



Análise de extratos alternativos de Própolis Verde e Própolis do Oeste do Paraná por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Analysis of Alternative Extracts of Green Propolis and West Paraná Propolis by High Performance Liquid Chromatography

Ana Carolina Okagawa Dias¹, Jhazmin Vivian Jara Garvizu², Ricardo Fiori Zara³, Solange Maria Cotica⁴, Lorena Clara Cruz⁵.

RESUMO

A própolis é uma denominação utilizada para descrever o produto proveniente de substância resinosas, colhida pelas abelhas melíferas das flores. Farmacologicamente, é o centro para diversos estudos devido às atividades biológicas e propriedades antioxidantes dos compostos bioativos presentes, contudo a forma de preparação do extrato e a origem do material são de suma importância para extração do composto. Assim sendo, o objetivo deste trabalho foi analisar novas maneiras de extrair os compostos bioativos, bem como identificar e quantificar diferentes amostras de própolis. Para o preparo dos extratos pesou-se 5 g da amostra e adicionou-se 50 mL do solvente extrator, levando ao Shaker por 24 horas; após isso, o extrato foi filtrado e diluído. Para a identificação e determinação dos compostos, utilizou-se o sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Através dessa análise, foi possível identificar oito compostos fenólicos em concentrações diversas, dos quais o ácido ferúlico e o ácido *p*-cumárico se destacaram como os mais proeminentes. Esses resultados têm implicações significativas na seleção do solvente, podendo afirmar que o solvente otimizado não extraiu os compostos de uma forma tão eficiente quanto etanol 70%; contudo, estudos posteriores devem ser realizados a fim de avaliar a aplicabilidade da mistura proposta.

PALAVRAS-CHAVE: Ácidos fenólicos; compostos bioativos; extratos.

ABSTRACT

Propolis is a term used to describe the product derived from resinous substances collected by honeybees from flowers. Pharmacologically, it is the focus of various studies due to the biological activities and antioxidant properties of the bioactive compounds present; however, the preparation of the extract and the source of the material are of paramount importance for the extraction of the compound. Therefore, the aim of this work was to analyze new ways to extract bioactive compounds and to identify and quantify different samples of propolis. For the preparation of the extracts, 5 g of the sample was weighed, and 50 mL of the extracting solvent was added, shaken for 24 hours; after that, the extract was filtered and diluted. For the identification and determination of compounds, a High-Performance Liquid Chromatography system was used. Through this analysis, it was possible to identify eight phenolic compounds in various concentrations, of which ferulic acid and *p*-coumaric acid stood out as the most prominent. These results have significant implications for solvent selection, suggesting that the optimized solvent did not extract the compounds as efficiently as 70% ethanol; however, further studies should be conducted to assess the applicability of the proposed mixture.

KEYWORDS: phenolic acids; bioactive compounds; extracts.

¹ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil. E-mail: carolokagawa@gmail.com. ID Lattes: 6406071528327902.

² Bolsista do Conselho Nacional de Pesquisa. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil. E-mail: jhazminvjgarvizu@gmail.com. ID Lattes: 5762360990243459.

³ Docente do curso de Processos Químicos – COPEQ. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil. E-mail: ricardozara@professores.utfpr.edu.br. ID Lattes: 1508164359774914.

⁴ Docente do curso de Processos Químicos – COPEQ. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil. E-mail: smcottica@utfpr.edu.br. ID: 9405524829450494.

⁵ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil. E-mail: lorenaclara.lc@gmail.com. ID: 0300954335877707.



INTRODUÇÃO

A própolis é uma substância resinosa constituída pelas abelhas melíferas ao misturarem suas próprias ceras com resinas coletadas de diversas plantas. Sua composição química é complexa e variada, visto que está relacionada com a ecologia da flora de cada região em que as abelhas se encontram (PARK, 2002). Dessa maneira, com a localização geográfica da própolis, há diferentes tipos de própolis. Particularmente, a própolis verde apresenta um perfil fitoquímico com alta concentração de fenólicos, os quais conferem diversas propriedades biológicas (LINS, 2018).

O etanol é um dos solventes mais utilizados na comercialização do extrato da própolis. Contudo, outras alternativas vêm sendo estudadas para a extração dos compostos bioativos da própolis por meio de solventes menos agressivos. Entre essas formas, encontram-se os *Natural Deep Eutectic Solvents* (NADES), que são uma classe de solvente específicos que possuem em sua composição compostos naturais, bem como oferecem vantagens na extração desses compostos bioativos (TZANI, 2022). Dessa forma, estudos indicam que a utilização de NADES à base de sorbitol - um álcool de açúcar encontrado naturalmente em frutas, reconhecido como um adoçante nutritivo (GODSWILL, 2017) - apresentaram resultados promissores na extração desses compostos biologicamente ativos (BOYKO, 2020).

O propósito desse estudo foi identificar e quantificar os compostos fenólicos presentes na própolis (verde e marrom), obtidos por meio de extratos alternativos, utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e comparar os resultados com extratos obtidos com etanol 70% já amplamente utilizado.

METODOLOGIA

Para o estudo, foram utilizadas amostras de própolis verde, cedidas pela empresa Apiário RIODEMEL Ltda, coletadas na região de Caxambú/MG, Brasil, e amostras de própolis marrom, coletadas na região de Cascavel/Pr, Brasil. Para a obtenção dos extratos etanoicos, foram preparadas soluções de etanol 70% a partir de etanol absoluto e água. Posteriormente adicionou-se 5 g de própolis de cada variedade em Erlenmeyers separados com 50 mL da solução. Já para o extrato alternativo, foram preparadas soluções com 5 g de cada variedade de própolis, e adicionou-se o solvente proposto previamente otimizado para extração de compostos antioxidantes (60% de sorbitol, 25% de água e 15% de glicerina). Logo em seguida, os extratos foram levados ao Shaker por 24 horas a 100 rotações por minuto (rpm). Após o tempo de extração, as amostras foram filtradas a vácuo e armazenadas em frascos âmbar sob refrigeração.

Para a análise em cromatografia líquida de alta eficiência, as amostras foram liofilizadas (Liotop-L101) e, posteriormente, pesadas (100 mg) e dissolvidas em 1 mL de uma solução de metanol e água (v/v). Após isso, para a quantificação dos compostos, foi utilizada a metodologia válida com pequenas alterações de Çayan (2020).

O cromatógrafo utilizado foi Dionex UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific), equipado com detector UV-VIS (VWD-3400RS), bomba quaternária (LPG-3400SD), forno (TCC-3400RS) e sistema de injeção manual. O software utilizado para análise de dados foi Chromeleon 7. A separação cromatográfica foi realizada em coluna de fase reversa C18 (octadecilsilano) Waters Acquity BEH (250 mm x 4,6 mm) com tamanho de partícula de 5 µm. A fase móvel foi composta de água ultrapura acidificada com ácido acético 0,5% (pH



3,03) e metanol acidificado com ácido acético 0,5% (pH 3,52), com eluição por gradiente. A composição inicial foi de água e metanol (85:15), com aumento gradual de metanol até 30 minutos (40:60), essa proporção foi aumentada até 35 minutos (5:95), mantendo essa proporção até 40 minutos.

As amostras foram preparadas na concentração de 1 mg mL⁻¹ em etanol 99,98 % e filtradas em membrana nylon hidrofílica, de abertura de poro de 0,22 µm (Merck®). O fluxo utilizado foi de 1,0 mL min⁻¹, temperatura da coluna de 40 °C, volume de injeção de 20 µL e comprimento de onda de 280 nm. A identificação dos compostos foi realizada por comparação dos tempos de retenção com padrões, para quantificação foram utilizadas curvas de calibração externa.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) dos extratos etanoicos e otimizados (solvente proposto) da própolis, tanto na variedade verde quanto na marrom, apresentaram a presença de diversos compostos. Dentre esses, apenas oito compostos secundários puderam ser definitivamente identificados e quantificados, esses compostos estão diretamente relacionados às propriedades atribuídas à própolis e sua atividade antioxidante, detalhado na Tabela 1.

Tabela 1 – Concentração dos compostos (µg mL⁻¹) encontrados nos extratos etanoico e otimizado de ambas as variedades através da cromatografia líquida de alta eficiência.

| Composto | Própolis marrom | | Própolis verde | |
|--------------------------|-----------------|----------|----------------|----------|
| | Otimizado | Etanoico | Otimizado | Etanoico |
| Ácido Clorogênico | N/A | 1662,57 | 3137,04 | 2352,32 |
| Ácido Caféico | 137,90 | N/A | N/A | 2061,80 |
| Ácido Siríngico | N/A | 2738,07 | 103,72 | 449,88 |
| Ácido <i>p</i> -Cumárico | 26,55 | 265,11 | 4322,60 | 19734,84 |
| Ácido Ferúlico | 1171,60 | 32658,84 | 102,79 | 287,83 |
| Ácido Cinâmico | 350,80 | 11646,53 | 70,64 | 2815,68 |
| Quercetina | N/A | 1483,57 | N/A | N/A |
| Kaemperferide | N/A | N/A | N/A | 14002,04 |

Fonte: Elaborado pelos autores (2023). Legenda: N/A não aplicado.

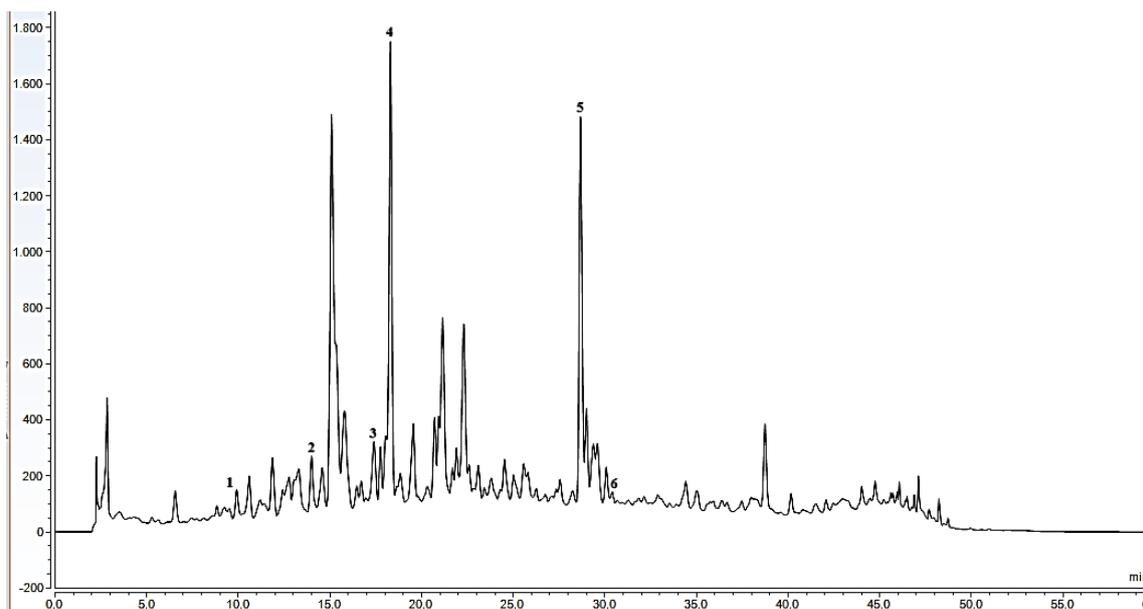
Os dados apresentados na Tabela 1 revelam as concentrações de diferentes compostos fenólicos nas amostras de própolis analisadas, medidas em µg mL⁻¹. O extrato etanoico da própolis marrom (Cascavel – PR) exibiu a presença de ácido clorogênico, ácido siríngico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido cinâmico e quercetina, em contraste, o extrato com o solvente proposto não apresentou concentrações de ácido clorogênico, ácido siríngico e quercetina. Por outro lado, o extrato etanoico da própolis verde identificou sete compostos, excluindo apenas a quercetina, enquanto o extrato otimizado revelou a



presença de apenas cinco compostos, excluindo o ácido caféico, quercetina e kaemperferide.

O cromatograma do extrato etanoico da própolis marrom (Figura1) apresentou 78 picos, dos quais seis foram identificados e quantificados, destes, os picos são respectivamente: ácido clorogênico, ácido siríngico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido cinâmico e quercetina.

Figura 1 – Cromatograma do extrato etanoico da própolis marrom



Fonte: Elaborado pelos autores (2023).

Rodrigues (2020) em um estudo para identificar a composição química dos extratos hidroalcoólicos da própolis verde, também identificou a presença do ácido caféico ($1,39 \text{ mg mL}^{-1}$), ácido siríngico ($1,02 \text{ mg mL}^{-1}$), ácido *p*-cumárico ($0,56 \text{ mg mL}^{-1}$) e ácido ferúlico ($5,07 \text{ mg mL}^{-1}$) compostos que garantem ao extrato um potencial de atividade farmacológica (RODRIGUES, 2020).

Devido à falta de padrões dos compostos químicos, alguns picos não puderam ser identificados, além disso, alguns compostos apresentam tempo de retenção muito próximo, assim podem ter eluídos entre si e formando um único pico. Contudo, observou-se uma notável variação na presença e quantidade desses compostos nas amostras. Destacam-se o ácido ferúlico ($32,66 \text{ mg mL}^{-1}$) no extrato etanoico da própolis marrom e o ácido *p*-cumárico ($19,73 \text{ mg mL}^{-1}$) no extrato etanoico da própolis verde.

Contudo, foram feitas outras análises para a avaliação da atividade antioxidante, em um estudo paralelo a este, por meio de testes de caracterização da capacidade anti-radical (DPPH), fenólicos e flavonóides, com os resultados desses testes e da análise por meio da CLAE a própolis verde se destaca em relação à própolis marrom.

A ausência de determinados compostos bioativos nas amostras de própolis destaca que a tamanha complexidade química, dependendo da origem botânica bem como do solvente utilizado no processo de extração, são cruciais para a formulação do produto com as propriedades biológica e antioxidantes específicas, direcionando a escolha das amostras e solventes ideais para atender aos objetivos desejáveis.



CONCLUSÃO

O presente estudo, analisou a influência da origem botânica e do solvente na atividade antioxidante de extratos de própolis verde e marrom. Por meio da cromatografia líquida de alta eficiência, foi possível identificar a composição química qualitativa e quantitativa de oito compostos fenólicos nos extratos, dentre os quais destacou-se o ácido ferúlico e o ácido *p*-cumárico, cabe destacar que a própolis verde é reconhecidamente rica nesses compostos, e possui uma atividade antioxidante melhor que a própolis marrom.

Portanto, ressalta-se que a própolis verde é uma escolha promissora para as aplicações terapêuticas e antioxidantes, evidenciando, assim, como uma opção mais vantajosa em relação a própolis marrom.

Embora o extrato proposto com sorbitol, glicerina e água foi explorado como alternativa ao extrato etanoico, este demonstrou uma maior extração dos compostos bioativos da própolis, assim, pode-se afirmar que o solvente proposto não extraiu compostos de forma tão eficiente quanto o etanol 70%, contudo estudos posteriores devem ser realizados a fim de avaliar a aplicabilidade da mistura.

Material suplementar

Caso haja interesse em acessar o material suplementar, neste caso a determinação do solvente proposto, acessar o resumo expandido Otimização da Extração de Compostos Bioativos da Própolis Utilizando Solventes Alternativos.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer ao Prof. Dr. Ricardo Fiore Zara, nosso orientador e mentor, pela inestimável orientação e apoio ao longo desse processo de pesquisa, bem como ao Laboratório Multiusuário – LABCA – do campus Toledo da Universidade Federal do Paraná que ofereceram o suporte fundamental para essa pesquisa. Agradecimentos especiais para a Gabrielle Caroline Peiter e Lorena Clara Cruz pela ajuda na utilização do cromatógrafo e análises dos cromatogramas.

Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

BOYKO, Nikolay *et al.* Studying and Modeling of the Extraction Properties of the Natural Deep Eutectic Solvent and Sorbitol-Based Solvents in Regard to Biologically Active Substances from Glycyrrhizae Root. **Molecules** (Basel, Switzerland) 25, no. 7: 1482. 2020.

GODSWILL, Awuchi Chinaza. Sugar Alcohols: Chemistry, Production, Health Concerns and Nutritional Importance of Mannitol, Sorbitol, Xylitol, And Erythritol. **International Journal of Advanced Academic Research**, v. 3, n. 2, p. 31-66, 2017.



LINS, Alvanice Silva *et al.* Implantação das análises físico-químicas da própolis no laboratório da Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola. **Revista Pindorama**, [S.l.], v. 1, p. 20, 2018.

PARK, Yong Kun *et al.* Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**, v. 32, n. 6, p. 997–1003, dez. 2002.

RODRIGUES, Maria *et al.* Screening Fitoquímico de Amostras de Própolis do Nordeste do Brasil por HPLC: Variedades Verde, Negra e Vermelha. **Research, Society and Development**. v. 9, n. 10, e7799108936, 2020. DOI: 10.33448/rsd-v9i10.8936.

TZANI, Andromachi. *et al.* Green Extraction of Greek Propolis Using Natural Deep Eutectic Solvents (NADES) and Incorporation of the NADES-Extracts in Cosmetic Formulation. **Research Gate**. 26 de dezembro de 2022.

ÇAYAN, Fatih *et al.* Identification and Quantification of Phenolic Acid Compounds of Twenty Six Mushrooms by HPLC-DAD. **Journal of Food Measurement and Characterization**, Chan, n.14, p.1690-1698, 2020.