

Extração e atividade antioxidante de própolis: uma revisão bibliográfica

Extraction and antioxidant activity of propolis: a literature review

RESUMO

Tânia Tasca Magalhães Mendoza
tania.2018@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Toledo, Paraná, Brasil

Dra. Tatiana Shioji Tiuman
tatianatiuman@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Toledo, Paraná, Brasil

Própolis é uma mistura de substâncias que as abelhas coletam e depositam em suas colmeias e geralmente apresentam atividade antioxidante. Este trabalho teve como objetivo identificar a importância da otimização do processo de extração de própolis e os métodos de avaliar a atividade antioxidante, que podem ser utilizados para acompanhar a extração de substâncias ativas. Para isso, foi realizado um levantamento bibliográfico a partir de livros e trabalhos científicos. Com o estudo, verificou-se que para um maior rendimento dos compostos ativos na própolis é indicado utilizar solventes orgânicos e/ou água e o planejamento experimental pode ser uma alternativa para auxiliar no processo de extração. Além disso, observou-se que para determinar a atividade antioxidante *in vitro* em substâncias biologicamente ativas existem várias técnicas como DPPH, ABTS, FRAP, determinação de compostos fenólicos totais e flavonoides. Desta forma, conclui-se que a otimização do processo de extração de própolis é importante para se obter compostos fenólicos, que estão intimamente relacionados com a atividade antioxidante.

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



PALAVRAS-CHAVE: Extratos naturais. Solventes orgânicos. Compostos fenólicos.

ABSTRACT

Propolis is a mixture of substances that bees collect and deposit in their hives and generally have antioxidant activity. This work aimed to identify the importance of optimizing the propolis extraction process and the methods of evaluating the antioxidant activity, which can be used to accompany the extraction of active substances. For this, a bibliographic survey was carried out from books and scientific works. With the study, it was found that for a higher yield of the active compounds in propolis, it is recommended to use organic solvents and / or water and experimental planning can be an alternative to assist in the extraction process. In addition, it was observed that to determine the antioxidant activity *in vitro* in biologically active substances there are several techniques such as DPPH, ABTS, FRAP, determination of total phenolic compounds and flavonoids. Thus, it is concluded that the optimization of the propolis extraction process is important to obtain phenolic compounds, which are closely related to the antioxidant activity.

KEYWORDS: Natural extracts. Organic solvents. Phenolic compounds.



INTRODUÇÃO

Própolis é uma mistura de substâncias que as abelhas coletam e depositam em suas colmeias para sua vedação. Sua composição “[...] contém 50 - 60% de resinas e bálsamos, 30 - 40% de ceras, 5 - 10% de óleos essenciais, 5% de grão de pólen, além de microelementos como alumínio, cálcio, estrôncio, ferro, cobre, manganês e pequenas quantidades de vitaminas B1, B2, B6, C e E” (LUSTOSA *et al.*, 2008, p. 447). Dentre as substâncias de sua composição estão os flavonoides que são indicados por ter ações anti-inflamatória, antimicrobiana e antifúngica (LONGHINI *et al.*, 2007).

Utiliza-se a própolis na forma de extrato, principalmente para a medicina, indústria de alimentos e cosméticos. Vários solventes extratores podem ser utilizados para a extração da própolis e a escolha do solvente depende da finalidade de uso e dos componentes que se deseja extrair. Isso porque a própolis é composta por uma complexa mistura de substâncias com polaridades diferentes. Então um único solvente não irá extrair todos os componentes. São vários os métodos que podem ser utilizados para extrair os componentes bioativos da própolis, entre eles: maceração, extração Soxhlet, extração ultrassônica e por micro-ondas (HOJO, 2017).

Antioxidantes são aquelas substâncias que, quando em baixas concentrações comparadas a um substrato oxidável, podem atrasar ou inibir a oxidação de forma eficaz do substrato (TIVERON, 2010). A oxidação ocorre quando uma substância química perde um ou mais elétrons para outra substância e a redução é o processo inverso; esse processo de transferência de elétrons é um processo fundamental para a sobrevivência de células (ALVES, 2010).

Entre as propriedades desejáveis dos antioxidantes estão a eficácia quando entre 0,001 a 0,01% (baixas concentrações), não há efeitos indesejáveis de cor, odor, sabor quando em alimentos, são estáveis quando processados e armazenados e seus produtos de oxidação não são tóxicos (TIVERON, 2010).

Os antioxidantes naturais, compostos fenólicos, estão presentes nos vegetais e são de grande variedade. São compostos orgânicos que não parecem ter importância direta relacionada ao crescimento e desenvolvimento de plantas, mas que protegem a mesma de ataques herbívoros e microrganismos patogênicos; além disso podem atrair polinizadores ou dispersar frutos, proteger da radiação ultravioleta e reduzir o crescimento de plantas competidoras (TIVERON, 2010).

Considerando o assunto exposto, este trabalho teve como objetivo identificar a importância da otimização do processo de extração de própolis e os métodos de avaliar a atividade antioxidante, que podem ser utilizados para acompanhar a extração de substâncias ativas.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho utilizou como metodologia uma revisão de literatura sobre processo de extração de compostos antioxidantes de própolis e métodos que podem ser empregados para avaliar esta atividade. Para isso foram pesquisados dados em artigos, livros, dissertações e teses sendo organizados sobre os temas abordados.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Quando se trabalha com análises antioxidantes, uma das etapas fundamentais é a preparação das amostras. Com amostras sólidas primeiramente são trituradas possibilitando assim uma maior área de contato do solvente com a amostra (BOROSKI *et al.*, 2015). Importante observar durante o processo de extração qual a natureza do solvente, se o solvente consegue penetrar nas células, se as substâncias que são extraíveis se dissolvem, se há difusão da solução para fora da célula, a busca do equilíbrio da saturação do solvente, para que assim haja a maior eficiência. Importante observar também a temperatura, pH, tempo necessário para extração, presença de agentes como metal ou luz e se há interação de outras moléculas com as espécies que são antioxidantes (BOROSKI *et al.*, 2015).

No caso da própolis o solvente a ser utilizado depende da substância que se deseja extrair. Observa-se a presença de substâncias que são solúveis em óleo, água e aquelas que são solúveis tanto em óleo como em água. No caso da extração da própolis para a área de alimentos, medicinal ou da cosmética o solvente mais utilizado é o etanol (MARIANO, 2014)

Quando se trata de extração convencional a técnica mais empregada utiliza um solvente orgânico e/ou água para obter extratos com alto teor de compostos fenólicos. A polaridade do solvente empregado influencia diretamente na solubilidade dos compostos. Água, metanol, etanol e acetona são os solventes que mais se utiliza (SANTOS, 2013). Os compostos fenólicos sem moléculas de açúcar são solúveis em álcoois. Utiliza-se acetona, solvente menos polar, para obter-se componentes com baixa polaridade e os solventes mais polares são extraídos utilizando-se água. Quando se combina solventes com diferentes polaridades acaba-se tendo um aumento da eficiência do processo de extração (SANTOS, 2013).

Quando se utiliza o planejamento fatorial conjuntamente a análise das superfícies das respostas é possível se fundamentar na estatística para que as informações sejam mais confiáveis. Este método consiste na avaliação de diferentes entradas que afetam as respostas fornecendo informações que auxiliam na melhoria das performances de produtos e processos. Dentre suas vantagens estão a redução de repetições, analisar simultaneamente os fatores, otimizar mais de uma resposta ao mesmo tempo, verificação e cálculo do erro experimental e depende da competência do profissional e não dos seus conhecimentos em estatística (OLIVEIRA; ANDOLFATTO, 2016).

Existem diferentes técnicas para se determinar a atividade antioxidantes *in vitro* de substâncias biologicamente ativas. Em função dos diferentes tipos de radicais livres e suas formas de atuação, não há um método simples e universal para se quantificar a atividade antioxidante. Por isso os resultados precisam ser interpretados com base no método que foi utilizado (OLIVEIRA; ANDOLFATTO, 2016).

A técnica da ABTS (ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzoatizolina-6-sulfônico) captura um cátion radical sendo utilizada para medir a capacidade antioxidante de matrizes hidrofílicas e lipofílicas. É muito utilizada para análise de vegetais, frutas, plantas medicinais etc. Mede-se a atividade antioxidante utilizando a capacidade de estabilização do cátion radicalar ABTS que retorna a ABTS neutro; com isso há

a descoloração da solução e a absorbância diminui para 734 nm (BOROSKI *et al.*, 2015).

Com base a literatura pesquisada para se preparar as soluções para a técnica ABTS deve-se observar os passos: a) Preparo da solução de metanol a 50%; b) Preparo da solução de acetona a 70%; c) Preparo da solução estoque ABTS 7mM; d) Preparo da solução de persulfato de potássio 140mM; e) Preparo do radical ABTS + e; f) Preparo da solução padrão de Trolox 2,0 mM (RUFINO, 2007).

Para a determinação da curva padrão é necessário transferir, em ambiente escuro, 30 μ L de cada solução trolox (100 μ M, 500 μ M, 1000 μ M, 1500 μ M e 2000 μ M) para tubos de ensaio. Agregar a solução do radical ABTS e agitar os tubos para homogeneizar. Passados 6 minutos, realizar a leitura em 734 nm utilizando o branco como calibrador do espectrofotômetro. Plotar as concentrações de trolox no eixo X e suas absorbâncias no eixo Y e calcular a equação da reta.

A técnica DPPH é um método que envolve a captura do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) sendo uma determinação *in vitro* do potencial antioxidante de diferentes matrizes alimentares (BOROSKI *et al.*, 2015). É um radical estável e orgânico de nitrogênio comercialmente disponível. Possui em sua estrutura no átomo de nitrogênio um elétron desemparelhado. O radical de cor púrpura é reduzido através dos compostos antioxidantes se tornando amarelo pálido. Para a atividade antioxidante é necessário etanol ou metanol e se observa a diminuição da absorbância a 515-528 nm. A transferência de elétrons depende do solvente e do pH do meio reacional (RODRIGUES, 2009).

Para se preparar a solução de DPPH 0,1192 mmol L⁻¹ utiliza-se um balão volumétrico de 100 mL; acrescenta-se 4,70 mg de DPPH e completa-se o balão com metanol, dissolvendo e homogeneizando. Após transfere-se para um frasco âmbar. Deve ser utilizado no mesmo dia do preparo; importante proteger da luz tanto no preparo como na análise. Para o preparo da amostra a ser analisada utilizar 10 mL de metanol e dissolver 20 mg do extrato (BOROSKI *et al.*, 2015).

A análise é feita da seguinte forma: nas cubetas pipetar a solução do extrato. Em proteção contra a luz, acrescentar a solução metanoica do radical DPPH e esperar 30 minutos para a leitura da absorbância a 517 nm contra o branco. Pode-se determinar o IC₅₀, ou seja, a concentração de antioxidante necessário para inibir 50% do radical DPPH ou IAA (Índice de Atividade Antioxidante). Os resultados de IAA são avaliados de acordo as seguintes informações: < 0,5 – capacidade antioxidante fraca; entre 0,5 e 1 – capacidade antioxidante moderada; entre 1 e 2 – capacidade antioxidante forte; < 2 - capacidade antioxidante muito forte (BOROSKI *et al.*, 2015).

Na técnica de FRAP as reações de oxidação e redução (reação redox) favorecem ações antioxidantes. Existem substâncias que são doadoras de elétrons e que reagem com espécies reativas de oxigênio e nitrogênio convertendo-as em compostos mais estáveis finalizando as reações radicalares. É importante identificar o poder de redução de substâncias antioxidantes pois assim identifica-se atividade antioxidante alta (BOROSKI *et al.*, 2015).

A técnica de FRAP utiliza o complexo férrico 2,4,6-tripiril-1,3,4-triazina ([Fe³⁺(TPTZ)₂]³⁺) para identificar o poder de redução. “Na presença de uma substância antioxidante redutora e em meio ácido (pH 3,6), o complexo ([Fe³⁺(TPTZ)₂]³⁺) recebe um elétron é reduzido à forma ([Fe²⁺(TPTZ)₂]²⁺), que

apresenta intensa coloração azul com máximo de absorção em 593 nm” (BOROSKI *et al.*, 2015, p. 95). Esta técnica tem como limitação ser utilizada somente em meio aquoso (BOROSKI *et al.*, 2015).

Para a avaliação da capacidade sequestrante em própolis, por exemplo, o DPPH é o método mais utilizado. O método ABTS também é um dos mais utilizados para avaliar a atividade antioxidante em função de sua simplicidade e rapidez sendo de fácil aplicação nas rotinas dos laboratórios. O terceiro método mais utilizado é o FRAP (OLIVEIRA, ANDOLFATTO, 2016). Quando se utiliza o radical ABTS, que é solúvel tanto em água quanto em solventes orgânicos, pode-se trabalhar com amostras hidrofílicas e lipofílicas; por isso que com esse método utiliza-se extratos aquosos quanto extratos produzidos com etanol e água. Utilizando o método DPPH há a vantagem de que o resultado não sofre influência da polaridade do substrato (SALGUEIRO, 2016).

O principal reagente utilizado no método de determinação de Fenólicos Totais é o Folin-Ciocalteu, que é um líquido de coloração amarela. Quando na presença de espécies redutoras há a redução dos sais e formação de espécies reduzidas que desenvolvem uma coloração azul, e sua intensidade depende do número de hidroxilas ou grupos que são potencialmente oxidáveis nos compostos fenólicos (BOROSKI *et al.*, 2015).

Para a determinação de Fenólicos Totais as soluções das amostras devem ser preparadas com metanol ou outro solvente, sendo opcional o uso do ultrassom para auxiliar na solubilização, sobre proteção da luz com uma concentração final de 2,5 mg mL⁻¹. A solução padrão de ácido gálico é preparada com de água destilada. Utiliza-se a dissolução da solução para concentração de 0-200 mg L⁻¹ para a curva de calibração. Utiliza-se a solução do extrato da amostra adicionando o reagente Folin-Ciocalteu, a solução saturada de carbonato de sódio e água destilada. Agita-se os tubos, mantem-se em temperatura ambiente protegido da luz por 25 minutos. Passado este tempo, centrifugar por 10 minutos a 3000 rpm. Realizar a leitura a 725 nm (BOROSKI *et al.*, 2015).

No caso da determinação de flavonoides, utiliza-se a reação de complexação com o alumínio. Leva-se em consideração a disponibilidade do grupo ligante nos flavonoides, pH e solvente. O método original utiliza quercetina e sal cloreto de alumínio em meio ácido, que forma um complexo amarelo utilizando a água destilada como solvente. Algumas modificações foram realizadas substituindo a água destilada por álcool como etanol e metanol. Outra modificação é a acidificação do metanol. Algumas metodologias incluem o nitrito de sódio antes do metanol, seguido da adição de hidróxido de sódio. Há o deslocamento do comprimento de onda para 510 nm (BOROSKI *et al.*, 2015).

No método em questão prepara-se os reagentes com a solução de cloreto de alumínio a 5% onde adiciona-se 5 g do sal em 100 mL de metanol, agitando-se magneticamente (BOROSKI *et al.*, 2015).

Para o preparo das amostras adiciona-se metanol, sob a proteção da luz, tendo uma concentração final de metanol de 2,5 mg mL⁻¹. Para a solução do padrão utiliza-se 10 mg de quercetina em um balão volumétrico, sob proteção da luz, com 5mL de metanol, perfazendo 2000 mg L⁻¹. Após são feitas diluições em metanol para obter soluções com concentrações entre 0-100 mg L⁻¹, para a construção da curva de calibração (BOROSKI *et al.*, 2015).

O procedimento é feito da seguinte forma: em 500 µL da solução do extrato adicional 250 µL da solução de cloreto de alumínio a 5% e 4,25 mL de metano. Agitar os tubos e manter em temperatura ambiente por 30 minutos. Após realizar a leitura a 425 nm (BOROSKI *et al.*,2015).

CONCLUSÕES

Com este estudo verificou-se a importância de se otimizar o processo de extração de amostras de própolis e métodos utilizados para avaliar a atividade antioxidante, os quais podem ser utilizados para o acompanhamento da extração de substâncias bioativas. Com isso, compostos fenólicos, que estão intimamente relacionados com a atividade antioxidante poderão ser extraídos com maior eficácia e estes extratos poderão ser aplicados em produtos, desempenhando assim uma melhor atividade.

REFERÊNCIAS

ADELMANN, J. **Própolis**: variabilidade composicional, correlação como a flora e bioatividade antimicrobiana antioxidante. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2005. Disponível em <
<https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/1249/julianaadelmann.pdf;jsessionid=468324B72A538CAB80BFDA741C8AAE0E?sequence=1> > acesso em 13 de julho 2020

ALVES, Clayton Q. *et al.* Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010. Available from <
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422010001000033&lng=en&nrm=iso >. access on 13 february 2020.
<https://doi.org/10.1590/S0100-40422010001000033>.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 113-123, Feb. 2006. Available from <
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422006000100021&lng=en&nrm=iso >. Access on 15 June 2020.
<https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000100021>.

BOROSKI, M.; VISENTAINER, J.V.; COTTICA, S. M.; MORAIS, D. R. **Antioxidantes**: princípios e métodos analíticos. 1ª ed. Curitiba: Appris, 2015.

HOJO, P. A. **Extração de compostos bioativos de própolis verde por alta pressão isostática**. Dissertação de Mestrado. Unicamp, Faculdade de Engenharia de Alimentos, 2017. Disponível em <

<http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/RESPOSIP/332907> > acesso em 13/02/2020.

LONGHINI, R. *et al.* Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. **Rev. bras. farmacogn.**, João Pessoa, v. 17, n. 3, p. 388-395, Sept. 2007. Available from < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2007000300015&lng=en&nrm=iso >. access on 11 May 2020. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2007000300015>.

LUSTOSA, S. R. *et al.* Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Rev. bras. farmacogn.**, João Pessoa, v. 18, n. 3, p. 447-454, Sept. 2008. Available from < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2008000300020&lng=en&nrm=iso >. access on 11 May 2020. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000300020>.

MARIANO, J. S. **Extração e caracterização de dois tipos de própolis:** verde (mineira) e vermelha (alagoana). Dissertação de mestrado – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2014. Disponível em < https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/BUOS-B3PH8V/1/disserta_o_mestrado_propolis_verde_e_vermelha.pdf >, acesso em 29/06/2020.

OBARA, T. R. A. **Própolis verde:** otimização da extração de compostos ativos e sua atividade em diferentes modelos experimentais. 2017. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2017. DOI:10.11606/T.11.2018.tde-06042018-161559. Acesso em: 2020-07- 20.

OLIVEIRA, S. C.; ANDOLFATTO, S. **Otimização do processo de extração de compostos bioativos da própolis produzida por abelhas geneticamente modificadas.** Trabalho de conclusão de curso de Bacharel em Química, UTFPR, Campus Pato Branco, 2016. Disponível em < http://repositorio.roca.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/6986/1/PB_DAQUI_2016_2_5.pdf >, acesso em 11 de julho de 2020.

PARK, H., BAE, S. H., PARK, Y., CHOI, H. S., &SUH, H. J. (2015). Lipase-mediated Lipid Removal from Propolis Extract and its Antiradical and Antimicrobial Activity. **Journal of the science of food and agriculture**, v.8, p. 1697–1705, 1995. Disponível em < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jsfa.6874> >, acesso em 01/07/2020.

RODRIGUES, E. **Atividade antioxidante *in vitro* e perfil fenólico de cultivares de Mirtillo (*Vaccinium sp.*) produzidas no Brasil.** Dissertação de mestrado – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós Graduação em Ciências dos Alimentos. 2009. Disponível em < <http://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/93298> >, acesso em 17/02/2020.

RUFINO, M. do S. M.;ALVES, R. E.;BRITO, E. S. de; MORAIS, S. M. de; SAMPAIO, C. de G.;PÉREZ-JIMÉNEZ, J.;SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS+. Comunicado Técnico. **Embrapa Agroindústria Tropical**, 2007. Disponível em < <https://www.embrapa.br/agroindustria-tropical/busca-de-publicacoes/-/publicacao/426954/metodologia-cientifica-determinacao-da-atividade-antioxidante-total-em-frutas-pela-captura-do-radical-livre-abts> >, data de acesso 01/07/2020.

SALGUEIRO, F. B. **Caracterização da própolis verde brasileira: substâncias fenólicas, atividade biológica e análise quimiométrica.** 2016. Tese (Doutorado em Química). Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016. Disponível em < <https://tede.ufrj.br/jspui/handle/jspui/1469> > acesso em 11 de fevereiro de 2020.

SANTOS, Wilson Junior dos. **Extração de compostos antioxidantes da folha de mangueira (*Mangifera indica L.*) utilizando CO₂ supercrítico, água e etanol.** 2013.. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, SP. Disponível em: < <http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/266596> >. Acesso em: 11julho 2020.

TIVERON, A. P. **Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil.** 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010. DOI:10.11606/D.11.2010.tde-20102010-101541. Acesso em: 2020-026-13.