

ISOLAMENTO DE PRINCÍPIOS ATIVOS DA PRÓPOLIS POR CROMATOGRÁFIA EM PAPEL BIDIMENSIONAL E DOSEAMENTO ESPECTROFOTOMÉTRICO *

Telma Teixeira FRANCO **

Alberto Keidi KUREBAYASHI **

RIALA6/613

FRANCO, T.T. & KUREBAYASHI, A. K. — Isolamento de princípios ativos da própolis por cromatografia em papel bidimensional e doseamento espectrofotométrico. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 46(1/2):81-86, 1986.

RESUMO: Através de cromatografia em papel bidimensional e doseamento espectrofotométrico de flavonóides totais, foi proposto um método de controle de qualidade para produtos contendo própolis. Este método foi aplicado a 21 amostras comerciais cujos rótulos declaravam a presença de própolis, mostrou ser acessível a laboratórios comuns e apresentou alta sensibilidade.

DESCRITORES: própolis, determinação dos flavonóides; flavonóides da própolis, determinação por cromatografia, espectrofotometria; própolis, controle de qualidade.

INTRODUÇÃO

A própolis é uma substância de composição complexa, formada por material resinoso, gomoso ou balsâmico, coletado, pelas abelhas, de brotos de árvores ou de outras partes do tecido vegetal, modificada na colméia pela adição de secreções salivares e cera^{4, 6}. É empregada pelas abelhas no reparo de frestas ou danos à colméia, no preparo de locais desinfectados para a postura da abelha-rainha, na mumificação de insetos invasores. A própolis é encontrada na entrada da colméia, sugerindo que este termo, derivado de duas palavras gregas — pró, que significa antes, e polis, que significa cidade — está relacionado com defesa da colméia, cidade das abelhas.

A utilização da própolis pelo homem remonta a milênios, sendo conhecida pelos incas e, no século XII, já estava na composição de inúmeros medicamentos. Em 1907, Hitchcock e Borish verificaram ser este material composto de 46% de resina, 27% de cera de abelha, 7% de substâncias voláteis e 13% de impurezas não-detectadas. Na época, já se

conhecia a adulteração de tinturas de própolis por cera de abelha, compostos metálicos e materiais densos insolúveis⁹.

A literatura atual relata propriedades farmacológicas da própolis proporcionais à sua concentração, tais como a antibacteriana, com indicações em otorrinolaringologia, antifúngica e inibidora do crescimento de leveduras, cicatrizante¹ e antioxidante, devido à presença de ácidos orgânicos aromáticos, ácidos graxos e compostos fenólicos nesta substância^{1, 3, 7}.

VANHAELEN & VANHAELEN-FASTRE, em 1979^{10, 11}, identificaram flavonóides na própolis através da cromatografia líquida de alta resolução e da cromatografia em fase gasosa. BANKOVA et alii¹ (1982) identificaram a presença de ácidos graxos, compostos fenólicos, ésteres, álcoois aromáticos e flavonóides, na própolis, tendo doseado estes últimos por cromatografia líquida de alta resolução¹.

O aumento da utilização da própolis na composição de diversos produtos, consumidos em São Paulo, acarretou um elevado número

* Realizado na Seção de Química Biológica do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

de consultas ao Instituto Adolfo Lutz sobre sua composição, indicações ou contra-indicações e dosagens de seus princípios ativos, pois muitas são as indicações leigas para seu uso em méis, xaropes, cosméticos, tinturas etc., tendo às vezes sucesso terapêutico ou, em outros casos, servindo de panacéia.

A legislação brasileira regulamentou a utilização da própolis em cosméticos com limite máximo de 2,5% de concentração, sendo vedado o seu uso em produtos infantis². Não foi ainda regulamentado o seu uso em alimentos ou medicamentos.

O objetivo deste trabalho foi o de identificar e dosar classes de princípios ativos da própolis que pudessem servir de parâmetro de qualidade.

MATERIAL

Foram utilizadas 21 amostras de produtos contendo própolis, enviadas ao Instituto Adolfo Lutz por consumidores, produtores ou por entidades responsáveis pela fiscalização de tais produtos, assim distribuídas: 12 soluções alcoólicas de própolis; 12 soluções hidroalcoólicas de própolis; 4 amostras de méis contendo própolis; e 1 amostra de mel puro.

Apesar de não haver declaração no rótulo dos produtos indicando a concentração de própolis, através de contatos com produtores de tais produtos verificou-se que os extratos alcoólicos eram originários de soluções com concentração entre 1:10 e 3:10 (p/v), que as soluções hidroalcoólicas tinham diluição em água entre 1:50 ou mais (p/v), a partir do extrato alcoólico, e que os méis tinham de 1 a 5% de própolis bruto.

Utilizamos dois principais procedimentos: cromatografia em papel bidimensional descendente e doseamento espectrofotométrico.

MÉTODO

a) Cromatografia em papel para identificação de flavonóides⁵

Reagentes

Acetato de etila

Fase móvel *a*: isobutanol, ácido acético glacial e água (3:1:1)

Fase móvel *b*: ácido acético glacial e água (15:85)

Procedimento — Aplicar as soluções alcoólicas diretamente no papel ou, então, concentrá-las previamente. Extrair as soluções hidroalcoólicas, méis e xaropes conforme a

técnica que consiste em pesar de 1 a 5 gramas da amostra (dependendo da concentração da própolis no produto), adicionar 30 ml de água destilada e transferir para funil de separação; extrair com três porções de 10 ml de acetato de etila e reunir os extratos para posterior concentração em banho-maria ou rotavapor. Preparadas as amostras, aplicá-las no canto superior direito do papel previamente marcado com um espaço de 5 cm dos lados adjacentes à mancha, que servirão de apoio na canaleta do solvente (conforme figura 1). Saturar a cuba com a fase móvel *a*, colocar o papel na canaleta com auxílio de um bastão de vidro de mesma dimensão e adicionar o solvente cuidadosamente para não escorrer. Deixar por aproximadamente 18 horas (ou até que o solvente tenha atingido 2 cm da borda inferior da folha). Secar o papel em capela. Substituir a fase móvel *a* pela *b*. Girar o papel em ângulo de 90°, deixando toda a extensão da mancha percorrida agora paralelamente ao leito da canaleta. Correr o cromatograma por aproximadamente 5 horas. Secar o papel somente em capela e observar as manchas na luz ultravioleta (lâmpada ultravioleta longa). Marcar as manchas com lápis e então adicionar uma gota de hidróxido de amônio ou expor o papel ao vapor do mesmo. Observar novamente na região do ultravioleta (ver distribuição das manchas na figura 2).

b) Doseamento espectrofotométrico de flavonóides⁹

Equipamento

Espectrofotômetro (U.V. e visível)

Reagentes

Etanol absoluto

Solução de quercetina padrão

Solução de oxicleto de zircônio (2,5%, p/v, em metanol)

Procedimento — Diluir as soluções alcoólicas e hidroalcoólicas diretamente em etanol absoluto. Diluir a própolis em bruto etanol absoluto até 0,001 g/ml. Extrair méis e xaropes conforme descrito no procedimento para cromatografia em papel, evaporar e diluir em etanol absoluto. Colocar alíquotas das amostras em tubos de vidro às quais se deve adicionar 1 ml de oxicleto de zircônio por tubo. Completar o volume com etanol absoluto para 10 ml. Esperar 10 minutos e ler em espectrofotômetro a 301 nm, frente a branco de cada amostra sem oxicleto de zircônio. Calcular o resultado em gramas de flavonóides totais expressos em quercetina por ml ou grama de amostra.

Curva-padrão — Pesar 0,01 grama de quercetina, transferir para balão de 100 ml e completar o volume com etanol absoluto

(0,1 mg/ml). Preparar diluições crescentes nos tubos de vidro de 0,1 ml até 2,0 ml. Adicionar a estas soluções 1 ml de oxicleto de

zircônio. Completar o volume para 10 ml com etanol absoluto. Esperar 10 minutos e ler a 301 nm. Construir a curva-padrão.

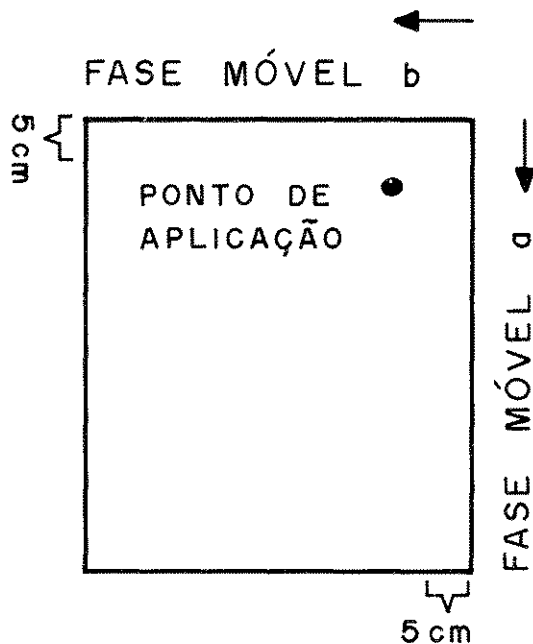


FIGURA 1 — Esquema da aplicação da amostra contendo própolis.

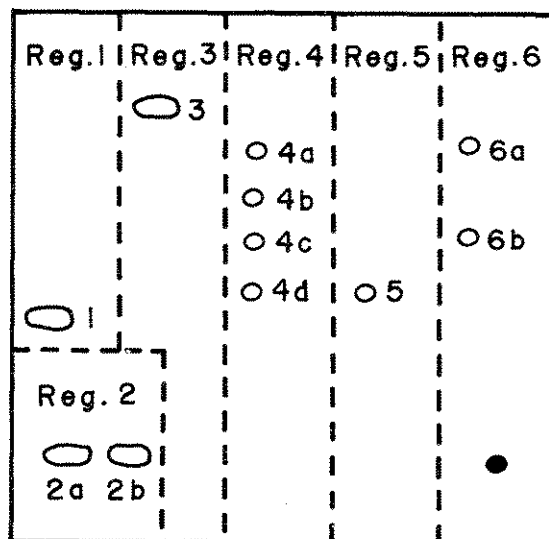


FIGURA 2 — Distribuição e caracterização das manchas de amostras contendo própolis: região 1, mancha rosa-amarelado, cuja coloração não se altera com a adição de NH_3 ; região 2, mancha marrom-claro, ou escuro, não-fluorescente, que se torna amarelada com adição de NH_3 ; região 3, mancha verde, fluorescente, que não reage com AlCl_3 ; região 4, duas a quatro manchas azuis, fluorescentes, cuja coloração não se altera com adição de NH_3 ; região 5, manchas azuis ou verdes, fluorescentes; região 6, uma ou duas manchas verdes, fluorescentes, que se tornam verde-amareladas com a adição de NH_3 .

RESULTADOS

A tabela 1 mostra a freqüência com que as principais classes de flavonóides aparecem nos produtos contendo própolis. A figura 2 mostra o esquema da posição das manchas em um cromatograma, assim como suas respectivas cores quando expostas à luz ultravioleta na ausência e na presença de amônia.

A tabela 2 apresenta a concentração de flavonóides encontrados nos produtos analisados, onde se verifica que as soluções alcoólicas contêm um teor elevado de flavonóides (variando de 0,24 a 7,5 g/100 ml), enquanto que as soluções hidroalcoólicas,

produtos preparados a partir das soluções alcoólicas, misturadas com água, apresentam teor mínimo de flavonóides (0,007 a 0,050 g/100 ml).

DISCUSSÃO

Observamos que em todas as amostras comerciais, em cujos rótulos está declarada a presença da própolis, aparece a mancha da região 3. As manchas da região 4, que costumam aparecer juntas, aparecem em 60% das amostras. As manchas das regiões 1, 5 e 6 aparecem em 25% das amostras.

TABELA 1

Freqüência de manchas de princípios ativos de produtos contendo própolis distribuídas pelas diversas regiões do cromatograma

N.º de amostras	Tipo de amostra	Regiões					
		1	2	3	4	5	6
1	Sol. própolis alcoólica	—	—	+	+	+	+
2	Sol. própolis alcoólica	—	—	+	+	—	—
3	Sol. própolis alcoólica	+	+	+	+	+	+
4	Sol. própolis alcoólica	—	—	+	+	—	+
5	Sol. própolis alcoólica	+	+	+	+	—	—
6	Sol. própolis alcoólica	+	+	+	+	+	+
7	Sol. própolis alcoólica	+	+	+	+	—	—
8	Sol. própolis alcoólica	—	—	+	+	—	—
9	Sol. própolis alcoólica	+	+	+	+	—	—
10	Sol. própolis alcoólica	—	—	+	—	—	—
11	Sol. própolis alcoólica	—	—	+	+	—	—
12	Sol. própolis alcoólica	—	—	+	+	+	—
13	Sol. própolis hidroalcoólica	—	—	+	—	—	—
14	Sol. própolis hidroalcoólica	—	—	+	—	—	—
15	Sol. própolis hidroalcoólica	—	—	+	—	—	—
16	Sol. própolis hidroalcoólica	—	+	+	—	—	—
17	Mel com própolis	—	—	+	+	—	—
18	Mel com própolis	—	—	+	+	—	—
19	Mel com própolis	—	+	+	—	—	—
20	Mel com própolis	—	—	+	—	—	—
21	Mel puro	—	—	—	—	—	—

(+) presente.

(—) ausente.

TABELA 2

Concentração de flavonóides livres

N.º de amostras	Tipo de amostra	Flavonóides expressos em quercetina g/100 ml
1	Sol. própolis alcoólica	0,300
2	Sol. própolis alcoólica	0,600
3	Sol. própolis alcoólica	3,700
4	Sol. própolis alcoólica	0,240
5	Sol. própolis alcoólica	1,120
6	Sol. própolis alcoólica	0,920
7	Sol. própolis alcoólica	1,600
8	Sol. própolis alcoólica	1,500
9	Sol. própolis alcoólica	7,500
10	Sol. própolis alcoólica	0,400
11	Sol. própolis alcoólica	0,600
12	Sol. própolis alcoólica	1,200
13	Sol. própolis hidroalcoólica	0,020
14	Sol. própolis hidroalcoólica	0,050
15	Sol. própolis hidroalcoólica	0,020
16	Sol. própolis hidroalcoólica	0,007
17	Mel com própolis	0,050
18	Mel com própolis	0,050
19	Mel com própolis	0,020
20	Mel com própolis	0,020
21	Mel puro	(—)

(—) = não-detectado.

Nas soluções hidroalcoólicas e méis, além da mancha da região 3, podem aparecer, em alguns casos, manchas das regiões 2 e 4, possivelmente devido à pequena concentração de própolis nestes tipos de produtos, o que é verificado pelo teor de flavonóides.

Os méis analisados contêm teor igualmente baixo de flavonóides livres, talvez pela adição de pequena concentração da tintura de própolis ou pela adição da borra da própolis já esgotada de princípios ativos.

Utilizamos a quercetina como padrão de doseamento de flavonóides por ser ela mais acessível aos laboratórios; entretanto, outros flavonóides podem ser utilizados, desde que possuam hidroxilas em sua estrutura para formação do quelato metal-flavonóide.

CONCLUSÃO

Através da cromatografia em papel bidimensional foi possível isolar princípios

ativos componentes da própolis em produtos comercializados. Verificamos ser freqüente a presença da mancha da região 3, que pode servir de indicador da presença de própolis, assim como das pequenas manchas azuis fluorescentes da região 4 que não reagem com hidróxido de amônio ou tricloreto de alumínio.

Através da reação com oxiclureto de zircônio e própolis, obtivemos um índice de flavonóides expresso em quercetina que nos fornece a concentração de própolis no produto. Esta reação apresenta elevada sensibilidade (0,001 grama de própolis-padrão por ml), embora possa sofrer interferência por outros compostos contendo anéis poliidroxilados.

FRANCO, T.T. & KUREBAYASHI, A.K. — Isolation of active principles of propolis through bidimensional paper chromatography and spectrophotometric determination. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 46(1/2):81-86, 1986.

ABSTRACT: A simple and sensitive method for the quality control of propolis products was devised through bidimensional paper chromatography and total flavonoids determination spectrophotometric.

DESCRIPTORS: propolis, flavonoid determination; propolis, quality control; paper chromatography; spectrophotometry.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BANKOVA, V.S.; POPOV, S.S. & MAREKOV, N.L. — High-performance liquid chromatographic analysis of flavonoids from propolis. *J. Chromatogr.*, 242:133-43, 1982.
2. BRASIL. Leis, decretos etc. — Portaria n.º 5, de 25 de fevereiro de 1985, da Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Cosméticos. *Diário Oficial*, Brasília, 4 mar. 1985. Seção I, p. 3536. Permite o uso de extrato de própolis em cosméticos...
3. KEPČIJA, D.J.; DIMITRIJEVIC, M. & STOJANOVIC, N. — An investigation of the antioxidant properties of propolis. *Acta Vet.*, Belgrado, 31:181-4, 1981 apud *Chem. Abstr.*, 202:190j, 1981.
4. LEITÃO, C.M. — *Glossário biológico: pequeno dicionário de termos empregados em ciências biológicas*. São Paulo, Editora Nacional, 1946. 646 p.
5. MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R. & THOMAS, M.B. — *The systematic identification of flavonoids*. Berlin, Springer-Verlag, 1970. p. 1-61.
6. NIKOLAEV, A.B. — Defending the bee town. In: *A REMARKABLE hive product: propolis*. Bucharest, Apimondia, 1978. p. 10-137.
7. SZEWCZAC, E.H. & GODOL, G.F. — Verificação da sensibilidade dos *Staphylococcus aureus* à própolis. *Aerosol Cosmét.*, São Paulo, 19:16-22, 1982.
8. TAMAS, M. & MARINESCU, I. — Asupra continutului de flavone din mugurii de plop. *Stud. Cercet. Biochim.*, 26:182-5, 1983.
9. THORPE, E. — *Enciclopédia de Química Industrial*. Barcelona, Labor, 1923. p.
10. VANHAELEN, M. & VANHAELEN-FASTRE, R. — Propolis — I. Origine, micrographie, composition chimique et activité thérapeutique. *J. Pharm. Belg.*, 34:253-9, 1979.
11. VANHAELEN, M. & VANHAELEN-FASTRE, R. — Propolis — II. Identification par chromatographies haute-performance (liquide, gaz-liquide et sur couches minces des constituants. Bioautographie des chromatogrammes des composés antibactériens. *J. Pharm. Bel.*, 34:317-28, 1979.

Recebido para publicação em 7 de julho de 1986.