

Artigo

Metodologias Acessíveis para a Quantificação de Flavonoides e Fenóis Totais em Própolis

Marcucci, M. C.; Salatino, A.; Oliveira, L. F. A. M.; Gonçalves, C. P

Rev. Virtual Quim., 2021, 13 (1), 61-73. Data de publicação na Web: 17 de Novembro de 2020

<http://rvq.sbg.org.br>

Accessible Methodologies for Quantification of Flavonoids and Total Phenols in Propolis

Abstract: Propolis is widely known for its important therapeutic activities. In its chemical constitution, there are several classes of secondary metabolites, such as simple phenols, carboxylic and cinnamic acids, coumarins, tannins and flavonoids. However, flavonoids, an important class of secondary metabolites, may be found in small concentrations in propolis, which makes its quantification difficult. In view of this information, the purpose of this review is to present the main methodologies used in the quantification of this class of secondary metabolites, in addition to proposing new approaches for the characterization of flavonoids and phenols, using low-cost commercial raw materials.

Keywords: Propolis; flavonoids; phenols; quantification.

Resumo

A própolis é largamente conhecida por suas importantes atividades terapêuticas. Apresenta em sua constituição química diversas classes de metabólitos secundários, tais como, fenóis simples, ácidos carboxílicos e cinâmicos, cumarinas, taninos e flavonoides. Entretanto, os flavonoides, uma classe importante de metabólitos secundários, muitas vezes encontra-se em pequenas concentrações na própolis, o que pode dificultar sua quantificação. Tendo em vista estas informações, esta revisão teve como objetivo relacionar as principais metodologias utilizadas na identificação e quantificação desta classe de metabólitos secundários, além de propor novas abordagens para a caracterização de flavonoides e fenóis totais, a partir da utilização de matérias primas comerciais de baixo custo.

Palavras-chave: Própolis; flavonoides; fenóis; quantificação.

* Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Ciências e Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Biociências e Diagnóstico Bucal, Avenida Engenheiro Francisco José Longo 777/778, Jardim São Dimas, CEP 12245-000, São José dos Campos-SP, Brasil

 cris.marcucci@yahoo.com.br
DOI: [10.21577/1984-6835.20200131](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20200131)

Metodologias Acessíveis para a Quantificação de Flavonoides e Fenóis Totais em Própolis

Maria Cristina Marcucci,^{a,*} Antônio Salatino,^b Laís Farias Azevedo de Magalhães Oliveira,^c Carolina Passarelli Gonçalves^d

^a Programa de Pós-Graduação em Biociências e Diagnóstico Bucal da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Ciências e Tecnologia, Avenida Engenheiro Francisco José Longo - 777/778, CEP 12245-000, Jardim São Dimas, São José dos Campos-SP, Brasil.

^b Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica, CP 11461, CEP 05508-090, São Paulo-SP, Brasil.

^c Laboratório de Caracterização e microscopia de materiais, Instituto de Física, Programa de Pós-graduação em Ciências dos materiais, Centro de Tecnologia, Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Av. Lourival Melo Mota, S/N, CEP 57072-900, Tabuleiro do Martins, Maceió-AL, Brasil.

^d Programa de Pós-graduação em Farmácia e Biotecnologia da Universidade Anhanguera de São Paulo – Pirituba, Avenida Raimundo Pereira de Magalhães, 3305, CEP 05145-200, Pirituba, São Paulo-SP, Brasil.

*cris.marcucci@yahoo.com.br

Recebido em 14 de Julho de 2020. Aceito para publicação em 13 de Outubro de 2020.

1. Introdução

2. Objetivos

3. Materiais e Métodos

3.1. Bases de dados consultadas

4. Resultados e Discussão

4.1. Propriedades dos compostos fenólicos

4.2. Flavonoides: classes estruturais e propriedades biológicas

4.3. Controle de qualidade

5. Conclusões

1. Introdução

A própolis, uma resina coletada pelas abelhas em brotos e exsudatos de plantas, é levada para a colmeia onde é misturada à cera e à saliva desses insetos, resultando num produto gomoso e balsâmico (Figura 1A).¹ Diversas atividades farmacológicas vêm sendo comprovadas em ensaios laboratoriais e através do uso em diferentes formulações, além do tradicional

e consagrado extrato etanólico. As abelhas utilizam-na para vedar todas as frestas, mumificar pequenos animais e insetos, os quais foram mortos no interior da colmeia, impedindo assim a sua putrefação. Também utilizam pequenas quantidades de própolis para criar um ambiente quase asséptico nos favos, cujo mel está em elaboração e revestem a entrada da colmeia. Desse modo, quando a abelha adentra o seu interior, fica livre de contaminação ao entrar em contato com a própolis que reveste a entrada

do ninho, além da que se encontra nos alvéolos (Figura 1 (B) e 1 (D)).² A própolis possui diversas atividades, incluindo antibacteriana, antifúngica e antiviral. Microrganismos que poderiam contaminar a colmeia em presença de própolis não conseguem proliferar. Vem daí a palavra “própolis”, que significa “em defesa da cidade ou da colmeia”.³ Atualmente, vem sendo avaliada a sua eficácia no combate ao coronavírus.⁴

Nos últimos anos, a própolis de regiões tropicais, especialmente do Brasil, têm sido alvo de grande interesse econômico, sendo que muitos países compram esse valioso produto nacional.⁵ Este fator economicamente importante levou muitos pesquisadores a investigar a própolis brasileira. Na literatura internacional, encontra-se um número considerável de artigos científicos tratando deste produto brasileiro.

A própolis apresenta uma composição química bastante complexa.⁶⁻⁷ Os primeiros relatos sobre a análise de própolis baseados em evidências químicas surgiram na década de 1970 quando Lavie na França e Popravko na Rússia, identificaram a presença de flavonoides em própolis e compararam com a composição de exsudatos de choupo e bétula.⁸ Muitas outras publicações se seguiram a estas e hoje é aceito, através de comprovações químicas, que as principais fontes de própolis em zonas temperadas são os brotos e exsudatos de espécies de *Populus* (choupo) e seus híbridos. Estas informações foram amplamente confirmadas na Europa.⁹ Mesmo na Nova Zelândia, espécies lá introduzidas de *Populus* são a fonte preferencialmente visitada pelas abelhas.¹⁰ Na

Rússia, especialmente nas regiões do norte, são espécies de bétula (*Betula verrucosa*) as preferidas pelas abelhas.¹¹⁻¹² As própolis originadas destas regiões têm uma composição química muito similar e os principais constituintes são: flavonoides aglicônicos, ácidos aromáticos e seus ésteres.¹³⁻¹⁷

Em regiões tropicais, não existem espécies de choupo e bétula e as abelhas visitam outras plantas. Por isso, a composição química de amostras de tais regiões é muito distinta das de zonas temperadas. Investigações sobre esta resina em regiões tropicais revelaram que, em muitos casos, os flavonoides são os principais componentes destas amostras, similarmente às Europeias, embora a sua origem vegetal seja diferente.¹⁸⁻¹⁹ Por exemplo, em amostras do deserto de Sonora, alguns autores identificaram flavonoides aglicônicos típicos de exsudatos da planta *Ambrosia deltoidea*: 3,5,7-tri-idroxi-3,8-dimetoxiflavona, xantomicrol, hispidulina, sideritiflavona, kaempferol, quercetina, ramnazina e outros componentes em menor concentração. Miricetina 3,7,4,5'-tetrametil éter e quercetina 3,7,3'-trimetil éter foram isolados da própolis da Tunísia, originando-se de exsudatos de folhas de algumas espécies de *Citrus*.²⁰ A Figura 1 mostra alguns tipos de própolis brasileiras: (B e D) própolis verde de *Baccharis dracunculifolia* (alecrim-do-campo), (C e E) marrom, (F) vermelha, predominantemente de *Dalbergia ecastaphyllum*, do litoral do nordeste.

Nas própolis brasileiras, poucos flavonoides foram identificados, tais como: 5,6,7-tri-idroxi-3,4'-di-idroxiflavona, aromadendrina-4-metil éter, pinobanksina, kaempferida, além de crisina e

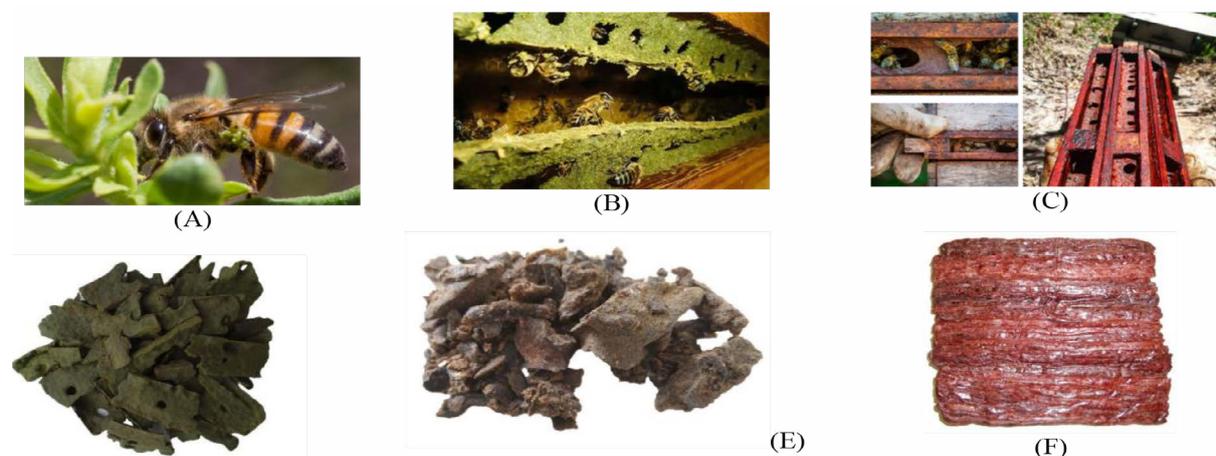


Figura 1. Abelha coletando a resina (A), própolis verde na colmeia (B), vermelha na colmeia (C), própolis verde (D), própolis marrom (E) e própolis vermelha (Alagoas) produzidas pelas abelhas *Apis mellifera*.

Fonte: (A) Apis Brasil (B, D, F): Natucentro (C): Beeva Brazil (E): Pronatu

galangina. Por outro lado, foram identificados compostos novos, que possuem uma atividade biológica marcante. Os compostos fenólicos e os ácidos *p*-cumáricos prenilados foram encontrados em grande quantidade em amostras brasileiras, como o ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico (PHCA), 9-*E* e 9-*Z*-2,2-dimetil-6-carboxietenil-8-prenil-2H-1-benzopirano (DCBEN) o ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (DHCA, o Artepillin-C) e ácido 2,2-dimetil-8-prenil-2H-1-benzopirano-6-propenóico (DPB), além de outros (Figura 2).²¹⁻²⁶

Apesar de não estarem em quantidades expressivas na própolis de alecrim-do-campo (comercialmente a mais importante própolis

brasileira) os flavonoides podem estar presentes em menores quantidades e serem responsáveis por diversas atividades biológicas importantes, como anti-inflamatória e antioxidante. Entretanto, outras própolis de grande interesse comercial, como a vermelha e a verde da caatinga apresentam quantidades expressivas de flavonoides.²⁷⁻²⁸ A presença de pouca concentração desta classe de metabólitos secundários dificulta muitas vezes a sua identificação. Por este motivo, métodos para a detecção e quantificação são essenciais para a sua caracterização completa, além das importantes propriedades biológicas atribuídas aos flavonoides.

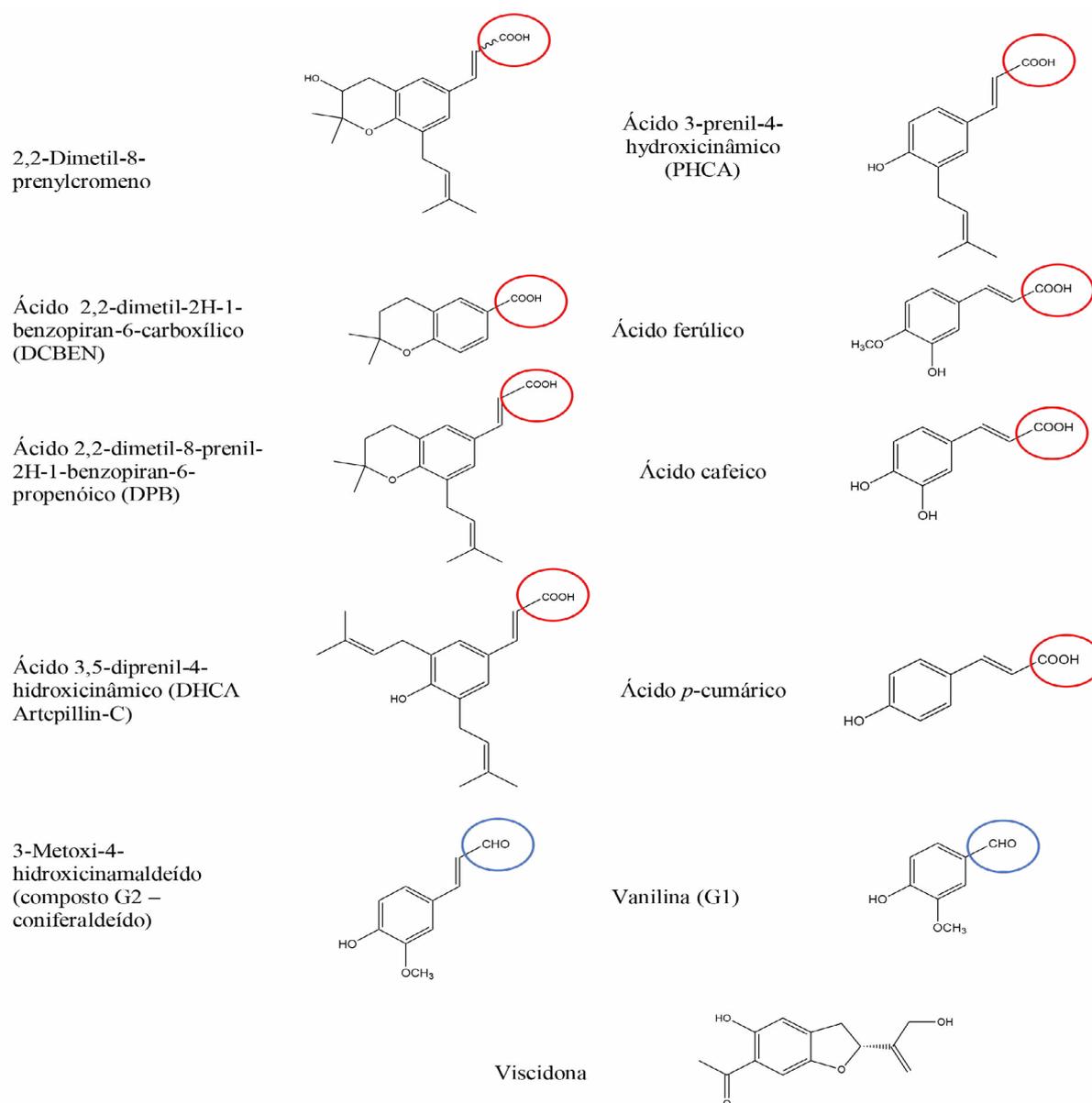


Figura 2. Alguns compostos existentes em própolis brasileiras. Os círculos em vermelho indicam que se tratam de ácidos, e em azul, de aldeídos

2. Objetivos

Considerando estas informações, o presente trabalho teve como objetivo relacionar as principais características de compostos fenólicos e flavonoides de própolis brasileira, e apresentar métodos para a caracterização e quantificação desses metabólitos secundários.

3. Materiais e Métodos

3.1. Bases de dados consultadas

Como base para o levantamento de dados, foram utilizados o Portal Periódicos Capes, *Web of Science*, Scielo, Lilacs, *Science Direct* e *Google acadêmico*. Para a busca, foram considerados apenas estudos nos idiomas inglês e português, publicados no período entre 1995 a 2020, utilizando-se os seguintes descritores: constituintes químicos da própolis, quantificação de flavonoides e quantificação de fenóis. Preferencialmente, foram selecionados artigos recentes com elevado impacto, que propiciassem um conjunto relevante de informações para o entendimento das propriedades biológicas das substâncias fenólicas, com destaque para os flavonoides.

4. Resultados e Discussão

4.1. Propriedades dos compostos fenólicos

Existem diversas classes de compostos fenólicos que ocorrem de maneira universal nas angiospermas, que podem desempenhar importantes papéis na biologia dos animais, principalmente nos herbívoros.²⁹⁻³⁰ São originados do metabolismo secundário das plantas, vários deles sendo formados e acumulados em condições de estresse, como nas infecções, ferimentos, radiações UV, entre outras.³¹ Estes compostos encontram-se amplamente distribuídos nas plantas e são um grupo muito diversificado, incluindo os flavonoides, os ácidos fenólicos, cumarinas, taninos, além de outros. Estes metabólitos secundários, exercem diferentes funções nas plantas em que são biossintetizados, como por exemplo, na

proteção contra patógenos e contribuem para a pigmentação.³¹ Em alimentos, este metabólitos são responsáveis por diversas funções, entre elas, a adstringência, aroma e apresentam propriedades antioxidantes.³² As principais fontes de compostos fenólicos são frutas cítricas, como limão, laranja e tangerina, além de outras frutas, como a cereja, uva, ameixa, pera, maçã e mamão, sendo encontrados em maiores quantidades na polpa que no suco da fruta. A pimenta verde, brócolis, repolho roxo, cebola, alho, tomate, nozes, entre outros, também são excelentes fontes destes compostos.³³

Como exemplos de ácidos fenólicos, têm-se o benzoico, cafeico, *p*-cumárico e ferúlico. Entre os flavonoides, a apigenina, o kaempferol e a quercetina. Alguns compostos fenólicos de origem vegetal são familiares, pelo menos em termos organolépticos, como a vanilina, constituinte majoritário da baunilha e que entre outras funções, é responsável pelo aroma o *t*-anetol constituinte principal do anis e um dos responsáveis pelo seu aroma, e o eugenol (muito usado pelos dentistas, presente no óleo de cravo na proporção de 85%, aproximadamente).^{29,34} Na própolis existem numerosos compostos fenólicos, especialmente flavonoides e ácidos fenólicos. Pesquisas confirmaram que na própolis verde derivada de alecrim-do-campo, os ácidos fenólicos são bem mais abundantes que os flavonoides. Talvez seja essa particularidade um dos fatores responsáveis pela enorme preferência do mercado internacional em relação a essa própolis do Brasil.³⁶

Na própolis verde brasileira existem muitos ácidos fenólicos, entre eles o cafeico, ferúlico, *p*-cumárico e seus derivados (Figura 2) os quais possuem inúmeras propriedades biológicas e farmacológicas, a saber: antimicrobiana, antitumoral, antirradicais livres, imunoestimulantes, entre outras.³⁶ Na própolis marrom, foi encontrado o composto 2-[1-hidroximetil]vinil-5-acetil-hidroxicumarano (I) (Figura 2) e na vermelha, isoflavonoides e benzofenonas preniladas.²¹

4.2. Flavonoides: classes estruturais e propriedades biológicas

Os flavonoides são um grande grupo de metabólitos secundários da classe dos polifenóis, componentes de baixo peso molecular encontrados em diversas espécies vegetais. Diferentes classes compõem esse grupo, entre elas: as chalconas, flavonas, flavanonas, flavonóis, di-hidroflavonóis

(flavononóis), isoflavonas, antocianinas, antocianidinas, auronas, entre outras (Figura 3).³⁶

Os flavonoides absorvem radiação eletromagnética na faixa do ultravioleta (UV) e do visível e dessa maneira um dos papéis que apresentam é o de defesa das plantas frente à radiação UV da luz solar. Além disso, podem representar uma barreira química de defesa contra microrganismos (bactérias, fungos e vírus) insetos e outros animais herbívoros.³⁶ Os flavonoides

atuam também em relacionamentos harmônicos entre plantas e insetos, atraindo e orientando esses animais até o néctar, contribuindo enormemente para a polinização. Esses compostos também desempenham um importante papel na saúde.³⁷ Estão presentes em todas as plantas, fazendo com isso, parte da dieta humana.³⁸ Os flavonoides têm ação antioxidante, minimizando a peroxidação lipídica e o efeito dos radicais livres. Atribui-se às oxidações dos ácidos graxos poli-insaturados

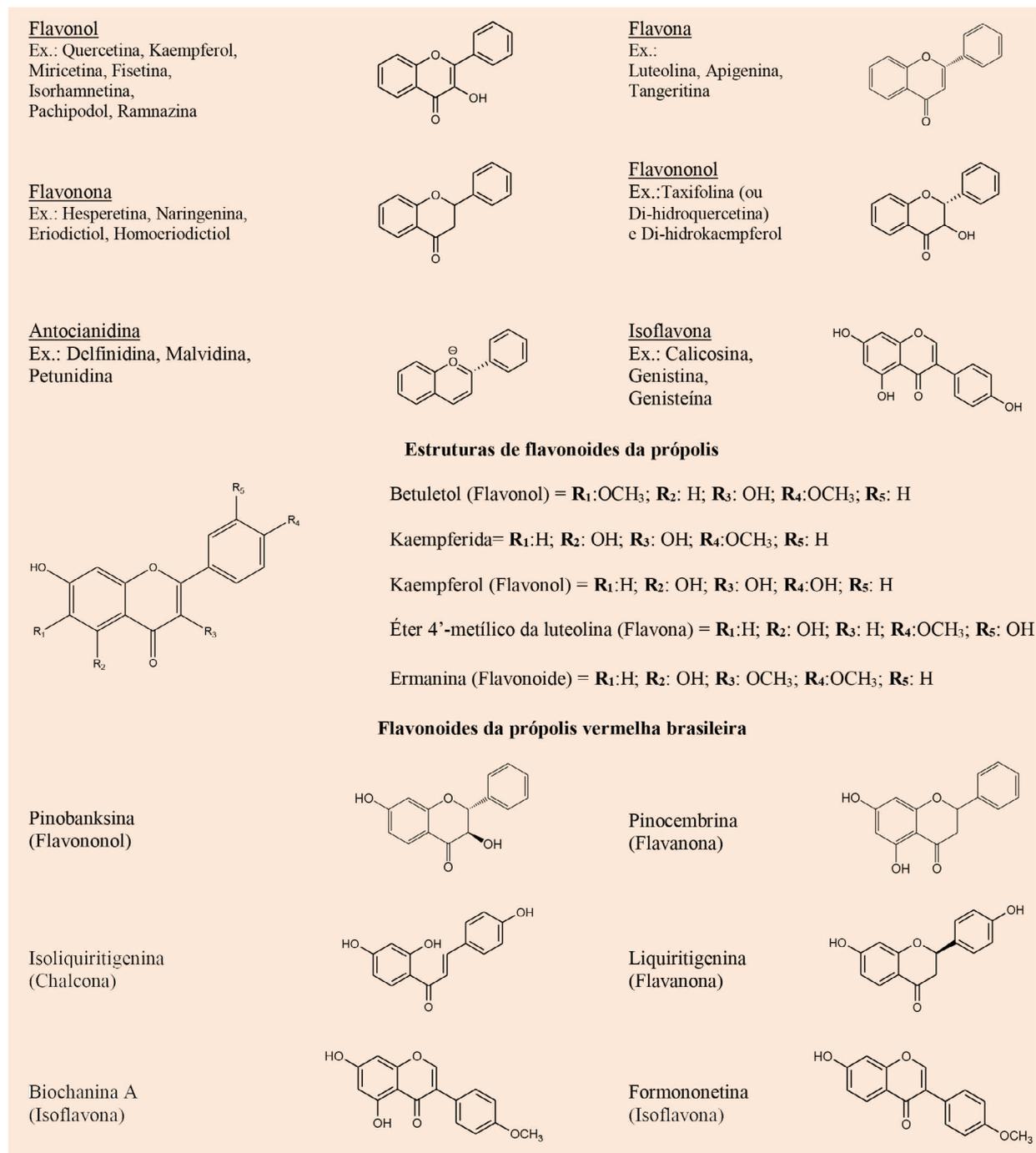


Figura 3. Estruturas de flavonoides e exemplos de alguns deles, encontrados em própolis brasileiras

(como o ácido linoleico, presente em quantidades relativamente altas no óleo de soja) uma forte influência no estímulo ao desenvolvimento de doenças de grande importância na atualidade, como a arteriosclerose, as enfermidades coronárias e determinados tipos de câncer.³⁹ Foi demonstrado que indivíduos que ingerem maiores quantidades de flavonoides, os quais são encontrados em alimentos de origem vegetal, como as verduras, frutas, chás, e de origem animal como o mel, apresentam uma diminuição considerável do risco de morte por acidentes cardiovasculares (infarto do miocárdio, trombose, derrame, entre outros).³⁸ Os flavonoides estão presentes também em quantidades relativamente altas no vinho tinto. Atribui-se a isso o chamado “paradoxo francês”, pelo qual os franceses, apesar de ingerirem uma dieta “menos saudável”, pois consomem mais gordura animal, sofrem de uma incidência muito menor daqueles males do que os norte-americanos.³⁹⁻⁴⁰ Acredita-se que o consumo substancialmente maior de vinho pelos franceses seja a razão por esse resultado paradoxal. Como na própolis brasileira existe essa classe de compostos, é muito importante o seu doseamento, para se ter dados quantitativos e assim correlacionar a sua concentração com a atividade biológica já mencionada.

4.3. Controle de qualidade

No grupo dos compostos fenólicos, são quantificados também os flavonoides, pois estes são um grupo de polifenóis. Quando se determina o teor de polifenóis totais, estão sendo quantificados os flavonoides, ácidos fenólicos e taninos, presentes na própolis. Embora a concentração de flavonoides na própolis de alecrim-do-campo seja relativamente pequena, é possível quantificá-los e utilizar os valores obtidos como parâmetro para o seu controle de qualidade químico.⁴¹

O reagente de Folin-Ciocalteu foi desenvolvido após um longo uso do reativo de Folin-Denis⁴², sendo uma mistura de fosfomolibdato de sódio e fosfotungstato de sódio, usado para inibir a redução do reativo.

A utilização do reagente de Folin-Denis é prejudicada pela produção ocasional de um precipitado branco que interfere na coloração direta da solução teste.⁴³ Este pode ser removido, mas é necessária uma etapa extra para a determinação de fenóis totais. As modificações

introduzidas no reagente Folin-Ciocalteu aumentaram a proporção de molibdato de sódio e impediram sua precipitação, adicionando-se sulfato de lítio ao reagente. A comparação do procedimento de Folin-Denis (FD) com o de Folin-Ciocalteu (FC) forneceu uma sensibilidade e reprodutibilidade maior para o reagente. No entanto, considerando a conveniência de procedimentos padronizados para fins de controle de qualidade, o reagente FD às vezes ainda é usado. Com técnicas e padrões adequados, os resultados são muito semelhantes, pois a reação química é a mesma. O mais importante é que esta reação redox ocorra em pH = 12.⁴⁴ Por essa razão, após a adição do reagente, acrescenta-se uma solução concentrada de carbonato de sódio, um sal com características alcalinas e realiza-se a leitura no comprimento de onda de 760 nm.

As análises utilizando-se o reagente de FC são convenientes, simples, reprodutíveis e requerem apenas equipamentos comuns em laboratórios (é suficiente um colorímetro). Sob condições adequadas, o ensaio inclui a detecção dos diferentes tipos de fenóis encontrados na natureza. Como diferentes fenóis reagem em diferentes graus, a expressão dos resultados como um número único, como miligramas por litro de equivalência de ácido gálico, é necessariamente arbitrária. Como a reação é independente, quantitativa e previsível, a análise de uma mistura de fenóis pode ser recalculada em termos de qualquer outro padrão. De fato, o ensaio mede todos os compostos facilmente oxidáveis sob as condições da reação e sua própria inclusão permite que certas substâncias reajam, ainda que raramente sejam consideradas fenóis. Originalmente, o reagente de Denis foi proposto para a quantificação de proteínas, pois todas elas possuem, em sua constituição, a tirosina, um aminoácido com hidroxila fenólica. No entanto, em soluções alcoólicas, as proteínas não são extraídas. O uso criterioso, considerando possíveis interferências em amostras específicas e estudos anteriores, se necessário, pode levar a resultados muito informativos. A análise é interessante sob o ponto de vista de se determinar um grupo de substâncias bioativas, sendo um complemento importante à análise feita por HPLC que separa um grande número de compostos individuais. É um dos parâmetros admitidos pelo Ministério da Agricultura⁴⁵ para caracterização e controle químico de própolis brasileira. Como a reação é

quantitativa e todos os ingredientes, exceto o fenol adicionado, são inorgânicos, é possível investigar a natureza exata do (s) produto (s) de oxidação do FC a partir da reação com fenóis específicos.

A reação de fenóis com o reagente FC é representada na Figura 4. O produto é uma solução azul, cuja intensidade é medida pelo valor de sua absorbância em 760 nm.

Os flavonoides são quimicamente classificados de acordo com a presença ou não de um anel central, de uma dupla ligação no anel e de um grupo hidroxila a ele ligado (Figura 3). A maneira mais precisa e exata de se identificar e quantificar flavonoides em produtos naturais, incluindo a própolis, é a análise por cromatografia líquida de alta eficiência. No que se refere a análise de própolis, existem numerosos artigos sobre a técnica. Entretanto, quando se pensa em controle

de qualidade, é conveniente a introdução de alternativas mais simples e baratas, pois nesses casos requerem-se procedimentos que permitem a análise rápida de numerosas amostras, até mesmo em laboratórios modestos, no que se refere ao instrumental. Uma das técnicas que se enquadram bem nesse contexto é a determinação de flavonoides totais por espectrometria no UV. O uso do cloreto de alumínio (AlCl_3) no diagnóstico da presença de alguns grupamentos químicos foi pela primeira vez empregado para antocianinas.⁴⁶ Trata-se de uma classe de pigmentos do grupo dos flavonoides, encontrados principalmente em flores, mas muitas vezes também em frutos, e que dão ao órgão vegetal colorações que podem variar do vermelho ao azul, passando por todos os matizes intermediários. Em 1954, Harborne sugeriu o uso do cloreto de alumínio para a

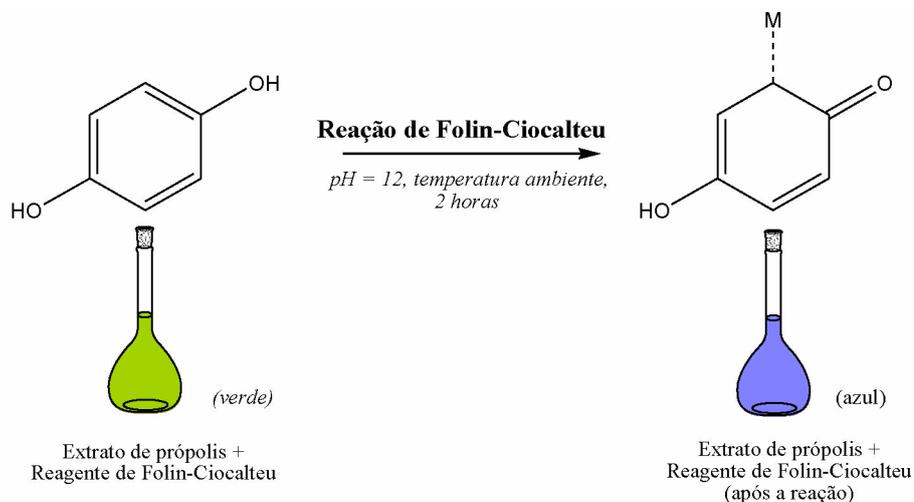


Figura 4. Reação de oxirredução do Folin-Ciocalteu com os compostos fenólicos da própolis

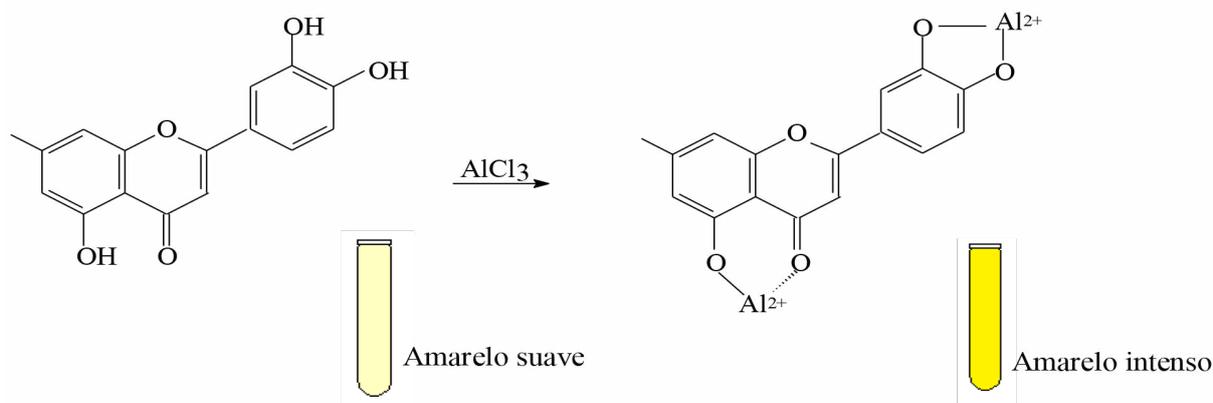


Figura 5. Formação do complexo flavonoide – Al^{3+} . As cores nos tubos indicam a mudança de amarelo suave (antes da complexação) para amarelo intenso (após a reação com o AlCl_3)

determinação espectrofotométrica da presença de certos grupamentos químicos em flavonoides.⁴⁷ Em termos de facilidade analítica, para empresas que não dispõem de equipamentos sofisticados, a opção de se utilizar essa técnica é viável e conveniente.⁴¹ Foi proposta a utilização de um método espectrofotométrico para a determinação de flavonoides totais em plantas, utilizando-se o AlCl_3 . O cátion alumínio forma complexos estáveis com os flavonoides em metanol, ocorrendo na análise espectrofotométrica, um desvio para maiores comprimentos de onda e intensificação da absorção (Figura 5).⁴⁷

Dessa maneira, é possível determinar a quantidade de flavonoides, evitando-se a interferência de outras substâncias fenólicas, principalmente os ácidos fenólicos, que invariavelmente acompanham os flavonoides nos tecidos vegetais. A leitura é feita em espectrofotômetro em 425 nm, utilizando-se cloreto de alumínio a 5% em metanol. Nessas condições, o complexo [flavonoide – Al]²⁺ absorve em comprimento de onda bem maior do que o flavonoide sem a presença do agente complexante (cloreto de alumínio) (desvio batocrômico) (Figura 6). Os ácidos fenólicos, mesmo os que formam complexos com AlCl_3 , absorvem em comprimentos de onda muito inferiores, evitando-se dessa maneira interferências nas medidas de absorbância.

O questionamento sobre o método do cloreto de alumínio para determinação de flavonoides totais é antigo. A maioria dos pesquisadores que vêm usando o método do cloreto de alumínio, bem como as empresas que realizam o controle de qualidade, fazem uso da quercetina para a

construção da curva padrão. Entretanto, existe uma polêmica sobre o uso da rutina, ao invés da quercetina como padrão. A origem do emprego da rutina provém da primeira fonte bibliográfica para o uso do método do AlCl_3 : a farmacopeia Alemã.⁴⁸ Mas nesse caso se justifica o uso da rutina, pois o método original visa a determinação de flavonoides totais em material foliar, no qual predominam glicosídeos (a rutina é um diglicosídeo). No caso de própolis, glicosídeos são muito raros. Portanto, é bem mais razoável usar-se quercetina.

Tanto o ácido gálico quanto a quercetina são marcadores químicos de baixo custo e facilmente disponíveis em estado puro. Se o objetivo for estabelecer um método aplicável a qualquer tipo de própolis, como é o contexto ora em discussão, uma opção lógica é a quercetina. Um exemplo, caso se queira determinar o teor de flavonoides totais de uma própolis produzida na Eritreia, da qual não se conhece o perfil de flavonoides. Pode ser que ela derive de uma leguminosa parecida com *Mimosa tenuiflora*, muito comum na caatinga. Nesse caso, a quercetina representaria muito bem os flavonoides da própolis, pois a própolis verde da caatinga tem predominantemente flavonóis em sua composição, inclusive a quercetina.⁴⁹ Mas a fonte de resina da própolis da Eritreia pode ser outra planta. De qualquer forma, a quercetina continua sendo a opção mais adequada pois é um flavonol, e flavonóis são mais comuns em plantas do que flavonas ou outras categorias de flavonoides.

Na própolis europeia há quantidade apreciável de pinocembrina (uma flavanona) e pinobanksina (um flavanonol). Mas esta possui também uma

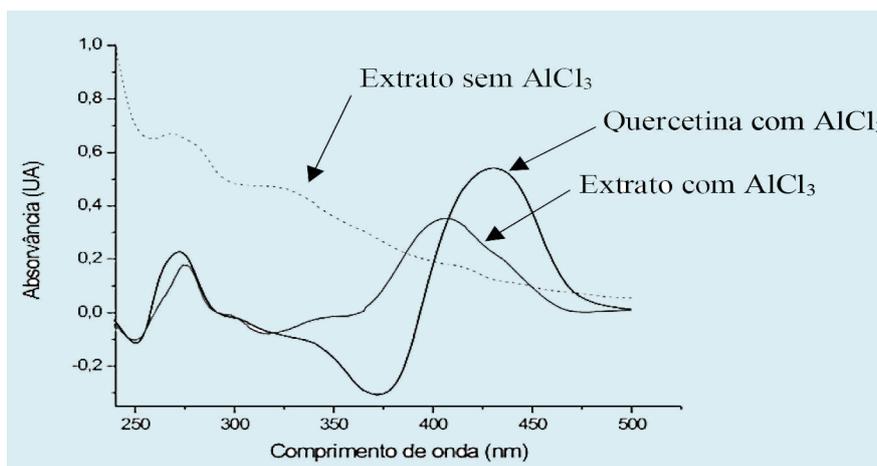


Figura 6. Desvio batocrômico do complexo flavonoide – Al^{2+} . Fonte: Adaptado de Marques *et al.*⁴⁷

quantidade considerável de galangina (um flavonol). Uma vez que flavonóis são mais comuns e como a quercetina é o flavonol mais abundante e mais amplamente distribuído nas plantas, além de ter custo reduzido e ser amplamente disponível comercialmente, é recomendada a sua utilização como padrão para o método do AlCl_3 , assim como a utilização do ácido gálico para determinação de fenóis totais.

É importante ressaltar que esses métodos colorimétricos não fornecem dados que possam ser encarados como fidedignos em relação à exata quantidade de fenóis totais ou flavonoides totais das amostras de própolis. No entanto, são parâmetros úteis ao permitir a comparação entre amostras de própolis, tanto entre tipos distintos de própolis, quanto entre diferentes amostras de um mesmo tipo. Por exemplo, comparando-se as própolis verdes brasileiras de alecrim-do-campo (sudeste brasileiro) e de jurema-preta (*Mimosa tenuiflora*, caatinga), o método de AlCl_3 usando quercetina indica claramente que a última⁴⁹ é muito mais rica em flavonoides do que a primeira.⁴¹ A esse respeito, julga-se que seria adequado que a Instrução Normativa N° 11 do Ministério da Agricultura⁴⁵ previsse não apenas o limite mínimo para flavonoides totais de própolis de alecrim-do-campo (5 g kg^{-1}), mas também um limite máximo. É característico que esse tipo de própolis tenha conteúdo de flavonoides bem inferior ao de outros, inclusive de própolis brasileiras. Por exemplo, análises de própolis verde da caatinga forneceram teores de flavonoides totais próximo a 100 g kg^{-1} , correspondendo a aproximadamente 70% de fenóis totais.⁴⁹ Por seu turno, os teores de flavonoides de análises de várias amostras de própolis verde de alecrim-do-campo⁴¹ permaneceram abaixo de 27 g kg^{-1} , correspondendo a proporções inferiores a 13% do conteúdo de fenóis totais.

É evidente que nos casos em que se deseja comparar amostras de própolis de uma mesma fonte de resina, cujo perfil de flavonoides seja conhecido, seria mais acurado selecionar um padrão que represente mais adequadamente a média de seus flavonoides, tanto em massa molecular quanto em categoria química (flavonol, flavona, flavanona, isoflavona, entre outros). Mas isso seria para um caso particular. Por exemplo, no caso da própolis de alecrim-do-campo, pode-se imaginar o emprego de kaempferida como padrão. Porém, esbarra-se na dificuldade de se conseguir adquirir o padrão e o seu custo, que é consideravelmente elevado.

Quando se emprega o método do AlCl_3 para avaliar flavonoides de folhas de plantas, é pertinente empregar-se rutina (um glicosídeo) pois folhas contêm principalmente flavonoides glicosilados. A massa molecular da rutina é próxima à média da massa molecular dos flavonoides que serão analisados. Mas em própolis, quase sempre há apenas flavonoides aglicônicos, pois glicosídeos da saliva das abelhas hidrolisam os glicosídeos da resina coletada e liberam as agliconas. Por isso, deve-se usar uma aglicona como padrão, que terá massa molecular próxima às massas moleculares dos flavonoides da amostra de própolis.

O cátion Al^{3+} complexa-se com os átomos vicinais do núcleo do flavonoide, não havendo associação do Al^{3+} com os átomos de oxigênio dos açúcares. A massa molecular da quercetina é 302 Da e a da rutina é 610 Da. A razão entre as duas massas moleculares é 2,08 Da. Isso significa que, se num hipotético ensaio, $1 \mu\text{g}$ de quercetina fornece absorvância 0,7 em 425 nm em solução alcoólica contendo AlCl_3 , necessitaria-se de $2 \mu\text{g}$ de rutina para obter o mesmo valor de 0,7 de absorvância; $2 \mu\text{g}$ de rutina contêm $1 \mu\text{g}$ de quercetina; a massa correspondente a $1 \mu\text{g}$ restante é representada por resíduos de moléculas de açúcares da estrutura da rutina, que não reagem com Al^{3+} . Por este motivo, a utilização da rutina para este método faz uma enorme diferença em relação ao uso da quercetina.

5. Conclusões

Os métodos analíticos aplicados à pesquisa de própolis evoluíram ao longo dos anos, impulsionados pela necessidade de se padronizar os tipos de própolis, quantificar os componentes responsáveis por sua atividade biológica e garantir a qualidade dos produtos que contêm própolis. Em princípio, é importante determinar-se a quantidade de resinas, cera, umidade e material insolúvel como critérios de qualidade da amostra. Em muitos casos, a quantificação de fenóis totais é um modo indireto de avaliar a quantidade de resina do material. Considerando-se as mais variadas aplicações da própolis na indústria farmacêutica, os métodos analíticos desempenham um papel importante, garantindo a qualidade dos produtos finais. As técnicas analíticas instrumentais apresentam grandes vantagens, pois são robustas e garantem

uma análise assertiva e precisa, entretanto, muitas vezes o preço e o acesso a estes equipamentos as tornam pouco acessíveis. Nesse sentido, as técnicas clássicas, as quais podem ser executadas de maneira simples e que não requerem muitos investimentos, são uma maneira segura de realizar as análises apropriadas na própolis utilizada como matéria prima, garantindo também resultados precisos e seguros para o desenvolvimento das mais diversas formulações farmacêuticas.

Referências Bibliográficas

¹ Drescher, N. A clue on bee glue: New insight into the sources and factors driving resin intake in honeybees (*Apis mellifera*). *PLOS ONE* **2019**, *14*, 0210594. [CrossRef]

² Khurshid, Z.; Naseem, M.; Zafar, M.S.; Najeeb, S.; Zohaib, S. Propolis: a natural biomaterial for dental and oral healthcare. *Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects*. **2017** *11*, 265. [CrossRef] [PubMed]

³ Przybyłek, I.; Karpiński, T. M. Antibacterial properties of propolis. *Molecules* **2019**, *24*, 29. [CrossRef] [PubMed]

⁴ Hashem, H. *In Silico* approach of some selected honey constituents as SARS-CoV-2 main protease (COVID-19) inhibitors. *Eurasian Journal of Medicinal and Oncology* **2020**, *1*, 2. [CrossRef]

⁵ Silva, R. F. B. Perspectives for environmental conservation and ecosystem services on coupled rural–urban systems. *Perspectives in Ecology and Conservation* **2017**, *15*, 74. [CrossRef]

⁶ Ahangari, Z.; Naseri, M.; Vatandoost, F. Propolis: chemical composition and its applications in endodontics. *Iranian Endodontic Journal* **2018**, *13*, 285. [CrossRef] [PubMed]

⁷ Rufatto, L. C. Red propolis: chemical composition and pharmacological activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* **2017**, *7*, 591. [CrossRef]

⁸ Bankova, V.; Castro, S.; Marcucci, M. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* **2000**, *31*, 3. [CrossRef]

⁹ Duke, C. C.; Tran, V. H.; Duke, R. K. A sedge plant as the source of Kangaroo Island propolis rich in prenylated p-coumarate ester and stilbenes. *Phytochemistry*. **2017**, *134*, 87. [CrossRef] [PubMed]

¹⁰ Lev-yadun, S. Why is the bark of common temperate *Betula* and *Populus* species white? *International Journal of Plant Sciences* **2019**, *180*, 632. [CrossRef]

¹¹ Isidorov, V. A.; Bakier, S.; Pirożnikow, E. Selective behaviour of honeybees in acquiring European propolis plant precursors. *Journal of Chemical Ecology* **2016**, *42*, 475. [CrossRef]

¹² Zabaïou, N. Biological properties of propolis extracts: something new from an ancient product. *Chemistry and Physics of Lipids* **2017**, *207*, 214. [CrossRef] [PubMed]

¹³ Marcucci, M. C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* **1995**, *26*, 83. [CrossRef]

¹⁴ Trusheva, B.; Popova, M.; Bankova, V.; Simova, S.; Marcucci, M. C.; Miorin, P. L.; Pasin, F. R.; Tsvetkova, I. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* **2006**, *3*, 249. [CrossRef]

¹⁵ Huang, Y. Combined direct analysis in real-time mass spectrometry (DART-MS) with analytical pyrolysis for characterization of Chinese crude propolis. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* **2019**, *137*, 227. [CrossRef]

¹⁶ Ozdal, T.; Ceylan, F. D.; Eroglu, N.; Kaplan, M.; Olgun, E. O.; Capanoglu, E. Investigation of antioxidant capacity, bioaccessibility and LC-MS/MS phenolic profile of Turkish propolis. *Food Research International* **2019**, *122*, 528. [CrossRef] [PubMed]

¹⁷ Salatino, A.; Fernandes-Silva, C. C.; Righi, A.A.; Salatino, M. L. F. Propolis research and the chemistry of plant products. *Natural Products Research* **2011**, *28*, 925.

¹⁸ Alday, E. Plant origin authentication of Sonoran desert propolis: an antiproliferative propolis from a semi-arid region. *The Science of Nature* **2019**, *106*, 25. [CrossRef]

¹⁹ Bankova, V.; Popova, M.; Trusheva, B. The phytochemistry of the honeybee. *Phytochemistry* **2018**, *155*, 1. [CrossRef] [PubMed]

²⁰ Sawaya, A. C. H. F.; Cunha, I. B. S.; Marcucci, M. C. Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. *Chemistry Central Journal* **2011**, *5*, 27. [CrossRef]

²¹ Ccana-Capatinta, G. C.; Mejía, J. A. A.; Tanimoto, M. H.; Groppo, M.; De Carvalho, J. C. A. S.; Bastos, J. K. *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub. and *Symphonia globulifera* L.f.: the botanical sources of isoflavonoids and benzophenones in Brazilian red propolis. *Molecules* **2020**, *25*, 2060. [CrossRef]

²² Marcucci, M. C.; Ferreres, F.; Garcia-Viguera, C.; Bankova, V. S.; De Castro, S. L. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *Journal of ethnopharmacology* **2001**, *74*, 105. [CrossRef] [PubMed]

- ²³ Salomão, K.; Pereira, P. R. S.; Campos, L. C.; Borba, C. M.; Cabello, P. H.; Marcucci, M. C.; De Castro, S. L. Brazilian Propolis: Correlation between chemical composition and antimicrobial activity. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* **2008**, *5*, 317. [[CrossRef](#)]
- ²⁴ Franchin, M. The use of Brazilian propolis for discovery and development of novel anti-inflammatory drugs. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2018**, *153*, 49. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁵ Freires, I. A.; De Alencar, S. M.; Rosalen, P. L. A pharmacological perspective on the use of Brazilian red propolis and its isolated compounds against human diseases. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2016**, *110*, 267. [[CrossRef](#)]
- ²⁶ Rufatto, L. C. Brazilian red propolis: chemical composition and antibacterial activity determined using bioguided fractionation. *Microbiological Research* **2018**, *214*, 74. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁷ Betances-Salcedo, E. Flavonoid and antioxidant capacity of propolis prediction using near infrared spectroscopy. *Sensors* **2017**, *17*, 1647. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁸ De Mendonça, I. C. G. Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. *BMC complementary and alternative medicine*, **2015**, *15*, 357. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁹ Kumar, N.; Goel, N. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology Reports* **2019**, *24*, e00370.
- ³⁰ Tungmunnithum, D. Flavonoids and other phenolic compounds from medicinal plants for pharmaceutical and medical aspects: an overview. *Medicines* **2018**, *5*, 93. [[PubMed](#)]
- ³¹ Kessler, A.; Kalske, A. Plant secondary metabolite diversity and species interactions. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **2018**, *49*, 115. [[CrossRef](#)]
- ³² Alrifai, O. Current review of the modulatory effects of LED lights on photosynthesis of secondary metabolites and future perspectives of microgreen vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2019**, *67*, 6075. [[CrossRef](#)]
- ³³ Septembre-Malaterre, A.; Remize, F.; Poucheret, P. Fruits and vegetables, as a source of nutritional compounds and phytochemicals: changes in bioactive compounds during lactic fermentation. *Food Research International* **2018**, *104*, 86. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁴ Kuppusamy, P. Quantification of major phenolic and flavonoid markers in forage crop *Lolium multiflorum* using HPLC-DAD. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, **2018**, *28*, 282. [[CrossRef](#)]
- ³⁵ Wozniak, M. The role of seasonality on the chemical composition, antioxidant activity and cytotoxicity of Polish propolis in human erythrocytes. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2019**, *29*, 301. [[CrossRef](#)]
- ³⁶ Sforcin, J. Biological properties and therapeutic applications of propolis. *Phytotherapy research* **2016**, *30*, 894. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁷ Schmalwieser, A. W.; Weihs, P.; Schauburger, G. UV Effects on living organisms. BT - Encyclopedia of Sustainability Science and Technology, 1a. ed., Springer: New York, 2019.
- ³⁸ Zhao, C. N. Fruits for prevention and treatment of cardiovascular diseases. *Nutrients* **2017**, *9*, 598. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁹ Amaral, A. B.; Silva, M. V. DA; Lannes, S. C. S. Lipid oxidation in meat: mechanisms and protective factors: a review. *Food Science and Technology* **2018**, *38*, 1. [[CrossRef](#)]
- ⁴⁰ Ferrières, J. The French paradox: lessons for other countries. *Heart* **2004**, *90*, 107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴¹ Woisky, R. G.; Salatino, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apicultural Research* **1998**, *37*, 99. [[CrossRef](#)]
- ⁴² Folin, O.; Ciocalteu, V. Tyrosine and tryptophane in proteins. *Journal of Biological Chemistry* **1927**, *73*, 627. [[Link](#)]
- ⁴³ Galvão-Poundso, M. A. M. Evaluation of the Folin-Ciocalteu method and quantification of total tannins in stem barks and pods from *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **2018**, *61*, e18170586. [[CrossRef](#)]
- ⁴⁴ Singleton, V. L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventós, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* **1999**, *299*, 152. [[CrossRef](#)]
- ⁴⁵ Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 11, de 20 de outubro. Brasília, 2000.
- ⁴⁶ Chung, T. H. Evaluation of aluminum chloride as an effective short-term solution for reducing odor-causing volatile fatty acids in duck litter. *Revista Brasileira de Ciência Avícola* **2017**, *19*, 545. [[CrossRef](#)]

⁴⁷ Shah, M.; Hossain, M. Total flavonoids content and biochemical screening of the leaves of tropical endemic medicinal plant *Merremia borneensis*. *Arabian Journal of Chemistry* **2011**, *7*, 1. [[CrossRef](#)]

⁴⁸ Marques, G. S. Avaliação de procedimentos para quantificação espectrofotométrica de flavonoides totais em folhas de *Bauhinia forficata* Link. *Química Nova* **2012** *35*, 517. [[CrossRef](#)]

⁴⁹ Deutscher Apothecar Verlag. *Deutscher Arzneibuch*. Golgi-Verlag GmbH. Stuttgart 1978, 680 p.

⁵⁰ Ferreira, J. M.; Fernandes-Silva, C. C.; Salatino, A.; Negri, G.; Message, D. New propolis type from north-east Brazil: chemical composition, antioxidant activity and botanical origin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2017**, *97*, 3552. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]