

DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTIDIABÉTICO DA PRÓPOLIS COLETADA EM UMA ÁREA DE TRANSIÇÃO CERRADO-AMAZÔNIA

Thaynara Guimarães Miranda¹, Karoliny Sousa Miranda², Kálita Cardoso da Silva², Robson dos Santos Barbosa³, Carla Cristina da Silva⁴, Ilsamar Mendes Soares⁴

¹Estudante do Curso Superior de Licenciatura em Ciências Biológicas – IFTO/Araguatins. Bolsista do Programa de Iniciação Científica. E-mail: <thaynara.miranda@estudante.ifto.edu.br>

²Estudante do Curso Superior de Licenciatura em Ciências Biológicas – IFTO/Araguatins. Voluntários do Programa de Iniciação Científica. E-mails: <karoliny.miranda@estudante.ifto.edu.br>, <kalita.silva2@estudante.ifto.edu.br>, <aghata.lima@estudante.ifto.edu.br>, <daniel.andrade3@estudante.ifto.edu.br>, <bruna.cardoso@estudante.ifto.edu.br>

³Doutorando em Biodiversidade e Biotecnologia no Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal – Bionorte/UFT. E-mail: <robsondx@gmail.com>

⁴Professor do curso de Licenciatura em Ciências Biológicas – IFTO/Araguatins. E-mails: <ilsamar.soares@ifto.edu.br>, <carla.silva@ifto.edu.br>

Resumo: A própolis é um produto apícola de composição química variável de acordo com as condições climáticas e de vegetação da região de origem. Geralmente é constituído de substâncias com diversas atividades biológicas, entre elas, antibacteriana, antifúngica, antiviral, antioxidante e antidiabética. Como não foram encontrados estudos sobre a constituição química e atividades biológicas da própolis na microrregião do Bico do Papagaio, o presente trabalho avaliou a própolis coletada nessa localidade com o objetivo de analisar suas propriedades químicas e atividades biológicas, com o foco na atividade antidiabética. Assim, a própolis de *Apis mellifera* foi coletada numa área de transição Cerrado-Amazônia situada no município de Sampaio-TO, a qual foi dissolvida em metanol e dimetilsulfóxido e submetida aos seguintes testes: fitoquímica preliminar que indicou a presença de compostos fenólicos, alcaloides e flavonoides; Cromatografia líquida de alta eficiência que permitiu a identificação de compostos importantes no controle de diabetes; atividade antioxidante, que revelou capacidade de sequestro de radicais livres em sistemas biológicos; teste *in vitro* de inibição da enzima intestinal α -glicosidase – AG, que revelou boa capacidade inibitória e; estudo *in silico* que indicou capacidade da própolis em se ligar a AG e alterar sua ação quanto ao metabolismo de carboidratos. Os dados obtidos indicaram que a própolis é promissora para a atividade antidiabética. Pesquisas futuras de análises físico-químicas poderão contribuir com a determinação de riscos e benefícios na utilização da própolis para o controle do metabolismo de carboidratos.

Palavras-chave: Diabetes, fitoquímicos, inibição, hiperglicemia

1 INTRODUÇÃO

A própolis é um produto apícola complexo e resinoso, produzido pelas abelhas a partir da coleta de diferentes substâncias florais, às quais as abelhas acrescentam secreções salivares, cera e pólen para a elaboração do produto (SALGUEIRO; CASTRO, 2016). Sua utilização na colmeia é bastante diversificada, sendo aplicada para vedar buracos e rachaduras, reparar e fortalecer favos de mel, proteger contra a entrada de insetos e ainda mumificar o corpo de algum animal que possa entrar na colmeia (BANKOVA et al., 2005).

De forma geral, a composição química da própolis varia de acordo com as condições climáticas e de vegetação da região onde a colmeia é formada (PORTILHO et al., 2013). As classes de compostos fitoquímicos presentes na própolis variam entre compostos fenólicos, flavonoides, terpenos, aldeídos, cumarinas e entre outros, que conferem a esse produto diversas

atividades biológicas, entre elas, antibacteriana, antifúngica, antiviral, antioxidante e antidiabética (SFORCIN; BANKOVA, 2010).

O diabetes mellitus é uma doença metabólica caracterizada por uma concentração elevada de glicose no sangue que resulta na ação inadequada da insulina, levando a uma série de complicações, como retinopatia, neuropatia, insuficiência renal, doença cardíaca e derrame. Se trata de uma doença que não tem cura, sendo assim, o custo econômico de intervenções medicamentosas e até mesmo a redução da qualidade de vida, levam muitos indivíduos a procurarem terapias alternativas com propriedades anti-hiperglicêmicas visando o controle da glicemia e diminuição do risco de complicações da doença (LI et al., 2010; PANDEY et al., 2011).

Em relação a constituição química e atividades biológicas da própolis situada na região do Bico do Papagaio, os estudos são escassos e pouco se sabe sobre os benefícios desse produto apícola. Portanto, o presente trabalho avaliou a própolis coletada nessa localidade com o objetivo de analisar suas propriedades químicas e atividades biológicas, com o foco na atividade antidiabética.

2 METODOLOGIA

2.1 Coleta do material

A própolis foi obtida no apiário da Chácara Santa Maria, município de Sampaio, Bico do Papagaio, extremo norte do Estado do Tocantins, região de transição Cerrado-Amazônia, sob coordenadas 5°21'57.7"S 47°51'53.8"W. A coleta está cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SISGEN sob o número A1CE259. Depois de coletada, a amostra foi devidamente armazenada em recipiente fechado ao abrigo da luz, conservada em caixa térmica, levada ao laboratório de Bromatologia do IFTO - Campus Araguatins e armazenada sob refrigeração até a realização das análises.

2.2 Prospecção fitoquímica

A avaliação da presença das classes de metabólitos secundários foi realizada com solução da própolis bruta a 1 % em metanol, utilizando testes de coloração e precipitação. Alcaloides foram investigados conforme Matos (2009), compostos fenólicos, conforme Soares et al. (2017), flavonoides conforme Mouco et al. (2003) e fitosteróis conforme por Lin et al. (2009).

2.3 Avaliação da atividade antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante seguiu a descrição de Soares et al. (2017). O teste foi realizado em triplicata, misturando 0,5 mL de diferentes concentrações da própolis (10 a 250 µg/mL em metanol) com 2,2-difenil-1-picril-hidrazila – DPPH (40 µg/mL em metanol), deixando

por meia hora no escuro e lendo as absorvâncias a 517 nm. Como controles positivos utilizou-se hidroxitolueno butilado – BHT, rutina e ácido ascórbico. A partir das absorvâncias determinou-se a atividade antioxidante total e a concentração inibitória (IC50), que foi expressa em µg/mL.

2.4 Inibição da enzima α -glicosidase

O ensaio de inibição da α -glicosidase (AG), seguiu a descrição de Costa et al. (2020). Assim, 0,1 mL de diferentes concentrações da própolis (0 – 2,5 mg/mL em DMSO), foram misturados com 0,53 mL de tampão fosfato 0,1 M (pH 6,8), 0,27 mL da AG e incubada a 37° por 20 minutos, para então, ser adicionado 100 µL do substrato p-nitrofenil- α -d-glucopiranosídeo (4 mM), repetindo a incubação novamente, adicionando 1 mL de carbonato de sódio 0,2 M e leitura de absorvância a 405 nm. Uma reação da AG sem o extrato foi tomada como controle.

2.5 Identificação de compostos

Os compostos foram identificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando um cromatógrafo Shimadzu® dotado de coluna C18 Luna Phenomenex® 5 µm mantida a 22°C. Para eluição foram utilizados duas fases móveis, “A” (0,1 % de ácido fosfórico em água) e “B” (Fase A/acetoneitrila/metanol (54:35:11), com a seguinte programação de gradiente: 0,1- 5 min, 0 % B; 5-10 min, 30 % B; 10-20 min, 40 % B; 20-50 min 40 % B; 50-60 min 50 % B; 60-70 min 60 % B; 60-90 min 80 % B; 90-100 min 80 % B; 100-110 min 100 % B; 110-140 min 100 % B; 140-150 min 0 % B; 150-160 min 0 % B; fluxo de 1 mL/min. Identificou-se os compostos mediante a comparação do tempo de retenção da amostra de própolis com o dos padrões autênticos ácido gálico, catequina, ácido vanílico, ácido p-cumárico, rutina, caempferol e flavona, todos obtidos na Sigma®. O extrato e os padrões foram filtrados em membrana PVDF de 0,22 µm antes da injeção no equipamento.

2.6 Testes de ancoragem molecular

Para esta análise, utilizou-se a estrutura química de um dos fitoquímicos identificados na própolis, o ácido vanílico, a qual, foi recuperada do banco de dados PubChem e a estrutura da AG recuperada do Protein Data Bank (PDB). Para simulação foram utilizados os softwares MGLTools 1.5.6, AutoDock Vina 4.0 (TROT; OLSON, 2010), Pymol 2.4.0 e LigPlot 2.2.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Prospecção fitoquímica

A importância da realização da triagem fitoquímica, consiste no fato de que a presença de determinados compostos, atribuem à própolis diversas ações biológicas. Os resultados obtidos nessa triagem revelaram a presença de diferentes classes de fitoquímicos como indicado na Tabela

1.

Tabela 1 – Metabólitos secundários detectados na própolis da área de transição Cerrado-Amazônia.

Classes químicas	Extrato de própolis
Compostos fenólicos	+
Fitosteróis	-
Alcaloides	+
Flavonoides	+
Flavonóis	+
Flavona	+

Fonte: Os autores

Os compostos fenólicos, alcaloides, flavonoides, flavonóis e flavonas são responsáveis pelas atividades antibacteriana, antifúngica e principalmente pela capacidade antioxidante e antidiabética da própolis. Estes resultados são compatíveis com as pesquisas de Fianco (2014), Castro et al. (2007); Rivera-Vañez et al. (2018).

3.2 Avaliação da atividade antioxidante

Pelo ensaio DPPH, as propriedades antioxidantes do extrato de própolis foram analisadas quanto a sua capacidade de agir como doadores de elétrons para reduzir substâncias oxidantes. A análise das diferentes diluições do extrato permitiu determinar a quantidade de extrato suficiente para diminuir a absorbância inicial do DPPH em 50 %, concentração inibitória (IC50) expressa em µg/mL. A própolis e os padrões apresentam variâncias significativas no potencial antioxidante, como mostra a Tabela 2.

Tabela 2 – Média e desvio padrão dos valores de IC50 DPPH em µg/mL avaliados na amostra de própolis e padrões sintéticos hidroxitolueno butilado (BHT), rutina, ácido ascórbico frente ao radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH).

Amostras	IC50 DPPH (µg/mL)
BHT	100 ± 7,236a
Rutina	59,682 ± 0,402b
Ácido ascórbico	35,391 ± 0,203c
Própolis	528,893 ± 7,500d

* Médias seguidas pela mesma letra na coluna, diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Os autores.

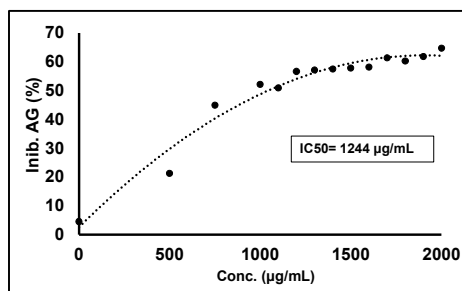
Com a análise da Tabela 2 é possível observar que o melhor IC50 foi detectado no padrão sintético ácido ascórbico, seguido pela rutina e BHT, sendo o maior IC50 registrado para a própolis. Como a própolis testada é uma amostra bruta e os controles positivos são padrões isolados, o fato de se evidenciar a concentração inibitória apenas 5 vezes maior que o controle BHT indica que a própolis é capaz de sequestrar radicais livres em meios biológicos e uma purificação dessa matéria prima poderá intensificar seu poder antioxidante. Araújo et al. (2016), também evidenciaram atividade antioxidante em própolis de *A. mellifera* tocantinense de uma

área distinta da avaliada neste trabalho e observaram uma variação de IC₅₀ entre $260,34 \pm 12,27$ $\mu\text{g/mL}$ e $845,38 \pm 31,60$ $\mu\text{g/mL}$. Desta forma, os valores encontrados no presente trabalho (IC₅₀= $528,893 \pm 7,500$ $\mu\text{g/mL}$), se situaram em um ponto intermediário ao obtido por estes autores, indicando que esta unidade federativa tem grande potencial para produção deste produto apícola para fins medicinais.

4.3 Inibição da enzima α -glicosidase

A inibição da AG foi analisada como meio de retardar a absorção de carboidratos e reduzir os níveis de glicemia pós-prandiais. O resultado da atividade inibitória da solução de própolis é apresentado na Figura 1. Como pode ser observado a atividade inibitória da solução de própolis foi dependente da concentração e atingiu um valor máximo de 64 % com um IC₅₀= 1244 $\mu\text{g/mL}$. Isto confere à própolis analisada um potencial para o desenvolvimento de produto antidiabético, pois como descreve Shibano et al. (2008) para um extrato exercer reduções significativas na diabetes ele deve exibir atividades inibidores da AG.

Figura 1 - Inibição da α -glicosidase pelo extrato de própolis.



Fonte: Os autores

4.4 Identificação de compostos

A realização da análise CLAE permitiu identificar componentes da própolis coletada na área de transição Cerrado-Amazônia. Como mostrado na Tabela 3, a análise por CLAE permitiu a identificação de ácidos fenólicos e flavonoides, compostos importantes para o controle de diabetes. Salatino et al. (2011) relata que o ácido gálico, ácido p-cumárico e ácido vanílico são eficazes no tratamento inicial da diabetes. Com isso, infere-se que o efeito desses compostos somados aos demais detectados na própolis em estudo, seja capaz de atuar em diferentes fatores relacionados as complicações diabéticas.

É importante destacar que, além dos fitoquímicos detectados pelas análises realizadas neste trabalho, a própolis pode apresentar em sua composição química polissacarídeos, proteínas, aminoácidos, amidas, aminas e detritos orgânicos que, juntos, podem perfazer um percentual de 5 % (KUROPATNICKI et al., 2013). A possível presença de polissacarídeos revela uma

preocupação, que exige mais estudos sobre a composição química da própolis do presente estudo por pesquisas futuras, tendo em vista que, se constitui um grupo de substâncias relacionadas ao desenvolvimento de diabetes. Embora a comprovação seja necessária para ponderar os riscos e benefícios do uso da própolis para este fim, as evidências do presente trabalho revelaram que se há polissacarídeos na própolis, não está afetando a inibição da AG, apresentando um efeito inibitório até melhor que o inibidor utilizado atualmente como medicamento, a acarbose. Costa et al. (2020) constataram uma IC₅₀ de 600000 µg/mL para esta substância, indicando que são necessárias quantidades aproximadamente cinco vezes maior que a própolis (1244 µg/mL) para reduzir a atividade da AG em 50 %.

Tabela 3 – Identificação de compostos a partir do tempo de retenção dos padrões em comparação com o extrato bruto de própolis obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência.

Compostos	Tempo de retenção
Ácido gálico	15,060
Catequina	24,280
Ácido vanílico	28,190
Ácido p-cumárico	41,710
Rutina	64,850
Caempferol	103,150
Flavona	133,310

Fonte: Os autores.

Com a realização do teste de ancoragem molecular, foi possível analisar a interação entre a AG e o ácido vanílico encontrado na própolis, além de determinar os parâmetros de afinidade molecular. Como mostrado na Tabela 4, os compostos fenólicos da própolis podem interagir com diversos resíduos de aminoácidos da AG, estabelecendo pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Estes dados estão de acordo com os de Aleixandre et al. (2022), que relatam que os compostos fenólicos interagem com enzimas digestivas por ligações não covalentes em sua atividade inibitória.

Tabela 4 - Parâmetros de afinidade molecular entre a enzima α -glicosidase e ácido vanílico encontrado no extrato de própolis

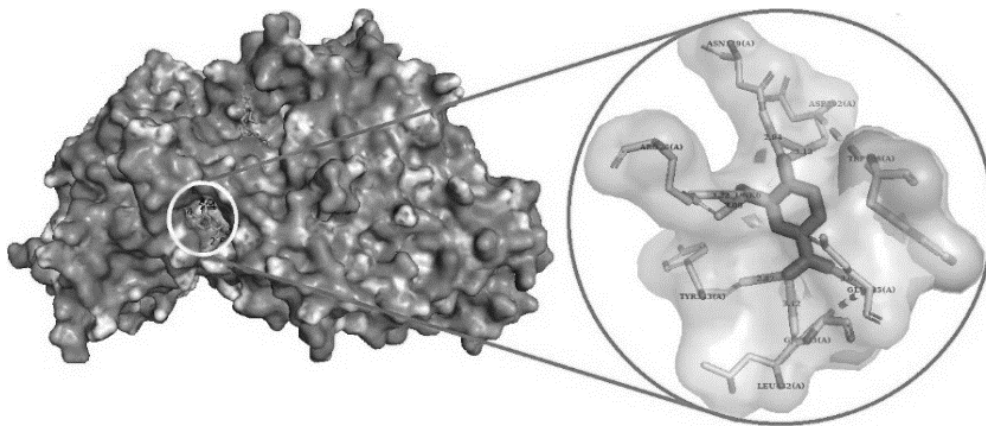
Complexo	Energia na melhor conformação ($\Delta G_{\text{binding}}$ (kcal/mol))	Distância RMSD	Aminoácidos que interagem por pontes de hidrogênio	Aminoácidos que interagem por ligação hidrofóbica
α -glicosidase (4J5T) e ácido vanílico	-5.8	0.000 Å	Glu 435 Leu 432 Arg 26 Tyr 3433 Asn1 29 Asp 202	Gly 433 Trp 206

Fonte: Os autores

Na Figura 2, é possível notar que o ácido vanílico, se acomoda num bolsão da superfície

da AG. Embora este sítio de ligação seja alostérico, os dados da inibição somados ao estudo *in silico* indicam que quando os compostos da própolis se ligam aos resíduos, podem alterar a conformação da AG e reduzir sua função catalítica na transformação de carboidratos.

Figura 2 - Interação entre o ácido vanílico (PubChem CID 8468), um dos fitoquímicos identificados por CLAE no extrato da própolis e a α -glicosidase (RCSB PDB ID 4J5T). O círculo branco indica a posição do ácido vanílico numa cavidade superficial da estrutura da enzima. Os resíduos de aminoácidos da melhor pose de interação obtida entre o fitoquímico e a enzima estão em destaque (estruturas do receptor e ligante criadas no Pymol).



Fonte: Os autores

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A própolis coletada na área de transição Cerrado-Amazônia, apresenta fitoquímicos importantes no controle de diabetes e radicais livres. O ensaio de inibição e ancoragem molecular revelaram que a própolis inibe a ação da α -glicosidase. Pesquisas futuras de análises físico-químicas e determinação de polissacarídeos com essa própolis, poderão contribuir com a determinação de riscos e benefícios de sua utilização no controle do metabolismo de carboidratos.

6 AGRADECIMENTOS

Ao IFTO/*campus* Araguatins, que possibilitaram a realização dessa pesquisa.

REFERÊNCIAS

ALEIXANDRE *et al.* Understanding phenolic acids inhibition of α -amylase and α -glucosidase and influence of reaction conditions. **Food Chemistry**, v. 372, n. 15, 2022.

ARAÚJO, K.S.S. et al. Physicochemical properties and antioxidant capacity of propolis of stingless bees (*Meliponinae*) and *Apis* from two regions of Tocantins, Brazil. **Acta Amazônica**, v. 46 n. 1, 2016.

BANKOVA, V. Recent trends and important developments in propolis research. **Evidence-Based Complementary and Alternative**, v. 2, n. 1, p. 29–32, 2005.

CASTRO M. L. Própolis do Sudeste e Nordeste do Brasil: Influência da sazonalidade na

atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química Nova**. 007;30(7):1512-16, 2007.

COSTA, O. J. et al. Inhibitory effects of *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan stem bark extract on α -glucosidase activity and oxidative stress. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 14, n. 11, p. 583-592, 2020.

FIANCO, A. L.B. **Estudo sobre a atividade antifúngica e antioxidante de extratos de própolis obtidos com CO_2 supercrítico**. Dissertação de mestrado – Universidade do Rio Grande do Sul, 2014.

LI et al. Effects of Encapsulated Propolis on Blood Glycemic Control, Lipid Metabolism, and Insulin Resistance in Type 2 Diabetes Mellitus Rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 2010.

MATOS, F. J. A. Introdução à Fitoquímica Experimental. 3ª ed. Fortaleza: **edições UFC**, 2009.

MONDAL et al. A new ester of fatty acid from a methanol extract of the whole plant of *Amaranthus spinosus*. **Pharmaceutical Biology**, p. 600–604, 2014.

MOUCO, et al. Controle de qualidade de ervas medicinais. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, n. 31, p. 18- 22, 2003. Of protein. **Food Chemistry**, 113, p. 78–84, 2009.

PANDEY et al. Alternative therapies useful in the management of diabetes: A systematic review. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**. v. 3, p. 504–12, 2011.

PORTILHO et al. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica da própolis produzida no estado do Tocantins. Araguaína, **Revista Científica do ITPAC**, 2013.

RIVERA-YAÑEZ et al. Hypoglycaemic and Antioxidant Effects of Propolis of Chihuahua in a Model of Experimental Diabetes. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 2018.

SALATINO et al. Propolis research and the chemistry of plant products. **Natural Product Reports**, Brasil, v. 28, p. 925–936, 2011.

SALGUEIRO, F. B.; CASTRO, R. N. Comparação entre a composição química e capacidade antioxidante de diferentes extratos de própolis verde. Rio de Janeiro, **Química Nova**, v. 39, N. 10, p. 1192-1199, 2016.

SFORCIN, J. M., BANKOVA, V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 253–260, 2010.

SHIBANO et al. Antioxidant constituents in the dayflower (*Commelina communis* L.) and their α -glucosidase-inhibitory activity. **Journal of Natural Medicines** 62, 349, 2008.

SOARES et al. Application of a degreasing process and sequential ultrasound-assisted extraction to obtain phenolic compounds and elucidate of the potential antioxidant of *Siparuna guianensis* Aublet. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 11, n. 21, p. 357-366, 2017.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of computational chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455-461, 2010.