

Otimização de solventes alternativos para extração dos compostos bioativos de própolis

Optimization of alternative solvents for the extraction of bioactive compounds from propolis

Jhazmin Vivian Jara Garvizu¹, Ana Carolina Okagawa Dias², Solange Maria Cottica³,
Gabrielle Caroline Peiter⁴, Lorena Clara Cruz⁵, Ricardo Fiori Zara⁶

RESUMO

A própolis é uma resina produzida por abelhas, é valorizada por suas propriedades biológicas, incluindo ação antimicrobiana e antioxidante e sua composição química varia conforme a flora regional. Neste estudo, foi investigada a influência do tipo de solvente e da origem botânica na atividade antioxidante de extratos de própolis verde de Caxambú/MG e marrom de Cascavel/PR. Foram conduzidas comparações entre os extratos otimizados utilizando sorbitol, glicerina e água em contraposição aos extratos tradicionais de etanol. Essa avaliação foi realizada por meio de testes de caracterização, incluindo análises de DPPH, quantificação de compostos fenólicos totais e flavonoides, além da utilização de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os resultados obtidos indicaram que, apesar de o sorbitol ser considerado um solvente mais sustentável, ainda apresentou desempenho inferior em relação ao etanol no que diz respeito à eficácia na extração de compostos antioxidantes. Adicionalmente, vale destacar que a própolis verde demonstrou superioridade em termos de compostos bioativos quando comparada à própolis de Cascavel.

PALAVRAS-CHAVE: Antioxidante; CLAE; Etanol; Extrato; Sorbitol.

ABSTRACT

Propolis is a resin produced by bees, valued for its biological properties, including antimicrobial and antioxidant actions, and its chemical composition varies according to the regional flora. In this study, the influence of solvent type and botanical origin on the antioxidant activity of green propolis extracts from Caxambú/MG and brown propolis extracts from Cascavel/PR was investigated. Comparisons were made between optimized extracts using sorbitol, glycerin, and water, in contrast to traditional ethanol extracts. This assessment was conducted through characterization tests, including DPPH analysis, quantification of total phenolic compounds and flavonoids, in addition to the use of high-performance liquid chromatography (HPLC). The results obtained indicated that, although sorbitol is considered a more sustainable solvent, it still exhibited inferior performance compared to ethanol in terms of the extraction efficiency of antioxidant compounds. Additionally, it is worth noting that green propolis showed superiority in terms of bioactive compounds when compared to Cascavel propolis.

KEYWORDS: Antioxidant; Ethanol; Extract; HPLC; Sorbitol.

¹ Bolsista do CNPq. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil. E-mail: jhazminvjgarvizu@gmail.com ID Lattes:5762360990243459

² Voluntária. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil. E-mail: carolokagawa@gmail.com ID Lattes: 6406071528327902.

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

⁴ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil. E-mail: gabriellepeiter@utfpr.edu.br. ID Lattes: 7573248179492930.

⁵ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil. E-mail: lorenaclara.lc@gmail.com ID Lattes: 0300954335877707

⁶ Docente do curso de Tecnologia em Processos Químicos, COPEQ. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil. E-mail: ricardozara@utfpr.edu.br. ID Lattes:1508164359774914.



INTRODUÇÃO

A própolis é uma substância resinosa produzida pelas abelhas melíferas ao misturarem suas ceras com resinas de plantas. Ela possui diversas atividades biológicas, incluindo propriedades antimicrobianas, antioxidantes, anti-inflamatórias e imunomodulatórias (PARK, et al. 2002). A composição química da própolis varia de acordo com a flora da região onde as abelhas estão presentes, tornando-a complexa e diversificada (LEE, et al. 2014). Sendo assim, é importante considerar a localização geográfica da coleta e o estágio de desenvolvimento da planta hospedeira. Uma das variedades mais conhecidas da própolis é a própolis verde, já que, possui um perfil fitoquímico distinto com uma alta concentração de fenólicos, o que lhe confere diversas propriedades biológicas (RODRIGUES, et al. 2020).

No âmbito da produção industrial de etanol, é importante ressaltar a ocorrência de impactos ambientais significativos, tais como a emissão de poluentes atmosféricos provenientes da queima de bagaço e a disposição inadequada de águas residuais (PUGLIESE, et al. 2017).

Desse modo, com o intuito de encontrar um solvente alternativo e sustentável para extrair compostos bioativos da própolis considerou-se o uso de *Natural Deep Eutectic Solvents* (NADES), que são solventes naturais com fácil preparação, baixo custo e personalização para melhorar a extração de ativos desejados (TZANI, et al. 2022). Estudos indicam que os NADES à base de sorbitol são especialmente promissores na extração de compostos biologicamente ativos (BOYKO, et al. 2020).

O sorbitol é um álcool de açúcar encontrado naturalmente em frutas e bagas. Este composto é reconhecido como um adoçante nutritivo em comparação com a sacarose e encontra diversas aplicações na indústria (GODSWILL, et al. 2017). Apesar destas aplicações para o sorbitol, ainda não existem estudos em relação à sua eficácia na extração dos principais compostos bioativos da própolis quando utilizado em conjunto com agentes oleosos, como a glicerina.

Sendo assim, este estudo visou avaliar extratos de própolis usando solventes alternativos e investigar a composição qualitativa e quantitativa de compostos fenólicos extraídos. Além disso, foi realizada uma comparação com os resultados obtidos a partir de extratos etanólicos de própolis verde. Para atingir esse propósito, foram utilizadas técnicas de espectrofotometria UV-VIS e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

MATERIAIS E MÉTODOS

Para o estudo, foi utilizada uma amostra de própolis verde, cedida pela empresa Apiário RIODEMEL Ltda, proveniente majoritariamente do alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*), coletada na região de Caxambú/MG, Brasil nos meses de outubro, novembro e dezembro de 2022, já a própolis marrom foi coletada em Cascavel/PR e doada pela associação de apicultores de Toledo/PR.

As amostras na sua forma *in natura* foram armazenadas em sacos plásticos e em geladeira a 5°C até o momento de cada uma ser homogeneizada por separado, com o auxílio de um liquidificador, este procedimento foi realizado previamente à caracterização.

Para a obtenção dos extratos etanólicos, foram preparadas soluções de etanol 70%, posteriormente adicionou-se 5 g de própolis de cada variedade em erlenmeyers separados contendo 50 mL da solução. Já, para o preparo do extrato alternativo também foi pesado 5 g de própolis e 50 mL seguindo as medições de cada composto apresentadas na Tabela 1. Essas 14 combinações randômicas foram obtidas através do Software Design-Expert 13.0.



Após a adição do própolis, os frascos erlenmeyer foram selados com filme parafinado e envolvidos em papel alumínio para preservar a integridade das amostras. Após a preparação, as amostras foram inseridas em um agitador, protegido da luz, e agitadas a 100 rpm por 24 horas. Após o período de extração, as amostras foram filtradas a vácuo usando papel filtro faixa preta com gramatura de 85 g m⁻² (Moderna) e armazenadas em frascos âmbar.

Tabela 1-Planejamento experimental de variáveis não codificadas

Ordem	Teste	H ₂ O %	Glicerina %	Sorbitol 70 %
7	1	66,66	16,66	16,66
11	2	100,00	0,00	0,00
8	3	16,66	66,66	16,66
6	4	0,00	50,00	50,00
2	5	0,00	100,00	0,00
3	6	0,00	0,00	100,00
10	7	33,33	33,33	33,33
12	8	0,00	100,00	0,00
13	9	0,00	0,00	100,00
1	10	100,00	0,00	0,00
5	11	50,00	0,00	50,00
14	12	50,00	50,00	0,00
4	13	50,00	50,00	0,00
9	14	16,66	16,66	16,66

Fonte: Autores (2023)

Para a preparação das amostras com própolis, foi empregado 1 mL do extrato preparado previamente e, em seguida, realizou-se a filtração utilizando uma membrana de nylon hidrofílica com uma abertura de poro de 0,22 µm (Merck®). Posteriormente, o volume foi ajustado para 25 mL com metanol até atingir o volume final.

TESTES DE CARACTERIZAÇÃO.

Seguindo a metodologia recomendada por BOROSKI (2015), foram realizados testes para a avaliação da atividade antioxidante DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) utilizando Trolox 200 µmol L⁻¹ como padrão. A leitura foi feita no espectrofotômetro T80+ UV-Vis Spectrometer da marca PG Instruments Ltd, utilizando a absorbância de 517 nm. Destaca-se que para todos os testes de caracterização apresentados o branco utilizado para as leituras foi o metanol.

A quantificação dos compostos fenólicos foi realizada por meio do método de Folin-Ciocalteu descrito por BOROSKI (2015). Posteriormente, as amostras foram lidas no espectrofotômetro UV-Vis, com absorção máxima a 725 nm. Assim, a curva de calibração foi elaborada utilizando ácido gálico (EAG) na concentração de 200 mg L⁻¹.

O método empregado para determinar o teor de flavonoides foi baseado no protocolo descrito por Boroski (2015), mantendo a absorbância de 425 nm. O padrão utilizado para a construção da curva de calibração foi a quercetina.

ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Para a identificação e quantificação dos compostos fenólicos e flavonoides utilizou-se um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplado com detector de UV-Vis. O extrato foi seco em liofilizador (Liotop-L101) e após foi diluído na proporção de 1:1 em metanol. As condições cromatográficas utilizadas foram: coluna de fase reversa C18 (ACE 250 x 4,6 mm) com tamanho de partícula de 5 µm; temperatura do forno 40 °C; comprimento de onda de detecção de 280; fluxo de 1,0 mL min⁻¹; volume de injeção 20 µL; fase móvel: água ultrapura acidificada com ácido acético 0,5% (pH 3,03); metanol acidificado com ácido acético 0,5% (pH 3,52), com eluição por gradiente. A proporção inicial foi de água: metanol (85:15), com aumento gradual de metanol até 30 minutos (40:60), essa proporção foi aumentada até 35 minutos (5:95), e manteve-se essa proporção até 40 minutos.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A fim de determinar a atividade antioxidante, compostos fenólicos e flavonoides foram construídas a curvas de calibração, e através dessas curvas encontrou-se as equações das retas, as quais podem ser observadas na Tabela 2.

Tabela 2-Equações da reta obtidas através das curvas de calibração do DPPH, Fenólico e Flavonóides.

Teste	Equação da reta	R ²
DPPH	$y = -0,0004x + 0,9654$	0,9785
Fenólicos	$y = 0,0063x - 0,0674$	0,9470
Flavonóides	$y = 0,0072x - 0,0263$	0,9998

Fonte: Autores (2023).

Em seguida, utilizando os resultados de DPPH, fenólicos totais e flavonoides gerados a partir das combinações apresentadas na Tabela 1, foram calculados os valores demonstrados na Tabela 3.

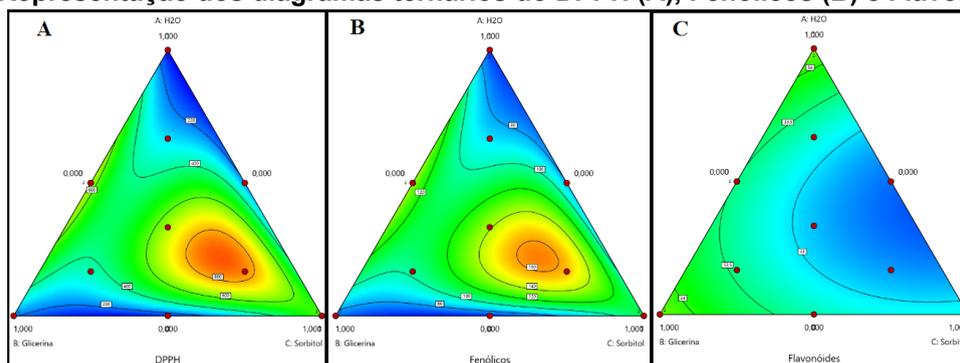
Tabela 3-Resultados dos testes de DPPH, flavonóide e fenólicos para diferentes combinações de solventes

Teste	DPPH (µmolE _T g ⁻¹)	Flavonóides (µmolE _Q g ⁻¹)	Fenólicos (µmolE _{AG} g ⁻¹)
1	2,38	0,83	1,52
2	2,51	0,83	1,79
3	4,44	0,83	1,89
4	5,01	0,83	1,87
5	4,88	0,86	2,06
6	11,76	0,82	2,60
7	23,69	0,83	4,46
8	6,38	0,86	1,74
9	19,01	0,84	3,14
10	3,13	0,89	1,62
11	7,01	0,81	2,24
12	16,82	0,83	3,45
13	18,69	0,84	3,68
14	16,07	0,82	3,22

Fonte: Autores (2023).

Assim, esses dados foram empregados para determinar o ponto ótimo de extração do solvente alternativo. Esse processo foi conduzido utilizando o software "State-Ease DesignExpert", versão trial 13.0. Ao submeter os resultados da Tabela 3 ao software, foram gerados diagramas ternários (Figura 1). Esses diagramas sugerem uma combinação ideal dos parâmetros apresentados, com o objetivo de otimizar a extração dos compostos bioativos pelo solvente alternativo.

Figura 1-Representação dos diagramas ternários do DPPH (A), Fenólicos (B) e Flavonóides (C).



Fonte: Autores (2023).

Nesse sentido, a composição ideal foi estabelecida em 60% de sorbitol, 25% de água e 15% de glicerina. Após essa determinação, conduziu-se os testes de DPPH e fenólicos utilizando essas concentrações tanto para a própolis verde quanto para a própolis marrom, conforme indicado na Tabela 4. Esses resultados foram posteriormente comparados com os obtidos a partir do extrato de própolis etanólico, que é um produto comercializado. Ressalta-se que não foram realizados testes para flavonoides, isso se deve ao fato de que, mesmo quando houve mudanças na composição do solvente, os dados na Tabela 3 não apresentaram variações substanciais, sendo todos baixos em todas as condições testadas.

Tabela 4-Resultados dos testes de DPPH e Fenólicos para os extratos de própolis etanólicos e otimizados.

Própolis	DPPH ($\mu\text{mol ET g}^{-1}$)	Fenólicos ($\mu\text{mol EAG g}^{-1}$)
Verde etanol 70%	39,40	3,39
Verde Otimizado	6,44	2,31
Marrom etanol 70%	9,11	2,25
Marrom Otimizado	0,25	1,09

Fonte: Autores (2023).

O extrato etanólico demonstra um potencial antioxidante mais elevado em comparação com o extrato otimizado. Na aplicação do teste T de Student, o qual revelou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre essas duas variedades de extrato em relação às suas propriedades antioxidantes e ao teor de compostos fenólicos. Ademais, observaram-se discrepâncias entre as amostras de própolis estudadas mesmo quando submetidas ao mesmo processo de extração. Para a os resultados encontrados com a cromatografia líquida de alta eficiência revelou a presença de diversos compostos, no entanto, apenas 8 compostos secundários puderam ser identificados. Entre estes



compostos, destacam-se o ácido ferúlico ($32,66 \text{ mg mL}^{-1}$) no extrato etanólico da própolis marrom e o ácido *p*-cumárico ($19,73 \text{ mg mL}^{-1}$) no extrato etanólico da própolis verde.

CONCLUSÃO

Conclui-se que tanto o procedimento de preparação quanto a origem da matéria-prima desempenham um papel fundamental na extração dos compostos preciosos do extrato. Assim, mesmo que o sorbitol seja reconhecido como um solvente sustentável, este estudo destaca suas restrições na extração efetiva dos compostos bioativos da própolis, reforçando a preferência contínua pelo etanol como o principal solvente na extração de compostos antioxidantes. A própolis verde de Caxambú/MG mostra-se superior em antioxidantes quando comparada com a própolis do Cascavel/PR.

REFERÊNCIAS

- BOROSKI, M.; VISENTAINER, J.V.; COTTICA, S. M.; MORAIS, D. R. **Antioxidantes: Princípios e métodos analíticos**. 1ª ed. Curitiba: Appris, 2015.
- BOYKO, N. et al. Studying and Modeling of the Extraction Properties of the Natural Deep Eutectic Solvent and Sorbitol-Based Solvents in Regard to Biologically Active Substances from Glycyrrhizae Roots. **Molecules**, v. 25, n. 7, p. 1482, jan. 2020.
- GODSWILL, A. C. Sugar alcohols: chemistry, production, health concerns and nutritional importance of mannitol, sorbitol, xylitol, and erythritol. *Int. J. Adv. Acad. Res*, v. 3, n. 2, p. 31-66, 2017.
- LEE, I.-K., Han, M.-S., Kim, D.-W., & Yun, B.-S. (2014). Phenylpropanoid acid esters from Korean propolis and their antioxidant activities. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 24(15), 3503–3505. doi:10.1016/j.bmcl.2014.05.065.
- Microsoft Excel. Microsoft Office Professional Plus. 2016
- PARK, Y. K. et al.. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**, v. 32, n. 6, p. 997–1003, dez. 2002.
- PUGLIESE, L. et al. Impactos ambientais na produção do etanol brasileiro: Uma breve discussão do campo à indústria. **Revista Brasileira Multidisciplinar ReBraM**. v. 20, n.1, 21 jul. 2017.
- RODRIGUES, M. et al. Screening Fitoquímico de amostras de própolis do Nordeste do Brasil por HPLC: Variedades verde, negra e vermelha. **Research, Society and Development**. v. 9. e7799108936. 10.33448/rsd-v9i10.8936.
- Stat Ease- Design Expert versão trial 13.0. Tulsa, USA. 2023.
- TZANI, A. et al. Green Extraction of Greek Propolis Using Natural Deep Eutectic Solvents (NADES) and Incorporation of the NADES-Extracts in Cosmetic Formulation. **Sustainable Chemistry**, v. 4, n. 1, p. 8–25, mar. 2023.

Agradecimentos

Os autores expressam sua gratidão ao Laboratório Multiusuário – LABCA do Campus Toledo da Universidade Federal do Paraná pelo suporte e a CNPq pelo apoio financeiro fornecido para impulsionar a pesquisa e suporte à permanência dos estudantes.

Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.