

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DIRETORIA DE GRADUAÇÃO E EDUCAÇÃO PROFISSIONAL
COORDENAÇÃO DO CURSO DE TECNOLOGIA EM PROCESSOS QUÍMICOS

RAYANE ALVES RODRIGUES DA ROCHA

**AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE PRÓPOLIS DA REGIÃO
OESTE DO PARANÁ SOB DIFERENTES SOLVENTES EXTRATORES**

TOLEDO, PR
2022

RAYANE ALVES RODRIGUES DA ROCHA

**AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE PRÓPOLIS DA REGIÃO
OESTE DO PARANÁ SOB DIFERENTES SOLVENTES EXTRATORES**

**EVALUATION OF THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PROPOLIS FROM
WESTERN REGION OF PARANÁ UNDER DIFFERENT EXTRACTING
SOLVENTS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos (COPEQ) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, câmpus Toledo, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Processos Químicos.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Solange Maria Cottica

TOLEDO, PR
2022



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

RAYANE ALVES RODRIGUES DA ROCHA

**AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE PRÓPOLIS DA REGIÃO
OESTE DO PARANÁ SOB DIFERENTES SOLVENTES EXTRATORES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do curso de Tecnologia em Processos Químicos da UTFPR, câmpus Toledo, como parte das exigências para obtenção do título de Tecnólogo em Processos Químicos.

Aprovado em 01 de Dezembro de 2022.

Banca examinadora

Prof^a Dr^a Solange Maria Cottica
UTFPR, câmpus Toledo
Orientadora

Prof Dr Ricardo Fiori Zara
UTFPR, câmpus Toledo
Avaliador

Prof^a Dr^a Camila Vargas Neves
UTFPR, câmpus Toledo
Avaliador

OBS: A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso de Tecnologia em Processos Químicos.

Agradecimentos

Aos meus pais e aos meus irmãos por todo esforço investido na minha Educação e por terem acreditado em mim desde o começo. Vocês são a melhor família que eu poderia ter.

Gratidão ao meu melhor amigo Murilo pela amizade incondicional, por estar do meu lado nos meus piores dias e principalmente pela compreensão da minha ausência. Saiba que você foi um dos pilares para que eu chegasse até aqui.

Agradeço ao meu amigo Djonatan por ter me acolhido, por cada momento de descontração, pelos bons conselhos e por me fazer ver o potencial que eu tinha em cada fase que me encontrava. Você é um dos responsáveis por deixar essa caminhada mais serena.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Solange Maria Cottica pelo tempo, paciência ao me ensinar e dedicação. Obrigada pelo empenho, pela confiança depositada e motivação durante o processo.

Agradeço a todos os professores que me acompanharam durante o curso por terem transmitido seus conhecimentos com excelência.

A todos os meus amigos do curso de graduação pelas trocas de ideias e ajuda mútua.

Agradeço ao Laboratório Multiusuário Central Analítica da UTFPR Campus Toledo pelas análises realizadas.

Sou grata a Universidade Tecnológica Federal do Paraná pelo fornecimento do auxílio para a realização deste trabalho e pela bolsa de Iniciação Científica.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram diretamente e indiretamente para a realização deste trabalho.

Resumo

Os produtos naturais vêm sendo bastante explorados, onde pode-se destacar a própolis, material produzido pelas abelhas no qual envolve substâncias resinosas, material gomoso e balsâmico, que possui diversas aplicações na área farmacêutica e alimentícia por conta de seus atributos antimicrobianos, anti-inflamatório e antioxidante. Com base nisso, objetivo deste estudo foi comparar a atividade antioxidante de amostras de própolis obtidas por raspagem e fita extraídas com solventes distintos de municípios da região Oeste do Paraná. Para a extração foram utilizadas as misturas dos solventes etanol/isopropanol (50:50), acetato de etila/acetona (27:73) e acetona/etanol (67:33). Para determinação da atividade antioxidante, foram utilizadas as metodologias de captura radicalar (ABTS e DPPH) e FRAP como método de redução do ferro, enquanto que para compostos fenólicos totais e teor de flavonoides foram determinados por Folin-Ciocalteu e cloreto de alumínio, respectivamente. A partir da análise estatística expressa como média \pm desvio padrão, foi visto que a forma de coleta influencia diretamente na atividade antioxidante da própolis, visto que as própolis com maiores níveis de tais bioatividades foram coletadas através de raspagem. Também foi evidenciado que a polaridade dos solventes também interfere na capacidade antioxidante, tendo em vista que as menores atividades foram com acetato de etila/acetona, solventes com polaridades mais distintas em comparação ao etanol/isopropanol com acetona/etanol. A partir da análise de correlação, pode-se pressupor que a maioria dos compostos fenólicos são flavonoides e que os antioxidantes atuam por transferência de hidrogênio. Os resultados obtidos mostram níveis elevados de atividades antioxidantes das própolis, variando de $41,91 \pm 0,21$ a $1672,53 \pm 15,35 \mu\text{Mol ET g}^{-1}$, evidenciando a influência que o método de coleta e os solventes extratores possuem nas bioatividades da própolis. Com os resultados obtidos, há possibilidade de incentivo à produção e por consequência, agregar maior valor a este produto.

Palavras-chave: produtos apícolas; bioatividades; compostos fenólicos; flavonoides.

Abstract

Natural products have been widely explored, where we can highlight propolis, a material produced by bees that involves resinous substances, gummy and balsamic material, which has several applications in the pharmaceutical and food area because of its antimicrobial, anti-inflammatory and antioxidant attributes. Based on this, the objective of this study was to compare the antioxidant activity of propolis samples obtained by scraping and tape extracted with different solvents from municipalities in the western region of Paraná. The solvent mixtures ethanol/isopropanol (50:50), ethyl acetate/acetone (27:73) and acetone/ethanol (67:33) were used for extraction. For antioxidant activity determination, radical capture methodologies (ABTS and DPPH) and FRAP as iron reduction method were used, while for total phenolic compounds and flavonoid content were determined by Folin-Ciocalteu and aluminum chloride, respectively. From the statistical analysis expressed as mean \pm standard deviation, it was seen that the form of collection directly influences the antioxidant activity of propolis, since propolis with higher levels of such bioactivities were collected by scraping. It was also evident that the polarity of the solvents also interferes in the antioxidant capacity, since the lowest activities were with ethyl acetate/acetone, solvents with more distinct polarities compared to ethanol/isopropanol with acetone/ethanol. From the correlation analysis, it can be assumed that most phenolic compounds are flavonoids and that the antioxidants act by hydrogen transfer. The results obtained show high levels of antioxidant activities of propolis, ranging from 41.91 ± 0.21 to $1672.53 \pm 15.35 \mu\text{Mol ET g}^{-1}$, showing the influence that the method of collection and the extracting solvents have on the bioactivities of propolis. With the results obtained, there is the possibility of encouraging the production and, consequently, adding greater value to this product.

Keywords: bee products; bioactivities; phenolic compounds; flavonoids.

Lista de figuras

Figura 01 – Coleta via raspagem da própolis	17
Figura 02 – Caixilho de própolis com fita.....	17
Figura 03 – Retirada das tiras de própolis	18
Figura 04 – Moléculas de a) quercetina e b) galangina, flavonoides mais comumente encontrados na própolis.....	19
Figura 05 – Ácidos graxos encontrados em própolis	19
Figura 06 – Molécula de a) ácido cafeico e b) estrutura geral do ácido hidroxicinâmico, fenilpropanoides mais comumente encontrados na própolis.....	19
Figura 07 – Estrutura dos antioxidantes sintéticos BHA e BHT, respectivamente.....	20
Figura 08 – Estruturas possíveis do tocoferol, antioxidante natural mais encontrado	21
Figura 09 – Estrutura de um flavonoide	23
Figura 10 – DPPH na estrutural radicalar (1) e não radicalar (2).....	23
Figura 11 – Estabilização do radical ABTS e sua formação pelo persulfato de potássio	24
Figura 12 – Mecanismo de ação do método FRAP	25
Figura 13 – Redução do molibdênio	25
Figura 14 – Localização geográfica das cidades de Cascavel e Marechal Cândido Rondon, municípios da região Oeste do Paraná.....	27

Lista de tabelas

Tabela 1 – Derivados de ácido cinâmico e de ácido benzóico	22
Tabela 2 – Equações da reta das curvas de calibração para as análises de DPPH•, ABTS ⁺ , FRAP, teor de fenólicos totais e flavonoides	32
Tabela 3 – Atividade antioxidante dos extratos feitos a partir das amostras de Cascavel, MCR 1 e MCR 2	32
Tabela 4 – Determinação de fenólicos totais e flavonoides dos extratos feitos a partir das amostras de Cascavel, MCR 1 e MCR 2	33
Tabela 5 – Correlação das análises realizadas e R obtidos.....	38

Lista de gráficos

Gráfico 1 – Comparativo entre os resultados obtidos de cada extrato para a mistura de solvente etanol/isopropanol para as atividades antioxidantes	34
Gráfico 2 – Comparativo entre os resultados obtidos de cada extrato para a mistura de solvente etanol/isopropanol para os fenólicos totais e flavonoides.....	34
Gráfico 3 – Comparativo entre os resultados obtidos de cada extrato para a mistura de solvente acetato de etila/acetona para as atividades antioxidantes	34
Gráfico 4 – Comparativo entre os resultados obtidos de cada extrato para a mistura de solvente acetato de etila/acetona para os fenólicos totais e flavonoides	35
Gráfico 5 – Comparativo entre os resultados obtidos de cada extrato para a mistura de solvente acetona/etanol para as atividades antioxidantes	35
Gráfico 6 – Comparativo entre os resultados obtidos de cada extrato para a mistura de solvente acetona/etanol para os fenólicos totais e flavonoides.....	36

Lista de abreviaturas e siglas

ABTS	Ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfônico
DPPH	Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila
EAG	Equivalente de Ácido Gálico
EQ	Equivalente de Quercetina
ET	Equivalente Trolox
FRAP	Poder Antioxidante de Redução de Ferro
MCR	Marechal Cândido Rondon
nm	Nanômetro
TPTZ	2,4,6-tri (2-piridil)-1,3,5-triazina
UV-Vis	Ultravioleta-Visível

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
2.	OBJETIVOS	14
2.2	OBJETIVO GERAL	14
2.3	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3.	JUSTIFICATIVA	15
4.	REVISÃO DE LITERATURA	16
4.1	PRÓPOLIS	16
4.2	ANTIOXIDANTES	19
4.2.1	Ácidos fenólicos	21
4.2.2	Flavonoides	22
4.3	MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	23
4.3.1	Captura de radicais livres	23
4.3.1.1	DPPH	23
4.3.1.2	ABTS	24
4.3.2	Poder de redução	24
4.3.3	Determinação de fenólicos totais	25
4.3.4	Determinação de flavonoides	25
4.4	SOLVENTES EXTRATORES	26
5.	MATERIAIS E MÉTODOS	27
5.1	AMOSTRAGEM	27
5.2	EXTRAÇÃO DA PRÓPOLIS	27
5.3	METODOLOGIAS PARA ANÁLISE DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	28
5.3.1	Método DPPH	28
5.3.2	Método ABTS	29

5.3.3	Método FRAP.....	29
5.3.4	Determinação de fenólicos totais	30
5.3.5	Determinação de flavonoides	30
5.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA E CORRELAÇÃO	31
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	40
	REFERÊNCIAS.....	41

1. INTRODUÇÃO

O setor de apicultura no Brasil vem se intensificando bastante nesses últimos anos, como mostra a pesquisa feita em 2020 pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), que informa que 51,5 mil toneladas de mel foram produzidas neste ano, resultando em R\$ 621,5 milhões de valor de retorno ao país.

A procura de produtos oriundos da apicultura ficou ainda mais alta durante a pandemia do COVID-19, visto que estes possuem propriedades antioxidantes e antimicrobianas, que permitem o uso do mel como um medicamento natural. Silveira e seus colaboradores (2021) em seus estudos apontaram redução do tempo da permanência hospitalar de pacientes com COVID-19 que ingeriram própolis durante o período de internação.

Assim como o mel, a própolis possui atividades antioxidantes naturais e propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas, anestésicas e cicatrizantes, que são utilizadas desde os tempos mais remotos por egípcios, gregos e romanos (ALDEMANN, 2005). A própolis se enquadra na fronteira entre o medicamento e o alimento, característica essa que atrai tanto a comunidade científica para estudos de tais propriedades, como apicultores devido ao alto valor agregado (MATSUDA, 2006; TRUSHEVA *et al.*, 2006).

No Brasil, há produção de própolis nas regiões Nordeste, Sudeste, Centro-Oeste e Sul, onde se conferem características específicas para cada localização geográfica devido às condições climáticas, de vegetação e genéticas das abelhas. Contudo, não há dados oficiais desta produção (VIDAL, 2021).

Apesar de o solvente mais amplamente utilizado para realizar a extração da própolis ser o etanólico, alguns autores usaram em seus estudos outros solventes, já que a escolha do solvente se dá pela substância em que se deseja extrair. O tipo de solvente pode impactar diretamente na capacidade antioxidante da própolis, já que a própolis contém componentes solúveis tanto em água como óleo, podendo não gerar o aproveitamento mais eficiente (MARIANO, 2014).

O objetivo deste trabalho foi relacionar o impacto que diferentes solventes extratores e métodos de coleta possuem na atividade antioxidante e na determinação de fenólicos totais e flavonoides da própolis, sendo as amostras provenientes de duas localidades diferentes do Paraná.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antioxidante de própolis da região Oeste do Paraná.

2.2 Objetivos específicos

- Obter extratos de própolis utilizando diferentes misturas de solventes;
- Comparar os diferentes extratos de própolis em termos de atividade antioxidante pelos métodos DPPH, FRAP e ABTS;
- Comparar os teores de flavonoides e fenólicos totais dos extratos obtidos;
- Estudar a correlação entre os métodos aplicados;
- Avaliar o efeito do método de coleta sobre a bioatividade da própolis.

3. JUSTIFICATIVA

O estado do Paraná possui alta produção no setor da apicultura, sendo o segundo maior estado produtor de mel do Brasil, de acordo com a Pesquisa Pecuária Municipal (PPM) do ano de 2019.

Com o a discussão crescente sobre as propriedades e usos da própolis, o produto pode vir a ser uma alternativa de renda ao apicultor, devido ao seu alto valor agregado.

Portanto, se faz necessário o estudo de atividades antioxidantes da própolis da região Oeste do Paraná, considerando diferentes métodos de coleta e tipos de solventes extratores para melhor aproveitamento das particularidades e emprego deste produto na área medicinal.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 PRÓPOLIS

A própolis é um nome genérico para a mistura complexa que envolve substâncias resinosas, material gomoso e balsâmico que possuem consistência, textura e coloração variada (MELANI, 2009). Ela é coletada pelas abelhas em diferentes partes das plantas, como brotos, exsudatos resinosos e florais, acrescentando também cera, pólen e secreções salivares (LUSTOSA *et al.*, 2008). As abelhas do gênero *Apis mellifera* são as mais utilizadas pelos apicultores na produção não só de própolis, mas também de mel, por conta de possuírem maiores rendimentos na produção destes produtos em comparação as outras espécies (SALGUEIRO, 2016).

A própolis é conhecida devido às suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, cicatrizante e antimicrobiana. Pode apresentar diferentes texturas, sendo elástica e adesiva ou dura e quebradiça e tem como características o ponto de fusão ser em média de 60-70°C, ser maleável acima de 30° C, ter ou não odor e a coloração pode variar de esverdeado até o marrom escuro, por conta da sua procedência e idade (PARK, ALENCAR, AGUIAR, 2002; SILVA-CARVALHO, BALTAZAR, ALMEIDA-AGUIAR, 2015).

Para as abelhas, a própolis desempenha o papel de vedar frestas para diminuir o risco de ataque de intrusos, embalar intrusos mortos dentro da colmeia e evitar perda de calor por convecção, além da função antisséptica quando usada para a abelha rainha realizar a postura dos ovos (PINTO, PRADO, CARVALHO, 2011; SEELEY, 1995).

Para os seres humanos, a própolis é utilizada desde os tempos mais antigos como produto natural. No Egito, era conhecida como cera negra e era utilizada para embalsamar cadáveres, ou seja, era usada como anti-putrefativo. Já os gregos e romanos usavam como produto medicinal, em vista que o médico grego Hipócrates via a própolis como um cicatrizante e o historiador romano Plínio acreditava que o produto era capaz de aliviar dores (ALDEMANN, 2005). Ao final do século XIX, a própolis foi amplamente usada durante a guerra que ocorria na África do Sul por conta de suas propriedades cicatrizantes e na Segunda Guerra Mundial em clínicas soviéticas, onde a própolis era empregada até para tratamento da tuberculose (LUSTOSA *et al.*, 2008).

A partir dos anos 1950 e 1960 a própolis foi sendo atribuída ao tratamento de problemas de saúde nos países pertencentes à antiga ex-União Soviética como a Polônia e

Bulgária; contudo, somente em meados de 1980 que o produto se tornou popular no restante da Europa, Japão e América. No Brasil, o interesse pela própolis surgiu na década de 80 com o trabalho de Ernesto Breyer, que recomendou a utilização do produto como antibiótico natural (LIMA, 2006; MELANI, 2009).

Para o homem conseguir coletar a própolis, é necessário fazer uma raspagem na colmeia ou coletar via fita (PEREIRA *et al.*, 2015). O método de raspagem é considerado tradicional, sendo feita a partir da raspagem pelo apicultor das partes móveis da colmeia, como ilustra a Figura 1. Já a técnica de coleta por fita tem por objetivo estimular a propolização sem alterar a estrutura da colmeia, através da colagem de fita no caixilho de própolis (Figura 2), onde se obtém tiras (Figura 3) praticamente sem impurezas (BREYER, BREYER, CELLA, 2016).

Figura 1- Coleta via raspagem da própolis



Fonte: BREYER, BREYER, CELLA, 2016

Figura 2- Caixilho de própolis com fita



Fonte: BREYER, BREYER, CELLA, 2016

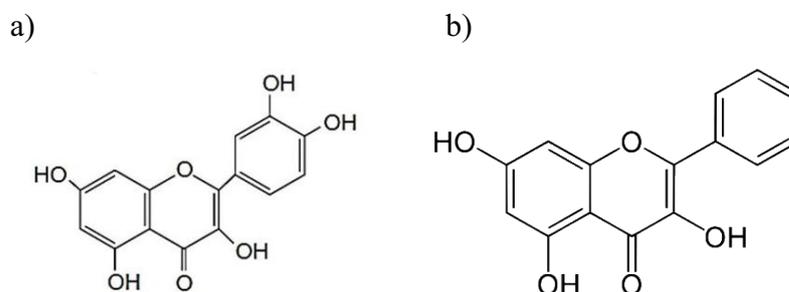
Figura 3- Retirada das tiras de própolis



Fonte: BREYER, BREYER, CELLA, 2016

Por conta da diversidade de ecologia de flora presente nas plantas e a variação genética das abelhas, é difícil determinar a composição química da própolis. Porém, há de modo geral, 5% de pólen, 5-10% de óleos essenciais, 30-40% de ceras e 50-60% de bálsamos e resinas (MATSUDA, 2006). Também está incluso em sua composição, elementos inorgânicos como cobre, ferro, estrôncio, cálcio e alumínio, flavonoides como quercetina e galangina (Figura 4), ácidos graxos como ácido esteárico e ácido oleico (Figura 5), fenilpropanoides como ácido hidroxinâmico e cafeico (Figura 6), ácidos aromáticos, esteroides, aldeídos, ésteres, cetonas, vitaminas como B1, B2, B3, B5, B6, C e E, hidrocarbonetos e polissacarídeos (LUSTOSA *et al.*,2008; MARCUCCI, 1996; MATSUDA, 2006).

Figura 4- Moléculas de a) quercetina e b) galangina, flavonoides mais comumente encontrados na própolis



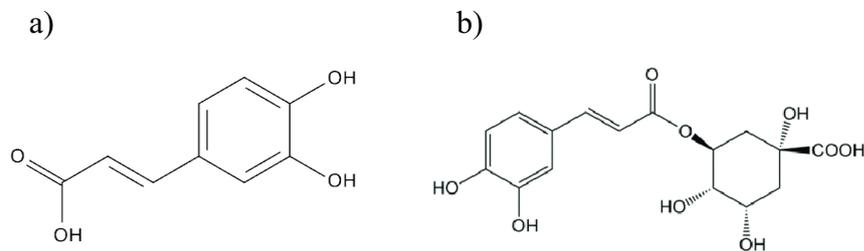
Fonte: elaborado pela autora (2022)

Figura 5- Ácidos graxos encontrados em própolis



Fonte: Adaptado de Almeida (2014)

Figura 6- Molécula de a) ácido cafeico e b) estrutura geral do ácido hidroxicinâmico, fenilpropanoides mais comumente encontrados na própolis



Fonte: elaborado pela autora (2022)

Com o aumento do interesse pelo consumo de própolis, as pesquisas sobre ela vêm crescendo, sendo envolvidos estudos da composição química e das suas possíveis aplicações na medicina alternativa. Tem-se um interesse específico na própolis brasileira por conta da diferença significativa existente em comparação às própolis oriundas da zona temperada do Norte, como o Japão e Rússia devido as condições climáticas, geográficas e às características da vegetação brasileira serem propícias para a produção (TRUSHEVA *et al.*, 2006; PEREIRA *et al.*, 2015; SALGUEIRO, 2016).

4.2 ANTIOXIDANTES

Antioxidantes são as substâncias que têm a capacidade de inibir ou prevenir a oxidação de uma ou mais moléculas, evitando com que ocorram as reações em cadeia. São categorizados pelo mecanismo de ação, sendo subdivididos em antioxidantes primários, removedores de oxigênio, sinergistas, mistos, agentes quelantes e biológicos (DEGÁSPARI, WASZCZYNSKYJ, 2004; ANTOLOVICH *et al.*, 2001).

Os antioxidantes primários são os compostos fenólicos que causam a inativação ou remoção dos radicais livres a partir da doação de átomos de hidrogênio aos mesmos (LUZIA, JORGE, 2009). O antioxidante sinergista possui pouca atividade antioxidante e pode atuar como potencializador da atividade dos antioxidantes primários. O ácido ascórbico é um exemplo, já que o composto pode atuar como sinergista da regeneração de antioxidantes primários (RAMALHO, JORGE, 2006).

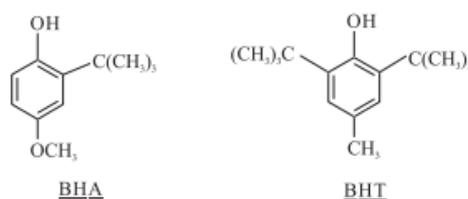
Já os antioxidantes removedores de oxigênio atuam em reações estáveis capturando o oxigênio presente (BAILEY, 1996).

O tipo quelante atua bloqueando a oxidação lipídica, isto é, complexam os íons metálicos; a classe biológica engloba as enzimas (como catalase e glucose), onde estas removem compostos com alta reatividade e/ou oxigênio do meio (BAILEY, 1996).

Além da classificação por mecanismo de ação, os antioxidantes são rotulados entre naturais e sintéticos.

Os sintéticos são amplamente utilizados na indústria de alimentos, sendo os mais comuns o BHT (butilhidroxitolueno) e BHA (butilhidroxianisol), como mostra a Figura 7. Essas moléculas apresentam estrutura fenólica que concede a doação de um próton para um radical livre, fazendo com que a molécula do acilglicerol se regenere e por consequência interrompa a oxidação via radicais livres. Ou seja, ocorre a transformação dos derivados fenólicos para radicais livres (RAMALHO, JORGE, 2006).

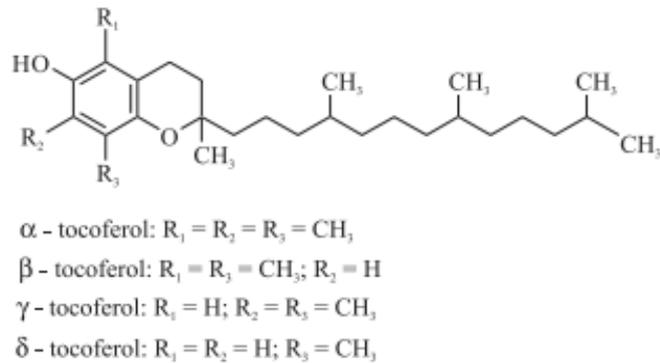
Figura 7- Estrutura dos antioxidantes sintéticos BHA e BHT, respectivamente



Fonte: RAMALHO, JORGE, 2016

Já os antioxidantes naturais estão presentes nos alimentos e são capazes de limitar as reações de oxidação dos compostos lipídicos, interrompendo a geração de radicais livres. Os mais comuns são os tocoferóis (Figura 8), ácidos fenólicos e a vitamina C (RAMALHO, JORGE, 2006; SUCUPIRA *et al*, 2012).

Figura 8- Estruturas possíveis do tocoferol, antioxidante natural mais comumente encontrado



Fonte: RAMALHO, JORGE, 2006

Além dos ácidos, os compostos fenólicos englobam os flavonoides e cumarinas, sendo os componentes dessa classificação responsáveis pela atividade antioxidante nos alimentos (DEGÁSPARI, WASZCZYNSKYJ, 2004).

As substâncias fenólicas são por volta de 50% dos constituintes da própolis (MELLO, PETRUS, HUBINGER, 2010). Este percentual pode variar de acordo com a região de coleta, tipo de abelha, entre outros.

4.2.1 Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos são metabólitos secundários das plantas, que são caracterizadas pela presença de um grupamento carboxílico, um anel aromático e um ou mais grupamentos hidroxila e/ou metoxila na molécula. São divididos entre ácidos cinâmicos com nove átomos de carbono e ácidos benzóicos com sete átomos de carbono (DEWICK, 2002). A Tabela 1 mostra as estruturas dos ácidos das duas classificações e seus derivados.

Tabela 1- Derivados de ácido cinâmico e de ácido benzóico

Substituintes	Derivados de ácido cinâmico	Derivados de ácido benzóico
$R_1=R_2=R_3=R_4=H$	Ácido cinâmico	Ácido benzóico
$R_1=OH$	Ácido orto-cumárico	-
$R_3=OH$	Ácido para-cumárico	Ácido para-hidroxibenzoico
$R_3=R_4=OH$	Ácido cafeico	Ácido protocatecuico
$R_2=OCH_3, R_3=OH$	Ácido ferúlico	Ácido vanílico
$R_2=R_3=R_4=OH$	-	Ácido gálico
$R_1=R_4=OH$	-	Ácido gentísico
$R_2=R_4=OCH_3, R_3=OH$	Ácido sinápico	Ácido siringico

Fonte: SALGUEIRO, 2016

Nas amostras de própolis, os ácidos mais comumente encontrados são os ácidos cafeico, ferúlico, cinâmico, sinápico, benzóico e gálico (CHANG *et al.*, 2008; SALGUEIRO, CASTRO, 2016).

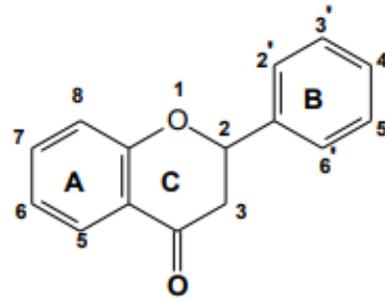
A capacidade antioxidante dos ácidos fenólicos é relacionada aos fatores estruturais, como a posição das hidroxilas ligadas no anel aromático:

Isto se deve ao fato da energia de ligação entre o átomo de hidrogênio e oxigênio do grupamento hidroxila ligado ao anel aromático ser menor do que no caso dos compostos alifáticos. A diminuição da densidade eletrônica no átomo de oxigênio devido ao efeito de ressonância do anel aromático facilita a retirada do átomo de hidrogênio do grupamento hidroxila das substâncias fenólicas, tornando-se os radicais fenóxidos, relativamente estáveis, devido à transferência de um elétron para o anel aromático (SALGUEIRO, 2016).

4.2.2 Flavonoides

Os flavonoides são oriundos dos metabólitos secundários das plantas, que são caracterizadas pelo grupo estrutural composto por 15 átomos de carbono arranjado em três anéis (C6-C3-C6), que são chamados A, C e B, como mostra a Figura 9. Os flavonoides são subdivididos em 6 classes: flavona, isoflavona, flavonol, flavanona, flavanol e antocianidina. Isso ocorre devido as variações estruturais no anel C. Os mais encontrados na própolis são a galangina e quercetina (SALGUEIRO, 2016).

Figura 9- Estrutura de um flavonoide



Fonte: SALGUEIRO, 2016

4.3 MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os compostos bioativos dos alimentos têm sua presença indicada através da capacidade antioxidante, que mede o potencial das moléculas de remover os radicais livres presentes (FLOEGEL *et al.*, 2011). Pode ser avaliada tanto *in vivo* como *in vitro*. Metodologias *in vitro* não medem fatores como: estabilidade *in vivo*, biodisponibilidade, retenção dos antioxidantes pelos tecidos e reatividade (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

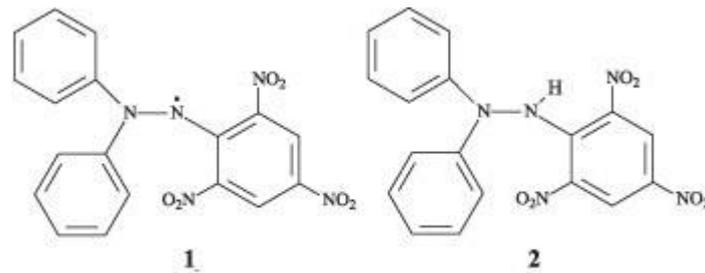
4.3.1 Captura de radicais livres

Nesta metodologia, é determinada a habilidade dos antioxidantes em “sequestrar” radicais livres do meio. Os procedimentos mais utilizados são o DPPH e ABTS.

4.3.1.1 DPPH

É um método espectrofotométrico que é muito usado por ser prático, rápido e com estabilidade. Se baseia na capacidade da amostra de “sequestrar” o radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) e transformá-lo em hidrazina (Figura 10). O DPPH é um radical estável que contém nitrogênio em sua estrutura, faixa de absorção de 510-520 nm e possui coloração púrpura, mas ao receber um hidrogênio radical ou elétron, se estabiliza, mudando sua cor para amarelo (SUCUPIRA *et al.*, 2012; FERNANDES, 2019).

Figura 10- DPPH na estrutura radicalar (1) e não radicalar (2)



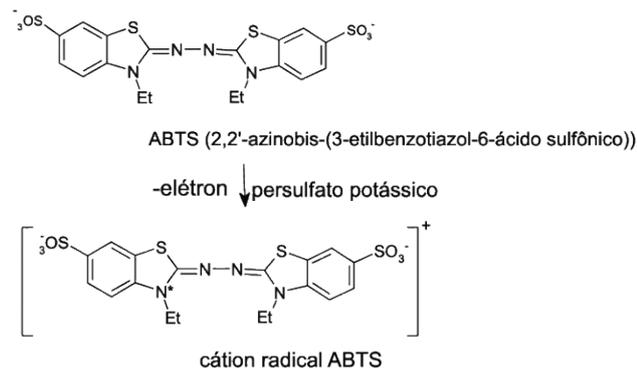
Fonte: ALVES *et al.*, 2010

4.3.1.2 ABTS

Fundamentado na habilidade dos antioxidantes “capturar” o cátion $\text{ABTS}^{\bullet+}$, onde causa declínio da absorbância. Possui a vantagem de poder ser aplicado em amostras lipossolúveis e hidrossolúveis e é muito utilizado devido a rapidez e estabilidade dos testes (SUCUPIRA *et al.*, 2012).

Este radical é feito a partir da reação de oxidação entre o ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfônico (ABTS) com o persulfato de potássio após o período de 16 horas (Figura 11) e tem como características ser estável e máximo de absorbância em 734 nm (BORGES *et al.*, 2011; SUCUPIRA *et al.*, 2012; FERNANDES, 2019).

Figura 11- Estabilização do radical ABTS e sua formação pelo persulfato de potássio



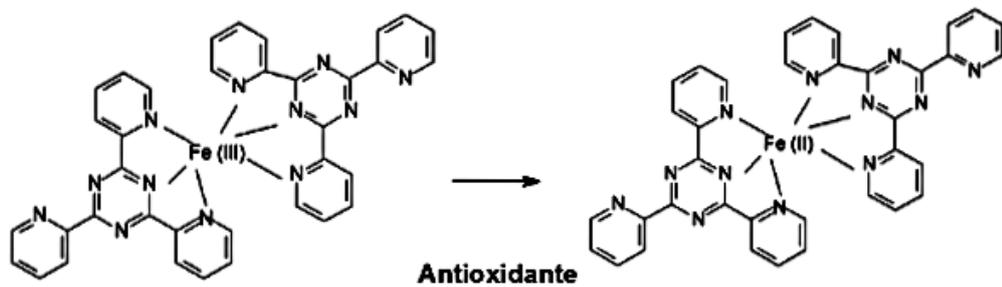
Fonte: PANNALA *et al.*, 2001

4.3.2 Poder de redução

As metodologias normalmente envolvem a redução do Fe^{3+} para Fe^{2+} , sendo o método *Ferric Reducing Antioxidant Power* (FRAP) o mais utilizado.

Este procedimento é embasado na redução do complexo férrico-tripiridiltriazina (Fe(III)-TPZ) para o complexo ferroso (Fe(II)-TPZ), como mostra a Figura 12. Esta redução só é possível em um pH ácido, visto que nessas condições o antioxidante consegue realizar a doação de um elétron. O ponto máximo de absorção é 593 nm e ao final, a reação obterá coloração azul (SUCUPIRA *et al.*, 2012).

Figura 12- Mecanismo de ação do método FRAP

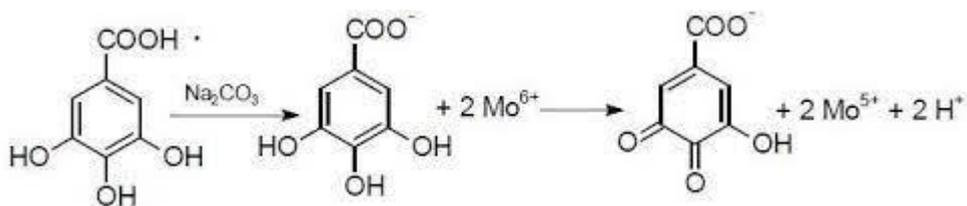


Fonte: BENZIE, STRAIN, 1995

4.3.3 Determinação de fenólicos totais

O método mais empregado para determinação dos compostos fenólicos totais é o de Folin-Ciocalteu, que consiste na oxidação do tungstênio e molibdênio presente no reagente de Folin-Ciocalteu, composto pelos ácidos de fosfotungstênio e fosfomolibdênio no estado de oxidação VI. Quando este entra em contato com o agente redutor, no caso, os compostos fenólicos, à medida que vai ocorrendo a reação, o reagente, que inicialmente possui coloração amarela, se torna azulada, como ilustra a Figura 13 (MARTINS, 2016).

Figura 13- Redução do molibdênio



Fonte: OLIVEIRA, ANDOLFATTO, 2014

4.3.4 Determinação de flavonoides

O método mais comum para quantificar o teor de flavonoides é através de análise espectrofotométrica com cloreto de alumínio na região do UV-Visível, por conta das ligações duplas existentes nos anéis aromáticos presentes. A metodologia se baseia na formação de complexos do cátion alumínio (Al^{3+}) com as moléculas de flavonoides presentes na amostra, onde se forma um complexo estável flavonóide- Al^{3+} (PEIXOTO SOBRINHO *et al.*, 2010). Segundo Ribeiro (2014), depois que ocorre a complexação, “ocorre um deslocamento batocrômico, bem como, uma intensificação da absorção, o que permite sua identificação sem interferência de outros compostos fenólicos presentes na amostra”.

4.4 SOLVENTES EXTRATORES

A extração é um processo que visa remover substâncias presentes na composição química do produto de interesse através de um solvente extrator adequado (SHIGIHARA *et al.*, 2022). No caso da própolis, os solventes mais comumente utilizados são etanólicos, já que a própolis bruta possui em sua composição substâncias solúveis tanto em óleo como em água (MARIANO, 2014).

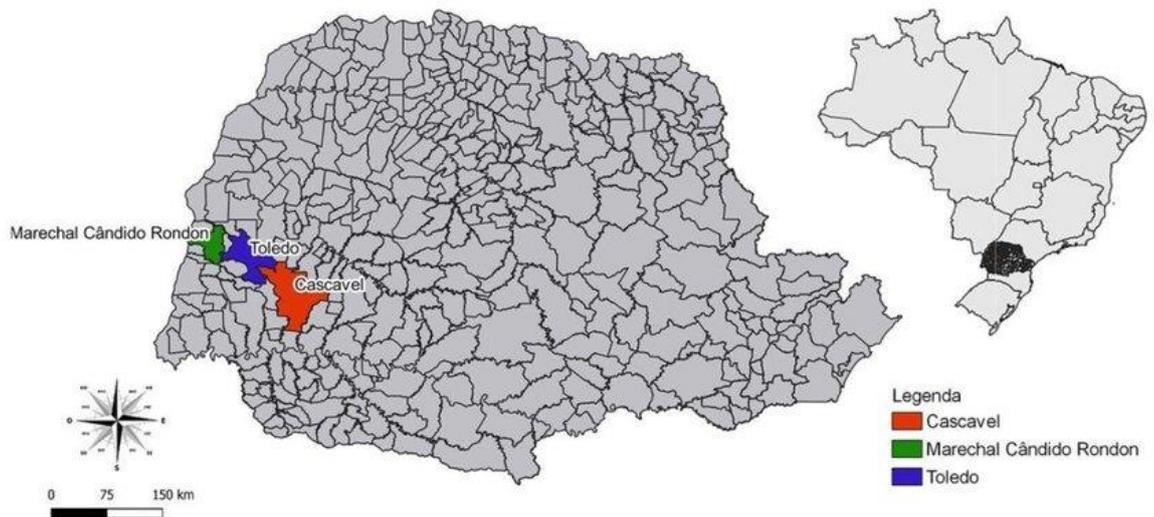
Apesar da predominância do uso de álcool etílico P.A ou 70% (v/v), diversos trabalhos demonstram usos de diferentes solventes extratores, como acetato de etila, metanol, clorofórmio, acetona e água, já que a própolis possui maior solubilidade com solventes polares (MARCUCCI, CUSTÓDIO, 2018).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 AMOSTRAGEM

Foram utilizadas três amostras de própolis de abelhas *Apis Mellifera* européia. Duas das amostras são oriundas da cidade de Marechal Cândido Rondon (PR), sendo classificadas como MCR 1 e MCR 2 e coletadas através de raspagem. Já a terceira amostra é proveniente da cidade de Cascavel (PR), que foi coletada via fita. A Figura 14 mostra a localização geográfica das cidades. As amostras foram mantidas em refrigeração e protegidas da luz no Laboratório de Alimentos da UTFPR-Toledo.

Figura 14- Localização geográfica das cidades de Cascavel e Marechal Cândido Rondon, municípios da região Oeste do Paraná



Fonte: FEIDEN, RAMOS, SCHWANKE (2020)

5.2 EXTRAÇÃO DA PRÓPOLIS

Os extratos foram preparados a partir da mistura de acetato de etila/acetona (27:73), etanol/isopropanol (50:50) e acetona/etanol (67:33). Tais proporções são provenientes de estudos prévios realizados por Silva (2021).

Para submeter as amostras no equipamento de agitação orbital Shaker (Troth) a 40°C e em 200 rpm durante 24 horas, as própolis foram trituradas, sendo adicionados 25 mL de solvente extrator.

A polaridade é um fator muito importante no processo extrativo. Sendo assim, a polaridade resultante de cada mistura de solventes aplicadas foi calculada a partir da Equação 1, onde P' é a polaridade resultante, P_A é a polaridade individual do solvente A e Ø_A é a proporção volumétrica (SNYDER, 1974).

$$P' = \text{Ø}_A P_A + \text{Ø}_B P_B \quad (1)$$

Passado o período de incubação, os extratos foram filtrados a vácuo e transferidos para um balão volumétrico de 25 mL, sendo o volume completado com o respectivo solvente de cada amostra.

Feito isso, os extratos foram homogeneizados e transferidos para frasco âmbar com tampa para ser armazenado sob refrigeração no Laboratório Multiusuário Central Analítica da UTFPR- Toledo.

5.3 METODOLOGIAS PARA ANÁLISE DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Todas as análises foram feitas em triplicata e sob proteção da luz. As curvas de calibração foram feitas a partir das diluições usadas na solução padrão e as médias das absorbâncias obtidas através das análises feitas com a solução padrão. Com as curvas realizadas, obteve-se a equação da reta e a partir dela, calculou-se a concentração dos extratos.

5.3.1 Método DPPH

O método utilizado foi elaborado por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) com adaptações de BOROSKI *et al.* (2015).

A solução do radical DPPH* utilizada foi com concentração de 0,1192 mmol L⁻¹, sendo preparada somente no dia das análises. Para preparar a solução de DPPH*, dissolveu-se 3,8 mg de DPPH (SigmaAldrich) em metanol (P.A) para o volume de 100 mL do balão volumétrico.

Para as análises, foi utilizado o volume de 50 μL dos extratos com fatores diluição 4 e 10 para 3 mL da solução DPPH• em tubos, onde posteriormente estiveram sob repouso durante 30 minutos. Em seguida, a absorbância foi medida a partir de um espectrofotômetro UV-Vis (T80- UV-VIS SPECTROMETER) a 517 nm, considerando o metanol como branco.

Os resultados foram determinados através da curva de calibração a partir do padrão Trolox sob concentração de 2000 $\mu\text{Mol L}^{-1}$ diluído entre 150 a 1500 $\mu\text{Mol L}^{-1}$, sendo expresso em ET g^{-1} (equivalente Trolox por grama de amostra).

5.3.2 Método ABTS

O método utilizado é o descrito no Comunicado Técnico 128 (2007), que foi elaborado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) com adaptações de BOROSKI *et al.* (2015).

Para análise, foi utilizado 30 μL dos extratos com fatores diluição 2 e 10 para 3 mL de radical ABTS, onde a mistura foi deixada 6 minutos em repouso. A absorbância foi medida em um espectrofotômetro UV-Vis (T80- UV-VIS SPECTROMETER) em 734 nm, considerando o tampão fosfato como branco.

Para a preparação da solução radical ABTS^{•+}, foi utilizado 5 mL solução de ABTS 7 mmol L^{-1} (Sigma Aldrich) com 88 μL da solução de persulfato de potássio 140 mmol L^{-1} (P.A), sendo deixada sob repouso, à temperatura ambiente e abrigo da luz durante 16 horas. Passada as 16 horas, a solução foi diluída, sendo 1 mL da solução contendo o radical para 55 mL de solução tampão fosfato (5 mM, pH 7,77) até a absorbância atingir 0,700 em 734 nm.

A equação da reta foi determinada a partir da curva de calibração do padrão Trolox. Com isso, foram calculados os resultados da concentração dos extratos, sendo expressos em $\mu\text{mol ET g}^{-1}$ de amostra. A faixa de concentração foi de 0 a 1700 $\mu\text{Mol L}^{-1}$.

5.3.3 Método FRAP

O método utilizado foi elaborado por Benzie e Strain (1996) com adaptações de BOROSKI *et al.* (2015).

Para análise, foram adicionados 100 μL da amostra com fator diluição 2 com 300 μL de água destilada em 3 mL do reagente FRAP em banho maria com temperatura constante de 37° C para melhor estabilidade da reação de complexação do reagente usado. A absorbância

foi lida no espectrofotômetro UV-Vis (T80- UV-VIS SPECTROMETER) a 593 nm após 40 minutos sob repouso e proteção da luz, considerando o próprio reagente FRAP como branco.

Para a preparação da solução do complexo FRAP, foi misturado 100 mL da solução tampão acetato de sódio 300 mmol L⁻¹ (P.A) em pH 3,6 com 10 mL da solução de TPTZ 10 mmol L⁻¹ (Sigma Aldrich) e 10 mL de solução de cloreto férrico 20 mmol L⁻¹ (P.A) sob temperatura constante de 37° C e proteção da luz. A solução foi preparada somente nos dias das análises.

As concentrações dos extratos foram expressas em µMol ET g⁻¹, sendo os valores obtidos através da curva de calibração. A diluição utilizada para a solução padrão variou de 0 a 730 µMol L⁻¹.

5.3.4 Determinação dos fenólicos totais

O método utilizado foi elaborado por Singleton e Rossi (1965) com adaptações de BOROSKI *et al.* (2015).

Em 250 µL dos extratos com fatores diluição 10 e 15, foi acrescentado 250 µL do reagente Folin-Ciocalteu diluído (1:1 v/v em água destilada) com 500 µL de solução saturada de carbonato de sódio (P.A) e 4 mL de água destilada. As análises foram feitas depois das amostras serem deixadas em repouso sob proteção da luz por 10 minutos e centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos.

A absorvância foi medida no espectrofotômetro UV-Vis (T80- UV-VIS SPECTROMETER) a 725 nm, considerando a água destilada como branco.

O padrão utilizado foi o ácido gálico, sendo assim, os resultados das concentrações dos extratos expressos em miligrama equivalente de ácido gálico por grama de amostra (mg EAG g⁻¹). As concentrações utilizadas para a realização da curva de calibração variaram de 0 a 90 mg L⁻¹.

5.3.5 Determinação dos flavonoides

O método utilizado foi elaborado por Dowd (1959) com adaptações de BOROSKI *et al.* (2015).

Para 500 µL de extrato, foi acrescentado 250 µL da solução de cloreto de alumínio 5% m/v (P.A) com 4,25 mL de metanol (P.A). As amostras foram deixadas por 30 minutos em

repouso sob proteção da luz. Posteriormente, a absorbância foi lida no espectrofotômetro UV-Vis (T80- UV-VIS SPECTROMETER) a 425 nm, considerando o metanol como branco.

Os resultados foram apresentados por curva de calibração a partir da quercetina, sendo as concentrações dos extratos expressas em miligrama equivalente de quercetina por grama de amostra (mg EQ g^{-1}). As concentrações utilizadas para a realização da curva de calibração variaram de 0 a 120 mg L^{-1} .

5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA E DE CORRELAÇÃO

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software Statistica 10, pela metodologia de Tukey, com 0,05 de significância. Os resultados foram expressos entre média \pm desvio padrão. A correlação foi realizada com o auxílio do software Excel 2019.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 2, estão expressos os valores das equações da reta das curvas de calibração para cada metodologia aplicada neste estudo com o seu respectivo R^2 , mostrando que houve bom ajuste linear.

Tabela 2- Equações da reta das curvas de calibração para as análises de DPPH•, ABTS^{•+}, FRAP, teor de fenólicos totais e flavonoides

Metodologia	Equação da reta	R ²
DPPH•	$y = 3,05 \cdot 10^{-4}x + 0,956$	0,984
ABTS ^{•+}	$y = 2,84 \cdot 10^{-4}x + 0,700$	0,997
FRAP	$y = 1,04 \cdot 10^{-3}x + 0,0392$	0,991
Fenólicos totais	$y = 7,99 \cdot 10^{-3}x + 0,0235$	0,999
Flavonoides	$y = 6,98 \cdot 10^{-3}x + 0,0123$	0,999

Fonte: elaborado pela autora (2022)

Na Tabela 3 são apresentados os resultados obtidos de atividade antioxidante dos extratos feitos a partir de própolis oriunda de Cascavel, MCR 1 e de MCR 2 com diferentes solventes extratores, enquanto na Tabela 4 mostra os valores determinados de fenólicos totais e flavonoides.

Tabela 3- Atividade antioxidante dos extratos feitos a partir das amostras de Cascavel, MCR 1 e MCR 2

Solvente extrator	DPPH• ($\mu\text{mol ET g}^{-1}$)	ABTS ^{•+} ($\mu\text{mol ET g}^{-1}$)	FRAP ($\mu\text{mol ET g}^{-1}$)
Cascavel			
Etanol com isopropanol	49,02 ± 1,03 ^a	96,49 ± 0,90 ^a	223,08 ± 0,48 ^a
Acetato de etila com acetona	42,13 ± 0,08 ^a	99,04 ± 0,73 ^a	201,58 ± 4,33 ^b
Acetona com etanol	41,91 ± 0,21 ^a	87,68 ± 0,77 ^a	218,86 ± 1,69 ^a

MCR 1			
Etanol com isopropanol	200,07 ± 6,42 ^b	391,33 ± 3,32 ^b	121,68 ± 1,90 ^c
Acetato de etila com acetona	201,33 ± 4,15 ^b	500,97 ± 3,97 ^c	247,25 ± 1,73 ^d
Acetona com etanol	226,23 ± 0,57 ^c	488,85 ± 1,83 ^c	179,38 ± 0,83 ^c
MCR 2			
Etanol com isopropanol	436,61 ± 8,53 ^e	1672,53 ± 15,35 ^d	307,60 ± 3,63 ^f
Acetato de etila com acetona	387,32 ± 2,95 ^d	802,08 ± 18,61 ^e	199,54 ± 1,69 ^b
Acetona com etanol	424,68 ± 9,00 ^e	1438,17 ± 26,81 ^f	274,70 ± 0,75 ^g

As letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ao nível de 5%

Fonte: elaborado pela autora (2022)

Tabela 4- Determinação de fenólicos totais e flavonoides dos extratos feitos a partir das amostras de Cascavel, MCR 1 e MCR 2

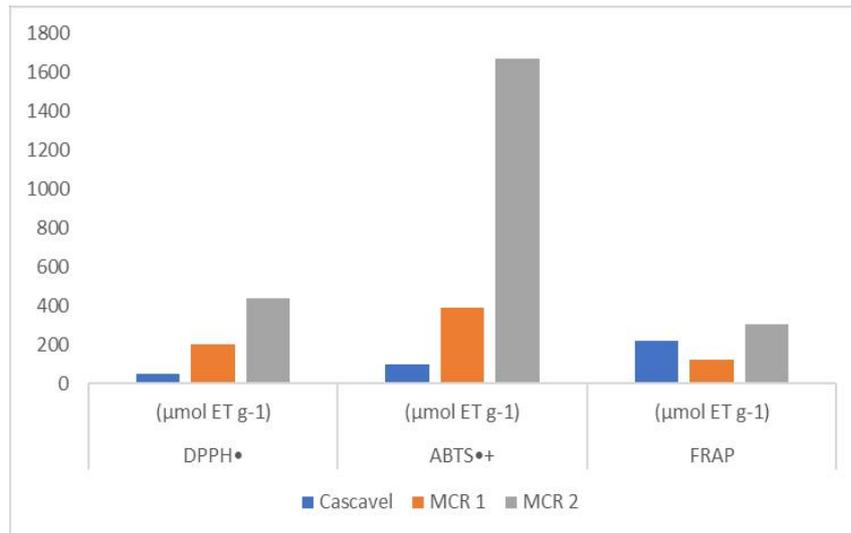
Solvente extrator	Fenólicos totais (mg EAG g⁻¹)	Flavonoides (mg EQ g⁻¹)
Cascavel		
Etanol com isopropanol	17,38 ± 0,08 ^{acf}	0,48 ± 0,01 ^a
Acetato de etila com acetona	11,22 ± 0,08 ^a	0,40 ± 0,01 ^b
Acetona com etanol	14,08 ± 0,13 ^{ag}	0,42 ± 0,02 ^b
MCR 1		
Etanol com isopropanol	31,56 ± 0,32 ^{beh}	3,53 ± 0,04 ^c
Acetato de etila com acetona	23,30 ± 0,12 ^{cijk}	2,31 ± 0,01 ^d
Acetona com etanol	28,64 ± 0,19 ^{beil}	3,49 ± 0,01 ^c
MCR 2		
Etanol com isopropanol	25,91 ± 0,07 ^{dhlj}	1,38 ± 0,03 ^e
Acetato de etila com acetona	20,69 ± 0,21 ^{dfgk}	1,08 ± 0,01 ^f
Acetona com etanol	33,07 ± 0,07 ^e	1,81 ± 0,00 ^g

As letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ao nível de 5%

Fonte: elaborado pela autora (2022)

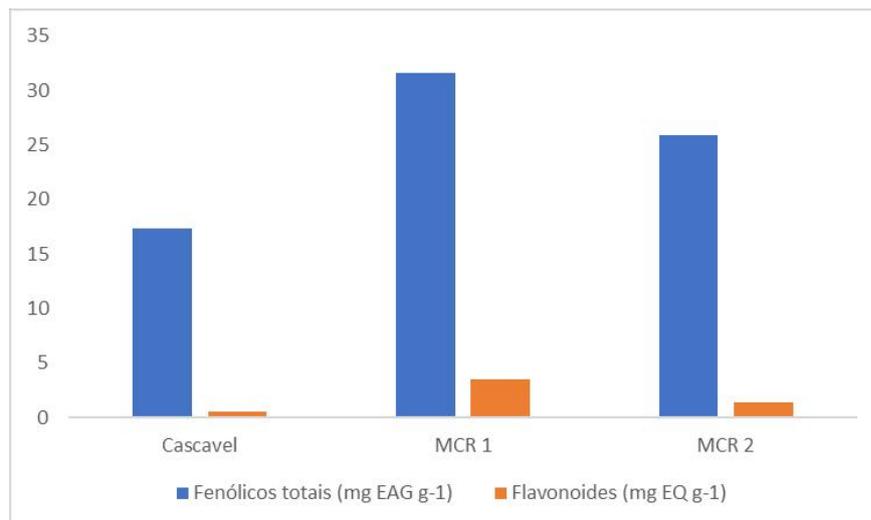
Nos Gráficos 1 e 2 são apresentados os comparativos dos resultados obtidos de cada extrato para o solvente extrator etanol/isopropanol. Já nos Gráficos 3 e 4 para a mistura acetato de etila/acetona e 5 e 6 o comparativo para o solvente acetona/etanol.

Gráfico 1- Comparativo entre os resultados obtidos de cada extrato para a mistura de solvente etanol/isopropanol para as atividades antioxidantes



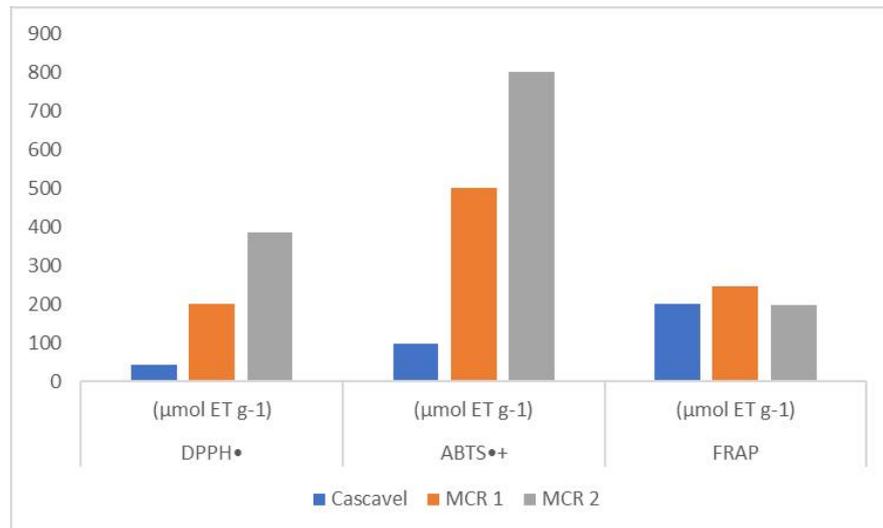
Fonte: elaborado pela autora (2022)

Gráfico 2- Comparativo entre os resultados obtidos de cada extrato para a mistura de solvente etanol/isopropanol para os fenólicos totais e flavonoides



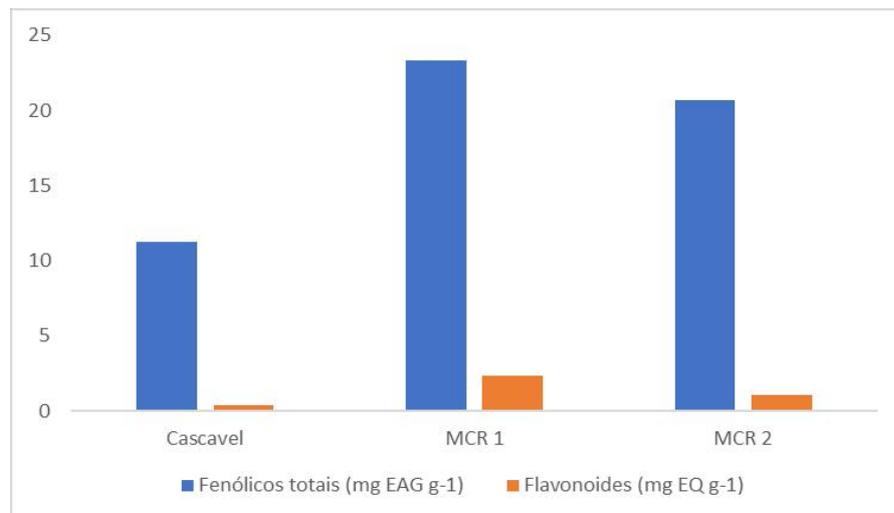
Fonte: elaborado pela autora (2022)

Gráfico 3- Comparativo entre os resultados obtidos de cada extrato para a mistura de solvente acetato de etila/acetona para as atividades antioxidantes



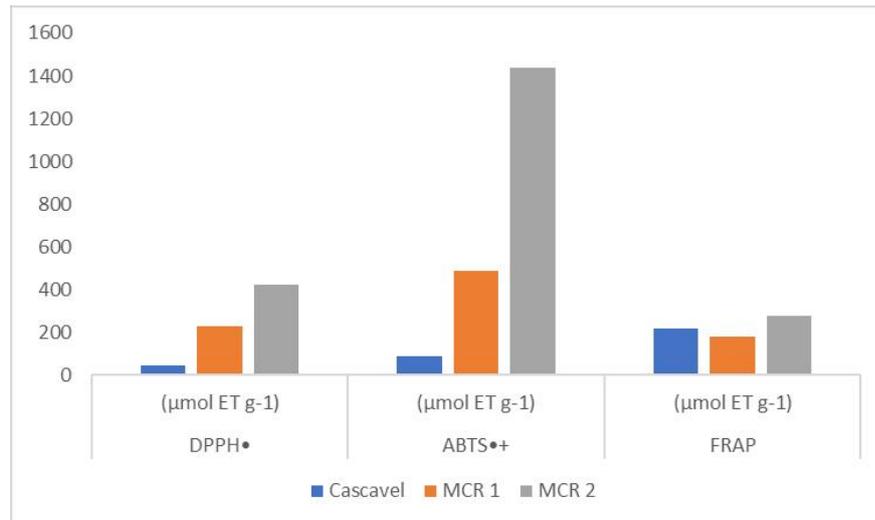
Fonte: elaborado pela autora (2022)

Gráfico 4- Comparativo entre os resultados obtidos de cada extrato para a mistura de solvente acetato de etila/acetona para os fenólicos totais e flavonoides



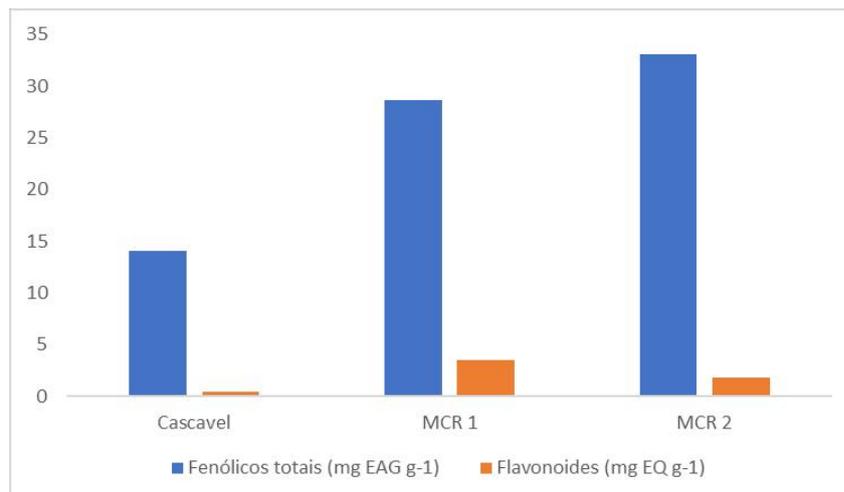
Fonte: elaborado pela autora (2022)

Gráfico 5- Comparativo entre os resultados obtidos de cada extrato para a mistura de solvente acetona/etanol para as atividades antioxidantes



Fonte: elaborado pela autora (2022)

Gráfico 6- Comparativo entre os resultados obtidos de cada extrato para a mistura de solvente acetona/etanol para os fenólicos totais e flavonoides



Fonte: elaborado pela autora (2022)

É visto que a própolis de Cascavel, coletada via fita, possui níveis menores de atividade antioxidante em comparação às outras, mesmo havendo menos impurezas. O que pode justificar é o aumento da concentração de antioxidantes quando se coleta via raspagem, já que essa técnica leva em consideração mais de uma florada e é coletada com intervalo maior em comparação ao método de fita.

Levando-se em consideração as polaridades dos solventes envolvidos nas extrações para a acetona (0,355), etanol (0,654), acetato de etila (0,228) e isopropanol (0,586) (REICHARDT, 2003), calculou-se que para a mistura etanol/isopropanol (50:50) obteve-se

polaridade relativa de 0,620, enquanto para acetato de etila/acetona (27:73) obteve-se 0,321 e para acetona/etanol (67:33) obteve-se 0,454 de polaridade relativa. Com esses resultados, torna-se evidente a influência da polaridade nos métodos de extração. Neste estudo, o solvente extrator que obteve melhores resultados para a amostra de Cascavel foi a combinação de etanol/isopropanol. Por outro lado, para as amostras de MCR 1, a melhor mistura de solventes para fenólicos totais e flavonoides foi etanol/isopropanol, mas houve variação para a atividade antioxidante; já para a amostra de MCR 2, os melhores resultados para a atividade antioxidante foi utilizando a mistura etanol/isopropanol, enquanto que para fenólicos totais e flavonoides os melhores valores foi utilizando a combinação acetona/etanol. Segundo Lima *et al.* (2019), solventes com características anfífilas apresentam maior eficiência em sua extração. Para Liu, Ang e Springer (2000), solventes com polaridades muito altas ou muito baixas (como a acetona) não caracterizam bons extratores.

Silva *et al.* (2021) realizaram seus estudos utilizando os mesmos solventes extratores e método de extração que o feito neste estudo. Os autores obtiveram resultados que variaram de $99,41 \pm 19,20$ a $1525,38 \pm 87,50$ $\mu\text{mol ET g}^{-1}$ para as atividades antioxidantes, enquanto que para os fenólicos totais o melhor resultado foi $97,86 \pm 2,68$ mg EAG g^{-1} ; para flavonoides, o melhor resultado foi $44,77 \pm 2,42$ mg EQ g^{-1} . Ao realizar o comparativo com este estudo, é visto que os resultados obtidos pelos autores foram superiores, sendo associado a flora do local de coleta da própolis utilizada por Silva e seus colaboradores, no caso, a própolis verde.

Oldoni (2007) fez seus extratos com 100 gramas de própolis de abelha *Apis mellifera* com 450 mL de etanol 80% a 70° C e em seus estudos, obteve em média 43 mg g^{-1} para flavonoides e 231,4 mg g^{-1} de compostos fenólicos. O que pode justificar estes valores é a forma em que foi feito o extrato, já que, segundo Nakajima *et al.* (2007), é esperado melhores resultados quando se é feito os extratos com solventes etanólicos.

Salgueiro, Castro (2016) apresentaram valores de 19,36 a 32,98 $\text{mmol ET } 100 \text{ mg}^{-1}$ para o método de DPPH em seus melhores resultados de atividade antirradicalar. Os extratos foram feitos durante 48h, sendo as amostras oriundas do Rio de Janeiro e São Paulo. Os extratos presentes neste trabalho apresentaram grande capacidade antioxidante, com um menor tempo de extração (24h).

Oliveira, Andolfatto (2014) obtiveram $40,33 \pm 3,61$ $\mu\text{mol ET g}^{-1}$ e $52,08 \pm 2,89$ $\mu\text{mol ET g}^{-1}$ para DPPH e ABTS ao fazer análises de própolis produzidas por abelhas *Apis mellifera* modificadas na cidade de Dois Vizinhos (PR), respectivamente. Ao comparar com as análises feitas neste estudo, é visto que os resultados obtidos foram superiores, mesmo as autoras

utilizando extrato etanólico. O que pode justificar é o tempo de extração aplicado pelas autoras, que foi de 45 minutos.

Palomino *et al.* (2009) encontrou valores que variaram de $455,5 \pm 7,8$ a $1091 \pm 17,3$ μmol de ET g^{-1} com a análise com ABTS. Os autores realizaram os estudos com própolis de diversas regiões, sendo as extrações feitas com etanol 80% durante 48h. Sendo assim, obteve-se maiores níveis de atividade antioxidante por conta do tempo elevado de extração.

Pires (2019) obteve em suas análises por FRAP um valor médio de $107,34 \pm 13,38$ mmol ET 100 mg^{-1} . Em comparação ao autor, as própolis avaliadas neste estudo possuem grande capacidade de redução de ferro, já que o autor utilizou maiores quantidades de própolis triturada e solvente totalmente etanólico.

A quantidade de flavonoides encontradas por Calazans (2020) atingiu valores máximos de $155,56 \pm 0,64$ mg EQ g^{-1} . No presente trabalho, os teores em unidades de mg EQ L^{-1} , variaram de 0,40 a 3,53. Tais divergências se dão pelo método de extração, já que as amostras da autora foram submetidas a infusão com etanol a 80% por sete dias.

De forma geral, ao realizar a comparação com a literatura, é observado que se pode abranger diversos resultados para o desempenho da atividade antioxidantes da própolis. Tais diferenças são diretamente relacionadas a fatores como a origem geográfica e diferença genética das abelhas.

A Tabela 5 apresenta as correlações entre as técnicas, tornando possível a verificação de concordância dos valores encontrados. As análises das interações foram feitas seguindo os critérios descrito por Figueiredo Filho e Silva Junior (2009), sendo: ($r = 1,00$) perfeita, ($0,80 \leq r < 1,00$) forte, ($0,50 \leq r < 0,80$) moderada e ($0,10 \leq r < 0,50$) fraca.

Tabela 5- Correlação das análises realizadas e R obtidos

Tipo de correlação	R
DPPH x ABTS	0,937
DPPH x FRAP	0,440
DPPH x Fenólicos totais	0,685
DPPH x Flavonoides	0,301
ABTS x FRAP	0,658

ABTS x Fenólicos totais	0,614
ABTS x Flavonoides	0,158
FRAP x Fenólicos totais	0,000
FRAP x Flavonoides	-0,418
Flavonoides x Fenólicos totais	0,806

Fonte: elaborado pela autora (2022)

As técnicas que seguiram o mesmo princípio possuíram uma forte correlação. Segundo os autores Silva, Vendruscolo e Toralles (2011), com o indicativo de proporcionalidade de dois métodos que utilizam do mesmo princípio, é possível se utilizar apenas um deles.

O método FRAP houve baixas correlações com as demais técnicas, em especial, com fenólicos totais e flavonoides, sendo a técnica de ABTS a com melhor resultado. Uma das possibilidades de se explicar o ocorrido segundo Reis (2016), é que provavelmente os antioxidantes presentes nas amostras atuam por transferência de hidrogênio, mecanismo este diferente do ocorrido da reação de redução do ferro. Isso justifica o R moderado com o método ABTS, já que esta metodologia atua majoritariamente por transferência de elétron.

De forma geral, as correlações entre as atividades antioxidantes com os compostos fenólicos e flavonoides foram de moderadas a baixas. Mas a correlação entre fenólicos e flavonoides foi forte, indicando que provavelmente a maioria dos compostos fenólicos são flavonoides.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

É visto que diversos fatores afetam diretamente a quantidade de antioxidantes presentes nos extratos, sendo eles a forma de coleta, localidade, tempo de extração e tipo de solvente extrator.

Os resultados obtidos com os extratos possuem valores significativos de suas capacidades antioxidantes, variando de $41,91 \pm 0,21$ a $1672,53 \pm 15,35 \mu\text{Mol ET g}^{-1}$ para as atividades antioxidantes, enquanto para os fenólicos totais foi encontrado valores de $11,22 \pm 0,08$ a $33,07 \pm 0,07 \text{ mg EAG g}^{-1}$ e para flavonoides obteve-se resultados de $0,40 \pm 0,01$ a $3,53 \pm 0,04 \text{ mg EQ g}^{-1}$. Apesar de níveis altos em comparação com a literatura, não há correlação entre as atividades antioxidantes com as quantidades de flavonoides e compostos fenólicos presentes, como é possível ver nos resultados obtidos para as amostras MCR 1 e MCR 2. Isso evidencia que, apesar de o teor de compostos fenólicos totais ser frequentemente usado para explicar a atividade antioxidante, o seu significado é diferente de capacidade antioxidante.

Apesar de ser necessário padronizar os estudos da própolis devido a extensa variabilidade que ela pode ser encontrada, é esperado que ocorra investimento no estudo da aplicabilidade da própolis.

REFERÊNCIAS

- ALDEMANN, J. **Própolis: variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana/antioxidante**. 2005. 187 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- ALMEIDA, E. G. F. de. **Propriedades vibracionais dos ácidos esteárico e palmítico**. 2014. 72 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Recursos Naturais da Amazônia, Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém, 2014.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. C.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, [S.L.], v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P. D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **The Analyst**, [S.L.], v. 127, n. 1, p. 183-198, 23 nov. 2001. Royal Society of Chemistry (RSC).
- BAILEY, A. E. **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**, 5th ed., John Wiley: New York, 1996, vol. 3.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": the frap assay. **Analytical Biochemistry**, [S.L.], v. 239, n. 1, p. 70-76, jul. 1996.
- BORGES, L. L.; CARVALHO, T. T.; SOUZA, G. E.; BARBOSA, E. F. Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia v. 7, n. 12, p. 1-12, 2011.
- BOROSKI, M.; VISENTAINER, J. V.; COTTICA, S. M.; MORAIS, D. R. **Antioxidantes: Princípios e Métodos Analíticos**. Curitiba: Appris, 2015. 141 p.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lwt - Food Science And Technology**, [S.L.], v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS^{o+}. **Comunicado Técnico**, 128, 2007.

BREYER, E. D. H.; BREYER, H. F. E.; CELLA, I. Produção e beneficiamento da própolis. **Boletim Didático**, 1, 30. 2018.

CALAZANS, L. T. S. **Caracterização de extratos de própolis e efeito sobre *Campylobacter* termotolerantes de origem avícola**. 2020. 79 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2020.

CHANG, R.; PILO-VELOSO, D.; MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A. Analysis of a Brazilian green propolis from *Baccharis dracunculifolia* by HPLC-APCI-MS and GC-MS. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. 18, 4, 549-556, 2008.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 33-40, 30 jun. 2004.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. 2^o ed. John Wiley & Sons, LTD, 2002.

DOWD, L. E. Spectrophotometric Determination of Quercetin. **Analytical Chemistry**, [S.L.], v. 31, n. 7, p. 1184-1187, 1 jul. 1959.

FEIDEN, A.; RAMOS, M. J.; SCHWANKE, J. O comércio eletrônico como ferramenta de comercialização para a agricultura familiar. **Redes**, [S.L.], v. 25, p. 2151-2170, 18 dez. 2020. APESC - Associação Pro-Ensino em Santa Cruz do Sul.

- FERNANDES, L. A. **Antioxidantes naturais para aplicação em alimentos**. 2019. 54 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas, 2019.
- FIGUEIREDO FILHO, D. B.; SILVA JÚNIOR, J. A. da. Desvendando os Mistérios do Coeficiente de Correlação de Pearson (r). **Revista Política Hoje**, Vol. 18, n. 1, 2009.
- FLOEGEL, A.; KIM, D. O.; CHUNG, S. J.; KOO, S. I.; CHUN, O. K. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **Journal of food composition and analysis**, São Diego, v. 24, n. 7, p. 1043-1048, jan. 2011.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa Pecuária Municipal 2020**. Rio de Janeiro. 2020. Brasil, p. 8.
- LUSTOSA, S. R.; GALINDO, A. B.; NUNES, L. C. C.; RANDAU, K. P.; ROLIM NETO, P. J. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 8 p. 2008.
- LIMA, D. R. F, SOUSA, L. B.; MARCIANO, P. M. S. C.; JOFRE, J. B. F.; SIMIONI, A. R. Avaliação das propriedades e potencialidades da própolis verde e sua fonte botânica *Baccharis dracunculifolia*. **Revista Tecnologia e Tendências**, [S.L.], v. 10, n. 2, p. 93, 20 dez. 2019. Associação Pró-Ensino Superior em Novo Hamburgo.
- LIMA, M. G. **A produção de própolis no Brasil**. São João da Boa Vista: São Sebastião Editora e Gráfica. 2006.
- LIU, F. F.; ANG, C. Y.; SPRINGER, D. Optimization of extraction conditions for active components in *Hypericum perforatum* using surface methodology. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 48, 2000.
- LUZIA, D. M. M.; JORGE, N. Atividade antioxidante do extrato de sementes de limão (*Citrus limon*) adicionado ao óleo de soja em teste de estocagem acelerada. **Química Nova**, [S.L.], v. 32, n. 4, p. 946-949, 2009.

MARCUCCI, M. C. **Propriedades Biológicas e Terapêuticas dos Constituintes Químicos da Própolis**. Universidade Estadual de Campinas, 8 p. 1996.

MARCUCCI, M. C.; CUSTÓDIO, A. R. Própolis: correlação química e biológica. **Revista Chemkeys**, [S.L.], n. 10, p. 1-23, 17 set. 2018. Universidade Estadual de Campinas.

MARIANO, J. S. **Extração e caracterização de dois tipos de própolis: verde (mineira) e vermelha (alagoana)**. 2014. 98 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

MARTINS, U. E. C. **Determinação da composição de fenólicos e atividade antioxidante de espécies de plantas utilizadas na medicina popular brasileira**. 2016. 45 f. TCC (Graduação) - Curso de Química, Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2016.

MATSUDA, A. H. **Caracterização e Controle de Qualidade de própolis proveniente de diversas regiões do Brasil**. 2006. 122 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência dos Alimentos, Bromatologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

MELANI, A. C. F. **Atividade antibacteriana da própolis de *Apis mellifera* sobre *Enterococcus faecalis*: Estudo *in vitro* e *in vivo***. 2009. 66 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Saúde e Desenvolvimento, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2009.

MELLO, B. C. B. S.; PETRUS, J. C. C.; HUBINGER, M. D. Desempenho do processo de concentração de extratos de própolis por nanofiltração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [S.L.], v. 30, n. 1, p. 166-172, mar. 2010. FapUNIFESP (SciELO).

NAKAJIMA, Y.; SHIMAZAWA, M.; MISHIMA, S.; HARA, H. Water extract of propolis and its main constituents, caffeoylquinic acid derivatives, exert neuroprotective effects via antioxidant actions. **Life Science**, 80 (2007) 370-377.

OLDONI, T. L. C. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera***. 2007. 105 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

OLIVEIRA, S. C. de; ANDOLFATTO, S. **Otimização do processo de extração de compostos bioativos da própolis produzida por abelhas geneticamente modificadas**. 2014. 54 f. TCC (Graduação) - Curso de Química Industrial, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2014.

PALOMINO G. L. R.; GARCÍA P.; GIL G.; B. A. ROJANO; D. L. DURANGO. Determination of phenolic content and evaluation of antioxidant activity of propolis from antioquia (COLOMBIA). **Revista de la facultad de química farmacéutica**, Medellin, v.16, n.3, p.388-395, set. 2009.

PANNALA, A.S.; CHAN, S.T.; O'BRIEN, J.P.; RICEEVANS, A.C. Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.282, n.5, p.1161-1168, 2001.

PARK, Y. K, ALENCAR, S. M, AGUIAR, C. L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian própolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 50, 2502-2506, 2002.

PEREIRA, D. S.; FREITAS, C. I. A.; FREITAS, M. O.; MARACAJÁ, P. B.; SILVA, J. B. A.; SILVA, R. A; SILVEIRA, D. C. Histórico e principais usos da própolis apícola. **Agropecuária Científica no Semiárido (Acsa)**, Patos, v. 11, n. 2, p. 1-21, jun. 2015.

PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S.; GOMES, T. L. B.; CARDOSO, K. C. M.; AMORIM, E. L. C. Otimização de Metodologia Analítica para o Doseamento de Flavonoides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. **Química Nova**, v.33, n.2 ,2010, p.288-291.

PINTO, L. M. A.; PRADO, N. R. T. do; CARVALHO, L. B. de. Propriedades, usos e aplicações da própolis. **Revista Eletrônica de Farmácia**, [S.L.], v. 8, n. 3, p. 76-100, 29 set. 2011.

PIRES, L. O. **Isolamento, caracterização e avaliação da atividade antiparasitária (*Trypanosoma cruzi*) de derivados prenilados da própolis verde**. 2019. 140 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2019.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, [S.L.], v. 29, n. n4, p. 755-760, jul. 2006.

REICHARDT, C. **Solvents and Solvents Effects in Organic Chemistry**. 3 ed., 2003.

REIS, E. C. **Avaliação da atividade antioxidante dos extratos etanólicos dos frutos de *Eugenia moraviana* e *Eugenia blastantha***. 2016. 53 f. TCC (Graduação) - Curso de Licenciatura em Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2016.

RIBEIRO, C. S. P. **Determinação espectrofotométrica de flavonóides totais presente nas folhas de arruda (*Ruta graveolens L.*)**. 2014. 67 f. TCC (Graduação) - Curso de Química Industrial, Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis, Assis, 2014.

SALGUEIRO, F. B. **Caracterização da própolis verde brasileira: composição química, atividade biológica e análise quimiométrica**. 2016. 156p. Tese (Doutorado)- Curso de Química Orgânica, Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

SALGUEIRO, F. B.; CASTRO, R. N. Comparação entre a composição química e capacidade antioxidante de diferentes extratos de própolis verde. **Química Nova**, v. 39, n. 10, p. 1192-1199, 2016.

SEELEY, T. D. **The wisdom of the hive – The social physiology of honey bee colonies**. **Harvard: Harvard University Press**. 1995. 295 p.

SHIGIHARA, T. H.; PIRES, E. F.; JUSTO, D. A.; SILVA, J. A. M.; ZARA, R. F.; MARTIN, C. A.; COTTICA, S. M.; TIUMAN, T. S. Otimização da extração de própolis verde pela

atividade antifúngica e incorporação em biofilme de quitosana. **Revista Univap**, [S.L.], v. 28, n. 59, p. 1-2, 1 ago. 2022. UNIVAP Universidade de Vale do Paraíba.

SILVA-CARVALHO, R.; BALTAZAR, F.; ALMEIDA-AGUIAR, C. Propolis: a complex natural product with a plethora of biological activities that can be explored for drug development. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 206439. 29, 2015.

SILVA, J. A. M. da; COTTICA, S. M.; JUSTO, D. A.; PEITER, G. C.; CUNHA, M. B. **Escolha das melhores misturas para a extração de própolis verde, com análises antioxidantes e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**. In: XXVI Seminário de Iniciação Científica e Tecnológica da UTFPR, 2021, Toledo. Congresso.

SILVA, R. S.; VENDRUSCOLO, J. L.; TORALLES, R. P. Avaliação da capacidade antioxidante em frutas produzidas na região Sul do RS. **Atual Ciência e Tecnologia Agrícola**, v. 17, n. 03, 2011.

SILVEIRA, M. A. D.; JONG, D.; BERRETTA, A. A.; GALVÃO, E. B. S.; RIBEIRO, J. C.; CERQUEIRA-SILVA, T.; AMORIM, T. C.; CONCEIÇÃO, L. F. M. R.; GOMES, M. M. D.; TEIXEIRA, M. B.; SOUZA, S. P.; SANTOS, M. H. C. A.; MARTIN, R. L. A. S.; SILVA, M. O.; LÍRIO, M.; MORENO, L.; SAMPAIO, J. C. M.; MENDONÇA, R.; ULTCHAK, S. S.; AMORIM, F. S.; RAMOS, J. G. R.; BATISTA, P. B. P.; GUARDA, S. N. F.; MENDES, A. V. A.; PASSOS, R. H. Efficacy of Brazilian green propolis (EPP-AF®) as an adjunct treatment for hospitalized COVID-19 patients: a randomized, controlled clinical trial. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S.L.], v. 138, p. 111526, jun. 2021. Elsevier BV.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of Total Phenolic Compounds with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

SNYDER, L. R. **Principle of adsorption chromatography**. New York: Marcel Dekker, 1968.

SUCUPIRA, N. R.; SILVA, A. B.; PEREIRA, G.; COSTA, J. N. Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. **UNOPAR Científica**. Ciências biológicas e da saúde, 8 p. 2012.

TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; BANKOVA, V.; SIMOVA, S.; MARCUCCI, M. C.; MIORIN, P. L.; PASIN, F. R.; TSVETKOVA, I. Bioactive Constituents of Brazilian Red Propolis. **Evidence-Based Complementary And Alternative Medicine**, [S.L.], v. 3, n. 2, p. 249-254, 2006.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTÁ, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, São Paulo, v.30, n. 5, p. 1323 – 1338, set./out. 2007.

VIDAL, M. F. Potencial da produção de própolis no Nordeste. Fortaleza: **Banco do Nordeste do Brasil**, ano 6, n.153, jan 2021. (Caderno Setorial ETENE).