

Atividade antioxidante de extratos de própolis em vários solventes

Antioxidant activity of propolis extracts in various solvents

RESUMO

Diego de Assunção Justo
diego.twd@outlook.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil.

Clayton Antunes Martin
claytonmartin@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil.

Juliana Aparecida Mirante da Silva
juliana_mirante@hotmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil.

Marina Brito Cunha
marinacunhambc@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil.

Solange Maria Cottica
smcottica@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil.

A presença de compostos oxidantes em sistemas biológicos afeta várias moléculas, gerando doenças cardiovasculares. Os antioxidantes são moléculas que podem diminuir o estresse oxidativo. Esse trabalho objetivou a avaliação de antioxidantes em extratos de própolis preparados com o acetato de etila, acetona, etanol, isopropanol e suas misturas. Os extratos foram preparados utilizando própolis e o solvente extrator na proporção 1:25 (m/v). O teor de compostos fenólicos foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu e o teor de flavonoides pela complexação com o cloreto de alumínio. A atividade antioxidante foi determinada pelos métodos de ABTS e FRAP. Para a extração com a mistura de acetato de etila:isopropanol 1:1 (v/v) foram obtidos teores elevados de flavonoides (47,6 mg de EQ g⁻¹ de própolis) e teores intermediários de compostos fenólicos (80,9 mg de EAG g⁻¹ de própolis), com esta mistura também apresentando os maiores níveis de atividade antioxidante para os métodos ABTS e FRAP, respectivamente, 778,2 e 1463,6 mg de ET g⁻¹ de própolis.

PALAVRAS-CHAVE: Flavonoides. Compostos fenólicos. Bioatividade.

ABSTRACT

Oxidant compounds in biological systems affects several molecules, causing cardiovascular diseases. Antioxidants are molecules that can decrease oxidative stress. This work aimed to evaluate antioxidants in propolis extracts prepared with ethyl acetate, acetone, ethanol, isopropanol and their mixtures. The extracts were prepared with propolis and the extractor solvent at 1:25 (w/v) ratio. The content of phenolic compounds was determined by the Folin-Ciocalteu method and the content of flavonoids by complexation with aluminum chloride. The antioxidant activity was determined by the ABTS and FRAP methods. For extraction with the mixture of ethyl acetate: isopropanol 1: 1 (v/v) high levels of flavonoids (47.6 mg of QE g⁻¹ propolis) and intermediate levels of phenolic compounds (80.9 mg of GAE g⁻¹ propolis), with this mixture also showing the highest levels of antioxidant activity for the ABTS and FRAP methods, respectively, 778,2 and 1463,6 mg of TE g⁻¹ of propolis.

KEYWORDS: Flavonoids. Phenolic compounds. Bioactivity.

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

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



INTRODUÇÃO

A própolis é uma resina composta por uma mistura de substâncias produzida pelas abelhas, as quais utilizam-se de diversas partes das plantas para a produção da mesma, como por exemplo: brotos, cascas, botões florais e exsudatos resinosos (FISCHER et al., 2008). Deste modo, as abelhas coletam substâncias presentes nas plantas e as modificam por meio de enzimas salivares gerando a formação de novas substâncias bioativas, garantindo assim diversas propriedades à própolis. (FISCHER et al., 2008, MARCUCCI, 1995, MATOS, 2012).

A própolis apresenta uma grande variedade de aplicações, que incluem sua utilização para a produção de alimentos, fármacos e cosméticos. (COSTA et al., 2013). Dentre as principais propriedades da própolis, destaca-se sua grande atividade antioxidante (DE MELO et al., 2014), antibacteriana (BASTOS et al., 2011), antifúngica (LONGHINI et al., 2007), antiviral (FISCHER et al., 2005), cicatrizante (ALMEIDA et al., 2013), e anti-inflamatória (FISCHER et al., 2008).

A atividade antioxidante pode ser definida como sendo a capacidade de uma ou mais substâncias em evitar ou retardar a oxidação de substâncias e células, mediante mecanismos baseados na transferência de elétrons ou hidrogênios (PRASNIEWSKI, 2015, URREA-VICTORIA et al., 2016).

Embora existam vários estudos sobre a própolis em diversas regiões do Brasil, existem poucos estudos sobre o efeito da composição do solvente extrator sobre a composição e atividade antioxidante da própolis. Assim, este trabalho objetivou avaliar o efeito do solvente extrator sobre atividade antioxidante, teor de compostos fenólicos e flavonoides de extratos de própolis.

MATERIAIS E MÉTODOS

As amostras de própolis de *Apis mellifera*, matéria-prima utilizada, foram gentilmente doadas pela empresa Apis Global Prods Alternativos Ltda, sendo classificada como própolis verde, conforme o laudo fornecido pela empresa PROBee. O armazenamento da própolis até a realização das extrações foi em ultrafreezer, a -50 °C.

Os extratos foram obtidos utilizando-se diferentes misturas de solventes extratores na proporção 1:1 (v/v) e 1:1:1 (v/v), sendo elas: etanol/isopropanol (e:i), acetato de etila/isopropanol (ace:i), acetato de etila/etanol/isopropanol (ace:e:i), acetona/etanol (a:e), acetona/isopropanol (a:i) e acetato de etila/acetona (ace:a). Inicialmente, adicionou-se 25 mL de solvente extrator em erlenmeyer contendo 1 g de própolis, a qual foi incubado em *shaker* (THOTH), por 24 horas, a 40 °C e 200 rpm. O extrato foi filtrado e concentrado em evaporador rotativo (MA 120). Por fim, padronizou-se o extrato em balão de 10 mL completando-se o volume com o respectivo solvente extrator. Os solventes foram de grau PA e as extrações foram realizadas em triplicata.

A análise do teor de flavonoides foi realizada conforme método descrito por Boroski et al., (2015). Os extratos foram diluídos a proporção de 1:25 (v/v) para a

realização da análise. Os resultados foram expressos em equivalente de quercetina por grama de própolis (mg EQ g⁻¹ de própolis).

O teor de compostos fenólicos foi determinado conforme Boroski et al., (2015), utilizando extratos diluídos na razão de 1:25 (v/v). Os resultados foram expressos em termos de equivalente de ácido gálico (mg EAG g⁻¹ de própolis).

A atividade antioxidante foi determinada por métodos baseados na captura radicalar e no poder de redução do Fe³⁺ (FRAP - *Ferric Reducing Antioxidant Power*). O método envolvendo o radical 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) foi realizado segundo metodologia descrita por Almeida & Benassi (2011), mas utilizando-se comprimento de onda de 734 nm ao invés de 730 nm. O método FRAP que utiliza o complexo formado entre o 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina e o Fe³⁺, foram realizados conforme descrito por Boroski et al., (2015). Os extratos foram diluídos na proporção de 1:50 (v/v) para a realização das análises e os resultados foram expressos em termos de equivalente de trolox (μmol de ET g⁻¹ de própolis). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e quando observadas diferenças significativas entre as médias, ao teste de Tukey. Em todas as análises foi utilizado o nível de significância de 0,05. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Para a realização das análises foi utilizado o software R version 3.5.1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração de flavonoides variou de 24,60 a 47,60 mg EQ g⁻¹ de própolis (Tabela 1), com os teores dos extratos ace:i, ace:a, a:i e e:i não diferindo significativamente entre si ($p > 0,05$). A extração com a mistura ternária ace:e:i resultou no menor teor de flavonoides, cujo resultado não apresentou diferença significativa com o obtido para a extração a:e. Ao estudar a própolis tipo 12, produzida no estado de Minas Gerais, Castro et al., (2007), obtiveram teores de flavonoides variando de 43,0 a 47,3 mg de EQ g⁻¹ de própolis. A comparação destes resultados com os obtidos no presente estudo indica a presença de teores semelhantes aos obtidos para as extrações ace:i e ace:a.

Tabela 1 – Concentração de flavonoides e compostos fenólicos em própolis

Solvente Extrator	Flavonoides (mg EQ. g ⁻¹ de própolis)	Compostos Fenólicos (mg de EAG g ⁻¹ de própolis)
acetato de etila:isopropanol	47,60 ± 5,80 a ¹	80,94 ± 7,20 b
acetato de etila:acetona	45,11 ± 5,60 a	80,95 ± 5,82 b
acetona:isopropanol	38,81 ± 2,36 ab	82,16 ± 0,39 b
etanol:isopropanol	39,11 ± 2,38 ab	107,99 ± 6,67 a
acetona:etanol	33,39 ± 4,01 bc	101,16 ± 5,71 a
acetato de etila:etanol:isopropanol	24,60 ± 2,41 c	69,40 ± 2,04 b

¹Letras diferentes na mesma coluna correspondem a diferenças significativas ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. Fonte: Autoria própria (2020).

Os teores de compostos fenólicos variaram de 69,40 a 107,99 EAG g⁻¹ de própolis (Tabela 1), sendo que para os extratos e:i e a:e os teores foram significativamente maiores ($p < 0,05$) que para os observados para os demais extratos. No estudo realizado por Castro et al., (2007), foram encontrados teores de compostos fenólicos que variaram de 81,7 a 95,0 mg de EAG g⁻¹ de própolis. Estes resultados quando comparados aos teores obtidos no presente estudo indicam níveis de compostos fenólicos ligeiramente superiores (6,1 a 32,2 %) em relação as extrações e:i e a:e.

A atividade antioxidante pelo método FRAP variou de 576,74 a 778,23 μmol de ET g⁻¹ de própolis (Tabela 2), com os maiores teores sendo observados para os extratos ace:i, ace:e:i, a:i e a:e, cujos teores não diferiram significativamente entre si ($p > 0,05$). Por outro lado, a extração com a mistura e:i apresentou o valor de 576,74 μmol de ET g⁻¹ de própolis, que não apresentou diferença significativa entre os valores obtidos para os extratos a:e e a:ace. Em estudos realizados por Andrade et al., (2017) utilizando própolis da região nordeste do Brasil, encontrou-se valores de atividade antioxidante pelo método FRAP de 604,20, 471,51 e 633,18 μmol de ET g⁻¹ de própolis, para a própolis verde, marrom e vermelha, respectivamente. Estes resultados quando comparados aos obtidos no presente estudo indicam uma atividade antioxidante inferior quando comparada aos extratos ace:e:i, a:e, a:i e ace:i.

Os resultados obtidos para a atividade antioxidante pelo método ABTS variaram de 1112,17 a 1463,64 μmol de ET g⁻¹ de própolis (Tabela 2), não havendo diferença significativa entre os teores obtidos ($p > 0,05$). Ao estudar extratos etanólicos de própolis verde produzida no estado de São Paulo, Stadniki & Arenhart, (2017), obtiveram uma atividade antioxidante pelo método ABTS que variou de 273,63 a 690,57 μmol de ET g⁻¹ de própolis, valores muito inferiores aos obtidos neste estudo utilizando diferentes solventes extratores, sendo que todos apresentaram uma maior atividade antioxidante, o que evidencia a importância da utilização de misturas de solventes extratores no preparo da extração.

Tabela 2 – Resultado da análise de determinação do poder de redução e de atividade antioxidante pelo método ABTS

Solvente Extrator	Atividade Antioxidante (μmol de ET g ⁻¹ de própolis)	
	FRAP	ABTS
acetato de etila:isopropanol	778,23 $\pm$ 45,09 a ¹	1463,64 $\pm$ 171,17 a
acetato de etila:acetona	647,47 $\pm$ 46,53 bc	1150,61 $\pm$ 118,87 a
acetona:isopropanol	712,93 $\pm$ 29,13 ab	1179,88 $\pm$ 166,60 a
etanol:isopropanol	576,74 $\pm$ 8,83 c	1112,17 $\pm$ 36,41 a
acetona:etanol	673,47 $\pm$ 75,06 abc	1169,21 $\pm$ 344,19 a
acetato de etila:etanol:isopropanol	761,46 $\pm$ 42,15 ab	1198,13 $\pm$ 236,33 a

¹Letras diferentes na mesma coluna correspondem a diferenças significativas ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. Fonte: Autoria própria (2020)

CONCLUSÃO

A extração com a mistura ternária ace:e:i resultou em baixos teores de flavonoides e compostos fenólicos, não sendo recomendado utilizá-la para o preparo de extratos com a própolis estudada. Para a extração com os solventes ace:i foram obtidos teores elevados de flavonoides e teores intermediários de compostos fenólicos. Com a mistura extratora ace:i também foram obtidos elevados níveis de atividade antioxidante pelos métodos FRAP e ABTS. Considerando que é importante utilizar como extrator um solvente ou uma mistura de solventes que resultem simultaneamente nos maiores níveis de flavonoides, compostos fenólicos e atividade antioxidante (FRAP e ABTS), o emprego da mistura ace:i foi mais adequado para o preparo de extratos para o tipo de própolis estudado.

AGRADECIMENTOS

A Fundação Araucária pela concessão da bolsa de iniciação científica.

A UTFPR pelo suporte financeiro para a aquisição de insumos para o desenvolvimento do projeto.

Ao Laboratório Multiusuário Central Analítica (LABCA), da UTFPR, Câmpus Toledo pela disponibilização de equipamentos para a realização das análises.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M. B.; BENASSI, M. T. **Atividade antioxidante e estimativa do teor de melanoidinas em cafés torrados comerciais**. Ciências Agrárias, Londrina, v. 32, suplemento 1, p. 1893-1900, 2011. Disponível em:

https://www.researchgate.net/profile/Marta_Benassi/publication/314440736_Atividade_antioxidante_e_estimativa_do_teor_de_melanoidinas_em_cafes_torrados_comerciais/links/59a416f14585157031170002/Atividade-antioxidante-e-estimativa-do-teor-de-melanoidinas-em-cafes-torrados-comerciais.pdf. Acesso em: 03 set. 2020.

ANDRADE, J. K. S.; DENADAI, M.; OLIVEIRA, C. S.; NUNES, M. L.; NARAIN, N. **Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region**. Published by Elsevier Ltd, Food Research International, 2017. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28941675/>. Acesso em: 03 set. 2020.

BASTOS, E.M.A.F.; GALBIATI, C.; LOUREIRO, E.M.; SCOARIS, D.O. **Indicadores físico-químicos e atividade antibacteriana de própolis marrom frente à *Escherichia coli***. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. vol.63 no.5 Belo Horizonte Oct. 2011. Disponível em:

https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352011000500032. Acesso em: 16 jul. 2020.

BOROSKI, M.; VISENTAINER, J. V.; COTTICA, S. M.; MORAIS, D. R. **Antioxidantes. Princípios e Métodos Analíticos**. Editora: Appris (27 de outubro de 2015).

CASTRO, M. L.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; ALENCAR, S. V.; IKEGAKI, M.; DUARTE, S.; KOO, H. **Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica**. Química Nova, volume 30, no.7, São Paulo, 2007. Disponível em:

https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422007000700003&script=sci_arttext. Acesso em: 4 ago. 2020.

COSTA, A. S.; MACHADO, B. A. S.; UMSZA-GUEZ, M. A.; CIRQUEIRA, M. G.; NUNES, S. B.; PADILHA, F. F. **Levantamento dos estudos com a própolis produzida no estado da Bahia**. Sitientibus série Ciências Biológicas 13: 10.13102/scb324. 2013.

DE-MELO, A. A. M.; MATSUDA, A. H.; FREITAS, A. S.; BARTH, O. M.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. **Capacidade antioxidante da própolis**. Pesqui. Agropecu. Trop. vol.44 no.3 Goiânia July/Sept. 2014. Disponível em:

https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1983-40632014000300004. Acesso em: 17 jul. 2020.

FISCHER, G.; DUMMER, L.A.; VIDOR, T.; PAULINO, N.; PAULINO, A.S. **Avaliação da ação antiviral de uma solução de própolis sobre o Herpesvírus Bovino e o Vírus da Diarréia Viral dos Bovinos**. In: ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 7., 2005, Pelotas, RS. Anais. Pelotas, 2005. Disponível em:

https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X20170007000667&lng=pt&nrm=iso. Acesso em: 17 jul. 2020.

FISCHER, G.; HUBNER, S.O.; VARGAS, G.D.; VIDOR, T. **Imunomodulação pela própolis**. Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.75, n.2, p.247-253, abr./jun., 2008. Disponível em:

http://www.apiariosilvestre.com.br/images/documentos/3.Imunomodulacaopela_propolis.pdf. Acesso em: 15 jul. 2020.

LONGHINI, R.; RAKSA, S. M.; OLIVEIRA, A. C. P.; SVIDZINSKI, T. I. E.; FRANCO, S. L. **Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica**. Rev. bras. farmacogn. vol.17 no.3 João Pessoa July/Sept. 2007. Disponível em:

https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-695X20070003000015&script=sci_abstract&tlng=pt. Acesso em: 17 jul. 2020.

MARCUCCI, M. C. **Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity.** Apidologie, Campinas, Elsevier, 1995, p. 83-99. Disponível em: https://www.apidologie.org/articles/apido/abs/1995/02/Apidologie_0044-8435_1995_26_2_ART0002/Apidologie_0044-8435_1995_26_2_ART0002.html. Acesso em: 17 jul. 2020.

MATOS, V. R. **Caracterização química e palinológica da própolis produzida no litoral norte do estado de Bahia.** Dissertação de Mestrado em Botânica, Feira de Santana-BA, 2012.

PRASNIEWSKI, A. **Desenvolvimento de modelos de calibração multivariada para determinação de compostos fenólicos e atividade antioxidante em extrato etanólico de própolis utilizando a técnica FT-NIR.** Trabalho de Conclusão de Curso, UTFPR, Pato Branco, 2015.

STADNIKI, J.; ARENHART, D. K. **Determinação da atividade antioxidante de extrato e frações de própolis verde pelos métodos DPPH e ABTS.** IV Congresso de Ciência e Tecnologia da UTFPR-DV. Dois Vizinhos, PR, 2017. Acesso em: 15 ago. 2020.

URREA-VICTORIA, V.; PIRES, J.; TORRES, P. B.; SANTOS, D. Y. A. C.; CHOW, F. **Ensaio antioxidante em microplaca do poder de redução do ferro (FRAP) para extratos de algas.** Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, ISBN 978-85-85658-62-5, Setembro 2016. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/324452594_Ensaio_antioxidante_em_microplaca_do_poder_de_reducao_do_ferro_FRAP_para_extratos_de_algas. Acesso em: 17 jul. 2020.