Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Atividade antioxidante de extratos da própolis verde em sistemas lipídicos emulsionados

Renata Iara Cavalaro

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2017

Renata Iara Cavalaro
Bacharela em Ciências de Alimentos

Atividade antioxidante de extratos da própolis verde em sistemas lipídicos emulsionados

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Profa. Dra. **THAIS MARIA FERREIRA DE SOUZA VIEIRA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Cavalaro, Renata Iara

Atividade antioxidante de extratos da própolis verde em sistemas lipídicos emulsionados / Renata Iara Cavalaro - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - -Piracicaba, 2017.

88 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Oxidação 2. Antioxidantes naturais 3. Própolis verde 4. Extração 5. Ultrassom I. Título

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Eli e Antonio;

Aos meus irmãos Raul e Renan;

Aos meus sobrinhos Isabela, Eduardo, Olivia e Cecília,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela graça da vida, por sempre guiar meus caminhos e me proporcionar tantas bênçãos.

Aos meus pais Eli e Antonio por sempre cuidarem tão bem, todos os sacrifícios que fizeram para que eu encontrasse uma profissão que me trás felicidade, por toda confiança, amor e alegrias quando estamos juntos. Obrigada por tudo!

Aos meus irmãos Raul e Renan por todo o incentivo, motivação e felicidade proporcionados.

Aos meus sobrinhos Isabela, Eduardo, Olivia e Cecília por serem grandes preciosidades em minha vida, por todo amor e por me tornarem uma pessoa melhor a cada dia que passa. Amo vocês!

Agradeço também à toda família Viriato (Rodolfo, Gérsula, Bárbara e Ronan) pelas orações e acolhimento.

Agradeço à Professora Thais Maria Ferreira de Souza Vieira por me receber como aluna de mestrado e ter me dado a honra de ser sua orientada. Obrigada por todo apoio, palavras de sabedoria e por sempre estar disposta a ajudar.

A minha amiga Thalita Riquelme Augusto Obara, por nossa amizade que pretendo manter para sempre em minha vida. Por tirar minhas dúvidas, pelas corridas e papos na ESALQ, pela companhia e carinho.

As amigas Jéssica Aranha, Richtier Gonçalves e Ana Carolina Loro por me auxiliarem no desenvolvimento do projeto de mestrado e pelos momentos de descontração.

Aos amigos que conquistei durante o mestrado Rafael Vela, Thais Merlo, Samara Harada e Allana Patrícia pelos momentos de diversão, piadas e por estarem comigo durante nos momentos de angústia.

A toda minha família, pelas palavras de carinho e por acreditarem em mim.

Aos colegas do grupo ESALQ Food pela parceria e transmissão de conhecimento.

Às amigas Ana Carolina Clemente Campos, Anelique Pinto de Almeida, Amanda de Oliveira, Amanda Cristina Marabesi e Isadora Cristofoli Maia pela amizade, apoio e carinho.

Aos meus professores de graduação que foram uma grande inspiração para que meu desejo de fazer mestrado se tornasse realidade, em especial à Camila Rocha, Milene Dores, Allan Moraes e Evandro Galvão.

Aos membros da banca avaliadora: Professora Dra. Ana Paula Badan, Professora Dra. Suzana Caetano da Silva Lannes e Dra. Paula Porreli Moreira da Silva agradeço pela disponibilidade, correções e sugestões.

À Universidade de São Paulo por me possibilitar a realização de um mestrado de ótima qualidade.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo fornecimento da bolsa e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio.

A empresa Natucentro pelo fornecimento da amostra de própolis verde.

EPÍGRAFE

“Nas grandes batalhas da vida,
o primeiro passo para a vitória
é o desejo de vencer”.

Mahatma Gandhi

SUMÁRIO

RESUMO 9
ABSTRACT 10
1. INTRODUÇÃO 11
REFERÊNCIAS 12
2. ATUAÇÃO DO ULTRASSOM COMO METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS ANTIOXIDANTES DA PRÓPOLIS VERDE 15
RESUMO 15
ABSTRACT 15
2.1. OXIDAÇÃO LIPÍDICA E ANTIOXIDANTES 15
2.2. PRÓPOLIS VERDE 18
2.3. MÉTODOS DE EXTRAÇÃO 21
2.3.1. Extração assistida por ultrassom 22
2.4. MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE 23
2.4.1. Métodos baseados em transferência de hidrogênio 24
2.4.1.1. ORAC 24
2.4.1.2. TRAP 25
2.4.2. Métodos baseados em transferência de elétrons 25
2.4.2.1. ABTS 25
2.4.2.2. DPPH 26
2.4.2.3. FRAP 27
2.5. MÉTODOS DE INIBIÇÃO DA OXIDAÇÃO LIPÍDICA POR TESTES ACELERADOS 27
2.5.1. Schaal Oven Test ou teste de estufa 28
2.5.2. Oil Stability Index ou índice de estabilidade de óleo 28
2.6. CONSIDERAÇÕES FINAIS 28
REFERÊNCIAS 29
3. EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES DA PRÓPOLIS VERDE COM AUXÍLIO DE ULTRASSOM 39
RESUMO 39
ABSTRACT 39
3.1. INTRODUÇÃO 40
3.2. MATERIAL E MÉTODOS 41
3.2.1. Obtenção da amostra de própolis 41

3.2.2. Estudo do ponto de maior cavitação do banho de ultrassom 41
3.2.2.1. Erosão utilizando papel alumínio 41
3.2.3. Estudo do processo de extração por ultrassom 41
3.2.3.1. Obtenção de extratos antioxidantes 41
3.2.3.2. Delineamento experimental 42
3.2.4. Determinação do teor de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro 43
3.2.4.1. Determinação do teor de compostos fenólicos totais 43
3.2.4.2. Identificação e quantificação de ácidos fenólicos 43
3.2.5. Capacidade antioxidante pelo método ORAC 44
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....45
3.3.1. Estudo do ponto de maior cavitação do banho de ultrassom 45
3.3.2. Estudo do processo de extração 45
3.3.2.1. Efeito das variáveis independentes do processo sobre os compostos fenólicos totais (TPC) 46
3.3.2.1.1. Identificação e quantificação de ácidos fenólicos.....49
3.3.3. Efeito das variáveis independentes do processo sobre a capacidade antioxidante por ensaio ORAC 52
3.3.4. Otimização da extração para todas as respostas 54
3.4. CONSIDERAÇÕES FINAIS 56
REFERÊNCIAS 56
4. OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES DA PRÓPOLIS VERDE POR ULTRASSOM E APLICAÇÃO EM SISTEMA LIPÍDICO EMULSIONADO 61
RESUMO.....61
ABSTRACT 61
4.1. INTRODUÇÃO.....62
4.2. MATERIAL E MÉTODOS.....63
4.2.1. Obtenção da amostra de própolis 63
4.2.2. Estudo do processo de extração por ultrassom 64
4.2.2.1. Obtenção de extratos antioxidantes 64
4.2.2.2. Delineamento experimental 64
4.2.3. Determinação do teor de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro 65

4.2.3.1. Determinação do teor de compostos fenólicos totais 65
4.2.3.2. Identificação e quantificação de ácidos fenólicos 66
4.2.4. Capacidade antioxidante 66
4.2.4.1. Capacidade antioxidante pelo método ABTS 66
4.2.4.2. Capacidade antioxidante pelo método ORAC 67
4.2.5. Aplicação dos extratos obtidos em sistema modelo 67
4.2.5.1. Preparo de emulsões 67
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 68
4.3.1. Efeito das variáveis independentes do processo sobre os compostos fenólicos totais (TPC) 69
4.3.2. Efeito das variáveis independentes do processo sobre a capacidade antioxidante dos compostos da própolis verde (TAA) 73
4.3.2.1. ABTS (2,2 azinobis- (3-etilbenzotiazolina)-6-ácido sulfônico) 73
4.3.2.2. ORAC (Oxygen radical absorbance capacity) 75
4.3.3. Identificação e quantificação dos compostos fenólicos 78
4.3.4. Aplicação do extrato em emulsão lipídica 80
4.3.4.1. Determinação do teor de hidroperóxido 80
4.4. CONSIDERAÇÕES FINAIS 83
4.5. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 83
4.6. CONCLUSÕES FINAIS DO TRABALHO 83
REFERÊNCIAS 84

RESUMO

Atividade antioxidante de extratos da própolis verde em sistemas lipídicos emulsionados

O uso de antioxidantes sintéticos pela indústria de alimentos como forma de inibir ou retardar a oxidação lipídica tem sido amplamente questionado em relação à saúde do consumidor. Por isso, diversos estudos são realizados visando sua substituição por antioxidantes de fontes naturais, como os obtidos a partir da própolis verde. Neste contexto, a forma de extração influencia a composição e a atividade antioxidante dos produtos derivados, sendo um processo a ser estudado visando a obtenção não somente da extração dos compostos de interesse como também de vantagens operacionais. Este trabalho apresenta uma revisão bibliográfica e experimentos sobre a reação da oxidação lipídica, bem como os antioxidantes sintéticos e naturais para substituição. Além disso, vários métodos de avaliação da capacidade e extração de antioxidantes, com atenção especial ao ultrassom, considerando que ainda não foi relatado em estudos com a própolis verde, apesar de ser considerado um dos melhores métodos de uso por alguns autores. Neste trabalho a extração de compostos antioxidantes de própolis verde com auxílio de ultrassom foi avaliada por meio da aplicação de delineamentos experimentais visando a otimização das condições de processo. Utilizou-se o delineamento central composto rotacional (DCCR) com 12 ensaios, sendo 4 pontos centrais para ambos os capítulos. Os extratos obtidos nas condições de processo otimizadas foram aplicados em emulsões lipídicas. No primeiro delineamento experimental analisado foram obervados efeitos significativos do tempo de processo e da proporção solvente:matéria prima sobre o teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante, determinada pelo método ORAC, dos extratos obtidos. Por meio de análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) pôde-se identificar que o aumento do tempo de extração e da proporção solvente:matéria prima influenciaram positivamente a extração do Artepelin C e do ácido *p*-cumárico. Buscando-se melhorar a produtividade do processo de extração, foi aplicado um segundo delineamento experimental, fixando-se a variável tempo em 20 minutos e variando-se a concentração de etanol e relação amostra:solvente. Os extratos produzidos com uso de etanol anidro (99% v/v) e proporção própolis:solvente de 0,857:30 m/v, apresentaram atividade antioxidante e teores de Artepelin C e ácido *p*-cumárico superiores aos encontrados nos extratos obtidos do experimento anterior, evidenciando a importância do estudo sequencial para otimização do processo de extração. Os extratos produzidos nas condições otimizadas foram aplicados em emulsões lipídicas submetidas a teste acerelado de oxidação. As amostras adicionadas de extrato de própolis verde apresentaram grau oxidativo semelhante àquela adicionada do antioxidante sintético TBHQ, muito utilizado pela indústria de alimentos e questionado quanto aos seus efeitos sob a saúde do consumidor. Os resultados indicaram que extrato de própolis verde obtido em condições otimizadas representam uma alternativa para uso como antioxidante em sistema lipídico.

Palavras-chave: Oxidação; Antioxidantes naturais; Própolis verde; Extração; Ultrassom

ABSTRACT

Antioxidant activity of extracts of green propolis in emulsified lipid systems

Synthetic antioxidants, used by the food industry to inhibit or retard the oxidation, has been correlated with problems of consumer's health. Therefore, several studies are carried out to replace them by antioxidants from natural sources, such as a green propolis. In this context, the extraction form influences the composition and antioxidant capacity of the derived products, so it must be studied aiming not only the extraction of the compounds of interest, but also to obtain operational advantages. This work presents a bibliographical review and experiments about the reaction of lipid oxidation, as well as the synthetic and natural antioxidants for substitution. In addition, several methods of evaluating antioxidant capacity and extraction, with special attention to ultrasound, were discussed, which has not been reported in a study with a green própolis yet, despite of being considered one of the best methods of use by some authors. In this work the extraction of green propolis's antioxidant compounds with ultrasound was evaluated by the application of experimental designs to optimize the process conditions. The Central Composite Rotational Design (CCRD) was used with 12 essay and 4 central points for both chapters. The extracts obtained under the optimized process conditions were applied in lipid emulsions.In the first experimental design applied to extraction process, it was verified that variables time and the sample:solvente relation presented positive effects on phenolic content and antioxidant activity determined by ORAC method. Results of high performance liquid chromatography (HPLC) indicated that increasing time of extraction and sample:solvent proportion allowed a higher extraction of Artepelin C and *p*-coumaric acid. In order to obtain the optimal extraction condition, a second experiamental design was applied, aimimg to use as little sample as possible in a low extraction time. In this experiment, etanol concentration and sample:solvent relation were studied. Extracts obtained using 99% v/v etanol, 0.857: 30 m/v ratio during 20 minutes presents higher amounts of Artepelin C and *p*-coumaric acid compared to previous results. Extracts obtained under opmized condition was added to lipid emulsions subjected to accelerater oxidation test. The samples with propolis extracts presented peroxide values similar to samples added of TBHQ, a synthetic antioxidant widely used by the food industry and questioned due to its effects on consumer health. Results indicate propolis extracts represent a potential alternative to synthetic antioxidant for food use.

Keywords: Oxidation; Natural antioxidants; Green propolis; Extraction; Ultrasound

1. INTRODUÇÃO

A oxidação lipídica representa uma das principais causas de deterioração em alimentos e gera uma série de alterações que resultam em rejeição do produto, devido a alterações no *flavour*, características visuais e valor nutritivo (ARAÚJO, 2011). A utilização de antioxidantes surge neste contexto para inibir ou retardar a ocorrência da oxidação lipídica, agindo sobre os radicais livres, sequestrando-os ou impedindo sua formação (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004). Na indústria de alimentos os antioxidantes sintéticos são amplamente utilizados, especificamente o butilhidroxitolueno (BHT), butil-hidroxianisol (BHA), terc-butilhidroxiquinona (TBHQ), tri-hidroxi-butilfenona (THBP) e propil galato (PG). No entanto, seu uso tem despertado algumas preocupações devido à toxidade desses produtos e problemas que podem ser causados à saúde do ser humano. Por isso, a substituição de antioxidantes sintéticos por antioxidantes naturais tem se tornado uma alternativa necessária. No entanto, além da busca por fontes alternativas aos antioxidantes sintéticos, é necessário estudar a viabilidade técnica de sua obtenção visando uma produção em escala industrial.

A própolis é uma alternativa de substituição dos antioxidantes sintéticos utilizados atualmente. A determinação do tipo de própolis é dependente da origem geográfica e botânica da espécie e fonte vegetal utilizada pelas abelhas (ALENCAR et al., 2005). No caso da própolis verde a principal espécie vegetal é a *Baccharis dracunculifolia* (alecrim-do-campo), que é utilizada pelas abelhas *Apis mellifera*.

A própolis é constituída por resina e bálsamo, coletada por abelhas de ramos de plantas, flores, pólen, brotos e exsudatos de árvores (LUSTOSA et al., 2008). Dentre as própolis conhecidas, a própolis verde brasileira é constituída principalmente de derivados prenilados do ácido *p*-cumárico e seu marcador qúimico é o Artepilin C (ácido 3,5 –diprenil-4-hidroxicinâmico). Possui propriedades biológicas distintas, tais como poder anti-bacteriano, antiviral, anti-inflamatório, anticarcinogênico, anti-fúngico, anti-tumoral e antioxidante (AHN et al., 2007; CABRAL et al., 2009; MACHADO et al., 2012). Sendo esta última uma propriedade biológica conhecida, pesquisas ainda são necessárias e à respeito da extração de compostos fenólicos, propriedade antioxidante e aplicação de extratos da própolis verde em produtos alimentícios, visando sua utilização como antioxidante natural.

Os métodos de extração de antioxidantes de fontes naturais necessitam de melhoria na eficiência, tendo como resultado a redução do volume de reagente, do tempo de processo e custos, além do mínimo de perdas, ou seja, utilização de um método que proporcione a otimização do processo e indique respostas desejáveis. A extração sólido-líquido com auxílio de ultrassom é uma alternativa aos métodos existentes, já que possibilita o uso de menores níveis de energia, consumo de pequena quantidade de solventes e manutenção de baixas temperaturas, evitando danos térmicos (BRIONES-LABARCA et al., 2015; OROIAN; ESCRICHE, 2015). Devido às vantagens do ultrassom como metodologia de extração de compostos fenólicos de fontes naturais, houve um aumento no número de estudos nesta área, evidenciando este método sobre os demais utilizados, como foi observado por Morelli e Prado (2012); Ghafoor e Choi (2009) e Nour; Tandafir; Cosmulescu (2016).

O estudo do processo de extração de compostos antioxidantes por meio de delineamentos experimentais e técnicas de otimização pode indicar as condições para melhor produtividade do processo de obtenção de extratos. Não há uma escolha universal para métodos de determinação da capacidade antioxidante, porém os mais conhecidos são o 2,2'-azino-bis-3-etilbenztiazolina-6-sulfónico (ABTS) e 1,1-difenil -2-picrilhidrazil (DPPH), entre outros, como o poder antioxidante de redução do ferro (FRAP), capacidade de absorção de radicais de oxigénio (ORAC), sistema modelo β-caroteno/ácido linoleico e *Folin-Ciocalteu* (FLOEGEL et al., 2011; ARAÚJO, 2011). Nesse trabalho, o uso de ultrassom na extração de compostos ativos da própolis verde foi estudado, bem como a aplicação dos extratos obtidos em sistemas lipídicos. Com isso espera-se um avanço do conhecimento visando o uso de antioxidantes naturais na indústria de alimentos.

O Capítulo 2 apresenta uma introdução geral e objetivos gerais do trabalho, bem como uma revisão bibliográfica abordando sobre oxidação lipídica e antioxidantes, meios de extração destes componentes e avaliação da capacidade antioxidante.

No capítulo 3 é apresentado o estudo da otimização da extração de compostos fenólicos da própolis verde por meio do ultrassom, sua atividade antioxidante *in vitro*, identificação e quantificação de compostos ativos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com o uso de um delineamento experimental e análise de superfície de resposta para escolha do ensaio com condições de extração mais eficiente no que diz respeito à concentração de compostos fenólicos antioxidantes.

Já no capítulo 4 são apresentados os resultados do ensaio otimizado aplicado em emulsão lipídica, comparado à três antioxidantes sintéticos (BHA, BHT e TBHQ).

1.1 OBJETIVO GERAL

Produzir extratos antioxidantes a partir da própolis verde com emprego de soluções hidroalcoólicas e ultrassom e avaliar o efeito da adição dos extratos produzidos em condições otimizadas nas emulsões lipídicas em comparação com três antioxidantes sintéticos testados (BHA, BHT E TBHQ).

REFERÊNCIAS

AHN, M. R.; KUMAZAWA, S.; USUI, Y.; NAKAMURA, J.; MATSUKA, M.; ZHU, F.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. **Food Chemistry**, Londres, v. 101, n. 4, p. 1383-1392, mar. 2007.

ARAÚJO, J. **Química de alimentos: teoria e prática**. 4ª ed. Viçosa: Ed. UFV, 2011.

BRIONES-LABARCA, V.; PLAZA-MORALES, M.; GIOVAGNOLI-VICUÑA, C.; JAMETT, F. High hydrostatic pressure and ultrasound extractions of antioxidant compounds, sulforaphane and fatty acids from Chilean papaya (Vasconcellea pubescens) seeds: Effects of extraction conditions and methods. **LWT-Food Science and Technology**, Londres, v. 60, n. 1, p. 525-534, jan. 2015.

CABRAL, I. S. R.; OLDONI, T. L. C.; PRADO, A.; BEZERRA, R. M. N.; ALENCAR, S. M. D.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P. L. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1523-1527, jul. 2009.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 1, fev. 2004.

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.

GHAFOOR, K.; CHOI, Y. H. Optimization of ultrasound assisted extraction of phenolic compounds and antioxidants from grape peel through response surface methodology. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, Seul, v. 52, n. 3, p. 295-300, abr. 2009.

LUSTOSA, S. R.; GALINDO, A. B.; NUNES, L. C.; RANDAU, K. P.; ROLIM NETO, P. J. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 18, n. 3, p. 447-454, jul./set. 2008.

MACHADO, J. L.; ASSUNÇAO, A. K. M.; DA SILVA, M. C. P.; REIS, A. S. D.; COSTA, G. C.; ARRUDA, D. D. S.; BERRETTA, A. A.. Brazilian green propolis: anti-inflammatory property by an immunomodulatory activity. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, São Paulo, v. 2012, nov. 2012.

MORELLI, L. L. L.; PRADO, M. A. Extraction optimization for antioxidant phenolic compounds in red grape jam using ultrasound with a response surface methodology. **Ultrasonics sonochemistry**, Oxford, v. 19, n. 6, p. 1144-1149, nov. 2012.

NOUR, V.; TRANDAFIR, I.; COSMULESCU, S. Optimization of ultrasound-assisted hydroalcoholic extraction of phenolic compounds from walnut leaves using response surface methodology. **Pharmaceutical biology**, Lisse, v. 54, n. 10, p. 2176-2187, mar. 2016.

OROIAN, M.; ESCRICHE, I. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. **Food Research International**, Barking, v. 74, p. 10-36, ago. 2015.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L.; PAREDES-GUSMÁN, J. Composição química de Baccharis dracunculifolia, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Ciencia Rural**, Santa Maria, v. 35, p. 909-915, jul./ago. 2005.

2. ATUAÇÃO DO ULTRASSOM COMO METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS ANTIOXIDANTES DA PRÓPOLIS VERDE

Resumo

A oxidação lipídica é uma das principais causas de deterioração de alimentos e o uso de antioxidantes sintéticos como forma de previni-la ou retardá-la tem se tornado questionável no quesito saúde do consumidor. Os diversos compostos fenólicos, como ácido caféico, ferúlico, cinâmico e cumárico, que são encontrados em produtos naturais como a própolis verde, podem ser usados como compostos antioxidantes na indústria de alimentos. Sua forma de extração é uma etapa necessária de ser estudada, já que nela ocorre o isolamento, identificação e uso destes compostos. O ultrassom tem se destacado frente à outros métodos por ser simples e eficiente, principalmente quando utilizado em otimizações variando as condições de processo.

Palavras-chave: Oxidação lipídica; Compostos fenólicos; Extração

Abstract

Lipid oxidation is one of the main causes of food deterioration and the use of synthetic antioxidants as a way of preventing or delaying has become questionable in consumer's health area. The various phenolic compounds, such as caffeic, ferulic, cinnamic and cumaric acid, found in natural products such as green propolis, can be used as antioxidant compounds in the food industry. Its form of extraction is a very important stage, since in it occurs the isolation, identification and use of these compounds. Ultrasound has stood out against others methods because it is a simple and efficient method, especially in the case of optimization of the method by dealing with the variables involved in the process.

Keywords: Lipid oxidation; Phenolic compounds; Extraction

2.1. Oxidação lipídica e Antioxidantes

A deterioração de alimentos é um fenômeno gradativo, que ocorre durante o processamento, distribuição e armazenamento do produto, que provoca alterações indesejáveis no *flavour*, na aparência e no valor nutritivo nos alimentos (ARAÚJO, 2011). Em alimentos ricos em óleos e gorduras, a oxidação lipídica é considerada uma das principais reações de deterioração, obtendo como produtos os aldeídos voláteis, responsáveis pelo ranço (ANDREO; JORGE, 2006). A oxidação lipídica dos ácidos graxos insaturados possui diversos iniciadores, incluindo oxigênio, calor e íons metálicos, os quais colaboram para que a reação se desenvolva (ANTOLOVICH et al, 2002). Estes iniciadores se envolvem na decomposição de hidroperóxidos e resultam em compostos que desencadeiam alterações sensoriais (*off flavour*), além de mudanças nutricionais e descoloração nos alimentos (FELTES et al., 2010; ARAÚJO, 2011).

A reação de oxidação é dividida em três estágios: inicial, de propagação e terminal. Inicialmente, o oxigênio ativado interage com um iniciador, reagindo com um ácido graxo insaturado, havendo a retirada de um átomo de hidrogênio do carbono metilênico adjacente à ligação dupla carbono-carbono. Durante a propagação, ocorre a formação de hidroperóxidos e esta etapa da reação se propaga até o esgotamento de oxigênio e ácidos graxos insaturados. A fase terminal é caracterizada, a partir da decomposição dos hidroperóxidos, pela formação de produtos finais estáveis ou não reativos como álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres e outros hidrocarbonetos, como pode ser observado na figura 1 (FERRARI, 1998; KIRK, 1984).

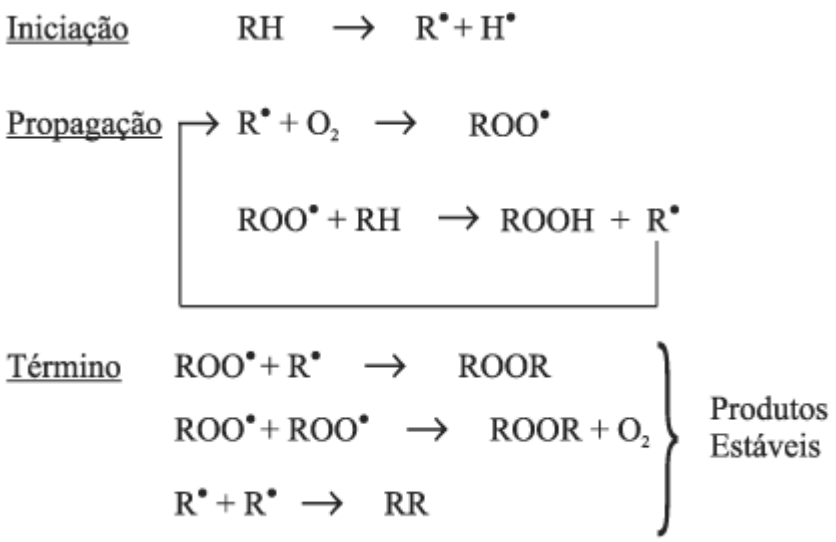

Figura 1. Etapas da oxidação lipídica.

Legenda: RH – Ácido graxo insaturado; R• - Radical livre;
ROO• - Radical pexóxido; ROOH – Hidroperóxido.
Fonte: Farmer et al. (1942).

Os antioxidantes são substâncias capazes de proteger o alimento contra a oxidação lipídica, sequestrando ou impedindo a formação de radicais livres, que promovem a continuidade da oxidação dos óleos e/ou das gorduras (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004). Os principais componentes antioxidantes dos alimentos são os compostos fenólicos (ROGINSKI; LISSI, 2005). Os antioxidantes podem atuar inibindo a autoxidação, a fotoxidação ou a oxidação enzimática. Na autoxidação, ocorrem dois mecanismos de controle da reação, onde os antioxidantes atuam como bloqueadores de reações em cadeia ou se complexam com metais. Os bloqueadores de reação em cadeia são divididos em doadores e receptores de elétrons, sendo que os doadores de elétrons competem com o lipídeo pelo radical peroxil, resultando na diminuição da velocidade de reação, enquanto que os receptores competem com o oxigênio triplete pelo radical livre, reduzindo a formação do radical peroxil (YANISHLIEVA-MASLAROVA; GORDON, 2001).

A escolha do melhor antioxidante para a preservação do alimento depende de propriedades como: eficácia em baixas concentrações (0,001% a 0,01%); ausência de mudanças na coloração, odor, sabor e em outras características do alimento; compatibilidade com o alimento; estabilidade nas condições de processamento e armazenamento; e ausência de toxicidade (DECKER, et al. 2005;

RAMALHO; JORGE, 2006). Sua atuação sobre os alimentos depende essencialmente do grau de instauração do ácido graxo, além de estrutura, tipo e solubilidade do substrato oxidável (FRANKEL; MEYER, 2000). A solubilidade é a característica do antioxidante que determina sua distribuição sobre as fases existentes no sistema (KOLEVA et al., 2002).

Duas categorias básicas separam os antioxidantes: sintéticos e naturais. No geral os sintéticos são compostos fenólicos contendo vários graus de substitutos alquila, enquanto os naturais podem ser compostos fenólicos, quinonas, lactonas e polifenóis (MARTINEZ-TOME et al., 2001). Os antioxidantes sintéticos com maior utilização na indústria de alimentos são compostos fenólicos como Butil-hidroxianisol (BHA), Butil-hidroxitolueno (BHT), Terc-butilhidroquinona (TBHQ) e Propil Galato (PG) (SOUSA et al., 2007; CONEGLIAN et al., 2011). Estes antioxidantes são chamados de antioxidantes primários, onde encontram-se compostos fenólicos poli-hidroxilados e fenóis, atuam formando um complexo antioxidante-lipídio.

Apesar dos benefícios propiciados pelos antioxidantes sintéticos na indústria de alimentos, pelo aumento da vida útil, estes são considerados potencialmente carcinogênicos, provocam males devido ao aumento do peso do fígado, proliferam-se no retículo endoplasmático, além de serem tóxicos dependendo da quantidade adicionada ao produto (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004). No Brasil, o limite máximo estabelecido e permitido para a adição destes antioxidantes, é de 0,02 g/100 g de óleos e gorduras para BHA e TBHQ e de 0,01 g/100 g de BHT (BRASIL, 2005). No Canadá e na Comunidade Econômica Européia o TBHQ não tem sua utilização permitida (REISHCE et al., 1997).

Devido à toxicidade apresentada por alguns antioxidantes sintéticos, o uso de antioxidantes naturais tem se tornado uma alternativa promissora e economicamente mais viável, podendo proporcionar possíveis benefícios à saúde dos consumidores, devido aos efeitos funcionais de seus compostos bioativos polifenólicos (HUBER et al., 2012, VIERA, 2012). Entre os antioxidantes naturais, os mais empregados são os tocoferóis, ácidos fenólicos e extratos de plantas, como alecrim, sálvia e própolis (RAMALHO; JORGE, 2006). Os flavonoides, incluindo flavonas, flavonóis e isoflavonas, são considerados o grupo mais abundante, possuindo boa atividade antioxidante em emulsões. Eles atuam sequestrando radicais, formando complexos e desativando o oxigênio singlete (MENDONÇA, 2009).

O emprego de antioxidantes em sistemas multifásicos demonstra que a eficiência é diretamente afetada pela solubilidade dos compostos que compreendem as fases da emulsão. Sendo assim, o conhecimento sobre a afinidade do antioxidante por óleo ou água é essencial para adquirir eficácia nos resultados de atividade antioxidante de compostos fenólicos. Bandyopadhyay, Chakraborty e Raychaudhuri (2007), avaliaram a substituição de antioxidantes sintéticos (TBHQ, BHA, BHT), por antioxidantes naturais (beterraba, gengibre e hortelã). De acordo com os resultados relatados, o uso de BHA e BHT pode ser substituído por todas as fontes naturais avaliadas, isoladamente ou de forma combinada, com exceção do TBHQ que somente pôde ser substituído pela combinação de hortelã e gengibre.

O avanço nas pesquisas de agentes antioxidantes naturais se mostram importantes no sentido de obter aditivos alimentícios com menos efeitos colaterais possíveis de doenças e redução

nas características indesejáveis encontradas nos atuais antioxidantes empregados (SMITH; DOYLE; MURPHY, 2015). Galati e O'brien (2004), sugerem que este campo deve ser mais explorado, a fim de comprovar a eficácia de flavonoides e outros compostos fenólicos e seus potenciais de toxicidade.

2.2. Própolis Verde

A própolis é um produto natural que vem sendo utilizado pela civilização durante séculos, desde 300 a.C (DA SILVA et al., 2006; VARGAS et al., 2004). Sabe-se que os egípcios inicialmente utilizavam as propriedades anti-putrefativas da própolis para embalsamar cadáveres (CASTALDO; COMPASSO, 2002). Na África, ao final do século XIX, foi amplamente utilizada por suas propriedades cicatrizantes (PINTO et al, 2004), enquanto no Brasil, apenas na década de 80 começaram-se os estudos pioneiros com a própolis, baseando-se em seu caráter terapêutico (ABREU, 2008).

A palavra própolis é derivada do grego “pro”, que significa “em defesa” e “polis” que significa “cidades”, indicando ser portanto uma defesa da colmeia (DE ALMEIDA; MENEZES, 2002).

Própolis é uma substância complexa, formada por resina e bálsamo, coletada por abelhas de ramos de plantas, flores, pólen, brotos e exsudatos de árvores. Quando dentro da colmeia, é adicionada de enzimas secretadas pelas próprias abelhas (LUSTOSA et al., 2008). A mistura obtida é utilizada para própria proteção contra outros insetos, bactérias e fungos, e até mesmo contra o vento (PARK et al., 2001).

No geral, contém 50 - 60% de resinas e bálsamos, 30 - 40% de ceras, 5 - 10% de óleos essenciais, 5% de grão de pólen, além de microelementos como alumínio, cálcio, estrôncio, ferro, cobre, manganês e pequenas quantidades de vitaminas B1, B2, B6, C e E (PARK et al., 2001; LUSTOSA et al., 2008). A variação destes componentes ocorre principalmente de acordo com a sazonalidade (SOUZA et al., 2010).

Assim como os componentes encontrados na própolis, a coloração também varia com sua procedência, mudando sua tonalidade em amarelo, marrom, verde, vermelho e preto. Na Europa, América do Norte e oeste da Ásia, a fonte dominante de própolis é o exsudato do botão de álamo (*Populus sp*.). Entretanto, na América do Sul esta espécie não é nativa, podendo ser extraído de árvores como: assa-peixe, aroeira, eucalipto e alecrim (PARK et al., 2000; LUSTOSA et al., 2008). Outras espécies vegetais empregadas como fontes de própolis em várias partes do mundo são pinheiros, carvalho, salgueiro, acácia, entre outras (MARKHAM et al., 1996).

De acordo com o boletim do SEBRAE (2014), o interesse internacional pela compra da própolis vem crescendo ao longo dos anos, sendo que o Brasil está em terceiro lugar no ranking mundial em termos de produção, com 70% produzida no estado de Minas Gerais. Além disso, de 29 toneladas da própolis produzidas neste estado, 20 toneladas são de própolis verde de acordo com a Cooperativa Nacional de Apicultura (Conap). A produção anual no Brasil esta estimada em torno de 50 a 150 toneladas/ano e 75% é exportado (LIMA, 2008).

Há relatos de que esta substância possui várias atividades biológicas sob estudo: como anti-bacteriana, antiviral, anti-inflamatório, anticarcinogênica, anti-fúngica, anti-tumoral e antioxidante

(AHN et al., 2007; BUFALO; CANDEIAS; SFORCIN, 2009; CABRAL et al., 2009; KUMAZAWA et al., 2004). Algumas de suas atividades biológicas, podem ser atribuídas aos componentes químicos presentes na própolis, que derivam parcialmente do seu elevado teor de flavonoides e ácidos fenólicos (AHN et al., 2007; DA SILVA et al., 2006). No Brasil, a legislação vigente preconiza que o extrato etanólico de própolis deve conter pelo menos 0,25% de flavonóides e 0,50% de componentes fenólicos com relação ao peso seco (BRASIL, 2001).

Alves e Kubota (2013) verificaram em seu estudo, que a alta atividade antioxidante da própolis pode vir dos compostos fenólicos e dos flavonoides, como quercetina, flavonas, isoflavonas, flavononas, antocianinas, catequinas e isocatequinas. MENDES DA SILVA et al. (2006) correlacionaram a atividade antioxidante da própolis aos níveis de fenólicos, indicando que os flavonoides desempenham papel importante para desempenho de tal atividade.

Foram classificados 12 tipos de própolis no Brasil, de acordo com sua origem botânica, características físico-químicas e composição química, no entanto, recentemente o 13º. tipo foi identificado como “própolis vermelha” (BORGES et al., 2004; CABRAL et al., 2009). Estas classificações foram realizadas através de avaliações de atividades antimicrobiana e antioxidante da substância e de um perfil químico obtido pelas seguintes técnicas: espectrometria de absorção na região UV – visível, cromatografia de camada delgada de alta eficiência (CCDAE) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (PARK et al., 2000).

A própolis vermelha foi encontrada posteriormente no Brasil, concentrando-se ao longo do mar e costas de rios no Nordeste, a qual foi classificada como própolis do grupo 13. Sua coloração é nomeada vermelha devido ao exsudado vermelho coletado da superfícies de *Dalbergia ecastophyllum* (ABREU, 2008). Originalmente, este tipo de própolis é típico de Cuba e da Venezuela, onde as origens botânicas foram identificadas como *Clusia nemorosa* e *Clusia scrobiculata*, respectivamente (TRESHEVA et al., 2006).

Alencar et al. (2007) identificaram quatro isoflavonas presentes na própolis vermelha, não encontradas nas demais própolis brasileiras, com propriedades antimicrobiana, anticarcinogênica e antioxidante: dihidroxiisoflavona, homopterocarpina, medicarpina e 4’,7-dimethoxi-2’-isoflavona. Tshusheva et al. (2006) avaliaram a presença obrigatória de benzofenonas preniladas como constituintes principais deste tipo de própolis, diferenciando-as da própolis verde.

A própolis brasileira possui em sua composição química como principal contribuinte para sua atividade antioxidante os derivados de ácidos fenólicos, os quais eliminam radicais livres, protegendo a membrana celular contra a peroxidação lipídica (JACOBO-VELÁZQUEZ; CISNEROS-ZEVALLOS, 2009; MARCUCCI; WOISKY; SALATINO, 1998). Wysocki Júnior (2013) verificou que a maior atividade antioxidante observada na fração hidrolipídica de seu extrato de própolis verde, coincidiu com a fração que apresenta maior concentração de fenólicos totais, enquanto no extrato hidroetanólico bruto, que apresentou resultado semelhante quanto à atividade antioxidante, outras substâncias estavam presentes.

No Brasil, a mais bem estudada é a chamada própolis verde ou própolis Alecrim, que se origina a partir de *Baccharis dracunculifolia* (família *Asteraceae*) (TRUSHEVA et al., 2006; DA SILVA FROZZA et al., 2013). Possui em sua composição ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido cinâmico,

pinobasksina, canferol, kaempferide, isosakuranetina, crisina, acacetina, artepelin C, dentre outros (FONSECA, 2007). É produzida normalmente em São Paulo e Minas Gerais e constituída principalmente de derivados prenilados do ácido *p*-cumárico (LUSTOSA et al., 2008).

O composto volátil mais abundante do extrato de própolis verdes em diclorometano é o 3-prenilcinamato de alila que é facilmente detectável via cromatografia gasosa e pode servir como marcador químico deste tipo de própolis, já que é mais abundante e encontrado apenas na própolis verde (NASCIMENTO et al., 2008; CHANG et al., 2008). Wysocki Júnior (2013) afirma que a substância denominada Artepelin C (ácido 3,5 –diprenil-4-hidroxicinâmico) é considerado um dos principais marcadores químicos da própolis verde (Figura 2).

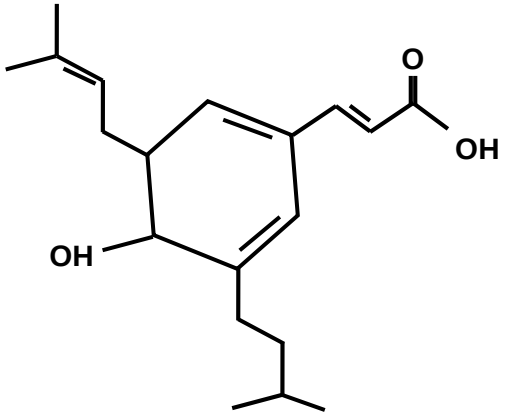

Figura 2. Estrutura químida do Artepelin C.
Fonte: adaptado de Wysocki Júnior, 2013.

Admite-se portanto, que substâncias formadas a partir do ácido cinâmico e seus derivados (ácidos p-cumárico, caféico, ferúlico, e sinápico) como a Artepelin C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico), são características da própolis verde (SALATINO et al., 2005; TEIXEIRA et al., 2005). Chang et al. (2008) afirmaram que os compostos majoritários encontrados em seu extrato etanólico (95%) de própolis verde foram compostos cinâmicos e seus derivados, flavonoides, ácido benzoico, compostos aromáticos não hidroxilados, ácidos alifáticos e ésteres. A tabela 1 apresenta os principais compostos químicos encontrados em própolis verde extraídas no Brasil.

Tabela 1. Principais compostos químicos encontrados na própolis verde brasileira

Autores	Local de coleta	Composição encontrada
Salgueiro e Castro (2016)	São Paulo - SP	Ácido clorogênico e rosmarínico, flavonoides canferide e canferol, Artepelin C.
Fernandes-Silva et al. (2013)	Três Pontas - MG	Ácidos benzenopropanóico, drupanina, Artepelin C, ácido cinâmico.
Funari e Ferro (2016)	Cabreúva - SP	Ácido clorogênico, cafeico, ferúlico, para-cumárico, Artepelin C, flavonoides canferida e isossacuranetina.
De Sousa et al. (2007)	Cajurú – SP e Oliveira/Itamogi - MG	Ácido cafeico, cumárico, acid drupanina, Artepelin C, dimethyl-6-carboxyethenyl-2H-1-benzopyran.

A averiguação da atividade do antioxidante sobre o alimento é essencial para analisar o efeito de sua adição e suas possíveis influências negativas, como alterações no *flavour* e cor do produto, tornando-o indesejável aos olhos do consumidor. Neste sentido, alguns trabalhos recentes têm estudado a aplicação do própolis em alimentos. Em um estudo sobre a aplicação do extrato de própolis do Canadá em bebidas lácteas, foi observado que as bebidas enriquecidas com ácido linoleico conjugado quando eram adicionadas de extratos a capacidade antioxidante aumentava, além da produção de aldeídos ter diminuído significativamente durante a armazenagem sob exposição de luz (COTTICA et al., 2015). Spinelli et al (2015) afirmam em seu trabalho, que a utilização da própolis encapsulada aumenta seu potencial antioxidante, além de mascarar seu sabor quando inserido no produto alimentício. Viera (2012) avaliando o efeito do extrato de própolis como antioxidante em linguiça toscana, verificou que o extrato mostrou-se efetivo no controle da oxidação lipídica, enquanto a aceitabilidade (sabor e odor) variaram entre 66,1% e 70,0% para os tratamentos testados. Kunrath et al. evidenciam que a própolis tem alto potencial de aplicação em produtos cárneos como antioxidante natural.

2.3. Métodos de extração

Estudos têm sido realizados na busca pela melhoria da eficiência de extração de antioxidantes naturais, com redução do volume de reagente, do tempo de processo e substituição de técnicas tradicionais. As técnicas tradicionais de extração, ou também conhecidas como convencionais, são consideradas demoradas, possuem baixa eficiência e podem afetar a fração extratora, além disso, se forem utilizadas altas temperaturas durante longo tempo, a fração pode perder sua atividade biológica (PRASAD et al., 2009). Além disso, na metodologia de extração convencional (EC) ou *conventional extraction* há perdas por ionização, hidrólise e oxidação e o processo deve ser realizado na ausência de luz e oxigênio (NAYAK et al., 2015; HAYAT et al., 2009).

Os métodos mais comuns são: o processamento de alta pressão, ultrassom, irradiação gama, extração por fluido supercrítico, Soxhlet e microondas (AKTAS; YILDIZ, 2011; PRASAD et al., 2009). Para serem considerados ideais, os métodos não devem ser destrutivos e devem colaborar para que as taxas de extração sejam altas (NAYAK et al., 2015).

Trusheva, Trunkova e Bankova (2007) e Briones-Labarca et al. (2015) afirmaram que a extração assistida por micro-ondas (EAM) ou *microwave-assisted extraction*, alta pressão hidrostática (APH) ou *high pressure extraction* e a extração ultrasssônica (EU) ou *ultrasound-assisted extraction* estão entre as tecnologias mais promissoras para extração em plantas. Estes métodos baseiam-se essencialmente na seleção adequada de solvente e energia, visando aumentar a solubilidade química e transferência de massa (CORRALES et al., 2008).

Alta pressão hidrostática, campo elétrico pulsado e ultrassom pertencem às tecnologias respeitadoras do ambiente e energeticamente eficientes (CORRALES et al., 2008).

O método assistido por micro-ondas ocorre em recipientes selados de extração, onde estão contidas a amostra e o solvente, sob condições de temperatura e pressão controladas. Por ocorrer em meio fechado, os recipientes permitem a elevação muito alta da temperatura do solvente, podendo atingir seu ponto de ebulição, encurtando o tempo de extração e aumentando a eficiência do processo (BALLARD et al., 2010). É considerado eficaz e econômico, sua utilização reduz o tempo de extração e utilização menor de solventes (PAN et al., 2008; WANG et al., 2010).

As micro-ondas aplicadas são campos elétricos e magnéticos, sua energia atua como radiação não ionizante, que causa radiação dos dipolos, porém não afeta a estrutura molecular e sua frequência varia de 300 a 300.000 MHz (WANG et al., 2010).

Zigoneanu et al (2008) afirmaram que o hexano foi considerado o melhor solvente para o processo de MAE, por não absorver energia das micro-ondas, evitando assim a degradação dos componentes termolábeis. Nayak et al. (2015) concluíram em seu estudo que a metodologia EAM, contribuiu não só para uma maior recuperação do teor de fenólicos totais, mas também na qualidade de compostos fenólicos, com rica atividade antioxidante.

A metodologia APH baseia-se na aplicação de pressão de 100 - 800 MPa, podendo chegar até mesmo a 1000 MPa. É considerado um método eficaz e rápido quando comparado aos outros, apesar de poder causar alterações estruturais nos alimentos, por deformações celulares, dano na membrana e desnaturação de proteínas. Sua utilização pode melhorar a taxa de transferência de massa, a permeabilidade de solvente nas frações celulares, bem como a difusão de metabólitos secundários nestas frações (DORNENBURG; KNORR, 1993; AHMED; RAMASWAMY, 2006).

Prasad et al. (2009) compararam a eficiência do método APH com o método convencional (EC), verificando redução do tempo de extração do EC para o APH e melhor atividade antioxidante deste último.

2.3.1. Extração assistida por ultrassom

A metodologia por ultrassom pode ser realizada em dois tipos de equipamentos: o banho ultrassônico e a sonda ultrassônica. No banho ultrassônico as amostras são submersas dentro de um

objeto de vidro, ocorre uma melhora da solubilidade das partículas sólidas da amostra em solvente. O segundo método, a sonda ultrassônica, é considerado mais potente quando comparado ao banho, neste caso, a sonda é imersa no balão da reação, causando menos atenuações (CHEMAT; KHAN, 2011).

A extração assistida por ultrassom é um método que representa vantagens pela alta eficiência, por demandar menor consumo energético e requerer pequena quantidade de solvente, além disso, pode ser utilizado em baixas temperaturas, evitando danos térmicos (BRIONES-LABARCA et al., 2015; OROIAN; ESCRICHE, 2015).

O ultrassom, devido ao seu alto poder de transferência de massa por forças de cavitação, apresenta bolhas presentes no líquido-sólido de extração, que podem causar colapso celular na planta, gerando pressão localizada, rompendo o tecido, facilitando a liberação de substâncias intracelulares para o solvente (CORRALES et al., 2008). Suslick e Price (1999) e Chemat et al. (2017) afirmam ainda que as bolhas de cavitação geram efeitos físicos que afetam a amostra analisada, podendo gerar fragmentação e erosões na mesma.

Quando utilizado como uma unidade de processo no pré-tratamento, o método pode ser capaz de aumentar a extração de componentes, tais como: polifenóis, antocianinas, compostos aromáticos, polissacarídeos, óleos e compostos funcionais, além disso o uso deste tipo de extração proporciona maior rendimento com redução do tempo de processo, e é comercialmente viável para aplicação em escala industrial (VILKHU et al., 2008).

Jug, Končić e Kosalec (2014) avaliaram a eficiência da maceração quando comparada ao método de extração por EU em amostras de própolis, verificando que este último se apresentou superior quanto ao rendimento.

Xu et al. (2017) avaliaram em seu trabalho o efeito de fatores como concentração de etanol, proporção de solvente:amostra, tempo e temperatura na extração de antioxidantes naturais da flor de *Limonium sinuatum*, concluindo que a concentração de etanol e a proporção de solvente:amostra avaliados foram considerados significativos no rendimento da extração.

A variação da temperatura de processo do EU foi avaliada por Afshari, Samavati e Shahidi (2015). Os autores concluíram em uma análise da atividade antioxidante de polissacarídeos, que o aumento da temperatura, até atingir 95°C, aumenta o rendimento de extração devido ao aumento na solubilidade.

Industrialmente, a utilização do EU mostrou-se vantajosa pelo aumento da taxa global de extração, possibilidade de utilização de solventes alternativos, baixo investimento, aumento da extração de compostos sensíveis ao calor (CHEMAT; KHAN, 2011).

2.4. Métodos de avaliação da capacidade antioxidante

A capacidade antioxidante é utilizada como parâmetro indicador da presença de compostos bioativos nos alimentos (ARAÚJO, 2011). É descrita pela capacidade das moléculas redox de eliminar os radicais livres presentes (FLOEGEL et al., 2011). Pode ser avaliada *in vitro* ou *in vivo*, sendo que nos métodos *in vitro* estão envolvidos desde métodos químicos com substratos lipídicos à

ensaios mais complexos, utilizando técnicas instrumentais, por avaliação colorimétrica, biológica e eletroquímica (BORGES et al., 2011; ALVES et al., 2010).

Metodologias *in vitro* possuem algumas desvantagens por não medirem fatores como: biodisponibilidade, estabilidade *in vivo*, retenção dos antioxidantes pelos tecidos e reatividade (CRUZ, 2008; VASCONCELOS et al., 2007).

Neste contexto, a eficiência do antioxidante pode ser medida através da transferência de átomos de hidrogênio (TAH) ou *hydrogen atom transfer*, medindo a capacidade do antioxidante em desativar os radicais peroxila por meio da doação de hidrogênio, a medição também pode ocorrer pela transferência de elétrons (TE) ou *single electron transfer*, neste tipo de ensaio o antioxidante é avaliado quanto à sua capacidade em reduzir oxidantes pela transferência de um elétron (HUANG; PRIOR, 2005). Os principais métodos, seus princípios, vantagens e desvantagens são apresentados a seguir.

2.4.1. Métodos baseados em transferência de hidrogênio

Os métodos baseados em transferência de hidrogênio medem a habilidade do antioxidante em eliminar ou desativar os radicais livres através da doação de hidrogênio. Este tipo de reação é independente do pH e do solvente utilizado e ocorre rapidamente, finalizando em minutos e até mesmo segundos, porém, possui limitação quando há a presença de agentes redutores como o metal, afetando a reatividade aparente (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). Estão inclusos nesta classificação: ORAC (oxygen radical absorbance capacity) e TRAP (total radical-trapping antioxidante parameter).

2.4.1.1. ORAC

O método ORAC é baseado na transferência de átomos de hidrogênio em que ocorre uma reação competitiva entre o antioxidante e o substrato (alimento) pelo radical peroxil, este radical é formado a partir do composto dicloreto de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) (AAPH). Neste caso, a reação ocorre entre o radical com a fluoresceína (composto fluorescente), porém com a remoção do radical peroxil por meio do antioxidante há um retardo da perda da fluorescência (BECKER; NISSEN; SHIBSTED, 2004; FLOEGEL et al., 2011; ARAÚJO, 2011).

A intensidade da fluoresceína é medida a cada minuto no total de 35 minutos em condições pré estabelecidas de pH e temperatura (MACDONALD-WICKS; WOOD; GARG, 2006). Este método é totalmente automatizado, no entanto necessita de controle de temperatura, já que a reação que ocorre no meio é sensível à mesma. O resultado da atividade antioxidante por ORAC é expresso através do cálculo da medida da área sob a curva de decaimento da fluorescência, comumente dados em equivalentes de Trolox, necessitando também de uma curva padrão com 5 concentrações (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

2.4.1.2. TRAP

Neste método ocorre um controle entre o radical peroxil e a sonda através do antioxidante, que monitora a capacidade do mesmo em reagir com os componentes citados acima. A reação possui como requisito de realização a presença de sonda reativa com $ROO^{\cdot}$ em baixas concentrações, além disso, nenhuma reação em cadeia de radicais além da oxidação da sonda deve ocorrer. Em alimentos e bebidas este ensaio pode ser aplicado *in vitro,* tendo seus resultados expressos em Trolox, assim como o ORAC (SANCHEZ-MORENO, 2002).

2.4.2. Métodos baseados em transferência de elétrons

Estes métodos baseiam-se na capacidade de transferir elétron com o objetivo de reduzir compostos como radicais e metais. Quando esta reação ocorre, há uma mudança da coloração do oxidante acompanhada à ela, sendo sua descoloração dependente da concentração de antioxidante presente (ARAÚJO, 2011).

São considerados métodos lentos, sendo assim, o cálculo é realizado em porcentagem de redução do produto e não a partir da cinética como é realizado no TAH (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

Nesta classificação, encontram-se métodos como: ABTS (2,2'-azino-bis-3-etilbenztiazolina-6-sulfónico), DPPH (2’2-diphenyl-1-picrilhydrazil), FRAP (ferric reducing antioxidante power) e Folin-Ciocalteu (fenóis totais).

2.4.2.1. ABTS

Na metodologia de ABTS, adiciona-se persulfato de potássio para formar quimicamente o radical $ABTS^{+\bullet}$ (coloração azul – esverdeado), visando facilitar a observação do comportamento espectral do ABTS, que absorve luz na região do visível (734 nm) somente na forma radicalar ($ABTS^{+\bullet}$). Neste caso, o antioxidante regenerará a forma radicalar, promovendo a descoloração da solução tampão fosfato, adicionada em função do material a ser analisado (Figura 3). A intensidade da coloração será correlacionada à mesma intensidade ocasionada pelo padrão analítico Trolox® (ácido 6-hidróxi-2-5-7-8- tetrametilcromo2-carboxílico), um análogo hidrossolúvel da vitamina E (BECKER; NISSEN; SKIBETED, 2004). O ABTS é aplicável ao estudo de antioxidantes hidrossolúveis e lipossolúveis, compostos puros e extratos vegetais (AUGUSTO et al., 2015).

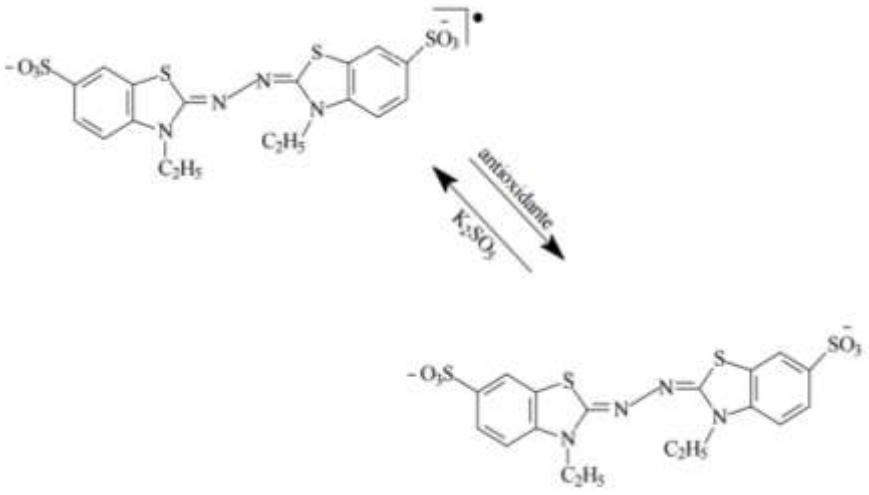

Figura 3. Comportamento espectral do ABTS.
Fonte: Cruz, 2008.

Floegel et al. (2011) compararam os métodos de ABTS e DPPH em alimentos com maior poder antioxidante consumidos nos EUA. Verificaram que os ensaio de ABTS resultaram em melhores estimativas da capacidade antioxidante de alimentos, quando comparado ao DPPH, em particular quando analisados frutos, vegetais e bebidas contendo compostos antioxidantes hidrofílicos, lipofílicos e pigmentados.

2.4.2.2. DPPH

O método de determinação da capacidade antioxidante DPPH é considerado prático, rápido e estável. Baseia-se na capacidade do radical estável 1,1 –diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH$^{\bullet}$) de reagir com doadores de hidrogênio. O radical DPPH$^{\bullet}$ é um radical de nitrogênio orgânico, possui coloração violeta e absorção máxima na faixa de 515 a 520 nm. A redução do radical é monitorada pelo decréscimo da absorbância, a solução perde sua coloração violeta, tornando-se amarelada. Isso ocorre devido ao desemparelhamento do elétron proveniente do átomo de nitrogênio do DPPH, que recebe um átomo de hidrogênio, proveniente do antioxidante, promovendo a mudança de cor. Ali et al. (2008) realizaram a reação estequiométrica do radical DPPH, representado por Z', como uma molécula doadora de hidrogênio (AH) (Equação 1):

$$Z' + AH \rightarrow ZH + A' \qquad (1)$$

Trata-se de uma metodologia aplicável em análise de extrato de frutas, grãos e farelos, vegetais, ervas e óleos de sementes comestíveis, utilizando diferentes solventes como etanol, acetona, metanol e benzeno (CHENG; MOORE; YU, 2006; MOON; SHIBAMOTO, 2009). Cabral et al. (2009), verificaram em sua pesquisa com a própolis vermelha, que o método DPPH tem se mostrado vantajoso sobre os outros métodos, pois o resultado não é afetado pela polaridade do substrato.

2.4.2.3. FRAP

O ensaio de FRAP, diferentemente dos outros métodos, baseia-se na habilidade das substâncias fenólicas em reduzir o ferro férrico (Fe^{3+}) à ferro ferroso (Fe^{2+}) em baixo pH, sem a existência de radicais livres envolvidos (VASCONCELOS et al., 2007). Mede-se portanto, a capacidade antioxidante na redução do complexo incolor (ferritripiridiltriazina) (Fe^{3+} - TPTZ) para o complexo ferroso azul ferroso-tripiridiltriazina (Fe^{2+} - TPTZ), devido à doação de elétron pelo antioxidante (FLOEGEL et al., 2011; PELLEGRINI et al., 2006). O antioxidante utilizado neste caso deve ser obrigatoriamente hidrofílico, já que o método ocorre em meio aquoso (ARAÚJO, 2011). Os resultados desta metodologia são expressos em equivalentes micromol de Trolox/g de amostra (em base seca) ou equivalente em milimol de Fe^{2+}/kg de amostra (PELLEGRINI et al., 2006). A principal desvantagem deste método baseia-se no fato de que, substrato oxidável não é incluso no método, assim a capacidade redutora do método pode não refletir necessariamente a atividade antioxidante (RAVELLI, 2011).

Thaipong et al. (2006) compararam a eficiência dos métodos ABTS, DPPH, FRAP, e ensaios de ORAC para estimar atividades antioxidantes do ácido ascórbico, fenólicos totais e carotenoides totais nos extratos de goiaba. Verificaram em seus resultados, que todas as metodologias apresentaram-se compatíveis para a atividade antioxidante medida, porém a técnica FRAP mostrou alta reprodutibilidade, foi simples, rapidamente realizada e maior correlação com ambos ácido ascórbico e compostos fenólicos.

2.5. Métodos de inibição da oxidação lipídica por testes acelerados

A avaliação da oxidação lipídica é realizada em alimentos com o objetivo de verificar as condições químicas, físicas ou organolépticas de alimentos gordurosos (SHAHIDI; WANASUNDARA, 2008). Industrialmente, é necessária como medida de prevenção e controle da qualidade de óleos e gorduras. Esta avaliação pode ser realizada em condições normais ou aceleradas, sendo que esta última permite estimar rapidamente a eficácia teórica de um antioxidante, de forma isolada ou em associação (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

Os testes de oxidação acelerada são considerados simples e específicos para aplicação em análise de alimentos (SHIMANO, 2012). Objetivando resultados fiéis, estes testes devem ser realizados durante um período de tempo de indução, visando simular as condições que o alimento é exposto (FRANKEL, 1993). A avaliação da oxidação do alimento por meio de testes acelerados permite estudar a estabilidade oxidativa da amostra, além da eficácia do antioxidante (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999). Dentre os testes acelerados utilizados em óleos e gorduras estão o teste de estufa Schaal Oven Test e o Rancimat.

2.5.1. *Schaal Oven Test* ou teste de estufa

Dentre os testes acelerados, o teste de estufa é o mais utilizado por apresentar poucos inconvenientes, sua eficácia é resultado de cada dia de armazenamento na temperatura de 60 - 70° C, correspondente à um mês de armazenamento à temperatura ambiente. Entre os intervalos estabelecidos são retiradas amostras, que podem ser analisadas quanto à eficácia do antioxidante sobre oxidação lipídica. As metodologias mais utilizadas são: índice de peróxido, índice de acidez e absortividade no UV (KRISTOTT, 2000). Este método é limitado pelo fato de não relacionar o prazo de validade com a estabilidade oxidativa e propriedades sensoriais do óleo (KRISTOTT, 2000).

Os resultados obtidos neste teste apresentam boa correlação com o teste realizado em condições normais de armazenamento, com temperatura não controlada (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

2.5.2. *Oil Stability Index* ou índice de estabilidade de óleo

O método de índice de estabilidade do óleo difere do armazenamento em condições ambiente com relação ao controle do fluxo de ar e temperatura, acelerando a oxidação (FARHOOSH, 2007). Seu equipamento é responsável por determinar automaticamente o tempo de indução, além disso, os compostos voláteis formados durante a oxidação alteram exponencialmente a condutividade da água, assim é possível identificar o período de indução, medido em horas.

É limitado, já que requer altos níveis de oxidação e não é aplicável à compostos termolábeis. Outro inconveniente é que alguns antioxidantes são sensíveis à altas temperaturas ou até mesmo voláteis e por isso a resposta pode ser subestimada (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

2.6. Considerações Finais

A escolha do melhor antioxidante para impedir a continuidade da oxidação lipídica é dependente de diversos fatores, no entanto, a forma com que o mesmo é extraído age diretamente no rendimento da amostra analisada. Por isso, estudos baseados nas diversas formas de extração em antioxidantes naturais são necessários, assim será possível determinar a melhor metodologia otimizada para cada extrato e se esta é realmente eficaz para atuar sobre reações deteriorantes. Neste sentido, o emprego de soluções hidroalcoólicas e a utilização do ultrassom como medida de acelerar o processo de extração com altos rendimentos de compostos fenólicos deve ser considerado em estudos da área, que procuram solucionar problemas de degradação de alimentos no segmento agroalimentar.

REFERÊNCIAS

ABREU, A. P. L. de. **Estudo comparativo da atividade antiinflamatória e antifúngica de extratos de própolis vermelha e verde**. 2008. 70 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia Clínica) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

AFSHARI, K.; SAMAVATI, V.; SHAHIDI, S. Ultrasonic-assisted extraction and in-vitro antioxidant activity of polysaccharide from Hibiscus leaf. **International journal of biological macromolecules**, Guildford, v. 74, p. 558-567, mar. 2015.

AHMED, J.; RAMASWAMY, H. S. High pressure processing of fruits and vegetables. **Stewart Postharvest Review**, Londres, v. 2, n. 1, p. 1-10, fev. 2006.

AHN, M. R.; KUMAZAWA, S.; USUI, Y.; NAKAMURA, J.; MATSUKA, M.; ZHU, F.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. **Food Chemistry**, Londres, v. 101, n. 4, p. 1383-1392, mar. 2007.

AKTAS, E. T.; YILDIZ, H. Effects of electroplasmolysis treatment on chlorophyll and carotenoid extraction yield from spinach and tomato. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 106, n. 4, p. 339-346, out. 2011.

ALENCAR, S. M.; OLDONI, T. L. C.; CASTRO, M. L.; CABRAL, I. S. R.; COSTA-NETO, C. M.; CURY, J. A.; IKEGAKI, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 113, n. 2, p. 278-283, set. 2007.

ALI, S. S.; KASOJU, N.; LUTHRA, A.; SINGH, A.; SHARANABASAVA, H.; SAHU, A.; BORA, U. Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. **Food Research International**, Barking, v. 41, n. 1, p. 1-15, out. 2008.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. D. L.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, out. 2010.

ALVES, E.; KUBOTA, E. H. Conteúdo de fenólicos, flavonoides totais e atividade antioxidante de amostras de própolis comerciais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 34, n. 1, p. 37-41, abr. 2013.

ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 24, n. 2, fev./dez. 2006.

ANTOLOVICH, Michael et al. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, Londres, v. 127, n. 1, p. 183-198, nov. 2002.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos**: teoria e prática. 5ª ed. Viçosa: Ed. UFV, 2011. 601 p.

AUGUSTO, T. R.; MARTIN, J. G. P.; DA MATTA JUNIOR, M. D.; VIEIRA, T. M. F DE S. Atividade antioxidante e aplicação de extratos vegetais em alimentos. In: Workshop de Ciências da APG/ESALQ: O Despertar Profissional, n°1, 2015, Piracicaba. **Anais do I Workshop de Ciências da APG/ESALQ: "O despertar profissional"**. Piracicaba:resurso eletrônico, 2015. p. 6-17.

BALLARD, T. S.; MALLIKARJUNAN, P.; ZHOU, K.; O'KEEFE, S. Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidant compounds from peanut skins. **Food Chemistry**, Londres, v. 120, n. 4, p. 1185-1192, jun. 2010.

BANDYOPADHYAY, M.; CHAKRABORTY, R.; RAYCHAUDHURI, U. A process for preparing a natural antioxidant enriched dairy product (Sandesh). **LWT-Food Science and Technology**, Londres, v. 40, n. 5, p. 842-851, jun. 2007.

BECKER, E. M.; NISSEN, L. R.; SKIBSTED, L. H. Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects review. **European Food Reasearch and Technology**, Berlin, v. 219, p. 561-571, out. 2004.

BORGES, L. L.; LÚCIO, T. C.; GIL, E. D. S.; BARBOSA, E. F. Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, Centro Científico Conhecer de Goiânia, v. 7, p. 12, maio. 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC N° 23, de 15 de fevereiro de 2005. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 15 de fevereiro de 2005. Aprova o "Regulamento técnico do uso de aditivos alimentares, estabelecendo suas funções e seus limites máximos para a categoria de alimentos óleos e gorduras – subcategoria creme vegetal e margarinas". **Diário Oficial da União**, Brasília, 16 fev. 2005. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br.> Acesso em: 30/07/2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento (MAA). Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa Nº3, de 19 de janeiro de 2001. Anexo VII. Brasília, DF; 2001.

BRIONES-LABARCA, V.; PLAZA-MORALES, M.; GIOVAGNOLI-VICUÑA, C.; JAMETT, F. High hydrostatic pressure and ultrasound extractions of antioxidant compounds, sulforaphane and fatty acids from Chilean papaya (Vasconcellea pubescens) seeds: Effects of extraction conditions and methods. **LWT-Food Science and Technology**, Londres, v. 60, n. 1, p. 525-534, jan. 2015.

BORGES, E. C.; DA SILVA, L. C.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Caracterização química de extratos etanólicos de própolis com atividade inibitória do crescimento de estafilococos isolados de mastite bovina. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, Ponta Grossa, v. 8, n. 1, jul. 2014.

BUFALO, M. C.; CANDEIAS, J. M.; SFORCIN, J. M. In vitro cytotoxic effect of Brazilian green propolis on human laryngeal epidermoid carcinoma (HEp-2) cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, São Paulo, v. 6, n. 4, p. 483-487, ago. 2009.

CABRAL, I. S. R.; OLDONI, T. L. C.; PRADO, A.; BEZERRA, R. M. N.; ALENCAR, S. M. D.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P. L. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1523-1527, jul. 2009.

CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, Milano, v. 73, p. S1-S6, nov. 2002.

CHANG, R.; PILÓ-VELOSO, D.; MORAIS, S. A.; NASCIMENTO, E. A. Analysis of a Brazilian green propolis from Baccharis dracunculifolia by HPLC-APCI-MS and GC-MS. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 18, n. 4, p. 549-556, out./nov. 2008.

CHEMAT, F.; KHAN, M. K. Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. **Ultrasonics sonochemistry**, Oxford, v. 18, n. 4, p. 813-835, jul. 2011.

CHEMAT, F.; ROMBAUT, N.; SICAIRE, A. G.; MEULLEMIESTRE, A.; FABIANO-TIXIER, A. S.; ABERT-VIAN, M. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications: A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, Oxford, v. 34, p. 540-560, jan. 2017.

CHENG, Z.; MOORE, J.; YU, L. High-throughput relative DPPH radical scavenging capacity assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, 54: 7429-7436, set. 2006.

CONEGLIAN, S. M.; DA SILVA LIMA, B.; DA SILVA, L. G.; LAZZARI, C. M.; SERRANO, R. D. C.; TONELLO, C. L. Utilização de antioxidantes nas rações. **PUBVET**, Londrina, V. 5, N. 5, Ed. 152, Art. 1026, 2011.

COTTICA, S. M.; SABIK, H.; BÉLANGER, D.; GIROUX, H. J.; VISENTAINER, J. V.; BRITTEN, M. Use of propolis extracts as antioxidant in dairy beverages enriched with conjugated linoleic acid. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 241, n. 4, p. 543-551, jun. 2015.

CORRALES, M.; TOEPFL, S.; BUTZ, P.; KNORR, D.; TAUSCHER, B. Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: a comparison. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 9, n. 1, p. 85-91, jan. 2008.

CRUZ, APG. **Avaliação do efeito da extração e da microfiltração do açaí sobre sua composição e atividade antioxidante. 2008. 88 p**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

DA SILVA FROZZA, C. O.; GARCIA, C. S. C.; GAMBATO, G.; DE SOUZA, M. D. O.; SALVADOR, M.; MOURA, S. DELLAGOSTIN, O. A. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 52, p. 137-142, fev. 2013.

DA SILVA, J. F. M.; DE SOUZA, M. C.; MATTA, S. R.; DE ANDRADE, M. R.; VIDAL, F. V. N. Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. **Food Chemistry**, Londres, v. 99, n. 3, p. 431-435, jul. 2006.

DE ALMEIDA, E. C.; MENEZES, H. Anti-inflammatory activity of propolis extracts: a review. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, Botucatu, v. 8, n. 2, p. 191-212, jul. 2002.

DE SOUSA, J. P.; BUENO, P. C.; GREGORIO, L. E.; DA SILVA FILHO, A. A.; FURTADO, N. A.; DE SOUSA, M. L.; BASTOS, J. K. A reliable quantitative method for the analysis of phenolic compounds in Brazilian propolis by reverse phase high performance liquid chromatography. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 30, n. 16, p. 2656-2665, jul. 2007.

DECKER, E. A.; WARNER, K.; RICHARDS, M. P.; SHAHIDI, F. Measuring antioxidant effectiveness in Foods. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Kansas, v. 53, p. 4303-4310, abr. 2005.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 1, fev. 2004.

DORNENBURG, H.; KNORR, D. Cellular permeabilization of cultured plant tissues by high electric field pulses or ultra high pressure for the recovery of secondary metabolites. **Food Biotechnology**, Nova York, v. 7, n. 1, p. 35-48, dez. 1993.

FARHOOSH, R. Shelf-life prediction of edible fats and oils using Rancimat. **Lipid technology**, High Wycombe, v. 19, n. 10, p. 232-234, out. 2007.

FARMER, E. H., BLOOMFIELD, G. F., SUNDRALINGAM, A., SUTTON, D. A. The course and mechanism of autoxidation reactions in olefinic and polyolefinic substances, including rubber. **Transactions of the Faraday Society**, Londres, v. 38, p. 348-356, abr. 1942.

FELTES, M.; CORREIA, J. F.; BEIRÃO, L. H.; BLOCK, J. M.; NINOW, J. L.; SPILLER, V. R. Alternatives for adding value for the fish processing wastes. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 14, n. 6, p. 669-677, dez. 2010.

FERNANDES-SILVA, C. C.; SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F.; BREYER, E. D.; NEGRI, G. Chemical profiling of six samples of Brazilian propolis. **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 2, p. 237-240, fev. 2013.

FERRARI, C. K. B. Oxidação lipídica em alimentos e sistemas biológicos: mecanismos gerais e implicações nutricionais ep mecanismos gerais e implicações nutricionais e patológicas tológicas. **Revista de Nutricão**, Campinas, v. 11, n. 1, p. 3-14, jan./jun. 1998.

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**, San Diego, v. 24, n. 7, p. 1043-1048, nov. 2011.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Análise de própolis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 171-178, jan/mar. 2006.

FONSECA, Y. M. **Desenvolvimento de formulações tópicas contendo extrato própolis verde: estudos de estabilidade, liberação, permeação e retenção cutânea. 2007. 169 p**. Dissertação (Mestrado em medicina e cosméticos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

FRANKEL, E. N. In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 4, n. 7, p. 220-225, jul. 1993.

FRANKEL, E. N.; MEYER, A. S. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Londres, v. 80, n. 13, p. 1925-1941, ago. 2000.

GALATI, G.; O'BRIEN, P. J. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. **Free Radical Biology and Medicine**, Nova York, v. 37, n. 3, p. 287-303, ago. 2004.

HAYAT, K.; HUSSAIN, S.; ABBAS, S.; FAROOQ, U.; DING, B.; XIA, S.; XIA, W. Optimized microwave-assisted extraction of phenolic acids from citrus mandarin peels and evaluation of antioxidant activity in vitro. **Separation and Purification Technology**, Nova York, v. 70, n. 1, p. 63-70, nov. 2009.

HUANG, S. W.; HOPIA, A.; SCHWARZ, K.; FRANKEL, E. N.; GERMAN, J. B. Antioxidant activity of r-tocopherol and trolox in different lipid substrates: bulk oils vs oil-in-water emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 44, n. 2, p. 444-452, fev. 1996.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of agricultural and food chemistry,** Easton, v.53, p.1841-1856, fev. 2005.

HUBER, K.; DE QUEIROZ, J. H.; MOREIRA, A. V. B.; RIBEIRO, S. M. R. Caracterização química do resíduo agroindustrial da manga Ubá (Mangifera indica L.): uma perspectiva para a obtenção de antioxidantes naturais. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, Ponta Grossa, v. 6, n. 1, fev. 2012.

JACOBO-VELÁZQUEZ, D. A.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Correlations of antioxidant activity against phenolic content revisited: a new approach in data analysis for food and medicinal plants. **Journal of Food Science**, Champanhe, v. 74, n. 9, p. R107-R113, out. 2009.

JUG, M.; KONČIĆ, M. Z.; KOSALEC, I. Modulation of antioxidant, chelating and antimicrobial activity of poplar chemo-type propolis by extraction procures. **LWT-Food Science and Technology**, Londres, v. 57, n. 2, p. 530-537, jul. 2014.

KRISTOTT, J. Fats and oils. In: KILCAST, D.; SUBRAMNIAM, P.(Ed). **The stability and shelf-life of food**. Cambridge: Woodhead., 2000. Cap. 12, p. 279-310.

KIRK, J.R. Biological availability of nutrients in processed foods. **Journal of Chemical Education**, Easton, v.61, n. 4, p.364-367, abr. 1984.

KOLEVA, I. I.; VAN BEEK, T. A.; LINSSEN, J. P.; GROOT, A. D.; EVSTATIEVA, L. N. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. **Phytochemical Analysis**, Sussex, v. 13, p. 8-17, dez. 2002.

KUNRATH, C. A.; SAVOLDI, D. C.; MILESKI, J. P. F.; NOVELLO, C. R.; ALFARO, A. D. T.; MARCHI, J. F.; TONIAL, I. B. Application and evaluation of propolis, the natural antioxidant in Italian-type salami. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 20, fev. 2017.

LIMA, G. Estudo sobre mel, cera e própolis. **ApexBrasil, Brasília**, 2008.

LUSTOSA, S. R.; GALINDO, A. B.; NUNES, L. C.; RANDAU, K. P.; ROLIM NETO, P. J. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 18, n. 3, p. 447-454, jul./set. 2008.

MACHADO, J. L.; ASSUNÇAO, A. K. M.; DA SILVA, M. C. P.; REIS, A. S. D.; COSTA, G. C.; ARRUDA, D. D. S.; BERRETTA, A. A.. Brazilian green propolis: anti-inflammatory property by an immunomodulatory activity. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, São Paulo, v. 2012, nov. 2012.

MACDONALD-WICKS, L. K.; WOOD, L. G.; GARG, M. L. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Londres, v. 86, n. 13, p. 2046-2056, ago. 2006.

MARCUCCI, M. C.; WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Uso do cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis. **Mensagem doce**, Mossoró, v. 46, p. 3-8, jun. 1998.

MARKHAM, K. R.; MITCHELL, K. A.; WILKINS, A. L.; DALDY, J. A.; LU, Y. HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zeland propolis. **Phytochemistry**, Nova York, v. 42, n. 1, p. 205-211, maio. 1996.

MARTÍNEZ-TOMÉ, M.; JIMÉNEZ, A. M.; RUGGIERI, S.; FREGA, N.; STRABBIOLI, R.; MURCIA, M. A. Antioxidant properties of Mediterranean spices compared with common food additives. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 64, n. 9, p. 1412-1419, set. 2001.

MENDES DA SILVA, J. F.; DE SOUZA, M. C.; MATTA, S. R.; DE ANDRADE, M. R.; VIDAL, F. V. N. Correlation analysis between phenolic level of Brazilian própolis extracts and this antimicrobial and antioxidants activities. **Food Chemistry**, Londres, v. 99, n. 3, p. 431-435, jul. 2006.

MENDONÇA, A. C. **Atividade antioxidante de poliaminas e comparação com produtos naturais e sintéticos**. 2009. 86 p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

MOON, J. K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant assays for plant and food componentes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, n. 5, p. 1655-1666, jan. 2009.

NASCIMENTO, E. A.; CHANG, R.; MORAIS, S. A.; PILÓ-VELOSO, D.; REIS, D. C. Um marcador químico de fácil detecção para a própolis de Alecrim-do-Campo (Baccharis dracunculifolia). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 18, n. 3, p. 379-86, jun. 2008.

NAYAK, B.; DAHMOUNE, F.; MOUSSI, K.; REMINI, H.; DAIRI, S.; AOUN, O.; KHODIR, M. Comparison of microwave, ultrasound and accelerated-assisted solvent extraction for recovery of polyphenols from Citrus sinensis peels. **Food chemistry**, Londres, v. 187, p. 507-516, nov. 2015.

OROIAN, M.; ESCRICHE, I. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. **Food Research International**, Barking, v. 74, p. 10-36, ago. 2015.

PAN, Y.; WANG, K.; HUANG, S.; WANG, H.; MU, X.; HE, C.; HUANG, F. Antioxidant activity of microwave-assisted extract of longan (Dimocarpus Longan Lour.) peel. **Food Chemistry**, Londres, v. 106, n. 3, p. 1264-1270, fev. 2008.

PARK, Y. K.; DE ALENCAR, S. M.; DE AGUIAR, C. L.; SCAMPARINI, A. R.; GONZÁLEZ, M.; MOLINA, M. A. Comparação das características físico-químicas das própolis produzidas na região sub-tropical da América do Sul: evidência fitoquímica de sua origem botânica. **Análise**, Jundiaí, v. 13, p. 8, dez. 2001.

PARK, Y. K.; INEGAKI, M.; ALENCAR, S. M.; WANG, H. K.; BASTOW, K.; COSENTINO, M.; LEE, K. H. Determinação das atividades citotóxica e anti-HIV dos extratos etanólicos de própolis coletadas em diferentes regiões do Brasil. **Mensagem Doce**, Mossoró, v. 56, p. 2-5, maio 2000.

PELLEGRINI, N.; SERAFINI, M.; SALVATORE, S.; DEL RIO, D.; BIANCHI, M.; BRIGHENTI, F. Total antioxidant capacity of spices, dried fruits, nuts, pulses, cereals and sweets consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. **Molecular nutrition and food research**, Weinheim, v. 50, n. 11, p. 1030-1038, out. 2006.

PINTO, A. C. D. V. A.; WITT, L. N. M.; SÁ, M. M. D. C. M.; VIANA, S. L. R. Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcoólico de própolis. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 1, p. 159-163, jun. 2004.

PRASAD, K. N.; YANG, E.; YI, C.; ZHAO, M.; JIANG, Y. Effects of high pressure extraction on the extraction yield, total phenolic content and antioxidant activity of longan fruit pericarp. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 10, n. 2, p. 155-159, abr. 2009.

PRIOR, R. L.; CAO, G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods 1. **Free Radical Biology and Medicine**, Nova York, v. 27, n. 11, p. 1173-1181, dez. 1999.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 10, p. 4290-4302, abr. 2005.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 755, jul./ago. 2006.

RAVELLI, D. **Estabilidade oxidativa de óleo de soja adicionado de extratos de especiarias: correlação entre parâmetros físico-químicos e avaliação sensorial**. 2011. 113 p. Tese (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

REISHCE, D.W.; LILLARD, D.A.; EITENMILLER, R.R.; AKOH, C.C.; MIN, D.B. **Antioxidants**. 3ª. Edição. Nova York: CRC Press, 1997, p. 409–432.

ROGINSKI, V; LISSI, E.A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**. Londres, v.92, p.235-254, set. 2005.

SALATINO, A.; TEIXEIRA, É. W.; NEGRI, G. Origin and chemical variation of Brazilian propolis.**Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Oxford, v. 2, n. 1, p. 33-38, jan. 2005.

SALGUEIRO, F. B.; CASTRO, R. N. Comparison between chemical composition and antioxidant activity of different extracts of green propolis. **Química Nova**, São Paulo, v. 39, n. 10, p. 1192-1199, dez. 2016.

SEBRAE. Boletim: **O mercado da própolis.** http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/cdb856e1dedd81e245438b6ba5ea2c4f/$File/4612.pdf - acessado em 24/03/17.

SHANTHA, N. C.; DECKER, E. A. Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 15, n. 77, p. 421-4, abr. 1994.

SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, U. N. Methods for measuring oxidative rancidity in fats and oils. In: AKOH, C. C.; MIN, D. B. (ed). **Food Lipids: chemistry, nutrition and biotechnology**, 3a. ed., Nova York: CRC Press, 2008. Cap 14, p. 347-408.

SHIMANO, M. Y. H. **Ação antioxidante de extratos de especiarias e suas misturas binárias e ternárias sobre a estabilidade oxidative de óleo de soja**. 2012. 113 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

SILVA, F. AM; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 94-103, jan./fev. 1999.

SMITH, H.; DOYLE, S.; MURPHY, R. Filamentous fungi as a source of natural antioxidants. **Food chemistry**, Londres, v. 185, p. 389-397, out. 2015.

SOUSA, C. D. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. D.; ARAÚJO, D. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 351 – 355, jan. 2007.

SOUZA, E. A.; INOUE, H.T.; GOMES, S.M.A.; FUNARI, S.R.C.; ORSI, R.O. O. Propriedade físico-química da própolis em função da sazonalidade e método de produção. **Archivos de Zootecnia**, Cordoba, v.59, n. 228, maio. 2010.

SPINELLI, S.; CONTE, A.; LECCE, L.; INCORONATO, A. L.; DEL NOBILE, M. A. Microencapsulated Propolis to Enhance the Antioxidant Properties of Fresh Fish Burgers. **Journal of Food Process Engineering**, Westport, v. 38, n. 6, p 527-535, jan. 2015.

SUSLICK, K. S.; PRICE, G. J. Applications of ultrasound to materials chemistry. **Annual Review of Materials Science**, Palo Alto, v. 29, n. 1, p. 295-326, ago. 1999.

TEIXEIRA, É. W. et al. Plant origin of green propolis: bee behavior, plant anatomy and chemistry. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, Oxford, v. 2, n. 1, p. 85-92, nov. 2005.

THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; BYRNE, D. H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of food composition and analysis**, San Diego, v. 19, n. 6, p. 669-675, set./nov. 2006.

TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; BANKOVA, V.; SIMOVA, S.; MARCUCCI, M. C.; MIORIN, P. L.; TSVETKOVA, I. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Oxford, v. 3, n. 2, p. 249-254, fev. 2006.

TRUSHEVA, B.; TRUNKOVA, D.; BANKOVA, V. Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. **Chemistry Central Journal**, Londres, v. 1, n. 1, p. 1-4, jun. 2007.

VARGAS, A. C. D.; LOGUERCIO, A. P.; WITT, N. M.; COSTA, M. M. D.; SILVA, M. S.; VIANA, L. R. Alcoholic propolis extract: antimicrobial activity. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 1, p. 159-163, jan./fev. 2004.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. D. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. D. S.; KUBOTA, 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.

VIERA, V. B. **Obtenção do extrato de própolis assistida por micro-ondas, aplicação em linguiça toscana e avaliação da sua capacidade antioxidante**. 2012. 78 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

VILKHU, K.; MAWSON, R.; SIMONS, L.; BATES, D. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry—A review. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 9, n. 2, p. 161-169, abr. 2008.

WANG, J.; ZHANG, J.; ZHAO, B.; WANG, X.; WU, Y.; YAO, J. A comparison study on microwave-assisted extraction of Potentilla anserina L. polysaccharides with conventional method: Molecule weight and antioxidant activities evaluation. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 80, n. 1, p. 84-93, mar. 2010.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of apicultural research**, Londres, v. 37, n. 2, p. 99-105, mar. 1998.

WYSOCKY JÚNIOR, H. L. Atividade cicatrizante e antiúlcera de espécies vegetais brasileiras: atividade cicatrizante, fracionamento químico e análises de própolis verde. 2013. 92 p. Tese (Doutorado em Fármacos e medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

XU, D. P.; ZHENG, J.; ZHOU, Y.; LI, Y.; LI, S.; LI, H. B. Ultrasound-assisted extraction of natural antioxidants from the flower of Limonium sinuatum: Optimization and comparison with conventional methods. **Food Chemistry**, Londres, v. 217, p. 552-559, fev. 2017.

YANISHLIEVA-MASLAROVA, N.V.; GORDON, M.H. **Antioxidants in food – practical applications**. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2001. 380 p.

ZIGONEANU, I. G.; WILLIAMS, L.; XU, Z.; SABLIOV, C. M. Determination of antioxidant components in rice bran oil extracted by microwave-assisted method. **Bioresource technology**, Essex, v. 99, n. 11, p. 4910-4918, jul. 2008.

3. EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES DA PRÓPOLIS VERDE COM AUXÍLIO DE ULTRASSOM

Resumo

A substituição de antioxidantes sintéticos por antioxidantes naturais, como os da própolis verde, é altamente desejado pela indústria de alimentos. A própolis verde apresenta uma alta capacidade antioxidante, que é principalmente atribuída ao seu alto teor de compostos fenólicos totais. A forma com que estes compostos são extraídos influencia fortemente o rendimento final e atividade antioxidante do extrato resultante, e as variáveis utilizadas podem influenciar em quais compostos são extraídos da matéria-prima. Neste sentido, o objetivo do trabalho foi realizar a otimização das condições de extração de compostos fenólicos e antioxidantes da própolis verde com uso de sistema de ultrassom na potência máxima (28 W/L) à temperatura constante de 25°C, variando o tempo e a proporção amostra:solvente, sendo o solvente uma solução etanol:água. Utilizou-se um delineamento central composto rotacional e a metodologia de superfície de resposta para estimar condições experimentais de extração efetivas em termos de teor de compostos fenólicos totais (TPC), expresso em equivalente de ácido gálico (mg AG/g amostra seca) e capacidade antioxidante medida em equivalente Trolox (µmol de TEAC/g amostra de própolis) pelo método de ORAC. Os compostos fenólicos extraídos foram identificados e quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os resultados obtidos elucidam que o processo de extração com o ultrassom sofreu influência direta da proporção e do tempo. O modelo matemático encontrado para o TPC e para ORAC mostraram-se preditivos, com porcentagem de variação explicada de 88% e 86%, respectivamente. As condições consideradas ótimas para extração de compostos fenólicos antioxidantes da própolis verde encontraram-se em 25 minutos na proporção de 1:30 de amostra:solvente, resultando em extratos com TPC de 533,9 mg AG/g amostra e capacidade antioxidante de 3.253,90 µmol TEAC/g. A concentração dos compostos antioxidantes nos extratos aumentou a medida que os níveis das duas variáveis exploratórias aumentaram (proporção de 1:10 – 1:30 e tempo de 5 – 45 minutos). É possível afirmar que o uso de ultrassom para obtenção de extratos hidroalcoólicos de própolis verde foi viável tecnicamente nas condições testadas.

Palavras-chave: Própolis verde; Otimização; Ultrassom

Abstract

The replacement of synthetic for natural antioxidants, such as green propolis, is highly appreciated by food industry. Green propolis presents a high antioxidant capacity due to its total phenolic content. The way how these compounds are extracted from raw material strongly influence on the final yield as well as antioxidant activities. In this study it was performed the optimization of antioxidants compounds extraction from green propolis through a ultrasound system at maximum power (28 W / L) at 25 ° C, varying the time and proportion of sample: solvent. A Central Composite Rotational Design (CCRD) and Surface Methodology were applied to allow to estimate the experimental conditions capable to extract higher content of Total Phenolic Compounds (TPC) expressed by Gallic acid equivalent (mg AG/ g sample) and antioxidant capacity determined by Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) expressed by TEAC equivalent (µmol TEAC.g^{-1} sample). After the extraction step the phenolic compounds were identified and quantified by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The results showed that the extraction process was influenced by both variables tested. The mathematic models for TPC and ORAC were considered predicted and the percentages of variation explained

were 88% and 86%, respectively. The optimum conditions to extract higher content of phenolic compounds from green propolis were 25 minutes and 1:30 (sample: solvent, w/v) proportion. Under these conditions there were found 533.9 mg AG/g of TPC and 3253.9 µmol TEAC.g^{-1} of antioxidant capacity. The concentration of phenolic compounds increasead as the levels of variables studied also increased (proportion of 1:10 - 1:30 and time of 5 - 45 minutes). Thus, it is possible to affirm that the use of ultrasound system to produce hydroalcoholic extracts from green propolis were feasible, presenting advantages on conventional process.

Keywords: Green propolis; Optimization; Ultrasound

3.1. Introdução

Os antioxidantes devem sua capacidade de eliminar os radicais livres aos compostos fenólicos e flavonoides extraídos de plantas (IACOPINI et al., 2008). Estes compostos preservam o alimento da oxidação lipídica, principalmente quando o produto é exposto ao oxigênio e à luz (MAISUTHISAKUL; SUTTAJIT; PONGSAWATMANIT, 2007).

A própolis, considerada um antioxidante natural, é um material resinoso coletado por abelhas de diferentes tipos de árvores, sua cor varia dependendo da fonte vegetal que é extraída, sendo planta nativa brasileira *Baccharis dracunculifolia* a mais importante fonte da própolis verde (HATA et al., 2012; MACHADO et al., 2015).

Na própolis verde os compostos fenólicos específicos como: ácido *p*-cumárico e flavonoides, além de Artepelin C, apigenina e tt-farnesol, têm se tornado um atrativo devido à sua atividade efetiva, como ação antioxidante, anti-cárie e supressor do crescimento de células tumorais (KIMOTO et al., 1998; KOO et al., 2002; SIMÕES et al., 2004).

De acordo com Bittencourt et al. (2015), os compostos encontrados no extrato de própolis dependem da escolha e eficácia do método de extração utilizado. Neste sentido, Bulduk, Gezer e Cengiz (2015) afirmam que não somente o método influencia a variedade de compostos extraídos, mas também o tipo e concentração do solvente, a proporção de amostra:solvente, a temperatura e o tempo de processo.

Além dos métodos tradicionais que utilizam calor e agitação, métodos como micro-ondas, extração por fluido supercrítico e ultrassom são utilizados para extrair compostos bioativos (AKTAS; YILDIZ, 2011; PRASAD et al., 2009).

O ultrassom possui a vantagem de ser um processo simples, eficiente e barato (VIROT et al., 2010; ILBAY; ŞAHIN e KIRBAŞLAR, 2013). Além disso, permite boa penetração do solvente na matriz, aumentando a matriz de contato entre a amostra e o solvente através dos efeitos da cavitação produzidos pela onda ultra-sônica (MORELLI e PRADO, 2012; ILBAY; ŞAHIN e KIRBAŞLAR, 2013).

Para reduzir o número de experimentos e estimar as melhores condições de extração com maior precisão utiliza-se a metodologia de superfície de resposta (RSM) e o desenho experimental (DOE), permitindo simplificar o processo e maximizar a utilização de dados obtidos (WU; LIN e CHAU, 2001; ILBAY; SAHIN e KIRBASLAR, 2013). A metodologia de superfície de resposta é eficaz para analisar a interação das variáveis independentes, bem como seu efeito sobre as variáveis resposta (MYERS e MONTGOMERY, 2002).

Neste sentido, o objetivo do presente trabalho foi utilizar variáveis exploratórias como o tempo e a proporção de amostra:solvente para otimizar a extração de compostos antioxidantes da própolis verde com ultrassom, de forma a obter condições ideais para extração de compostos fenólicos totais e antioxidante, bem como verificar a variação de compostos como Artepelin C e *p*-cumárico em três ensaios obtidos para verificação da influência das variáveis independentes e sua quantificação.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Obtenção da amostra de própolis

A própolis verde foi fornecida pela empresa brasileira Natucentro Indústria e Apiários Centro Oeste Ltda. (Bambuí – MG), coletada por abelhas africanizada, do gênero *Apis Melífera* da planta alecrim do campo ou *Baccharis Dracunculifolia* no mês de novembro do ano de 2015. Foi realizada uma limpeza visual prévia da amostra, com o objetivo de retirar qualquer material indesejável presente. Em seguida, a amostra foi triturada mediante a adição de Nitrogênio líquido até ficar homogênea, foi pesada para verificação do peso total, acondicionada em sacos escuros de polietileno de baixa densidade e armazenada em freezer comercial à –18 ºC.

3.2.2. Estudo do ponto de maior cavitação do banho de ultrassom

3.2.2.1. Erosão utilizando papel alumínio

O procedimento para avaliação do ponto de maior cavitação do banho de ultrassom foi procedido afim de evitar maiores erros de experimento. Realizou-se o teste de erosão do papel alumínio segundo o método adaptado de Soriano (2006), forrando-se toda a superfície do fundo da cuba do banho de ultrassom com papel alumínio. Foi adicionado à cuba 1 L de água em temperatura ambiente, mantido na mesma temperatura durante 5 minutos de processo ou até o ponto de maior cavitação fosse identificado, ou seja, local onde ocorreu maior colapso da célula.

3.2.3. Estudo do processo de extração por ultrassom

3.2.3.1. Obtenção de extratos antioxidantes

Os extratos foram obtidos com o emprego de soluções hidroalcoólicas à 65%, conforme resultados obtidos em ensaios preliminares. A proporção de própolis e solventes adicionada variou entre 1:10 e 1:30 e a extração ocorreu em banho de ultrassom (Unique, VSC-14000, Brasil) ajustado na potência máxima (28 W/L). A extração foi realizada em temperatura constante de 25°C, visando evitar a degradação de compostos de interesse. Foi utilizado o mesmo volume total de solvente (30

mL) nos ensaios com diferentes proporções de amostra:solvente, visto que as ondas de ultrassom influenciam de acordo com o volume aplicado.

Após tempo determinado, a amostra foi centrifugada a 5000 rpm por 15 minutos em micro centrífuga refrigerada (Hitachi KOKI; Japão) mantida em temperatura ambiente e posteriormente filtrada em papel de filtro tipo Whatman n. 2. O sobrenadante foi rotaevaporado (rotaevaporador Buchi Labortechnik AG – modelo R-215) à 45°C para evaporação do solvente. A solução resultante será armazenada sob refrigeração à 7°C em frascos âmbar até o momento das análises para a determinação da capacidade antioxidante (ORAC) e teor de compostos fenólicos totais.

3.2.3.2. Delineamento experimental

Foi aplicado um delineamento experimental tipo delineamento central composto rotacional (DCCR) e estudado os efeitos do tempo (x_1) e variação da proporção amostra:solvente (x_2), para a obtenção de respostas como o teor de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante dos extratos da própolis verde. No total foram realizados 12 ensaios combinando as variáveis, sendo 4 repetições do ponto central. Gráficos de superfície de resposta di e tridimensional foram gerados e manteve-se as variáveis resposta em seu melhor nível para sobreposição das mesmas, encontrando assim o ponto ótimo.

Foi realizado este delineamento para direcionar as variáveis independentes estudadas, afim de realizar um segundo delineamento experimental, buscando estipular um tempo adequado e trabalhar com uma menor proporção de amostra:solvente para que seja um processo viável.

A Tabela 2 apresenta as faixas de estudo das condições de preparo dos extratos e seus níveis de variação.

Tabela 2. Faixa de estudo das condições de preparo dos extratos de própolis verde e seus níveis de variação

Variáveis explanatórias	**Níveis de Variação**				
	-1,41	-1	0	1	+1,41
Tempo (minutos)	5	11	25	39	45
Proporção (própolis:solvente) (g/mL)	1:10	1:13	1:20	1:27	1:30

As variáveis respostas foram: o teor de compostos fenólicos totais e a capacidade antioxidante determinada pelo método ORAC. A realização das análises foi realizada de forma aleatória para os ensaios. Após a análise dos efeitos principais e interações, os efeitos não significativos ao nível de 5% de probabilidade foram eliminados e com os coeficientes de regressão foram ajustados modelo matemático conforme a equação a seguir:

$$Y= \beta 0 + \beta 1x1 + \beta 2x2 + \beta 12x1x2 + \beta 11x1^2 + \beta 22x2^2 + \varepsilon$$

Onde: Y = resposta (variável dependente)

x_1 e x_2 = níveis codificados das variáveis explanatórias

β_0 = média

β's = coeficientes de regressão

ε= resíduo

Os modelos foram avaliados em relação ao coeficiente de determinação (R^2) e teste de F comparado ao valor da tabela de 95% de probabilidade para uma distribuição de referência, com auxílio do aplicativo Statistica 12.0 (Statsoft, USA). Após a validação do modelo, as regiões de interesse das superfícies de respostas geradas com as curvas de iso-respostas foram estudadas, a fim de determinar os níveis ótimos do processo em estudo. Após a identificação das melhores condições, foi realizada a validação prática do modelo teórico, sendo que os extratos produzidos nesta etapa tornaram-se ponto de partida para as análises subsequentes.

3.2.4. Determinação do teor de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante *in vitro*

3.2.4.1. Determinação do teor de compostos fenólicos totais

A determinação do teor de compostos fenólicos totais ou *total phenolic content* (TPC) A análise foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventos (1999), estabelecendo-se o ácido gálico como padrão para realização de uma curva. Para a determinação do teor de fenólicos totais, 0,5 mL dos extratos obtidos na extração por ultrassom foi utilizado. Foi misturado à estes 2,5 mL do reagente *Folin-Ciocalteau* (diluído 1:10) e 2,0 mL de Na_2CO_3 4% (m/v). Após 2 h de incubação no escuro à temperatura ambiente, a absorbância foi medida em espectrofotômetro (Shimadzu, modelo UV 1240, Japão) a 740 nm. O branco do sistema foi preparado da mesma forma, porém sem a alíquota da amostra.

Os resultados do teor de compostos fenólicos totais foram expressos como equivalentes de ácido gálico (mg AG/g), calculados por meio de uma curva construída com concentrações variando de 5 a 60 µg/mL.

3.2.4.2. Identificação e quantificação de ácidos fenólicos

A análise foi realizada no laboratório de Bioquímica do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ – USP. As análises por CLAE em fase reversa foram realizadas de acordo com o método descrito por Alencar et al. (2007). Os extratos foram previamente filtrados utilizando filtro 0,22 µm (Millipore) e diluídos em metanol e uma alíquota de 10 microlitros foi injetada em um cromatógrafo líquido (Shimadzu Co) acoplado à um detector de arranjo fotodiodos e à coluna de fase reversa C_{18} (250 x 4,6 mm) com tamanho de partícula de 5 µm. Foram utilizadas duas fases móveis, tais como água Milli-Q:ácido acético (19:1) (solvente A) e metanol (solvente B). O gradiente

iniciou com 30% do solvente B até 40% de B em 15 minutos, 50% de B em 30 minutos, 60% de B em 45 minutos, 75% de B em 65 minutos, 75% de B em 85 minutos, 90% de B em 95 minutos e 30% de B em 105 minutos. A coluna foi mantida à uma temperatura constante de 30°C e os cromatogramas foram processados utilizando o software Class-VP. Os compostos foram identificados pelo espectro de absorção na região ultravioleta a 310 nm, utilizando os recursos do detector de arranjo de fotodiodos, pela comparação do tempo de retenção e co-cromatografia de padrões. Neste trabalho, foram utilizados os seguintes padrões autênticos de ácidos fenólicos e flavonoides (Extrasynthese Co. e Sigma Aldrich): ácido *p*-cumárico e artepelin C. A identificação dos compostos foi realizada no comprimento de onda ultra-violeta de 310 nm. Foram escolhidos 3 ensaios, baseados na resposta de teor de compostos fenólicos, que representam as diferentes condições avaliadas e que apresentaram baixo, médio e alto teor. Os ensaios analisados neste primeiro momento foram 1, 4 e 9, visando avaliar três níveis distintos. Neste sentido, buscou-se verificar como o aumento do tempo e da proporção interferiam na extração do ácido *p*-cumárico e artepelin C.

3.2.5. Capacidade antioxidante pelo método ORAC

A análise foi realizada no laboratório de Bioquímica do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ – USP. Utilizou-se o método ORAC adaptado daquele descrito por Chisté et al (2011). Os reagentes utilizados no método foram diluídos em tampão fosfato de potássio 75 mM, pH 7,4. Para a análise foi utilizado 30 µL de extrato/padrão, 60µL de fluoresceína (concentração de 4,066mM) e 110 µL de AAPH (dicloreto de 2,2'-azobis(2-amidinopropano)) na concentração de 76mM.

Para o preparo do branco, utilizou-se apenas 200µL de tampão fosfato. O controle foi realizado com 30µL de tampão fosfato, 60µL de fluoresceína e 110µL de AAPH. As leituras foram feitas em leitor de microplacas SpectraMax® M3 (Molecular Devices), em condições específicas de temperatura (37°C), por 2 horas de incubação e fluorescência (excitação 485nm, emissão 528nm).

Para a construção da curva padrão foi utilizado o Trolox® 1mM nas concentrações de 12,5 a 400 µM. A proteção fornecida pelos extratos (ou padrão) foi calculada usando a diferença entre a área sob a curva de decaimento de fluorescência na presença da amostra (AUC amostra) e na sua ausência (AUC branco). Por meio de equações de regressão e cálculos fornecidos pelo software, os resultados finais foram lançados na reta obtida pela curva analítica. Os resultados de atividade antioxidante foram, então, expressos em equivalente Trolox (µmol de TEAC/g de amostra de própolis).

3.3. Resultados e Discussão

3.3.1. Estudo do ponto de maior cavitação do banho de ultrassom

Para obtenção de uma extração igual para todas os ensaios realizou-se previamente uma análise do ultrassom banho com papel alumínio para verificar o ponto de maior cavitação interna. Esta identificação é essencial visto que a posição do recipiente em determinada área pode influenciar no resultado final.

Observaram-se 2 pontos de melhor cavitação, sendo ambos em cima dos cristais piezoelétricos do banho de ultrassom. Assim, todos os frascos foram situados na mesma posição para prosseguimento da extração de maneira mais regular entre todos. Na figura 4 é possível verificar a localização da melhor posição para os frascos de extração através dos pontos de erosão formados.

Figura 4. Erosão com papel alumínio para determinação do maior ponto de cavitação.
Legenda: Os círculos vermelhos representam a área de maior extração.

Verifica-se portanto que o equipamento utilizado possuia 2 pontos maiores de extração, onde a cavitação ocorre com máxima intensidade, situados exatamente sobre os cristais piezoelétricos do banho de ultra-som.

3.3.2. Estudo do processo de extração

A Tabela 3 apresenta as faixas de estudo das condições de preparo dos extratos (variáveis independentes), seus níveis de variação e as variáveis resposta.

Tabela 3. Condições de extração e resultados obtidos

Variáveis independentes (valor real e codificado)			Variáveis respostas	
Ensaio[a]	**Tempo ultrassom (min)**	**Proporção Própolis:solvente (g/mL)**	**Y_{TPC} (mg AG/g amostra)[b]**	**Y_{TAA} (µmol TEAC/g amostra)[c]**
1	11 (-1)	1:13 (-1)	334,2	2452,0
2	39 (+1)	1:13 (-1)	351,9	3123,1
3	11 (-1)	1:27 (+1)	405,3	3077,6
4	39 (+1)	1:27 (+1)	481,8	3326,4
5	5 (-1,41)	1:20 (0)	344,8	2210,2
6	45 (+1,41)	1:20 (0)	316,4	3524,0
7	25 (0)	1:10 (-1,41)	413,3	3064,5
8	25 (0)	1:30 (+1,41)	533,9	3253,8
9	25 (0)	1:20 (0)	450,9	3245,3
10	25 (0)	1:20 (0)	464,7	3214,7
11	25 (0)	1:20 (0)	494,5	3255,1
12	25 (0)	1:20 (0)	411,4	3272,9

[a] Ensaios realizados em ordem aleatória.
[b] Teor de compostos fenólicos totais.
[c] Capacidade antioxidante total.

3.3.2.1. Efeito das variáveis independentes do processo sobre os compostos fenólicos totais (TPC)

Os dados apresentados na tabela de análise de variância (ANOVA) (tabela 4) indicam um bom ajuste do modelo (R^2=0,88), indicando que 87% de variação é explicada pelo mesmo. Como o F calculado para a regressão é superior ao F tabelado ($F_{regression}$ = 44,92 > $F_{tabulated\ (0,95;\ 5;\ 6)}$ = 4,39), o modelo, caracterizado pela equação 1, se ajusta bem aos dados experimentais. O fato de o modelo apresentar uma alta porcentagem de variação explicada e o F calculado ser considerado 10 vezes superior ao F tabelado, pode-se concluir que o modelo pode ser utilizado para fins preditivos. Os termos considerados não significativos, retirados do modelo, foram incorporados aos resíduos para o cálculo da ANOVA.

Tabela 4. Análise de variância (ANOVA) para o teor de compostos fenólicos totais.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de Liberdade (GL)	Quadrado médio	F
Regressão	45.544,11	5	45.544,11	44,92
Resíduo	6.080,22	6	1.013,37	
Total	53.904,32	11		

R^2=0,88 $F_{=0,95;5;6}$=4,39

Os valores absolutos de t_{Calc}, também chamados de efeitos padronizados, fornecem as alturas das barras que por sua vez são dispostas de maneira decrescente. As barras que ultrapassam a linha de *p*=0,05 consideram que tais variáveis representadas são significativas, o que pode ser observado no diagrama de Pareto (figura 5).

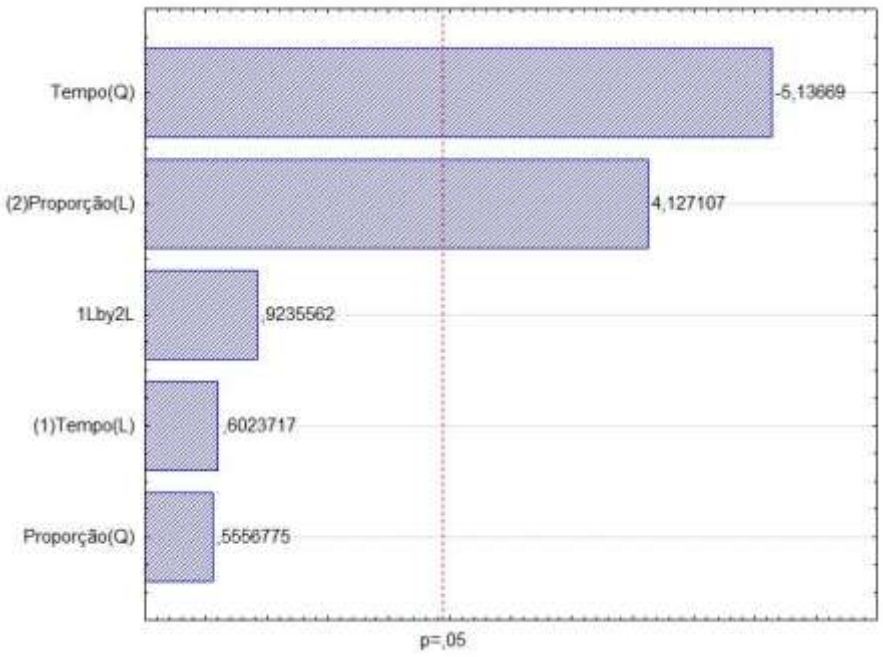

Figura 5. Diagrama de Pareto para a análise de TPC. *p*= 0,5.

É possível verificar pelo diagrama de Pareto que, o tempo quadrático e a proporção linear foram variáveis consideradas significativas ao nível de 5% de probabilidade. No entanto, a interação entre as variáveis tempo e proporção, bem como o tempo linear e a proporção quadrática, por apresentarem efeito não significativo, foram desconsideradas para a obtenção do modelo matemático de segunda ordem (Equação 1) apresentado a seguir.

$$Y_{TPC} = 460,9 - 66,2x_1^2 + 46,5x_2 \quad (1)$$

Por meio das superfícies de respostas e gráficos de contorno que representam graficamente o modelo ajustado (figura 6), pode-se verificar a faixa de tempo e proporção de amostra:solvente em que obteve-se melhor resposta do teor de compostos fenólicos totais (TPC).

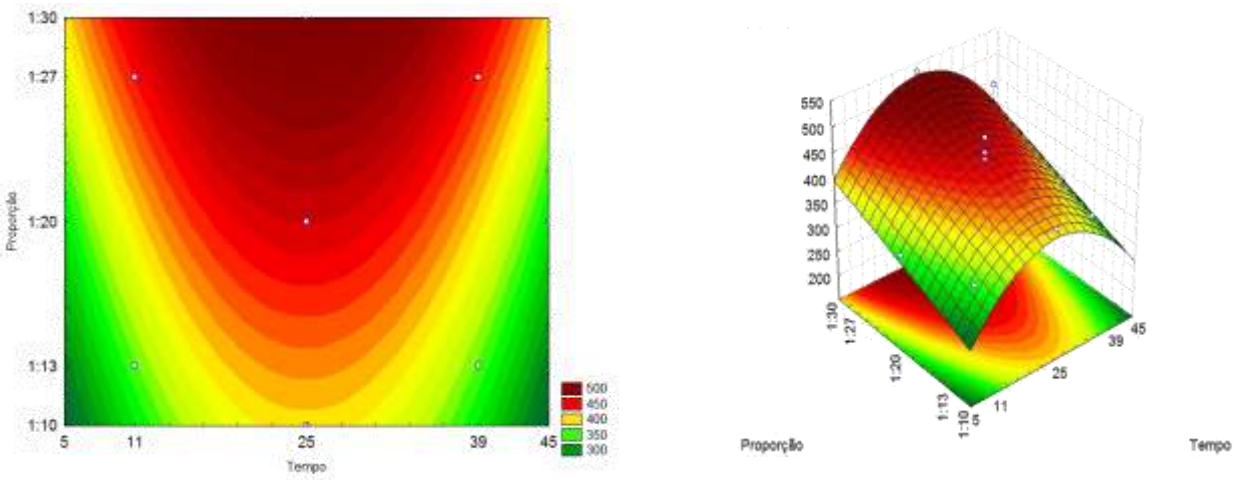

Figura 6. Influência do tempo e da proporção de amostra:solvente sobre o teor de compostos fenólicos totais do extrato de própolis verde.

Observando as superfícies, é possível afirmar que há uma tendência de maior extração de compostos fenólicos entre aproximadamente 18 e 30 minutos, com proporção amostra:solvente acima de 1:13. Os resultados que variaram de 316,4 a 533,9 mg AG/g amostra demonstram que o teor de compostos fenólicos totais encontrados em todos os ensaios avaliados atende ao requesito mínimo do Ministério da Agricultura, que é de 0,5% (BRASIL, 2001). Bittencourt et al. (2015) verificaram o teor de compostos fenólicos totais da própolis verde e marrom, sendo ambas brasileiras, e obtiveram resultados variando de 38,85 a 204,3 mg AG/g amostra e 31,8 a 62,4 mg AG/g amostra, respectivamente. Tais resultados são diferentes deste presente trabalho devido ao método de extração utilizado (maceração), tipo e quantidade de solvente usado, quantidade de amostra, temperatura, sazonalidade da própolis, dentre outros.

Oldoni et al. (2015), em um estudo de otimização de extração de compostos bioativos de própolis do Brasil, encontraram valores variando de 2,4 – 5,7 mg AG/g amostra, utilizando uma variação de tempo de 15 a 45 minutos. Os autores ainda afirmaram que o teor de compostos fenólicos totais aumentava proporcionamente com o aumento do tempo, contrariamente ao que foi observado neste estudo, já que a variável x_1 (tempo linear) não foi considerada significativa e os melhores pontos de extração concentravam-se entre 11 e 39 minutos.

Ghafoor e Choi (2009), em um estudo de otimização de extração de compostos fenólicos por ultrassom da pele da uva, verificaram que a variável tempo foi altamente significativa, com melhor resultado de TPC em 20 minutos, dados estes semelhantes ao encontrado neste estudo. A maioria das células dos compostos fenólicos são quebradas nos primeiros 20 minutos de extração e depois deste tempo o processamento com o ultrassom pode induzir a degradação destes compostos presentes na amostra analisada (TIWARI et al., 2009; MARAN et al., 2013). No entanto, como pode

ser observado no nosso trabalho, a composição de compostos fenólicos só começa a sofrer interferência de redução a partir de aproximadamente 40 minutos.

Paviani et al. (2013), em um estudo comparando a forma convencional de extração, extração convencional por solvente a quente e a extração por fluido supercrítico de própolis brasileira verde e vermelha, verificaram que a eficiência da extração por Soxhlet foi afetada pela polaridade do solvente utilizado, sendo que o método mais eficiente na extração de TPC foi a extração por fluido supercrítico na pressão estabelecida de 400 bar a 60°C.

Estes resultados exemplificam a importância de estudo das varíaveis avaliadas e seu impacto sobre a resposta final.

3.3.2.1.1. Identificação e quantificação de ácidos fenólicos

A análise por cromatográfica líquida de alta eficiência (CLAE) mostrou uma composição química complexa através da observação de diversos tempos de retenção e o método cromatográfico foi considerado efetivo devido à sua alta seletividade.

Através dos 3 ensaios (1, 4 e 9), verificou-se que a medida que aumentou-se o tempo de extração com o ultrassom e a proporção de amostra:solvente usada, houve no geral um aumento da quantidade de Artepelin C e ácido *p*-cumárico (tabela 5).

Tabela 5. Composição e quantificação dos ensaios selecionados de própolis verde por HPLC.

Ensaio	**Composto (mg/g amostra)**	
	Artepelin C	**Ácido *p*-cumárico**
1	161,4	9,4
4	206,9	22,6
9	126,0	12,2

As análises de CLAE foram realizadas de acordo com os perfis cromatográficos dos padões de ácido p-cumárico e Artepelin C, como pode ser observado na imagem 7 e 8, respectivamente.

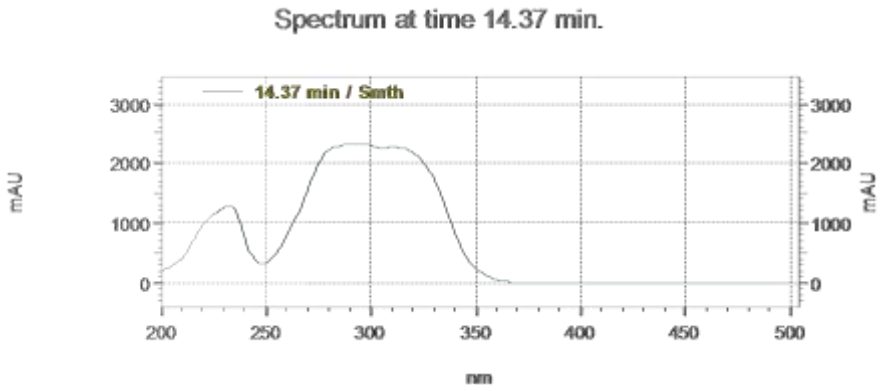

Figura 7. Perfil cromatográfico para o padrão de ácido *p*-cumárico obtido em 14,3 minutos.

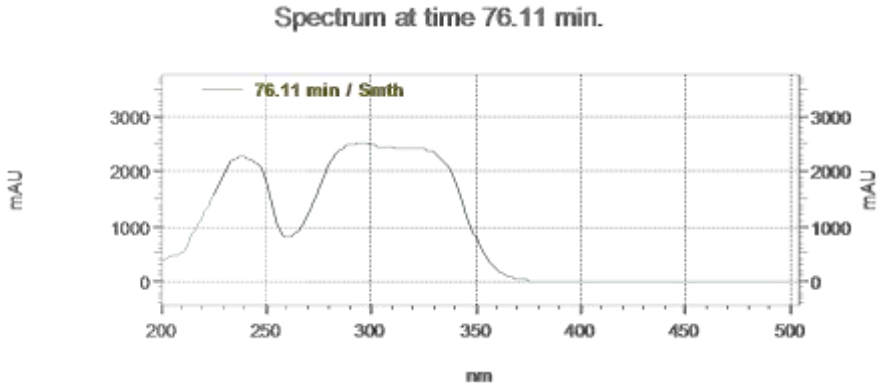

Figura 8. Perfil cromatográfico para o padrão de Artepelin C obtido em 76,1 minutos.

Nas figuras 7 e 8 foram apresentados os espectros de absorção na região do UV e o comprimento de onda de absorção máximo, respectivamente, obtidos em 300 nm para ambos os compostos estudados (ácido *p*-cumárico e Artepelin C), que apresentam tempo de retenção em 14,3 e 76,1 minutos, respectivamente. Confirmou-se assim o comprimento de onda selecionado para o desenvolvimento do estudo. Os compostos identificados nos ensaios 1, 4 e 9 são mostrados em seus respectivos cromatogramas na figura 9, 10 e 11.

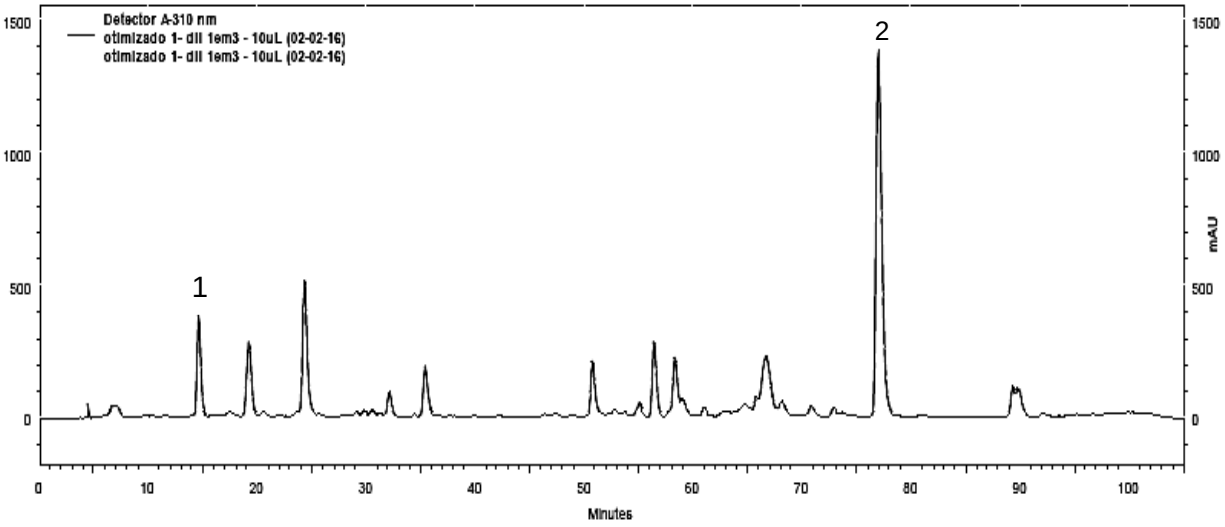

Figura 9. Perfil cromatográfico do ensaio 1 do extrato hidroalcoólico de própolis verde extraído por ultrassom. Identificação do pico: (1) Ácido *p*-cumárico; (2) Artepelin C.

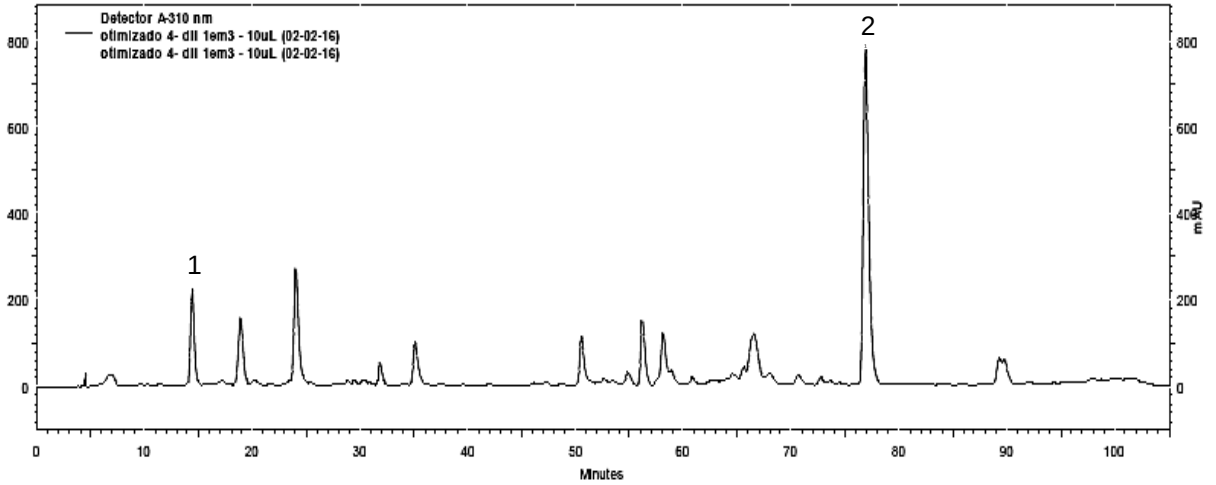

Figura 10. Perfil cromatográfico do ensaio 4 do extrato hidroalcoólico de própolis verde extraído por ultrassom. Identificação do pico: (1) Ácido *p*-cumárico; (2) Artepelin C.

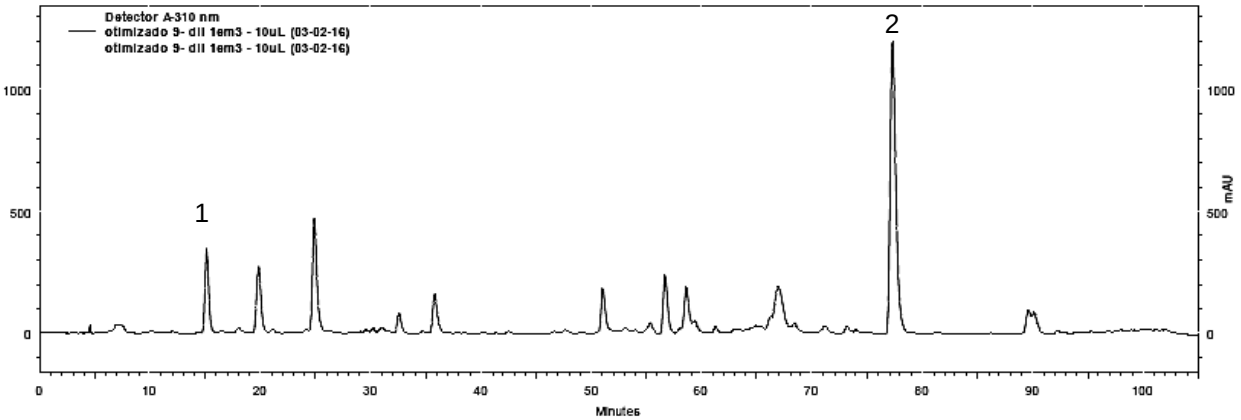

Figura 11. Perfil cromatográfico do ensaio 9 do extrato hidroalcoólico de própolis verde extraído por ultrassom. Identificação do pico: (1) Ácido *p*-cumárico; (2) Artepelin C.

A quantidade de ácido *p*-cumárico quantificada variou de 9,4 – 22,6 mg/g amostra. Oldoni et al. (2015) classificaram este mesmo composto como majoritário em seu estudo, apresentando concentração de 0,3 mg/g, seguido do ácido cafeico e ferrúrico. Enquanto Cunha et al. (2004) obtiveram como resultado 22,2 mg/g de *p*-cumárico em amostra de própolis da região sudeste do Brasil.

O ácido fenólico majoritário foi o Artepellin C (206,9 mg/g amostra seca). Castro, Cury e Rosalen (2007) afirmaram que a própolis do sudeste brasileiro apresenta o ácido 4-hidroxi-3,5-diprenil cinâmico (Artepelin C) como sendo um dos compostos majoritários. Machado et al. (2016), analisando diversos tipos de própolis do Brasil, dentre elas própolis verde, vermelha e marrom, concluíram que o composto Artepelin C esteve presente apenas na própolis verde brasileira.

No mesmo ensaio (4) em que se encontrou maior teor de Artepelin C, verificou-se maior teor de ácido *p*-cumárico. Este resultado pode ser explicado por meio da formação destas duas substâncias, que é devida a partir do ácido cinâmico e seus derivados (SILVA, 2008).

De Zordi et al. (2014), em um estudo de otimização de compostos da própolis utilizando ultrassom e por dióxido de carbono supercrítico e o perfil químico de ambas técnicas, verificaram que o uso do ultrassom com etanol é a melhor escolha em termos de extração de compostos fenólicos, enquanto o outro método é mais eficiente na extração de flavonoides e ácidos cafeicos.

Shimizu et al. (2004) constataram em seu trabalho que o Artepelin C da planta *Baccharis dracunculifolia* da próplis brasileira é considerado um composto antioxidante biodisponível. No entanto é necessária a realização de estudos que comprovem se a forma de extração não torna esta concentração encontrada de ácidos fenólicos nesse trabalho tóxica quando ingerida por seres humanos como antioxidante natural aplicado em alimentos.

Exitem problemas em se comparar os compostos químicos da planta de extração e da própolis em si, já que eles podem variar com a parte da planta obtida para análise e também com o crescimento e estação em que foi realizada a amostragem (KUMAZAWA et al., 2003).

Os resultados deixam claro que o ultrassom fornece uma alta eficiência para obter ambos compostos analisados, Artepelin C e ácido *p*-cumárico nos ensaios de própolis verde do sudeste brasileiro, proporcionando uma redução no tempo de extração e energia quando comparado aos métodos tradicionais. Além disso, as faixas dos parâmetros analisados na otimização podem ter melhorado significativamente o rendimento e a concentração dos compostos.

3.3.3. Efeito das variáveis independentes do processo sobre a capacidade antioxidante por ensaio ORAC

O ensaio ORAC foi utilizado para mensurar a capacidade antioxidante dos compostos fenólicos da própolis verde. As variáveis independentes com pequena ou nenhuma influência sobre o resultado de ajuste final foram excluídas para obtenção de um modelo parametrizado (Equação 2).

$$Y_{TAA} = 3.208,4 + 347,5x_1 - 185,81x_1^2 + 1.373,8x_2 \quad (2)$$

Dentre as variáveis independentes avaliadas, o tempo linear (x_1) e quadrático(x_1^2), bem como a proporção linear (x_2) foram considerados significativas e influenciaram a capacidade antioxidante. A figura 12 apresenta o diagrama de Pareto para os efeitos dados pelo teste de T-student.

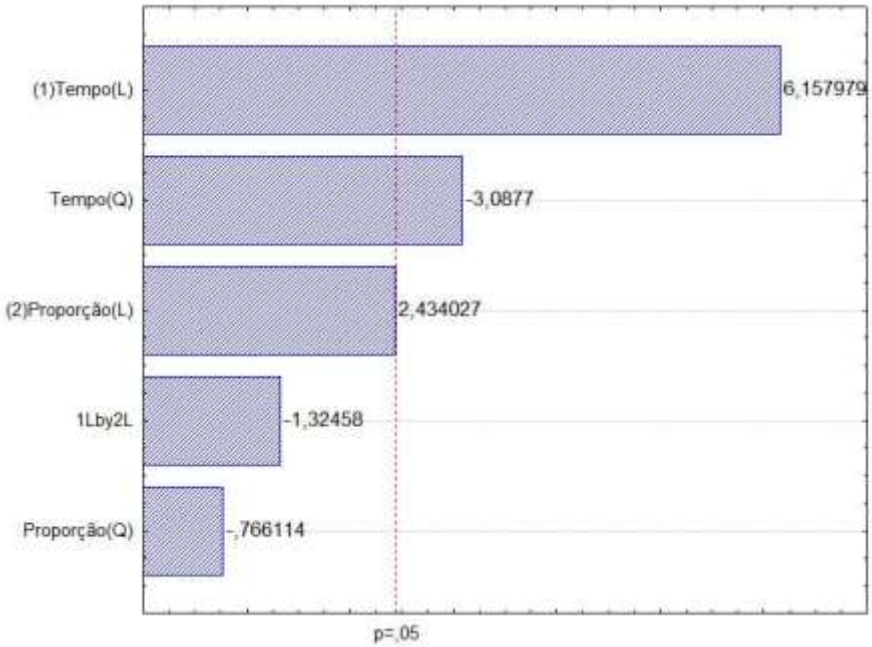

Figura 12. Diagrama de Pareto para a capacidade antioxidante por ensaio ORAC (*p*= 0,5).

Através da ANOVA apresentada na tabela 6, observa-se que o F calculado para a regressão (50,6) foi maior que o F tabelado (4,0) e a porcentagem de variação explicada (R^2) pelo modelo foi muito boa, cerca de 86%, podendo-se concluir que o modelo se ajusta bem aos dados experimentais.

Tabela 6. Análise de variância (ANOVA) para a capacidade antioxidante por ensaio ORAC.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de Liberdade (GL)	Quadrado médio	F
Regressão	1.342.172	3	1.342.171,1	50,6
Resíduo	211.967	8	26.495,8	
Total	1.554.138	11		

R^2=0,86 $F_{0,95;3;8}$=4,0

Por meio das superfícies de resposta apresentadas em 2D e 3D, respectivamente (figura 13) verifica-se que os dados mostraram que as melhores condições foram verificadas a partir de aproximadamente 20 minutos. A medida que ocorreu o aumento da proporção amostra:solvente, a capacidade antioxidante aumentou proporcionalmente.

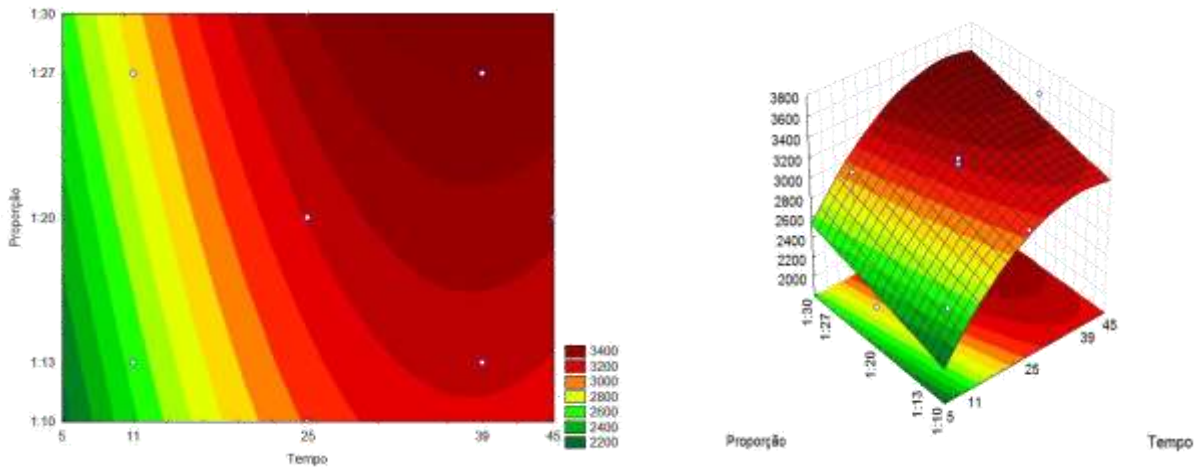

Figura 13. Influência do tempo e da proporção de amostra:solvente sobre a capacidade antioxidante por ensaio ORAC do extrato de própolis verde.

Utilizando a metodologia de ORAC, o teor de capacidade antioxidante encontrado neste estudo variou de 2210,2 – 3524,0 µmol TEAC/g amostra. Kumazawa et al (2004) afirmaram que a capacidade antioxidante de extrato etanólico de própolis está de acordo com a região geográfica de produção de cada amostra analisada. Neste sentido, Corrêa et al. (2016), quando avaliaram a capacidade antioxidante de amostras de própolis verde coletadas no estado de Minas Gerais – BR, verificaram que o extrato obtido por maceração apresentou 5769.7 µmol TEAC/ g amostra. Apesar dos resultados destes autores serem superiores ao encontrado em nosso trabalho, deve-se salientar que o material foi deixado *overnight* para deposição e separação da cera, fazendo com que houvesse perda no tempo de obtenção do material final para análise, além da temperatura de extração ser maior (30°C), influenciando no processo. Em contrapartida, Hatano et al. (2012) encontraram o valor de 8240 ± 658 µmol TEAC/g de extrato etanólico em própolis verde de Minas Gerais-BR.

3.3.4. Otimização da extração para todas as respostas

A fim de se obter uma otimização para as respostas de capacidade antioxidante por ORAC e teor de compostos fenólicos totais simultaneamente, as superfícies de resposta foram sobrepostas, como pode ser observado na figura 14.

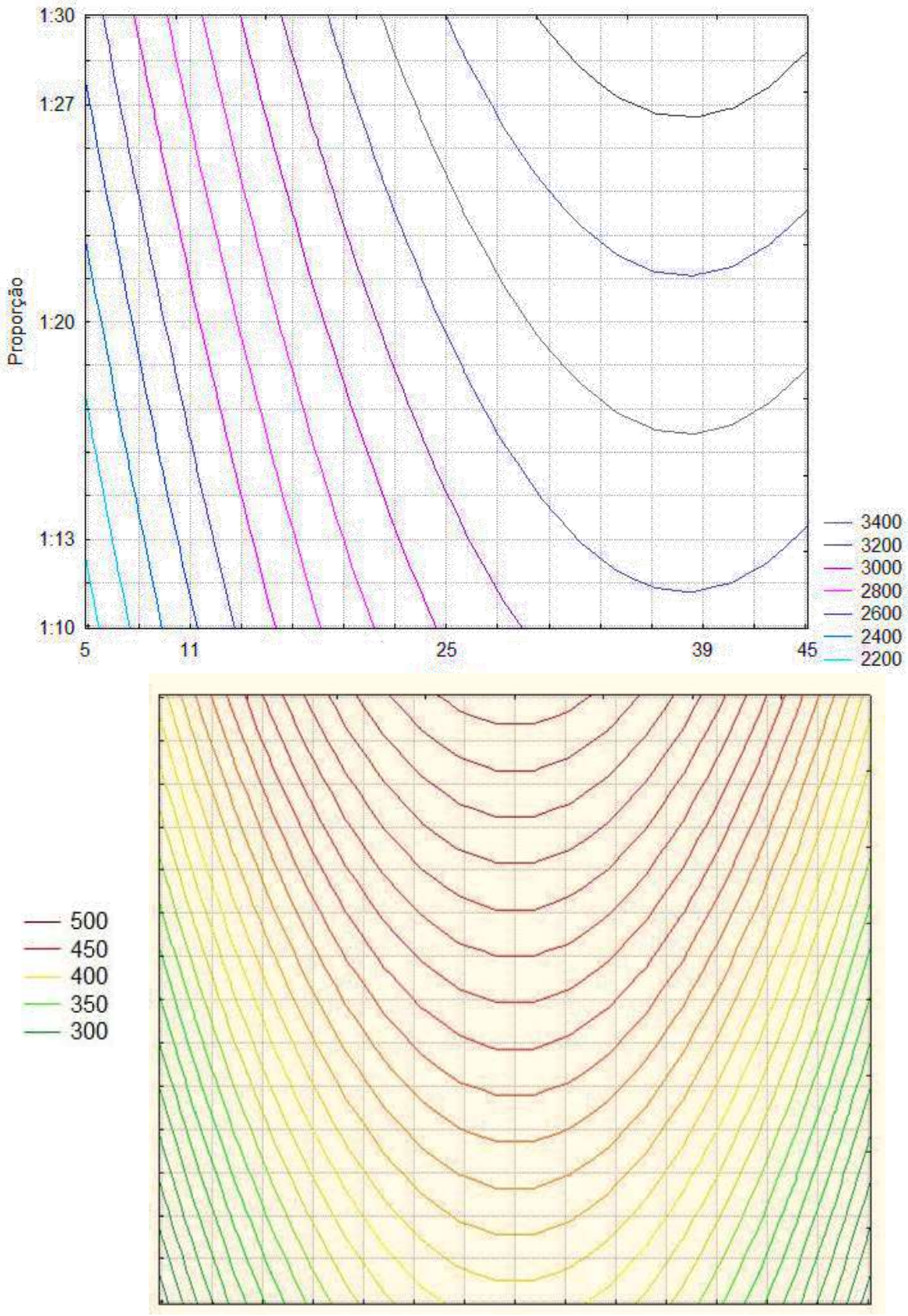

Figura 14. Sobreposição dos gráficos de contorno obtidos para ORAC e Fenólicos.

Com base nisto, determinou-se que a região ótima de extração hidroalcoólica com ultrassom com base apenas nos ensaios testados. Assim, aquele ensaio com resultados mais expressivos foi o ensaio 8, extraído em 25 minutos na proporção de 1:30 de amostra:solvente (m/v). Neste ponto em questão obteve-se o maior resultado para teor de compostos fenólicos totais (533,9 mg AG/g amostra) e capacidade antioxidante manteve-se em 3.253,8 µmol TE/g amostra.

Este estudo indicou que a própolis verde é uma boa fonte de compostos fenólicos e antioxidantes, e o uso de ultrassom foi um método muito eficaz, já que os gastos com energia (temperatura) não são necessários para que haja um aumento da extração de compostos, principalmente quando estes podem ser degradados.

3.4. Considerações Finais

Foi possível obter condições ótimas de extração de compostos fenólicos e antioxidantes da própolis verde por ultrassom, variando o tempo e a proporção de amostra: solvente. O modelo utilizado mostrou que as variáveis independentes utilizadas foram influentes no desempenho da extração com o ultrassom, bem como o método mostrou-se eficiente quando comparado à outros.

Verificou-se ainda que os compostos identificados e quantificados na própolis verde, tais como o *p*-cumárico e Artepelin-C tiveram sua concentração aumentada de 9,4 – 22,6 mg/g amostra e 126,0 – 206,9 mg/g amostra, respetivamente a medida que o tempo (5 – 45 minutos) e a proporção (1:10 – 1:30 g/mL) também aumentavam nos ensaios avaliados.

No entanto, visto que, o custo da própolis verde para uso como antioxidante natural torna-se inviável quando comparado com outros antioxidantes naturais, sugere-se realizar uma extração priorizando reduzir a quantidade de amostra, sem afetar a capacidade antioxidante da mesma. Além disso, busca-se estudar os compostos fenólicos obtidos no menor tempo, sem que haja interferência em seu teor e capacidade antioxidante. Este estudo será apresentado no próximo capítulo.

REFERÊNCIAS

AKTAS, E. T.; YILDIZ, H. Effects of electroplasmolysis treatment on chlorophyll and carotenoid extraction yield from spinach and tomato. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 106, n. 4, p. 339-346, out. 2011.

ALENCAR, S. M.; OLDONI, T. L. C.; CASTRO, M. L.; CABRAL, I. S. R.; COSTA-NETO, C. M.; CURY, J. A.; IKEGAKI, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 113, n. 2, p. 278-283, set. 2007.

BITTENCOURT, M. L.; RIBEIRO, P. R.; FRANCO, R. L.; HILHORST, H. W.; DE CASTRO, R. D.; FERNANDEZ, L. G. Metabolite profiling, antioxidant and antibacterial activities of Brazilian propolis: Use of correlation and multivariate analyses to identify potential bioactive compounds. **Food Research International**, Barking, v. 76, n. 1, p. 449-457, out. 2015.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Instrução Normativa nº 3 – ANEXO VI – Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 19 jan. 2001.

BULDUK, Ibrahim; GEZER, Bahdışen; CENGIZ, Mustafa. Optimization of ultrasound-assisted extraction of morphine from capsules of Papaver somniferum by response surface methodology. **International journal of analytical chemistry**, Londres, v. 2015, p. 8, ago. 2015.

CASTRO, M. L.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; ALENCAR, S. M.; IKEGAKI, M.; DUARTE, S.; KOO, H. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química. Nova**, São Paulo, v. 30, n. 7, p.1512-1516, jan. 2007.

CHISTÉ, R. C.; MERCADANTE, A. Z.; GOMES, A.; FERNANDES, E.; DA COSTA LIMA, J. L. F.; BRAGAGNOLO, N. In vitro scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry**, Londres, n. 127, p. 419-426, jul. 2011.

CORRÊA, W. R; LÓPEZ, B. G. C.; PRADO, S. C. D.; CUNHA, I. B. D. S.; SAWAYA, A. C. H. F.; SALVADOR, M. J. ESI-MS fingerprinting of residues of green propolis, and evaluation of their antioxidant and antimicrobial activities. **Journal of Apicultural Research**, v. 55, n. 1, p. 1-7, jul. 2016.

CUNHA, I.; SAWAYA, A. C.; CAETANO, F. M.; SHIMIZU, M. T.; MARCUCCI, M. C.; DREZZA, F. T.; CARVALHO, P. D. O. Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 15, n. 6, p. 964-970, nov/dez. 2004.

DE ZORDI, N.; CORTESI, A.; KIKIC, I.; MONEGHINI, M.; SOLINAS, D.; INNOCENTI, G.; DALL'ACQUA, S. The supercritical carbon dioxide extraction of polyphenols from propolis: a central composite design approach. **The Journal of Supercritical Fluids**, Virginia, v. 95, n. 95, p. 491-498, out. 2014.

GHAFOOR, K.; CHOI, Y. H. Optimization of ultrasound assisted extraction of phenolic compounds and antioxidants from grape peel through response surface methodology. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, Seul, v. 52, n. 3, p. 295-300, abr. 2009.

HATA, T.; TAZAWA, S.; OHTA1, S.; RHYU, M.; MISAKA, T.; ICHIHARA, K. Artepillin C, a Major Ingredient of Brazilian Propolis, Induces a Pungent Taste by Activating TRPA1 Channels. **Plos One**, Washington, v. 7, n° 11, P. 1- 9, nov. 2012.

HATANO, A.; NONAKA, T.; YOSHINO, M.; MOK-RYEON, A. H. N.; TAZAWA, S.; ARAKI, Y.; KUMAZAWA, S. Antioxidant activity and phenolic constituents of red propolis from Shandong, China. **Food Science and Technology Research**, Southampton, v. 18, n. 4, p. 577-584, abr. 2012.

IACOPINI, P., BALDI, M., STORCHI, P., SEBASTIANI, L. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego v. 21, n. 8, p. 589-598, dez. 2008.

ILBAY, Z.; ŞAHIN, S.; KIRBAŞLAR, Ş. İ. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of rosehip (Rosa canina L.) with response surface methodology. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Londres, v. 93, n. 11, p. 2804-2809, abr. 2013.

KIMOTO, T., ARAI, S., KOHGUCHI, M., AGA, M., NOMURA, Y., MICALLEF, M.J., KURIMOTO, M. e MITO, K. Apoptosis and suppression of tumor growth by artepillin C extracted from Brazilian propolis. **Cancer detection and prevention**, Nova York, v. 22, n. 6, p. 506-515, dez. 1998.

KOO, H., PEARSON, S.K., SCOTT-ANNE, K., ABRANCHES, J., CURY, J.A., ROSALEN, P.L., PARK, Y.K., MARQUIS, R.E. e BOWEN, W.H. Effects of apigenin and tt-farnesol on glucosyltransferase activity, biofilm viability and caries development in rats. **Oral Microbiology and immunology**, Copenhagen, v. 17, n. 6, p. 337-343, dez. 2002.

KUMAZAWA, S.; YONEDA, M.; SHIBATA, I.; KANAEDA, J.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Tóquio, v. 51, n. 6, p. 740-742, abr. 2003.

KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food chemistry**, Londres, v. 84, n. 3, p. 329-339, fev. 2004.

MACHADO, B. A. S.; DE ABREU BARRETO, G.; COSTA, A. S.; COSTA, S. S.; SILVA, R. P. D.; DA SILVA, D. F.; PADILHA, F. F. Determination of parameters for the supercritical extraction of antioxidant compounds from green propolis using carbon dioxide and ethanol as co-solvent. **PloS one**, Washington, v. 10, n. 8, p. e0134489, ago. 2015.

MACHADO, B. A. S.; SILVA, R. P. D.; DE ABREU BARRETO, G.; COSTA, S. S.; DA SILVA, D. F.; BRANDÃO, H. N.; PADILHA, F. F.Chemical composition and biological activity of Extracts obtained by supercritical extraction and ethanolic extraction of brown, green and Red Propolis derived from different geographic regions in Brazil. **PloS one**, Washington, v. 11, n. 1, p. 1-26, ago. 2016.

MAISUTHISAKUL, P.; SUTTAJIT, M.; PONGSAWATMANIT, R. Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. **Food chemistry**, Londres, v. 100, n. 4, p. 1409-1418, nov. 2007.

MARAN, J. P.; MANIKANDAN, S.; NIVETHA, C. V.; DINESH, R. Ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from Nephelium lappaceum L. fruit peel using central composite face centered response surface design. **Arabian Journal of Chemistry**, Arabia Saudita, v. 2, n. 1, 2013. In press.

MORELLI, L. L. Lima; PRADO, M. A. Extraction optimization for antioxidant phenolic compounds in red grape jam using ultrasound with a response surface methodology. **Ultrasonics sonochemistry**, Oxford, v. 19, n. 6, p. 1144-1149, nov. 2012.

MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C. Experimental designs for fitting response surfaces-I. **Response surface methodology. Process and product optimization using designed experiments. 2a ed. Nueva York: Willey**, 2002.

OLDONI, T. L. C.; OLIVEIRA, S. C.; ANDOLFATTO, S.; KARLING, M.; CALEGARI, M. A.; SADO, R. Y.; LIMA, V. A. Chemical Characterization and Optimization of the Extraction Process of Bioactive Compounds from Propolis Produced by Selected Bees Apis mellifera. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 26, n.10, p. 2054-2062, out. 2015.

PAVIANI, L. C.; FIORITO, G.; SACODA, P.; CABRAL, F. A. Different Solvents for Extraction of Brazilian Green Propolis: Composition and Extraction Yield of Phenolic Compounds. In: **III Iberoamerican Conference on Supercritical Fluid**. 2013. p. 1-5.

PRASAD, K. N., YANG, E., YI, C., ZHAO, M., JIANG, Y. Effects of high pressure extraction on the extraction yield, total phenolic content and antioxidant activity of longan fruit pericarp. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Amsterdam, v. 10, n. 2, p. 155-159, 2009.

SIMÕES, L. M. C., GREGÓRIO, L. E., DA SILVA FILHO, A. A., DE SOUZA, M. L., AZZOLINI, A. E. C. S., BASTOS, J. K., LUCISANO-VALIM, Y. M. Effect of Brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. **Journal of ethnopharmacology**, Lausanne, v. 94, n. 1, p. 59-65, set. set. 2004.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in enzymology**, Nova York, v. 299, p. 152-178, abr. 1999.

SHIMIZU, K.; ASHIDA, H.; MATSUURA, Y.; KANAZAWA, K. Antioxidative bioavailability of artepillin C in Brazilian propolis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Nova York, v. 424, n. 2, p. 181-188, 2004.

SILVA, C. C. F. **Análise química e atividades antioxidante e citotóxica de amostras de própolis de alecrim**. 2008. 110 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) -Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

TIWARI, B.K., DONNELL, C.P., CULLEN, P.J. Effect of sonication on retention of anthocyanins in blackberry juice. **Journal of Food Engeneering**, Davis, v. 93, n. 2, p. 166-171, 2009.

VIROT, M.; TOMAO, V.; LE BOURVELLEC, C.; RENARD, C. M.; CHEMAT, F. Towards the industrial production of antioxidants from food processing by-products with ultrasound-assisted extraction. **Ultrasonics sonochemistry**, Oxford, v. 17, n. 6, p. 1066-1074, ago. 2010.

WU, J.; LIN, L.; CHAU, F. Ultrasound-assisted extraction of ginseng saponins from ginseng roots and cultured ginseng cells. **Ultrasonics sonochemistry**, Londres, v. 8, n. 4, p. 347-352, out. 2001.

4. OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES DA PRÓPOLIS VERDE POR ULTRASSOM E APLICAÇÃO EM SISTEMA LIPÍDICO EMULSIONADO

Resumo

A busca pela substituição de antioxidantes sintéticos por antioxidantes naturais é crescente na indústria de alimentos. Diversos estudos estão sendo realizados com a própolis verde, relatando a capacidade antioxidante atribuída aos seus compostos fenólicos. No entanto, estudos que abrangem as diversas formas de extração dos compostos desta matéria-prima e que busquem realizar um planejamento experimental para obter parâmetros de processos otimizados ainda são escassos. O objetivo deste trabalho foi aplicar um planejamento fatorial (*Design of experiments* – DOE), variando parâmetros como porcentagem de etanol e proporção de amostra:solvente na extração com ultrassom, a fim de se identificar a condição de processo para obtenção de extratos com alto valor de teor total de fenólicos e capacidade antioxidante, visando sua aplicação em sistema modelo de emulsão, comparando com antioxidantes sintéticos como TBHQ, BHA e BHT. Foi aplicado um delineamento fatorial completo do tipo 2^2 com quatro pontos centrais, sendo que as variáveis independentes utilizadas foram a porcentagem de etanol (0 – 99%) e proporção de amostra:solvente (1:20 – 1:50), mantendo o volume final da solução de 30 mL. A variáveis dependentes avaliadas foram o teor de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante por ABTS e ORAC, além dos teores de Artepelin C (ácido 4-hidroxi-3,5-diprenil cinâmico) e acido *p*-cumárico por CLAE. Os resultado obtidos evidenciaram a influência dos parâmetros escolhidos sobre o processo de extração, mostrando que com o uso de 99% v/v de etanol e proporção amostra:solvente de 0,857:30 m/v foi possível obter extratos com alto teor de compostos fenólicos totais (1614,8 mg AG/g amostra) e alta capacidade antioxidante, contendo 807,66 mg de Artepelin C/g própolis e 45,6 mg ácido *p*-cumárico/g própolis. O ensaio acerelado de oxidação com amostras de emulsão lipídica do tipo óleo em água adicionadas de extrato de própolis e de antioxidantes sintéticos mostrou que, após 9 dias de armazenamento em estufa, os valores de peróxido nas amostras com o antioxidante natural foram similares aos encontrados nas amostras adicionadas de TBHQ, representando potencial para uso em sistema lipídicos.

Palavras-chave: Planejamento experimental; Ultrassom; Artepelin C

Abstract

The search for natural antioxidants replacement substituting synthetic ones is increasing in the food industry. Several studies are being carried out with green propolis, reporting its antioxidant capacity attributed to its phenolic compounds. However, the studies that cover the different forms of extraction of compounds of the raw material, that seek to realize an experimental design to obtain the processes parameters of optimization are still scarce. The aim of this work was to perform a factorial design (DOE), varying the percentage of ethanol and sample: solvent proportion in the extraction with ultrasound, thus finding the optimal condiction to extract high content of total phenolic with antioxidant capacity, in to apply resulting extracts in na emulsion system model, comparing with synthetic antioxidants such as TBHQ, BHA and BHT. The complete factorial design (2^2) with four central points was applied and the independent variables were the percentage of ethanol (0 - 99%) and the sample: solvent ratio (1:20 - 1:50), keeping the final volume on to 30 mL of solution. The dependent variables evaluated

were the total content of phenolic compounds and the antioxidant capacity by ABTS and ORAC. The results obtained evidenced an influence of the parameters in the extraction process and the optimum response was achieved by using 99% v / v ethanol and 0.857: 30 m / v sample:solvent ratio. At this condiction, extracts presented the total phenolic compound content of 1.614,8 mg AG / g sample and a higher antioxidant capacity for both ORAC (13.244 µmol TEAC/ g sample) and for ABTS (13.412,14 µmol TEAC / g sample) methods. High performance liquid chromatography indicated that optmized extract presented 807,66 mg of Artpellin C (3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid)/g of sample and 45,6 mg of p-coumaric acid / g of propolis. Accelerated oven test with oil-in-water emulsion added of green própolis extracts and synthetic antioxidants shower that atfer 9 days under heating, peroxide value of samples added of tne natural antioxidant was similar to TBHQ added samples, confirming green própolis extracts as an alternative for food use.

Keywords: Experimental design; Ultrasound; Artipilin C

4.1. Introdução

A análise de dados com o auxílio de um planejamento experimental (DOE) possibilita que o pesquisador conduza seu experimento e analise seus dados de forma a estabelecer ligação entre as conclusões obtidas e os objetivos propostos inicialmente (HAMADA e WU, 2000). Neste Contexto, a metodologia de superfície de resposta (*Response Surface Methodology* – RSM), buscando obter uma resposta otimizada, trabalha com modelos empíricos de acordo com um conjunto de técnicas matemáticas e estatísticas baseando-se no planejamento experimental estabelecido (VIEIRA, 2015).

O estudo da aplicação do planejamento experimental em estudos de otimização de produtos e processos, tais como a extração de antioxidantes naturais vem sendo aplamente realizados. Estes estudos ampliam o interesse sobre o conhecimento de uma possível substituição parcial ou total destes antioxidantes ao invés de antioxidantes sintéticos na índustria alimentícia e para isso o conhecimento das reações de degradação e como podem ser prevenidas ou adiadas é essencial.

A oxidação lipídica é uma das principais reações de deterioração que ocorre durante o processamento e armazenamento de alimentos ricos em óleos e gorduras (KIM; DECKER e LEE, 2012). A reação é responsável por desencadear rancidez organoléptica, degradação de compostos nutricionais e cor, tornando o produto final inaceitável para o consumo (VARGAS-SÁNCHEZ et al., 2014).

Os principais responsáveis pela oxidação são os ácidos graxos insaturados, sendo suas duplas ligações sítios ativos que reagem com o oxigênio (ANDREO; JORGE, 2006). Deste modo, o grau de insaturação de óleos vegetais utilizados como ingredientes em emulsões alimentícias, influencia na susceptibilidade oxidativa.

Dentre os óleos vegetais, o óleo de soja apresenta em sua composição alto teor de ácidos graxos insaturados (70-80%), incluindo cerca de 19% a 30% de ácido oleico, 44% a 62% de ácido linoleico e 4-11% de ácido linolênico (DRUZIAN et al., 2012). O ácido linolênico ($C_{18:3}$) torna este tipo de óleo muito susceptível à oxidação (DOMINGOS et al., 2007).

O grau de insaturação, a composição e o tipo do ácido graxo, bem como as condições de armazenamento, temperatura, luz e umidade são fatores que devem ser avaliados visando retardar a

degradação oxidativa e aumentar o período de armazenamento do produto (OETTERER; REGITANO-D'ARCE; SPOTO, 2006). A velocidade de reação pode ser controlada por meio do uso correto do material da embalagem, atmosfera inerte, condições adequadas de armazenamento e uso de antioxidantes (ARAÚJO, 2011).

Os antioxidantes mais utilizados pela indústria de alimentos são sintéticos como o butil hidroxianisol (BHA), butil hidroxitolueno (BHT), t-butil-hidroquinona (TBHQ) e o galato de propila (PG), mas seu uso tem sido correacionado a riscos a saúde (ALVES; KUBOTA, 2013). Neste sentido, houve um aumento no interesse por pesquisas com antioxidantes naturais como o cacau, arroz, maçã, orégano, alecrim, mel e própolis (GECKIL et al., 2005; JIANG et al., 2013).

Gülçin et al. (2010) avaliaram a capacidade antioxidante da extrato de própolis, do BHA e BHT quando adicionados em emulsão, verificando que a própolis inibiu 93,2% da peroxidação lipídica, enquanto que o BHA e o BHT inibiram 83,3%, 82,1%, respectivamente.

O objetivo do presente capítulo foi utilizar variáveis exploratórias como a porcentagem de etanol e a proporção de amostra:solvente para otimizar a extração utilizando ultrassom, de forma a obter condições ideais de extração para as respostas de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante por ABTS e ORAC, procurando reduzir o uso de matéria prima. Além de reconhecer o ensaio que apresentar melhor resposta e nele identificar e quantificar compostos como Artepelin C e *p*-cumárico, aplicá-lo em sistema modelo de emulsão lipídica para compará-lo com antioxidantes sintéticos por meio da avaliação do teor de peróxido ao longo de 9 dias.

4.2. Material e Métodos

4.2.1. Obtenção da amostra de própolis

A própolis verde foi fornecida pela empresa brasileira Natucentro Indústria e Apiários Centro Oeste Ltda. (Bambuí – MG), coletada por abelhas africanizada, do gênero *Apis Melífera* da planta alecrim do campo ou *Baccharis Dracunculifolia* no mês de novembro do ano de 2015. As amostras foram direcionadas até as dependências do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ – USP, foi realizada uma limpeza visual prévia da amostra, com o objetivo de retirar qualquer material estranho presente. Em seguida, a amostra foi triturada mediante a adição de Nitrogênio líquido até ficar homogênea, foi pesada para verificação do peso total, acondicionada em sacos escuros de polietileno de baixa densidade e armazenada em freezer comercial a -18 ºC.

4.2.2. Estudo do processo de extração por ultrassom

4.2.2.1. Obtenção de extratos antioxidantes

Os extratos foram obtidos com o emprego de soluções etanólicas à 65%, conforme resultados obtidos em ensaios preliminares. Através da observação dos gráficos de superfície de resposta obtidos na primeira otimização relatada no capítulo 3, realizou-se um segundo planejamento experimental mantendo fixo o tempo em 20 minutos, já que no capítulo anterior foi verificado que a partir deste tempo as respostas (teor de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante) aumentaram. Variou-se ainda a proporção de etanol e buscou-se reduzir a proporção de solvente:amostra quando comparada com o capítulo anterior. O estudo com o melhor tempo em que foi obtida resposta considerável e a redução na proporção quando comparado com o outro modelo matemático desenvolvido deve-se à necessidade de redução de custos para a aplicação industrial. A proporção de própolis e solventes adicionada variou entre 1:20 e 1:50 (g/mL), sendo que a extração ocorrereu em banho de ultrassom (Unique, VSC-14000, Brasil) ajustado na potência máxima (28 W/L). Foi utilizado o mesmo volume total de solvente (30 mL) nos ensaios com diferentes proporções de amostra:solvente, visto que as ondas de ultrassom influenciam de acordo com o volume obtido.

A amostra foi centrifugada a 5000 rpm por 15 minutos em micro centrífuga refrigerada (Hitachi KOKI; Japão) mantida em temperatura ambiente e posteriormente filtrada em papel de filtro tipo Whatman n. 2. O sobrenadante foi rotaevaporado (rotaevaporador Buchi Labortechnik AG – modelo R-215) à 45°C para a evaporação do solvente utilizado, em seguida o material foi armazenado sob refrigeração à 7°C em frascos âmbar até o momento das análises para a determinação da capacidade antioxidante (ABTS e ORAC) e teor de compostos fenólicos totais.

4.2.2.2. Delineamento experimental

Foi aplicado um delineamento experimental do tipo delineamento central composto rotacional (DCCR) e estudados os efeitos da variação da proporção amostra:solvente e porcentagem de etanol, fixando o tempo em 20 minutos, para a obtenção de respostas como o teor de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante dos extratos da própolis verde. No total foram realizados 12 ensaios combinando as variáveis, sendo 4 repetições do ponto central.

A Tabela 7 apresenta as faixas de estudo das condições de preparo dos extratos e os níveis das variáveis e o delineamento experimental com as variáveis independentes e dependentes.

Tabela 7. Faixa de estudo das condições de preparo dos extratos de própolis verde e seus níveis de variação

Variáveis explanatórias	Níveis de Variação				
	-1,41	-1	0	1	+1,41
% Etanol (x_1)	0	14,4	49,5	84,6	99
Proporção (própolis:solvente) (g/mL) (x_2)	1:20	1:24,3	1:35	1:45,63	1:50

As variáveis dependentes foram: o teor de compostos fenólicos totais e a capacidade antioxidante determinada pelo método ORAC e ABTS. Os ensaios foram realizados de forma aleatória. Após a análise dos efeitos principais e interações, os efeitos não significativos ao nível de 5% de probabilidade foram eliminados e com os coeficientes de regressão foram ajustados modelo matemático conforme a equação a seguir:

$$Y= \beta 0 + \beta 1x1 + \beta 2x2 + \beta 12x1x2 + \beta 11x1^2 + \beta 22x2^2 + \varepsilon$$

Onde: Y = resposta (variável dependente)
x_1 e x_2 = níveis codificados das variáveis explanatórias
β_0 = média
β'_s = coeficientes de regressão
ε= resíduo

Os modelos foram avaliados em relação ao coeficiente de determinação (R^2) e teste de F comparado ao valor da tabela de 95% de probabilidade para uma distribuição de referência, com auxílio do aplicativo Statistica 12.0 (Statsoft, USA). Após a validação do modelo, as regiões de interesse das superfícies de respostas geradas com as curvas de iso-respostas foram estudadas, a fim de determinar os níveis ótimos do processo em estudo. Após a identificação das melhores condições, foi realizada a validação prática do modelo teórico, sendo que os extratos produzidos nesta etapa serviram de ponto de partida para as análises subsequentes.

4.2.3. Determinação do teor de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante *in vitro*

4.2.3.1. Determinação do teor de compostos fenólicos totais

A determinação do teor de compostos fenólicos totais ou *total phenolic content* (TPC) foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventos (1999), estabelecendo-se o ácido gálico como padrão para realização de uma curva. Para a determinação do teor de fenólicos totais, 0,5 mL dos extratos obtidos na extração por ultrassom foram utilizados. Foi misturado à estes 2,5 mL do reagente *Folin-Ciocalteau* (diluído 1:10) e 2,0 mL de Na_2CO_3 4% (m/v).

Após 2 h de incubação no escuro à temperatura ambiente, a absorbância foi medida em espectrofotômetro (Shimadzu, modelo UV 1240, Japão) à 740 nm. O branco do sistema foi preparado da mesma forma, porém sem a alíquota da amostra.

Os resultados do teor de compostos fenólicos totais foram expressos como equivalentes de ácido gálico (mg AG/g), calculados por meio de uma curva construída com concentrações variando de 5 a 60 µg/mL.

4.2.3.2. Identificação e quantificação de ácidos fenólicos

A análise foi realizada no laboratório de Bioquímica do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ – USP. As análises por CLAE em fase reversa foram realizadas de acordo com o método descrito por Alencar et al. (2007). Os extratos foram previamente filtrados utilizando filtro 0,22 µm (Millipore) e diluídos em metanol e uma alíquota de 10 microlitros foi injetada em um cromatógrafo líquido (Shimadzu Co) acoplado à um detector de arranjo fotodiodos e a coluna de fase reversa C_{18} (250 mm x 4,6 mm) com tamanho de partícula de 5 µm. Foram utilizadas duas fases móveis, tais como água Milli-Q:ácido acético (19:1) (solvente A) e metanol (solvente B). O gradiente iniciou com 30% do solvente B até 40% de B em 15 minutos, 50% do solvente B em 30 minutos, 60% do solvente B em 45 minutos, 75% do solvente B em 65 minutos, 75% do solvente B em 85 minutos, 90% do solvente B em 95 minutos e 30% do solvente B em 105 minutos. A coluna foi mantida à uma temperatura constante de 30°C e os cromatogramas foram processados utilizando o software Class-VP. Os compostos foram identificados pelo espectro de absorção na região ultravioleta, utilizando os recursos do detector de arranjo de fotodiodos, pela comparação do tempo de retenção e co-cromatografia de padrões. Neste trabalho, foram utilizados os seguintes padrões autênticos de ácidos fenólicos é flavonoides (Extrasynthese Co. e Sigma Aldrich): ácido *p*-cumárico e Artepelin C. A identificação dos compostos foi realizada em 300 nm.

4.2.4. Capacidade antioxidante

A capacidade antioxidante dos extratos de própolis verde foi determinada por ensaios in vitro ABTS e ORAC nas amostras produzidas nas condições selecionadas.

4.2.4.1. Capacidade antioxidante pelo método ABTS

Realizou-se o método ABTS para a capacidade antioxidante de acordo com a metodologia proposta por Re et. al (1999) e Dos Santos et al. (2008). O radical ABTS foi gerado a partir da reação de 5 mL de solução aquosa de $ABTS^{\bullet+}$ (7 mM) com 88 µL de solução de persulfato de potássio (140 $mM.L^{-1}$). A mistura formada permaneceu no escuro por 12-16 horas à 25°C. Posteriormente, foi

diluída com etanol para obter absorbância de 0,7 ± 0,02 a 734 nm usando um espectrofotômetro do modelo (Shimadzu, modelo UV 1240, Japão).

Transferiu-se alíquotas de 30 µL do extrato ou do antioxidante padrão Trolox (ácido 2-carboxilico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano) para tubos contendo 3 mL da solução do radical verde-azulado $ABTS^{\bullet+}$ em ambiente escuro. A redução da absorbância a 734 nm foi medida depois de 6 min, utilizando um espectofotômetro (Shimadzu, modelo UV 1240, Japão).

Como referência de padrão, o Trolox foi utilizado e o branco não continha a alíquota da amostra de própolis, substituindo-a por etanol. A capacidade antioxidante dos extratos foi expressa como TEAC (Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox) em µmol TEAC /g de amostra seca.

4.2.4.2. Capacidade antioxidante pelo método ORAC

A análise foi realizada no laboratório de Bioquímica do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ – USP. Utilizou-se o método ORAC adaptado daquele descrito por Chisté et al (2011). Os reagentes utilizados no método foram diluídos em tampão fosfato de potássio 75 mM, pH 7,4. Para a análise foi utilizado 30 µL de extrato/padrão, 60 µL de fluoresceína (concentração de 4,066mM) e 110 µL de AAPH (dicloreto de 2,2'-azobis(2-amidinopropano)) na concentração de 76 mM.

Para o preparo do branco, utilizou-se apenas 200 µL de tampão fosfato. O controle foi realizado com 30 µL de tampão fosfato, 60 µL de fluoresceína e 110 µL de AAPH. As leituras foram feitas em leitor de microplacas SpectraMax® M3 (Molecular Devices), em condições específicas de temperatura (37°C), por 2 horas de incubação e fluorescência (excitação 485 nm, emissão 528 nm).

Para a construção da curva padrão foi utilizado o Trolox 1 mM nas concentrações de 12,5 a 400 µM. A proteção fornecida pelos extratos (ou padrão) foi calculada usando a diferença entre a área sob a curva de decaimento de fluorescência na presença da amostra (AUC amostra) e na sua ausência (AUC branco). Por meio de equações de regressão e cálculos fornecidos pelo software, os resultados finais foram lançados na reta obtida pela curva analítica. Os resultados de atividade antioxidante foram, então, expressos em equivalente Trolox (µmol TEAC/g amostra de própolis).

4.2.5. Aplicação dos extratos obtidos em sistema modelo

4.2.5.1. Preparo de emulsões

A metodologia de preparo das emulsões adotada foi realizada de acordo com Huang et al. (1996). O preparo das emulsões do tipo óleo em água foi realizado adicionando-se 200 g de óleo de soja refinado sem adição de antioxidante (Liza/Cargil), 180 g de água destilada, e 20 g de Monolaurato de Sorbitan Etoxilado 20 EO (Tween 20) (Synth/Periódica) como emulsionante em béquer. A mistura foi realizada em homogeneizador de amostra tipo Turrax (Ika T25 basic, Staufen, Germany) por 1 minuto a 18000 rpm.

Os extratos foram aplicados na emulsão em concentrações de 100 e 200 mg/kg de acordo com o teor de compostos fenólicos totais encontrados e foram obtidas 108 amostras, considerando duas concentrações para cada antioxidante, experimento feito em triplicata e dias de análise de teor de peróxido. A água adicionada na emulsão foi reduzida de acordo com o volume deste solvente no extrato em cada ensaio, para manutenção mais igualitária da proporção de água e óleo na emulsão. A adição de antioxidante foi na mesma concentração de extrato, utilizando-se os antioxidantes sintéticos TBHQ (Sigma-Aldrich), BHA (Sigma-Aldrich) e BHT (Sigma-Aldrich). A avaliação da atividade antioxidade das emulsões foi realizada através de uma comparação entre as amostras que contenham apenas o extrato de própolis com aquelas adicionadas dos antioxidantes sintéticos.

As amostras que continham os antioxidantes sintéticos foram adicionadas em tubos de 7 cm de altura com 1 cm de diâmetro, tais tubos foram colocados em estufa e submetidos ao aquecimento a 40°C durante 9 dias consecutivos de acordo com Shantha e Decker (1994). Deixou-se uma distância considerável entre todas as amostras para que a circulação de ar da estufa não fosse prejudicada.

A determinação de hidroperóxidos ocorreu nos tempos 0, 3, 6 e 9 dias pelo método espectrofotométrico com tiocianato férrico e a quantificação dos hidroperóxidos foi realizada através da construção de uma curva padrão com concentrações conhecidas de hidroperóxidos de cumeno. Os resultados foram expressos em mg de equivalente de hidroperóxido de cumeno/kg de óleo (DE CAMARGO et al., 2016). O experimento foi realizado em triplicata.

Foi realizada a Análise de variância (ANOVA) e quando aplicáveis, os dados foram comparados pelo teste de Tukey para média de 3 repetições ($p \leq 0,5$) e correlacionados, utilizando o aplicativo SAS 9.3.

4.3. Resultados e discussão

A fim de otimizar a extração, deve-se conhecer a influência das variáveis e de suas interações no processo (BULDUK; GEZER E CENGIZ, 2015) através da superfície de resposta.

O nível das variáveis dependentes e independentes, bem como seus valores codificados são apresentados na tabela 8. Os valores das variáveis dependentes foram obtidos pelas médias das triplicatas seguida do desvio padrão.

Tabela 8. Valores codificados e reais das variáveis independentes e variáveis dependentes obtidas.

	Variáveis independentes				Variáveis dependentes		
	% Etanol (x_1)		Proporção própolis:solvente (x_2)		Y_{TPC}(mg AG/g amostra)[b]	Y_{TAA} ORAC (µmol TEAC/g amostra)[c]	Y_{TAA} ABTS (µmol TEAC/g amostra)[d]
Ensaio[a]	Valor codificado	Valor real	Valor codificado	Valor Ensaio			
1	-1	14,4	-1	1,231:30	132,9±0,7	5003,7±163,5	2665,55±19,4
2	1	84,6	-1	1,231:30	646,5±2,0	4925,6±109,4	2901,91±34,0
3	-1	14,4	1	0,657:30	125,3±1,0	3439,1±2,2	1155,39±11,4
4	1	84,6	1	0,657:30	651,0±4,9	8107,4±321,0	4689,09±45,3
5	-1,41	0	0	0,857:30	57,9±1,3	21,3±2,02	408,66±3,3
6	1,41	99	0	0,857:30	1614,8±28,2	13244,5±62,8	13412,14±68,8
7	0	49,5	-1,41	1,5:30	278,6±0,9	3551,8±27,8	1219,34±57,0
8	0	49,5	1,41	0,6:30	212,3±0,5	2569,1±377,4	1439,57±4,9
9	0	49,5	0	0,857:30	719,4±3,8	7605,7±352,9	2417,4±10,1
10	0	49,5	0	0,857:30	719,0±1,9	7650,6±210,9	2417,4±3,3
11	0	49,5	0	0,857:30	719,0±3,8	8464,1±313,9	2574,01±49,1
12	0	49,5	0	0,857:30	718,5±3,8	6702,4±576,8	2260,79±86,4

Valor do ensaio = mantendo o volume de solvente água:etanol de todos os ensaios em 30 mL, variando a massa de própolis verde.
[a] Ensaios realizados em ordem aleatória.
[b] Teor de compostos fenólicos totais.
[c] Capacidade antioxidante total por ORAC.
[d] Capacidade antioxidante total por ABTS.

4.3.1. Efeito das variáveis independentes do processo sobre os compostos fenólicos totais (TPC)

O teor de compostos fenólicos totais, determinado pelo método de Folin Ciocalteu, variou de 57,9± 1,3 – 1.614,8± 28,2 mg AG/g amostra (Tabela 1). Estes valores estão de acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade da Própolis exigido pelo MAPA, que preconiza o mínimo de 0,5% m/m de compostos fenólicos no extrato hidroalcoólico da própolis (BRASIL, 2001). Bittencourt et al. (2015), estudando sobre o perfil antioxidante da própolis brasileira extraída através de métodos tradicionais, que utilizam agitação e variação de temperatura, encontraram 185,52 mg AG/g amostra de compostos fenólicos totais. Enquanto que Vargas-Sánchez et al. (2014) avaliaram o teor de compostos fenólicos de extrato de própolis coletada do México, encontrando o máximo de 244,8 ± 0.02 mg AG/g extrato.

Machado et al. (2015), estudando os compostos antioxidantes da própolis verde extraídos por extração supercrítica, avaliaram 3 porcentagens de etanol (0, 1 e 2%), encontrando valores de 62,21; 80,3 e 66,72 mg AG/g amostra, respectivamente. Avaliando a diferença entre o mínimo e o máximo de TPC encontrado em nosso trabalho, pode-se concluir que o menor valor foi observado no

ensaio extraído com 0% de etanol, enquanto o maior valor foi verificado no ensaio com 99% do solvente. Neste sentido, Cunha et al (2004), analisando o teor de compostos fenólicos extraídos com diferentes porcentagens de etanol (30, 50, 70 e 100%), verificaram um aumento na eficiência de extração quando a concentração era igual ou maior que 70%. Oldoni et al (2015), trabalhando com otimização da extração de compostos fenólicos da própolis, avaliaram a variação do parâmetro "porcentagem de etanol (50 – 80%)", concluindo que o TPC aumenta proporcionalmente com o aumento dessa variável. Estas afirmações estão de acordo com o que foi encontrado em nosso estudo, pois a melhor extração de compostos fenólicos ocorre em maiores concentrações de etanol por estar correlacionado com a polaridade dos compostos majoritários encontrados na matéria-prima.

A concentração de etanol adicionada afeta não somente o conteúdo de compostos fenólicos totais, mas também a atividade antioxidante do extrato de própolis (OLDONI et al., 2015). Morelli e Prado (2012), verificaram ainda que a concentração de etanol é uma variável mais significante quando comparada ao tempo de extração para a resposta de atividade antioxidante pelo método de DPPH. Biscaia e Ferreira (2009), estudando a otimização da extração compostos fenólicos da própolis brasileira (PR-Brasil) por técnicas de extração a baixa pressão, extração com fluido supercrítico (EFS), Soxhlet e maceração variando diferentes solventes, verificaram que a utilização de etanol aumentou o rendimento de extração em três vezes na EFS.

Observa-se portanto a partir dos dados da literatura, que não somente as variáveis envolvidas, mas também o processo de extração afetam o rendimento do teor de compostos fenólicos desta matéria prima. Além desses fatores, o clima, condições do ambiente e sazonalidade são fatores variáveis que modificam a composição da própolis (ANKLAM, 1998; PARK et al., 2004).

A análise de variância (ANOVA) do modelo é mostrada na tabela 9.

Tabela 9. Análise de variância (ANOVA) para o teor de compostos fenólicos totais da própolis verde.

Fonte de variação	**Soma dos quadrados**	**Grau de liberdade (GL)**	**Quadrado médio**	**F**
Regressão	1.800.374	5	1.800.374	49,84
Resíduo	216.636	6	36.106	
Total	2.051.725	11		

R^2= 0,89 $F_{0,95;\ 5;\ 6}$ = 4,39

Por meio da ANOVA obtida pela análise de TPC verificou-se que o modelo é considerado significativo com valor de coeficiente de correlação (R^2) igual a 0,89, sendo assim, o modelo está apto para explicar 89% dos resultados de teor de compostos fenólicos totais. Além disso, o valor F da regressão corrobora com o fato do modelo proposto ser válido, já que o $F_{calculado}$ é superior ao $F_{tabelado}$. O modelo matemático de segunda ordem encontrado (Equação 1) demonstrou os parâmetros lineares e quadráticos considerados significativos. Os termos não significativos foram mantidos no modelo para fins de comparação com as superfícies ajustadas para o teor de compostos fenólicos totais apresentados a seguir.

$$Y_{TPC} = 719{,}42 + 405{,}52x_1 + 20{,}86x_1^2 - 12{,}10x_2 - 276{,}35x_2^2 + 3{,}02x_1x_2 \quad (1)$$

O parâmetro linear (x_1) e o parâmetro quadrático (x_2) foram significativos ao nível de $p<0{,}05$, enquanto os outros parâmetros não tiveram o mesmo resultado. Tais parâmetros significativos podem ser observados pelo diagrama de Pareto a seguir (Figura 15).

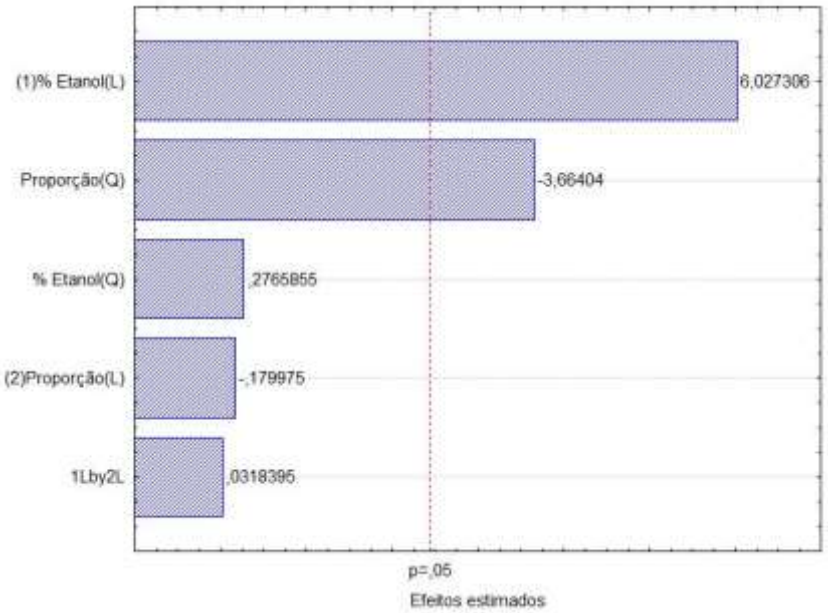

Figura 15. Diagrama de Pareto para teor de compostos fenólicos totais.

O efeito das variáveis x_1 (% etanol) e x_2 (proporção) sobre o teor de compostos fenólicos totais é mostrado pelas superfícies de resposta e gráficos de contorno, respectivamente (Figura 16).

A análise das superfícies de resposta permitiu identificar a região em que a amostra de própolis verde obtinha melhor extração utilizando a metodologia de ultrassom. Pode-se verificar que a extração obteve melhor resultados entre 49,5 – 99% de etanol e seu ponto ótimo manteve-se em 99% de etanol e 0,857:30 de proporção amostra:solvente.

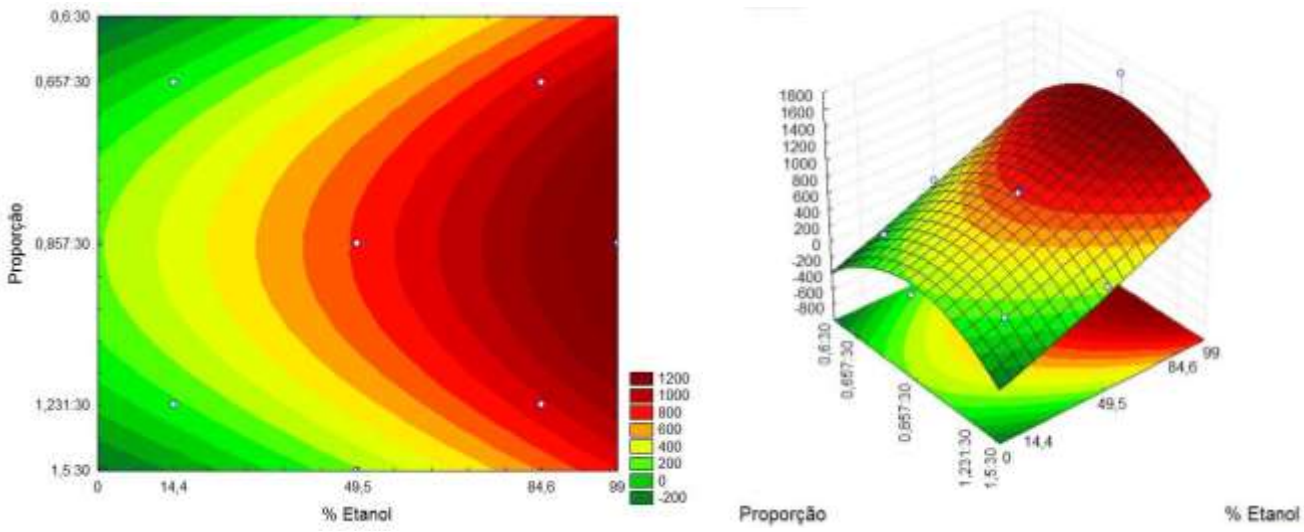

Figura 16. Influência da porcentagem de etanol (x_1) e proporção de amostra: solvente (x_2) sobre o teor de compostos fenólicos totais da própolis verde.

A figura 17 representa os perfis de valores preditos e desejabilididade indica que o nível máximo de teor de compostos fenólicos totais pode ser alcançado com a máxima porcentagem de etanol utilizada e uma proporção média. Além disso, verifica-se que a partir do momento em que o experimento é realizado com mais de 0,857:30 de proporção amostra:solvente, ocorre uma queda no nível de desejabilidade e TPC. Cottica et al. (2011) verificaram em seu estudo que a porcentagem de etanol e a concentração de própolis utilizada se correlacionaram com o teor de compostos fenólicos totais.

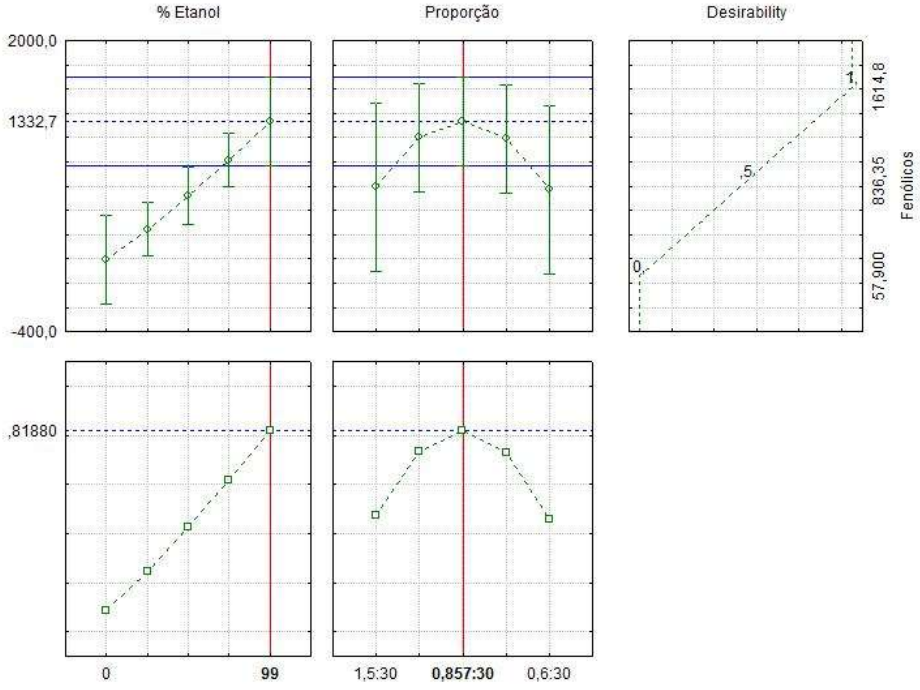

Figura 17. Perfis para o teor de compostos fenólicos totais e desejabilidade para extração ótima por ultrassom. Legenda: A linha vermelha indica o valor ótimo.

Os perfis de desejabilidade plotados mostraram em quais níveis das variáveis independentes estudadas (x_1 e x_2) produzem a resposta mais desejável da variável dependente (Y_{TPC}). Os perfis indicaram que 99% de etanol são um rendimento ótimo de teor de compostos fenólicos totais, com pontuação de desejabilidade de 0,81.

4.3.2. Efeito das variáveis independentes do processo sobre a capacidade antioxidante dos compostos da própolis verde (TAA)

4.3.2.1. ABTS (2,2 azinobis- (3-etilbenzotiazolina)-6-ácido sulfônico)

Diversos estudos de otimização de extração de compostos fenólicos e antioxidantes de produtos naturais estão sendo realizados variando parâmetros como tempo, proporção, temperatura e porcentagem de etanol (MORELLI e PRADO, 2012; NOUR, TRANDAFIR e COSMULESCU, 2016). Neste sentido, o planejamento experimental busca minimizar custos e tempo de processo, maximizando rendimento, produtividade, mantendo a qualidade do material analisado.

A capacidade antioxidante dos extratos hidroalcoólicos de própolis verde determinada pelo método de ABTS, a partir da descoloração do radical catiônico 2,2 azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-ácido sulfônico, variou de 408,66±3,3 – 13.412,14±68,8 µmol TEAC/g amostra (Tabela 1). Palomino et al. (2009), examinando a capacidade antioxidante por ABTS da própolis de diferentes localidades preparada com etanol 96% por maceração, encontrou valores que variaram de 455,5 ± 7,8 - 1091 ± 17,3 µmol de TEAC/g. Estes valores encontrados comprovam a eficiência do ultrassom sobre o método tradicional de maceração até mesmo com uma porcentagem de etanol utilizada sendo próxima ao nosso trabalho. Além disso, os autores ainda comentam o tempo de extração, que é em torno de 48 horas e este tempo é considerado bastante superior quando feito uma comparação entre os estudos.

A tabela 10 apresenta a Análise de variância (ANOVA) do modelo.

Tabela 10. Análise de variância (ANOVA) para a capacidade antioxidante por ABTS da própolis verde.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Grau de liberdade (GL)	Quadrado médio	F
Regressão	90.615.769	2	90.615.769	21,62
Resíduo	37.698340	9	4.188.704	
Total	128.314.109	11		

R^2= 0,70 $F_{0,95;\ 2;\ 9}$ = 4,26

A análise de variância permitiu verificar uma porcentagem de variação explicada do modelo de 70%. O teste F indicou que as regressões são significativas, já que o $F_{calculado}$ (21,62) é 5 vezes superior ao $F_{tabelado}$ (4,26). O modelo parametrizado, para as variáveis codificadas, que representa a

capacidade antioxidante por ABTS em função da porcentagem de etanol e proporção de amostra:solvente, é representado na equação 2.

$$YTAA = 1.728,68 + 2.771,36x_1 + 2.108,40x_1^2 \quad (2)$$

Foram mantidos no modelo apenas os parâmetros linear (x_1) e quadrático (x_1^2), considerados significativos ao nível de $p<0,05$.

A maior capacidade antioxidante observada para este método foi encontrada utilizando 99% de etanol (Figura 18), assim como observado no resultado de teor de compostos fenólicos totais.

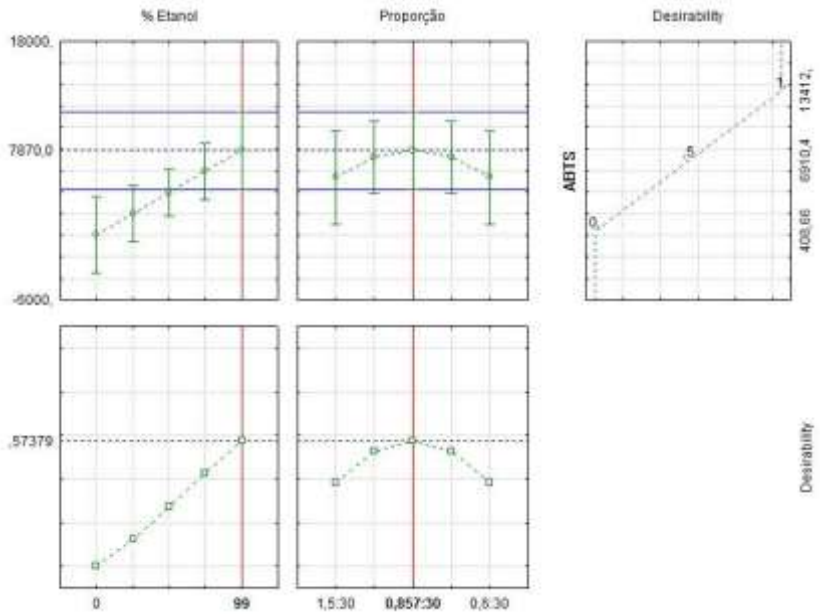

Figura 18. Perfis para a capacidade antioxidante por ABTS e desejabilidade para extração ótima por ultrassom. A linha vermelha indica o valor ótimo.

Observa-se com os perfis obtidos na figura 19 que o ponto ótimo encontra-se em 99% de etanol e proporção entre 0,857:30 – 0,657:30 de amostra:solvente, podendo ser observado por meio das superfícies de resposta ajustadas para ABTS na figura 18. Além disso, a desejabilidade do ponto ótimo para porcentagem de etanol foi de 0,78.

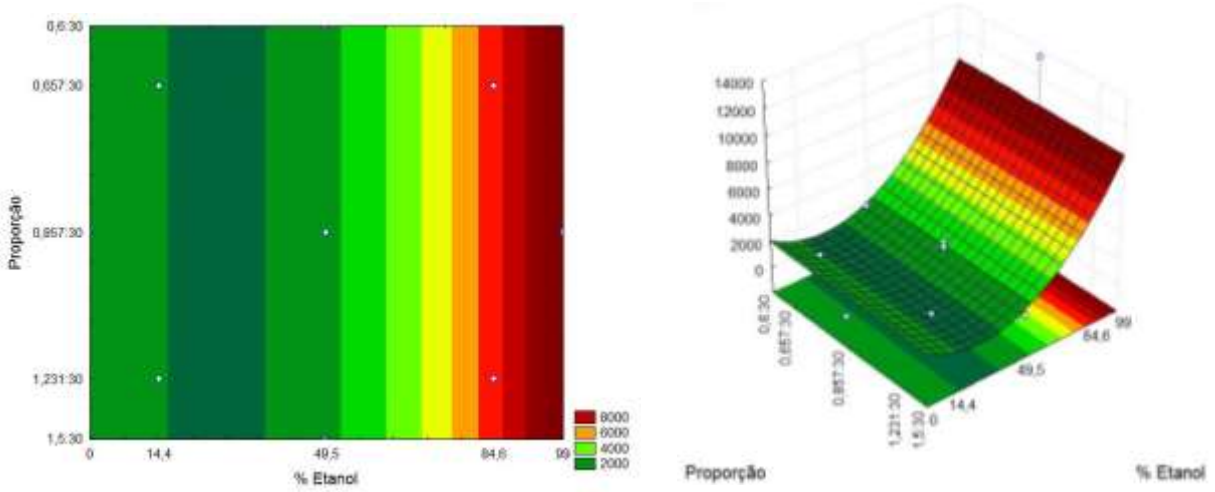

Figura 19. Influência da porcentagem de etanol (x_1) e proporção de amostra: solvente (x_2) sobre a capacidade antioxidante por ABTS da própolis verde.

Observou-se por meio das superfícies de resposta que a porcentagem de etanol 99% (v/v) em todas as proporções proporcionou maior capacidade antioxidante, desta forma, pode-se concluir que esta concentração de solvente (etanol:água) é considerada a mais eficiente quanto ao poder de extração em todos os níveis de proporção. Valores abaixo desta porcentagem não demonstraram-se igualmente eficientes no resultado final de extração.

Nour, Trandafir e Cosmulescu (2016) determinaram a capacidade antioxidante de folhas de nogueira com diferentes proporções de sólido:solvente utilizando solvente hidroalcoólico e concluíram que a proporção 4.96 g/mL obteve a condição ótima no ultrassom. Afirmaram ainda que os principais fatores que influenciaram a extração por ultrassom são a proporção e a porcentagem de etanol utilizada.

Tomei e Salvador (2007) indicaram em seu estudo a importância de se correlacionar métodos indiretos, como o ABTS, com métodos diretos, como ORAC, de determinação da capacidade antioxidante para se obter um maior grau de segurança analítica dos resultados obtidos no experimento.

4.3.2.2. ORAC (*Oxygen radical absorbance capacity*)

Huang et al. (2005) e Ou et al. (2001), estudando os métodos diretos e indiretos de determinação da capacidade antioxidante, verificaram sob o ponto de vista do mecanismo envolvido, que a metodologia de ORAC é adequada quando se usa alimentos, produtos naturais e fluidos biológicos.

Os valores observados para ORAC variaram de 21,3 ± 2,02 - 13.244,5 ± 62,8 µmol TEAC/g amostra, alguns autores estudando a própolis de diversas localidades do mundo encontraram valores dentro desta faixa. Carneiro et al. (2016), estudando a própolis de Minas Gerais (MG), São Paulo

(SP) e Rio Grande do Sul (RS) encontraram valor de aproximadamente 1000 µmol TEAC/g amostra. Corrêa et al. (2016) avaliaram o poder da extração por maceração à 30°C da própolis de MG e observaram 5.769,7 µmol TEAC/g amostra estudada. Enquanto Sun et al (2015), avaliando a influência de diferentes porcentagens de etanol (25, 50, 75, 95 e 100%) sobre a extração da própolis da China por ultrassom, verificaram valores variando de 13,8 – 2.759,5 µmol TEAC/g amostra. Já Miguel et al. (2014) observaram em seu trabalho, com a própolis de diferentes localidades do Marrocos, valores variando de 1.106,4 ± 78,1 – 2.012,1 ± 78,1 µmol TEAC/g amostra. Assim, pode-se concluir a partir de uma comparação de todos estes trabalhos que as faixas das variáveis estudadas, o tipo de extração e de amostra confere grande diferença entre as respostas.

Foi realizada uma análise de variância e os resultados podem ser observado nas tabela 11.

Tabela 11. Análise de variância para a capacidade antioxidante por ORAC dos extratos.

Fonte de variação	**Soma dos Quadrados**	**Grau de liberdade (GL)**	**Quadrado Médio**	**F**
Regressão	101.894.516	3	101.894.516	28,0
Resíduo	29.069.510	8	3.633.689	
Total	130.964.026	11		

R^2=0,7 $F_{0,95;\ 3;\ 8}$ = 4,0

A análise de variância apresentada na tabela 11 possibilitou verificar a validade do modelo, avaliando o coeficiente de determinação (R^2) e o teste F. Assim, a porcentagem de variação explicada pelo modelo foi de 77%, considerada razoável para o processo. O teste F foi significativo, sendo o modelo adequado para descrever os resultados através da superfície de resposta. Deste modo, temos a equação 3 do modelo parametrizado a partir das variáveis codificadas.

$$Y_{TAA} = 7.323,20 + 2.913,03X_1 - 2.080,33X_2^2 + 1.186,60X_1X_2 \qquad (3)$$

Rodrigues e Iemma (2014) afirmam que para que o modelo seja o mais simples e prático, mas sem perder sua qualidade, é desejável que o mesmo tenha o menor número possível de parâmetros. Assim, foram mantidos no modelo apenas o parâmetro linear (x_1), quadrático (x_2) e a interação entre eles.

Através das superfícies de resposta geradas pelo modelo em 2D e 3D, respectivamente (Figura 20), e dos perfis (Figura 21), pode-se obter as condições para a capacidade antioxidante que resultam no ótimo.

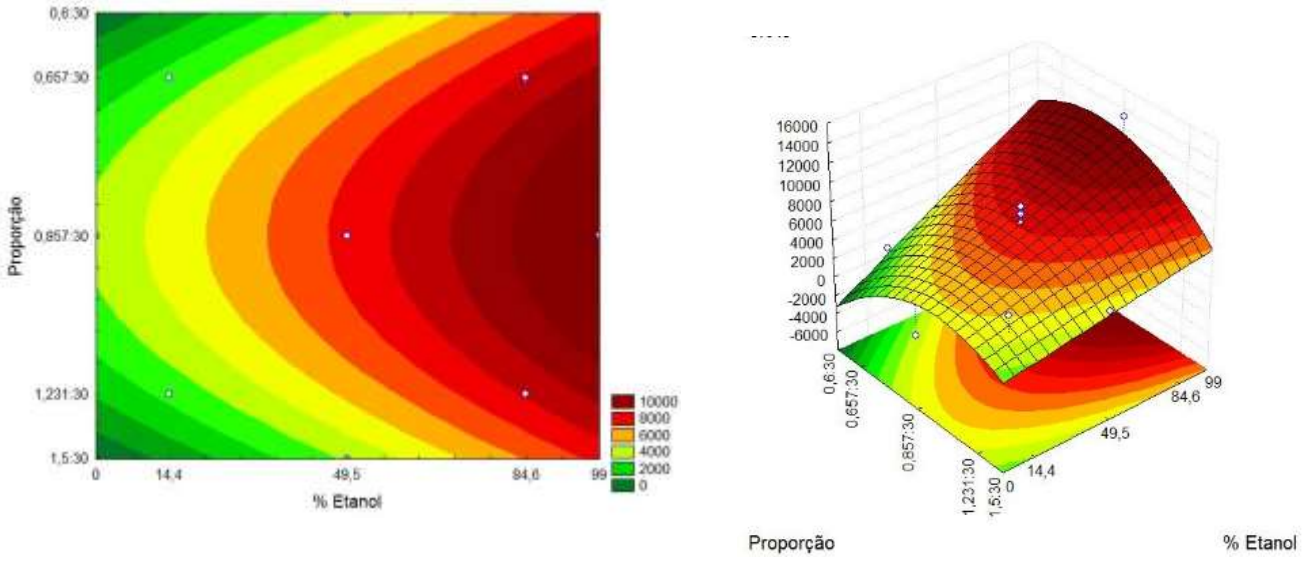

Figura 20. Influência da porcentagem de etanol (x1) e proporção de amostra: solvente (x2) sobre a capacidade antioxidante por ORAC da própolis verde.

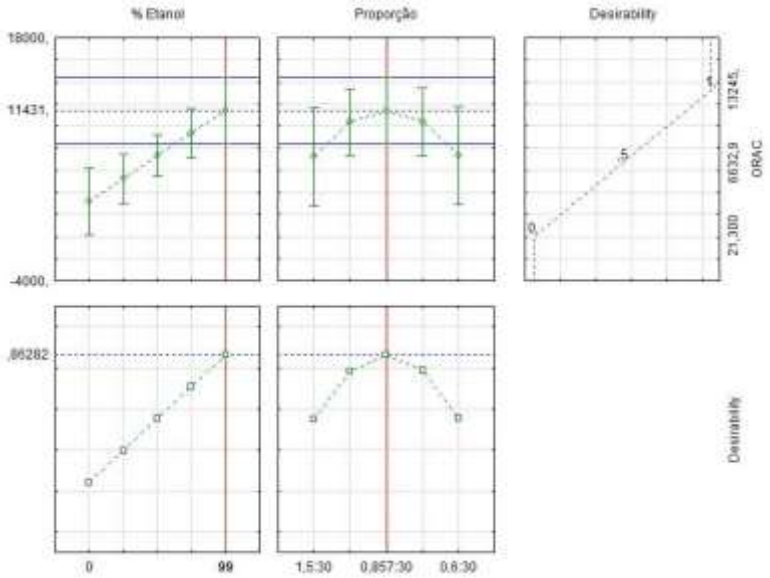

Figura 21. Perfis para a capacidade antioxidante por ORAC e desejabilidade para extração ótima por ultrassom. A linha vermelha indica o valor ótimo.

As superfícies de resposta e gráficos de contorno, bem como os perfis obtidos para ORAC, assim como foi obtidos para as outras respostas, possibilitam concluir que a faixa ótima de estudo é em 99% de etanol e 0,857:30 de proporção de amostra:solvente, condição de extração coincidentemente aplicada ao ensaio 6 do delineamento, como pode ser observado na figura 22. Por esse motivo não foi necessário realizar análises subsequentes para comprovar a validação prática do modelo teórico, e já que os ensaios foram realizados em triplicata.

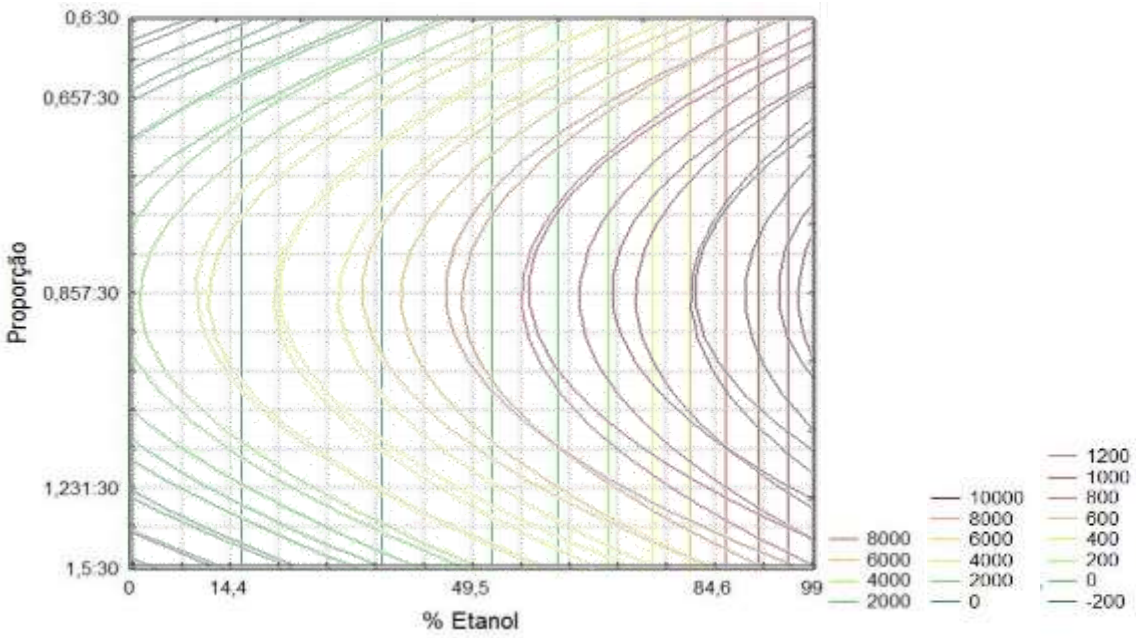

Figura 22. Sobreposição dos gráficos de contorno obtidos para ORAC, ABTS e Fenólicos.

O extrato obtido na condição otimizada foi considerado ideal para posterior identificação e quantificação de compostos fenólicos como ácido p-cumárico e artepelin C por cromatografia líquida de alta eficiência. Além disso, foi aplicado em emulsão para comparação com antioxidantes sintéticos (BHA, BHT e TBHQ), buscando como alternativa uma substituição parcial ou total dos mesmos em nível industrial.

Comparando os resultados obtidos no capítulo 3 e 4 para o teor de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante, pôde-se verificar o aumento expressivo destas respostas do terceiro para o quarto capítulo. Assim, a utilização de uma menor quantidade de própolis verde não influenciou numa diminuição dos compostos fenólicos, este fato também pode ser verificado por meio dos dados obtidos na cromatografia, onde o composto majoritário aumentou cerca de

4.3.3. Identificação e quantificação dos compostos fenólicos

A figura 23 apresenta o cromatograma do ensaio 6 de própolis verde extraída por ultrassom. O conteúdo dos compostos fenólicos foram expresso em mg/ g de extrato com o respectivo desvio padrão.

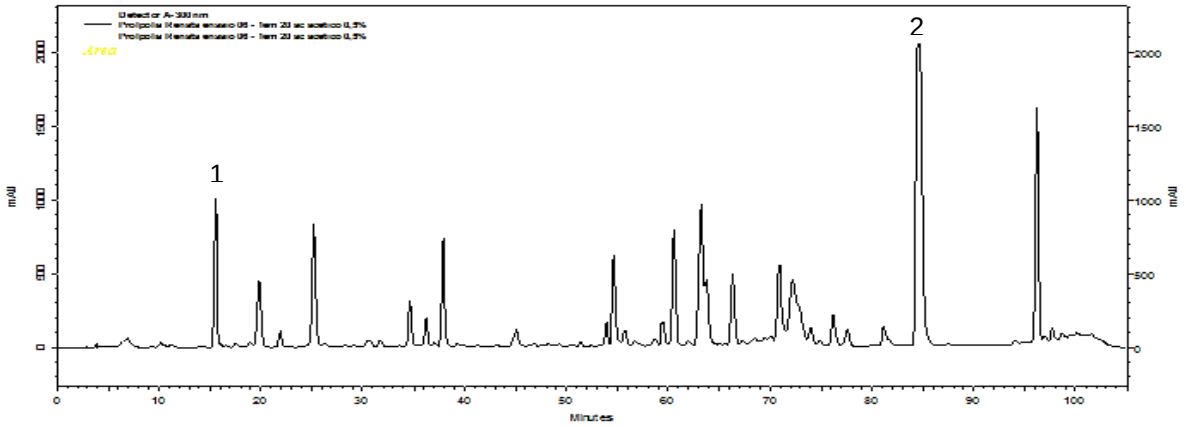

Figura 23. Cromatograma obtido do extrato em 300 nm. Identificação do pico: (1) ácido *p*-cumárico; (2) artepelin C.

O cromatograma do extrato de própolis verde mostrou-se complexo pela quantidade de picos em diferentes tempos de retenção. O composto fenólico majoritário no extrato foi o ácido 4-hidroxi-3,5-diprenil (Artepelin C) com 807,6 ± 57,7 mg Artepelin C/g própolis assim como observado por Castro et al. (2007) ao estudarem a composição química da própolis verde, verificaram que o composto majoritário encontrado foi o Artepelin C.

Apesar de o composto Artepelin C ser predominante em termos de quantidade, a extração do ácido *p*-cumarico mostrou-se superior quando comparado à outros trabalhos, sua concentração no extrato foi de 45,6 ± 0,2 mg *p*-cumárico/g própolis. Oldoni et al. (2015) obtiveram como resultado da quantificação do mesmo composto o valor de 3,7 ± 1,9 mg *p*-cumárico/g própolis. A diferença existente entre a concentração deste composto nesse estudo em comparação à outros trabalhos deve-se dentre muitos fatores à localização geográfica de extração da matéria prima pelas abelhas (INOUE et al. (2007). Fernandes-Silva et al. (2013), em um estudo com própolis de diferentes estados e cidades, utilizando diversos solventes, encontraram valores de ácido *p*-cumárico variando de 1,41 – 7,43 mg/g própolis bruta e valores de Artepelin C variando de 0,08 – 1,02 mg/g própolis bruta, concluindo que os maiores valores de ambos os compostos foram encontrados na própolis obtida no município de Esmeraldas (Minas Gerais).

Castro et al (2007) indicaram que os compostos derivados do ácido cinâmico, como o ácido *p*-cumárico são uma das substâncias mais abundantes na própolis, concluíram ainda que o composto Artepelin C é um dos compostos majoritários na própolis do sudeste brasileiro. Este resultado pode ser comprovado com os cromatogramas e quantidades de ambos compostos fenólicos analisados em nosso estudo.

Sun et al. (2015), estudando a extração da própolis de Pequim (China) com diferentes porcentagens de etanol (0, 25, 50, 75, 95 e 100%), encontraram valores de ácido p-cumárico variando de 0,3 – 1,5 mg/g de própolis. O maior valor deste ácido fenólico encontrado neste estudo foi verificado em 95% de etanol. Estes dados estão de acordo com o nosso trabalho, visto que a melhor extração de compostos fenólicos e antioxidantes da própolis verde por ultrassom foi

observado a partir de 84,6% de etanol e este resultado deve-se à polaridade dos compostos presentes que foram extraídos da própolis.

Portanto, o método de quantificação e identificação dos compostos fenólicos utilizando cromatografia liquida de alta eficiência (CLAE) foi efetivo por mostrar alta seletividade, eficiência de separação de compostos e boa resolução dos picos.

4.3.4. Aplicação do extrato em emulsão lipídica

4.3.4.1. Determinação do teor de hidroperóxido

O método mais comumente utilizado para determinar o estado oxidativo de uma amostra de óleo é a determinação do peróxido, apesar de se limitar na quantificação de produtos primários da reação (CAETANO, 2009; TELLES, 2006).

Na tabela 12 estão apresentados os dados de valores de peróxido obtidos das emulsões controle, adicionada de TBQH, BHA, BHT e Própolis nas concentrações de 100 e 200 ppm. Estas concentrações foram escolhidas devido à legislação brasileira, que estabelece por meio da resolução número 22/77 do decreto-lei 986 do ano de 2005 o uso de 200 mg/kg para BHA e TBHQ e 100mg/g para BHT (BRASIL, 2005).

Nos dias 0 e 3 pode-se observar que os antioxidantes não se diferenciaram. A partir do dia 6 houve diferença significativa entre os tratamentos. Nota-se que neste tempo as amostras adicionadas de TBHQ 100 ppm, própolis 100 e 200 ppm e BHT 100 ppm não diferiram estatisticamente entre si.

Ao fim dos nove dias de análise dos sistemas acelerados de oxidação, verificou-se que as amostras adicionadas de extrato de própolis verde em ambas concentrações mantiveram o teor de hidroperóxidos próximo ao encontrado para o TBHQ (100 e 200 ppm), enquanto o antioxidante BHT foi o que apresentou resultados mais próximos ao controle. Ukulo; Kiiyukia e Kenji (2013), em um estudo do desenvolvimento da oxidação de emulsões com óleo de soja adicionadas de antioxidantes sintéticos comparados com a própolis, verificaram que até o décimo quinto dia de análise as emulsões com extrato de própolis mostraram-se mais eficientes contra a oxidação quando comparas àquelas com BHT. Concluíram ainda que entre os dias 25 e 30 o teor de hidroperóxido (peroxide value – PV) aumentou mais quando comparado às emulsões com BHT.

Ao se comparar as diferentes concentrações dos mesmos antioxidantes ao fim dos 9 dias verificou-se que não houve diferenças significativa entre os mesmos. Özcan (2000), avaliando diferentes concentrações de extrato de própolis em emulsão, também verificou que em alguns casos diferentes concentrações não se diferem quando analisadas o valor de peróxido no mesmo tempo, já que suas capacidades antioxidantes são próximas.

Tabela 12. Teor de hidroperóxido de emulsões a base de óleo de soja com adição de antioxidantes sintéticos (TBHQ, BHA e BHT) e própolis verde.

Ensaio	Hidroperóxidos (mg/Kg de óleo)			
	0 dias	3 dias	6 dias	9 dias
Controle	7,5±0,8 ^{Ab}	9,1±0,72 ^{Ab}	25,7±0,10 ^{ABa}	29,5±0,38 ^{ABCa}
TBHQ 100 ppm	10,7±0,63 ^{Aa}	11,0±0,08 ^{Aa}	12,5±0,01 ^{Ca}	18,7±0,14 ^{Ca}
TBHQ 200 ppm	14,0±1,00 ^{Aa}	9,1±0,69 ^{Aa}	13,9±0,39 ^{BCa}	17,5±0,28 ^{Ca}
BHA 100 ppm	7,5±0,11 ^{Ac}	16,4±0,14 ^{Abc}	28,1±0,08 ^{Aa}	33,5±0,08 ^{Aa}
BHA 200 ppm	5,4±0,05 ^{Ac}	19,3±0,01 ^{Ab}	26,5±0,66 ^{ABab}	34,2±0,08 ^{Aa}
BHT 100 ppm	6,5±0,01^{Ab}	11,4±0,01 ^{Aa}	12,9±0,07 ^{Cab}	23,5±0,01 ^{ABCa}
BHT 200 ppm	4,6±0,02 ^{Ac}	13,5±0,08 ^{Abc}	18,1±0,07 ^{BCab}	26,1±0,05 ^{ABCa}
Própolis 100 ppm	7,4±0,10 ^{Aa}	19,4±1,15 ^{Aa}	12,4±0,05 ^{Ca}	16,7±0,14 ^{Ca}
Própolis 200 ppm	8,2±0,40 ^{Aa}	8,7±0,01 ^{Aa}	12,5±0,01 ^{Ca}	17,5±0,05 ^{Ca}

Legenda: Valores expressos pela média da triplicata seguido dos desvios padrões. Letras maiúscula diferentes nas colunas e letras minúsculas diferentes nas linhas diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

O aumento do teor de hidroperóxido ao longo dos dias pode ser atribuido à uma degradação dos compostos ativos e consequente redução da capacidade antioxidante dos extratos (UKULO; KIIYUKIA e KENJI, 2013).

Observando o teor de hidroperóxidos em cada amostra ao longo do tempo, pode-se perceber que apenas as adicionadas do extrato de própolis verde (100 e 200 ppm) e do TBHQ (100 e 200 ppm) não apresentaram diferença significativa entre o período inicial e 9 dias de armazenamento sob aquecimento, com médias com a mesma letra. Na amostra controle, o dia 0 e 3 não tiveram diferença significativa, sendo diferentes do tempo 6 e 9.

De Camargo et al (2016), analisando a estabilidade oxidativa do óleo de amendoim prensado à frio a partir do amendoim com casca e óleo extraído de amendoim branqueado, verificaram que o teor de peróxido do segundo óleo citado diminuiu do tempo zero ao nono mês de análise (73,9 ± 9,5 – 52,6 ± 3,9 mg equivalente de hidroperóxido de cumeno/kg de óleo). Estes autores atribuíram esta redução à instabilidade dos peróxidos, os quais são produzidos e decompostos simultaneamente ao longo do tempo em produtos secundários da oxidação. Caso o resultado dos teores de hidroperóxido de nosso estudo tivesse diminuído gradualmente poderia-se

atribuir este fato à decomposição de peróxidos citada por De Camargo et al (2016), no entanto este fato pode estar relacionado com algum erro de amostragem devido à localização na estufa e consequentemente exposição ao calor e oxigênio.

Considerando que não houve diferença significativa entre as mesmas amostras com diferentes concentrações (100 e 200 ppm) no mesmo dia, o desenvolvimento da reação de oxidação por meio dos valores observados de teor de peróxido ao longo dos dias, foi representado na figura 24 apenas para as menores concentrações (100 ppm), o que é desejável para a indústria em termos financeiros de uso de matéria prima.

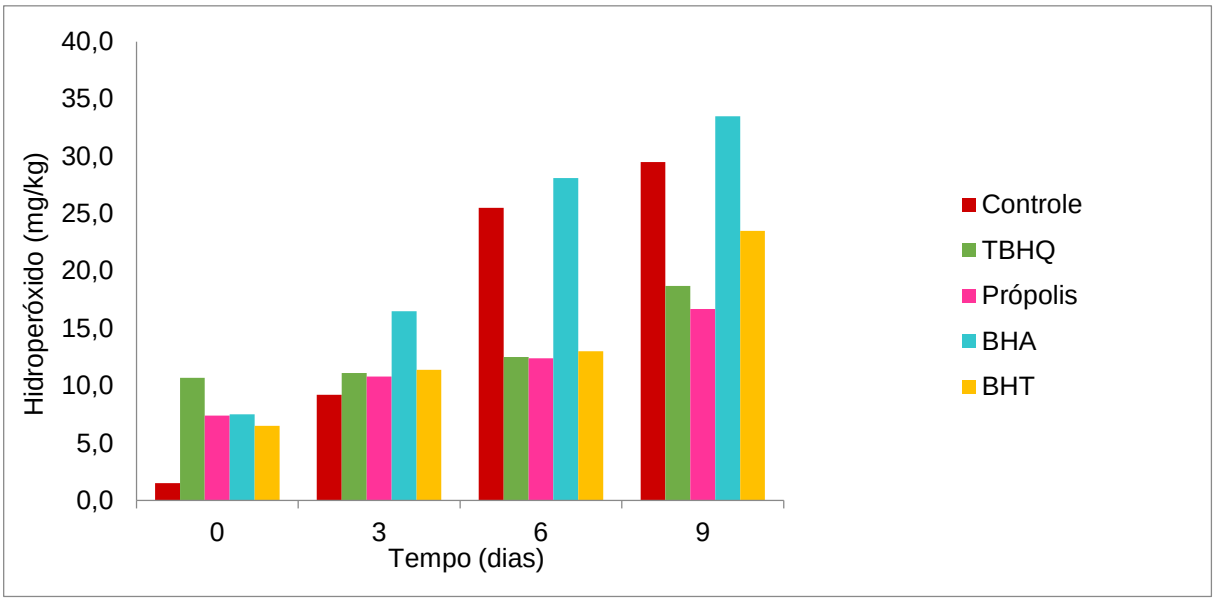

Figura 24. Teor de hidroperóxido (mg/kg óleo) dos ensaios com 100 ppm ao longo de 9 dias de teste acelerado de oxidação à 40°C.

O efeito antioxidante mais notável foi observado nas amostras com própolis e TBHQ, dado esta semelhança, pode-se considerar a técnica de extração com ultrassom eficiente para fins de aplicação em sistema modelo de emulsão, já que o TBHQ é considerado o antioxidante mais efetivo no estudo. Já o BHA ao fim dos 9 dias obteve o maior teor de peróxido verificado, superando a amostra controle, podendo este fato estar relacionado com localização dentro da estufa ou exposição à fatores que contribuem para a aceleração da oxidação lipídica.

Analisando individualmente as amostras com os diferentes antioxidantes e concentrações, verifica-se um efeito pró-oxidante, uma vez que não houve diferença significativa entre as amostras com o mesmo antioxidante e concentrações diferentes (100 e 200 ppm). Ou seja, a redução do teor de hidroperóxido não foi considerada proporcional à concentração do extrato. O mesmo foi observado por De Camargo et al. (2012) em seu estudo de análise da estabilidade do óleo de soja adicionado de extrato de pele de amendoim (*Peanut skin extracts* – PSE), não encontrando diferenças significativas entre as concentrações de 400 – 1000 mg/kg de PSE. Shahidi e Wanasundara (1995) encontraram diferentes concentrações (200, 500 e 1000 ppm) de extrato de canola adicionados em óleo de canola apresentaram resultados similares de teor de hidroperóxido até o segundo dia de análise.

Estes resultados obtidos indicam que a quantidade de própolis verde utilizada não implica em aumento na capacidade antioxidante, assim pode-se inferir que foi possível obter uma formulação otimizada eficiente utilizando o mínimo de matéria-prima possível.

4.4. Considerações finais

Dentro dos parâmetros avaliados, a utilização do ultrassom mostrou maior eficiência quando comparado com outros estudos que utilizaram o método tradicional, além de reduzir o tempo e custos com amostra. Além disso, a metodologia de superfície de resposta foi um método que deixa claro as melhores condições desses parâmetros para obter respostas esperadas, que foram verificadas em 99% de etanol e 0,857:30 g/mL (m/v) de proporção de amostra:solvente.

O extrato obtido nas condições otimizadas foi aplicado em sistema modelo de emulsão lipídica e verificou-se que a própolis verde teve valor de peróxido semelhante ao antioxidante TBHQ ao longo dos dias de análise. A cromatografia líquida de alta eficiência permitiu identificar 2 ácidos fenólicos (Artepelin C e ácido p-cumárico), encontrando valores altos para ambos em suas quantificações.

Sendo assim, o presente estudo indica que a própolis verde extraída com ultrassom é uma boa fonte de compostos fenólicos antioxidantes, com potencial de substituição parcial ou total de antioxidantes sintéticos que podem ser prejudiciais à saúde do consumidor.

4.5. Sugestões para trabalhos futuros

O extrato de própolis verde apresenta desvantagens para a aplicação na índustria de alimentos devido à sua característica de aroma e sabor fortes, provenientes da fração volátil de ácidos fenólicos. Assim, são necessários estudos que possibilitem mascarar suas características até o fim da vida de útil de um produto que o contenha, seja por estudos de métodos de microencapsulação ainda não estudados ou afins.

4.6. Conclusões finais do trabalho

A utilização da própolis verde como substituição parcial ou integral dos antioxidantes sintéticos é uma alternativa viável com relação à presença de compostos fenólicos que atuam sobre a inibição da oxidação lipídica. Verificou-se neste trabalho que a concentração desses compostos é aumentada quando utiliza-se formas não convencionais de extração como o ultrassom, o qual pode reduzir o tempo de trabalho e de amostra utilizada. Além disso, a própolis verde extraída com o ultrassom mostrou-se eficiente na manutenção do valor de peróxidos próxima aos valores observados para antioxidantes sintéticos muito utilizados pela indústria alimentícia e que são nocivas a saúde do ser humano. O uso de variáveis específicas de processo interefiram nas respostas finais obtidas de

capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais, mostrando que o requerimento por altas porcentagens de etanol é influenciável pelos compostos mais apolares que são extraídos.

REFERÊNCIAS

ALENCAR, S. M.; OLDONI, T. L. C.; CASTRO, M. L.; CABRAL, I. S. R.; COSTA-NETO, C. M.; CURY, J. A.; IKEGAKI, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 113, n. 2, p. 278-283, set. 2007.

ALVES, E.; KUBOTA, E. H. Conteúdo de fenólicos, flavonoides totais e atividade antioxidante de amostras de própolis comerciais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 34, n. 1, p. 37-41, abr. 2013.

ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 24, n. 2, jul./dez. 2006.

ANKLAM, E. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. **Food chemistry**, Londres, v. 63, n. 4, p. 549-562, dez. 1998.

ARAÚJO, J. **Química de alimentos: teoria e prática**. 4ª ed. Viçosa: Ed. UFV, 2011.

BISCAIA, D.; FERREIRA, S. R. S. Propolis extracts obtained by low pressure methods and supercritical fluid extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, Natal, v. 51, n. 1, p. 17-23, nov. 2009.

BITTENCOURT, M. L.; RIBEIRO, P. R.; FRANCO, R. L.; HILHORST, H. W.; DE CASTRO, R. D.; FERNANDEZ, L. G. Metabolite profiling, antioxidant and antibacterial activities of Brazilian propolis: Use of correlation and multivariate analyses to identify potential bioactive compounds. **Food Research International**, Barking, v. 76, n. 1, p. 449-457, out. 2015.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução normativa nº3, de 19 de Janeiro de 2001. Anexo VII, Regulamento da identidade e qualidade de extrato de própolis.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC N° 23, de 15 de fevereiro de 2005. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 15 de fevereiro de 2005. Aprova o “Regulamento técnico do uso de aditivos alimentares, estabelecendo suas funções e seus limites máximos para a categoria de alimentos óleos e gorduras – subcategoria creme vegetal e margarinas”. **Diário Oficial da União**, Brasília, 16 fev. 2005. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br.> Acesso em: 30/07/2015.

BULDUK, Ibrahim; GEZER, Bahdışen; CENGIZ, Mustafa. Optimization of ultrasound-assisted extraction of morphine from capsules of Papaver somniferum by response surface methodology. **International journal of analytical chemistry**, Londres, v. 2015, p. 8, ago. 2015.

CAETANO, A. C. S. **Potencial antioxidante de extratos de resíduos de acerolas (Malpighia emarginata) em diferentes sistemas modelos e na estabilidade oxidativa de óleo de soja**. 2009. 111 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Ciências Domésticas, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2009.

CARNEIRO, M. J., LÓPEZ, B. G., LANCELLOTTI, M., FRANCHI, G. C., NOWILL, A. E., & SAWAYA, A. C. H. F. Evaluation of the chemical composition and biological activity of extracts of Tetragonisca angustula propolis and Schinus terebinthifolius Raddi (Anacardiaceae). **Journal of Apicultural Research**, Londres, v. 55, n. 4, p. 315-323, nov. 2016.

CASTRO, M. L.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; ALENCAR, S. M.; IKEGAKI, M.; DUARTE, S.; KOO, H. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 7, p. 1512-1516, ago. 2007.

CHISTÉ, R. C.; MERCADANTE, A. Z.; GOMES, A.; FERNANDES, E.; DA COSTA LIMA, J. L. F.; BRAGAGNOLO, N. In vitro scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry**, Londres, n. 127, p. 419-426, jul. 2011.

COTTICA, S. M.; SAWAYA, A. C.; EBERLIN, M. N.; FRANCO, S. L.; ZEOULA, L. M.; VISENTAINER, J. V. Antioxidant activity and composition of propolis obtained by different methods of extraction. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 22, n. 5, p. 929-935, maio. 2011.

CUNHA, I.; SAWAYA, A. C.; CAETANO, F. M.; SHIMIZU, M. T.; MARCUCCI, M. C.; DREZZA, F. T.; CARVALHO, P. D. O. Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 15, n. 6, p. 964-970, maio. 2004.

DE CAMARGO, A. C.; VIEIRA, T. M. F. D. S.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; CALORI-DOMINGUES, M. A.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Gamma radiation effects on peanut skin antioxidants. **International journal of molecular sciences**, São Paulo, v. 13, n. 3, p. 3073-3084, mar. 2012.

DE CAMARGO, A. C.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; DE ALENCAR, S. M.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G.; DE SOUZA VIEIRA, T. M. F.; SHAHIDI, F. Chemical changes and oxidative stability of peanuts as affected by the dry-blanching. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 93, n. 8, p. 1101-1109, abr. 2016.

DOMINGOS, A. K.; SAAD, E. B.; VECHIATTO, W. W.; WILHELM, H. M.; RAMOS, L. P. The influence of BHA, BHT and TBHQ on the oxidation stability of soybean oil ethyl esters (biodiesel). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 18, n. 2, p. 416-423, mar/abr. 2007.

DRUZIAN, J. I.; MACHADO, B. A. S.; SOUZA, C. O. D.; FRAGA, L. M.; DURAN, V. D. A. A.; BURGHGRAVE, U. S. D.; GUIMARÃES, J. E. Influência da dieta suplementada com óleo de soja na composição centesimal e perfil lipídico de tilápias do Nilo (Oreochromis niloticus). **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, São Paulo, v. 71, n. 1, p. 85-92, jul. 2012.

DOS SANTOS, G. M.; MAIA, G. A.; DE SOUSA, P. H. M.; DA COSTA, J. M. C.; DE FIGUEIREDO, R. W.; DO PRADO, G. M. Correlação entre atividade antioxidante e compostos bioativos de polpas comerciais de açaí (Euterpe oleracea Mart). **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v. 58, p. 187-192, dez. 2008.

FERNANDES-SILVA, C. C.; SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F.; BREYER, E. D.; NEGRI, G. Chemical profiling of six samples of Brazilian propolis. **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 2, p. 237-240, fev. 2013.

GECKIL, H.; ATES, B.; DURMAZ, G.; ERDOGAN, S.; YILMAZ, I. Antioxidant, free radical scavenging and metal chelating characteristics of propolis. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, Nova York, v. 1, n. 1, p. 27-31, jul. 2005.

GÜLÇIN, I; BURSAL, E., ŞEHITOĞLU, M. H., BILSEL, M.; GÖREN, A. C. Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 48, n. 8, p. 2227-2238, ago/set. 2010.

HAMADA, M.; WU, C.J.F. 2000: **Experiments: Planning, analysis, and parameter design optimization**. New York: John Wiley & Sons, Inc.

HUANG, S. W.; HOPIA, A.; SCHWARZ, K.; FRANKEL, E. N.; GERMAN, J. B. Antioxidant activity of r-tocopherol and trolox in different lipid substrates: bulk oils vs oil-in-water emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 44, n. 2, p. 444-452, fev. 1996.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. Nova York, v.53, n. 6, p.1841-1856, fev. 2005.

INOUE, H. T.; SOUSA, E. A.; ORSI, R. O.; FUNARI, S. C.; BARRETO, L. M. R. C.; DIB, A. Produção de própolis por diferentes métodos de coleta. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, Mayaguez, v. 15, n. 2, p. 65-69, abr. 2007.

KIM, T. S.; DECKER, E. A.; LEE, J.. Antioxidant capacities of α-tocopherol, trolox, ascorbic acid, and ascorbyl palmitate in riboflavin photosensitized oil-in-water emulsions. **Food Chemistry**, Londres, v. 133, n. 1, p. 68-75, jul. 2012.

MACHADO, B. A. S.; DE ABREU BARRETO, G.; COSTA, A. S.; COSTA, S. S.; SILVA, R. P. D.; DA SILVA, D. F.; PADILHA, F. F. Determination of parameters for the supercritical extraction of antioxidant compounds from green propolis using carbon dioxide and ethanol as co-solvent. **PloS one**, Washington, v. 10, n. 8, p. e0134489, ago. 2015.

MIGUEL, M. G., NUNES, S., DANDLEN, S. A., CAVACO, A. M., & ANTUNES, M. D. Phenols, flavonoids and antioxidant activity of aqueous and methanolic extracts of propolis (Apis mellifera L.) from Algarve, South Portugal. **Food Science and Technology,** Campinas, v. 34, n. 1, p. 16-23, jan./mar. 2014.

MORELLI, L. L. L.; PRADO, M. A. Extraction optimization for antioxidant phenolic compounds in red grape jam using ultrasound with a response surface methodology. **Ultrasonics sonochemistry**, Oxford, v. 19, n. 6, p. 1144-1149, nov. 2012.

NOUR, V.; TRANDAFIR, I.; COSMULESCU, S. Optimization of ultrasound-assisted hydroalcoholic extraction of phenolic compounds from walnut leaves using response surface methodology. **Pharmaceutical biology**, Lisse, v. 54, n. 10, p. 2176-2187, mar. 2016.

OETTERER, M.; D'ARCE, M. A. B. R.; SPOTO, M. **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. 1ª. ed. Barueri: Editora Manole Ltda, 2006.

OLDONI, T. L. C.; OLIVEIRA, S. C.; ANDOLFATTO, S.; KARLING, M.; CALEGARI, M. A.; SADO, R. Y.; LIMA, V. A. Chemical Characterization and Optimization of the Extraction Process of Bioactive Compounds from Propolis Produced by Selected Bees Apis mellifera. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 26, n. 10, p. 2054-2062, out. 2015.

OU, B; HAMPSCH-WOODILL, M; PRIOR, R.L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Kansas, v.49, p.4619-4626, set. 2001.

ÖZCAN, M. Antioxidant activity of seafennel (*Crithmum Maritimum L.)* essential oil and rose (*Rosa Canina*) extract on antioxidant activity of seafennel (*Crithmum Maritimum L*.) essential oil and rose (rosa canina) extract on natural olive oilnatural olive oil. **Acta Alimentaria**, Budapest, v. 29, n. 4, p. 377-384, jul. 2000.

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**, Medelin, v.16, n.3, p.388-395, set. 2009.

PARK, Y. K.; PAREDES-GUZMAN, J. F.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; FUJIWARA, F. Y. Chemical constituents in Baccharis dracunculifolia as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 5, p. 1100-1103, fev. 2004.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free radical biology and medicine**, Nova York, v. 26, n. 9, p. 1231-1237, maio. 1999.

RODRIGUES, M.I. e IEMMA A.F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 3ª. Ed, Campinas, SP: Editora Cárita, 2014.

SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, U. Effect of natural antioxidants on the stability of canola oil. **Developments in Food Science**, São Paulo, v. 37, p. 469-479, dez. 1995.

SHANTHA, N. C.; DECKER, E. A. Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. **Journal of AOAC International**, Arlington, n. 77, p. 421-4, abr. 1994.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in enzymology**, Nova York, v. 299, p. 152-178, abr. 1999.

SUN, C.; WU, Z.; WANG, Z.; ZHANG, H. Effect of ethanol/water solvents on phenolic profiles and antioxidant properties of Beijing propolis extracts. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Oxford, v. 33, n. 9, p. 77-88, jul. 2015.

TELLES, M. M. **Caracterização dos grãos, torta e óleo de três variedades de girassol (Helianthus annuus L.) e estabilidade do óleo bruto**. 2006. 70 p. Tese (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

TOMEI, R. R.; SALVADOR, M. J. Metodologias analíticas atuais para avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais. **Encontro Latino Americano De Iniciação Científica**, São José dos Campos, v. 11, p. 1963-1967, 2007.

UKULO, J. W.; KIIYUKIA, C.; KENJI, G. M. Antioxidative and radical scavenging activities of propolis extracts in food models. **African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development**, Nairobi, v. 13, n. 1, p. 7273-7287, jan. 2013.

VARGAS-SÁNCHEZ, R. D.; TORRESCANO-URRUTIA, G. R.; ACEDO-FÉLIX, E.; CARVAJAL-MILLÁN, E.; GONZÁLEZ-CÓRDOVA, A. F.; VALLEJO-GALLAND, B.; SÁNCHEZ-ESCALANTE, A. Antioxidant and antimicrobial activity of commercial propolis extract in beef patties. **Journal of Food Science**, Champanhe, v. 79, n. 8, p. C1499-C1504, jul. 2014.

VIEIRA, T. M. F. S. Uso do planejamento experimental para otimização da extração de compostos antioxidantes de frutas, especiarias e resíduos agroindustriais. Tese de Livre Docência, USP ESALQ, 2015. 100 p.