

OTIMIZAÇÃO DE PROCESSO EXTRATIVO DE PRÓPOLIS

SELMA LUCY FRANCO¹
JOSÉ HAMILTON FERREIRA BUENO²

¹ Professora de Farmacotécnica da Universidade Estadual de Maringá (Paraná) e Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas - Unesp - Araraquara.

² Professor Titular, Departamento de Fármacos e Medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Unesp - Araraquara. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - Unesp - Araraquara

Introdução

Própolis é um termo originado do grego que significa "em defesa da cidade", é o nome de uma resina balsâmica, com composição complexa, de consistência viscosa, odor agradável, apresentando variação na cor de parda escura a vermelha e com sabor amargo. É coletada pelas abelhas em brotos e exsudados de árvores e modificada, na colmeia, por adição de secreção salivar da abelha⁽¹⁾. É utilizada para vedar e envernizar a colmeia para prevenir o escape de água, evitar penetração de corpos estranhos, embalsamar insetos mortos dentro da colmeia, evitando, assim, a sua decomposição^(2, 3, 4, 5, 6).

A composição química da própolis é muito variada, apresentando 55% em resinas e bálsamos, 30% em ceras, 10% em óleos voláteis e 5% em pólen. Entre os compostos químicos presentes, podem ser citados ácido benzóico, álcool e ácido cinâmico, benzaldeído, compostos terpênicos, ácido salicílico e flavonóides⁽⁷⁾, entre os quais preponderam os flavonóides⁽⁸⁾.

A própolis é dotada de inúmeras ações farmacológicas, destacando-se as ações: antimicrobiana, antiviral, antiparasitária e antiinflamatória^(9,10). Usada na dermatologia para cicatrização de ferimentos, regeneração de tecidos, tratamentos de queimaduras, neurodermites, eczemas, úlceras externas, prurido⁽¹⁾. Foi utilizado como cicatrizante em escaras de decúbito⁽²⁾ e vem sendo utilizada em grande escala na medicina popular e em cosméticos. Fortalece o sistema imunológico, equilibrando o organismo⁽¹¹⁾ e apresenta atividade antibiótica contra bactérias Gram-positivas. Possui, ainda, ações anti-séptica, bacteriostática e adstringente.⁽¹²⁾

A composição química da própolis e a concentração das substâncias ativas é muito variada, em função da flora existente ao redor do apiário. Este tem sido o fator que origina grandes problemas, quando o objetivo é padronização, seja sob a forma de extrato ou outra forma farmacêutica. Para tanto, torna-se necessário estudos de padronização, desde as condições de coleta, armazenagem, preparação de extratos e formas farmacêuticas.

No mercado, percebe-se hoje verdadeira parafernália, quanto à forma de preparação do extrato de própolis. O processo extrativo utilizado nas indústrias de produção e manufatura

de produtos apícolas é, via de regra, a maceração (dimaceração), por período de 40 a 60 dias, sendo feito de forma rudimentar, sem muita preocupação com concentração, reprodutibilidade de extração, etc. Tanto o processo extrativo em si, como o tempo de extração e mesmo a quantidade de própolis (cerca de 30%) podem interferir na qualidade do extrato final. Há mais de duas décadas que se tem estabelecido algumas regras de preparação de extratos^(13,14), as quais são seguidas exatamente, quando não se tem a monografia da droga. A maceração é o método preconizado para preparação de extratos, a partir de resinas^(4,5,15), justificando a escolha da técnica, até o momento.

Embora seja produto de exportação, a falta de estudos que caracterizem a própolis e seus extratos, que estabeleçam padrões de procedimentos, têm deixado os produtores e exportadores sem muitas alternativas de garantia da qualidade. A médio e longo prazos, isto pode originar uma falsa "má qualidade" da própolis brasileira, além de facilitar a adulteração da mesma. Para os fitoterápicos, salvo quando se tem monografia que estabeleça condições de extração, geralmente é proposto que a concentração da droga esteja na faixa de 5-15%^(9,10,16). Pode ser observado que a quantidade de própolis utilizada pelos produtores para obtenção do extrato (cerca de 20-30%) está muito acima do preconizado na "Farmacopéia Brasileira"⁽⁴⁾. Em função disto, surge a necessidade de se otimizar a preparação do extrato de própolis, estudando-se a possibilidade da aplicação de menor quantidade da droga, através da comparação da eficiência extrativa.

Neste trabalho, a proposta foi desenvolver técnica de extração mais adequada para a característica resinosa da própolis, preservando a estabilidade de seus componentes químicos, avaliando, em uma primeira etapa, o método extrativo e, na seqüência, a quantidade de própolis a ser colocada para o preparo do extrato.

Metodologia:

Obtenção da própolis

As amostras de própolis foram coletadas das colmeias de abelhas *Apis mellifera*, na Fazenda Experimental de Iguatemi da Universidade Estadual de Maringá (FEI-UEM), localizadas

no apiário da clareira, no interior de uma reserva de eucaliptos e ao redor de uma mata nativa. Foram congeladas e em seguida trituradas em turboextrator, acondicionadas em frasco âmbar, bem vedados e estocadas em temperatura de congelamento (freezer).

Preparação dos extratos

Foram preparados extratos contendo 5, 10, 20, e 30% de própolis em álcool 96°, por turboextração, durante 15 minutos, e por maceração, durante 42 dias. Cada extrato foi preparado em quintuplicata, tendo sido realizadas três análises por extrato. Foram estabelecidos parâmetros, como a determinação do resíduo seco (RS), valor de pH, da densidade, do teor alcoólico e teor de flavonóides.

O teor de flavonóides foi determinado, seguindo a técnica da "Farmacopéia Alemã"⁽¹⁶⁾, modificada para extratos, tomando alíquota correspondente ao peso de própolis proposto originalmente. Os valores foram obtidos utilizando a fórmula abaixo.

$$Q = \frac{A \times 12500}{(500 \times m \times (100 - PD))}$$

m = massa de própolis usada em g
A = Absorvência da solução teste
PD = Perda por dessecação
500 = Absortividade da quercetina

As medidas de pH, resíduo seco, teor alcoólico e densidade foram determinadas, usando técnicas farmacopéicas⁽⁴⁾. Foram calculados as médias dos valores obtidos, e mantido o coeficiente de variação abaixo de 5%.

Resultados e discussão

Os resultados na figura 1 apresentam a variação no teor de flavonóides e demonstram que este diminui, à medida em que aumenta a quantidade de própolis, indicando, pois, que cerca de 60% da droga utilizada para preparação dos extratos é eliminada intacta junto com o marco, comprometendo a extração. Este fato pode ser detectado (fig. 1), através do decréscimo nos valores do teor de flavonóides, de acordo com o aumento da quantidade de droga utilizada para extração.

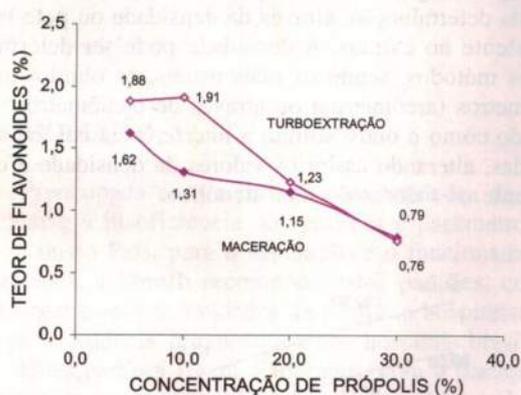


Figura 1. Valores obtidos para teor de flavonóides variando a quantidade de própolis em 5, 10, 20 e 30% (p/p, n=5). Comparação dos métodos extrativos turboextração e maceração.

Foi avaliada, ainda, a turboextração comparada com o método usual de preparo, a maceração. Foi observado (fig.1) comportamento semelhante para os métodos de maceração e turboextração com relação ao teor de flavonóides e quantidade de droga. Os resultados obtidos por turboextração apresentam maior teor de substância ativa para as quantidades de 5, 10 e

20%, sendo inferior que a maceração apenas para o extrato obtido a partir de 30% da droga, corroborando a possibilidade de perda anteriormente referida. A vantagem obtida na turboextração para as quantidades de própolis 5 e 10%, seguido da queda sensível nos valores do teor de flavonóides nas quantidades de 20 e 30%, inclusive no processo de maceração, podem ser indicativos da saturação do solvente e, conseqüentemente, de sua capacidade extrativa, além de sugerir a possibilidade de estar ocorrendo degradação das substâncias ativas.

O tempo de contato praticado na indústria de fitoterápicos varia em torno de 40 dias, considerado muito longo, por propiciar reações que poderiam alterar a qualidade do extrato obtido.

Na obtenção do extrato por turboextração, a partir de 30% de própolis, observa-se além da perda de substâncias ativas (fig.1), que o método se torna tecnologicamente deficiente. Durante a preparação, ocorre a formação de um gel entre o álcool, a resina e a cera, o que dificulta a filtração e conseqüentemente o processo extrativo. Por sua vez, a maceração só se mostra mais eficiente do que a turboextração, quando a concentração de própolis é alta (30%). Assim, com relação ao teor de flavonóides, pode ser considerado que a turboextração é mais eficiente para a extração até a quantidade de 20% (p/p) da droga e que a quantidade de própolis necessária para preparação do extrato situa-se na faixa de 5 a 10%, sendo inútil acrescentar maiores quantidades.



Figura 2. Valores de densidade obtidos para os extratos preparados por maceração e turboextração, nas concentrações de própolis de 5, 10, 20 e 30% (p/p, n = 5).

Considera-se lícito admitir que o teor de flavonóides obtido na maceração tenha sido também resultado da agitação periódica (diária) cuidadosamente executada, fato este perfeitamente viável, em razão de se trabalhar em pequena escala (aproximadamente 200 mL extrato). Na produção industrial de produção de extrato própolis, é usual deixar a droga em contato em contato com o líquido extrator durante aproximadamente 40 dias, sob agitação ocasional com um bastão manual ou com agitador elétrico, de hélice acionado sob baixa rotação. Nestas circunstâncias, é possível que ocorram perdas superiores àquelas observadas em nossos ensaios.

A avaliação da densidade, neste estudo, fez-se necessário, objetivando-se estabelecer mais um parâmetro que estabeleçam características de reconhecimento do extrato. Foi possível detectar um aumento na densidade, de acordo com o aumento da quantidade de própolis utilizada na preparação do extrato (fig.2). Este aumento de densidade está provavelmente relacionado com a dissolução de maior quantidade de resina e cera.

Na maceração, observa-se que apenas para o extrato obtido a partir de 30% de droga ocorre um aumento da densidade superior ao obtido através da turboextração.

O aumento da densidade pode modificar a especificidade de dissolução do solvente, provavelmente gerando uma di-

minuição do coeficiente de solubilidade dos flavonóides. Este fato pode ser visualizado confrontando-se os gráficos das figuras 1 e 2. Observa-se que o aumento da concentração de própolis ocasiona uma redução na extração de flavonóides (fig.1) e um aumento na densidade dos extratos (fig.2). Por outro lado, o aumento na quantidade de própolis promove saturação do solvente comprometendo solubilidade, o que parece acentuar com a formação de gel na turboextração.

Na figura.3 pode ser observado a manutenção nos valores de pH, algo entre 5,27 e 5,51, sugerindo que a droga em questão não apresenta grande interferência sobre o pH do álcool utilizado (na faixa de 6,5). Esta pequena variação provavelmente deve-se à presença das substâncias fenólicas^(19,20) (flavonóides, taninos, etc.) e dos fenilpropanóides^(17,18) (derivados do ácido cinâmico).

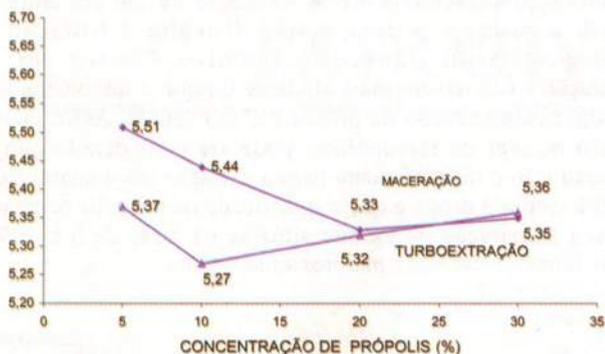


Figura 3. Valores de pH obtidos para os diversos extratos preparados por maceração e turboextração a 5, 10, 20 e 30% (p/p, n = 5).

Embora estas substâncias sejam majoritárias e estejam presentes em grande quantidade, a presença de outros grupos de substâncias nitrogenadas, como os aminoácidos⁽¹⁾, que equilibram o pH deixando o extrato próximo do pH neutro. Este comportamento pode ser visualizado nos extratos obtidos, através dos dois métodos extrativos, sugerindo que o aumento no conteúdo de própolis pouco interfere no pH do extrato obtido, quando comparado com álcool usado para prepará-lo.

A determinação do resíduo seco (RS) para os extratos tem como função primordial padronizá-los com relação à quantidade de própolis a ser utilizada, bem como para escolha do método de obtenção. Os valores detectados (fig.4) demonstram que o resíduo seco aumenta na proporção em que são utilizadas quantidades crescentes de própolis em ambos os métodos de extração. É detectada pequena variação do RS entre os métodos de obtenção dos extratos com 5, 10, 20% de própolis se diferenciando de forma considerável na concentração de 30%.

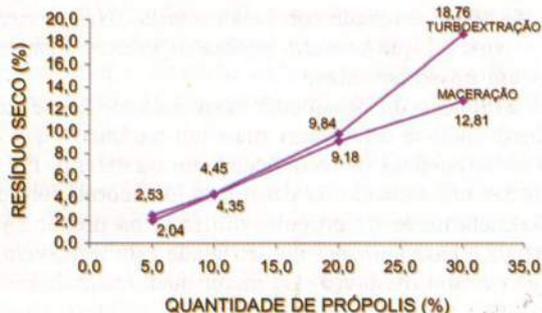


Figura 4. Avaliação da extração através da determinação do Resíduo seco para os diversos extratos obtidos por maceração e turboextração, variando a concentração de própolis em 5, 10, 20, 30 % (p/p, n = 5)

É veiculado conceito de que os extratos que possuem RS inferior a 10% não têm qualidade ou mesmo eficácia. Partindo da premissa de que os flavonóides são responsáveis por grande parte das ações da própolis, tais afirmações não condizem com a realidade, já que, de acordo com valores da tabela 1, o teor de flavonóides é inversamente proporcional ao RS, corroborando com a afirmação anterior de que os extratos com grandes quantidades de própolis (maior do que 10%) estão com sua extração comprometida, desperdiçando matéria-prima. O resíduo seco não pode ser colocado como padrão de melhor ou pior qualidade, deve ser considerado apenas como mais uma característica do extrato da própolis.

Tabela 1. Valores obtidos para o Teor de Flavonóides e Resíduo Seco (n=5)

Turboextração								
Extrato	Valores de Resíduo Seco				Valores do teor de Flavonóides			
	5%	10%	20%	30%	5	10	20	30
Valor(%)	2,53	4,45	9,84	18,76	1,88	1,91	1,23	0,76
s	0,12	0,19	0,43	0,45	0,0878	0,0631	0,0236	0,040
CV%	4,65	4,20	4,34	2,38	4,67	3,00	1,92	0,52

MACERAÇÃO								
Extrato	Valores de Resíduo Seco				Valores do teor de Flavonóides			
	5%	10%	20%	30%	5%	10%	20%	30%
Valor(%)	2,04	4,35	9,18	12,81	1,62	1,31	1,16	0,79
s	0,08	0,20	0,17	0,31	0,0385	0,0507	0,0358	0,0069
CV%	3,94	4,62	1,88	2,42	2,37	3,88	3,10	0,87

O teor alcoólico é um parâmetro usualmente estabelecido para ser mais uma forma de caracterizar os extratos obtidos seja de origem vegetal ou animal. A farmacopéia brasileira preconiza esta determinação, através da densidade ou pelo teor de água existente no extrato. A densidade pode ser determinada por vários métodos, sendo os mais usuais, os obtidos através de densímetros (areômetros) ou através de picnômetros. Tanto um método como o outro sofrem a interferência das substâncias extraídas, alterando assim os valores da densidade e consequentemente os valores do teor alcoólico.

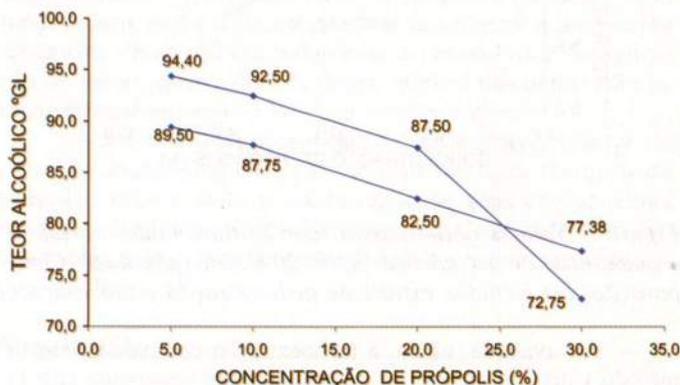


Figura 5. Valores de teor alcoólico em relação a variação na concentração de própolis, 5, 10, 20, 30 % (p/p) para extratos obtidos por maceração e turboextração.

A própolis, como é sabido, apresenta, além das substâncias ativas, outros grupos em maior quantidade, como as resinas e ceras. A dissolução destas substâncias promove logicamente uma resposta irreal, o que conseqüentemente compromete os valores do teor alcoólico. O aumento da concentração de própolis na obtenção do extrato leva evidentemente a um acréscimo na dissolução destes grupos e conseqüente di-

Bibliografia:

1. MARCUCCI, M. C. *Própolis: Chemical Composition, Biological properties and Therapeutic Activity*, Apidology, 1994.
2. AZEVEDO, I. B. S., SAMPAIO, R. F., MONTES, J. C., CONTRERAS, R. L. L. Tratamento de escaras de decúbito com própolis. *Rev. Bras. de Enf.*, v.39, p.33-7, 1986.
3. LAVIE, P. El antibiotico del propoleos. In: I International Beekeep Jubilee Congress, 1978, Bucarest. *Anais. Bucarest: Apimondia*, 1975. p.145-56.
4. *Farmacopéia Brasileira*. 4ed., São Paulo: Ateneu, 1988.
5. OSOL, A. Ed. *Remington's Pharmaceutical Sciences*. 16ed., Pennsylvania: Mack, 1980. p.1461.
6. NATIONAL FORMULARY. 14ed., Rockville: American Pharmaceutical Association, 1975. p.941.
7. WALKER, P., CRANE, E. Constituents of própolis. *Apidology*, v.18, p.327-34, 1987.
8. IOIRISH, N. Propoleos. In: *Propoleos - Investigaciones científicas y opiniones acerca de su composicion, características y utilizacion con fines terapêuticos*. Apimondia, Bucarest, 1975. 185p.
9. BUNNEY, M. H. Contact Dermatitis in Beekeepers due to propolis (Bee Glue). *Brit. J. Derm.*, v.80, p.17-23, 1968.
10. DOBROWOLSKI, J. W., VOHORA, S. B., SHARMA, K., SHAH, S. A., NAQVI, S. A., DANDIYA, P. C. Antibacterial, antifungal, anti-moebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *Journal of Ethnopharmacology*, v.35, p.77-82, 1991.
11. KOSONOCKA, L. Própolis fortalece o sistema imunológico. *Revista Brasileira de Apicultura*, (set/out), p.22-4, 1991. (Retirada e traduzido da revista *American Bee Journal* (julho), 1990).
12. HAY, K. D., GRIG, D. E. Propolis allergy: a cause of oral mucositis with ulceration. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, v.70, 584-6, 1990.
13. MOBUS, B. The importance of propolis to honey bees. *Brit. Bee J.*, v.19, p.199, 1972.
14. SINGH, Z. Propolis collection and its use. *Indian Bee J.*, v.34, p.11-9, 1972.
15. PARROT, E. L. *Galenical extraction*. 3ed. Minneapolis: Burgess Publishing, 1971. p.241-9.
16. BUNDESVEREINIGUNG Deutcher Apoteckerverbande ed. *Deutcher Arzneimittel - Codex*, 1986. Frankfurt: Govi- Deutcher Apotheker, 1979. Codex-Probe - modificada para extratos.
17. VANHAELEN, M., VANHAELEN-FASTRÉ, R. J. *Pharm. Belg.*, v.34, p.317-28, 1979.
18. MOREIRA, T. F. *Rer. Bras. Farmacog.* v.1, p.12-9, 1986.
19. MARCUCCI, M. C.; SALATINO, M. L.; SALATINO, A.; LOPES, C. M. A. Proc. IV Iberoamerican Meeting Apic., Ministerio da Agricultura, Ganaderia y Recursos Renovaveis, Rio Cuarto Argentina. p.193-6, 1994.
20. GREENAWAY, W.; MAY, J. and WHATLEY, F. R. *Journal of Chromatography*, v. 472, n.2, p.111-21, 1989.