

EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA DE EXTRATO DE PRÓPOLIS VERMELHA: ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE PROCESSO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

Larissa Moraes dos Santos Fonseca¹; João Henrique de Oliveira Reis²; Bruna Aparecida Souza Machado³; Gabriele de Abreu Barreto⁴; Jeancarlo Pereira dos Anjos⁵; Alex Alisson Bandeira Santos⁶; Fernando Luiz Pellegrini Pessoa⁷; Janice Izabel Druzian⁸

¹ Mestre em Microbiologia; DIT2A – FAPESB; larimfonseca@gmail.com

² Mestre em Patologia Humana e Experimental; jhonyba47@hotmail.com

³ Doutora em Biotecnologia; Centro Universitário SENAI CIMATEC; Salvador-BA; brunam@fieb.org.br

⁴ Mestre em Ciência dos Alimentos; gabriele.barreto@fieb.org.br

⁵ Doutor em Química; jeancarlo.anjos@fieb.org.br

⁶ Doutor em Energia e Ambiente; alex.santos@fieb.org.br

⁷ Doutor em Engenharia Química; fernando.pessoa@fieb.org.br

⁸ Doutora em Ciências dos Alimentos; janicedruzian@hotmail.com

RESUMO

RESUMO: A própolis é um material natural de grande interesse industrial. A Extração com Fluido Supercrítico (SFE) é uma alternativa à extração hidroalcoólica por apresentar maior seletividade, bons rendimentos e preservar as características físico-químicas dos componentes a serem extraídos. O objetivo deste estudo foi determinar as melhores condições de processo para a obtenção de extrato de própolis vermelha com elevado potencial antioxidante por SFE utilizando CO₂ como fluido supercrítico e etanol como cosolvente. Foram estudados a Curva Global de Extração, o S/F, o percentual de etanol e as isotermas de rendimento global em função das diferentes pressões (250, 350 e 450 bar) e temperaturas (30, 40 e 50°C). Com base na avaliação geral de rendimento, teor de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante, pode-se definir as condições de 350 bar e 40 °C como as ideais para o processo de extração de própolis vermelha utilizando SFE.

PALAVRAS-CHAVE: própolis vermelha; extração com fluido supercrítico; foromonetin; compostos antioxidantes.

1. INTRODUÇÃO

A própolis é um composto natural definido por uma mistura resinosa complexa produzida pelas abelhas através da mistura de exsudatos de diferentes plantas, cera e secreções salivares de grande aplicação nas áreas alimentícia, farmacêutica e cosmética graças às suas propriedades bioativas como atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e antioxidante^{1,2}. Dentre os variados tipos de própolis, a propolis vermelha têm recebido destaque devido a seus compostos biologicamente ativos, os flavonoides e propriedades farmacológicas². Grande parte dos trabalhos envolvendo a própolis é realizada utilizando o processo de extração convencional (hidro alcoólico) para obtenção do seus extratos^{3,4}. No entanto, apesar de ser bastante empregada, a extração convencional é um processo lento que apresenta resíduos do solvente no extrato. Uma rota diferenciada para a extração de compostos/substâncias de matrizes naturais é a utilização de Extração com Fluido Supercrítico (SFE). Esta tecnologia vem sendo difundida em múltiplas áreas industriais dadas às suas vantagens únicas, tais como extração seletiva, altos rendimentos, preservação das características físico-químicas dos componentes a serem extraídos e maior seletividade do processo^{5,6}. Com o objetivo de otimizar as condições que influenciam no processo, os parâmetros temperatura, pressão, tempo, tipo e percentual de modificadores ou cosolventes devem ser avaliados para a extração da própolis vermelha. Assim, o objetivo deste estudo foi determinar as melhores condições de processo para a obtenção de extrato de própolis vermelha com elevado potencial antioxidante utilizando dióxido de carbono (CO₂) como fluido supercrítico e etanol como cosolvente.

2. METODOLOGIA

Foram realizadas as etapas pra definição dos parâmetros de processo por SFE:

- Determinação da Curva Global e S/F (massa de CO₂ /massa de matéria-prima) - Foram utilizados 7,5 g da própolis vermelha e o procedimento foi realizado nas condições de temperatura e pressão mais brandas as estudadas (T 40°C; P 100 bar);
- Avaliação da Influência de Cosolvente - Para esta etapa, aplicou-se o S/F que corresponde a um volume total de CO₂ de 0,540 m³ (tempo aproximado de extração de 240 minutos) e variação de percentual de

cosolvente por minuto de 0,05 mL (1%), 0,10 mL (2%) e 0,20 mL (4%), além do extrato controle (sem adição de cosolvente – 0%).

- **Determinação das Isotermas Globais de Rendimento (GYI):** utilizou-se as melhores condições dos ensaios realizados nas Etapas 1 e 2 e dessa forma empregou-se um valor de S/F de 131, 4% de cosolvente (etanol m/m) com variações na pressão (250, 350 e 450 bar) e temperatura (30, 40 e 50°C).

Foram realizados ensaios para determinação do teor de compostos fenólicos totais, teor de flavonoides e atividade antioxidante por DPPH dos extratos bem como identificação e quantificação dos compostos fenólicos por Cromatográfica Líquida de Alta Eficiência^{7,8} (HPLC). A análise estatística foi realizada utilizando o programa Statistica® 6.0 da StatSoft (Tulsa, EUA). Foi também realizada a análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey (95% de nível de confiança) com o objetivo de identificar as diferenças significativas entre as médias obtidas para cada ensaio ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da obtenção da curva cinética de extração da própolis vermelha foi possível determinar a quantidade de CO₂ necessária para que o período difusional do processo fosse atingido e estimar o tempo de processo. Foram obtidos 13 pontos de coleta até atingir a extração exaustiva (Figura 1). Os pontos 1 e 2 apresentaram maior acúmulo de extrato, sendo o rendimento destes de 0,56 e 0,59%, respectivamente, e o rendimento total de 5,89%. No entanto, o teor de compostos bioativos mais elevados foi observado no extrato do ponto 10, com valores de compostos fenólicos de 226,03±22,60 mEAG.g⁻¹, atividade antioxidante de aproximadamente 30% e rendimento acumulado de 4,88%. Dessa forma, o ponto 10 foi escolhido para as próximas etapas deste estudo. Estudos anteriores já reportaram uma baixa produção de extrato de própolis obtido por SFE, atrelado ao fato de a própolis não ser muito solúvel em extração utilizando CO₂, mas ser muito mais solúvel em uma mistura de CO₂ com etanol⁹.

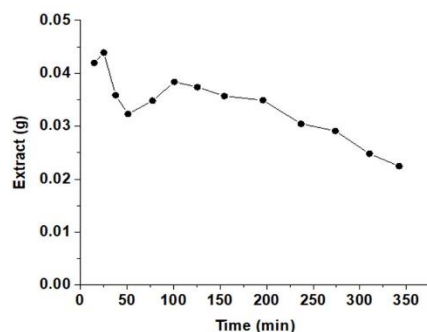


Figura 1. Perfil da extração da própolis vermelha em relação à massa de extrato obtida nos diferentes tempos para obtenção da cinética piloto.

Na segunda etapa deste estudo foram avaliadas melhores condições de extração por SFE utilizando etanol como cosolvente. A Tabela 1 apresenta os resultados para o teor de compostos fenólicos, flavonoides, IC₅₀ (DPPH) e concentrações dos compostos formonometin, epicatechin e kaempferol utilizando 1, 2 e 4% de etanol (cosolvente) em relação a massa de CO₂ (m/m) e sem a presença de cosolvente.

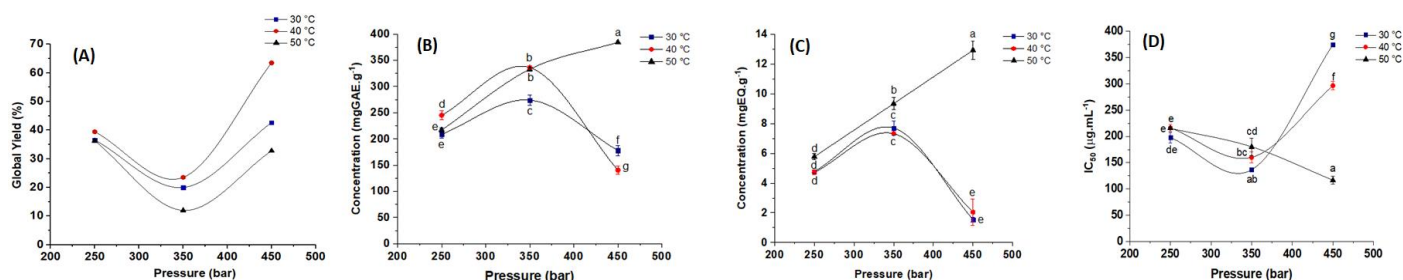
Tabela 1. Resultados do teor de compostos fenólicos totais, flavonoides, IC₅₀ (DPPH), e dos biomarcadores formonometin, epicatechin e kaempferol utilizando 1, 2 e 4% de etanol (cosolvente) em relação a massa de CO₂ (m/m) e sem a presença de cosolvente.

Parâmetros de cosolvente (m/v)	Análises					
	Total fenólicos (mgGAE.g ⁻¹)	Flavonoides (mgQE.g ⁻¹)	IC ₅₀ (µg.g ⁻¹)	Formonometina (mg.g ⁻¹)	Epicatequina (mg.g ⁻¹)	Kaempferol (mg.g ⁻¹)
0%	441.10±40.18 ^a	1.31±0.03 ^c	198.36±20.99 ^b	1.16±0.15 ^b	3.87±0.19 ^{a,b}	0.72±0.11 ^b
1%	458.22±74.66 ^a	5.88±0.24 ^b	142.97±16.16 ^a	2.06±1.42 ^b	2.93±1.95 ^b	0.81±0.46 ^b
2%	514.38±7.99 ^a	9.36±0.14 ^a	185.83±12.04 ^b	1.41±0.54 ^b	3.45±0.88 ^b	0.69±0.11 ^b

4% 692.47±196.12^a 6.20±1.82^b 140.20±13.99^a 7.18±1,86^a 5.76±0.84^a 1.60±0.25^a

Valores que mostram a mesma letra na mesma coluna não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$) através do teste de Tukey a um nível de confiança de 95%.

O extrato obtido utilizando 4% de etanol (80%) apresentou a maior quantificação dos compostos formononetin, epicatequina e kaempferol, bem como, a maior concentração do teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante (representado pelo menor IC_{50}) (Figura 2). Dessa forma, com exceção do teor de flavonoides totais, todos os compostos analisados estiveram presentes em maior concentração nos extratos obtidos com 4% de cosolvente o que pode ser justificado pela polaridade dos compostos de interesse. A presença de etanol como cosolvente melhora o processo de extração dos compostos presentes na própolis vermelha, pois, além do aumento da polaridade do solvente, o etanol pode melhorar a área da superfície de extração em uma matriz sólida devido à expansão do material gerada pelas interações entre sólidos e solventes e à afinidade entre o solvente líquido e os compostos associativos na matéria-prima, proporcionando uma maior miscibilidade do gás na amostra⁹, resultando em maior eficiência de extração. Na Figura 2 são apresentadas as isotermas de rendimento global (GYI) para o rendimento total, teor de compostos fenólicos totais, teor de flavonoides e a



atividade antioxidante (IC_{50}) determinada para os extratos de própolis vermelha obtidos nas diferentes condições de temperatura (30, 40 e 50 °C) e pressão (250, 350 e 450 bar) empregadas (S/F 131 – etapa 1 / 4% etanol – etapa 2). Como a formononetin é considerada o principal biomarcador da própolis vermelha e principal composto de interesse (devido as suas propriedades biológicas), e com base na avaliação geral de rendimento e do teor de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante, pode-se definir as condições de 350 bar e 40 °C como as melhores condições de processo para a obtenção de extratos de própolis vermelha utilizando CO_2 como fluido supercrítico e etanol (4% m/m) como cosolvente.

Figura 2. Isotermas de Rendimento Global para (A) percentual de rendimento total; (B) teor de compostos fenólicos totais ($mgEAG.g^{-1}$); (C) teor de flavonoides ($mgEAG.g^{-1}$); e (D) atividade antioxidante (IC_{50}) ($\mu g.mL^{-1}$) para os extratos de própolis vermelha utilizando CO_2 como fluido supercrítico, etanol como cosolvente (4% m/m) nas temperaturas de 30, 40 e 50°C e pressões de 250, 350 e 450 bar.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao analisar as melhores condições de processo para a obtenção de extrato de própolis vermelha utilizando CO_2 como fluido supercrítico e etanol como cosolvente, foram definidos o S/F de 131 (0,540 m³ de CO_2 e 240 minutos), 4% de etanol, pressão de 350 bar e temperatura de 40 °C como os melhores parâmetros. O aumento da concentração de etanol elevou a concentração de compostos fenólicos obtidos, com destaque para a formononetin, composto considerado biomarcador da própolis vermelha. A presença de elevada capacidade antioxidante e de compostos fenólicos de interesse no extrato obtido neste estudo, demonstra a SFE com etanol como cosolvente é uma alternativa promissora para obtenção de extratos de própolis vermelha com elevado valor agregado.

5. REFERÊNCIAS

- 1 PARK, Yong; ALENCAR, Severino e AGUIAR, Claudio. Botanical Origin and Chemical Composition of Brazilian Propolis. São Paulo, Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2002.
- 2 MARCUCCI, M. C; RODRIGUEZ, José et al. Chemical composition of Brazilian propolis from Sao Paulo State. São Paulo. Zeitschrift Für Naturforsch, 1998.
- 3 SFORCIN, José. Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis. Phytotherapy Research, 2016.

- ⁴ TRUSHEVA, B.; TRUNKOVA, D.; BANKOVA, V. Different extraction methods of biologically active components from propolis; a preliminary study. *Chemistry Central Journal*, 2007.
- ⁵ DEVEQUI-NUNES, D.; MACHADO, B.; BARRETO, Gabriele; SILVA, J. R.; SILVA, D. F.; ROCHA, J. L. C; BRANDÃO, H. N. B.; BORGES, V. M.; UMSZA-GUEZ, M. A. Chemical characterization and biological activity of six different extracts of propolis through conventional methods and supercritical extraction, *PLoS One*, 2018.
- ⁶ FACHRI, B.A.; SARI, P.; YUWANTI, S.; SUBROTO, E. Experimental study and modelling on supercritical CO₂ extraction of Indonesian raw propolis using response surface method: Influence of pressure, temperature and CO₂ mass flowrate on extraction yield. *Chemical Engineering Research and Design*, 2020.
- ⁷ SALGUEIRO, F.B; CASTRO, R.N. Castro, Comparação entre a composição química e capacidade antioxidante de diferentes extratos de própolis verde, *Química Nova*, 2016.
- ⁸W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier, C. Berset, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT - Food Science Technology*, 1995.
- ⁹OROIAN, M.; URSACHI, F.; DRANCA, F. Influence of ultrasonic amplitude, temperature, time and solvent concentration on bioactive compounds extraction from propolis, *Ultrasonics – Sonochemistry*, 2020.