



A PRÓPOLIS COMO CANDIDATA NO TRATAMENTO DO MAL DE ALZHEIMER

Carlos E. A. Alves¹; Amanda B. Nascimento²; Lucas S. Frota³; Sara I. C. G. Barbosa⁴; Raissa de O. Costa⁵; Carlucio R. Alves⁶.

¹carlovedu.almeida@aluno.uece.br; ²amanda.nascimento@aluno.uece.br; ³lucass.frota@aluno.uece.br; ⁴sara.gomes@aluno.uece.br; ⁵rhaisa.costa@aluno.uece.br; ⁶carlucio.alves@uece.br

Palavras-Chave: Acetilcolinesterase, *Apis mellifera*s, Antioxidante.

Introdução

A doença de alzheimer (DA) é uma afecção neurodegenerativa progressiva e irreversível, na qual causa uma perda de memória e distúrbios cognitivos, que assola a humanidade a diversos séculos, na qual só foi descoberto em 1907 por Aloysius Alzheimer que era um médico alemão (Contreras-pulache, 2014). Segundo dados do Ministério da Saúde do Brasil, 2023, a doença é manifestada quando determinadas proteínas no sistema nervoso central sofrem falhas durante seu processamento, assim gerando fragmentos de proteínas mal processadas e tóxicas nas quais podem aparecer no interior dos neurônios ou entre seus espaços, resultando em uma falha ou até mesmo em uma perda progressiva de neurônios em certas regiões do cérebro, dessa forma prejudicando a memória, linguagem, raciocínio, estímulos sensoriais e pensamentos abstratos.

A DA mesmo já sendo descoberta e pesquisada a tempos, permanece sem uma cura nos tempos contemporâneos atuais (Queiroz *et al.*, 2023). Ainda não se é compreendido totalmente a causa exata da doença de Alzheimer, porém há existência de fatores que estão normalmente recorrentes nos casos de DA, algumas delas por exemplo, formação anormais de placas amiloides e emaranhados neurofibrilares no cérebro, acarretando assim nos sintomas já citados como redução das células nervosas, assim causando perda cognitiva e diminuição do cérebro (Queiroz *et al.*, 2023). Outro grande indicador da doença de Alzheimer são as placas senis, que são conhecidas como beta-amiloides, são importantes marcadores da doença, nos quais são gerados pelo metabolismo irregular de uma proteína precursora amiloide (Sant'ana *et al.*, 2018; Queiroz *et al.*, 2023). A estratégia terapêutica para a DA busca melhorar a hipofunção colinérgica, sendo que, até o momento, a abordagem mais promissora tem sido a inibição da enzima acetilcolinesterase, responsável pela degradação da acetilcolina (Li, 2020; Queiroz *et al.*, 2023).

Existem diversos medicamentos que atuam nas sinapses colinérgicas, que podem interferir na enzima acetilcolinesterase ao inibi-la ou reativá-la, impactando os receptores de acetilcolina, podendo assim agir como antagonistas ou não (Queiroz *et al.*, 2023). Para lidar com as problemáticas da DA se é feito um acompanhamento multidisciplinar farmacológico, ou seja, uso de diversos fármacos para cada sintoma (Sant'ana *et al.*, 2018). Esse tratamento tem como objetivo lidar com as áreas cognitivas afetadas, retardando os efeitos da DA (Sant'ana *et al.*, 2018). A partir do entendimento que o tratamento contra a DA vem do acompanhamento multidisciplinar de fármacos, esses coquetéis de fármacos se desenvolveram juntos com as pesquisas sobre o entendimento da doença. Os primeiros fármacos listados no coquetel de tratamento contra a DA são os inibidores da colinesterase, que atuam na inibição das enzimas neurotransmissoras, a acetilcolinesterase e a butirilcolinesterase (Sant'ana *et al.*, 2018), os medicamentos que mostram habilidade para inibir essa enzima são geralmente chamados de anticolinérgicos (Queiroz *et al.*, 2023). Um

dos primeiros fármacos comercializado assim foi a tacrina, um fármaco com bastantes efeitos colaterais perigosos a saúde humana, já os fármacos atuais da segunda geração como a donepezila, a galantamina e a rivastigmina ((Sant'ana *et al.*, 2018), os quais já são menos perigosos a saúde do usuário, porém ainda apresentam bastantes efeitos colaterais como náuseas, vômitos, diarreia, anorexia, dispepsia, dores abdominais, oscilação da pressão arterial e entre alguns outros sintomas ((Sant'ana *et al.*, 2018). Com isso o interesse no uso de fitoterápicos contra a DA vem surgindo cada vez mais, com o intuito de diminuir os efeitos colaterais, então buscando um agente anticolinérgicos, se foi pensado na própolis.

A própolis, que é um produto natural produzido pelas as abelhas da espécie *Apis Melliferas* L., onde a síntese de substâncias resinas vegetais, cera, óleos, pólen somado a detritos da região (Menezes, 2022; Salgueiro, 2016) acabam por serem usadas principalmente para o embalsamento de abelhas mortas e proteção da colmeia (Dotta, 2015), que é de grande importância para o funcionamento da colmeias, esse composto apresenta variantes de acordo com o ecossistema e os fatores fitogeográficos em que a colmeia está localizada, como a mudança da vegetação, o estado do solo, entre outros fatores influenciam na mudança da própolis (De-melo *et al.*, 2014; Menezes, 2022). Existem diferentes tipos de própolis, que são principalmente caracterizadas pela a cor, como a própolis marrom, verde e a vermelha, a própolis vermelha é produzida em maior parte na região nordeste do Brasil (Reis *et al.*, 2021; Vidal, 2021). Esse produto resinoso tem muitas propriedades fitoterápicas que são capazes de proporcionar melhorias à saúde para aqueles que a utilizam, como atividades antibacterianas, anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana entre outras atividades (Gomes, 2016; De-melo *et al.*, 2014; Aguiar, 2018).

Visando encontrar um fármaco ou fitoterápico, com potencial anticolinérgico, além de não apresentar efeitos colaterais nos quais dregadem a qualidade de vida do usuario em trocar de retardar os sintomas neurodegenerativos progressivos da DA, o trabalho em questão, indica a avaliação da propolis vermelha como candita contra os males causados pela DA.

Material e Métodos

A atividade antioxidante foi avaliada pelo método de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) seguindo a metodologia descrita por Becker *et al.* (2019) , com modificações, pelo método de ABTS (ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico)) descrito por Re *et al.* (1999). Ambos os testes foram realizados em microplaca de fundo chato de 96 poços em leitor Elisa BioTek, modelo ELX 800. As diluições das amostras e dos padrões positivos utilizados nas avaliações quantitativas em microplaca, partiram de solução mãe com concentração de 2,0 mg.mL⁻¹ foram: 100 µg.mL⁻¹ , 50 µg.mL⁻¹ , 25 µg.mL⁻¹ , 12,5 µg.mL⁻¹ , 6,25 µg.mL⁻¹ , 3,12 µg.mL⁻¹ . A absorbância foi aferida em 515 nm para o radical DPPH● após 60 min de incubação, a 630 nm para o radical ABTS+● após 10 minutos de incubação. Como padrão negativo foram utilizadas todas as soluções, excetuando-se a amostra. Foram extintos da análise os valores referentes às colorações naturais dos extratos. Com os valores CI 50 das médias serão realizados teste de variância com comparação múltipla entre pares pelo teste de Tukey, considerando significativos valores de P < 0.05. Os antioxidantes quercetina e ácido gálico foram utilizados para comparação.

Na atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase (AChE) foi aferida em placas de 96 poços de fundo chato utilizando leitor Elisa BIOTEK, modelo ELX 800, software “Gen5 V2.04.11”, baseando-se na metodologia descrita por Ellman *et al.* (1961). Em placas de 96 poços, foram utilizadas as seguintes soluções por poço: 25 µL de iodeto de acetiltiocolina (15 mM), 125 µL de 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico] na solução Tris/HCL (50nM, pH=8, com 0,1 M de NaCl e 0,02 M de MgCL 2 .6H 2 O. (3 mM, DTNB ou reagente de Ellman), 50 µL da solução Tris/HCL (50 nM, pH=8, com 0,1% de albumina sérica bovina (BSA), 25 µL da amostra de extrato dissolvida no solvente de extração da amostra e diluída 10 vezes na solução Tris/HCL (50 mM, pH=8) para obter uma concentração final de 0,2 mg.mL⁻¹ (Rhee *et al.*, 2001; Trevisan *et al.*, 2003). A absorbância foi aferida a 405 nm durante 30 segundos. Em seguida, foram adicionados 25 µL da enzima acetilcolinesterase (0,25 µ.mL⁻¹) e a absorbância foi aferida por minuto até o total de 25 minutos de incubação da enzima. Como padrão negativo foram utilizadas todas as soluções, excetuando-se a amostra. As diluições das amostras e dos padrões positivos utilizadas nas avaliações quantitativas em microplaca, partiram de solução mãe com concentração de 2,0 mg.mL⁻¹ foram: 100 µg.mL⁻¹, 50 µg.mL⁻¹, 25 µg.mL⁻¹, 12,5 µg.mL⁻¹, 6,25 µg.mL⁻¹, 3,12 µg.mL⁻¹. Foram extintos da análise os valores referentes às colorações naturais dos extratos. Com os valores CI 50 das médias serão realizados teste de variância com comparação múltipla entre pares pelo teste de Tukey, considerando significativos valores de P < 0.05. Os padrões utilizados como controle positivo foram a galantamina e a fisostigmina.

Todas as amostras foram analisadas em triplicata. As amostras apresentaram coloração própria absorvida pelo espectro de onda de leitura, sendo assim, foram deduzidos os valores referentes à coloração. Após normalização dos dados foi realizado teste de curva de regressão não linear pelo programa estatístico GraphPad Prism v7.0.

Resultados e Discussão

Nos ensaios antioxidante, a própolis se mostrou uma elevada atividade antioxidante de origem natural. Esse potencial antioxidante foi avaliado por meio da medição da inibição do radical DPPH e ABTS, que são modelos amplamente reconhecido para avaliar a capacidade de uma substância em neutralizar os radicais livres (Frota *et al.*, 2023). Na tabela 1, é possível observar o resultado obtido de inibição para o radical DPPH possui valores médios de concentração inibitória (CI 50) de 10,74 ± 0,41 para o própolis vermelho. É importante destacar que valores de CI < 50 inferiores a 50 µg.mL⁻¹ (Kuetze; Efferth, 2010) são categorizados como indicativos de uma elevada atividade antioxidante. Portanto, esses achados reforçam a promissora das amostras em atuar como um antioxidante natural.

Tabela 1.: Resultado da análise de atividade antioxidante.

Amostras	CI ₅₀ DPPH• (µg.mL ⁻¹)	CI ₅₀ ABTS+• (µg.mL ⁻¹)
Quercetina (Padrão)	2,74 ± 0,08	3,98 ± 0,13
Ácido gálico (Padrão)	1,94 ± 0,27	13,01 ± 0,03
Própolis vermelha	10,74 ± 0,41	13,87 ± 0,26

Fonte: O próprio autor.

Assim como Abdullah, 2019, afirma que a própolis tem uma atividade antioxidante, na qual este trabalho também se confirma ser verdadeiro diante dos dados exibidos. A própolis vermelha usada de amostra nesses estudo se mostra ainda mais eficiente diante dos padrões da quercetina e do ácido gálico utilizados, como se é possível analisar na tabela 1.

A tabela 2 mostra os resultados para a inibição da acetilcolinesterase, a propolis vermelha tem uma alta inibição (CI 50 < 20 µg.mL⁻¹) da enzima (Santos et al., 2018), com CI 50 de 14,45 ± 0,40 µg.mL⁻¹. Assim mostrando que o material se prova promissor para estudos de inibição da enzima.

Tabela 2.: Resultado da análise de atividade anticolinesterase.

Amostras	CI ₅₀ AChE (µg.mL ⁻¹)
Galantamina (Padrão)	5,82 ± 0,02
Fisostigmina (Padrão)	2,15 ± 0,05
Quercetina (Padrão)	5,48 ± 0,03
Própolis vermelha	14,45 ± 0,40

Fonte: Próprio autor.

Assim como afirma Aguiar, 2018, onde utilizou da propolis vermelha, ela apresenta uma atividade anticolinesterase, assim como a do seguinte estudo, no qual também contribuimos para medir seu grau de atividade sendo classificado em elevado. Farmacos que inibem a acetilcolinesterase tem a capacidade de aliviar os sintomas causados pela DA (Nascimento *et al*, 2018). Inibindo a acetilcolinesterase a predominar no sistema e degrade o neuro transmissor acetilcolina, na qual é um dos principais neurotransmissores atacados pelos DA (Queiroz *et al.*, 2023).

Conclusões

No presente estudo foi possível observar que a própolis vermelha apresenta uma capacidade antioxidante que se mostrou consideravelmente elevada, assim mostrando o alto potencial antioxidante natural da propolis, além disso o potencial de inibição da acetilcolinesterase se mostrou relevante, apresentando uma eficiência como um agente antidegradante da acetilcolina, dessa forma podendo ser usado como um meio para retardar os sintomas e assim diminuir o avanço da DA ao longo do tempo, de tal forma que auxilia ao quadro do paciente. No entanto o uso da propolis vermelha contra o mal de Alzheimer ainda não é tão explorada na literatura, com tudo, pelo o que foi visto é favorável estudos de sinergia da propolis com alguns outros princípios ativos para uma possível criação de fármaco eficiente contra a DA e seus sintomas, assim revelando a necessidade de maior exploração dessa vertente na pesquisa, abordando essa possível futura ferramenta farmacológica.

Agradecimentos

Agradeço a FINEP, FUNCAP, FACE, CNPQ, pelo incentivo financeiro as pesquisas, agradeço a Universidade Estadual do Ceará (UECE), juntamente ao Laboratório de Química de Produtos Naturais, e principalmente ao SisNaBio que proporcionou espaço e conhecimento.

Referências

- ABDULLAH, Nurul Aliah et al. Physicochemical analyses, antioxidant, antibacterial, and toxicity of propolis particles produced by stingless bee *Heterotrigona itama* found in Brunei Darussalam. **Heliyon**, v. 5, n. 9, 2019.
- AGUIAR, G. R. et al. Estudo químico e avaliação biológica da própolis vermelha de Alagoas. **Revista Virtual de Química**, v. 10, n. 1, 2018.
- BECKER, M. et al. Determination of the Antioxidant Capacity of Red Fruits by Miniaturized Spectrophotometry Assays. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 3, n. 4, p. 223-227, dez. 2019. Disponível em: http://jbcs.sbq.org.br/audiencia_pdf.asp?aid2=5501&nomeArquivo=2018-0415SR.pdf. Acesso em: 21 jul. 2024.
- CONTRERAS-PULACHE, H. Esbozo de Alois Alzheimer. **Revista Peruana de Epidemiología**, v. 18, n. 1, p. 1-5, 2014.
- DE-MELO, A. A. M. et al. Capacidade antioxidante da própolis. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 44, p. 341-348, 2014.
- DOTTA, G. et al. Effect of dietary supplementation with propolis and *Aloe barbadensis* extracts on hematological parameters and parasitism in Nile tilapia. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, n. 1, p. 66-71, 2015.
- ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88-95, jul. 1961. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0006295261901459>. Acesso em: 21 jul. 2024.
- FROTA, L. S. et al. Antioxidant and anticholinesterase activities of amentoflavone isolated from *Ouratea fieldingiana* (Gardner) Engl. through in vitro and chemical-quantum studies. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 41, n. 4, p. 1206-1216, 4 mar. 2023. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/07391102.2021.2017353>. Acesso em: 21 jul. 2024.
- GOMES, M. F. F. et al. Atividade antibacteriana in vitro da própolis marrom. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, p. 279-282, 2016.

- KUETE, V.; EFFERTH, T. Cameroonian medicinal plants: pharmacology and derived natural products. **Frontiers in Pharmacology**, v. 1, p. 123, 2010. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2010.00123/abstract>. Acesso em: 21 jul. 2024.
- LI, Xian-Tao. Alzheimer's disease therapy based on acetylcholinesterase inhibitor/blocker effects on voltage-gated potassium channels. **Metabolic Brain Disease**, v. 37, n. 3, p. 581-587, 2022.
- MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, p. 405-411, 2022.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR); SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. Portaria Conjunta nº 13, de 28 de novembro de 2017. Aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Doença de Alzheimer. **Diário Oficial da União**, 2017.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Alzheimer. Brasília, DF: **Ministério da Saúde**, 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/a/alzheimer>. Acesso em: 15 jul. 2024.
- NASCIMENTO, A. B. et al. Benzofenona Prenilada como candidata no tratamento do mal de Alzheimer: uma abordagem in silico: Prenylated Benzophenone as a candidate in the treatment of Alzheimer's disease: an in silico approach. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 12, p. 77699-77707, 2022.
- QUEIROZ, M. K. G. et al. Aplicação dos métodos MD/MFCC na caracterização da interação entre inibidores e enzimas no contexto terapêutico da doença de Alzheimer, **Universidade Federal de Campina Grande**, 2023.
- RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, maio 1999.
- REIS, J. H. O. et al. Caracterização química e biológica de extratos de própolis vermelha do nordeste do Brasil obtidos por diferentes métodos de extração, **Universidade Federal da Bahia**, 2021.
- RHEE, I. K. et al. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **Journal of Chromatography A**, v. 915, n. 1-2, p. 217-223, abr. 2001. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967301006240>. Acesso em: 21 jul. 2024.
- SALGUEIRO, F. B.; CASTRO, R. N. Comparação entre a composição química e capacidade antioxidante de diferentes extratos de própolis verde. **Química Nova**, v. 39, p. 1192-1199, 2016.
- SANT'ANA, N. J. et al. Terapia anti-amiloide: uma nova estratégia para tratamento da doença de Alzheimer. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, v. 16, n. 2, p. 127-131, 2018.
- SANTOS, T. C. D. et al. Naturally Occurring Acetylcholinesterase Inhibitors and Their Potential Use for Alzheimer's Disease Therapy. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, 18 out. 2018. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2018.01192/full>. Acesso em: 21 jul. 2024.
- TREVISAN, M. T. S. et al. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 301-304, maio 2003. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422003000300002&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt. Acesso em: 21 jul. 2024.
- VIDAL, M. F. Potencial da produção de própolis no Nordeste. **Banco do Nordeste do Brasil**, ano 6, n. 153, jan. 2021. Disponível em: https://bnb.gov.br/s482-dspace/bitstream/123456789/728/1/2021_CDS_153.pdf. Acesso em: 21 jul. 2024.