



Análise da atividade antioxidante presente nos cremes para o tratamento de mastite, babosa e do extrato hidroalcoólico de própolis

Analysis of the antioxidant activity present in creams for the treatment of mastitis, aloe vera, and hydroalcoholic propolis extract

Luiza da Silva Leite¹, Sílvia Cristina Aguiar², Solange Maria Cottica³

RESUMO

A pesquisa contém o intuito de medir a atividade antioxidante de três cremes para o tratamento de mastite, desenvolvidos pela UNEMAT, com diferentes concentrações de própolis e babosa em sua formulação. Também foi avaliada a atividade antioxidante nas amostras de babosa e extrato hidroalcoólico de própolis. Foram feitas as análises de DPPH, fenólicos totais e flavonóides, sendo os cremes utilizados na concentração de 100 g/L em etanol 70%. A babosa e o extrato hidroalcoólico também foram diluídos no mesmo solvente, em diferentes concentrações para cada teste. A partir dos resultados obtidos, conclui-se que o extrato hidroalcoólico possui a maior atividade antioxidante, uma vez que nos testes do sequestro do radical DPPH, teor de fenólicos totais e flavonoides se apresentou em quantidades superiores aos cremes desenvolvidos e à babosa. Logo, é possível elencar em ordem decrescente de atividade antioxidante, o extrato de própolis, a babosa, o creme 3, creme 1 e o creme 2. É possível verificar a transferência da rica atividade antioxidante da própolis para os cremes desenvolvidos.

PALAVRAS-CHAVE: atividade antioxidante; mastite; própolis.

ABSTRACT

The research aims to measure the antioxidant activity of three creams for the treatment of mastitis, developed by UNEMAT, with different concentrations of propolis and aloe vera in their formulation. The activity was also assessed in samples of aloe vera and hydroalcoholic propolis extract. Analyses of DPPH, total phenolics, and flavonoids were conducted, with the creams used at a concentration of 100 g/L in 70% ethanol. Aloe vera and the hydroalcoholic extract were also diluted in the same solvent at different concentrations for each test. Based on the results obtained, it can be concluded that the hydroalcoholic extract has the highest antioxidant activity, as it exhibited higher levels of DPPH radical scavenging, total phenolics, and flavonoids compared to the developed creams and aloe vera. Therefore, it is possible to rank the antioxidant activity in ascending order as follows: propolis extract, cream 3, cream 1, cream 2, and aloe vera. The transfer of the rich antioxidant activity of propolis to the developed creams can be observed.

KEYWORDS: antioxidant activity; mastitis; propolis.

INTRODUÇÃO

O processo metabólico da oxidação é um meio essencial para a obtenção de energia celular. Entretanto, essa reação libera radicais livres no corpo, de modo que ocasiona um estresse oxidativo celular, o qual está associado ao desenvolvimento de doenças (BERNABUCCI, RONCHI, LACETERA et al.2005). A mastite é um exemplo, a qual é uma inflamação na glândula mamária, que interfere na diminuição da produção de leite do gado

¹ Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil. E-mail: luizaleite03@gmail.com. ID Lattes: 0745294202599448.

² Docente no Departamento de Zootecnia. Universidade do Estado do Mato Grosso, Pontes e Lacerda, Mato Grosso, Brasil. E-mail: scaquiar@unemat.br. ID Lattes: 2611314776831572

³ Docente do curso de Tecnologia em Processos Químicos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil. E-mail: smcottica@utfpr.edu.br. ID Lattes: 9405524829450494



leiteiro e prejuízo financeiro ao produtor (OLIVEIRA, 2015). Sendo assim, existe uma alta demanda no mercado em busca de produtos e alimentos que combatam os radicais livres, consequentemente com alta atividade antioxidante, como a própolis, por exemplo.

O 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH), é um radical sintético livre estável, por possuir em sua estrutura três anéis aromáticos, o qual é responsável por estabilizar sua carga eletrônica nos grupos de NO_2 e N presentes (MARTINEZ, et al. 2006). Quando uma substância antioxidante entra em contato com tal, ocasiona-se a transferência do hidrogênio ou elétron, assim passa a ser uma molécula estável. Logo ocorre a neutralização ou eliminação do radical, tal reação verifica-se quando o reagente é exposto ao Trólox, por exemplo. Este que possui boa estabilidade como radical livre e boa atividade antioxidante.

No grupo dos polifenóis, sendo os flavonóides um deles, constituídos por grupos de hidroxila em sua molécula, acabam se tornando um ótimo agente doador de H e de elétrons, assim sendo antioxidantes efetivos (ALVES, et al. 2007). O Ácido Gálico e a Quercetina são dois exemplos de compostos ricos em atividade antioxidante por apresentarem essa estrutura, os quais foram utilizados como padrões nos testes de fenólicos totais e flavonóides.

MATERIAIS E MÉTODOS

DPPH

Para o preparo da solução de DPPH foi pesado 4,70 mg deste, em um béquer, onde foi adicionado 20 mL de etanol 70% e agitado. Ao final, transferiu-se para um balão âmbar de 100 mL. Este processo de lavagem do béquer se repetiu 4 vezes, até que os últimos 20 mL foram completados diretamente no balão com uma pipeta de Pasteur. A solução foi homogeneizada e levada para um banho de ultrassom por 420 segundos, a qual posteriormente foi transferida para um frasco âmbar.

Em seguida, efetuou-se uma diluição (1:3 v/v) para a amostra de babosa, sendo pipetado e armazenado em um frasco âmbar 100 μL extrato em 200 μL etanol 70%. Já para o extrato hidroalcoólico foi realizada uma diluição (1:26 v/v) a qual foi pipetado 10 μL extrato junto de 250 μL etanol 70%, assim ela foi estocada em um frasco âmbar.

Com a solução de DPPH e as diluições devidamente preparadas, pode-se iniciar o teste em triplicatas, o qual primeiramente foi pipetado 50 μL da amostra nos tubos de ensaio envolto de papel alumínio. Em seguida, adicionou-se 3 mL da solução de DPPH e agitou-se com o auxílio de um Vórtex. Com isso foram aguardados 30 minutos, sobre proteção da luz, para leitura da absorbância em espectrofotômetro UV/VIS a 517 nm contra o branco, o qual foi preparado com etanol 70% no lugar da amostra em todos os testes.

Para a curva de calibração esse mesmo processo foi realizado, o qual substituiu-se a amostra pelo padrão Trólox. Sendo este preparado em 5 diferentes concentrações de 0 até 1200 $\mu\text{mol/L}$, com os resultados obtidos e tabelados, foi gerado um gráfico e obtida a equação de reta, a qual foi utilizada para efetuar cálculos de concentração.

TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Inicialmente, foi preparado o reagente Folin-Ciocalteu em uma diluição de (1:1 v/v) com água destilada em um frasco âmbar. Posteriormente, foi preparada a solução de carbonato de sódio, onde pesou-se 34,985 g do sal em um béquer e acrescentado 100 mL de água destilada. A solução foi disposta em um agitador magnético até estar



completamente dissolvida, logo formou-se um corpo de fundo e foi utilizado o sobrenadante.

Em um frasco âmbar realizou-se novamente uma diluição (1:3 v/v) para a amostra de babosa, sendo 100 µL extrato e 200 µL etanol 70%. Assim como o extrato hidroalcoólico também foi diluído (1:26 v/v), sendo pipetado 10 µL de extrato junto de 250 µL etanol 70%, logo a diluição foi estocada em um frasco âmbar.

Com as soluções preparadas, foi pipetado em um tubo de ensaio protegido da luz, 250 µL da amostra, junto de 250 µL do reagente Folin-Ciocalteu, somado de 500 µL da solução saturada de carbonato de sódio e por fim 4 mL de água destilada. Os tubos foram agitados no Vórtex e repousados por 25 minutos, logo foram levados à centrífuga por 10 minutos a 3000 rpm. Com isso foi feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro UV/VIS a 725 nm contra o branco, os testes foram realizados em triplicatas.

A curva de calibração foi realizada utilizando o ácido gálico como padrão, sendo este preparado em diferentes concentrações de 0 a 200 mg/L de água. Assim, o protocolo foi aplicado e os dados obtidos foram tabelados. Com isso, pode-se gerar um gráfico, onde foi possível obter a equação de reta e calcular o teor de fenólicos presentes.

TEOR DE FLAVONÓIDES

Inicialmente, pesou-se 5,0191 g de cloreto de alumínio em um béquer onde foi adicionado 100 mL de etanol 70%, a solução foi posta sob um agitador magnético e utilizado o sobrenadante, perfazendo uma concentração de 5% da solução do sal. Para o extrato hidroalcoólico, em um frasco âmbar foi efetuada uma diluição de (1:36 v/v) a qual pipetou-se 10 µL extrato e 350 µL etanol 70 %, a solução foi levemente agitada.

O ensaio em triplicatas foi realizado, em tubos de ensaio protegidos da luz com papel alumínio, onde foi adicionado com uma micropipeta 500 µL da amostra, junto de 250 µL da solução de cloreto de alumínio 5% e 4,25 mL de etanol 70%. Os tubos foram agitados no Vórtex e mantidos por 30 minutos até a leitura das amostras, a qual foi realizada em espectrofotômetro UV/VIS a 425 nm contra o branco, os resultados foram anotados.

A fim de realizar a curva de calibração, foi preparado a solução de Quercetina, onde foi pesado em um béquer 30,1 mg desta junto de 5 mL de etanol 70%, a qual foi transferida para um balão volumétrico de 15 mL. Este processo de lavagem do béquer foi repetido mais uma vez e os últimos 5 mL foram acrescentados com uma pipeta de Pasteur até o menisco. Logo, foram efetuadas as devidas diluições de 0 a 250 mg/L de etanol 70%, a fim de obter os dados para plotar a curva de calibração e obter a equação de reta para efetuar os cálculos do teor de flavonóides nas amostras.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

DPPH

Após pesar 96,15 g do creme 1, posteriormente 98,52 g do creme 2 e 117,5 g do creme 3, a fim de preparar os extratos de creme e efetuar as diluições para o extrato hidroalcoólico de própolis e a babosa, fez-se a análise de DPPH e os resultados das absorbâncias das triplicatas em 517 nm foram tabelados.

Em seguida, foram realizadas as diluições do padrão Trólox nas concentrações de 0 µmol/L, 150 µmol/L, 300 µmol/L, 600 µmol/L e 1200 µmol/L. Com os resultados das absorbâncias, pode-se montar um gráfico da concentração (µmol/L) pela absorbância (nm),



com o qual obteve-se a equação de reta. Utilizando esta, foi substituído o valor das absorvâncias das amostras no Y, a fim de obter o valor de X, que seria a concentração em Equivalente em Trólox $\mu\text{mol/L}$. Esse cálculo foi efetuado para cada triplicata, logo em seguida, foi feita uma média aritmética.

Posteriormente, para calcular a concentração de Equivalente em Trólox (ET) por grama de amostra, dividiu-se o resultado encontrado pela concentração do respectivo creme. Para a babosa e o extrato hidroalcoólico foi multiplicado o resultado encontrado anteriormente, pelo volume da diluição, sendo (1:3 v/v) para a amostra de babosa, e do extrato hidroalcoólico (1:26 v/v) perfazendo esses a concentração final em $\mu\text{mol ET/L}$. Após encontrar o resultado para cada triplicata, com os dados obtidos foi calculado uma média e tabelados, Tabela 1.

Tabela 1. Resultado dos cálculos de concentração em equivalente Trólox (ET) obtidos através da equação de reta para o método DPPH.

Amostra	Média [$\mu\text{mol ET/g amostra}$]	Média [$\mu\text{mol ET/L}$]
Creme 1	5,34 \pm 0,22	-
Creme 2	4,10 \pm 0,36	-
Creme 3	7,10 \pm 0,12	-
Babosa	-	2894,75 \pm 101,43
Extrato Hidroalcoólico	-	33689,50 \pm 943,93

Fonte: autoral.

Portanto, com o valor da absorvância e os cálculos de concentração das amostras, é possível verificar a atividade antioxidante em todas análises realizadas, destacando-se o extrato hidroalcoólico e a babosa. Este resultado é esperado, uma vez que eles são mais puros do que os cremes, assim sendo uma fonte rica de antioxidantes. Deste modo, é visto a maior concentração no creme 3, posteriormente o 1 e por fim o 2.

TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Seguindo a mesma diluição do teste anterior foi realizado a análise do teor de fenólicos no comprimento de onda em 725 nm, assim foi encontrado e tabelado os resultados. Para efetuar os cálculos de concentração foi necessário montar a curva padrão a fim de encontrar a equação de reta. Sendo esse teste efetuado com Ácido Gálico nas concentrações de 0; 25; 50; 100; 150 e 200 mg/L.

Com isso, os valores de absorvância foram substituídos no Y da equação a fim de isolar e determinar o X, o qual representa a concentração em mg/L, e foi aplicado uma média para os resultados encontrados. Com isso os valores do extrato hidroalcoólico e a babosa foram multiplicados pelo valor da diluição, sendo esses expressos em mg de Equivalente a Ácido Gálico/L (mg EAG/L). Já os cremes foram divididos pelo respectivo valor da sua concentração e o resultado final é obtido em mg de Equivalente Ácido Gálico/g amostra (mg EAG/g).

Tabela 2. Resultado dos cálculos de concentração em equivalente ácido gálico (EAG) obtidos através da equação de reta para o método de compostos fenólicos totais.

Amostra	Média [mg EAG/g amostra]	Média [mg/L EAG]
Creme 1	1,00 \pm 0,01	-



Creme 2	0,80 ± 0,04	-
Creme 3	1,05 ± 0,01	-
Babosa	-	91,18 ± 3,75
Extrato Hidroalcoólico	-	3592,95 ± 21,56

Fonte: autoral.

Deste modo é possível elencar que todos os compostos analisados possuem teor de fenólicos. Logo o extrato hidroalcoólico de própolis apresentou melhores resultados, posteriormente o creme 3, creme 1, creme 2.

TEOR DE FLAVONÓIDES

Inicialmente, foi pesado 0,9696 mg do creme 1, 0,9680 mg do creme 2 e 1,0877 mg do creme 3. Sendo estes diluídos em 100 mL de etanol 70%, perfazendo assim respectivamente uma concentração de 96,96 g/L, 96,80 g/L e 108,77 g/L. Para a análise do teor de flavonóides, o extrato hidroalcoólico precisou ser diluído em 36 vezes, já a babosa não houve alteração.

Deste modo, foram encontrados os valores das absorvâncias para as amostras no comprimento de onda de 425 nm. Logo, foram efetuadas as diluições com a Quercetina para a curva padrão, sendo testadas na concentração de mg/L em 0; 25; 50; 75; 100; 150; 200 e 250. Uma vez obtida a equação de reta, foi substituído o valor de Y na equação obtida pelos respectivos valores das absorvâncias medidas, a fim de encontrar o valor de X, o qual é a concentração em mg/L.

Com a média desses valores, foi possível calcular a concentração em mg de Equivalente Quercetina/g de amostra (mg EQ/g) para os cremes, uma vez que é dividido o valor calculado anteriormente pela devida concentração e efetuada uma média. Para a babosa e o extrato hidroalcoólico foi encontrada a concentração em mg de Equivalente Quercetina/L (mg EQ/L), sendo o extrato hidroalcoólico multiplicado pelo volume da diluição. Os resultados calculados foram tabelados, Tabela 3.

Tabela 3. Resultado dos cálculos de concentração em equivalente quercetina (EQ) obtidos através da equação de reta para a determinação de flavonóides.

Amostra	Média [mg EQ/g amostra]	Média [mg EQ/L]
Creme 1	0,43 ± 0,02	-
Creme 2	0,28 ± 0,02	-
Creme 3	0,88 ± 0,00	-
Babosa	-	1,68 ± 0,48
Extrato Hidroalcoólico	-	7076,57 ± 21,00

Fonte: autoral.

De acordo com a Tabela 3 é visto que o extrato hidroalcoólico possui maior concentração de flavonóides, posteriormente é classificado o creme 3, creme 1 e creme 2, sendo este último em concentrações bem abaixo dos anteriores.

CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos conclui-se que o extrato hidroalcoólico de própolis possui maior atividade antioxidante, em seguida, a babosa, o creme 3, creme 1 e o creme



2. Com isso, é possível verificar que o poder antioxidante da própolis foi transferido para os cremes formulados.

Agradecimentos

Os agradecimentos deste trabalho vão para o CNPQ que apoia os alunos à pesquisa e inovações, a todos parceiros do LabCA da UTFPR de Toledo que auxiliaram neste processo. Assim como minha orientadora que sempre esteve disponível para os esclarecimentos das dúvidas e apoio.

Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

ALVES C; BRANDÃO H; DAVID J; DAVID J; LIMA. **Avaliação da atividade antioxidante de flavonoides**. 2007. 8 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química Ufba, Ufba, Salvador, 2007. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/XS9CsdV86YbjrxfMjLGmXVL/?format=pdf>. Acesso em: 21 ago. 2023.

BERNABUCCI U, RONCHI B, LACETERA N et al. **Influence of body condition score on relationships between metabolic status and oxidative stress in periparturient dairy cows**. J Dairy Sci 88, 2017-2026. 2005.

MARTINEZ, S. et al. **Cyclic voltammetry study of plasma antioxidant capacity – Comparison with the DPPH and TAS spectrophotometric methods**. Journal of Electroanalytical Chemistry, v. 588, n. 1, p. 68-73, 2006.

OLIVEIRA, George. **Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH• estudo de revisão**. 2015. 44 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Biológicas, S, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí, Teresina, 2015. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbpm/a/5Wrr5LFLJVJDN5yYQnFGyWd/?format=pdf>. Acesso em: 21 ago. 2023.

RUFINO M; ALVES R; BRITO E; MORAIS S; SAMPAIO C; PÉREZ-JIMÉNEZ, Jara; SAURA-CALIXTO, Fulgencio D. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH**. Fortaleza: Embrapa, 2007. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/426953/1/Cot127.pdf>. Acesso em: 08 set. 2023.