efetiva aplicação da própolis como fotossensibilizador são necessários novos testes.

Novos estudos devem ser realizados no sentido de estabelecer se a complexação interfere em outras propriedades biológicas da própolis, como a antimicrobiana. Ainda, devido a composição química da própolis ser variada, faz-se necessário realizar esses estudos também com outros tipos de própolis.

Referências bibliográficas

Anjum, S. I., Ullah, A., Khan, K. A., Attaullah, M., Khan, H., Ali, H., Bashir, M. A., Tahir, M., Ansari, M. J., Ghramh, H. A., Adgaba, N., & Dash, C. K. (2019). Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(7), 1695–1703. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.08.013>.

Barbeira, P. J. S., Paganotti, R. S. N., & Ássimos, A. A. (2013). Development of a multivariate calibration model for the determination of dry extract content in Brazilian commercial bee propolis extracts through UV-Vis spectroscopy. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 114, 441–448. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2013.05.009>.

Carvalho, A. A., Finger, D., MacHado, C. S., Schmidt, E. M., Costa, P. M. Da, Alves, A. P. N. N., Morais, T. M. F., Queiroz, M. G. R. De, Quináia, S. P., Rosa, M. R. Da, Santos, J. M. T. Dos, Pessoa, C., Moraes, M. O. De, Costa-Lotufo, L. V., Sawaya, A. C. H. F., Eberlin, M. N., & Torres, Y. R. (2011). *In vivo* antitumoural activity and composition of an oil extract of Brazilian propolis. *Food Chemistry*, 126(3), 1239–1245. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.035>.

Doğan, H., Silici, S., & Ozcimen, A. A. (2020). Biological Effects of Propolis on Cancer. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 8(3), 573. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v8i3.573-579.2939>.

Finger, D., Machado, C. S., Torres, Y. R., Quináia, S. P., Thomaz, A. C. G., Gobbo, A. R., Monteiro, M. C., Ferreira, A. G., Sawaya, A. C. H. F., & Eberlin, M. N. (2013). Antifungal bioassay-guided fractionation of an oil extract of propolis. *Journal of Food Quality*, 36(5). <https://doi.org/10.1111/jfq.12039>

Ibrahim, N., 'Izzah, Wong, S. K., Mohamed, I. N., Mohamed, N., Chin, K. Y., Ima-Nirwana, S., & Shuid, A. N. (2018). Wound healing properties of selected natural products. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(11). <https://doi.org/10.3390/ijerph15112360>

Moç, A. C., Silaghi-Dumitrescu, R., & Sârbu, C. (2011). Rapid and effective evaluation of the antioxidant capacity of propolis extracts using DPPH bleaching kinetic profiles, FT-IR and UV-vis spectroscopic data. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(4–5), 516–522. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.11.006>

Oyama, J., Fernandes Herculano Ramos-Milare, Á. C., Lopes Lera-Nonose, D. S. S., Nesi-Reis, V., Galhardo Demarchi, I., Alessi Aristides, S. M., Juarez Vieira Teixeira, J., Gomes Verzignassi Silveira, T., & Campana Lonardon, M. V. (2020). Photodynamic therapy in wound healing in vivo: a systematic review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 30. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.101682>

Pasupuleti, V. R., Sammugam, L., Ramesh, N., & Gan, S. H. (2017). Honey, Propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/1259510>.

Rufino, M. S. M., Fernandes, F. A. N., Alves, R. E., & de Brito, E. S. (2009). Free radical-scavenging behaviour of some north-east Brazilian fruits in a DPPH{radical dot} system. *Food Chemistry*, 114(2), 693–695. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.098>.

Sawaya, A. C. H. F., Barbosa da Silva Cunha, I., & Marcucci, M. C. (2011). Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. *Chemistry Central Journal*, 5(1), 27. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-5-27>.

Schmidt, E. M., Stock, D., Chada, F. J. G., Finger, D., Christine Helena Frankland Sawaya, A., Eberlin, M. N., Felsner, M. L., Quináia, S. P., Monteiro, M. C., & Torres, Y. R. (2014). A comparison between characterization and biological properties of brazilian fresh and aged propolis. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/257617>.

Shanmugapriya, K., & Kang, H. W. (2019). Engineering pharmaceutical nanocarriers for photodynamic therapy on wound healing: Review. *Materials Science and Engineering C*, 105(July), 110110. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110110>.

Siewert, B., & Stuppner, H. (2019). The photoactivity of natural products – An overlooked potential of phytomedicines? *Phytomedicine*, 60(June), 152985. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.152985>.

Tomazzoli, M. M., Pai Neto, R. D. a., Moresco, R., Westphal, L., Zeggio, A. R. S. omens., Specht, L., Costa, C., Rocha, M., & Maraschin, M. (2015). Discrimination of Brazilian propolis according to the seasoning using chemometrics and machine learning based on UV-Vis scanning data. *Journal of Integrative Bioinformatics*, 12(4), 279. <https://doi.org/10.2390/biecoll-jib-2015-279>.

Wang, C. C., Wang, Y. X., Yu, N. Q., Hu, D., Wang, X. Y., Chen, X. G., Liao, Y. W., Yao, J., Wang, H., He, L., & Wu, L. (2017). Brazilian green propolis extract synergizes with protoporphyrin IX-mediated photodynamic therapy via enhancement of intracellular accumulation of protoporphyrin IX and attenuation of NF-κB and COX-2. *Molecules*, 22(5). <https://doi.org/10.3390/molecules22050732>