



Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Departamento de Engenharia de Alimentos
ExTrAE – Laboratório de Extração, Termodinâmica
Aplicada e Equilíbrio



EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DE COMPOSTOS COM PRINCÍPIOS ATIVOS DE PRÓPOLIS USANDO O DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO

M.Sc. Losiane Cristina Paviani Diehl
Engenheira de Alimentos (URI, 2001)
Mestre em Engenharia de Alimentos (URI, 2004)

Prof. Dr. Fernando Antonio Cabral
Orientador DEA/FEA-UNICAMP

Prof. Dra. Maria Cristina Marcucci
Co-orientador UNIBAN

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte integrante da tese de doutorado para obtenção do título de Doutor em Engenharia de Alimentos.

Campinas - SP

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

D563e Diehl, Losiane Cristina Paviani
Extração e fracionamento de compostos com princípios ativos de
própolis usando o dióxido de carbono supercrítico / Losiane Cristina
Paviani Diehl. -- Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Fernando Antonio Cabral
Co-orientador: Maria Cristina Marcucci
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade
de Engenharia de Alimentos

1. Própolis. 2. Extração supercrítica. 3. Artepillin C. 4.
Atividade antioxidante. 5. Atividade antimicrobiana. I. Cabral,
Fernando Antonio. II. Marcucci, Maria Cristina. III. Universidade
Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV.
Título.

Título em inglês: Extraction and fractionation of compounds with active principles of propolis
using supercritical carbon dioxide

Palavras-chave em inglês (Keywords): Propolis, Supercritical extraction, Artepillin C,
Antioxidant activity, Antimicrobial activity

Titulação: Doutor em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora: Fernando Antonio Cabral

Eduardo Augusto Caldas Batista

Christianne Elisabete da Costa Rodrigues

Cláudio Dariva

Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya

Programa de Pós Graduação: Programa em Engenharia de Alimentos

Banca Examinadora

Prof. Dr. Fernando Antonio Cabral
(Orientador)

Prof. Dr. Eduardo Augusto Caldas Batista
(Membro)

Profa. Dra. Christianne E. C. Rodrigues
(Membro)

Prof. Dr. Claudio Dariva
(Membro)

Profa. Dra. Alexandra C. H. Frankland Sawaya
(Membro)

Ao **Gustavo** que esteve sempre presente com muita paciência e amor, me incentivando e colaborando para a realização deste trabalho.

Aos meus pais, **Neiva e Mansueto**, por estarem sempre presentes, pelo apoio constante ao longo deste trabalho e em toda a minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Fernando Antonio Cabral** pela orientação, incentivo, apoio, amizade e confiança na execução deste trabalho.

A **Prof. Dr. Maria Cristina Marcucci** pela co-orientação e parceria na realização das análises deste trabalho.

Ao **Prof Dr. Claudio Dariva** por possibilitar a realização da etapa de extração supercrítica deste trabalho na URI. A **Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e Missões** por permitir a realização das extrações supercríticas no Laboratório de Termodinâmica Aplicada do curso de Engenharia de Alimentos.

A **Alexandra Sawaya** pela reallização das análises dos extratos com ionização por eletrospray.

A **Dra. Angela Custódio** pela realização da análise quimiométrica.

Aos mebros da Banca Examinadora: **Prof. Dr. Claudio Dariva, Prof. Dr. Eduardo Caldas Batista, Profa. Dra. Christianne E. C. Rodrigues, Profa. Dra. Alexandra Sawaya, Profa. Dra. Alessandra Lopes de Oliveira, Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre e Profa. Dra. Silvânia Mendes Moreschi** pela correção e valiosas sugestões para aprimorar este trabalho.

Ao curso de doutorado em Engenharia de Alimentos da FEA/UNICAMP pela oportunidade.

Aos amigos: **Camila, Letícia, Irede e Marcelo** pelo apoio, incentivo, amizade e alegria em todos os momentos.

Aos colegas de **EXTRAÆ**, Bárbara, Lu Tanaka, Mariana BT, Mariana, Wagner, Naty Pires, Clere, Natália, Hugo, Klícia, Simone, Thiago, Ana Alice, Luís, Helena

por tornarem o trabalho muito agradável, pelo bom humor e pelas conversas descontraídas da hora do café.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao CNPq pela bolsa de doutorado e suporte financeiro deste trabalho.

TESE DE DOUTORADO

AUTOR: Losiane Cristina Paviani Diehl

TÍTULO: Extração e fracionamento de compostos com princípios ativos de própolis usando o dióxido de carbono supercrítico

ORIENTADOR: Prof. Dr.Fernando Antonio Cabral – EXTRAE/DEA/FEA/UNICAMP

CO-ORIENTADOR: Profa. Dra.Maria Cristina Marcucci - UNIBAN

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi investigar a influência da temperatura, pressão e porcentagem de etanol como co-solvente no processo de extração e fracionamento com dióxido de carbono supercrítico de princípios ativos presentes no extrato etanólico de própolis (EEPS) e da própolis bruta. Os experimentos foram realizados nas temperaturas de 20 °C, 35 °C e 50 °C, pressões de 150, 200 e 250 bar e adição de etanol como co-solvente nas proporções de 0 %, 5 % 10 % e 15 %. A identificação dos compostos presentes nos extratos foi feita por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) frente a quatro marcadores (compostos fenólicos): ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (DHCA, também conhecido como Artepillin C), ácido 3-prenil-4-hidrocinâmico (PHCA), ácido 4-hidroxicinâmico (ácido *p*-cumárico) e 4'-metoxi-3,5,7-tridroxiflavona (canferide). A atividade antioxidante dos extratos foi baseada no sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) pelos extratos de própolis analisados e o resultado é expresso em ED₅₀. A atividade antimicrobiana *in vitro* foi avaliada pelo método de difusão em disco contra três microorganismos patogênicos: *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Escherichia coli* (ATCC 25922). O extrato etanólico de própolis teve um rendimento médio de 39,45 % e uma alta atividade antioxidante, ou seja, um ED₅₀ de 7,58 µg/mL. O experimento

de extração supercrítica a partir do EEPS realizado na condição de 20 °C e pressão de 250 bar apresentou uma alta atividade antioxidante, cerca de 7,91 µg/mL, muito próximo com o valor obtido para o EEPS. A extração supercrítica a partir do extrato etanólico de própolis com adição de 5, 10 e 15 % não apresentou resultados satisfatórios. Os maiores rendimentos globais para a extração supercrítica da própolis bruta, foi obtido quando adicionou-se 15 % de etanol como co-solvente. O extrato etanólico de própolis seco (EEPS) apresentou um halo de inibição de 10 mm frente ao *S. aureus*. O extrato etanólico de própolis e os extratos obtidos via supercrítica não apresentaram atividade antimicrobiana contra *Candida albicans* e *Escherichia coli*.

Palavras-Chave: Própolis, extração supercrítica, Artepillin C, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana

DOCTORAL THESIS

AUTHOR: Losiane Cristina Paviani Diehl

TITLE: Extraction and fractionation of compounds with active principles of propolis using supercritical carbon dioxide

MAJOR PROFESSOR: Prof. Dr.Fernando Antonio Cabral – EXTRAE/DEA/FEA/UNICAMP

CO-MAJOR PROFESSOR: Profa. Dra. Maria Cristina Marcucci - UNIBAN

ABSTRACT

The objective of this work is to investigate the influence of temperature, pressure and percentage of ethanol as a co-solvent in the process of extraction and fractionation with supercritical carbon dioxide of active ingredients present in dry ethanolic extract of propolis (EEP) and crude propolis. The experiments were conducted under temperature conditions of 20 °C, 35 °C and 50 °C, pressure on the conditions of 150, 200 and 250 bar and the addition of ethanol as co-solvent in the proportions of 0 %, 5 %, 10 % and 15 %. The identification of compounds present in the extracts was measured by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) against four markers (phenolic compounds): 3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid (DHCA, also known as Artepillin C), 3-prenyl-4-hydroxycinnamic acid (PHCA), 4-hydroxycinnamic acid (*p*-coumaric acid) and 4'-methoxy-3',5,7-tridroxyflavone (Kaempferide). The antioxidant activity for all extracts were evaluated by the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical scavenging method, the results was expressed in ED₅₀. The antimicrobial activity using disk diffusion were determined against three pathogenic microorganisms: *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Candida albicans* (ATCC 10231) and *Escherichia coli* (ATCC 25922). The global yield of the extraction of ethanolic extract of propolis was 39.45% and had a high antioxidant activity, ED₅₀ of 7.58 µg

/mL. The experiment of supercritical extraction of the EEP conducted on the condition of 20 °C and pressure of 250 bar resulted in an extract with about 7.91 mg/mL, very close to the value obtained for the EEP. The supercritical extraction from ethanol extract of propolis with the addition of 5, 10 and 15% of what did not present satisfactory results. The global yield of supercritical extraction of crude propolis, was obtained when added 15% of ethanol as a co-solvent. The ethanolic extract of propolis (EEP) presented an inhibition halo of 10 mm for *S. aureus*. The ethanolic extract of propolis and the extracts obtained by supercritical technology did not show antimicrobial activity against *Candida albicans* and *Escherichia coli*.

Keywords: Propolis, supercritical extraction, Artepillin C, antioxidant activity, antimicrobial activity

ÍNDICE GERAL

| | |
|---|-------------|
| ÍNDICE GERAL | XI |
| ÍNDICE DE TABELAS | XV |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | XVII |
| NOMENCLATURA/ABREVIACÕES..... | XIX |
| CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS | 1 |
| 1.1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.2 OBJETIVOS | 3 |
| 1.2.1 Objetivos gerais..... | 3 |
| 1.2.2 Objetivos específicos | 4 |
| CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 5 |
| 2.1 PRÓPOLIS..... | 5 |
| 2.2 HISTÓRICO | 9 |
| 2.3 PUBLICAÇÕES..... | 10 |
| 2.4 PATENTES | 12 |
| 2.5 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA..... | 13 |
| 2.6 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA PRÓPOLIS | 14 |
| 2.7 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DA PRÓPOLIS | 22 |
| 2.7.1 Atividade antimicrobiana | 23 |
| 2.7.2 Atividade antioxidante | 26 |
| 2.7.3 Atividade antiinflamatória | 30 |
| 2.7.4 Atividade citotóxica da própolis..... | 30 |
| 2.7.5 Outras atividades biológicas da própolis | 31 |
| 2.8 TOXICIDADE E ALERGIA | 32 |
| 2.9 APLICAÇÕES | 33 |
| 2.10 LEGISLAÇÃO | 34 |
| 2.11 PROCESSO DE EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO..... | 36 |
| 2.12 DIÓXIDO DE CARBONO COMO SOLVENTE SUPERCRÍTICO | 42 |
| 2.13 EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA COM O USO DE CO-SOLVENTE | 43 |

| | |
|--|-----------|
| 2.14 MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO EXPERIMENTAL DA SOLUBILIDADE DE SOLUTOS EM CO ₂ | 45 |
| 2.15 EXTRAÇÃO SUPERCÍTRICA DE PRÓPOLIS..... | 50 |
| 2.16 ANÁLISE MULTIVARIADA DOS RESULTADOS | 51 |
| 2.16.1 Análise de componentes principais (PCA) | 53 |
| CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS..... | 55 |
| 3.1 MATÉRIA-PRIMA | 55 |
| 3.2 DETERMINAÇÃO TOTAL DE SUBSTÂNCIAS VOLÁEIS E ÁGUA..... | 56 |
| 3.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS (EEPS) | 56 |
| 3.4 TESTES PRELIMINARES DA EXTRAÇÃO SUPERCÍTRICA DA PRÓPOLIS BRUTA E DO EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS SECO (EEPS) | 57 |
| 3.4.1 Equipamento experimental | 58 |
| 3.4.2 Procedimento experimental para a primeira fase dos testes preliminares..... | 60 |
| 3.4.3 Procedimento experimental para a segunda fase dos testes preliminares..... | 62 |
| 3.5 EQUIPAMENTO DE EXTRAÇÃO COM DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCÍTRICO PARA A REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS..... | 62 |
| 3.6 EQUIPAMENTO DE EXTRAÇÃO COM CO ₂ -SC E CO-SOLVENTE | 66 |
| 3.7 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL..... | 67 |
| 3.7.1 Extração supercrítica a partir extrato etanólico de própolis (EEPS) | 68 |
| 3.7.2 Extração supercrítica do extrato etanólico de própolis com adição de co-solvente | 70 |
| 3.7.3 Extração supercrítica da própolis bruta com/sem adição de co- solvente | 71 |
| 3.7.4 Determinação experimental da solubilidade com base nos dados de extração supercrítica da própolis | 72 |
| 3.7.5 Construção das isotermas de rendimento global..... | 73 |
| 3.8 ANÁLISE QUÍMICA DOS EXTRATOS..... | 73 |
| 3.8.1 Espectrometria de massas com ionização por electrospray no modo negativo [ESI(-)-MS] | 73 |
| 3.8.2 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa | 74 |
| 3.9 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE | 76 |

| | |
|---|------------|
| 3.10 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA..... | 78 |
| 3.11 ANÁLISE MULTIVARIADA..... | 79 |
| CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO | 81 |
| 4.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA | 81 |
| 4.2 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS SECO | 82 |
| 4.3 RESULTADOS EXPERIMENTAIS OBTIDOS DA PRIMEIRA FASE DOS TESTES PRELIMINARES | 86 |
| 4.3.1 Resultados das análises químicas obtidas por espectrometria de massas com ionização por eletrospray em modo negativa – ESI(-)-MS..... | 89 |
| 4.4 RESULTADOS EXPERIMENTAIS DA SEGUNDA FASE DOS TESTES PRELIMINARES | 92 |
| 4.5 EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA DO EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS (EEPS), COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA..... | 96 |
| 4.5.1 Rendimento e cinética de extração..... | 97 |
| 4.5.2 Análise química e atividades antioxidante e antimicrobiana dos extratos | 103 |
| 4.6 EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA DO EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS (EEPS) COM ADIÇÃO DE CO-SOLVENTE, COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA..... | 107 |
| 4.6.1 Rendimento e cinética de extração..... | 107 |
| 4.6.2 Análise química e atividades antioxidante e antimicrobiana dos extratos | 114 |
| 4.7 EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA DA PRÓPOLIS BRUTA COM E SEM ADIÇÃO DE CO-SOLVENTE, COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA | 119 |
| 4.7.1 Rendimento e cinética de extração..... | 119 |
| 4.7.2 Análise química e atividades antioxidante e antimicrobiana dos extratos | 124 |
| 4.8 RESULTADOS COMPLEMENTARES SOBRE A EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA DA PRÓPOLIS BRUTA | 133 |
| 4.9 ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA..... | 136 |
| CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES | 142 |
| CAPÍTULO 6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS | 145 |
| CAPÍTULO 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 146 |
| ANEXO A – ESTRUTURA QUÍMICA DE ALGUNS COMPOSTOS ENCONTRADOS NA PRÓPOLIS DE ORIGEM BRASILEIRA COM ALGUMA PROPRIEDADE BIOLÓGICA | 164 |

| | |
|---|------------|
| ANEXO B – RESULTADOS EXPERIMENTAIS | 166 |
| B.1 DETERMINAÇÃO DE RENDIMENTO TOTAL (X_o) DA EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA DO EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS SECO (EEPS) EM DIFERENTES TEMPERATURAS, PRESSÕES..... | 166 |
| B.1.2 CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR HPLC DAS EXTRAÇÕES SUPERCRÍTICAS DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE PRÓPOLIS SECO | 171 |
| B.2 DETERMINAÇÃO DE RENDIMENTO TOTAL (X_o) DA EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA DO EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS SECO (EEPS) EM DIFERENTES TEMPERATURAS, PRESSÕES E CONCENTRAÇÃO DE CO-SOLVENTE. | 176 |
| B.2.1 CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR HPLC DAS EXTRAÇÕES SUPERCRÍTICAS DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE PRÓPOLIS SECO UTILIZANDO ETANOL COMO CO-SOLVENTE | 181 |
| B.3 ENSAIOS DE DETERMINAÇÃO DE RENDIMENTO TOTAL (X_o) DA EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA DA PRÓPOLIS BRUTA EM DIFERENTES TEMPERATURAS, PRESSÕES E CONCENTRAÇÃO DE CO-SOLVENTE. | 189 |
| B.3.1 CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR HPLC DAS EXTRAÇÕES SUPERCRÍTICAS DA PRÓPOLIS BRUTA | 196 |
| B.3.2 CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR HPLC DAS EXTRAÇÕES SUPERCRÍTICAS DA PRÓPOLIS BRUTA COM 10% DE ACETATO DE ETILA E ETANOL COMO CO-SOLVENTE..... | 206 |
| ANEXO C – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE | 207 |
| C.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS OBTIDOS DA EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA DO EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS SECO (EEPS)..... | 207 |
| C.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS OBTIDOS A PARTIR DA EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA DO EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS SECO (EEPS): | 208 |
| C.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS OBTIDOS DA EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA DO EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS SECO (EEPS) E ADIÇÃO DE CO-SOLVENTE | 211 |
| C.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS OBTIDOS DA EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA DA PRÓPOLIS BRUTA COM E SEM ADIÇÃO DE CO-SOLVENTE | 215 |
| ANEXO D – PADRÕES PARA A PRÓPOLIS E EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS DO MINISTÉRIO DA AGRICULTURA | 220 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|--|-----|
| TABELA 2.1. COMPOSTOS IDENTIFICADOS DE PRÓPOLIS DE <i>A. MELLÍFERA</i> DO SUL E SUDESTE DO BRASIL..... | 21 |
| TABELA 2.2. PROPRIEDADES CRÍTICAS DE VÁRIOS SOLVENTES QUE PODEM SER EMPREGADOS NA EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA..... | 39 |
| TABELA 2.3. PROPRIEDADES FÍSICAS ASSOCIADAS A DIFERENTES ESTADOS DAS SUBSTÂNCIAS. | 40 |
| TABELA 4.1. RESULTADOS DO TEOR DE UMIDADE DA PRÓPOLIS BRUTA. | 82 |
| TABELA 4.2. RESULTADOS OBTIDOS DO EEP FRENTE AO RENDIMENTO GLOBAL, MARCADORES SELECIONADOS PARA A ANÁLISE POR HPLC E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE..... | 83 |
| TABELA 4.3. PICOS E TEMPOS DE RETENÇÃO DOS MARCADORES ANALISADOS. | 85 |
| TABELA 4.4. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS E RESULTADOS OBTIDOS NOS TESTES PRELIMINARES. | 86 |
| TABELA 4.5. COMPOSTOS IDENTIFICADOS EM EXTRATOS DE PRÓPOLIS BRUTA UTILIZANDO A TÉCNICA ESI-(-)-MS..... | 90 |
| TABELA 4.6. RENDIMENTO GLOBAL DE EXTRAÇÃO (X_o) EM FUNÇÃO DAS CONDIÇÕES OPERACIONAIS E DO TEMPO DE EXTRAÇÃO..... | 92 |
| TABELA 4.7. CONCENTRAÇÃO EM MG/G DE QUATRO COMPONENTES SELECIONADOS NO EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS SECO (EEP) E NOS EXTRATOS OBTIDOS POR EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO. | 95 |
| TABELA 4.8. RENDIMENTOS GLOBAIS DE EXTRAÇÃO E SOLUBILIDADE EM FUNÇÃO DAS VARIÁVEIS TEMPERATURA E PRESSÃO..... | 98 |
| TABELA 4.9. CONCENTRAÇÃO DOS 4 MARCADORES, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS SUPERCRÍTICOS OBTIDOS DO EEP EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E PRESSÃO. | 104 |
| TABELA 4.10. RENDIMENTOS GLOBAIS DE EXTRAÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS (EEP) EM FUNÇÃO DAS VARIÁVEIS TEMPERATURA, PRESSÃO E ADIÇÃO DE CO-SOLVENTE. | 109 |
| TABELA 4.11. CONCENTRAÇÃO DOS 4 MARCADORES, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA <i>IN VITRO</i> DO EXTRATO SUPERCRÍTICO OBTIDOS EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E PRESSÃO..... | 115 |
| TABELA 4.12. RENDIMENTOS, CONCENTRAÇÕES DOS 4 MARCADORES, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS FRAÇÕES DO EXTRATO SUPERCRÍTICO OBTIDO A 35 °C, 200 BAR E 10 % DE CO-SOLVENTE A PARTIR DO EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS..... | 118 |
| TABELA 4.13. RENDIMENTOS GLOBAIS DE EXTRAÇÃO DA PRÓPOLIS BRUTA EM FUNÇÃO DAS VARIÁVEIS TEMPERATURA E PRESSÃO E ADIÇÃO OU NÃO DE CO-SOLVENTE..... | 120 |
| TABELA 4.14. CONCENTRAÇÃO EM DOS 4 MARCADORES, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS SUPERCRÍTICOS OBTIDOS EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE TEMPERATURA, PRESSÃO E ADIÇÃO DE CO-SOLVENTE..... | 126 |

| | |
|--|-----|
| TABELA 4.15. RENDIMENTOS, CONCENTRAÇÕES DOS 4 MARCADORES, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA <i>IN VITRO</i> DAS FRAÇÕES DO EXTRATO SUPERCRÍTICO OBTIDO A 35 °C, 200 BAR E 10 % DE CO-SOLVENTE..... | 131 |
| TABELA 4.16. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS E RENDIMENTO GLOBAL (X_o) OBTIDOS NAS EXTRAÇÕES COM DIFERENTES CO-SOLVENTES. | 134 |
| TABELA 4.17. CONCENTRAÇÃO DOS 4 MARCADORES DO EXTRATO SUPERCRÍTICO UTILIZANDO 10 % DE ADIÇÃO DE CO-SOLVENTE..... | 135 |
| TABELA 4.18. VARIÁVEIS ANALISADAS NO PCA E CODIFICAÇÕES QUE FORAM UTILIZADAS PARA A ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA. | 137 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|-----|
| FIGURA 2.1. DESENHO ESQUEMÁTICO DA UTILIZAÇÃO DA PRÓPOLIS PELAS ABELHAS..... | 6 |
| FIGURA 2.2. FOTOGRAFIA DE UMA AMOSTRA DE UM TIPO DE PRÓPOLIS DE ORIGEM BRASILEIRA. | 7 |
| FIGURA 2.3. DIAGRAMA DE FASE DE UM COMPOSTO PURO. | 38 |
| FIGURA 2.3. REPRESENTAÇÃO DA MEDIDA DE SOLUBILIDADE ATRAVÉS DE CURVA DE EXTRAÇÃO. . | 48 |
| FIGURA 3.1. DESENHO ESQUEMÁTICO DA UNIDADE DE EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA. | 59 |
| FIGURA 3.2. UNIDADE EXPERIMENTAL DE BANCADA UTILIZADA NOS EXPERIMENTOS (URI). | 63 |
| FIGURA 3.3. FOTOGRAFIA DA BOMBA HPLC DE CO-SOLVENTE UTILIZADA DOS EXPERIMENTOS. ... | 67 |
| FIGURA 3.4. ESTRUTURA QUÍMICA DOS MARCADORES UTILIZADOS NA ANÁLISE QUÍMICA DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS. | 75 |
| FIGURA 3.5. REAÇÃO DE SEQUESTRO DO RADICAL LIVRE (DPPH) PELA PRÓPOLIS. | 77 |
| FIGURA 4.1. CROMATOGRAMA TÍPICO DE EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS OBTIDO POR HPLC. | 84 |
| FIGURA 4.2. CURVA DE EXTRAÇÃO A 300 BAR E 40 °C. LEITO FIXO CONTENDO 55,90 G DE PRÓPOLIS BRUTA. | 87 |
| FIGURA 4.3. ESPECTRO DE MASSAS ESI(-)-MS DO EXTRATO SUPERCRÍTICO OBTIDO A PARTIR DA PRÓPOLIS BRUTA. | 91 |
| FIGURA 4.4. ISOTERMAS DE RENDIMENTO GLOBAL DE EXTRATOS SUPERCRÍTICOS OBTIDOS A PARTIR DE EXTRATOS ETANÓLICOS DE PRÓPOLIS SECO (EEP) A 60 °C | 93 |
| FIGURA 4.5. RENDIMENTO GLOBAL DE EXTRAÇÃO EM FUNÇÃO DA DENSIDADE DO DIÓXIDO DE CARBONO. | 94 |
| FIGURA 4.6. CURVA DE EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA NA TEMPERATURA DE 20 °C E PRESSÕES DE 150 BAR, 200 BAR E 250 BAR. | 99 |
| FIGURA 4.7. CURVA DE EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA NA TEMPERATURA DE 35 °C E PRESSÕES DE 150 BAR, 200 BAR E 250 BAR. | 100 |
| FIGURA 4.8. CURVAS DE EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA DO EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS: À 50 °C E PRESSÕES DE 150, 200 E 250 BAR. | 100 |
| FIGURA 4.9. RENDIMENTO GLOBAL PARA A EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA (A) E SOLUBILIDADE DO EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS NAS PRESSÕES DE 150, 200 E 250 BAR E TEMPERATURAS DE 20, 35 E 50 °C (B)..... | 102 |
| FIGURA 4.10. CONCENTRAÇÃO DE ARTEPILLIN C OBTIDO NOS EXTRATOS SUPERCRÍTICOS (A) E NO RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO EM MG/G DE EXTRATO (B). | 103 |
| FIGURA 4.11. CURVAS DE EXTRAÇÃO DA MASSA TOTAL EXTRAÍDA EM RELAÇÃO A MASSA DE SOLVENTE (CO ₂) EMPREGADA NA EXTRAÇÃO UTILIZANDO ETANOL COMO CO-SOLVENTE.. | 110 |

| | |
|--|-----|
| FIGURA 4.12. CURVAS DE EXTRAÇÃO DA MASSA TOTAL EXTRAÍDA EM RELAÇÃO A MASSA DE SOLVENTE (CO ₂) EMPREGADA NA EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA A 20 °C E ETANOL COMO CO-SOLVENTE NAS PROPORÇÕES DE 5 E 15 %..... | 111 |
| FIGURA 4.13. CURVAS DE EXTRAÇÃO DA MASSA TOTAL EXTRAÍDA EM RELAÇÃO A MASSA DE SOLVENTE (CO ₂) EMPREGADA NA EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA A 50 °C E ETANOL COMO CO-SOLVENTE NAS PROPORÇÕES DE 5 E 15 %..... | 112 |
| FIGURA 4.14. CURVAS DE EXTRAÇÃO DA MASSA TOTAL EXTRAÍDA EM RELAÇÃO A MASSA DE SOLVENTE (CO ₂) EMPREGADA NA EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA A 20 °C E 50 °C, ETANOL COMO CO-SOLVENTE NAS PROPORÇÕES DE 5 E 10 %..... | 113 |
| FIGURA 4.15. CURVAS DE EXTRAÇÃO DA MASSA TOTAL EXTRAÍDA EM RELAÇÃO A MASSA DE SOLVENTE (CO ₂) EMPREGADA NA EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA A 20 °C E 50 °C, ETANOL COMO CO-SOLVENTE NAS PROPORÇÕES DE 10 E 15 %..... | 114 |
| FIGURA 4.16. COMPARAÇÃO ENTRE AS CURVAS DE EXTRAÇÃO OBTIDAS A PARTIR DA PRÓPOLIS BRUTA EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE TEMPERATURA, PRESSÃO E ADIÇÃO DE CO-SOLVENTE. | 123 |
| FIGURA 4.17. CURVAS DE EXTRAÇÃO DA MASSA TOTAL EXTRAÍDA EM RELAÇÃO A MASSA DE SOLVENTE (CO ₂) EMPREGADA NA EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA A 20 °C E 50 °C, 150 E 250 BAR DE PRESSÃO. | 124 |
| FIGURA 4.18. GRÁFICO DOS ESCORES: PC1 X PC2, REPRESENTANDO AS ANÁLISES DAS AMOSTRAS SUBMETIDAS A DIFERENTES TIPOS DE EXTRAÇÃO. | 139 |
| FIGURA 4.19. GRÁFICO DOS LOADING: PC1 X PC2, ONDE PODE SER VISUALIZADA AS VARIÁVEIS QUE CONTRIBUEM PARA A SEPARAÇÃO DAS AMOSTRAS NA FIGURA 4.17. | 140 |

NOMENCLATURA/ABREVIações

AA: atividade antioxidante

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

b.s.: base seca

C. albicans: *Candida albicans*

CAF: ácido cafeico

CAPE: fenil éster do ácido cafeico

CER: constant extraction rate (período de taxa constante de extração)

CG: cromatografia gasosa

CG/EM: cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

CO₂: dióxido de carbono

CO₂-SC: dióxido de carbono em estado supercrítico

DC: diffusion controlled rate period (período de taxa de controle por difusão)

DCBEN: ácido 2,2-dimetil-6-carboxietil-2h-benzopirano

DHCA: ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepillin C)

DPB: ácido 6-propenóico-2,2-dimetil-8-prenil-2h-benzopirano

DPPH: radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

E. coli: *Escherichia coli*

ED₅₀: concentração eficiente que elimina 50 % dos radicais livres

EEP: extrato etanólico de própolis

EEPS: extrato etanólico de própolis seco

EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

ESI(-)-MS: electrospray ionization mass and tandem mass spectrometry in the negative ion mode (ionização por eletrospray acoplado a espectrometria de massas em modo negativo)

FER: falling extraction rate period (período de taxa decrescente de extração)

HCA: hierarchical cluster analysis (análise de agrupamento hierárquico)

HPLC: High Performance Liquid Chromatography (cromatografia líquida de alta eficiência)

[M-H]⁻: molécula desprotonada

OEC: overall extraction curve (curva global de extração)

P_C: pressão crítica

PCA: principal component analysis (análise de componente principais)

P-CUM: ácido *p*-cumárico

PHCA: ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico

S. aureus: *Staphylococcus aureus*

SFE: supercritical fluid extraction (extração com fluido supercrítico)

T_C: temperatura crítica

X_O: rendimento global de extração

Y^{*}: solubilidade

$\frac{dM_{\text{solute}}}{dM_{\text{CO}_2}}$: derivada da curva de extração no período de taxa constante

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 Introdução

Própolis é um material multifuncional usado pelas abelhas na construção e manutenção da colméia. A sua composição química é bastante complexa e suas propriedades farmacológicas são estudadas há muito tempo.

Própolis é usualmente dissolvida em etanol ou em mistura etanol/água e filtrada para remover material insolúvel, tais como graxas e detritos da colméia, obtendo como resultado um extrato alcoólico de própolis, este processo favorece o aumento da concentração de flavonóides em relação ao material bruto. A composição do extrato resultante depende da localização da colméia, das fontes disponíveis de busca das abelhas, do país de origem, estação do ano e da razão etanol/água usada na extração (CATCHPOLE et al., 2004).

Em 1991, no “50th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association”, o Instituto Nacional de Doenças Infecciosas do Japão anunciou a descoberta de três agentes anticâncer na forma de diterpenos na própolis, levando com isso a um “boom” da própolis no Japão. Atualmente no Japão, os produtos de própolis são obtidos a partir do extrato alcoólico, do extrato álcool/água e também por métodos de extração supercrítica e são produzidos basicamente a partir de matéria-prima proveniente do Brasil (JAFRA, 2007).

O interesse global de pesquisas em própolis tem duas justificativas: a primeira devido a suas características de panacéia, como por exemplo: uso como anestésico e no tratamento dermatológico, como antibiótico, antifúngico e antitumoral, dentre outras. A segunda é devido a seu alto valor agregado, pelo

qual um frasco do extrato alcoólico que é vendido no Brasil por cerca de 5 a 10 reais, chega a custar 150 dólares em Tóquio. Este alto valor agregado em Tóquio pode justificar em parte o interesse dos japoneses na própolis, principalmente a de origem brasileira (sendo hoje a terceira maior produção mundial, perdendo apenas para a China e a Rússia). Embora produza de 10 a 15 % da produção mundial, o Brasil atende a cerca de 80 % da demanda japonesa. Dois pontos se destacam na preferência dos japoneses pela própolis brasileira (obviamente além das propriedades farmacológicas): o primeiro em relação a suas características sensoriais e em segundo devido a menor teor de metais pesados e demais poluentes ambientais (PEREIRA et al., 2002).

Recentemente, alguns trabalhos apresentados na literatura, empregaram o poder anti-solvente do dióxido de carbono para fracionar os componentes do extrato alcoólico de própolis com o objetivo de obter frações especiais ricas em componentes de interesse. Os flavonóides e derivados do ácido cinâmico são polares e tem solubilidade muito baixa em dióxido de carbono supercrítico, enquanto que a mistura CO₂ + etanol é um bom solvente (CATCHPOLE et al., 2004). O processo consiste em adicionar o CO₂ supercrítico no extrato alcoólico, diminuindo a solubilidade dos solutos de interesse, precipitando-os em função da diminuição de solubilidade e em função das variáveis de processo. Uma patente chinesa (WU e LUYU, 2000) relata extração sequencial de própolis a partir de extrato alcoólico. Além desta aplicação, de grande interesse comercial, a propriedade anti-solvente do CO₂ é muito empregada na indústria farmacêutica para produção de micro e nano partículas e ainda para microencapsulação de princípios ativos. Neste sentido, Mishima et al. (1997) apresentam trabalhos no qual encapsulam flavona e 3-hidroxiflavona em polímeros usando o dióxido de carbono supercrítico.

Os processos de separação envolvendo o dióxido de carbono supercrítico, vêm resolver alguns problemas das indústrias de processamento, pois são

processos alternativos que podem minimizar o impacto ambiental, pela diminuição de resíduos tóxicos e pelo melhor aproveitamento dos sub-produtos. O CO₂ é inerte, não tóxico, de baixo custo, tornando-o ideal para uso em alimentos. O produto final obtido por este processo é isento de resíduos de solventes orgânicos e atende às restrições impostas pelos órgãos de saúde. Além de possuir excelente qualidade, possui também a vantagem de sua temperatura crítica (31,2 °C) ser relativamente baixa, facilitando o uso de temperaturas não elevadas em condições supercríticas em processos envolvendo materiais termolábeis. Por fim, como o dióxido de carbono é um gás nas condições ambientes, sua separação é simples, podendo ser realizada reduzindo a pressão às condições normais.

Baseando-se no fato de que a própolis é um produto de alto valor no mercado internacional e o Brasil possui um grande potencial para a sua produção, já que sua própolis apresenta excelente qualidade (considerada hoje a melhor do mundo), verificou-se a possibilidade de usar o CO₂ supercrítico para fracionar própolis. A técnica empregando a propriedade anti-solvente do CO₂ para o fracionamento da própolis já é realidade no Japão (JAFRA, 2007), produzindo assim um produto diferenciado de altíssimo valor agregado.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivos gerais

Avaliar o processo de extração supercrítica de compostos presentes na própolis verde, utilizando CO₂ como solvente supercrítico, com/sem adição de co-solvente em relação ao rendimento global de extração, composição química frente a quatro marcadores selecionados e atividade antimicrobiana.

1.2.2 Objetivos específicos

Este trabalho teve como objetivos:

- Obtenção do extrato etanólico de própolis, avaliando o rendimento da extração e a composição química frente a quatro compostos fenólicos previamente selecionados, dentre os quais três ácidos cinâmicos: ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepillin C ou DHCA), ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico (PHCA), ácido 4-hidroxicinâmico (*p*-cumárico) e um flavonóide: 4'-metoxi-3,5,7-triidroxiflavona (canferide);
- Realizar extrações com CO₂ sub e supercrítico a partir do extrato etanólico de própolis seco (EEPS) e da própolis bruta para a obtenção de dados experimentais de fracionamento. Obter a sua respectiva composição em função das variáveis de processo: temperatura de 20, 35 e 50 °C; pressão de 150, 200 e 250 bar e uso de etanol como co-solvente nas proporções de 5 %, 10 % e 15 %;
- Identificar e quantificar nas frações obtidas, alguns compostos de interesse por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) frente aos marcadores: Artepillin C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico) (DHCA), ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico (PHCA), ácido *p*-cumárico e canferide;
- Medir a atividade antioxidante (AA) do extrato etanólico de própolis e dos extratos obtidos via tecnologia supercrítica através do sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH);
- Medir a atividade antimicrobiana *in vitro* contra três microorganismos patogênicos, sendo um Gram positivo: *Staphylococcus aureus*, um Gram negativo: *Escherichia coli* e uma levedura: *Candida albicans*.

CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Própolis

Própolis (CAS N° 9009-62-5) é o nome genérico de uma substância resinosa, de coloração e consistência variada, coletada pelas abelhas das diversas partes da planta, como broto, botões florais e exsudados resinosos (KOO e PARK, 1996). O termo 'própolis' foi usado por autores na antiga Grécia onde *pro* significa "em defesa de" e *polis* "cidade", isto é, em defesa da cidade ou colméia (MARCUCCI, 1996; BURDOCK, 1998). As abelhas de fato usam esta substância para protegê-las contra insetos e microorganismos, empregando-a em finas camadas nas paredes internas das colméias, para vedar buracos e rachaduras, reparar e fortalecer os favos de mel, proteger a entrada da colméia, no preparo de locais assépticos para a postura da abelha rainha e na mumificação de insetos invasores (BANKOVA et al., 2000). Costuma-se encontrar na colméia pequenos animais ou parte deles envoltos em própolis, em perfeito estado de conservação, já que à própolis é também atribuída ação antimicrobiana, o que impede a decomposição do cadáver (MARCUCCI, 1996; PARK et al., 1998a). Há evidências da utilização da própolis desde 300 A. C.; como por exemplo, no Antigo Egito, onde a própolis era utilizada para embalsamar mortos, como medicamento e antisséptico. Na Itália, no século XVII, foi usada em vernizes, especialmente para violinos (GHISALBERTI, 1979).

Na Figura 2.1 é apresentado um desenho esquemático sobre utilização da própolis pelas abelhas (APICULTURA, 2006).

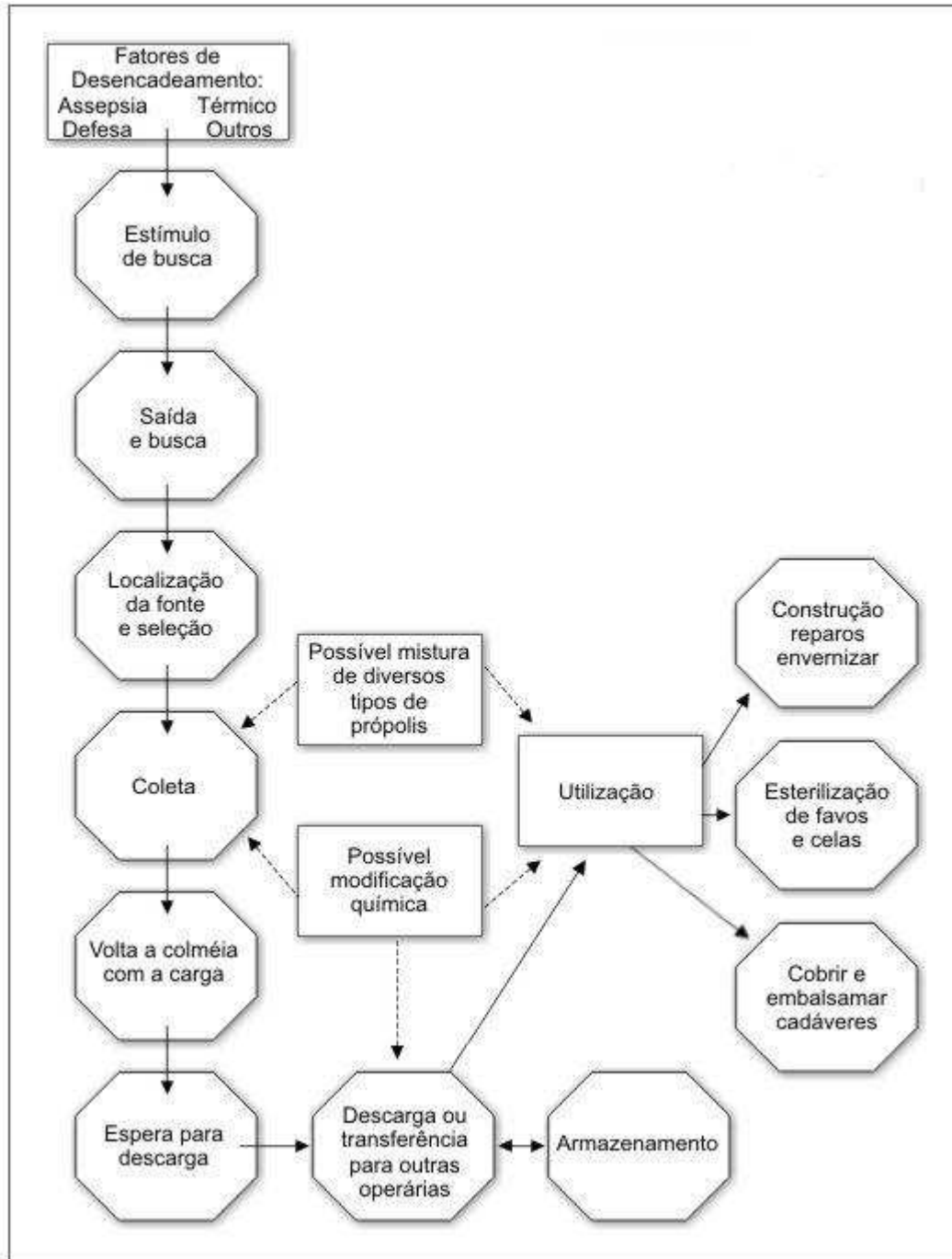


Figura 2.1. Desenho esquemático da utilização da própolis pelas abelhas.

A coloração da própolis é dependente de sua procedência, pode variar do marrom escuro passando a uma tonalidade esverdeada até o marrom avermelhado, dependendo do seu tipo e idade. Possui um odor característico que pode variar de intensidade, de acordo com a amostra. O ponto de fusão é variável entre 60 - 70 °C sendo que pode atingir em alguns casos até 100 °C (MARCUCCI, 1996). É uma substância rígida, porém quebradiça quando fria e que se torna dúctil e maleável quando aquecida. Sua remoção da pele humana é difícil, pois pode interagir fortemente com óleos e proteína da pele (BURDOCK, 1998).

Durante a coleta, as abelhas misturam a cera e a própolis coletada juntamente com a enzima 13-glicosidase presente em suas salivas, acarretando a hidrólise dos flavonóides glicosilados até suas respectivas agliconas (PARK et al., 1997). A Figura 2.2 apresenta uma fotografia de própolis de origem brasileira (APICULTURA, 2006).



Figura 2.2. Fotografia de uma amostra de um tipo de própolis de origem brasileira.

König (1994) relatou as fontes vegetais da própolis de diversas regiões. Segundo o autor, na Europa a principal fonte vegetal para a própolis são as árvores da família das Salicaceas, particularmente do gênero *Populus*

(popularmente conhecida como “álamo”). Nos Estados Unidos, além dos “álamos”, os pinheiros de modo geral são importantes fontes para a própolis. Na Austrália, os eucaliptos são fontes vegetais importantes, sendo que na região Ocidental, as plantas da espécie *Xanthorrhoea presii* e *Xanthorrhoea australis* são as fontes vegetais predominantes da própolis. De acordo com Park et al. (2002), a *Baccharis dracunculifolia* DC. (compositae) é a fonte botânica da própolis originária do sudoeste do Brasil. Este tipo de própolis é caracterizada pela predominância de ácidos fenólicos, especialmente prenilados derivados do ácido *p*-cumárico (MARCUCCI e BANKOVA, 1999; PEREIRA et al., 2002).

Bankova et al. (1998) estudaram os botões florais de árvores de *Populus nigra*, *Populus itálica* e de própolis da Bulgária e isolaram dois ésteres do ácido cafeico e dois ésteres do ácido ferúlico. Os autores confirmaram a hipótese da origem vegetal da própolis da Bulgária pela sua relação com os botões das famílias das salicáceas, principalmente *Populus nigra*.

Nos estudos de identificação da origem botânica, a composição química da própolis comparada com a composição da provável fonte vegetal tem se mostrado um dos melhores indicadores da origem da própolis (GHISALBERTI, 1979).

Bankova et al. (1999) investigaram, utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), própolis e secreções de três espécies de plantas, *Baccharis dracunculifolia*, *Araucaria angustifolia* e *Eucalyptus citriodora*, que são comumente mencionadas como as prováveis fontes botânicas de própolis. Baseado nas evidências químicas, os autores relataram que *B. dracunculifolia* mostrou ser uma das fontes de própolis no estado de São Paulo.

Bankova et al. (1998) investigaram por CG e CG-EM a variação sazonal na composição química de própolis brasileira coletada por duas subespécies de abelhas, *Apis mellifera* africanizada e *Apis mellifera* ligustica européia. Os principais componentes das amostras foram os compostos fenólicos,

especialmente os derivados de ácido cinâmico. Houve exceção para as amostras de outono de *Apis mellifera* *lingustica*, onde os diterpenos predominaram. Nas própolis de ambas as subespécies, os diterpenos apareceram no verão e atingiram a porcentagem máxima no outono, mas estiveram ausentes durante as outras estações. Os autores concluíram que ambas as subespécies de abelhas coletam própolis do mesmo grupo de plantas e existem pelo menos duas fontes vegetais importantes que no entanto, ainda não foram identificadas.

2.2 Histórico

Um dos muitos produtos naturais utilizados durante séculos pela humanidade tem sido a própolis, a qual é administrada sob diversas formas. Seu emprego já era descrito pelos assírios, gregos, romanos, incas e egípcios. No Egito antigo (1700 A. C.; “cera negra”) era utilizada como um dos materiais para embalsamar os mortos (PEREIRA et al., 2002).

Os gregos, entre os quais Hipócrates, a adotaram como cicatrizante interno e externo. Plínio, historiador romano, refere-se à própolis como medicamento capaz de reduzir inchaços e aliviar dores, enquanto a elite feminina da época utilizava esta multi-droga no alívio da síndrome pré-menstrual e de cólicas. Para médicos europeus dos séculos XVI em diante, particularmente russos e poloneses, a própolis encontrou emprego como antibacteriano, tuberculostático e agente dermatológico antieczematoso e antiacne. Na odontologia era empregada no tratamento de abscessos e gengivas hemorrágicas, bem como nos casos de candidíases bucais e halitoses. A própolis também é encontrada nos receituários chineses antigos como medicamento ativo contra moléstias coronárias e hipertensão (supondo-se atividade hipolipêmica) e disfunções hematológicas (NOTHENBERG, 1997).

O termo própolis já era descrito no século XVI na França. Na África do Sul, na guerra, ao final do século XIX, foi amplamente utilizada devido às suas propriedades cicatrizantes e, na segunda guerra mundial, foi empregada em várias clínicas soviéticas. Na antiga URSS, a própolis mereceu especial atenção na medicina humana e veterinária, com aplicações inclusive no tratamento da tuberculose, observando-se a regressão dos problemas pulmonares e recuperação do apetite (PEREIRA et al., 2002).

Em 1908 surgiu o primeiro trabalho científico sobre suas propriedades químicas e composição, indexado no Chemical Abstracts (referência nº 192). Em 1968 surgiu no Chemical Abstracts o resumo da primeira patente utilizando a própolis (Romana, para a produção de loções para banho) (PEREIRA et al., 2002).

Anos atrás, famosos fabricantes de violinos na Itália, incluindo *Stradivarius*, usavam a própolis como um ingrediente na composição de vernizes. Foi descrita a coloração especial de alguns violinos feitos por antigos mestres de Cremona devido ao uso de própolis nos polidores e vernizes (MARCUCCI, 1996; BURDOCK, 1998). Hoje em dia ainda é utilizada na resina de instrumentos com cordas e para o reparo de acordeões (BURDOCK, 1998).

2.3 Publicações

Historicamente o primeiro trabalho (indexado pelo Chemical Abstracts) sobre a própolis foi publicado 10 anos depois que o professor Heinrich Dresser da Bayer, proclamou o surgimento de uma milagrosa droga batizada como heroína, 5 anos depois do surgimento do primeiro barbitúrico e 14 anos antes do descobrimento da vitamina D, por McCollum e colaboradores, no óleo de fígado

de bacalhau (que evitaria o raquitismo), isolada na Alemanha por Windaus. (PEREIRA et al., 2002).

Em pouco mais de 90 anos, o número de trabalhos publicados citados no Chemical Abstracts totaliza 450, oriundos de 39 países (dos cinco continentes), além de 239 patentes (PEREIRA et al., 2002). Houve um crescimento quase exponencial do número total de publicações sobre a própolis. Os principais países em número de publicações no assunto tiveram um aumento substancial nas décadas de 80 e 90: entre 40 % (Itália de 5 para 7 trabalhos publicados) e 660 % (Japão de 5 para 38 trabalhos publicados) (PEREIRA et al., 2002).

O interesse dos japoneses pela própolis é traduzido no número de publicações. Em 1987 surgiram as três primeiras publicações japonesas; coincidentemente, todas revisando em japonês as suas propriedades, principalmente as biológicas. O Japão responde por cerca de 10 % do total de trabalhos publicados (PEREIRA et al., 2002).

No Brasil a primeira publicação sobre a própolis, em 1984, apresenta um estudo comparativo do efeito da própolis e antibióticos na inibição de *Staphylococcus aureus*. A própolis brasileira estudada apresentou mais atividade antimicrobiana do que vários antibióticos testados. Apesar da posição de destaque na produção e comércio da própolis, e de possuir a quinta maior produtividade científica no assunto (cerca de 6 % do total de trabalhos publicados, cerca de 27 artigos), a atividade de pesquisa no Brasil não reflete em número, nem em conteúdo, o interesse internacional que a própolis brasileira possui, principalmente para os japoneses (PEREIRA et al., 2002).

2.4 Patentes

Uma verdadeira "febre" de patentes sobre própolis vem sendo observada. Desde a primeira patente (romena) em 1965, até 1999 já foram depositadas aproximadamente 239 patentes. Até o final da década de 80, as patentes eram dominadas pela antiga URSS (Rússia e seus países satélites), principalmente a Romênia. Hoje 43 % de todas as patentes depositadas são japonesas, sendo que a primeira patente japonesa surgiu em 1987 (sobre o uso da própolis no controle de odores). Em relação ao Brasil, a primeira patente surgiu somente em 1995 para o uso em tratamento odontológico, na prevenção de cáries e gengivites. Até 1999, o Brasil possuía somente três patentes (menos de 2 % de todas as patentes depositadas) (PEREIRA et al., 2002).

Quinze patentes, 6,2 % do total depositado até o começo de 1999, se referem ao uso da própolis em tratamentos odontológicos. Essa é uma das aplicações da própolis mais estudada em todo mundo, tendo relatos científicos desde 1952 (PEREIRA et al., 2002).

O reduzido número de patentes brasileiras em relação aos trabalhos publicados (3 patentes/27 trabalhos), reflete infelizmente o fato da universidade brasileira não ter o hábito ou incentivos e mecanismos para proteger suas atividades de pesquisa por meio de patentes. O oposto ocorre no Japão, onde foram depositadas 98 patentes, mais do dobro do número de trabalhos publicados, aproximadamente 43, no mesmo período, incluindo patentes sobre a aplicação de compostos isolados inicialmente da própolis brasileira (PEREIRA et al., 2002).

2.5 Importância econômica

O mercado brasileiro de produtos apícolas está avaliado atualmente em US\$ 360 milhões anuais. As pesquisas demonstram um potencial de curto prazo para mais de US\$ 1 bilhão anual (UNIFLORA, 2007). Estudos sobre a produção apícola no Brasil mostram dados contraditórios quanto ao número de apicultores e colméias, produção e produtividade. Quanto aos apicultores, as pesquisas apontam os extremos entre 26.315 e 300.000; esses produtores juntos possuem entre 1.315.790 e 2.500.000 colméias e um faturamento anual entre R\$ 84.740.000,00 e R\$ 506.250.000,00 (EMBRAPA, 2007). Os dados conflitantes refletem a dificuldade em se obter informações precisas quanto à produção e comercialização no setor agropecuário; entretanto, conseguem passar a idéia da importância dessa atividade para o país (EMBRAPA, 2007).

De maneira similar a outros países, este mercado tem crescido em função da procura por produtos naturais de alta qualidade e, principalmente, por produtos que atendam aos anseios específicos do consumidor. A nível internacional, somente o Japão movimentava anualmente US\$ 300 milhões com a própolis. As estimativas de consumo de produtos apícolas para a União Européia são de US\$ 12 bilhões anuais (UNIFLORA, 2007).

O interesse global de pesquisas em própolis tem duas justificativas: a primeira devido a suas características de panacéia (várias atividades biológicas). De certa maneira essas características também atrapalham sua aceitação, já que os médicos e outros profissionais tendem a desconfiar de sua eficácia devido a lhe serem atribuídas dezenas de atividades biológicas simultaneamente. A segunda é devida ao seu alto valor agregado, já que um frasco do extrato alcoólico é vendido no Brasil por cerca de 5 a 10 reais, mas chega a custar 150 dólares em Tóquio (NOTHENBERG, 1997; PEREIRA et al., 2002). Este alto valor agregado em

Tóquio pode justificar em parte o interesse dos japoneses na própolis, principalmente a brasileira (sendo hoje a terceira maior produção mundial, perdendo apenas para a Rússia e a China). Embora produza de 10 a 15 % da produção mundial, o Brasil atende a cerca de 80 % da demanda japonesa. Dados da Federação de Apicultores de Minas Gerais revelam que a própolis produzida no estado é considerada a melhor do mundo no mercado japonês, onde o quilograma do produto saltou de US\$ 5 para US\$ 200 nos últimos anos (PEREIRA et al., 2002).

Dois pontos se destacam na preferência japonesa pela própolis brasileira (obviamente além das propriedades farmacológicas): o primeiro graças as suas características sensoriais e em segundo devido ao menor teor de metais pesados e demais poluentes ambientais (NOTHENBERG, 1997; PEREIRA et al., 2002).

2.6 Composição química da própolis

A complexidade composicional da própolis, em termos químicos, foi pioneiramente revelada pela técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG/EM), o que permitiu a detecção de mais de 150 componentes (GREENAWAY et al., 1991). É considerada uma das misturas mais heterogêneas encontradas em fontes naturais, sendo que hoje mais de 300 constituintes já foram identificados e/ou caracterizados em diferentes amostras de própolis (BURDOCK, 1998). Geralmente a própolis é composta por aproximadamente 50 % de resinas, 30 % de ceras, 10 % de óleos essenciais e aromáticos, 5 % de pólen e 5 % de outros compostos orgânicos (PIETTA et al., 2002).

Os constituintes principais são os compostos fenólicos, a sua estrutura química é formada pelo anel benzênico com grupos hidroxilas associadas diretamente à estrutura cíclica (CROFT, 1998). Estas substâncias na própolis são representadas pelas agliconas de flavonóides, ácidos fenólicos e seus ésteres, os quais são responsáveis pela bioatividade contra vários microorganismos patogênicos (BANSKOTA et al., 1998; BURDOCK, 1998).

A presença destes diversos compostos fenólicos, principalmente os flavonóides, explicam, em parte, a grande variedade das propriedades terapêuticas relatadas por diversos pesquisadores. De fato, a aplicação médica da própolis aumentou o interesse na sua composição química e na sua origem (KOO e PARK, 1996; BANSKOTA et al., 2000b).

As diferenças na composição química da própolis promovem variação das propriedades biológicas e farmacológicas deste importante produto natural (PEREIRA et al., 2002). Este é possivelmente o maior problema para o uso da própolis em fitoterapia, tendo em vista que sua composição química varia com a flora da região (brotos, cascas, galhos, exudados resinosos e menos importante, botões florais) e época da colheita; com a técnica empregada, assim como com a espécie da abelha (no caso brasileiro também o grau de “africanização” da *Apis mellifera* pode influenciar a sua composição), conjunto este que exerce uma enorme importância nas propriedades físicas, químicas e biológicas. Vários trabalhos na literatura mostram a similaridade ou relacionam algumas substâncias naturais das plantas aos componentes encontrados na própolis. Somente no caso do Brasil são descritas propriedades biológicas e composição química distintas para diferentes amostras coletadas em diferentes partes do país. Essa variação é facilmente explicada pela grande biodiversidade brasileira, assim como, até certo ponto, a habilidade bioquímica das abelhas em alterar a composição nativa ou adicionar componentes próprios à própolis (PEREIRA et al., 2002).

O maior grupo de compostos isolados da própolis são os flavonóides, encontrados em todas as partes do reino vegetal, os quais, junto com os ácidos carboxílicos modificados, são componentes estratégicos na própolis, pois são responsáveis pela bioatividade contra vários microorganismos patogênicos (BURDOCK, 1998).

Uma menor variação da composição química da própolis é observada nas regiões temperadas do planeta, como por exemplo na Europa, onde seus principais compostos bioativos são os flavonóides (flavonas, flavonóis e flavanonas). A principal fonte botânica das zonas temperadas é exsudado de broto de espécies de *Populus (poplar)* e seus híbridos (GREENAWAY et al., 1991; BANKOVA et al., 1995; HEGAZI et al., 2000; BANKOVA et al., 2000; PEREIRA et al., 2002). Isso é verdade para a Europa, América do Norte e regiões não tropicais da Ásia e até na Nova Zelândia, onde espécies introduzidas de álamo são fontes botânicas para as abelhas (BANKOVA et al., 2000b).

As própolis de origem brasileiras são classificadas em 13 grupos conforme sua composição físico-química, que é diretamente relacionada com a planta utilizada pelas abelhas (DAUGSCH et al., 2006).

Existe uma grande controvérsia em relação ao teor de flavonóides nas amostras brasileiras (PEREIRA et al., 2002). Bankova et al. (1995) concluíram que a própolis de origem brasileira possuem baixa concentração de flavonóides e ésteres de ácidos fenólicos, possuindo altas concentrações de ácido dihidroxicinâmico, acetofenonas preniladas e alguns terpenóides específicos. Alguns autores sugerem que as fontes prováveis para a própolis brasileira podem ser principalmente *Baccharis spp.* (BANSKOTA et al., 1998) e *Araucária sp.* (BANKOVA et al., 1998; BANSKOTA et al., 1998). Aga et al. (1994) indicam os compostos prenilados como os maiores constituintes da própolis brasileira e relata

que a atividade antibacteriana destes compostos pode ser aumentada com o aumento do número de resíduos prenil, como citado por Marcucci et al. (2001).

Nas zonas temperadas do hemisfério norte, as abelhas coletam a própolis apenas no verão (incluindo final da primavera e começo do outono - cerca de quatro meses) e por isso as variações sazonais na composição da própolis são insignificantes. No Brasil, entretanto, a coleta de própolis se dá durante todo o ano, deste modo existe uma variação sazonal na sua composição. A diminuição em alguns componentes biologicamente ativos como os fenólicos são acompanhados pelo aumento de outros, por exemplo, ácidos diterpênicos. Deste modo pode-se esperar que algumas atividades biológicas, relacionadas a estes compostos, (antibacteriana, antifúngica) sejam similares em diferentes estações do ano (BANKOVA et al., 1998). Isto foi comprovado por Sforcin et al. (2000) que demonstraram não existir diferença estatisticamente significativa na atividade antimicrobiana da própolis coletada nas quatro estações do ano frente às cepas *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. A subespécie da abelha também tem determinada influência na composição quantitativa da própolis, porém o critério de escolha da fonte botânica pelas abelhas permanece incerto (BANKOVA et al., 1998).

Os tipos de compostos aromáticos e terpênicos encontrados na própolis possuem uma importância biológica que permitem a determinação das espécies vegetais visitadas pelas abelhas (MARCUCCI, 1996).

Os diferentes grupos de compostos da própolis foram descritos por Walker e Crane (1987); Greenaway et al. (1991); Marcucci (1995); Fontana et al. (2000); Bankova et al. (2000); Pereira et al. (2002) citado por Aldemann (2005) e são descritos abaixo:

- Hidrocarbonetos superiores (penta-, hexa-, nonacosanoshexanos);

- Álcoois (cinâmicos, fenetílico, prenílico, isobutenol, benzílico);
- Ácidos alifáticos (acético, angélico, butírico, fumárico, isobutírico, metilbutírico) e ésteres derivados (acetatos de isobutila, isopentila e isopentelina);
- Ácidos aromáticos (benzóico, cafeico, cinâmico, cumáricos (-*o*, -*m*, -*p*), ferúlico, gálico, salicílico, 3-4-dimetoxicinâmico, gentísico, hidroxicinâmico, isoferúlico, vanílico) e ésteres aromáticos derivados (acetato de benzila, benzoato de benzila, cafeato de benzila, cumarato de benzila, cafeato de fenil etila, ferulato de prenila, salicilato de benzila, cafeato de butenila, cafeato de butila, cafeato de cinamila, cafeato de butila, benzoato de etila, benzoato de metila, salicilato de metila; ésteres do ácido cafeico com álcoois graxos de cadeia longa - dodecanol, tetradecanol, tetradecenol, hexadecanol);
- Ácidos graxos superiores típicos de ceras (araquídico, behênico, cerótico, lignocérico) e usuais (palmítico, oléico, láurico, mirístico) e seus ésteres (hexacosilhexadecanoato);
- Aldeídos (benzaldeído, aldeído capróico, vanilina, isovanilina, *p*-hidroxibenzaldeído);
- Cetonas (acetofenona e seus derivados);
- Flavonas e flavonóis (acacetina, apigenina, apigenina-7-metil éster, crisina, galangina, galangina-3-metil éster, quercetina, canferol, tectocrisina, canferide; 3,7,4',5' tetrametil éter da quercetina);
- Flavonas (naringenina, pinobanksina, pinobanksina-3-acetato, pinobanksina-3-butilato, pinobanksina-3-metil éter, pinocembrina, pinostrobina);

- Chalconas e diidrochalconas (de alpinetina, naringenina, pinobanksina, pinobanksina-3-acetato, pinocebrina, pinostrombina);
- Terpenóides (farnesol, geraniol, cimeno, limoneno, estireno, naftaleno, β -bisabolol, 1,8-cineol, derivados de clerodane, derivados do labdane, β -amirin, sesquiterpenóides, ledol, spatulenol, germacren);
- Esteróides (acetatos de estigmasterol e calinasterol);
- Aminoácidos (alanina, β -alanina, ácido α -aminobutírico, ácido- δ -aminobutírico, arginina, asparagina, ácido aspártico, cistina, cisteína, ácido glutâmico, glicina, histidina, hidroxiprolina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, ornitina, fenilalanina, prolina, ácido piroglutâmico, sarcosina, triptofano, valina, serina, treonina, tirosina);
- Açúcares (*d*-ribofuranose, *d*-frutose, *d*-glucitol, *d*-glucose, talose, sacarose e xilitol, xilose, galactose, manose, ácido galacturônico, lactose, maltose, melibiose, eritritol, inositol);
- Lignanas (sesamina, aschantina, sesartenina, dihidrobenzofuran);
- Vitaminas (A, B1, B2, B6, C e E);
- Minerais (sódio, potássio, magnésio, bário, estrôncio, cádmio, chumbo, cobre, manganês, ferro, cálcio, vanádio, silício, alumínio, níquel, zinco, cromo, titânio, prata, molibdênio, cobalto).

Dezoito diferentes compostos têm sido identificados e quantificados de diferentes amostras de própolis do Sul e do Sudeste do Brasil, que incluem ácido cafeico e derivados, ácido *p*-cumárico e derivados, ácido ferúlico, pinobanksina, um derivado do kaemferol e cinco compostos fenólicos denominados: ácido 3-

prenil-4-hidroxicinâmico (PHCA), ácido 2,2-dimetil-6-carboxietil-2h-benzopirano (DCBEN), ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepillin C ou DHCA) e ácido 6-propenóico-2,2-dimetil-8-prenil-2h-1-benzopirano (DPB) (MARCUCCI et al., 2000).

Midorikawa et al. (2001) identificaram a presença de Artepillin C, ácido 4-hidroxi-3-prenilcinâmico, ácido *p*-cumárico e canferide em amostras de própolis brasileira. Park et al. (2004) identificaram flavonóides e outros compostos fenólicos em extratos etanólicos de própolis (EEP) e exudados resinosos de *Baccharis dracunculifolia*, tais como: ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido cinâmico, pinobaskina, kaemferol, crisina, canferide e Artepillin C (ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico) entre outras, estando presentes em maior quantidade Artepillin C (38,58 mg/g), canferide (12,57 mg/g) e ácido *p*-cumárico (10,67 mg/g).

Banskota et al. (1998) isolaram e identificaram 23 compostos em amostras de própolis do Brasil. Destes, um composto novo foi identificado como um derivado do cromano prenilado (3-hidroxi-2,2-dimetil-8-fenilcromano-6-ácido propenóico) (1). Os outros compostos, já conhecidos, foram identificados como: 2,2-dimetil-8-fenilcromeno-6-ácido propenóico) (2); 2,2-dimetilcromeno-6-ácido propenóico (3); 2,2-dimeticromeno-6-ácido carboxílico (4), Artepillin C (5); 4-dihidrocinaoiloxi-3-ácido fenilcinâmico (6); 4-hidroxi-3-ácido fenilcinâmico (7); vanilina (8); aldeído coniferil (9); ácido isocuprêssico (10); 15-acetoxiisocupressico ácido (11); ácido agático (12); ácido agático 15-metil éter (13); ácido agatálico (14); ácido cuprêssico (15); tremetona (16); viscidona (17); 12-acetoxiviscidona (18); betuletol (19); kamferide (20); ermenina (21); 3,5,7-trihidroxi-4-metoxiflavanol (22); e acetato coniferil dimérico (23). Os compostos 4, 7, 12, 19 e 22 foram isolados pela primeira vez em própolis.

Sawaya (2006) através da análise por ionização por eletrospray (IES) acoplado a espectrometria de massas (EM) relacionou a presença de algumas substâncias importantes em própolis provenientes de algumas regiões do Brasil e

de algumas plantas que são prováveis fontes de coleta pelas abelha (*Apis mellífera*). A Tabela 2.1 apresenta os compostos identificados por Sawaya (2006) em própolis do sul e do sudeste do Brasil.

Tabela 2.1. Compostos identificados de própolis de *A. mellífera* do sul e sudeste do Brasil.

| [M-H] ⁺ | Nome | Onde foi encontrado |
|--------------------|---|---------------------|
| 151 | Vanilina | D, F |
| 163 | Ácido <i>p</i> -cumárico | A,B,C,D,F |
| 177 | 3-metoxi-4-hidroxi-cinamaldeído | C |
| 179 | Ácido cafeico | A,C,D,F |
| 199 | Ácido 2,2-dimetil-2H-1-benzopirano-6-propenóico | B,C,F |
| 231 | Ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico | A,B,C,F |
| 231 | Ácido 3-[4-hidroxi-3-(oxo-butenil)-fenilacrilico] ou propol | A |
| 233 | Viscidona | D |
| 247 | Ácido 3,4-dihidroxi-5-prenilcinâmico | A,C,F |
| 253 | Crisina | D |
| 255 | Pinocebrina | D,F |
| 285 | Canferol | A,B |
| 297 | Ácido 2,2-dimetil-8-prenil-2H-1-benzopirano-6-propenóico | A,C,F |
| 299 | Canferida | A,B,C,F |
| 299 | Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepillin C) | A,B,C,F |
| 301 | Ácido E/Z comunico | D,E,F |
| 301 | Dihidrocanferida | A, B, C |
| 301 | Ácido 3-prenil-4-(2-metilpropionil-ox)-cinâmico | A |
| 315 | Ácido 4-hidroxi-3(E)-(4-hidroxi-3-metil-2-butenil)-5-prenil cinâmico | A, C, F |
| 315 | Ácido 3-hidroxi-2,2-dimetil-8-prenil-2H-1-benzopirano-6-propenóico | A, C, F |
| 317 | Ácido agático | D, E, F |
| 319 | Ácido isocuprêssico | D, E, F |
| 319 | Ácido cuprêssico | D, E, F |
| 329 | Betuletol | A, B, C, F |
| 333 | Ácido agático | D, E |
| 347 | 15 metil éster do ácido agático | D, E, F |
| 353 | Ácido cafeoilquínico | A, B, C |
| 361 | Ácido 15-acetoxi-cupressico | D, E, F |
| 363 | Ácido 3-prenil-4-dihidrocinaoiloxicinâmico | A, B, C, F |
| 447 | Ácido (E)-3-{4-hidroxi-3-[(E)-4-(2,3-dihidroxicinaoiloxi)-3-metil-2-butenil]-5-prenil-fenil}-2-propenóico | A, B, C, F |
| 515 | Ácido dicafeoilquínico | A, B, C, F |

A) Própolis verde do sudeste; B) *Baccharis dracunculifolia*; C) Própolis verde do Paraná; D) Própolis marrom do sul; E) *Araucária heterophylla* e F) Própolis mista do Paraná.

Alencar et al. (2005) e Park et al. (2004) compararam a composição química do extrato alcoólico do alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*) com a composição química do extrato alcoólico de própolis provenientes dos estados de São Paulo e Minas Gerais. Com base na composição obtida nos extratos, concluíram que as abelhas utilizam a resina vegetal das gemas vegetativas desta planta como principal fonte para a fabricação do tipo de própolis mais comum nestes Estados.

2.7 Propriedades biológicas da própolis

Muitas atividades biológicas da própolis têm sido reportadas, incluindo atividades antibacterianas (KUJUMGIEV et al., 1999), antifúngica (VALDÉS et al., 1987), antiviral (AMOROS et al., 1994), anticâncer (KIMOTO et al., 2001; MATSUNO, 1995) e atividade antiinflamatória (DOBROWOLSKI et al., 1991), entre outras. Estas atividades biológicas estão associadas aos compostos fenólicos, especialmente flavonóides e ácidos fenólicos (MARCUCCI et al., 2000; TAZAWA et al., 1999).

A caracterização de todas estas atividades biológicas associadas à tendência de utilização de produtos naturais tem resultado num aumento significativo da demanda de própolis e produtos contendo própolis, como extratos, comprimidos, cápsulas, nebulizações ou pós (MENEZES et al., 1997). A própolis também tem se destacado pela sua aplicabilidade nas indústrias de alimentos e cosméticos, sendo ingredientes em formulações de balas, chocolates, pasta de dente, xampus, creme para a pele, entre outras (MATSUDA, 1994).

2.7.1 Atividade antimicrobiana

O uso indiscriminado e prolongado de antimicrobianos químicos sintéticos têm levado à seleção de microorganismos patogênicos mutantes resistentes a esses compostos, tornando o uso de antimicrobianos de origem natural uma alternativa eficaz e econômica (CRISAN et al., 1995). O problema da resistência microbiana é crescente e a perspectiva de uso de drogas antimicrobianas no futuro é incerta. Portanto, devem ser tomadas atitudes que possam reduzir este problema como, por exemplo, controlar o uso de antibióticos, desenvolver pesquisas para melhor compreensão dos mecanismos genéticos de resistência e continuar o estudo de desenvolvimento de novas drogas, tanto sintéticas como naturais (NASCIMENTO et al., 2000).

Durante os últimos anos tem sido relatadas, *in vitro*, a atividade antimicrobiana da própolis que se deve aos flavonóides, ácidos aromáticos e ésteres presentes na resina natural. Os ácidos ferúlicos e cafeícos contribuem para a ação bactericida da própolis, além da galantina e pinocembrina. O mecanismo de atividade antimicrobiana é complexo e provavelmente baseado na inibição da RNA-polimerase bacteriana (BOSIO, 2000), podendo decorrer de um efeito sinérgico entre flavonóides, hidroxiácidos e sesquiterpenos (MARCUCCI, 1995). Todas as pesquisas realizadas em substâncias isoladas de própolis demonstraram que nenhum componente isolado tem uma atividade maior que o extrato total inicial (MARCUCCI, 1996; KUJUMGIEV et al., 1999).

Independente da origem da própolis, ela sempre possui atividade antibacteriana, especificamente contra bactérias Gram-positivas (LINDENFELSER, 1967), isto devido a uma parte significativa dos constituintes da própolis, principalmente fenóis (flavonóides, ácidos fenólicos e seus ésteres presentes na resina) (GHISALBERTI, 1979; BANKOVA et al., 1995; BURDOCK,

1998), entretanto a relação entre a estrutura e atividade antibacteriana dos constituintes da própolis não é conhecida.

Lindenfelser (1967) demonstrou a atividade antimicrobiana *in vitro* da própolis em 80 linhagens diferentes de microorganismos, sendo 39 bactérias, 39 fungos e 2 leveduras. O autor demonstrou que 25 das 39 linhagens de bactérias e 20 dos 39 fungos apresentaram inibição do crescimento em concentração menor que 100 µg/mL de própolis. As atividades demonstradas eram de modo geral bacteriostáticas ou fungistáticas, sendo que na maioria dos casos, concentrações ligeiramente maiores que 100 µg/mL apresentavam atividade bactericidas e fungicidas.

Aga et al. (1994) sugeriram que o Artepillin C é provavelmente um dos principais compostos antimicrobianos nas própolis de origem brasileira, em comparação com a própolis européia, em que fenólicos como a pinocembrina, galantina e ésteres de ácidos fenólicos são os responsáveis pela atividade antibacteriana.

Aga et al. (1994) avaliaram atividade antimicrobiana do ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico comparado com o ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico e ácido 4-hidroxicinâmico e concluíram que a atividade antimicrobiana desta classe de compostos pode ser incrementada pelo número de resíduos prenilados ligados, portanto, estes derivados prenilados do ácido cinâmico e ácidos diterpênicos presentes em própolis brasileira podem contribuir para a atividade antibacteriana destas própolis.

A atividade antimicrobiana *in vitro* da própolis foi verificada contra várias linhagens de bactérias Gram positivas: *Bacillus brevis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megatherium*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus subtilis*, *Cellulomas funi*, *Nocardia loberula*, *Micrococcus lysodeikticus*, *Sarcina lutea*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus faecalis* e Gram negativas:

Aerobacter aerogenes, *Alcaligenes sp.*, *Bordetella bronchiseptica*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia marcescens*. Verificou que de 39 linhagens de bactérias testadas, o crescimento de 25 delas foi inibido na presença de concentrações de própolis menores que 100 µg/mL (LINDENFELSER, 1967).

Grange e Davey (1990) observaram que os extratos etanólicos de própolis - EEP (3 mg de sólidos totais/mL) inibiram completamente o crescimento de *S. aureus* (inclusive MRSA), *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Branhamella catarrhalis* e *Bacillus cereus*, inibiram parcialmente o crescimento da *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, mas não tiveram efeito sobre *Klebsiella pneumoniae*, demonstrando então uma inibição preferencial sobre cocos em detrimento de bacilos Gram positivos. Além disso, evidenciaram que uma diluição 1:320 da amostra de própolis testada inibia totalmente a cepa *Mycobacterium tuberculosis*.

Fuentes e Hernandez (1990) relataram que extratos etanólicos de própolis (EEP) possuem uma atividade antimicrobiana pronunciada contra algumas bactérias, incluindo *S. aureus*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermis* e *Streptococcus sp* (β-hemolítico), como citado por Marcucci (1995). Menezes et al. (1997) também observaram que extratos etanólicos de própolis e preparações comerciais como tabletes, cápsulas e pós contendo própolis possuem ação frente à cepa *S. aureus*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus*. Marcucci et al. (2001) evidenciaram a inibição da cepa *Streptococcus faecalis* frente ao extrato metanólico de própolis.

Bankova et al. (1996) reportaram atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* de ácidos triterpenóicos de própolis brasileira, como o metil éster isocuprêssico foram os compostos mais ativos contra *S. aureus*. Miorin

et al. (2003) também demonstraram que a própolis brasileira possui alta atividade contra *S. aureus*.

Os resultados apresentados por Kujumgiev et al. (1999) provaram que apesar das grandes diferenças na composição química da própolis de diferentes regiões geográficas, todas as amostras exibiram atividade antibacteriana e antifúngica.

Os extratos de própolis podem potencializar o efeito de certos antibióticos. Ghisalberti (1979) verificou que a ação da biomicina, tetraciclina, neomicina, polimixia, penicilina e estreptomicina contra *S. aureus* e *E. coli* foi aumentada pela adição de própolis ao meio, e de acordo com Marcucci (1995) também prevenindo ou reduzindo qualquer tolerância aos mesmos. Em alguns casos o efeito bacteriostático teve um aumento de 10 a 100 vezes (GHISALBERTI, 1979; MARCUCCI, 1996).

2.7.2 Atividade antioxidante

Um antioxidante biológico é definido como “qualquer substância que, presente em baixas concentrações comparado ao substrato oxidável, reduz ou previne significativamente a oxidação deste substrato” (BENZIE et al., 1996). Os antioxidantes são compostos considerados capazes de retardar ou prevenir os processos de oxidação. De acordo com seu modo de ação, podem ser classificados como: sequestradores de radicais livres, quelantes de íons metálicos que catalisam a oxidação dos lipídeos, ou sequestradores de oxigênio. Os compostos polifenóis incluem-se principalmente na categoria de sequestradores de radicais livres, embora também possam ter ação antioxidante através de outros

mecanismos. A quercetina é um flavonóide que reúne as características de composto antioxidante natural mais potente (SÁNCHEZ-MORENO, 2002).

Vários métodos são utilizados para determinar a atividade antioxidante (AA) em extratos, porém um dos métodos mais utilizados consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), de coloração púrpura, que absorve no comprimento de onda entre 515 – 528 nm. Por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar (R^*), o DPPH é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com consequente desaparecimento da absorbância. A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres e/ou porcentagem de DPPH remanescente no meio reacional (BRAND-WILLIAMS et al., 1995; SÁNCHEZ-MORENO et al., 1998). A porcentagem de atividade antioxidante corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50 % é denominada concentração eficiente (ED_{50}), também chamada de concentração inibitória mínima.

As propriedades biológicas dos compostos fenólicos estão relacionadas com a atividade que cada fenol exerce sobre determinado meio. A atividade dos antioxidantes, por sua vez, depende de sua estrutura química, podendo ser determinada pela ação da molécula como agente redutor (velocidade de inativação do radical livre, reatividade com outros antioxidantes e potencial de quelatação dos metais) (RICE-EVANS et al., 1995).

O crescente interesse por alimentos naturais tem aumentado a demanda por antioxidantes naturais, que são produtos que tem origem não sintética e são capazes de prevenir ou retardar a oxidação de óleos e gorduras. Antioxidantes naturais na indústria de alimentos são importantes não apenas devido a sua

utilidade como método de prevenção da oxidação, mas também devido seus efeitos benéficos na saúde humana (IBAÑEZ et al., 2003).

Muitos autores relatam que algumas propriedades biológicas, principalmente a atividade antioxidante, em extratos etanólicos de própolis, se deve em parte ao seu alto conteúdo de flavonóides (MORENO et al., 2000; NAGAI et al., 2001). Apesar dos flavonóides serem considerados os antioxidantes mais abundantes e comuns em própolis, outros compostos fenólicos, como por exemplo o benzil cafeato, também apresentam atividade antioxidante (YAMAUCHI et al., 1992).

Banskota et al. (1998) estudaram os compostos químicos presentes na própolis de origem brasileira quanto a sua atividade antioxidante e indicaram que alguns compostos como por exemplo, os derivados do ácido cafeico, flavonóides, Artepillin C, entre outros compostos, devem possuir valores de ED₅₀ igual ou menor que 10 µg/mL para apresentar boa atividade biológica, ou seja, quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será sua ED₅₀ e maior a sua atividade antioxidante.

Park et al. (1998a, 1998b) determinaram que os extratos etanólicos de própolis preparados com 70 e 80 % de etanol apresentam maior atividade antioxidante em relação aos extratos obtidos com menor concentração de etanol. Nestas condições observou-se também uma maior extração de flavonóides.

Hayashi et al. (1999) isolaram um novo composto antioxidante e outros 11 compostos conhecidos de amostras de própolis brasileira. O novo composto foi determinado como sendo 3,4-dihidroxi-5-ácido prenilcinâmico (3-[3,4-dihidroxi-5-(3-metil-2-butenil) fenil]-2-(E)-ácido propenóico. Os autores verificaram que o composto isolado possui alta atividade antioxidante.

Banskota et al. (2000a) relataram que os extratos aquosos de própolis do Brasil e da China possuem atividade sequestradora de radicais livres contra o 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), maior que o extrato metanólico correspondente, enquanto extrato metanólicos de própolis da Suécia e Peru apresentam forte atividade sequestradora de radicais livres contra o DPPH. Moreno et al. (2000) mostraram que as própolis da Argentina possuem atividade sequestradora contra o DPPH o que justifica seu uso como uma fonte natural antioxidante.

Basnet et al. (1997) determinaram o efeito de extrato aquoso, extrato metanólico e extrato clorofórmico de própolis sobre o radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH). Os autores verificaram que o extrato aquoso de própolis apresentou atividade sequestrante do radical livre superior aos extratos metanólicos e de clorofórmio com valores de 62, 50 e 42 % respectivamente, a uma concentração de 10 µg/mL.

Shimizu et al. (2004) indicaram que o Artepillin C presente na própolis brasileira, procedente do estado de Minas Gerais, é um antioxidante biodisponível e que poderia ser utilizado em quimioprevenção de doenças degenerativas. Nakanishi et al. (2003) demonstraram a eficiente capacidade sequestrante dos radicais do Artepillin C, que é um dos principais compostos presentes na própolis brasileira, segundo Aga et al. (1994).

Hayashi et al. (1999), reportaram que derivados do ácido cinâmico de extratos etanólicos de própolis brasileiras são potentes antioxidantes. Os extratos metanólicos podem também possuir atividade sequestrante do DPPH radical livre devido a presença de flavonóides e derivados do ácido cinâmico.

2.7.3 Atividade antiinflamatória

Muitos estudos têm demonstrado que a própolis pode agir como potente agente antiinflamatório contra inflamação aguda e crônica. Similarmente, a galangina e o éster fenetil do ácido cafeico, compostos identificados como componentes majoritários da própolis, demonstraram inibição do desenvolvimento da inflamação induzida por uma ampla variedade de agentes patogênicos (BORRELLI et al., 2002).

A atividade antiinflamatória da própolis já é bastante reconhecida, principalmente contra doenças do sistema muscular-articular e outros tipos de inflamações, infecções, reumatismos e torções (MARCUCCI, 1996). Apesar do mecanismo exato de ações e os compostos principais responsáveis ainda não terem sido estabelecidos, as pesquisas têm se direcionado ao metabolismo do ácido araquidônico, já que as prostaglandinas possuem papel fundamental no processo inflamatório (ROSSI et al. 2002).

2.7.4 Atividade citotóxica da própolis

Kimoto et al. (1998) demonstraram que o Artepillin C ou DHCA (3,5-diprenil-4-ácido hidroxicinâmico) exibiu efeito citotóxico contra células malignas tanto “in vitro” como “in vivo”. O Artepillin C causou citotoxicidade em tumores sólidos e em células leucêmicas. Matsuno et al. (1997) reportaram que o Artepillin C (DHCA) é um dos compostos presentes na própolis brasileira com efeito anti-tumoral.

Grumberger et al. (1988) isolaram e caracterizaram um composto biologicamente ativo, com atividade citostática conhecido como CAPE (fenil éster

do ácido cafeico). Os autores observaram diferentes citotoxicidades do CAPE com relação as células normais e células transformadas de melanomas de humanos e ratos.

Banskota et al. (2000b) isolaram dois novos compostos derivados de extratos metanólicos de própolis de origem brasileira, os quais foram identificados como: (E)-3-[2,3-dihidro-2-(1-metiletênil)-7-prenil-5-benzofuranil]-2-ácido propenóico e (E)-3-{4-hidroxi-3-[(E)-4-(2,3-dihidrocina-namoiloxi)-3-metil-2-butenil]-5-prenilfenil}-2-ácido propenóico, ambos os compostos exibiram suave citotoxicidade para o câncer de fígado e células do fibrosarcoma humano HT-1080.

2.7.5 Outras atividades biológicas da própolis

Dimov et al. (1991) relataram que o extrato aquoso de própolis da Bulgária possui atividade imunoestimulatória no caso de infecções induzidas por *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Candida albicans* estimulando os macrófagos a produzir interleucina (IL-1). Ivanovska et al. (1995) observaram que a fração solúvel em água da própolis tem atividade imunomoduladora *in vivo* ativando o sistema complemento dependendo da via administrada, sendo efetiva apenas por via intravenosa e intraperitonal e não por via oral.

Cizmarik e Lahitova (1998) avaliaram o efeito protetor da própolis contra os agentes mutagênicos nitrovin e nitrosoguanidina. Os autores observaram uma redução da mutagenicidade desses compostos sobre as linhagens de *Salmonella typhimurium* TA 97 e TA 100 em torno de 50 e 60 %, respectivamente.

Marcucci et al. (2001) evidenciaram que o extrato metanólico da própolis induz um efeito relaxante na traquéia isolada de porcos da Índia. A própolis

demonstrou também promover a regeneração de ossos, cartilagem e polpa dentária e estimular a formação de colágeno (ACKERMANN, 1991). É utilizada também no tratamento de reumatismo e em odontologia, onde é considerado um anestésico local cinco vezes mais efetivo do que a cocaína (BURDOCK, 1998) e superior a procaína. Este efeito é atribuído aos flavonóides similares a pinocembrina e derivados de ácidos fenolcarboxílicos (FONTANA et al., 2004). Também são conhecidas as suas propriedades anti-sépticas, adstringentes, hipotensivas e espasmolítica (BURDOCK, 1998; MARCUCCI, 1996).

Muitas outras propriedades biológicas e farmacêuticas da própolis foram relatadas, dentre elas: propriedades imunogênicas, ação desintoxicante do fígado, atividade antiúlcera *in vitro*, anticáries em ratos, ação imunomoduladora por funcionar como adjuvante na imunização do toxóide tetânico (MARCUCI, 1996), agente protetor contra radiações gama, antileishmaniose em hamster, inibidor da atividade da dihidrofolato redutase (MARCUCI, 1995), efeito de cicatrização de feridas e reparo tissular, agindo em dermatites devido aos ácidos alil-cafeicos e no tratamento de varicose crônica trófica (FONTANA et al., 2004).

2.8 Toxicidade e alergia

Apesar de a metodologia de extração da própolis ainda permanecer sem padronização, pode-se afirmar por vários estudos que extratos de própolis possuem uma baixa toxicidade inata. Estes resultados já eram esperados já que os flavonóides, principais constituintes da própolis, possuem uma toxicidade relativamente baixa (BURDOCK, 1998).

Foram verificados que soluções de própolis até 20 % em acetona não foram irritantes em porcos da Índia e extratos de própolis aplicados puros e em pomadas

não foram irritantes em coelhos. Outros experimentos demonstraram que extratos alcoólicos de própolis (1875 a 2470 mg/Kg/dia) administrados na água de ratos e cobaias por 30 ou 60 dias não demonstraram alterações na aparência clínica, comportamento, peso e mortalidade dos ratos (cobaias) (BURDOCK, 1998).

Como um resultado da ampla utilização de própolis, vários relatos de reações alérgicas já foram descritos, para praticamente todas as partes do corpo (MARCUCCI, 1995; BURDOCK, 1998). As partes do corpo afetadas incluem, dentre outras, as mãos, braços, rosto, pescoço, região perioral, pés, pálpebra, orelha, vulva e pênis (BURDOCK, 1998).

Alguns autores relataram que os constituintes dos brotos de álamo são os possíveis responsáveis pelas alergias à própolis, principalmente derivados do ácido cafeico (BURDOCK, 1998). O flavonóide tectocrisina foi considerado um segundo alérgeno, mas com atividade muito fraca. Além disso, foram observadas as propriedades alérgicas dos ésteres fenéticos e prenílicos do ácido cafeico (MARCUCCI, 1995).

2.9 Aplicações

A longa história do homem em domesticar abelhas levou à exploração dos produtos apícolas. As várias propriedades favoráveis da própolis, tanto pura quanto refinada, tem sido exploradas para sua aplicação em vários propósitos humanos (BURDOCK, 1998). A própolis tem sido usada desde a antiguidade para propósitos farmacêuticos e seu uso continua hoje em dia em remédios caseiros e produtos pessoais (BURDOCK, 1998; KUJUMGIEV et al., 1999). Muitos países europeus estão interessados em produtos naturais para tratar doenças e a própolis é um importante produto utilizado com este propósito (MARCUCCI, 1995).

A lista de preparações e usos da própolis é quase interminável (BURDOCK, 1998). Estas aplicações incluem produtos dermatológicos de venda livre que são tidos como úteis na cicatrização de feridas, regeneração de tecidos, tratamento de queimaduras, neurodermatites, psoríase, úlceras nas pernas, herpes simples e genital e atividade contra dermatófitos. Utilizada em dentifrícios e preparações bucais para o tratamento de gengivites, estomatites, quelites e na pós-extração dentária (MARCUCCI, 1996; BURDOCK, 1998). Aparece como constituintes de “bio-cosméticos” em cremes e loções para a face. Ainda que os europeus utilizem mais produtos contendo própolis do que os americanos, a própolis é vendida na América em lojas de alimentos saudáveis em cápsulas (aproximadamente 50 mg/cápsula) e é utilizada em pasta de dente e fio dental (BURDOCK, 1998). Além disso, a própolis também é encontrada em chocolates (ACKERMANN, 1991).

2.10 Legislação

Para regulamentar o produto apícola foi criada a Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001 que no anexo VI regulamenta os padrões para fixação de identidade e qualidade de própolis e o anexo VII regulamenta a identidade e qualidade de extratos de própolis, proveniente da extração dos componentes solúveis em álcool neutro (BRASIL, 2001).

O anexo VI determina que a própolis será classificada quanto ao teor de flavonóides em: baixo quando o teor for até 1,0 % (m/m); médio quando o teor for maior que 1,0 e até 2,0 % (m/m) e alto quando o teor for maior que 2,0 % (m/m). Além disso, dispõe sobre requisitos de identidade como aroma, cor, sabor, consistência. Características físico-químicas como teor máximo de cera (25 % m/m), teor mínimo de compostos fenólicos (5 % m/m), teor mínimo de flavonóides

(0,5 % m/m), provas qualitativas como picos característicos de flavonóides entre 200 e 400 nm no espectro de absorção de radiações ultravioleta e visível, não autorização de uso de aditivos, critérios macroscópicos e microscópicos, dentre outros (BRASIL, 2001).

Quanto aos requisitos para se estabelecer a identidade e qualidade de extratos de própolis o anexo VII determina características sensoriais como aroma, cor, sabor, aspecto; físico-químicas como teor mínimo de extrato seco (11 % m/v), teor máximo de cera do extrato seco (1 % m/m), teor mínimo de flavonóides (0,25 % m/m), teor mínimo de compostos fenólicos (0,50 % m/m), provas qualitativas como picos característicos de flavonóides entre 200 e 400 nm no espectro de absorção de radiações ultravioleta e visível, não autorização de uso de aditivos, critérios macroscópicos e microscópicos, rotulagem, dentre outros (BRASIL, 2001).

A ANVISA divulgou no seu *site* uma nota técnica sobre o Registro de Produtos à base de própolis (Nota Técnica de 14 de setembro de 2005, www.anvisa.gov.br). Tal nota técnica é uma guia para o registro de produtos contendo própolis, os quais deverão atender requisitos mínimos de controle de qualidade, entre eles, a evidenciação da presença de marcadores que comprovem a sua origem.

Portanto, para os grupos caracterizados na cromatografia líquida, foi possível estabelecer um perfil baseado na ocorrência dos marcadores P-CUM (ácido *p*-cumárico), CAF (ácido cafeico), PHCA (ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico), DCBEN (ácido 2,2-dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano), DHCA (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico), DPB (ácido 2,2-dimetil-8-prenil-2H-1-benzopirano-6-propenóico), G1 (vanilina), G2 ((3-metóxi-4-hidroxicinamaldeído) e I (ácido 2-[1-hidroximetil]-vinil-6-acetil-5-hidroxicumarano) que podem servir como marcadores da própolis, caracterizada pela incidência destes compostos em praticamente

todas as amostras analisadas. A própolis de origem brasileira possui um marcador principal, isto é um componente majoritário que aparece na grande maioria das amostras analisadas, a saber, o ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (DHCA), denominado de Artepillin C pelos japoneses que já comercializam este composto na forma de pó (MARCUCCI, 2006).

2.11 Processo de extração com fluido supercrítico

Extração com fluido supercrítico (SFE, supercritical fluid extraction) é uma operação unitária que explora o poder de solvatação dos fluidos a temperatura e pressão acima de seus valores críticos. Embora as propriedades de fluido supercrítico sejam conhecidas há muito tempo, sua exploração em laboratório e processos de separação comercial tem origem relativamente recente. A extração com fluido supercrítico é aplicada em indústrias de alimentos, química, de cosméticos e farmacêuticas, entre outras. (RIZVI et al., 1986).

A tecnologia sub e supercrítica é uma tecnologia limpa e, portanto considerada “indústria verde”, característica que a tornou ainda mais interessante tendo em vista que as regulamentações com relação ao uso de solventes orgânicos tornaram-se mais rígidas e restritivas (BRUNNER, 1994).

Perrut (2000) associa a utilização da tecnologia supercrítica a produtos inovadores, “novos” ingredientes alimentares que não são obtidos por extração clássica com solvente ou destilação podem ser produzidos. Na indústria farmacêutica tem-se dado grande importância à forma de liberação das drogas (*drug delivery systems*), o que tem possibilitado novas rotas terapêuticas para muitas doenças.

O processo de extração supercrítica consiste em duas etapas: a primeira é a extração de material solúvel de uma matriz insolúvel, e a segunda a separação do extrato do solvente. Na extração, o solvente supercrítico distribui-se uniformemente através do leito fixo de extrato e recupera os compostos que possuem afinidade pelo solvente. Os compostos solubilizados no interior da matriz sólida são transferidos por difusão até o seio do solvente supercrítico. A separação ocorre quando a mistura extrato/solvente é removida do extrator até o coletor (BRUNNER, 1994).

O comportamento de uma extração geralmente é descrito por uma curva global de extração (OEC, do inglês, overall extraction curve) obtida pela massa total de extrato em função do tempo de extração, mantida constante a vazão do solvente. As curvas típicas de rendimento global apresentam três fases distintas. A primeira, onde retira-se o soluto exposto na superfície da partícula, denominado período de taxa constante de extração (CER - constant extraction rate). Na segunda etapa, a camada superficial de soluto na partícula começa a apresentar falhas e por isso menor quantidade de soluto é solubilizada. Esta etapa é denominada etapa de taxa decrescente de extração (FER - falling extraction rate period). Na terceira etapa o soluto é retirado de dentro da partícula, num processo difusional (DC – diffusion controlled rate period) (BRUNER, 1994; MEIRELES e NIKOLOV, 1994).

Um fluido supercrítico é definido como uma substância que está acima da sua temperatura crítica (T_c) e pressão crítica (P_c). O ponto crítico representa a maior temperatura e pressão em que a substância pode existir como vapor e líquido em equilíbrio (BRUNNER, 1994). Substâncias acima das condições do ponto crítico existem apenas em uma fase, sendo denominados fluidos supercríticos. Este fenômeno pode ser explicado com referência ao diagrama de fases, pressão versus temperatura (diagrama PT) de um composto puro, apresentado da Figura 2.3 (BRUNNER, 1994).

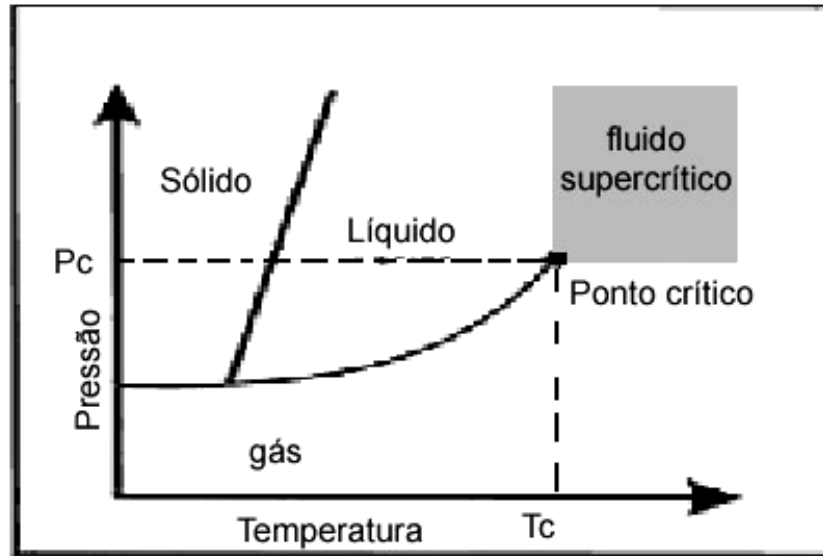


Figura 2.3. Diagrama de fase de um composto puro.

As propriedades críticas são características particulares de cada substância. A Tabela 2.2 fornece as condições críticas de diversos gases e líquidos que podem ser empregados na extração supercrítica (RIZVI et al., 1986; McHUGH e KRUKONIS, 1994).

Tabela 2.2. Propriedades críticas de vários solventes que podem ser empregados na extração supercrítica.

| Solvente | Temperatura Crítica [°C] | Pressão Crítica [bar] |
|---------------------|--------------------------|------------------------|
| Dióxido de carbono | 31,10 | 73,76 |
| Etano | 32,30 | 48,84 |
| Etanol | 240,75 | 61,40 |
| Etileno | 9,30 | 50,36 |
| Propano | 96,70 | 42,45 |
| Propileno | 91,90 | 46,20 |
| Ciclohexano | 280,30 | 40,73 |
| Benzeno | 289,00 | 48,94 |
| Tolueno | 318,60 | 41,14 |
| Clorotrifluormetano | 28,90 | 39,21 |
| Triclorofluormetano | 198,10 | 44,07 |
| Amônia | 132,50 | 112,77 |
| Água | 374,20 | 220,48 |

A densidade do fluido supercrítico aumenta com a pressão à temperatura constante e diminui com a temperatura à pressão constante. Nas proximidades do ponto crítico, estas variações ocorrem rapidamente em um pequeno intervalo de pressão (CLIFFORD, 1999). Em temperaturas muito maiores que a temperatura crítica, altas pressões são requeridas para alcançar densidades próximas àquelas de um líquido. A densidade do fluido está relacionada com o poder de solvatação, assim, o poder de solvatação de um fluido supercrítico aumenta com a densidade à temperatura constante e aumenta com a temperatura à densidade constante.

O efeito da temperatura sobre a solubilidade é bastante complexo devido à existência de dois fatores que atuam de forma contrária: a pressão de vapor do

soluto e densidade do solvente, um tende a aumentar a solubilidade com o aumento da temperatura e o outro tende a diminuí-la. O aumento da temperatura do sistema faz com que haja aumento na pressão de vapor do soluto, proporcionando maior solubilidade. Por outro lado, esse aumento de temperatura faz com que a densidade do solvente diminua, o que provoca diminuição na solubilidade (MARENTIS, 1988).

Na Tabela 2.3 pode ser observado que as densidades dos fluidos supercríticos possuem valores próximos aos do estado líquido, chegando a ser 100 vezes maior que as densidades características de gases. A difusividade do fluido supercrítico situa-se entre os valores dos estados gasoso e líquido, enquanto que a viscosidade é praticamente igual a dos gases (GERMER, 1989). Tais características tornam os fluidos supercríticos um meio bastante interessante para operações de extração e de fracionamento e também como meio reacional para a condução de reações químicas e bioquímicas (RIZVI et al., 1986).

Tabela 2.3. Propriedades físicas associadas a diferentes estados das substâncias.

| Estado do Fluido | Densidade $10^3[\text{g}/\text{cm}^3]$ | Difusividade $10^4[\text{cm}^2/\text{s}]$ | Viscosidade [kg/m.s] |
|-----------------------|---|--|--------------------------|
| Gás | | | |
| P= 1 bar, T= 15-30 °C | $(0,6-0,2) \times 10^{-3}$ | 0,1-0,4 | $(1-3) \times 10^{-5}$ |
| Fluido Supercrítico | | | |
| Pc, Tc | 0,2-0,5 | $0,7 \times 10^{-3}$ | $(1-3) \times 10^{-5}$ |
| 4Pc, Tc | 0,4-0,9 | $0,2 \times 10^{-3}$ | $(3-9) \times 10^{-5}$ |
| Líquido | | | |
| P= 1 bar, T= 15-30 °C | 0,6-1,6 | $(0,2-2) \times 10^{-5}$ | $(0,2-3) \times 10^{-3}$ |

Pelo que já foi mencionado, a aplicação industrial da SFE deveria ser muito mais difundida do que é na atualidade por apresentar inúmeras vantagens apresentadas. Algumas vantagens e desvantagens da extração supercrítica são citadas a seguir (BRUNNER, 1994; BOTT, 1982; CLIFFORD, 1999):

- A extração com gases comprimidos é vantajosa em relação a destilação para a extração de compostos termolábeis, uma vez que pode ser realizada a baixas temperaturas;
- Flexibilidade das variáveis de processo. A diferentes condições de pressão e temperatura o fluido apresenta diferentes densidades, o que permite otimizar a seletividade;
- A seletividade possibilita a extração de diferentes classes de compostos;
- Devido as suas propriedades de transporte favoráveis, os gases comprimidos permitem aproximação mais rápida do equilíbrio e penetram no substrato mais facilmente do que solventes líquidos;
- Componentes adicionais (co-solventes) podem ser usados em pequenas quantidades para manipular o equilíbrio de fases.

Algumas desvantagens da extração com dióxido de carbono supercrítico são apresentadas abaixo:

- Altos custos de investimentos iniciais, risco de capital e altos custos de manutenção, provenientes da segurança exigida pelos equipamentos;
- Os métodos comuns de aumento de escala não são facilmente aplicáveis a processos a altas pressões;

- Em processos tecnologicamente recentes, existe forte tendência ao uso de leis e patentes como forma de proteção contra a competição;
- Na modelagem da extração, não existe um único modelo que possa representar todas as matrizes. Cada matriz vegetal se comporta de maneira particular nas mesmas condições operacionais;
- As condições de separação da mistura extrato + solvente devem ser otimizadas para evitar perdas de produto junto com a corrente de solvente.

A SFE é uma área de interesse de inúmeros pesquisadores ao redor do mundo. Os estudos estão concentrados tanto no campo experimental como no campo teórico. No campo experimental, o estudo da influência das condições operacionais sobre o rendimento, composição química e cinética de extração tem recebido especial atenção. Os resultados são geralmente comparados àqueles obtidos por métodos de extração convencionais. No campo teórico os estudos estão concentrados no desenvolvimento de modelos matemáticos que representem a cinética de extração, e de modelos termodinâmicos que permitam a predição do comportamento de fases a elevadas pressões. Várias revisões da literatura foram apresentadas por Reverchon (1997), Hauthal (2001) e Meireles (2003).

2.12 Dióxido de carbono como solvente supercrítico

O solvente utilizado na extração como fluido supercrítico deve apresentar os seguintes requisitos: possuir bom poder de solvatação, ser inerte ao produto,

ser facilmente separado do produto, ser relativamente barato e deve ter pressão crítica baixa por razões econômicas (BRUNNER, 1994).

Muitas são as vantagens que fazem do CO₂ o solvente mais pesquisado no que concerne à extração supercrítica de produtos alimentícios e farmacêuticos: condições críticas amenas (31,2 °C e 73,4 bar), o que diminui os custos de compressão, facilita a separação após a extração e permite o processo à baixa temperatura, evitando degradações térmicas; alta volatilidade; baixa viscosidade e alta difusividade (facilitando a penetração em matrizes sólidas); baixa entalpia de vaporização; disponibilidade; atoxidade; não inflamabilidade; baixo custo; baixíssima reatividade (RIZVI et al., 1986; BROGLE, 1982).

O dióxido de carbono é um solvente apolar e não ionizável, em muitos aspectos parecido com o hexano, embora na fase supercrítica a constante dielétrica do dióxido de carbono aumente com a pressão. Manipulando-se a pressão, a seletividade do dióxido de carbono pode ser direcionada para uma possível extração de compostos de interesse baseados em sua polaridade (MARENTIS, 1988 citado por COELHO, 1996).

2.13 Extração supercrítica com o uso de co-solvente

O uso de co-solventes na extração supercrítica muitas vezes é recomendado devido a fortes interações entre soluto e co-solvente e/ou variação da densidade da fase fluida, causada pela adição de modificadores (GUAN et al. 1998 citado por BRAGA et al., 2003).

Em geral um co-solvente que possui temperatura crítica (T_c) inferior a do fluido supercrítico, causa diminuição na solubilidade de compostos menos voláteis,

e quando a temperatura crítica (T_c) do co-solvente é superior a do fluido supercrítico, acarreta o aumento da solubilidade de compostos menos voláteis (BRUNNER, 1994).

Mesmo a altas densidades, o CO_2 possui habilidade limitada em dissolver moléculas polares. Entretanto, as características dos fluidos supercríticos podem ser modificadas pela adição de compostos miscíveis e polares, mencionados na literatura como co-solvente ou modificadores (TAYLOR, 1996). Os co-solventes normalmente possuem volatilidade intermediária entre o solvente e o componente a ser extraído (KING e BOOT, 1993). Estes parâmetros ainda podem ser alterados pela seleção de condições específicas de temperatura e pressão. Estas condições acrescentam flexibilidade e adaptam-se as condições de extração para os requisitos específicos de extrato a ser produzido e do produto final desejado (PELLERIN, 1991).

A solubilidade de muitos compostos pode ser então aumentada utilizando um co-solvente. Uma das explicações de como o co-solvente atua na mistura supercrítica baseia-se na mudança de polaridade do solvente supercrítico e desta forma a solubilidade de um certo soluto ou de uma classe de compostos. Outro fator importante é a ocorrência de interações físicas e químicas entre co-solvente e o soluto, que também afetam e alteram a solubilidade do soluto no fluido supercrítico (EKART et al., 1993).

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar o efeito da adição de um modificador na extração supercrítica. Um deles é o aumento da solubilidade do soluto devido às interações soluto-co-solvente, outra explicação é o inchaço da matriz devido a sua interação com o co-solvente, o que permite a exposição do soluto ao solvente supercrítico. Além disso, o efeito da mudança de polaridade do solvente pela adição do co-solvente é outro fator que interfere no aumento da solubilidade. O efeito que irá predominar em uma extração com fluido supercrítico

vai depender do tipo de co-solvente e matriz e do soluto que se deseja extrair. Variações nas condições de temperatura e pressão também afetam a solubilidade (FAHMY et al., 1993).

Pelo menos 17 co-solventes têm sido estudados em extração com fluido supercrítico de produtos naturais. De todos esses modificadores, o metanol é o solvente polar mais utilizado. Acredita-se que elevada porcentagem de metanol (MeOH) pode romper o vínculo soluto-matriz sólida. Etanol (EtOH) é outra boa escolha por possuir baixa toxicidade (LANG e WAI, 2001).

No processo de extração supercrítica, a literatura reporta alguns trabalhos que utilizaram como variável do processo a porcentagem de co-solvente utilizada, geralmente sendo adicionado até 10% de co-solvente no sistema (RÓNYAI et al., 1998; BADALYAN et al., 1998; ZANCAN et al., 2002; WANG et al., 2001; BRAGA et al., 2003).

Desta forma, a extração de diferentes compostos com fluidos supercríticos pode ser otimizada com a mudança nas condições de processo, como temperatura e pressão, afetando a densidade do solvente e, conseqüentemente, a sua seletividade e com a adição de um modificador, que pode atuar de diferentes formas, conforme descrito anteriormente.

2.14 Métodos para determinação experimental da solubilidade de solutos em CO₂

A solubilidade do soluto em CO₂, ou seja, a concentração do soluto na fase solvente quando o equilíbrio físico químico é atingido, usualmente deve ser conhecida quando se estuda o processo de transferência de massa, pois o

gradiente para a transferência é definido como a diferença entre a concentração de soluto em um ponto no interior do extrator e aquela observada no equilíbrio nas mesmas condições de temperatura e pressão.

Eggers et al. (1985) observaram que as solubilidades de óleos vegetais em CO₂ supercrítico, calculadas através de equações de estado para fluidos à altas pressões, não correspondiam aos valores obtidos experimentalmente e sugeriram que para produtos naturais, devido a suas complexidades químicas, as solubilidades deveriam ser determinadas experimentalmente.

A temperatura influencia na solubilidade de um soluto num fluido supercrítico em três aspectos:

1. A densidade do solvente diminui com o aumento da temperatura, a pressão constante;
2. A pressão de vapor aumenta exponencialmente com a temperatura;
3. A solubilidade do soluto aumenta com a proximidade do ponto de fusão.

Dentre os três fatores citados, os efeitos de densidade e pressão de vapor são os principais na faixa de operação da extração com fluidos supercríticos. A densidade está diretamente ligada ao poder solvente de um fluido e a pressão de vapor é indicadora do quanto um composto pode se volatilizar.

A solubilidade de compostos em fluidos pressurizados pode ser determinada ou pelo método estático ou pelo método dinâmico (McHUGH e KRUKONIS, 1994).

No método estático, o equipamento para medida de solubilidade tem como principal componente uma célula de volume variável que contém o soluto, dotada de visores de quartzo ou safira para observar as fases de equilíbrio. O solvente

passa por uma bomba ou compressor para atingir a pressão de operação, sendo armazenado posteriormente em tanque pulmão de volume conhecido, termostatizado à mesma temperatura da célula. O solvente é injetado na célula, após ser atingido o equilíbrio térmico. O conteúdo da célula é misturado ao solvente e sua pressão ajustada isotermicamente por um pistão. A solubilidade do soluto no fluido solvente é determinada visualmente quando há formação de uma única fase. Portanto, àquela pressão, a solubilidade é determinada pela razão da massa do soluto pela quantidade de fluido presente na célula. Variando-se estas quantidades, novas pressões serão necessárias para a formação de uma única fase. O comportamento da solubilidade com a pressão a uma dada temperatura pode ser assim estabelecido.

O método estático de medida de solubilidade possui as seguintes vantagens:

- Sólidos pesados e polímeros podem ser pesquisados com pequena quantidade de fluido;
- Vários pontos de solubilidade podem ser levantados com o mesmo material, já que a solubilidade pode ser medida em distintas temperaturas para a mesma carga da célula de equilíbrio;
- Em estudos de solubilidade de solutos líquidos em gases pressurizados, é possível o conhecimento da solubilidade do solvente na fase líquida.

As maiores desvantagens deste método são:

- Dados de extração e esgotamento com fluidos pressurizados não são possíveis de se obter;

- Como o equilíbrio é determinado visualmente, a leitura do equilíbrio é passível de erro (GERMER, 1989). Além disto é uma técnica onerosa e sistemas multifásicos são precariamente avaliados.

No método dinâmico, a solubilidade é determinada como sendo a inclinação da etapa linear (Y^*) da curva de massa total extraída versus massa de CO_2 utilizada, onde a taxa constante de extração indica a saturação do solvente. O princípio do método dinâmico consiste da suposição de que o solvente, escoando através do leito com altos tempos de residência, acaba entrando em equilíbrio com o soluto. Portanto, ao deixar o equipamento, o solvente encontra-se saturado com o soluto e assim, a concentração do soluto nestas condições deve ser independente da vazão do solvente. Ainda mais, operando-se nas condições próximas ao equilíbrio, a taxa de extração de soluto para uma dada pressão e tempo de operação, deve ser constante, já que não é possível extrair uma quantidade maior de soluto do que aquela encontrada nas condições de equilíbrio.

Desta forma, a solubilidade é determinada diretamente dos dados de extração, correspondendo à inclinação da parte linear (Y^*) da curva de massa total extraída versus massa total de CO_2 utilizada, conforme mostra a Figura 2.3.

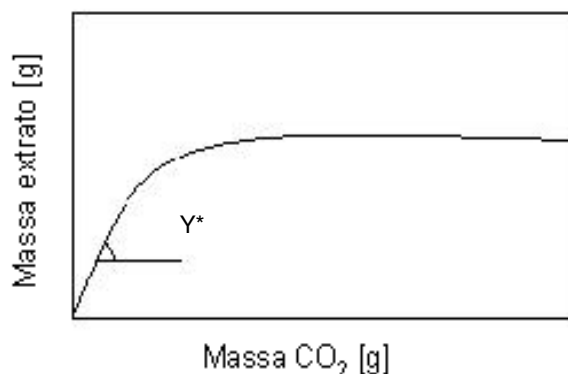


Figura 2.3. Representação da medida de solubilidade através de curva de extração.

Onde:

$$Y^* = \frac{dM_{\text{solute}}}{dM_{\text{CO}_2}} \quad (1)$$

O sistema dinâmico de medida de solubilidade possui muitas vantagens:

- Dados de equilíbrio, esgotamento e fracionamento podem ser obtidos rapidamente com grande reprodutibilidade;
- A área de contato entre o sólido (ou líquido) com o fluido é grande, o que favorece a transferência de massa e o equilíbrio é rapidamente atingido;
- O tempo de residência pequeno torna possível operar com líquidos termicamente instáveis;
- É barato e não exige células/reatores com elevada sofisticação.

Pode-se citar como desvantagens:

- Uma única fase é analisada;
- O sistema dinâmico de medida de solubilidade é limitado a compostos/solutos sólidos ou muito viscosos;
- Limitado a sistemas bifásicos.

2.15 Extração Supercrítica de Própolis

Stahl et al. (1988) estudaram a extração supercrítica de própolis a uma pressão de 600 bar e temperatura de 30 °C para remover as ceras e enriquecer o extrato em teor de flavonóides. Porém os flavonóides presentes na própolis são praticamente insolúveis em CO₂ puro, mas suficientemente solúveis na mistura CO₂ e etanol possibilitando sua separação de compostos de alto peso molecular e/ou compostos mais polares (CATCHPOLE et al., 2004).

Wang et al. (2004) estudaram a precipitação usando CO₂ como fluido supercrítico ou anti-solvente para a obtenção de partículas finas que contenham concentrado de flavonóides. You et al. (2002) estudaram a extração de própolis originária do Brasil e de Taiwan, com CO₂ supercrítico e CO₂ e co-solvente (etanol e água) com o objetivo de aumentar a solubilidade da água e obter extratos com atividade anticâncer. Na patente de Wu e Luyu (2000) também indicaram que na extração com CO₂ e etanol em pressões maiores é possível obter diferentes classes de compostos com atividade biológica.

Lee et al. (2007) utilizaram a extração supercrítica com dióxido de carbono (CO₂) como solvente para isolar e purificar o ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepillin C ou DHCA) da própolis bruta brasileira. Investigaram a influência da concentração de acetato de etila como co-solvente (2, 4 e 6 % (m/m)) e da temperatura de processo (40, 50 e 60 °C) numa pressão de 208 bar. A maior concentração de Artepillin C foi obtida na temperatura de 60 °C e com 6 % (m/m) de adição de acetato de etila como co-solvente.

2.16 Análise multivariada dos resultados

Diversos segmentos da química e da engenharia e o crescimento tecnológico/científico tem optado pela utilização cada vez mais frequente de recursos computacionais em função do aumento da quantidade de dados experimentais obtidos, bem como o aumento da variabilidade de técnicas para obtê-los. É importante ter como alternativa alguma ferramenta matemática que possa, de modo mais criterioso e científico, extrair maior número de informações de um conjunto de dados (MATOS et al., 2003). Esta metodologia é frequentemente utilizada com produtos naturais onde é necessário extrair informação de grande número de variáveis. Seus objetivos são: correlacionar dados, classificar objetos, simplificar dados complexos e mostrar correlação entre variáveis.

Os métodos estatísticos multivariados consideram as amostras e as variáveis em seu conjunto, permitindo extrair informações complementares que a análise univariada não consegue evidenciar. Um dos objetivos da utilização da análise multivariada é reduzir a representação dimensional dos dados, organizando-os em uma estrutura que facilite a visualização de todo o conjunto de dados (MOURA et al., 2006). A análise de componentes principais (PCA) consiste essencialmente em reescrever as coordenadas das amostras em outro sistema de eixo mais conveniente para a análise de dados. Em outras palavras, as n-variáveis originais geram, através de suas combinações lineares, n-componentes principais, cuja principal característica, além da ortogonalidade, é que são obtidos de ordem decrescente de máxima variância, ou seja, a componente principal 1 detém mais informação estatística que a componente principal 2, que por sua vez tem mais informação estatística que a componente principal 3 e assim por diante (MOURA et al., 2006).

Este método permite a redução da dimensionalidade dos pontos representativos das amostras pois, embora a informação estatística presente nas n -variáveis originais seja a mesma dos n -componentes principais, é comum obter em apenas 2 ou 3 das primeiras componentes principais mais que 90 % desta informação. O gráfico da componente principal 1 *versus* a componente principal 2 fornece uma janela privilegiada (estatisticamente).

As duas técnicas de análise multivariada mais conhecidas são a análise de agrupamento hierárquico (HCA, do inglês, Hierarchical Cluster Analysis) e análise dos componentes principais (PCA, do inglês, Principal Component Analysis).

A HCA é usada para classificar objetos (amostras) pelos valores de um conjunto de variáveis, dentro de um grupo. Com este método, as amostras ou variáveis são agrupadas de acordo com suas similaridades. Os resultados são apresentados na forma de dendograma, permitindo a visualização das distâncias entre os objetos ou variáveis (MOITA NETO e MOITA, 1998).

A PCA é uma ferramenta quimiométrica que permite extrair de determinado conjunto de dados, informações relevantes para o seu entendimento. Este conjunto de dados é organizado na forma de uma matriz (dados bidimensionais), onde as linhas podem ser as amostras e as colunas variáveis. Neste sentido, com a PCA é possível efetuar uma simplificação, redução da dimensão original dos dados (MATOS et al., 2003).

A PCA (Análise de Componentes Principais) reescreve as coordenadas dos vários dados obtidos a partir das amostras em eixo mais conveniente para análise. Os componentes principais (PC) são obtidos em ordem decrescente de variância, onde o componente principal (PC1) detém mais informação estatística que o PC2, e assim por diante. Portanto, a janela PC1 x PC2 é a mais importante estatisticamente (*scores*). PCA também pode ser usada para verificar quais

variáveis (*loadings*) tem maior importância no agrupamento das amostras (WOLD, 1987; MOITA NETO e MOITA, 1998).

2.16.1 Análise de componentes principais (PCA)

A análise de componentes principais é uma técnica estatística poderosa que pode ser utilizada para redução do número de variáveis e para fornecer uma visão estatisticamente privilegiada do conjunto de dados. A análise de componentes principais fornece as ferramentas adequadas para identificar as variáveis mais importantes no espaço das componentes principais (PRADO et al., 2002).

A análise de componentes principais consiste em reescrever as variáveis originais em novas variáveis denominadas componentes principais, através de uma transformação de coordenadas. A transformação de coordenadas é um processo trivial quando feito usando matrizes, pode ser feita de diversas maneiras conforme o interesse.

Os componentes principais são as novas variáveis geradas através de uma transformação matemática especial realizada sobre as variáveis originais. Esta operação matemática está disponível em diversos softwares estatísticos especializados. Cada componente principal é a combinação linear de todas as variáveis originais. Por exemplo, um sistema com oito variáveis, após a transformação, terá oito componentes principais. Cada uma destas componentes principais, por sua vez, será escrita como combinação linear das oito variáveis originais. Nestas combinações, cada variável terá importância ou peso diferente (SENA et al.,2000).

Duas são as características das componentes principais que as tornam mais efetivas que as variáveis originais para a análise do conjunto das amostras (PRADO et al., 2002). As variáveis podem guardar entre si correlações que são suprimidas nas componentes principais. Ou seja, as componentes principais são ortogonais entre si. Deste modo, cada componente principal traz uma informação estatística diferente das outras. A segunda característica importante é decorrente do processo matemático-estatístico de geração de cada componente que maximiza a informação estatística para cada uma das coordenadas que estão sendo criadas.

As variáveis originais têm a mesma importância estatística, enquanto que as componentes principais têm importância estatística decrescente. Ou seja, as primeiras componentes principais são tão mais importantes que podemos até desprezar as demais. Destas características podemos compreender como a análise de componentes principais: a) podem ser analisadas separadamente devido à ortogonalidade, servindo para interpretar o peso das variáveis originais na combinação das componentes principais mais importantes b) podem servir para visualizar o conjunto da amostra apenas pelo gráfico das duas primeiras componentes principais, que detêm maior parte da informação estatística (CAZAR, 2003).

CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

Este capítulo é dedicado a parte experimental do trabalho. Inicialmente são apresentadas descrições dos materiais utilizados, do aparato e do procedimento experimental adotado para a obtenção dos dados.

Foram realizadas três etapas distintas de extração supercrítica da própolis. Inicialmente as extrações foram realizadas a partir do extrato etanólico de própolis seco obtido previamente. Na segunda etapa as extrações supercríticas foram realizadas a partir do extrato etanólico de própolis seco, porém com a adição de etanol como co-solvente e a terceira etapa de realização das extrações foi a partir da própolis bruta utilizando, ou não, etanol como co-solvente. A partir dos extratos obtidos foram realizados testes para verificar a atividade antioxidante e antimicrobiana das amostras.

3.1 Matéria-Prima

As amostras de própolis verde utilizadas neste trabalho são oriúndas do Estado de Minas Geras e foram obtidas da Bioessens Ltda (lote nº MP003/05), com sede na cidade de Cotia (São Paulo, Brasil).

As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas em freezer doméstico (Cônsul, modelo 220, São Paulo, Brasil) a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento da sua utilização.

3.2 Determinação total de substâncias voláteis e água

A análise da umidade das amostras de própolis bruta foi feita segundo o Método AOAC (1997) ref. Nº 15.010-15.011. Este método consistiu em determinar o teor de substâncias voláteis a 98 °C. A determinação baseou-se em pesar 2 gramas de amostras em cápsulas previamente taradas e pesadas e submetê-los à secagem em estufa (Marca: Marconi, Modelo: MA-030/12, Piracicaba, SP) com bomba de vácuo (Marca: Marconi, Modelo: MA-058, Piracicaba, SP) a 100 °C e $P \leq 25$ mmHg. As amostras foram resfriadas em dessecador e pesadas até atingir peso constante. O cálculo da porcentagem de umidade na amostra seguiu a seguinte relação:

$$\%umidade = \frac{m_{amostra} - m_{amostrades\ sec\ ada}}{m_{amostra}} * 100 \quad (2)$$

3.3 Obtenção do extrato etanólico de própolis (EEPS)

Os extratos etanólicos de própolis (EEP) foram preparados com pequenas variações do método descrito por Sawaya et al. (2004). Para cada 3 gramas de própolis bruta adicionou-se 10 mL de etanol (Merck, Darmstadt, Germany) e colocou-se sob agitação em agitador magnético (Marca: Fisatom, Modelo: 752, São Paulo, SP) por 1 dia à temperatura ambiente. A porção insolúvel foi separada através de filtração utilizando papel filtro de 14 µm (Qualy, São José dos Pinhais, PR), o material filtrado foi acondicionado em freezer a -10 °C por uma noite e re-filtrado com o objetivo de reduzir o teor de ceras presente no extrato. O extrato

final foi evaporado em estufa (Marca: Marconi, Modelo: MA-030/12, Piracicaba, SP) com bomba de vácuo (Marca: Marconi, Modelo: MA-058, Piracicaba, SP) a 60 °C, resultando em um extrato etanólico seco de própolis (EEPS).

O rendimento do EEPS foi definido como a massa de extrato etanólico de própolis seco obtido pela massa de própolis bruta utilizada, esse valor dado em porcentagem.

3.4 Testes preliminares da extração supercrítica da própolis bruta e do extrato etanólico de própolis seco (EEPS)

Foram realizados dois tipos diferentes de testes preliminares com o objetivo de avaliar o tempo de extração, rendimento global de extração supercrítica, bem como o perfil químico das amostras obtidas.

- Primeira fase: realizaram-se três extrações supercríticas a partir da própolis bruta a 40 °C e 300 bar. O tempo de extração para esta fase inicial foi de 6 horas para o primeiro teste, 5 horas para o segundo teste e 16 horas para o terceiro teste, variando a quantidade de própolis no extrator. O objetivo da primeira fase dos testes preliminares foi de obter o rendimento global de extração e definir o tempo de extração supercrítica que foi utilizado no decorrer do trabalho.
- Segunda fase: foram realizadas cinco extrações supercríticas a partir do extrato etanólico de própolis seco (EEPS). A temperatura de extração foi de 60 °C e pressões de 150, 200, 250, 300 e 350 bar, o tempo de extração para todos os testes foi de 2 horas. O objetivo da

segunda fase dos testes preliminares foi verificar a influência da pressão de extração sobre o rendimento global e perfil químico obtido nos extratos.

3.4.1 Equipamento experimental

Para a realização das duas fases dos testes preliminares, utilizou-se como matéria-prima a própolis bruta descrita no item 3.1 e extrato etanólico de própolis seco (EEPS) obtido de acordo com a metodologia descrita no item 3.3 da seção Materiais e Métodos.

Os experimentos foram realizados em uma unidade experimental de bancada, no Laboratório de Extração, Termodinâmica Aplicada e Equilíbrio (EXTRAE) da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP. A Figura 3.1 apresenta um diagrama esquemático da unidade experimental utilizada.

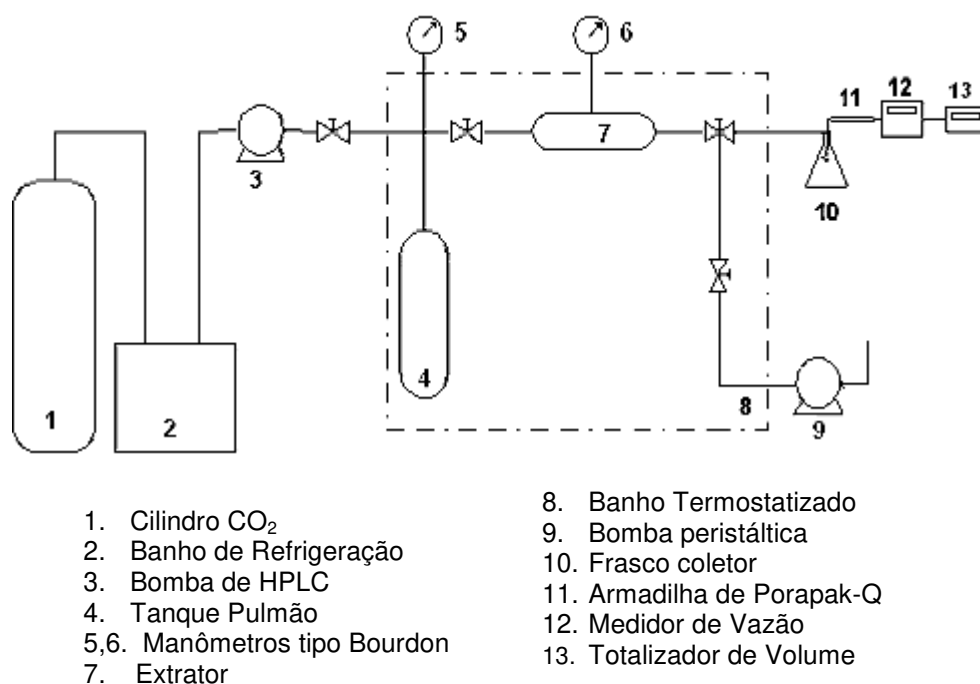


Figura 3.1. Desenho esquemático da unidade de extração supercrítica.

A pressurização do sistema consistiu no bombeamento do CO₂ do cilindro para o tanque pulmão e posteriormente para o extrator (previamente empacotado com a amostra) através de uma bomba de HPLC (Marca: ELDEX, Modelo: AA-100-S). Dentro do tanque pulmão a pressão foi controlada através de manômetro tipo Bourdon. Quando o tanque pulmão atingiu a pressão pré-estabelecida, abriu-se a válvula que conecta o tanque pulmão ao extrator e inicia-se assim a pressurização completa do sistema. Durante a pressurização do sistema, o banho termostatizado, na qual o extrator encontrava-se submerso, estava acionado para que atingisse e mantivesse a temperatura pré-estabelecida. A temperatura do banho termostatizado foi monitorada por termopares conectados a um indicador de temperatura.

A extração era iniciada assim que o sistema atingisse as condições de temperatura e pressão pré-estabelecidas. A pressão do sistema foi controlada através do acionamento correto da válvula micrométrica, conectada na saída do extrator. Na saída do sistema de extração foi adicionada uma armadilha de Porapak-Q (80-100 mesh, Waters Corporation, USA) com a finalidade de capturar os compostos voláteis extraídos. A armadilha de Porapak-Q foi preparada através do empacotamento do adsorvente (Porapak-Q) entre lã de vidro em uma coluna de vidro (5 cm x 0,5 cm di).

Na saída da armadilha de Porapak-Q foi conectado um medidor de vazão e um totalizador de volume com a finalidade de medir e manter a vazão do processo constante.

Ao término da extração, os extratos obtidos foram lacrados e acondicionados em ambiente inerte sob refrigeração para posterior análise.

3.4.2 Procedimento experimental para a primeira fase dos testes preliminares

3.4.2.1 Primeiro teste preliminar

Para a realização do primeiro teste de extração supercrítica da própolis bruta, o extrator foi totalmente preenchido com 55,90 g de própolis bruta. O empacotamento do extrator foi feito manualmente em pequenas quantidades, com o auxílio de bastão de vidro, tomou-se o cuidado para que a amostra ficasse homogeneamente compactada, a fim de evitar a formação de caminhos preferenciais pelo solvente (CO₂). A extração foi realizada a temperatura de 40 °C e pressão de 300 bar, o CO₂ foi escoado através do leito contendo a amostra com

vazão de 75 gCO₂/h. As amostras de extrato foram coletadas em frascos e pesadas a cada hora e o tempo total de extração foi de 6 horas. Além disso, extraiu-se os voláteis e estes foram capturados através de armadilha do adsorvente de Porapak-Q.

3.4.2.2 Segundo teste preliminar

O extrator foi empacotado com 5,05 g de própolis bruta misturados a esferas de vidro até preencher completamente o extrator. A extração foi feita nas mesmas condições de temperatura, pressão e vazão do CO₂ do experimento anterior, ou seja, 300 bar, 40 °C e 75 gCO₂/h. O tempo de extração para este teste foi de 5 horas. Além disso, extraiu-se os voláteis e estes foram capturados através de armadilha do adsorvente de Porapak-Q.

3.4.2.3 Terceiro teste preliminar

O extrator foi empacotado com 5,05 g de própolis bruta misturados a esferas de vidro até completar o leito do extrator. A extração foi feita nas mesmas condições de temperatura, pressão e vazão do CO₂ do experimento anterior, ou seja, 300 bar, 40 °C e 75 gCO₂/h. O tempo de extração para este teste foi de 16 horas. Além disso, extraiu-se os voláteis e estes foram capturados através de armadilha do adsorvente de Porapak-Q.

3.4.3 Procedimento experimental para a segunda fase dos testes preliminares

Para a realização destes testes preliminares, utilizou-se a mesma unidade experimental descrita no item 3.4.1. Em cada experimento o extrator foi carregado com aproximadamente 5 gramas de extrato etanólico de própolis seco (EEPS) misturados a esferas de vidro. A temperatura utilizada nos experimentos de extração supercrítica foi de 60 °C e pressões de 150, 200, 250, 300 e 350 bar. O extrato era coletado em frascos de vidro âmbar manipulando-se a válvula micrométrica. O tempo de extração foi de duas horas e vazão de CO₂ foi mantida em torno de 98 gCO₂/h.

3.5 Equipamento de extração com dióxido de carbono supercrítico para a realização dos experimentos

Finalizados os testes preliminares, os demais experimentos de extração supercrítica foram feitos na Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e Missões – Campus de Erechim, no Laboratório de Termodinâmica Aplicada do curso de Engenharia de Alimentos, sob orientação do Prof. Dr. Claudio Dariva.

A Figura 3.2 apresenta a fotografia da unidade de bancada utilizada para a realização dos experimentos.



Figura 3.2. Unidade experimental de bancada utilizada nos experimentos (URI).

Os componentes da unidade experimental são descritos a seguir:

- Cilindro de solvente: Armazenamento do solvente empregado nos experimentos, CO₂ (White-Martins, com pureza de 99,99 % na fase líquida), o cilindro de CO₂ possui um tubo pescador para a obtenção direta do solvente na fase líquida.
- Bomba de alta pressão: Neste trabalho foi utilizada uma bomba de seringa (Marca: ISCO, Modelo: 500D) que possui um cilindro interno de 500 mL, pressão de trabalho de até 258,6 bar e fluxo de até 107 mL/min. O cilindro da bomba é encamisado, o que possibilita a manutenção da temperatura do reservatório em valor pré-determinado com auxílio de banho de circulação.

- Banho de circulação 1: Este banho de circulação (Marca: QUIMIS, Modelo: 214M2) foi utilizado para manter a temperatura no cilindro da bomba de alta pressão constante. Faixa de temperatura do banho de circulação de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$, com precisão de $\pm 0,05\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Válvula de via única ou “check-valve”: A função desta válvula (Marca: HIP, Modelo: 15-41AF1-T) foi permitir o fluxo do solvente em apenas um sentido, uma inserida entre o cilindro de CO_2 e o cilindro da bomba de alta pressão e outra inserida entre o cilindro da bomba de alta pressão e a linha de extração conectada ao extrator.
- Válvula de esfera: A válvula quando aberta (Marca: HOKE, Modelo: 7155F2Y) permite o fluxo do solvente do cilindro da bomba de alta pressão para o extrator.
- Transdutor de pressão: O transdutor de pressão (Marca: NOVUS, Modelo: N1500) foi conectado entre a linha e o extrator para monitorar a pressão no interior desta.
- Extrator: Extrator encamisado de aço-inox 316 L, com volume interno de aproximadamente 100 mL.
- Banho de circulação 2: Este banho de circulação (Marca: NOVA ÉTICA, Modelo: N480) foi utilizado com o objetivo de garantir a temperatura constante do extrator, com precisão de $\pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Válvula métrica tipo agulha: Esta válvula (Marca: HIP, Modelo: 15-11AF1) está conectada à saída do extrator e permite abertura gradual possibilitando regulagem fina da vazão de saída do solvente/extrato.

- Manta de aquecimento: A manta de aquecimento (Marca: FISATON, Modelo: 5) envolve válvula de saída do extrator com o objetivo de evitar o efeito *Joule - Thompson*.
- Indicador de temperatura: Este indicador de temperatura (Marca: COEL, Modelo: UW 2000) possui um sensor PT 100 que fornece a temperatura de trabalho da manta de aquecimento, ajustada previamente.

O cilindro de CO₂ foi conectado à bomba de alta pressão por uma tubulação de metal flexível de 1/8” e permitiu a passagem do solvente até a bomba de alta pressão que, através de tubulações de 1/16”, foi conectada ao extrator. O solvente bombeado escoou por um tubo de aço-inox de 1/16” de diâmetro o qual se liga a uma válvula de esfera, que é conectada ao extrator através de conexão em T, que permite a passagem do solvente para o extrator e para um tubo de aço-inox de 1/16” de diâmetro, ao qual está conectado a um transdutor absoluto de pressão, sendo a leitura efetuada através de um indicador de pressão.

O extrator é um cilindro encamisado de aço inoxidável de aproximadamente 100 mL de volume interno, sendo a temperatura de extração controlada com auxílio de banho termostático de circulação. As extremidades do extrator são rosqueadas para encaixe em conexão fêmea. Para manter a matéria-prima dentro do extrator e impedir a passagem de sólidos, em ambas as extremidades do extrator existem telas de aço-inox de 300 mesh. A saída do extrator possui uma válvula micrométrica tipo agulha que controla o fluxo do solvente e extrato. A válvula foi envolvida por uma fita de aquecimento para evitar o resfriamento excessivo (efeito *Joule - Thompson*). O extrato foi coletado manipulando-se a válvula micrométrica.

3.6 Equipamento de extração com CO₂-SC e co-solvente

Todos os experimentos de extração supercrítica com adição de co-solvente foram feitos na Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e Missões – Campus de Erechim, no Laboratório de Termodinâmica Aplicada do curso de Engenharia de Alimentos, sob orientação do Prof. Dr. Claudio Dariva.

A unidade experimental de bancada utilizada para fazer os experimentos utilizando etanol como co-solvente é a mesma que foi descrita no item 3.5 da seção Materiais e Métodos, apenas com duas modificações. Acrescentou-se à unidade de extração uma bomba de co-solvente, bomba de HPLC Digital Série III (Marca: Acuflo) e uma “check-valve” (Marca: HIP, Modelo: 15-41AF1-T) a fim de permitir o fluxo do co-solvente em apenas um sentido, ou seja, a válvula foi colocada na tubulação entre a bomba de co-solvente e o extrator.

A bomba de co-solvente, do tipo deslocamento positivo, foi utilizada para deslocar o co-solvente para o extrator, este tipo de bomba possui um único pistão que permite operar com taxa constante (0,1 mL/min a 10 mL/min) tendo precisão de $\pm 0,2$ % sobre toda a faixa de operação. A Figura 3.3 apresenta uma fotografia da bomba de HPLC utilizada para o bombeamento do etanol nos experimentos.



Figura 3.3. Fotografia da bomba HPLC de co-solvente utilizada dos experimentos.

3.7 Procedimento experimental

O procedimento experimental foi dividido em três etapas distintas:

1. Primeira etapa: extração supercrítica do extrato etanólico de própolis seco (EEPS) nas condições de temperatura de 20, 35 e 50 °C e pressões de 150, 200 e 250 bar;
2. Segunda etapa: extração supercrítica do extrato etanólico de própolis seco nas condições de 20, 35 e 50 °C e pressões de 150, 200 e 250 bar e com adição de etanol como co-solvente nas proporções de 5,

10 e 15 % ($v_{\text{etanol}}/v_{\text{CO}_2}$), onde as condições de pressão do CO_2 foram as mesmas das condições de processo e a temperatura mantida fixa em $-2\text{ }^\circ\text{C}$, onde a densidade do CO_2 é praticamente igual a 1 kg/m^3 , para todas as pressões utilizadas;

3. Terceira etapa: extração supercrítica a partir da própolis bruta nas mesmas condições de temperatura, pressão e com adição de co-solvente (etanol) nas proporções de 0, 5, 10 e 15 %.

3.7.1 Extração supercrítica a partir extrato etanólico de própolis (EEPS)

O extrator foi empacotado manualmente com aproximadamente 2 gramas do extrato etanólico de própolis seco, obtido previamente de acordo com o item 3.3 da seção Materiais e Métodos, misturados a esferas de vidro, a fim de preencher todo o extrator para evitar a formação de caminhos preferenciais e com isso comprometer os dados a serem obtidos.

Para alimentar a amostra (EEPS) dentro do extrator teve-se o cuidado para quantificar a matéria-prima, pois o EEPS possui alta viscosidade e é extremamente aderente em qualquer superfície, neste sentido, pesou-se toda a vidraria utilizada para alimentar o extrator, e através da diferença de peso obteve-se a massa de EEP que foi alimentada no extrator.

O extrator encamisado era conectado ao sistema de extração e ajustava-se à temperatura desejada no banho de circulação para fazer o ensaio de extração. Neste ponto a bomba de alta pressão era acionada para o alcance da pressão desejada.

A passagem do solvente ao extrator foi feita, através do acionamento de uma válvula de retenção. O monitoramento da pressão foi feito através do indicador de pressão conectado ao transdutor absoluto de pressão. Uma vez que a pressão desejada era atingida, esperava-se um tempo pré-determinado (cerca de 30 minutos) até que o sistema atingisse o equilíbrio termodinâmico.

A extração foi iniciada através do acionamento da válvula micrométrica de saída. A vazão do solvente (CO_2) foi mantida constante em torno de 1,5 g/min ($\pm 0,1$). Na primeira hora de extração, em tempos de 10 em 10 minutos, removia-se o tubo coletor de extrato previamente pesado (vidro âmbar de 50 mL) e pesava-se novamente em balança analítica (Marca: Gibertini, Modelo: E 154), a fim de obter a massa de extrato em tempos pré-determinados para a obtenção da curva cinética de extração. Nas duas horas seguintes de extração, pesou-se o tubo coletor de 20 em 20 minutos até completar 3 horas. Ao término das extrações, os frascos contendo os extratos obtidos eram lacrados e acondicionados sob refrigeração em ambiente inerte até o momento das análises.

As extrações foram realizadas nas condições de temperatura de 20, 35 e 50 °C e pressões de 150, 200 e 250 bar. Foram realizadas as triplicatas para todos os ensaios. Cada experimento consumiu em média 6 horas incluindo: pesagem da matéria-prima, empacotamento da própolis com as esferas de vidro no extrator, estabilização da temperatura de extração, pressurização do sistema, alcance do equilíbrio termodinâmico, obtenção dos dados experimentais, despressurização e limpeza do extrator.

3.7.2 Extração supercrítica do extrato etanólico de própolis com adição de co-solvente

O extrato foi empacotado manualmente com aproximadamente 2 gramas do extrato etanólico de própolis seco misturado a esferas de vidro. O extrator foi então conectado ao sistema de extração e ajustavou-se o banho de circulação para a obtenção da temperatura desejada. A bomba de alta pressão foi acionada para o alcance da pressão desejada, permitindo a passagem do solvente ao extrator através da manipulação de uma válvula. Ajustavou-se também a bomba de co-solvente com a proporção de etanol desejada para o respectivo ensaio.

Uma vez que o sistema alcançava as condições de temperatura e pressão pré-determinadas, esperavou-se 30 minutos até que o sistema estivesse estável. A extração foi iniciada através do acionamento da válvula micrométrica de saída do extrato e o acionamento do botão de “início” da bomba de seringa e da bomba de co-solvente (preferencialmente juntos). A vazão de saída foi mantida em torno de 1,5 g/min ($\pm 0,1$).

O tempo total de extração foi de 3 horas, na primeira hora de extração em tempos de 15 minutos foi retirado o tubo coletor de extrato e adicionado outro tubo coletor previamente pesado, a fim de obter os dados necessários para a cinética de extração. Na segunda e terceira hora de extração, o frasco era pesado de 30 em 30 minutos. Como citado no item anterior o tempo médio para cada experimento foi de aproximadamente 6 horas.

As extrações foram realizadas nas temperaturas de 20, 35 e 50 °C e pressões de 150, 200 e 250 bar, a porcentagem de co-solvente utilizado nas extrações foi de 5, 10 e 15 % em volume. Foram realizadas triplicatas do ponto central dos experimentos, ou seja, na temperatura de 35 °C, pressão de 200 bar e

adição de 10 % de etanol como co-solvente. Foi feito um planejamento fatorial linear 2^3 , com triplicata do ponto central.

Para a etapa de extração com co-solvente foi necessária uma etapa de retirada do co-solvente antes de armazenar o extrato. Os frascos de extrato foram levados para a estufa a vácuo (Marca: Marconi, Modelo: MA-030/12), na qual permaneceram a 60 °C até atingir peso constante. Os frascos foram então pesados, lacrados e armazenados para posterior análise.

3.7.3 Extração supercrítica da própolis bruta com/sem adição de co-solvente

Aproximadamente 5 gramas própolis bruta foi misturada com esferas de vidro e então empacotadas no extrator de modo a não formar caminhos preferenciais. O extrator era então conectado ao sistema de extração e ajustavam-se as condições operacionais de temperatura e pressão. O procedimento para a extração com própolis bruta seguiu o mesmo método e condições descrito no item anterior (3.7.2). Também foram realizadas triplicatas do ponto central, calculando a variância nestes pontos.

Foram feitos 4 ensaios com própolis bruta sem a adição de co-solvente nas seguintes condições: temperatura de 20 °C e pressão de 150 bar; temperatura de 50 °C e 150 bar; temperatura de 20 °C e pressão de 250 bar e temperatura de 50 °C e 250 bar.

Foram feitos 2 ensaios adicionais com própolis bruta no equipamento descrito no item 3.4.1 da seção Materiais e Métodos. Aproximadamente 5 gramas de própolis bruta foram misturadas a esferas de vidro e empacotadas no extrator. Antes de fechar o extrator, o co-solvente foi adicionado dentro do extrator, em

contato direto com a própolis bruta. No primeiro ensaio adicionou-se 10 % em massa de acetato de etila (Ecibra, Santo Amaro, SP) e no segundo ensaio adicionou-se 10 % em massa de etanol (Merck, Darmstadt, Germany), ambos os testes foram feitos a 35 °C e 200 bar de pressão. Estes testes foram feitos baseados no artigo de Lee et al. (2006) a qual indicou melhora no rendimento de extração do Artepillin C quando utilizaram acetato de etila em relação ao uso de etanol como co-solvente.

Para a etapa de extração com co-solvente foi necessária uma etapa de retirada do co-solvente antes de armazenar o extrato. Os frascos de extrato foram levados para a estufa a vácuo (Marca: Marconi, Modelo: MA-030/12), na qual permaneceram a 60 °C para que ocorresse a evaporação do co-solvente. Os frascos permaneceram na estufa até atingir o peso constante. Os frascos foram então pesados, lacrados e armazenados em local inerte e sob refrigeração para posterior análise.

3.7.4 Determinação experimental da solubilidade com base nos dados de extração supercrítica da própolis

O procedimento utilizado para a determinação da solubilidade foi o uso dos pontos experimentais correspondentes a etapa linear das curvas de extração para todos os experimentos. Utilizou-se ajuste pelo método dos mínimos quadrados para se estimar o valor da solubilidade, considerando-se a relação massa de extrato por massa de solvente, sendo a solubilidade dada pelo coeficiente angular da reta, como indicado na Figura 2.3 do Capítulo 2.

3.7.5 Construção das isotermas de rendimento global

As isotermas de rendimento global para os experimentos de extração supercrítica do extrato etanólico de própolis seco e da própolis bruta foram construídas a partir de valores de rendimento global e massa de CO₂. O rendimento global (X_0) é definido como massa de extrato obtida pela massa de matéria-prima usada na extração, dado em porcentagem.

Os valores de X_0 foram obtidos nas temperaturas de 20 °C, 35 °C e 50 °C, pressões de 150, 200 e 250 bar. Foram mantidas constantes as massas de matéria-prima inicial, vazão de CO₂ e co-solvente (etanol), quando este foi utilizado.

3.8 Análise química dos extratos

3.8.1 Espectrometria de massas com ionização por electrospray no modo negativo [ESI(-)-MS]

As análises dos extratos supercríticos obtidos a partir da própolis bruta e do extrato etanólico de própolis seco, referentes aos testes preliminares descritos no item 3.4 da seção Materiais e Métodos, foram feitas por espectrometria de massas com fonte de ionização por eletrospray no modo negativo (ESI(-)-MS), utilizando a metodologia descrita por Sawaya et al. (2004). A identificação dos compostos químicos foram feitas no Laboratório Thomson de Espectrometria de Massas do

Instituto de Química da UNICAMP pela Dra. Alexandra Sawaya, sob coordenação do Prof. Dr. Marcos N. Eberlin.

Os extratos supercríticos obtidos a partir da própolis bruta foram dissolvidos e diluídos à concentração de aproximadamente 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ em solução contendo 70 % (v/v) de metanol grau cromatográfico (Merck, Darmstadt, Alemanha) e 30 % (v/v) de água deionizada. Em seguida foi acrescentado 0,5 % (v/v) de hidróxido de amônio (Merck, Darmstadt, Alemanha) para ser analisado em modo negativo. As soluções foram inseridas diretamente na fonte de ionização por eletrospray (ESI) por meio de bomba tipo seringa numa vazão de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ e analisadas no espectrômetro de massas Q-TRAP (Applied Biosystems, Concord, Canadá). As condições utilizadas foram: capilar de - 4000 V, cone de - 40 V, temperatura de 200 $^{\circ}\text{C}$ e espectros na faixa de 140 a 700 m/z em modo negativo. A identificação dos compostos presentes nos extratos foi feita por fragmentação de íons em comparação com espectros obtidos na literatura.

3.8.2 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa

A análise química dos extratos foi realizada a fim de monitorar quatro compostos importantes presentes na própolis os quais possuem comprovada atividade biológica: Artepillin C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico) (DHCA), ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico (PHCA), ácido *p*-cumárico e canferide. Na Figura 3.4 pode ser visualizadas as estruturas químicas dos quatro marcadores selecionados para a análise química da própolis.

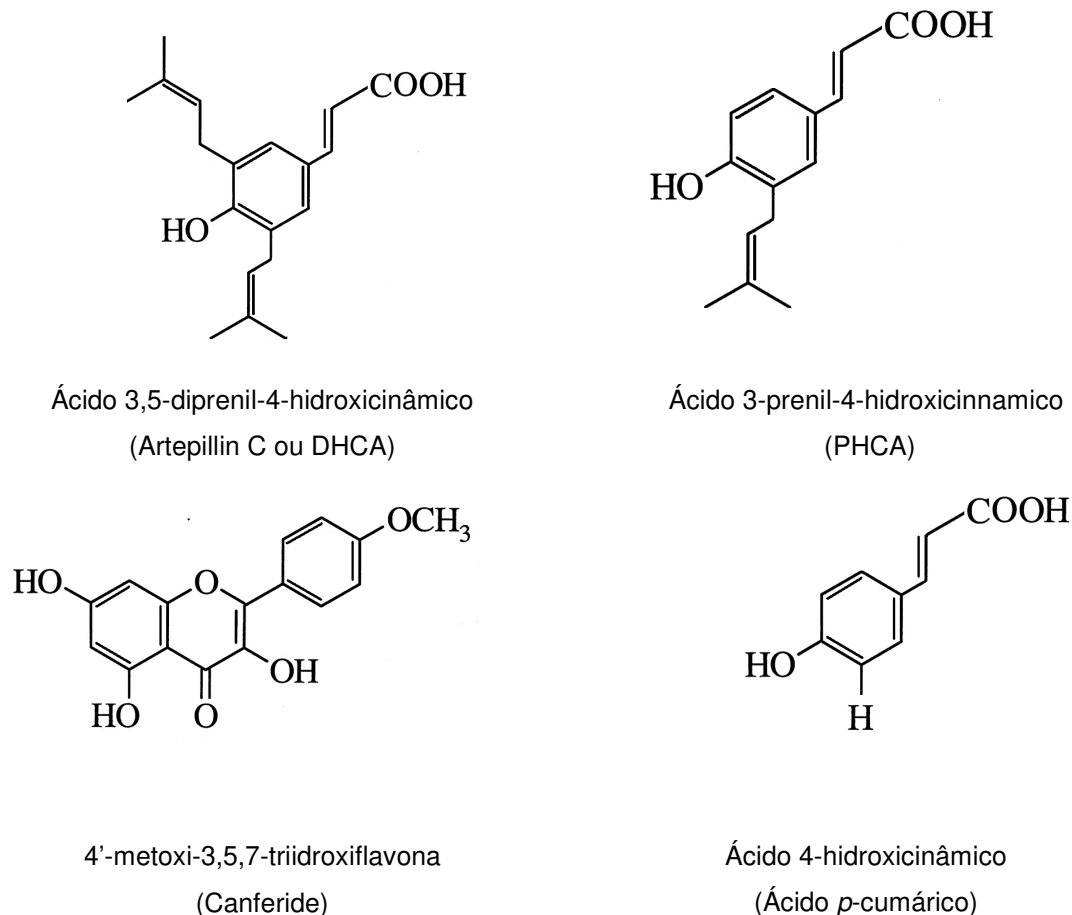


Figura 3.4. Estrutura química dos marcadores utilizados na análise química das amostras de própolis.

As análises químicas dos quatro compostos selecionados foram feitas na Natural Labor – Análises e Pesquisas Ltda, com sede na cidade de Campinas, São Paulo, pela Dra. Maria Cristina Marcucci Ribeiro.

A análise dos compostos foi realizada através da cromatografia líquida de alta eficiência (Merck-Hitachi, Darmstadt, Germany), equipado com bomba (Merck-Hitachi, modelo D-7100) e um detector de fotodiodos e injetor automático. A separação foi feita através de coluna em fase reversa Lichrochart 125-4 (Merck-Hitachi, Darmstadt, Germany) (RP-18, 12,5 x 0,4 cm, 5 µm de tamanho de

partícula). As condições cromatográficas utilizadas foram: fase móvel água-ácido fórmico (Merck, Darmstadt, Germany) (95:5, v/v, solvente A) e metanol grau cromatográfico (Merck, Darmstadt, Germany) (solvente B). A eluição foi desenvolvida em vazão de 1 mL/min utilizando-se gradiente linear. O tempo máximo de análise foi de 50 minutos e a detecção efetuada em comprimentos de onda de 280 nm.

A identificação dos compostos foi realizada através da comparação do tempo de retenção dos compostos selecionados e espectro UV visível (200-400 nm), com padrões isolados e adquiridos comercialmente. A quantificação dos compostos foi feita utilizando padrões externos. O programa utilizado para a análise de dados foi o Merck-Hitachi, modelo D-7100 Chromatography Data Station – DAD Manager.

3.9 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante (AA) do extrato etanólico de própolis e dos extratos obtidos através da tecnologia supercrítica foi determinada pelo método desenvolvido pela Natural Labor – Análises e Pesquisas Ltda adaptado da literatura (Banskota et al., 2000; Bankova e Marcucci, 2000; Hatano et al., 1989) baseado no sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH). As análises de atividade antioxidante foram realizadas na Universidade Bandeirante de São Paulo (UNIBAN).

Pode-se verificar pela estrutura do DPPH (Figura 3.5), que o composto pode aceitar um elétron ou radical hidrogênio para se transformar em uma molécula estável, que apenas raramente pode ser oxidada irreversivelmente (BLOIS, 1958). Conforme o DPPH vai sendo reduzido por um antioxidante, de

acordo com o observado na Figura 3.5, seu elétron se torna emparelhado e a absorvidade desaparece (BRAND-WILLIAMS et al., 1995).

A Figura 3.5 apresenta a reação de sequestro do radical livre pelo 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) pelo agente redutor (própolis).

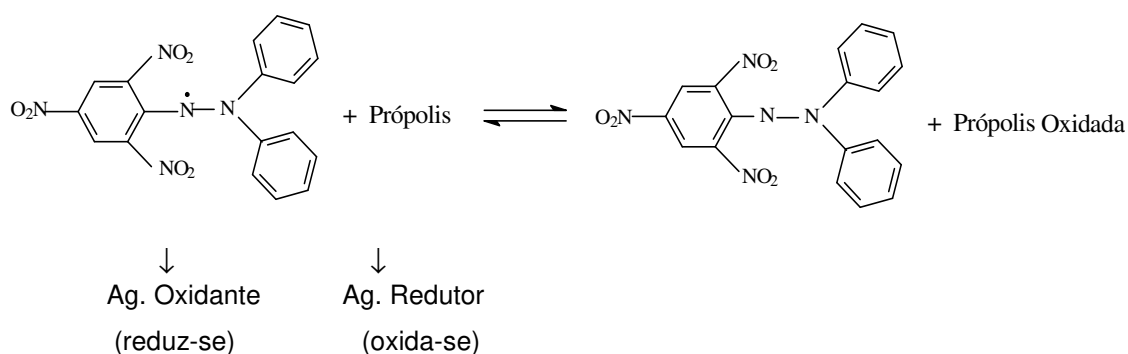


Figura 3.5. Reação de sequestro do radical livre (DPPH) pela própolis.

A partir da informação do teor de sólidos solúveis em etanol (EEP) foram realizadas as seguintes diluições: o extrato a 1 % v/v foi diluído a 0,01 % (v/v). Foram organizados 8 tubos de ensaios os quais foram enumerados de 0 a 7. Foram adicionados os volumes de etanol e de extrato de própolis em cada tubo de ensaio, de acordo com a diluição desejada. O volume de DPPH é adicionado no 1^o tubo e o cronômetro imediatamente ligado, desligando-o depois de um minuto. O DPPH foi adicionado nos tubos restantes a cada 1 minuto. A amostra é agitada e após 30 minutos da adição do DPPH no primeiro tubo a leitura é feita em espectrofotômetro (Varian, Modelo Cary 50) no comprimento de onda de 528 nm.

Com os resultados das absorbâncias nas respectivas concentrações pode-se obter a porcentagem de atividade antioxidante, considerando que 0 µg/mL

corresponde a 100 % de atividade antioxidante, ou seja, nesta concentração não foi adicionada a amostra, sendo então etanol e DPPH (branco). Após a obtenção destes resultados, um gráfico foi construído, onde na ordenada tem-se os valores de atividade antioxidante (%) e na abscissa tem-se os valores de concentração de extrato ($\mu\text{g/mL}$). Com a equação da reta e através do método dos mínimos quadrados obtêm-se os valores de ED_{50} (concentração eficiente que elimina 50% dos radicais livres). Os resultados da atividade antioxidante dos extratos estão apresentados no ANEXO C.

3.10 Atividade antimicrobiana

As análises antimicrobianas foram realizadas na Universidade Bandeirantes (UNIBAN) em São Paulo, utilizando a metodologia descrita por Silva (1998).

A atividade antimicrobiana *in vitro* foi empregada contra os microorganismos patogênicos: *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Escherichia coli* (ATCC 25922). As culturas dos microorganismos foram mantidas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ em caldo Tioglicolato (Merck, Darmstadt, Germany) + 15 % de glicerol e reativadas em meio apropriado para cada cepa.

A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de difusão em disco para confirmar sua ação contra os microorganismos citados. Foi estipulada qualitativamente pelo método de difusão em disco preconizado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008).

Os inóculos foram preparados através de suspensão direta do crescimento microbiano com turvação equivalente a 0,5 da escala de Mc Farland ($1,0 \times 10^8$

UFC/mL), sendo ajustada entre 0,08 – 0,10 de densidade óptica (D.O.) a 625 nm em espectrofotômetro em 5,0 mL de solução salina a 0,85 % (NaCl, Synth, Diadema, SP). Em seguida um *swab* estéril foi imerso no inóculo e estriado na placa de Petri contendo meio de cultura Mueller-Hinton ágar (Merck, Darmstadt, Germany), que foi utilizado para as bactérias, *S. aureus* e *E.coli*. Após 20 minutos, foram colocados discos de papel filtro Whatman n. 3 previamente impregnados com 30 µL de cada amostra numa concentração a 2 %. Os discos impregnados com os extratos de própolis foram levados para secar em estufa a 60 °C, por aproximadamente 15 minutos, para a eliminação de qualquer resíduo etanólico. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h e em seguida o halo de inibição foi medido com paquímetro.

Para a levedura *Candida albicans*, o crescimento microbiano foi monitorado à temperatura ambiente em local escuro e seco, empregando como meio de cultivo o ágar Sabouraud (Merck, Darmstadt, Germany).

Para o tratamento controle, foram inoculadas placas com as culturas ativadas de bactérias, não recebendo o disco com extrato de própolis. A atividade antimicrobiana foi determinada pela formação ou não de halo inibitório ao redor dos discos.

3.11 Análise multivariada

A quimiometria foi utilizada para correlacionar as amostras estatisticamente. A análise de Componentes Principais (PCA) foi executada usando a versão 2.60 do programa Pirouette (Infometrix, Woodinville, WA, USA). A análise foi feita na Natural Labor – Análises e Pesquisas Ltda, com sede na cidade de Campinas, São Paulo, pela Dra. Angela Custódio.

A análise quimiométrica foi feita a partir dos três diferentes tipos de extração supercrítica: extração supercrítica realizada a partir do extrato etanólico de própolis seco, extração supercrítica a partir do EEPS utilizando diferentes concentrações de etanol como co-solvente (5, 10 e 15 %), extração supercrítica a partir da própolis bruta com adição de etanol como co-solvente, nas proporções de 0, 5, 10 e 15 %.

A análise quimiométrica relacionou também as seguintes variáveis: rendimento de extração, composição em termos dos quatro marcadores pré-selecionados (Artepillin C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico ou DHCA), ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico (PHCA), ácido *p*-cumárico e canferide e atividade antioxidante.

A atividade antimicrobiana feita nos extratos obtidos não acrescentou-se na análise quimiométrica, pois em razão da obtenção de atividade antimicrobiana em alguns extratos, optou-se por não considerá-los na análise.

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foi investigado o efeito da temperatura, pressão e quantidade de co-solvente na extração supercrítica dos extratos etanólicos de própolis e da própolis bruta, atividade antioxidante e antimicrobiana dos extrato etanólico de própolis seco (EEPS) e dos extratos obtidos via tecnologia supercrítica. Os resultados obtidos serão discutidos conforme a sequência apresentada na seção Materiais e Métodos.

4.1 Caracterização da matéria-prima

A própolis apresentava aroma resinoso e balsâmico, cor esverdeada, sabor picante, consistência rígida à temperatura ambiente e pedaços homogêneos. De acordo com o laudo da própolis, fornecido pela Bioessens Ltda (Cotia, Brasil), a própolis encontra-se dentro dos padrões exigidos pelo Ministério da Agricultura (BRASIL, 2001).

Os resultados da análise de umidade medida, conforme metodologia descrita no item 3.2 da seção Materiais e Métodos, foram expressos em termos de substâncias voláteis, já que em temperatura de aproximadamente 100 °C e vácuo, ocorre a volatilização de outros compostos além da água. Os resultados para cada uma das três amostras em base seca estão apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Resultados do teor de umidade da própolis bruta.

| Amostra | Subst. Voláteis [%] | Sólidos Totais [%] |
|---------|---------------------|----------------------|
| 1 | 8,79 | 91,21 |
| 2 | 8,80 | 91,20 |
| 3 | 8,97 | 91,03 |
| Média | 8,85 ($\pm 0,07$) | 91,14 ($\pm 0,07$) |

4.2 Caracterização do extrato etanólico de própolis seco

O extrato etanólico de própolis foi obtido em triplicata através da metodologia descrita no item 3.3 da seção de Materiais e Métodos. O extrato obtido foi analisado em termos de rendimento global médio e da concentração de quatro marcadores (Artepillin C, ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico, *p*-cumárico e canferide) previamente selecionados e identificados por cromatografia líquida de alta eficiência, conforme metodologia descrita no item 3.8. Também foi avaliada a atividade antioxidante do EEPS através do método de DPPH e a atividade antimicrobiana *in vitro* contra *C. albicans*, *E. coli* e *S. aureus*.

O extrato etanólico de própolis seco apresentou coloração verde escura acentuada e odor muito forte, característico de própolis. Sua consistência é extremamente viscosa e possui forte aderência em contato com a pele ou qualquer outro material.

O extrato etanólico de própolis seco teve um rendimento médio de $39,45 \pm 1,2$ %, compatível com o resultado obtido por Funari et al. (2007) que obtiveram $38,34 \pm 2,05$ % (m/m).

O extrato etanólico de própolis de origem brasileira obtido por Funari et al. (2007) foi feito através de metodologia diferente deste trabalho, dissolveram 90 g

de própolis crua em 190 mL de etanol por 90 dias. Porém os resultados de rendimento de extração foram similares, indicando que 24 h de extração é suficiente. Ambos os trabalhos analisaram o extrato etanólico de própolis seco obtido por HPLC.

A Tabela 4.2 apresentou os resultados de concentração em mg/g dos quatro marcadores previamente selecionados para a análise química e rendimento médio do extrato etanólico de própolis seco (EEPS), comparados com os resultados obtidos por Funari et al. (2007).

Tabela 4.2. Resultados obtidos do EEP frente ao rendimento global, marcadores selecionados para a análise por HPLC e atividade antioxidante.

| | Rend. Global | Artepillin C | PHCA* | <i>p</i> -cumárico | Canferide |
|----------------------|--------------|--------------|--------|--------------------|-----------|
| | [%] | [mg/g] | [mg/g] | [mg/g] | [mg/g] |
| EEP | 39,45 ± 1,2 | 52,78 | 14,52 | 27,69 | 24,31 |
| Funari et al. (2007) | 38,34 ± 2,05 | 33,80 | - | 6,30 | 6,30 |

* a concentração do PHCA não consta no trabalho de Funari et al. (2007).
mg do composto/g de extrato analisado.

Os resultados apresentados na Tabela 4.2 mostram que apesar dos valores de rendimento obtidos no extrato etanólico de própolis não apresentarem diferença significativa, as composições em mg/g de três dos quatro marcadores selecionados para a análise foram distintas entre si. Pode-se observar na Tabela 4.2 que a concentração de Artepillin C é 56,16 % maior do que aquele obtido por Funari et al. (2007). Já para os compostos *p*-cumárico e canferide o aumento na concentração foi maior, em torno de 340 % e 286 %, respectivamente.

De acordo com Pereira et al. (2002) e Catchpole et al. (2004) este é o maior problema para o uso da própolis em fitoterapia, já que a sua composição química varia muito com a flora da região, época de colheita, espécie de abelha (no caso brasileiro também o grau de “africanização” da *Apis mellifera* pode influenciar a sua composição), assim como as técnicas de obtenção do extrato.

A Figura 4.1 apresenta um cromatograma típico de extrato etanólico de própolis de origem brasileira obtido por HPLC, com os respectivos tempos de retenção dos quatro marcadores selecionados para a análise: Artepillin C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico-DHCA), ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico (PHCA), ácido *p*-cumárico e canferide.

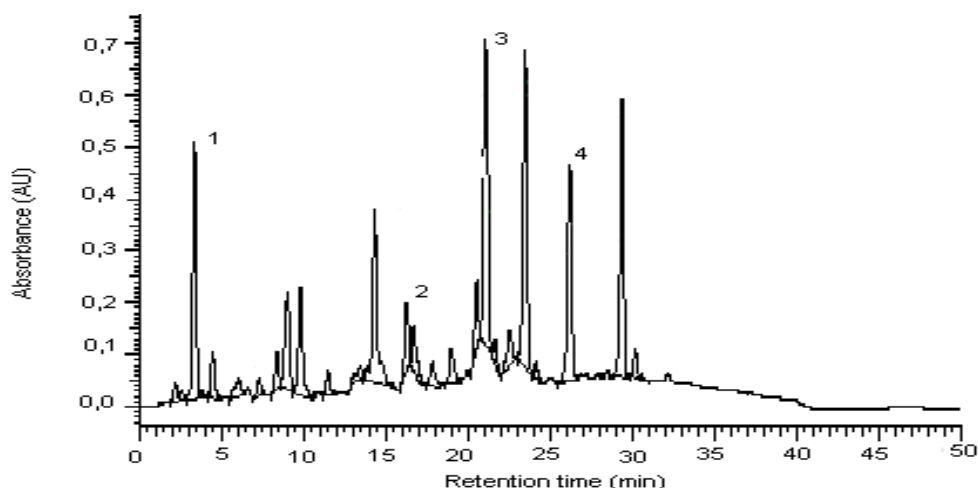


Figura 4.1. Cromatograma típico de extrato etanólico de própolis obtido por HPLC.

A Tabela 4.3 apresenta os picos dos quatro marcadores analisados por HPLC (tempos de retenção, fórmula e massa molar).

Tabela 4.3. Picos e tempos de retenção dos marcadores analisados.

| Pico | Tempo Retenção [min] | Composto | Fórmula Molecular | Massa Molar |
|------|-------------------------|------------------------|--|-------------|
| 1 | 3,37 | Ác. <i>p</i> -cumárico | C ₉ H ₈ O ₃ | 164,09 |
| 2 | 16,29 | PHCA | C ₁₄ H ₁₆ O ₃ | 232,14 |
| 3 | 20,55 | Canferide | C ₁₆ H ₁₂ O ₆ | 300,16 |
| 4 | 26,21 | Artepillin C | C ₁₉ H ₂₄ O ₃ | 300,19 |

A análise antioxidante do extrato etanólico de própolis foi feita através do método DPPH e apresentou valor de 7,58 µg/mL. Esta técnica fornece o resultado em valor de ED₅₀ (concentração eficiente que elimina 50 % dos radicais livres). Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será seu ED₅₀ e maior sua atividade antioxidante. De acordo com Banskota et al. (1998) a atividade antioxidante da própolis deve possuir valores de ED₅₀ igual ou inferior a 10 µg/mL para apresentar boa atividade antioxidante, ou seja, o EEPS analisado possui alta atividade antioxidante.

A atividade antimicrobiana do extrato etanólico de própolis seco (EEPS) foi testada em três microorganismos: uma bactéria Gram positiva, *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), uma bactéria Gram negativa: *Escherichia coli* (ATCC 25922) e uma levedura :*Candida albicans* (ATCC 10231).

O extrato etanólico de propolis não inibiu *E. coli* e *C. albicans*, porém apresentou inibição de 10 mm para o microorganismo Gram positivo *S. aureus*, avaliado neste trabalho. Resultado idêntico ao encontrado por Park et al. (1998a) quando avaliaram diferentes proporções de etanol/água na obtenção de extratos etanólicos de própolis. Verificaram que para extratos obtidos com 90 e 95 %, a zona de inibição frente ao *S. aureus* foi de 10 mm, já para o extrato aquoso de própolis, não houve inibição frente ao *S. aureus*.

De acordo com Lindenfelser (1967), a própolis possui atividade antimicrobiana especialmente contra bactérias Gram positivas. Esta atividade é atribuída aos flavonóides, ácidos aromáticos e ésteres presentes na resina (BURDOCK, 1998). Porém a relação entre a estrutura e a atividade antimicrobiana dos constituintes da própolis é ainda desconhecida. Kedzia (1990) e Krol et al. (1993) relatam que o mecanismo de atividade antimicrobiana da própolis é complexa e pode ser atribuída a um sinergismo entre os compostos fenólicos e outros compostos presentes na resina.

4.3 Resultados experimentais obtidos da primeira fase dos testes preliminares

A Tabela 4.4 apresenta os resultados dos três testes preliminares da extração supercrítica da própolis bruta na temperatura de 40 °C, pressão de 300 bar (densidade do CO₂: 910,91 kg/cm³) (Angus et al., 1976).

Tabela 4.4. Condições experimentais e resultados obtidos nos testes preliminares.

| Teste | T [°C] | Pressão [bar] | Massa [g] | Tempo [h] | X _o [%] | Voláteis [%] | Despressurização [g] |
|-------|-----------|------------------|--------------|--------------|-----------------------|-----------------|-------------------------|
| 1 | 40 | 300 | 55,90 | 6 | 3,77 | 0,032 | 0,4644 |
| 2 | 40 | 300 | 5,05 | 5 | 9,73 | 0,405 | 0,0974 |
| 3 | 40 | 300 | 5,05 | 16 | 16,44 | 0,538 | 0,0512 |

X_o= massa de extrato obtido pela massa de matéria-prima usada na extração, dada em porcentagem.

Despressurização: representa a quantidade de extrato obtido na despressurização do sistema.

Pode-se observar na Tabela 4.4 que diferentes rendimentos de extração foram obtidos. O primeiro teste de extração apresenta o menor rendimento de

extração e a maior massa alimentada no extrator. Em princípio, a massa extraída na despressurização deveria ser desprezível em vista da redução gradativa da pressão do sistema e conseqüente redução da solubilidade. A Figura 4.2 mostra que a taxa de extração é praticamente constante. Como a vazão de CO₂ era baixa e o comprimento do extrator, aproximadamente 15 cm, era suficiente longo para promover a saturação na saída do extrator, podemos considerar que a solubilidade do material solúvel em CO₂ era de aproximadamente 4,6 g/kg a 300 bar e 40 °C. Com base neste valor de solubilidade, pode-se prever um longo período de extração para o primeiro teste e optou-se então por interromper a extração e reduzir a massa de própolis no extrator. O rendimento de extração de voláteis na armadilha de Porapak-Q que correspondeu a 0,032% foi desconsiderado visto que apenas uma pequena fração dos voláteis foi extraído.

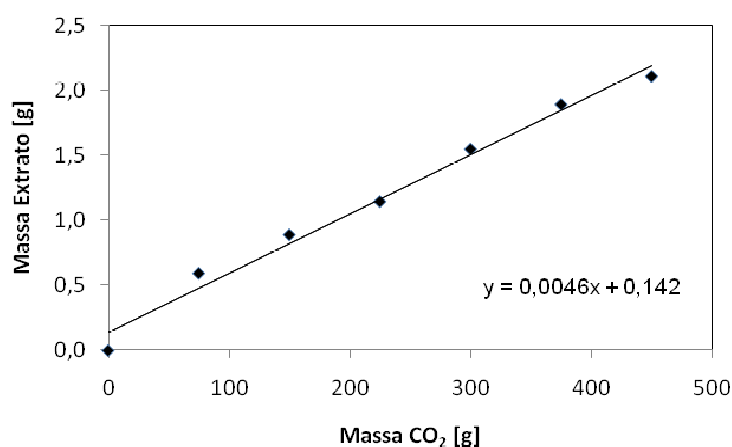


Figura 4.2. Curva de extração a 300 bar e 40 °C. Leito fixo contendo 55,90 g de própolis bruta.

Para o segundo e terceiro teste de extração, foi alimentado aproximadamente 5 gramas e o volume final foi completado com esferas de vidro

(leito inerte). Fez-se também um extrato etanólico do resíduo de própolis retido no extrator, obtendo-se rendimento de 35,77 % (cuja composição não foi avaliada). Neste caso poderia-se ter 2 extratos, um obtido com CO₂ e outro com etanol. Considerando os dois rendimentos, teria 44,9 % de rendimento de extração em um efeito combinado, lembrando que a extração só com etanol produz em média 39,45 % de extrato seco.

Como os três testes foram realizados com a própolis bruta, após a extração supercrítica, optou-se por obter o rendimento do extrato etanólico da própolis bruta retida dentro do extrator, com exceção do primeiro teste, que não foi realizado em decorrência de uma falha operacional. A metodologia para extração etanólica da própolis bruta está descrita no item 3.3 da seção Materiais e Métodos. Os rendimentos dos extratos etanólicos da própolis bruta que restaram dentro do extrator, após a extração supercrítica para o segundo e terceiro teste, foram de 35,77 % e 32,83 %, respectivamente.

Estes testes preliminares indicaram a quantidade adequada de própolis bruta que deveria ser utilizada no extrator, bem como forneceram uma idéia dos compostos presentes na própolis.

A composição do segundo teste, que apresentou maior rendimento global, foi determinada por espectrometria de massas com ionização por eletrospray no Laboratório de Espectrometria de Massas THOMSON do Instituto de Química da UNICAMP, conforme metodologia descrita no item 3.8.1 da seção Materiais e Métodos.

4.3.1 Resultados das análises químicas obtidas por espectrometria de massas com ionização por eletrospray em modo negativa – ESI(-)-MS

As análises dos extratos supercríticos obtidos a partir da própolis bruta foram feitas no Laboratório de Espectrometria de Massas THOMSON do Instituto de Química da UNICAMP, com a finalidade de obter um perfil químico (qualitativo) dos extratos supercríticos obtidos a partir da própolis bruta. A metodologia utilizada foi desenvolvida por Sawaya et al. (2004) e descrita no item 3.8.1 da seção Materiais e Métodos.

A técnica foi utilizada no modo negativo, com uso da técnica *fingerprinting* para análise do extrato supercrítico da própolis bruta na condição de 40 °C de temperatura e 300 bar de pressão, referente ao segundo teste preliminar. A Tabela 4.5 apresenta os compostos identificados nos extratos de própolis bruta utilizando ESI(-)-MS.

Tabela 4.5. Compostos identificados no extrato supercrítico obtido a partir da própolis bruta utilizando a técnica ESI(-)-MS.

| [M-H] ⁻ | Picos | Compostos |
|--------------------|-------|--|
| 147 | 1 | Ác. cinâmico |
| 163 | 2 | Ác. <i>p</i> -cumárico |
| 179 | 3 | Ác cafeico |
| 231 | 4 | Ác. 3-prenil-4-hidroxicinâmico |
| 247 | 5 | Ác. 3,4-dihidroxi-5-prenilcinâmico |
| 253 | 6 | Crisina |
| 269 | 7 | Apigenina |
| 299 | 8 | Ác. 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepillin C) |
| 315 | 9 | Ác. 3-hidroxi-2,2-dimetil-8-prenil-2H-1- benzopirano-6-propenóico |
| 363 | 10 | Ác. 3-cafeoilquínico |
| 447 | 11 | Ác. (E)-3-{4-hidroxi-3-[(E)-4-(2,3-dihidroxinamoiloxi)-3-metil-2-butenil]-5-prenil-fenil}-2-propenóico |
| 515 | 12 | Ác. 3,5-dicafeoilquínico |
| 677 | 13 | Ác 3,4,5-tricafeoilquínico |

Os extratos supercríticos foram comparados com componentes encontrados na própolis brasileira. A maioria dos compostos principais são ácidos orgânicos e fenóis, devido a sua fácil ionização em soluções básicas por deprotonação e, portanto, são transferidos eficientemente à fase gasosa como [M-H]⁻ - íons negativos. Um espectro de massas obtido a partir de íons existentes na amostra do extrato é apresentado na Figura 4.3.

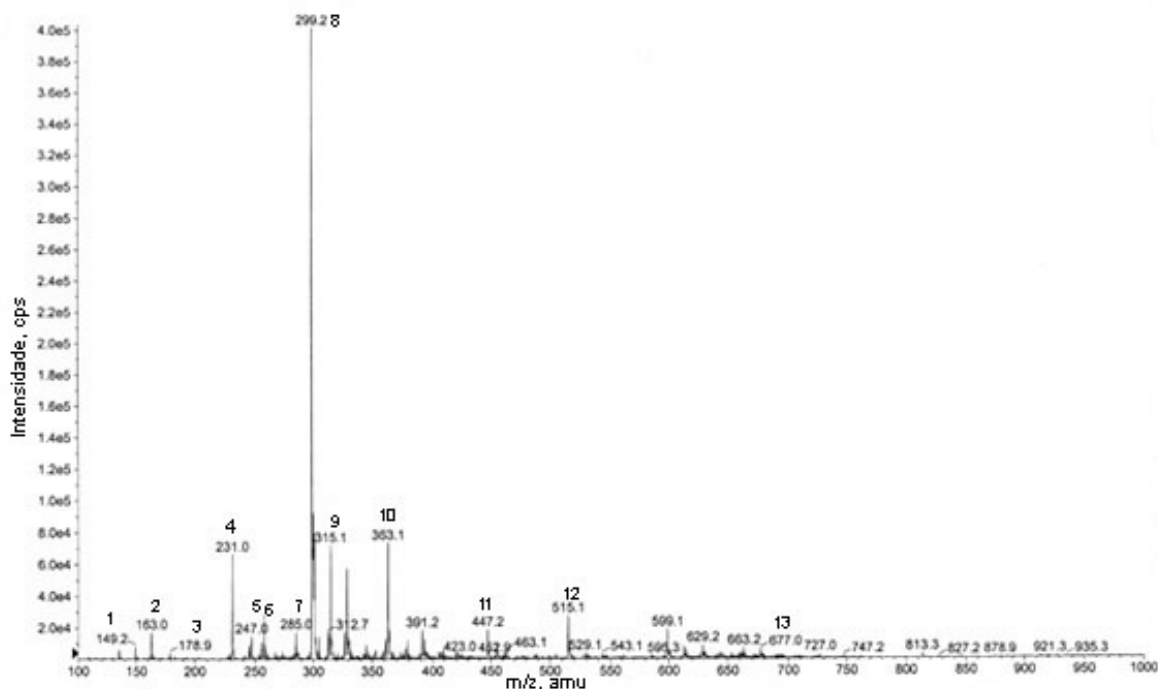


Figura 4.3. Espectro de massas ESI(-)-MS do extrato supercrítico obtido a partir da própolis bruta.

Os resultados obtidos neste estudo foram compatíveis com os apresentados por Sawaya (2006), que foram reportados na Tabela 2.1 da seção Revisão Bibliográfica. Todos os compostos identificados, com exceção da crisina, também foram identificados por Sawaya (2006) e representam a própolis verde do sudeste, com possível origem botânica a partir da *Baccharis dracunculifolia*.

Os principais compostos identificados neste estudo foram os ácidos: *p*-cumárico e derivados (cinâmico, 3-prenilhidroxicinâmico, 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico), ferúlico, 3-cafeoilquinico, 3,5-dicafeoilquinico (BASNET et al., 1996; PEREIRA et al., 2002) e 3,4,5-tricafeoilquinico. Também foram identificados os flavonóides (crisina, pinocembrina, apigenina), 2,2-dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano (MARCUCCI e BANKOVA, 1999; BANKOVA et al., 2000).

4.4 Resultados experimentais da segunda fase dos testes preliminares

O equipamento experimental utilizado para a segunda fase dos testes preliminares está descrito no item 3.4.1 da seção Materiais e Métodos e encontra-se no Laboratório de Extração Termodinâmica Aplicada e Equilíbrio (EXTRA-E) da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP. Para estes experimentos utilizou-se como matéria-prima o extrato etanólico de própolis seco (EEPS), obtido previamente de acordo com item 3.3 da seção Materiais e Métodos.

Nestes experimentos foram verificados o rendimento global do fracionamento com dióxido de carbono supercrítico do extrato etanólico de própolis seco (EEPS) na temperatura de 60 °C, pressões de 150, 200, 250, 300 e 350 bar e a concentração de quatro componentes previamente selecionados.

A Tabela 4.6 apresenta o rendimento global nas diferentes condições experimentais e em função do tempo de extração, dividido em primeira e segunda hora de extração, totalizando 2 horas de extração

Tabela 4.6. Rendimento global de extração (X_o) em função das condições operacionais e do tempo de extração.

| Teste | T [°C] | P [bar] | Densidade* [kg/m ³] | X_o [%] | |
|-------|-----------|------------|------------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | | | | 1 ^a h de extração | 2 ^a h de extração |
| 1 | 60 | 150 | 607,3 | 2,73 | 3,82 |
| 2 | 60 | 200 | 725,4 | 5,68 | 7,71 |
| 3 | 60 | 250 | 787,7 | 8,30 | 10,51 |
| 4 | 60 | 300 | 830,6 | 8,73 | 11,90 |
| 5 | 60 | 350 | 863,6 | 9,61 | 13,07 |

* Valores de densidade do CO₂ obtidos em Angus et al. (1976).

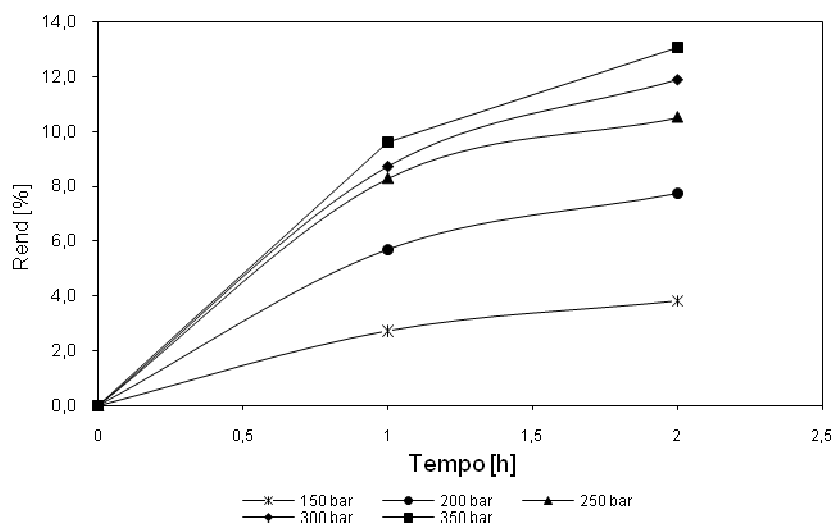


Figura 4.4. Isotermas de rendimento global de extratos supercríticos obtidos a partir de extratos etanólicos de própolis seco (EEPS) a 60 °C .

A Tabela 4.6 e a Figura 4.4 apresentam o rendimento global nas diferentes condições operacionais e em função do tempo de extração, primeira e segunda hora de extração, onde o efeito da pressão foi transcrito em termos da densidade do dióxido de carbono. As variáveis vazão do solvente ($1,5 \text{ g/min} \pm 0,1$), massa de extrato etanólico seco (aproximadamente 5 gramas) e temperatura de extração (60 °C) foram mantidas constantes em todas as extrações.

O rendimento global de extração na primeira hora variou de 2,73 % na pressão de 150 bar a 9,61 % na pressão de 350 bar e na segunda hora de 3,82 % a 13,07 %. Mantendo-se a temperatura fixa, em 60 °C e aumentando a pressão de extração, ocorreu aumento no rendimento global de extração, de quase 4 vezes, devido ao aumento da densidade do CO_2 , que passou de $607,3 \text{ kg/cm}^3$ para $863,6 \text{ kg/cm}^3$.

A partir da Tabela 4.6 pode-se construir a Figura 4.5 que correlaciona na condição de 2 horas de extração, o rendimento global (X_0) em função da densidade do dióxido de carbono.

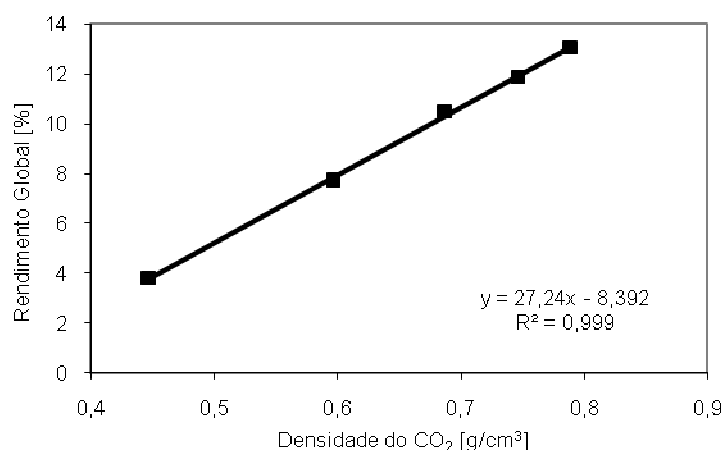


Figura 4.5. Rendimento global de extração em função da densidade do dióxido de carbono.

Como um dos objetivos da extração supercrítica foi verificar a possibilidade de fracionar o extrato visando alguns componentes alvos que possuam propriedades funcionais, a amostra do extrato etanólico de própolis seco (EEPS) e dos extratos supercríticos obtidos a 60 °C e pressões de 150, 200, 250, 300 e 350 bar foram analisados quanto à concentração de quatro componentes alvos: Artepillin C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico) (DHCA), ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico (PHCA), ácido *p*-cumárico e canferide.

A análise dos compostos foi realizada por cromatografia líquida acoplada a um detector de arranjo de diodos de acordo com o item 3.8.2 da seção Materiais e Métodos. A Tabela 4.7 apresenta as concentrações destes compostos em mg/g.

Tabela 4.7. Concentração em mg/g de quatro componentes selecionados no extrato etanólico de própolis seco (EEPS) e nos extratos obtidos por extração com fluido supercrítico.

| Componentes | EEPS | 150 bar | 200 bar | 250 bar | 300 bar | 350 bar |
|-------------------------------------|-------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Artepillin C (DHCA) | 40,41 | 38,67 | 46,62 | 24,75 | 31,33 | 38,06 |
| Ac. 3-prenil-4-hidrocinâmico (PHCA) | 13,01 | 1,51 | 2,38 | 2,63 | 4,70 | 5,07 |
| Ác. <i>p</i> -cumárico | 21,04 | 7,33 | 8,37 | 10,02 | 17,77 | 18,72 |
| Canferide | 16,12 | 1,88 | 2,75 | 3,32 | 6,27 | 6,43 |
| Total | 90,58 | 49,39 | 60,12 | 40,71 | 60,07 | 68,28 |

Pode-se observar que o Artepillin C comportou-se de maneira diferente nas pressões de 150 e 200 bar, com ponto de máximo de concentração em 200 bar, pois sua concentração foi superior que nas pressões de 300 e 350 bar, possivelmente devido a complexidade da mistura. O mesmo comportamento foi observado na temperatura de 40 °C e pressões de 200 , 300 e 400 bar, no trabalho de Piantino (2008), que avaliou a extração supercrítica de alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*), que é a provável fonte botânica da própolis verde avaliada neste trabalho.

Dos quatro componentes de interesse, observa-se que, excetuando o Artepillin C, as concentrações dos outros três componentes foram bem menores que do extrato obtido à baixa pressão (EEPS). Para o Artepillin C, existe uma tendência de obter a mesma concentração do EEPS quando a pressão é aumentada. Para pressões menores, observa-se que o CO₂ é mais seletivo para fracionamento, no entanto os rendimentos são menores. O fracionamento vai depender do grau de polaridade das moléculas, onde o CO₂ extrairá preferencialmente os componentes apolares. No entanto com o aumento de pressão e conseqüente aumento de densidade, o dióxido de carbono fica menos apolar e aumenta a sua capacidade de extrair componentes mais polares. Pode

ser observado que para a maioria das substâncias investigadas ocorre aumento na concentração com o aumento da pressão, devido ao aumento da densidade do dióxido de carbono e aumento de sua polaridade.

Observando a estrutura química do ácido hidroxicinâmico e seus derivados prenilados (DHCA e PHCA), é possível constatar que a adição de um grupo prenil na molécula aumenta o rendimento da extração supercrítica. A extração do Artepillin C (2 grupo prenil) com dióxido de carbono supercrítico foi muito melhor que a extração do ácido *p*-cumárico (0 grupo prenil), e a extração do Artepillin C (2 grupos prenil) é melhor que o PHCA (1 grupo prenil). Isto indica que a adição do grupo prenil diminui a polaridade da molécula, favorecendo a extração supercrítica (PIANTINO et al., 2008).

Os rendimentos de extração puderam ser correlacionados linearmente com a densidade do solvente, conforme pode-se observar na Figura 4.5. Com o aumento da pressão do processo, aumenta-se o rendimento de extração, mas diminui-se a seletividade do CO₂ no fracionamento, pois aproxima cada vez mais a concentração do extrato obtido por extração supercrítica (ESC) com a do extrato de origem (EEPS).

4.5 Extração supercrítica do extrato etanólico de própolis (EEPS), composição química, atividade antioxidante e atividade antimicrobiana

A temperatura e a pressão influenciam diretamente na solubilidade dos solutos, visto que a solubilidade depende da densidade do solvente e da pressão de vapor do soluto. A solubilidade do extrato no solvente foi obtida através da etapa de taxa constante de extração e é função de propriedades do sistema soluto-solvente. Como o poder de solubilização de um fluido está diretamente

relacionado com sua densidade, pode-se esperar que a solubilidade de um soluto varie com a pressão.

A pressão não só afeta a solubilidade de um determinado composto no solvente (devido a alteração da densidade) como também afeta o número de compostos solúveis no solvente. Desta forma, para maiores pressões o rendimento de extração também é maior.

4.5.1 Rendimento e cinética de extração

A solubilidade da mistura foi obtida através da inclinação inicial da curva de extração referente a temperatura e pressão para cada experimento, conforme descrito no item 3.7.4 da seção Materiais e Métodos.

A Tabela 4.8 apresenta o efeito da temperatura e da pressão sobre os rendimentos globais de fracionamento do extrato etanólico de própolis seco (EEPS), empregando dióxido de carbono como solvente para cada experimento. Apresenta também os valores médios da solubilidade obtida para cada experimento.

Tabela 4.8. Rendimentos globais de extração e solubilidade em função das variáveis temperatura e pressão.

| T [°C] | P [bar] | Corrida | ρ_{CO_2} [kg/m ³]* | X ₀ [%]** | Solubilidade [g _{soluto} /Kg _{CO2}] |
|--------|---------|---------|-------------------------------------|----------------------|--|
| 20 | 150 | 1 | 903,6 | 11,90 ± 2,07 | 2,2 |
| | 200 | 2 | 951,4 | 12,18 ± 1,29 | 2,1 |
| | 250 | 3 | 963,3 | 12,37 ± 1,37 | 2,4 |
| 35 | 150 | 4 | 815,0 | 13,35 ± 0,02 | 2,1 |
| | 200 | 5 | 866,1 | 14,91 ± 0,06 | 2,3 |
| | 250 | 6 | 901,7 | 15,36 ± 0,40 | 2,7 |
| 50 | 150 | 7 | 699,2 | 12,32 ± 1,11 | 2,2 |
| | 200 | 8 | 784,6 | 14,75 ± 0,97 | 2,3 |
| | 250 | 9 | 834,7 | 17,95 ± 2,17 | 2,8 |

* Angus et al. (1976).

** X₀ = (kg extrato/kg de matéria-prima)*100 (% base seca), valores médios de triplicatas de extrações.

Pode-se observar na Tabela 4.8, que nas condições de temperatura de 20, 35 e 50 °C e pressões de 150, 200 e 250 bar investigadas a variação do valor da densidade do solvente é de 699,2 a 963,3 kg/m³. Observa-se que o máximo e o mínimo rendimento foram obtidos a 50 °C/250 bar (17,95 % ± 2,17) e 20 °C/150 bar (11,90 % ± 2,07), respectivamente.

Na pressão de 250 bar, o rendimento global aumenta de 12,37 % b.s. para 17,95 % b.s., nas temperaturas de 20 e 50 °C. Este comportamento corresponde às mudanças das propriedades físicas do CO₂, principalmente da densidade, que está relacionada com o poder de solvatação. O mesmo comportamento pode ser observado para as demais pressões, ou seja, 150 e 200 bar.

A Figura 4.6 apresenta a cinética de extração supercrítica do extrato etanólico de própolis. As condições operacionais foram de 20 °C de temperatura e pressões de 150, 200 e 250 bar. As Figuras 4.7 e 4.8 apresentam as cinéticas de extração supercrítica do extrato etanólico de própolis nas temperaturas de 35 °C e 50 °C, respectivamente.

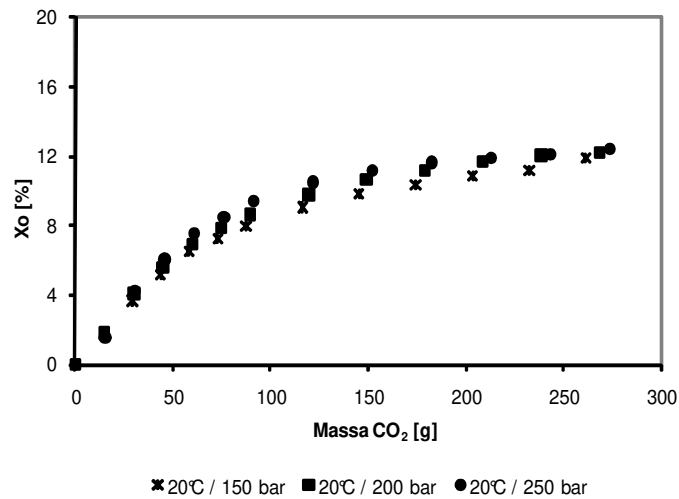


Figura 4.6. Curva de extração supercrítica na temperatura de 20 °C e pressões de 150 bar, 200 bar e 250 bar.

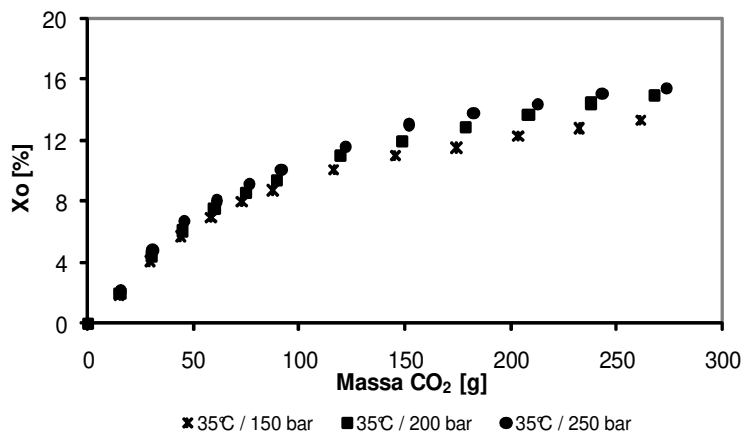


Figura 4.7. Curva de extração supercrítica na temperatura de 35 °C e pressões de 150 bar, 200 bar e 250 bar.

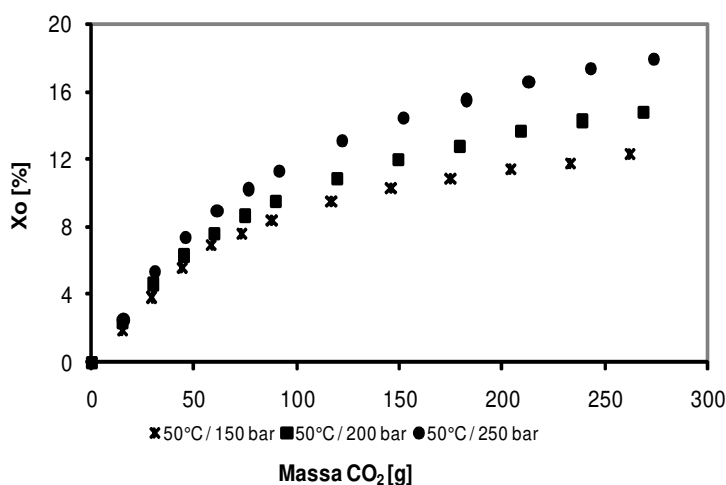


Figura 4.8. Curvas de extração supercrítica do extrato etanólico de própolis: à 50 °C e pressões de 150, 200 e 250 bar.

Pode-se observar na Tabela 4.8 e Figura 4.6, que o aumento da pressão na temperatura de 20 °C influencia pouco no rendimento de extração. Nesta temperatura, o máximo rendimento obtido foi de aproximadamente 12 %, tendo em vista que a densidade do solvente supercrítico é somente 6 % maior que a densidade na pressão de 150 bar. Para a temperatura de 35 °C, representada na Figura 4.7, os rendimentos globais de extração foram de 13,35 %, 14,91 % e 15,36 % para pressões de 150, 200 e 250 bar, respectivamente.

Para a temperatura de 50 °C, observa-se maior variação dos rendimentos de extração com a pressão. Neste caso a densidade na pressão de 250 bar é 19 % maior que a densidade na pressão de 150 bar. O rendimento máximo obtido na temperatura de 50 °C foi de 17,95 % na pressão de 250 bar. Isto pode ser visualizado na Tabela 4.8 e na Figura 4.8.

Os resultados das isotermas de 20 °C, 35 °C e 50 °C mostram que ocorre aumento do rendimento global com a pressão, mantendo-se a temperatura constante, o que era esperado, pois segundo Brunner (1994), o aumento da pressão resulta em aumento do poder de solvatação do CO₂ e consegue-se aumentar a extração de compostos de elevada massa molecular.

O fracionamento dos extratos de própolis vai depender muito da capacidade do dióxido de carbono solubilizar os componentes do extrato etanólico e esta capacidade é função da temperatura e pressão ou da temperatura e densidade do solvente. O aumento de temperatura aumenta a pressão de vapor dos solutos, aumentando a sua solubilidade no solvente. O aumento da densidade aumenta o poder de solvatação do solvente. O aumento de temperatura à pressão constante aumenta a pressão de vapor, porém diminui a densidade do solvente.

Na Figura 4.9 mostra-se os valores de rendimentos globais (X_o) para a extração supercrítica do extrato etanólico de própolis para os três níveis de pressão e temperatura (a) e o efeito na densidade do solvente nas pressões 150, 200 e 250 bar e temperaturas de 20, 35 e 50 °C (b).

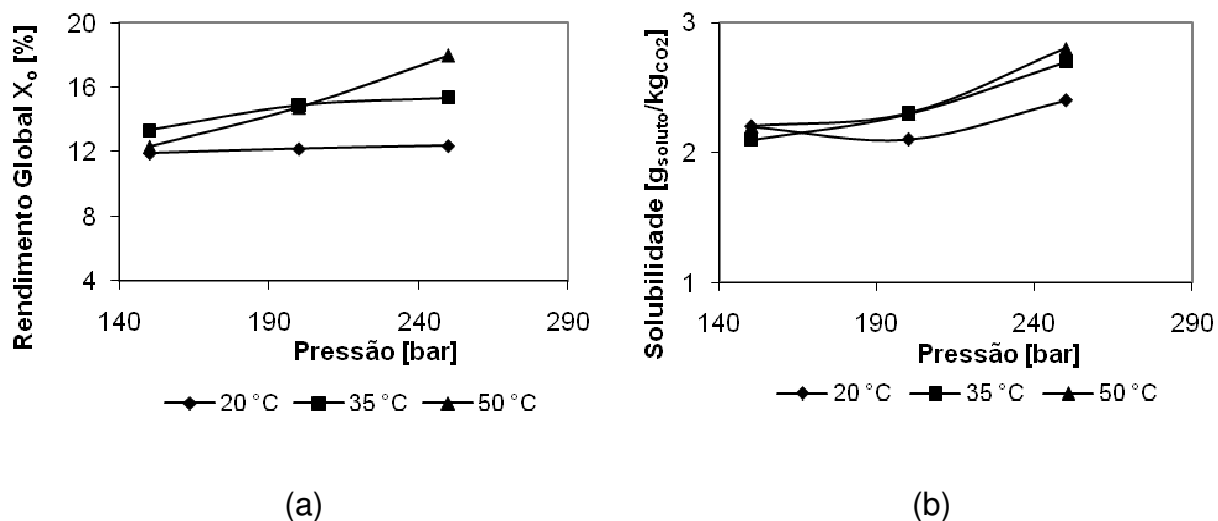


Figura 4.9. Rendimento Global para a extração supercrítica (a) e solubilidade do extrato etanólico de própolis nas pressões de 150, 200 e 250 bar e temperaturas de 20, 35 e 50 °C (b).

Na figura 4.10 pode ser vista a influência da temperatura e pressão na concentração em rendimento de extração com $\text{CO}_2\text{-SC}$ do Artepillin C. Nas pressões mais elevadas, a concentração deste composto nos extratos aumenta com aumento de temperatura e nas pressões mais baixas observa-se um comportamento inverso, onde a concentração diminui com o aumento da temperatura a pressão constante. Esse tipo de comportamento pode ser observado na Figura 4.9, onde dados de solubilidade de solutos em SC-CO_2 é explicado pelo efeito da temperatura e pressão na variação da densidade do solvente e pelo efeito da temperatura na pressão de vapor do soluto. O ponto de cruzamento das isotermas ocorreu entre 150 e 200 bar. Nesta região o efeito da temperatura no aumento da pressão de vapor compensa o efeito da temperatura na diminuição da densidade solvente. Em vista da existência desse ponto, a menor e a maior concentração ocorreram na mesma isoterma de 50 °C.

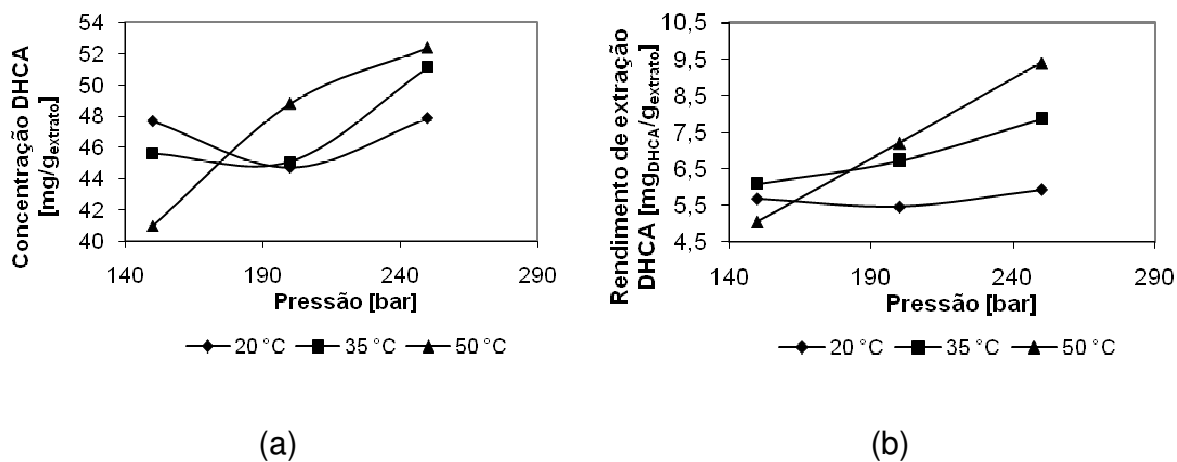


Figura 4.10. Concentração de Artepillin C obtido nos extratos supercríticos (a) e no rendimento de extração em mg/g de extrato (b).

4.5.2 Análise química e atividades antioxidante e antimicrobiana dos extratos

A Tabela 4.9 apresenta os valores de concentração em mg/g dos 4 marcadores selecionados para a análise em HPLC: Artepillin C, ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico (PHCA), p-cumárico e canferide dos respectivos extratos supercríticos obtidos a partir do extrato etanólico de própolis seco (EEPS) e a atividade antioxidante, com valores expressos em ED₅₀, que representa a concentração que elimina 50 % dos radicais livres e também a atividade antimicrobiana frente ao *S. aureus*.

Tabela 4.9. Concentração dos 4 marcadores, atividade antioxidante e atividade antimicrobiana dos extratos supercríticos obtidos do EEP em diferentes condições de temperatura e pressão.

| T | P | Condição Experimental | Artepillin C | PHCA | <i>p</i> -cumárico | Canferide | TOTAL | DPPH | <i>S. aureus</i> |
|------|-------|--------------------------|--------------|--------|--------------------|-----------|--------|------------------|---------------------|
| | | | | | | | | | Halo de inibição |
| [°C] | [bar] | | [mg/g] | [mg/g] | [mg/g] | [mg/g] | [mg/g] | ED ₅₀ | [mm] |
| 20 | 150 | 1 | 47,68 | 4,34 | 4,86 | 3,69 | 60,57 | 13,87 | 9,0 |
| | 200 | 2 | 44,72 | 3,72 | 3,73 | 2,59 | 54,76 | 9,99 | 8,0 |
| | 250 | 3 | 47,87 | 4,62 | 4,94 | 1,76 | 59,19 | 7,91 | 8,0 |
| 35 | 150 | 4 | 45,62 | 4,85 | 3,35 | 2,88 | 56,70 | 19,32 | 8,0 |
| | 200 | 5 | 45,10 | 3,58 | 3,58 | 2,74 | 55,00 | 16,13 | 10,0 |
| | 250 | 6 | 51,14 | 5,12 | 5,84 | 3,80 | 65,90 | 19,45 | 8,0 |
| 50 | 150 | 7 | 40,97 | 4,60 | 3,37 | 4,76 | 53,70 | 11,01 | 9,0 |
| | 200 | 8 | 48,80 | 4,38 | 4,50 | 4,09 | 61,77 | 11,57 | 7,0 |
| | 250 | 9 | 52,38 | 7,43 | 5,73 | 9,34 | 74,88 | 13,36 | 10,0 |
| EEPS | | | 52,78 | 14,52 | 27,69 | 24,31 | 542,47 | 7,58 | 10,0 |

mg do composto/g de extrato analisado.

A Tabela 4.8 e 4.9 relacionam as concentrações de 4 marcadores nos extratos obtidos através da extração supercrítica do extrato etanólico de própolis seco (EEPS) com CO₂ supercrítico como solvente. Observa-se que a concentração de Artepillin C não varia substancialmente com a temperatura e pressão e é pouco menor que a concentração no EEPS de partida. As concentrações dos outros componentes foram bem inferiores à concentração no extrato etanólico. As maiores variações na concentração dos componentes ocorreram a 50 °C, onde também observou-se maior variação do rendimento de extração com o aumento da pressão. A 20 °C, a concentração dos componentes variou pouco com a pressão, exceto para o canferide onde a variou de 3,69 para 1,76 mg/g, já a atividade antioxidante em termos de ED₅₀ caiu a metade, indicando melhora considerável.

De acordo com a Tabela 4.9, os resultados indicaram que não existe uma relação direta entre a concentração do Artepillin C e a atividade antioxidante, o mesmo foi observado no trabalho de Piantino (2008) que avaliou a concentração de Artepillin C e atividade antioxidante em extratos etanólicos de alecrim-do campo.

Pode-se observar na Tabela 4.9 que os quatro compostos analisados representam no máximo 10 % do total, portanto podem não serem determinantes de todas as propriedades biológicas do extrato.

A atividade antimicrobiana foi testada para três microorganismos patogênicos, sendo um Gram positivo (*Staphylococcus aureus*), um Gram negativo: *Escherichia coli* e uma levedura : *Candida albicans*.

Para os microorganismos *C. albicans* e *E. coli*, não obteve-se inibição da atividade antimicrobiana para o extrato etanólico de própolis seco (EEPS) e para os extratos supercríticos obtidos a partir do EEPS. Para o microorganismo

Staphylococcus aureus houve atividade antimicrobiana realizada por difusão em disco.

Pode-se observar na Tabela 4.9 que os melhores resultados de atividade antimicrobiana foram obtidos na corrida 5, realizada à temperatura de 35 °C e pressão de 200 bar e na corrida 9, que foi feita na temperatura de 50 °C e pressão de 250 bar, com halo de inibição de 10,0 mm, valor igual do extrato etanólico de própolis seco (EEPS) de partida. A corrida 9, apresentou maior concentração de Artepillin C e menores concentrações dos demais compostos analisados. Para a corrida 5, a concentração de Artepillin C foi inferior a encontrada na corrida 9, porém as concentrações dos demais compostos foram maiores. Extratos obtidos em ambas corridas apresentaram fraca atividade antioxidante.

Muitos pesquisadores relataram que o potencial biológico da própolis se deve a um sinergismo que ocorre entre muitos constituintes (MARCUCCI, 1996). Observou-se este sinergismo no estudo de várias frações de um extrato etanólico de própolis (EEP) feita por Krol et al. (1993), citado por Marcucci (1996) onde nenhuma fração separada inibiu o crescimento de *S. aureus* e quando todas as frações foram reunidas, recuperou-se a atividade do EEP total. Estes resultados indicaram que o potencial antibacteriano da própolis não é devido à presença de uma substância em particular mas, resultante de uma ação complexa de vários compostos. Nenhum trabalho encontrado na literatura indica qualquer relação entre a atividade antioxidante e antimicrobiana.

4.6 Extração supercrítica do extrato etanólico de própolis (EEPS) com adição de co-solvente, composição química, atividade antioxidante e atividade antimicrobiana

4.6.1 Rendimento e cinética de extração

As condições operacionais de temperatura e pressão foram de 20 °C, 35 °C e 50 °C, pressões de 150, 200 e 250 bar, respectivamente. A adição de co-solvente foi na proporção de 5, 10 e 15 %. A temperatura de 35 °C, pressão de 200 bar e 10 % de adição de etanol representa o ponto central dos experimentos, que foram feitos em triplicata.

Assim como na etapa anterior de extração supercrítica a partir do extrato etanólico de própolis, as variáveis de processo foram mantidas constantes, ou seja, a massa de amostra alimentada foi de 2 gramas, tempo de extração foi de 3 horas para todos os experimentos e as vazões do CO₂ como solvente e do etanol como co-solvente foram mantidas constantes no decorrer da extração, cerca de 1,5 g/min.

A Tabela 4.10 apresenta os valores de rendimento total obtidos na extração supercrítica do extrato etanólico de própolis com adição de etanol como co-solvente

Na Tabela 4.10, os valores de X_{oi} são referentes aos rendimentos obtidos na extração (material coletado). Como o extrato etanólico de própolis (EEP) é extremamente aderente a qualquer superfície, foi feita uma extração com etanol das esferas de vidro que aparentemente ficaram com EEPS aderido, de acordo com a metodologia descrita no item 3.3 da seção Materiais e Métodos, obtendo

assim, a massa de refinado. O rendimento X_o^{**} representa a massa em porcentagem do que ficou retido na tubulação (entre a saída do extrator e coletor), porém essa massa não foi coletada e analisada. Apenas o que foi coletado durante a extração foi analisado quimicamente.

No rendimento total de extração X_o foi considerado o valor referente a soma destas massas, ou seja, $X_o = X_{oi} + X_o^{**}$.

Tabela 4.10. Rendimentos globais de extração do extrato etanólico de própolis (EEP) em função das variáveis temperatura, pressão e adição de co-solvente.

| Experimento | T[°C] | P [bar] | Co-solvente [%] | X _{oi} [%] | X _o **[%] | X _o [%] | Refinado [%] |
|-------------|-------|---------|-----------------|---------------------|----------------------|--------------------|--------------|
| CS-1 | 20 | 150 | 5 | 58,23 | 23,82 | 82,05 | 17,95 |
| CS-2 | 50 | 150 | 5 | 42,34 | 36,70 | 79,04 | 20,86 |
| CS-3 | 20 | 250 | 5 | 50,60 | 45,79 | 96,39 | 3,62 |
| CS-4 | 50 | 250 | 5 | 62,50 | 37,50 | 100,00 | - |
| CS-5 | 20 | 150 | 15 | 37,62 | 43,61 | 81,23 | 18,76 |
| CS-6 | 50 | 150 | 15 | 70,59 | 29,41 | 100,00 | - |
| CS-7 | 20 | 250 | 15 | 78,31 | 21,69 | 100,00 | - |
| CS-8 | 50 | 250 | 15 | 80,68 | 19,32 | 100,00 | - |
| CS-9* | 35 | 200 | 10 | 89,49 ± 0,01 | 10,51 ± 0,01 | 100,00 ± 0,01 | - |

X₀ = rendimento global de extração: (kg extrato/kg de matéria-prima)*100 (% base seca).

*ponto central de temperatura, pressão e porcentagem de co-solvente, ensaio feitos em triplicata.

**massa do material que ficou retido na tubulação de saída no extrator.

Pode-se observar que para algumas condições experimentais, houve extração de praticamente 100 %. Para as extrações nas quais utilizou-se 10 % e 15 % de co-solvente, as extrações foram de 100 %, com exceção para o experimento CS-4, o qual também apresentou um rendimento de extração de 100 % nas condições de 50 °C, 250 bar de pressão e adição de 5% de co-solvente. O menor rendimento global de extração foi obtido no experimento CS-2, que foi feito a 50 °C, pressão de 150 bar e adição de 5 % de co-solvente.

Esta etapa de extração supercrítica foi realizada a partir da obtenção prévia do extrato etanólico de própolis e com a adição de etanol como co-solvente. Isto fez com que houvesse alto rendimento de extração nos primeiros 30 minutos de extração, não ocorrendo assim extração seletiva.

A Figura 4.11 apresenta o comportamento do rendimento global dos extrato, obtido por SFE utilizando CO₂ como solvente e etanol como co-solvente.

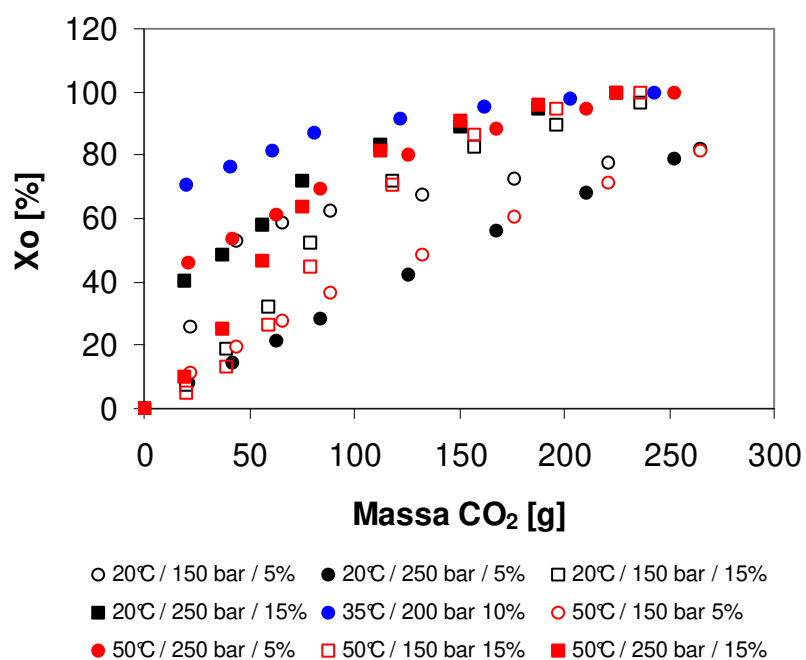


Figura 4.11. Curvas de extração da massa total extraída em relação a massa de solvente (CO₂) empregada na extração utilizando etanol como co-solvente.

Observa-se na Figura 4.11 que rendimentos globais de até 100 % foram alcançados. Como a própolis é bastante solúvel em etanol, no início da extração ocorre rendimento de extração significativo e após isso, a massa total de extrato foi praticamente constante.

A Figura 4.12 apresenta as curvas de extração supercrítica a partir do extrato etanólico de própolis a 20 °C, pressões de 150 bar e 250 bar e adição de 5 e 15 % de co-solvente.

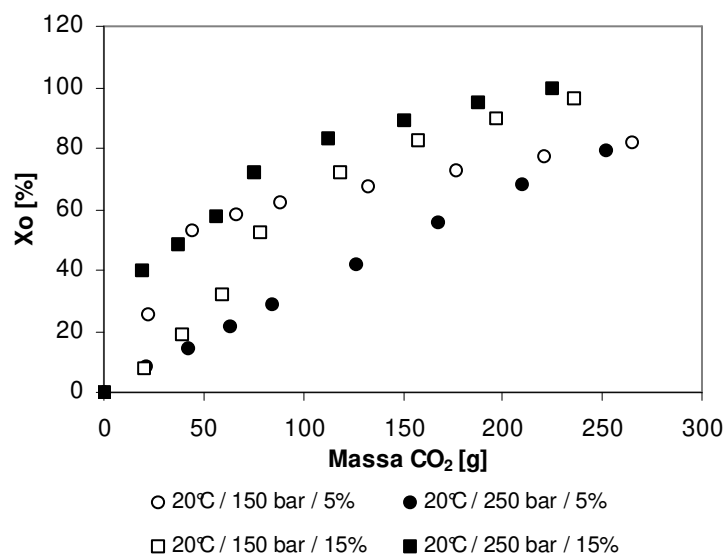


Figura 4.12. Curvas de extração da massa total extraída em relação a massa de solvente (CO₂) empregada na extração supercrítica a 20 °C e etanol como co-solvente nas proporções de 5 e 15 %.

A partir da Figura 4.12 pode-se observar que as extrações feitas a 20 °C e com 15 % de adição de co-solvente apresentaram maior rendimento de extração. Na temperatura de 20 °C e 15 % de adição de co-solvente na pressão de 250 bar houve um pequeno aumento no rendimento frente à pressão de 150 bar.

A Figura 4.13 apresenta as curvas de extração supercrítica a partir do extrato etanólico de própolis a 50 °C, pressões de 150 bar e 250 bar e adição de 5 e 15 % de co-solvente.

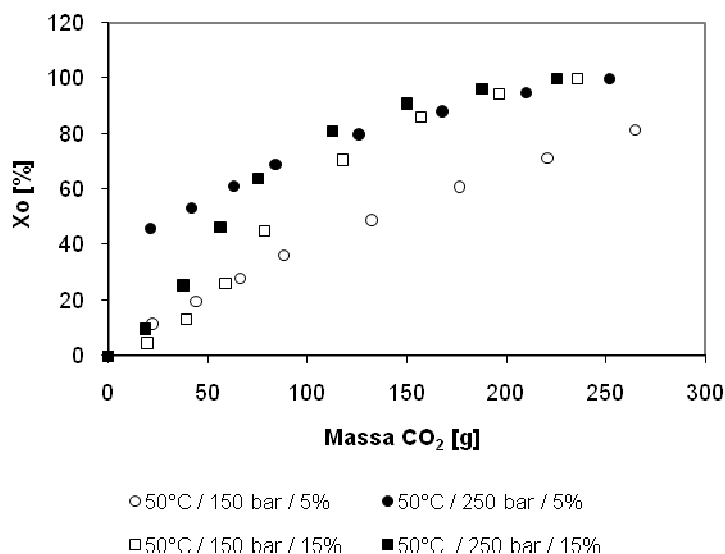


Figura 4.13. Curvas de extração da massa total extraída em relação a massa de solvente (CO₂) empregada na extração supercrítica a 50 °C e etanol como co-solvente nas proporções de 5 e 15 %.

A partir de Figura 4.13 pode-se observar que a 50 °C houve diferença no rendimento global frente à pressão e à adição de co-solvente, com exceção para a pressão de 150 bar e adição de 5 % de co-solvente, que apresentou rendimento inferior à 100 %. Acima de 5 % de adição de co-solvente, a temperatura e densidade ficam sem efeito frente a concentração de etanol, que por ter grande afinidade com a própolis extrai praticamente 100 %.

A Figura 4.14 apresenta as curvas de extração supercrítica do extrato etanólico de própolis nas temperatura de 20 °C e 50 °C, pressões de 150 bar e 250 bar com adição de 5 % e também o ponto central das condições operacionais, ou seja, 35 °C de temperatura, pressão de 200 bar e 10 % de etanol.

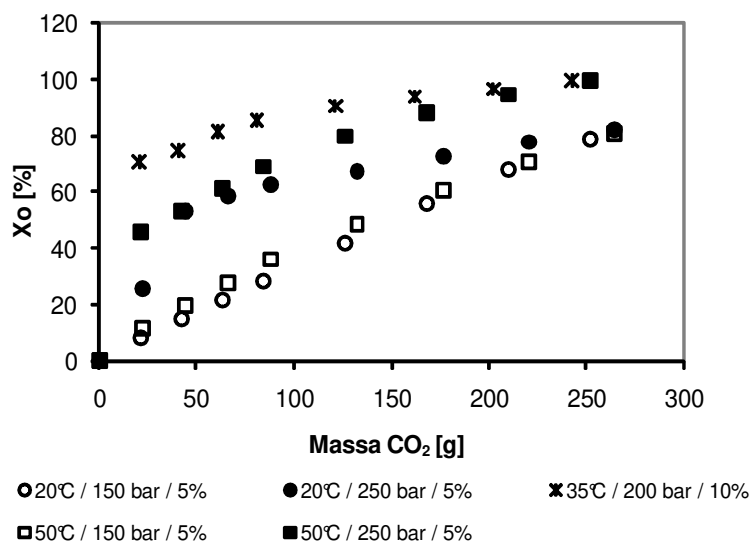


Figura 4.14. Curvas de extração da massa total extraída em relação a massa de solvente (CO₂) empregada na extração supercrítica a 20 °C e 50 °C, etanol como co-solvente nas proporções de 5 e 10 %.

A partir da Figura 4.14 pode-se observar que os maiores rendimentos de extração foram obtidos a 35 °C e 50 °C, pressões de 200 e 250 bar e adição de co-solvente na proporção de 5 e 10 %. Nesta figura também pode-se observar que o uso de etanol como co-solvente ocasionou alto rendimento no início da extração, devido à alta solubilidade da própolis em etanol.

A Figura 4.15 apresenta as curvas de extração supercrítica do extrato etanólico de própolis nas temperatura de 20 °C e 50 °C, pressões de 150 bar e 250 bar com adição de 15 % de etanol como co-solvente e também o ponto central das condições operacionais, ou seja, 35 °C, 200 bar e 10 % de etanol.

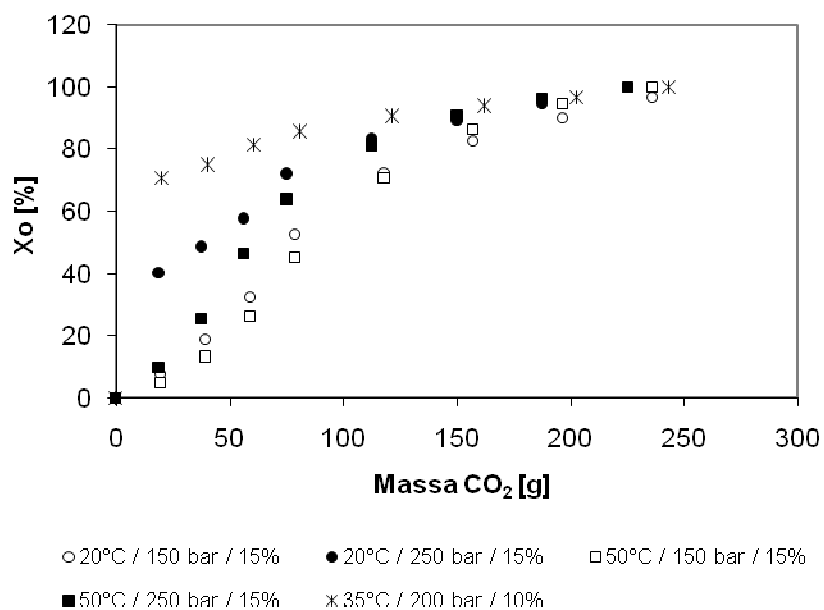


Figura 4.15. Curvas de extração da massa total extraída em relação a massa de solvente (CO₂) empregada na extração supercrítica a 20 °C e 50 °C, etanol como co-solvente nas proporções de 10 e 15 %.

Pode-se observar na Figura 4.15 que o ponto central, ou seja, a 35 °C, 200 bar e 10 % de co-solvente apresenta taxa inicial maior de extração, porém o rendimento total se equivale as demais extrações.

4.6.2 Análise química e atividades antioxidante e antimicrobiana dos extratos

A Tabela 4.11 apresenta os valores de concentração em mg/g dos marcadores pré-selecionados para a análise e os resultados de atividade antioxidante, expressos ED₅₀ e atimicrobiana dos extratos obtidos frente ao *S. aureus*.

Tabela 4.11. Concentração dos 4 marcadores, atividade antioxidante e atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato supercrítico obtidos em diferentes condições de temperatura e pressão

| | T | P | Co- solvente | X _o | Artepillin C | PHCA | p-cumárico | Canferide | TOTAL | DPPH | <i>S. aureus</i> |
|------|------|-------|-----------------|----------------|--------------|--------|------------|-----------|--------|------------------|---------------------|
| | | | | | | | | | | | Halo de inibição |
| | [°C] | [bar] | [%] | [%] | [mg/g] | [mg/g] | [mg/g] | [mg/g] | [mg/g] | ED ₅₀ | [mm] |
| CS-1 | 20 | 150 | 5 | 82,05 | 26,92 | 12,98 | 23,49 | 10,57 | 73,96 | 16,13 | 7,0 |
| CS-2 | 50 | 150 | 5 | 79,04 | 31,31 | 11,68 | 22,30 | 1,95 | 67,24 | 15,01 | 9,0 |
| CS-3 | 20 | 250 | 5 | 96,39 | 18,39 | 5,21 | 9,53 | 2,67 | 35,80 | 16,04 | 6,0 |
| CS-4 | 50 | 250 | 5 | 100,00 | 4,87 | 0,90 | 0,00 | 0,00 | 5,77 | 16,14 | NI |
| CS-5 | 20 | 150 | 15 | 81,22 | 30,07 | 6,17 | 13,63 | 0,00 | 49,87 | 14,56 | 7,0 |
| CS-6 | 50 | 150 | 15 | 100,00 | 6,45 | 1,67 | 0,33 | 0,00 | 8,45 | 15,86 | 7,0 |
| CS-7 | 20 | 250 | 15 | 100,00 | 17,55 | 4,96 | 8,69 | 2,22 | 33,42 | 17,93 | NI |
| CS-8 | 50 | 250 | 15 | 100,00 | 6,97 | 1,59 | 0,75 | 3,71 | 13,02 | 16,00 | NI |
| EEPS | | | | 39,45 | 52,78 | 14,52 | 27,69 | 24,31 | 119,30 | 7,58 | 10,0 |

mg do composto/g de extrato analisado.

NI: não inibiu

As concentrações dos quatro compostos analisados por HPLC, bem como o valor do ED₅₀ são referentes ao extrato obtido durante as três horas de extração, referente a X_{oi} da Tabela 4.10.

Pode-se observar na Tabela 4.11 que ocorre grande variação na concentração dos quatro compostos analisados. A maior concentração de todos os compostos foi obtida no experimento CS-1, cuja condições experimentais foram 20 °C, 150 bar e adição de 5% de co-solvente, porém a atividade antioxidante desta amostra apresentou-se fraca, seu ED₅₀ foi de 16,13 µg/mL. Todas as amostras analisadas apresentaram atividade antioxidante baixa, maior que 10 µg/mL.

O extrato obtido a partir do experimento CS-4 não indicou concentração de ácido *p*-cumárico e canferide. Os extratos obtidos dos experimentos CS-5 e CS-6 não apresentaram concentração de canferide.

A melhor atividade antioxidante foi obtida no extrato do experimento CS-5, cerca de 14,56 µg/mL, valor alto se comparado com o do extrato etanólico de própolis seco, que é cerca de 7,58 µg/mL.

Para avaliar a atividade antimicrobiana foram testados três microorganismos: *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Escherichia coli* (ATCC 25922). Porém não houve inibição de *C. albicans* e *E. coli*.

Para os experimentos CS-7 e CS-8, não ocorreu inibição do crescimento do *S. aureus*, visto que os extratos apresentaram baixas concentrações de Artepillin C, *p*-cumárico e canferide e fraca atividade antioxidante. O extrato do experimento CS-4 não apresentou halo de inibição do *S. aureus*, a concentração dos marcadores selecionados foi baixa e a atividade antioxidante foi fraca.

Pode-se observar na Tabela 4.11 que a maior inibição antimicrobiana foi verificada no extrato supercrítico obtido a 50 °C, 150 bar e 5 % de adição de etanol como co-solvente, referente ao experimento CS-2, a qual apresentou a maior concentração de Artepillin C. Para os demais experimentos, verificou-se fraca inibição do *S. aureus*, ou seja, apresentaram uma inibição inferior ao EEPS.

Com o objetivo de estudar a possibilidade de fracionar a própolis bruta de modo a obter frações enriquecidas em compostos que possuem diversas atividades biológicas como atividade antioxidante, atividade antimicrobiana entre outras, analisou-se as frações do experimento CS-9 que foi obtido em condições intermediárias de temperatura, pressão e adição de co-solvente, ou seja, 35 °C, 200 bar e 10 % de adição de etanol como co-solvente.

O extrato do experimento CS-9 foi dividido em oito (8) frações diferentes. Na primeira hora de extração, as frações foram coletadas de 15 em 15 minutos, nas duas horas seguintes as frações foram coletadas de 30 em 30 minutos, totalizando assim 3 horas de extração.

A Tabela 4.12 apresenta os resultados de rendimento total das frações referentes ao experimento CS-9, concentração em mg/g dos quatro marcadores selecionados para análise química, atividade antioxidante e atividade antimicrobiana *in vitro* frente ao *S. aureus*, das respectivas frações.

Tabela 4.12. Rendimentos, concentrações dos 4 marcadores, atividade antioxidante e atividade antimicrobiana das frações do extrato supercrítico obtido a 35 °C, 200 bar e 10 % de co-solvente a partir do extrato etanólico de própolis.

| Tempo [min] | Fração | X _o [%] | Artepillin C [mg/g] | PHCA [mg/g] | p-cumárico [mg/g] | Canferide [mg/g] | TOTAL [mg/g] | DPPH ED ₅₀ | <i>S. aureus</i> |
|----------------|---------|-----------------------|------------------------|----------------|----------------------|---------------------|-----------------|--------------------------|--------------------------|
| | | | | | | | | | Halo de inibição [mm] |
| 15 | CS-9 F1 | 69,48 | 52,25 | 13,63 | 35,5 | 10,47 | 111,85 | 13,37 | 7,0 |
| 30 | CS-9 F2 | 3,03 | 33,02 | 4,74 | 10,61 | 5,55 | 53,92 | 12,29 | 7,0 |
| 45 | CS-9 F3 | 5,17 | 14,04 | 3,28 | 11,68 | 2,71 | 31,71 | 14,66 | 7,0 |
| 60 | CS-9 F4 | 2,92 | 6,88 | 1,72 | 7,50 | 1,35 | 17,45 | 12,97 | NI |
| 90 | CS-9 F5 | 3,67 | 6,15 | 1,31 | 5,23 | 1,12 | 13,81 | 20,37 | NI |
| 120 | CS-9 F6 | 1,89 | 4,80 | 0,96 | 3,60 | 0,77 | 10,13 | 19,88 | NI |
| 150 | CS-9 F7 | 1,48 | 2,45 | 0,51 | 1,82 | 0,26 | 5,04 | 19,23 | NI |
| 180 | CS-9 F8 | 1,84 | 1,50 | 0,30 | 0,93 | 0,15 | 2,88 | - | - |

mg do composto/g de extrato analisado.

NI: não inibiu

:- não se obteve amostra suficiente para a realização dos experimentos.

Pode ser observado na Tabela 4.12 que o maior rendimento obtido nas frações corresponde a Fração 1 (CS-9F1), que apresenta maior concentração dos compostos analisados por HPLC.

A concentração de Artepillin C na Fração 1 é de 52,25 mg/g e da Fração 2 é de 33,02 mg/g, ou seja, a Fração 1 possui concentração 36 % superior em Artepillin C. Para os demais compostos, a Fração 1 também apresentou extrato mais concentrado nos demais compostos.

A atividade antioxidante foi mais pronunciada nas Frações 1 a 4, principalmente na Fração 2 e na Fração 4, com valores de ED₅₀ de 12,29 µg/mL e 12,97 µg/mL, respectivamente.

Verificou-se fraca atividade antimicrobiana frente ao *S. aureus* nas três primeiras frações obtidas na extração supercrítica realizada a partir do extrato etanólico de própolis nas condições de 35 °C, 200 bar e 10 % de co-solvente, onde as frações apresentaram a maior concentração dos compostos analisados. Para as demais frações obtidas não verificou-se atividade antimicrobiana.

4.7 Extração supercrítica da própolis bruta com e sem adição de co-solvente, composição química, atividade antioxidante e atividade antimicrobiana

4.7.1 Rendimento e cinética de extração

A Tabela 4.13 apresenta os resultados de rendimento global obtidos no processo de extração supercrítica da própolis bruta nas temperaturas de 20, 35 e 50 °C e pressões de 150, 200 e 250 bar utilizando e tanol como co-solvente da

extração nas proporções de 5, 10 e 15 %, com exceção dos experimentos PB-10 a PB-13, os quais foram feitos sem adição de etanol.

Tabela 4.13. Rendimentos globais de extração da própolis bruta em função das variáveis temperatura e pressão e adição ou não de co-solvente.

| Experimento | T[°C] | P [bar] | Co-solvente [%] | X _o [%] | Solubilidade [g _{soluto} /g _{CO2}] |
|-------------|-------|---------|-----------------|--------------------|---|
| PB-1 | 20 | 150 | 5 | 18,47 | 0,0038 |
| PB-2 | 50 | 150 | 5 | 20,30 | 0,0033 |
| PB-3 | 20 | 250 | 5 | 20,06 | 0,0034 |
| PB-4 | 50 | 250 | 5 | 27,83 | 0,0046 |
| PB-5 | 20 | 150 | 15 | 38,95 | 0,0140 |
| PB-6 | 50 | 150 | 15 | 42,14 | 0,0100 |
| PB-7 | 20 | 250 | 15 | 40,83 | 0,0153 |
| PB-8 | 50 | 250 | 15 | 51,34 | 0,0169 |
| PB-9* | 35 | 200 | 10 | 37,5 ± 3,1 | 0,0073 ± 0,001 |
| PB-10 | 20 | 150 | 0 | 3,29 | 0,0011 |
| PB-11 | 50 | 150 | 0 | 3,50 | 0,0011 |
| PB-12 | 20 | 250 | 0 | 4,03 | 0,0012 |
| PB-13 | 50 | 250 | 0 | 7,30 | 0,0022 |

*ponto central de temperatura, pressão e porcentagem de co-solvente, ensaio feitos em triplicata

De acordo com Catchpole et al. (2004), a própolis é pouco solúvel em CO₂ supercrítico, porém mais solúvel na mistura CO₂ e etanol. Este efeito pode ser observado na Tabela 4.13, onde os valores de rendimento global das extrações supercríticas utilizando etanol como co-solvente possuem valores muito superiores.

Pode-se observar que para os experimentos PB-10, PB-11 e PB-12 não houve diferença no valor de solubilidade da mistura e o rendimento de extração praticamente não se alterou. Já para o experimento PB-13, houve um aumento no valor de solubilidade, de 0,0012 g_{soluto}/gCO₂ do experimento PB-12 para 0,0022 g_{soluto}/gCO₂ do experimento PB-13, acarretando um incremento no rendimento do extração de cerca de 83 %.

Nos experimentos PB-1 e PB-2, na pressão de 150 bar e 5 % de adição de co-solvente, com o aumento de temperatura de 20 °C para 50 °C, observou-se pequeno aumento no rendimento de extração, de 18,5 para 20,3 %. Para os experimentos PB-3 e PB-4, foram utilizadas as mesmas condições de temperatura e co-solvente, porém a pressão de operação foi de 250 bar, o que fez o rendimento de extração aumentar de 20,1 e 27,8 %, respectivamente. A diferença no rendimento de extração foi superior quando aplicou-se pressões maiores.

O aumento da temperatura em pressões elevadas afeta pouco a densidade do solvente, neste caso, a temperatura é a variável mais importante. A baixa pressão ocorre maior variação da densidade do solvente com a temperatura, desfavorecendo o rendimento. O decréscimo da densidade com o aumento da temperatura compensa o efeito da temperatura nas pressões de vapor do soluto.

Nos experimentos com adição de 15 % de co-solvente, ou seja, os experimentos PB-5 a PB-8, nos quais manteve-se a pressão constante de 150 bar e aumentou-se a temperatura de 20 °C para 50 °C, o rendimento aumentou de 38,9 % para 42,1%. Para os experimentos PB-7 e PB-8 onde a pressão de

trabalho foi de 250 bar, 15 % de co-solvente o rendimento aumentou de 40,8 % para 51,3 %, quando aumentou-se a temperatura de 20 °C para 50°C. Comparando os experimentos PB-5, PB-6, PB-7 e PB-8, pode-se verificar que o aumento da pressão, de 150 para 250 bar, acarreta acréscimo no rendimento de extração superior ao aumento de temperatura de 20 °C para 50 °C a mesma pressão. O mesmo efeito pode ser observado para os experimentos com adição de 5 % de co-solvente.

O experimento PB-9, no qual as condições de operação da extração supercrítica foram os valores intermediários de temperatura, pressão e co-solvente, ou seja, 35 °C, 200 bar e 10 % de co-solvente, o rendimento global de extração foi de 37,5 %.

Os experimentos PB-10 a PB-13 foram feitos nas temperaturas de 20 °C e 50 °C, pressões de 150 e 200 bar sem adição de etanol como co-solvente. Pode-se observar na Tabela 4.13 que rendimentos globais muito inferiores foram obtidos. Os rendimentos mínimo e máximo de extração foram de 3,29 % e 7,30 %, nas condições de 20 °C/150 bar e 50 °C/250 bar, respectivamente. De acordo com Catchpole et al. (2004), a própolis possui baixa solubilidade em CO₂, porém é razoavelmente solúvel na mistura CO₂ e etanol, o que pode ser observado pela comparação dos rendimentos globais obtidos nas extrações supercríticas com e sem a adição de co-solvente.

A Figura 4.16 apresenta a comparação entre as curvas de extração obtidas a partir da extração supercrítica da própolis bruta nas condições de 20 °C e 50 °C de temperatura, pressões de 150 e 250 bar e adição de 0; 5 e 15 % de etanol como co-solvente.

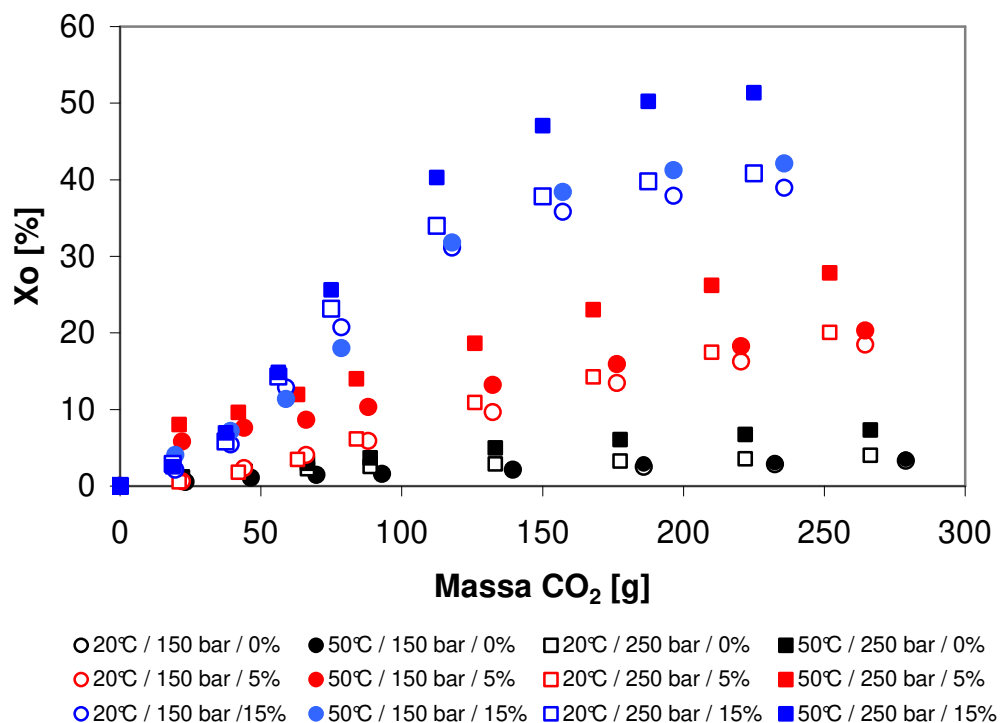


Figura 4.16. Comparação entre as curvas de extração obtidas a partir da própolis bruta em diferentes condições de temperatura, pressão e adição de co-solvente.

Pode-se observar nitidamente na Figura 4.16, que a quantidade de co-solvente utilizada na extração supercrítica influencia diretamente o rendimento global de extrato obtido. Pode-se observar também que os maiores rendimentos de extração foram obtidos nas maiores temperatura e pressão, ou seja, 50 °C e 250 bar, respectivamente.

A Figura 4.17 apresenta as cinéticas de extração dos experimentos de extração supercrítica da própolis bruta nas condições de 20 °C e 50 °C, pressões de 150 bar e 250 bar sem adição de co-solvente.

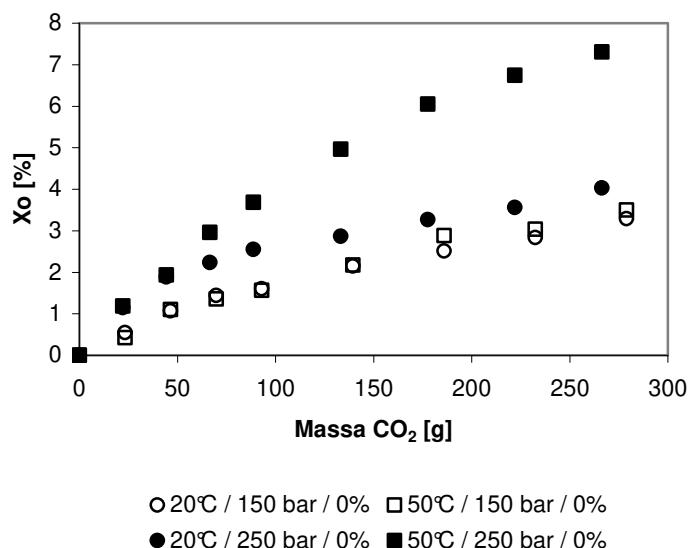


Figura 4.17. Curvas de extração da massa total extraída em relação a massa de solvente (CO₂) empregada na extração supercrítica a 20 °C e 50 °C, 150 e 250 bar de pressão.

Pode-se observar na Figura 4.17 que o maior rendimento foi obtido na temperatura de 50 °C e pressão de 250 bar. Pode-se observar uma aumento no rendimento de extração quando a pressão é aumentada de 150 para 250 bar, para as temperaturas de 20 °C e 50°C.

4.7.2 Análise química e atividades antioxidante e antimicrobiana dos extratos

A Tabela 4.14 apresenta os valores de concentração em mg/g dos 4 marcadores selecionados para a análise em HPLC: Artepillin C, ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico (PHCA), *p*-cumárico e canferide dos respectivos extratos supercríticos obtidos a partir do extrato etanólico de própolis seco (EEPS),

atividade antioxidante expressa em ED₅₀ e atividade antimicrobiana frente ao *S. aureus*.

Tabela 4.14. Concentração em dos 4 marcadores, atividade antioxidante e atividade antimicrobiana dos extratos supercríticos obtidos em diferentes condições de temperatura, pressão e adição de co-solvente.

| | T | P | Co-solvente | Xo | Artepillin C | PHCA | <i>p</i> -cumárico | Canferide | TOTAL | DPPH | <i>S. aureus</i> |
|-------|-------|-----|-------------|--------|--------------|--------|--------------------|-----------|------------------|-------|------------------|
| | | | | | | | | | | | Halo de inibição |
| | | | | | | | | | | | ED ₅₀ |
| [°C] | [bar] | [%] | [%] | [mg/g] | [mg/g] | [mg/g] | [mg/g] | [mg /g] | ED ₅₀ | [mm] | |
| PB-1 | 20 | 150 | 5 | 18,47 | 29,58 | 9,33 | 16,25 | 0,88 | 56,04 | 16,63 | NI |
| PB-2 | 50 | 150 | 5 | 20,30 | 12,34 | 0,97 | 1,85 | 0,97 | 16,13 | 13,55 | NI |
| PB-3 | 20 | 250 | 5 | 20,06 | 29,00 | 8,79 | 15,43 | 0,00 | 53,22 | 15,81 | NI |
| PB-4 | 50 | 250 | 5 | 27,83 | 19,42 | 2,52 | 4,33 | 0,71 | 26,98 | 16,79 | NI |
| PB-5 | 20 | 150 | 15 | 38,95 | 2,27 | 1,25 | 0,72 | 0,00 | 4,24 | 14,03 | NI |
| PB-6 | 50 | 150 | 15 | 42,14 | 36,57 | 15,29 | 27,10 | 11,92 | 90,88 | 17,99 | NI |
| PB-7 | 20 | 250 | 15 | 40,83 | 2,54 | 1,66 | 1,68 | 0,00 | 5,88 | 15,57 | NI |
| PB-8 | 50 | 250 | 15 | 51,34 | 12,76 | 2,86 | 4,23 | 0,00 | 19,85 | 12,53 | NI |
| PB-10 | 20 | 150 | 0 | 3,39 | 20,41 | 1,35 | 1,89 | 24,86 | 48,51 | 22,47 | NI |
| PB-11 | 50 | 150 | 0 | 3,50 | 0,82 | 0,17 | 0,13 | 1,15 | 2,27 | 27,07 | NI |
| PB-12 | 20 | 250 | 0 | 4,03 | 24,63 | 2,09 | 2,87 | 29,48 | 59,07 | 19,30 | NI |
| PB-13 | 50 | 250 | 0 | 7,30 | 57,81 | 1,88 | 1,82 | 0,00 | 61,51 | 16,80 | NI |
| EEPS | | | | 39,45 | 52,78 | 14,52 | 27,69 | 24,31 | 119,30 | 7,58 | 10,0 |

NI: não inibiu

A Tabela 4.14 relaciona as concentrações dos quatro marcadores presentes nos extratos obtidos através da extração supercrítica da própolis bruta utilizando 0; 5 e 15 % de etanol como co-solvente. Pode-se observar que para a adição de 5 % de co-solvente, mantendo-se fixa a temperatura de 20 °C e aumentando-se a pressão de extração de 150 bar para 250 bar, os quatro marcadores selecionados para a análise apresentaram concentrações similares, mesmo com aumento no rendimento global de extração de 18,47 % para 20,06 %, respectivamente. Ocorreu também pequena diminuição no valor de ED₅₀, de 16,63 µg/mL para 15,81 µg/mL.

Observou-se a 50 °C, 5 % de co-solvente e aumentando-se a pressão de 150 bar para 250 bar, o rendimento de extração aumentou de 20,30 % para 27,83 % e a concentração dos marcadores também aumentou, com exceção do canferide, cuja concentração diminuiu de 0,97 mg/g para 0,71 mg/g. Para os demais marcadores houve aumento de 12,34 mg/g para 19,42 mg/g na concentração de Artepillin C, ou seja, houve aumento de 57,37 % na sua concentração, para o PHCA o aumento foi maior, cerca de 159 %, ou seja a concentração do PHCA aumentou de 0,97 mg/g para 2,52 mg/g. A concentração de *p*-cumárico aumentou de 1,85 mg/g para 4,33 mg/g, ou seja, aumento de 134,05 %.

Para a adição de 5 % de etanol como co-solvente, podemos observar também que a 50 °C, os rendimentos globais de extração são maiores do que a 20 °C, porém a concentração dos 4 marcadores analisados são menores. Isso pode ser melhor observado para o ácido *p*-cumárico, cuja diferença de concentração é significativa. O efeito da temperatura irá diminuir a densidade do solvente, ficando mais seletivo aos diferentes compostos da mistura. Comportamento semelhante foi observado na Tabela 4.7 para a variação da pressão à temperatura constante.

A 20 °C e pressões de 150 e 250 bar, as concentrações foram de 16,25 mg/g e 15,43 mg/g, respectivamente, porém para 50 °C a concentração do ácido *p*-cumárico diminuiu para 1,85 mg/g e 4,33 mg/g nas respectivas pressões de 150 bar e 250 bar. A amostra que possuiu a melhor atividade antioxidante foi a PB-2, na qual o ED₅₀ era de 12,53 µg/mL e foi obtido nas condições de 50 °C, 150 bar e 5 % de adição de etanol como co-solvente.

Os extratos obtidos com adição de 15 % de co-solvente apresentaram maior rendimento global do que aqueles com adição de 5 % co-solvente, como observado na Tabela 4.14. Na temperatura de 20 °C, todos os marcadores apresentaram concentrações inferiores em comparação aos ensaios a 50 °C. As maiores concentrações foram obtidas na amostra PB-6, que foi de 36,57 mg/g de Artepillin C, 15,29 mg/g de PHCA, 27,10 mg/g de ácido *p*-cumárico e 11,92 mg/g de canferide, porém apresentou o maior ED₅₀, indicando que apesar de possuírem maior concentração dos marcadores, apresentou a pior atividade antioxidante.

O melhor resultado de atividade antioxidante dos extratos obtidos com adição de 15 % de etanol como co-solvente foi a amostra PB-8, que apresentou o maior rendimento global, de 51,34 % e menor ED₅₀ (12,53 µg/mL). As concentrações obtidas para esta amostra foram 12,76 mg/g de Artepillin C, 2,86 mg/g de PHCA e 4,23 mg/g de ácido *p*-cumárico. Os piores resultados de atividade antioxidante ocorreram nos experimentos PB-10 e PB-11, que apresentaram menor rendimento de extração, cerca de 3,39 e 3,50 % e ED₅₀ de 22,47 e 27,07 µg/mL respectivamente, indicando uma fraca atividade antioxidante.

A amostra PB-8 apresentou alto rendimento global de extração, cerca de 23,12 % maior que o extrato etanólico de própolis seco (EEPS), porém possivelmente de compostos que não sejam interessantes, já que a concentração dos compostos analisados foi baixa.

De acordo com Negri et al. (2000), o CO₂ possui característica não polar e a ESC da própolis bruta extrai preferencialmente substâncias não-polares, representadas por ceras como hidrocarbonetos e monoésteres, que estão presentes em grande quantidade na própolis bruta, o que pode ser observado pelo baixo rendimento de extração.

Os experimentos PB-10 a PB-13 foram obtidos a partir da extração da própolis bruta nas temperaturas de 20 °C e 50 °C, pressões de 150 e 250 bar, porém sem adição de co-solvente. A amostra PB-13 apresentou a maior concentração de Artepillin C de todos os experimentos com própolis bruta, que era 57,81 mg/g. Já nos experimentos PB-3, PB-5, PB-7 e PB-8 não foi detectada a presença do canferide.

Os extratos supercríticos obtidos a partir da própolis bruta nas condições operacionais de temperatura de 20 °C e 50 °C, pressões de 150 e 250 bar e adição de 0, 5 e 15 % de etanol como co-solvente, não apresentaram inibição frente aos microorganismos estudados (*C. Albicans*, *E. coli* e *S. aureus*).

Com o objetivo de estudar a possibilidade de fracionar a própolis bruta de modo a obter frações enriquecidas em compostos que possuem várias atividades biológicas, como atividade antioxidante e atividade antimicrobiana entre outras, analisou-se as frações do experimento PB-9, que foi feito em condições intermediárias de temperatura, pressão e adição de co-solvente, ou seja, 35 °C, 200 bar e 10 % de adição de etanol como co-solvente.

O experimento PB-9 foi dividido em oito (8) frações diferentes. Na primeira hora de extração, as frações foram coletadas de 15 em 15 minutos e nas duas horas seguintes as frações foram coletadas de 30 em 30 minutos, totalizando assim 3 horas de extração.

A Tabela 4.15 apresenta os resultados de rendimento total, concentração em mg/g dos quatro marcadores selecionados para análise química, atividade antioxidante e antimicrobiana das frações.

Tabela 4.15. Rendimentos, concentrações dos 4 marcadores, atividade antioxidante e atividade antimicrobiana *in vitro* das frações do extrato supercrítico obtido a 35 °C, 200 bar e 10 % de co-solvente.

| Tempo | | X _o | Artepillin C | PHCA | p-cumárico | Canferide | TOTAL | DPPH | <i>S. aureus</i> |
|-------|---------|----------------|--------------|--------|------------|-----------|--------|------------------|-----------------------|
| [min] | | [%] | [mg/g] | [mg/g] | [mg/g] | [mg/g] | [mg/g] | ED ₅₀ | Halo de inibição [mm] |
| 15 | PB-9 F1 | 3,04 | 48,86 | 9,40 | 18,88 | 44,56 | 121,70 | 15,45 | 1,0 |
| 30 | PB-9 F2 | 2,68 | 56,04 | 8,92 | 15,65 | 55,30 | 135,91 | 15,21 | 8,0 |
| 45 | PB-9 F3 | 4,03 | 56,21 | 11,09 | 20,47 | 55,76 | 143,53 | 14,47 | 7,0 |
| 60 | PB-9 F4 | 4,75 | 58,35 | 12,23 | 23,75 | 54,51 | 148,84 | 15,30 | 8,0 |
| 90 | PB-9 F5 | 9,32 | 54,80 | 11,93 | 24,72 | 47,25 | 138,70 | 12,95 | 9,0 |
| 120 | PB-9 F6 | 5,96 | 55,04 | 11,95 | 27,47 | 38,38 | 132,84 | 15,66 | 8,0 |
| 150 | PB-9 F7 | 2,89 | 47,59 | 11,28 | 29,07 | 33,21 | 121,15 | 10,90 | 9,0 |
| 180 | PB-9 F8 | 1,81 | 39,23 | 9,67 | 29,76 | 26,09 | 104,75 | 10,23 | 7,0 |

Pode-se observar na Tabela 4.15 que a fração que apresentou o maior rendimento total foi a Fração 5, cerca de 9,32 %. O menor rendimento, como era previsto, foi referente a Fração 8 que apresentou aproximadamente 1,81 % de rendimento total.

A Fração 4 apresentou a maior concentração de Artepillin C comparando com as outras frações deste experimento de extração supercrítica da própolis bruta, a qual apresentou concentração de 58,35 mg/g.

A melhor atividade antioxidante foi apresentada pelas Fração 7 e 8 que apresentaram aproximadamente 10 µg/mL.

De acordo com os resultados de extração da própolis bruta sem a adição de co-solvente, pode-se sugerir que a presença de compostos como ceras no material sólido interfere na extração de substâncias polares. Contudo, uma recomendação é o uso da ESC focado na extração de ceras, com o objetivo de “limpar” a matriz sólida e em seguida a extração utilizando solvente polar, selecionado para a extração de compostos bioativos como os compostos fenólicos.

Pode-se verificar na Tabela 4.15, que todas as frações obtidas no ponto central, ou seja, a 35 °C, 200 bar e 10 % de co-solvente apresentaram razoável inibição de *S. aureus*.

4.8 Resultados complementares sobre a extração supercrítica da própolis bruta

Foram realizadas duas extrações complementares da própolis bruta com adição de diferentes co-solventes, como acetato de etila e etanol, no laboratório EXTRAE. O equipamento utilizado está descrito no item 3.4.1 da seção Materiais e Métodos. Os solventes selecionados foram o acetato de etila (Ecibra, Santo Amaro, SP) e o etanol (Merck, Darmstadt, Germany).

A motivação para a realização de uma extração supercrítica utilizando acetato de etila como co-solvente surgiu a partir do trabalho de Lee et al. (2007), no qual os autores fizeram uma extração supercrítica da própolis bruta de origem brasileira com adição de 13,9 (m/m) % de acetato de etila como co-solvente, obtendo um extrato com 40 (m/m) % de Artepillin C. Após a obtenção do extrato supercrítico, este foi purificado utilizando coluna cromatográfica de sílica-gel, obtendo-se rendimento e purificação de produto de 95 (m/m) % em Artepillin C.

As duas extrações foram realizadas com aproximadamente 5 gramas de própolis bruta misturados a esferas de vidro. O co-solvente, na porcentagem de 10 (m/m) % foi adicionado sobre a própolis bruta já acondicionada dentro do extrator. A temperatura utilizada nos experimentos de extração supercrítica foi de 35 °C, pressão de 200 bar e adição de 10 % de co-solvente. As condições operacionais utilizadas referem-se ao ponto central das condições de extração com a própolis bruta.

O extrato era coletado em frascos de vidro âmbar manipulando-se a válvula micrométrica. O tempo de extração foi de três horas e vazão de CO₂ foi mantida em torno de 75 gCO₂/h. A Tabela 4.16 apresenta o rendimento global (%) das duas extrações com diferentes co-solventes. O experimento PB-AE representa a

extração supercrítica com adição de 10 (m/m) % de acetato de etila como co-solvente e PB-EtOH representa a extração supercrítica com adição de 10 (m/m) % de etanol como co-solvente.

Tabela 4.16. Condições experimentais e rendimento global (X_0) obtidos nas extrações com diferentes co-solventes.

| Experimento | T [°C] | Pressão [bar] | Densidade [kg/cm ³] | Co-solvente [%] | Tempo [h] | X_0 [%] | Despressurização [g] |
|-------------|-----------|------------------|------------------------------------|--------------------|--------------|--------------|-------------------------|
| PB-AE | 35 | 200 | 866,1 | 10 | 3 | 7,92 | 0,0093 |
| PB-EtOH | 35 | 200 | 866,1 | 10 | 3 | 7,15 | 0,0174 |

* Angus et al. (1976).

** $X_0 = (\text{kg extrato/kg de matéria-prima}) \cdot 100$ (% base seca), valores médios de triplicatas de extrações.

Despressurização: representa a quantidade de extrato obtido na despressurização do sistema.

Pode-se observar na Tabela 4.16 que o rendimento global das extrações utilizando acetato de etila e etanol como co-solventes não apresentou diferença significativa. O ensaio PB-AE apresentou 7,92 % de rendimento global e o ensaio PB-EtOH rendimento global de 7,15 %.

Comparando-se a Tabela 4.13 com a Tabela 4.16 pode-se observar que o rendimento da amostra PB-9, na qual utilizou 10 % de etanol como co-solvente foi muito superior aos rendimentos obtidos nas mesmas condições de temperatura, pressão e porcentagem de co-solvente das amostras PB-AE e PB-EtOH. O experimento PB-9 apresentou rendimento global de 37,47 %, já os experimentos PB-AE e PB-EtOH apresentaram 7,92 % e 7,15 %, respectivamente. Os 10 % de co-solvente foram adicionados diretamente sobre a própolis bruta, procedimento diferente ao utilizado para o experimento PB-9. O etanol e acetato de etila como

co-solventes favorecerão apenas o início da extração, enquanto encontram-se no leito de extração.

A Tabela 4.17 apresenta as concentrações dos extratos obtidos através da extração supercrítica da própolis bruta utilizando 10 % de etanol e 10 % de acetato de etila como co-solventes.

Tabela 4.17. Concentração dos 4 marcadores do extrato supercrítico utilizando 10 % de adição de co-solvente.

| | Artepillin C | PHCA | <i>p</i> -cumárico | Canferide | TOTAL |
|---------|--------------|--------|--------------------|-----------|--------|
| | [mg/g] | [mg/g] | [mg/g] | [mg/g] | [mg/g] |
| PB-AE | 34,56 | 2,06 | 0,98 | 3,67 | 41,27 |
| PB-EtOH | 30,47 | 1,46 | 0,70 | 48,20 | 80,83 |

Pode-se observar na Tabela 4.17 a concentração de Artepillin C no experimento PB-AE foi de 34,56 mg/g e a concentração no extrato do experimento PB-EtOH foi de 30,47 mg/g, ou seja a concentração de Artepillin C na amostra PB-AE foi aproximadamente 11 % superior.

Para os demais compostos a amostra PB-AE também apresentou maiores concentrações dos compostos analisados, com exceção para o canferide o qual apresentou concentração bem superior quando se utilizou etanol como co-solvente.

Para estas duas extrações não foram analisadas as atividades antioxidante e antimicrobiana dos extratos.

4.9 Análise quimiométrica

A quimiometria, através do PCA, foi utilizada para correlacionar os tipos de extração os quais a própolis foi submetida e as variáveis relacionadas, que são elas: rendimento de extração, composição em mg/g, frente aos quatro marcadores selecionados (Artepillin C, ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico, *p*-cumárico e canferide) e atividade antioxidante, com os valores expressos em termos de ED₅₀.

A Figura 4.18 apresenta similaridades ou diferenças apresentadas pelas amostras em função das variáveis e a Figura 4.18 apresenta as variáveis que foram analisadas através da quimiometria, que contribuem para a separação das amostras observadas na Figura 4.18.

A Tabela 4.18 apresenta a codificação que foi utilizada para a análise de PCA.

Tabela 4.18. Variáveis analisadas no PCA e codificações que foram utilizadas para a análise quimiométrica.

| CÓDIGO | Número | T | P | Co-solvente | REND | Ác. 3,5-diprenil- 4-hidroxicinâmico | Ác. 3-prenil- 4-hidroxicinâmico | Ác. p-cumárico | Canferide | DPPH |
|---------|--------|------|-------|-------------|--------|--|------------------------------------|----------------|-----------|-------|
| | | [°C] | [bar] | [%] | [%] | [mg/g] | [mg/g] | [mg/g] | [mg/g] | ED 50 |
| | | | | | | DHCA | PHCA | P-CUM | KAEMP | |
| C - 1 | 1 | 20 | 150 | 0 | 11,90 | 47,68 | 4,34 | 4,86 | 3,69 | 13,87 |
| C - 2 | 2 | 20 | 200 | 0 | 12,18 | 44,72 | 3,72 | 3,73 | 2,59 | 9,99 |
| C - 3 | 3 | 20 | 250 | 0 | 12,37 | 47,87 | 4,62 | 4,94 | 1,76 | 7,91 |
| C - 4 | 4 | 35 | 150 | 0 | 13,35 | 45,62 | 4,85 | 3,35 | 2,88 | 19,32 |
| C - 5 | 5 | 35 | 200 | 0 | 14,91 | 45,10 | 3,58 | 3,58 | 2,74 | 16,13 |
| C - 6 | 6 | 35 | 250 | 0 | 15,36 | 51,14 | 5,12 | 5,84 | 3,80 | 19,45 |
| C - 7 | 7 | 50 | 150 | 0 | 12,32 | 40,97 | 4,60 | 3,37 | 4,76 | 11,01 |
| C - 8 | 8 | 50 | 200 | 0 | 14,75 | 48,80 | 4,38 | 4,50 | 4,09 | 11,57 |
| C - 9 | 9 | 50 | 250 | 0 | 17,95 | 52,38 | 7,43 | 5,73 | 9,34 | 13,36 |
| CS - 1 | 10 | 20 | 150 | 5 | 82,05 | 26,92 | 12,98 | 23,49 | 10,57 | 16,13 |
| CS - 2 | 11 | 20 | 250 | 5 | 79,04 | 31,31 | 11,68 | 22,30 | 1,95 | 15,01 |
| CS - 3 | 12 | 20 | 150 | 15 | 96,39 | 18,39 | 5,21 | 9,53 | 2,67 | 16,04 |
| CS - 4 | 13 | 20 | 250 | 15 | 100,00 | 4,87 | 0,90 | 0,00 | 0,00 | 16,14 |
| CS - 5 | 14 | 50 | 150 | 5 | 81,22 | 30,07 | 6,17 | 13,63 | 0,00 | 14,56 |
| CS - 6 | 15 | 50 | 250 | 5 | 100,00 | 6,45 | 1,67 | 0,33 | 0,00 | 15,86 |
| CS - 7 | 16 | 50 | 150 | 15 | 100,00 | 17,55 | 4,96 | 8,69 | 2,22 | 17,93 |
| CS - 8 | 17 | 50 | 250 | 15 | 100,00 | 6,97 | 1,59 | 0,75 | 3,71 | 16,00 |
| CS - 9 | 18 | 35 | 200 | 10 | 100,00 | 15,11 | 3,31 | 9,61 | 2,80 | 16,50 |
| Pb - 1 | 19 | 20 | 150 | 5 | 18,47 | 29,58 | 9,33 | 16,25 | 0,88 | 16,63 |
| Pb - 2 | 20 | 50 | 150 | 5 | 20,30 | 12,34 | 0,97 | 1,85 | 0,97 | 13,55 |
| Pb - 3 | 21 | 20 | 250 | 5 | 20,06 | 29,00 | 8,79 | 15,43 | 0,00 | 15,81 |
| Pb - 4 | 22 | 50 | 250 | 5 | 27,83 | 19,42 | 2,52 | 4,33 | 0,71 | 16,79 |
| Pb - 5 | 23 | 20 | 150 | 15 | 38,95 | 2,27 | 1,25 | 0,72 | 0,00 | 14,03 |
| Pb - 6 | 24 | 50 | 150 | 15 | 42,14 | 36,57 | 15,29 | 27,10 | 11,92 | 17,99 |
| Pb - 7 | 25 | 20 | 250 | 15 | 40,83 | 2,54 | 1,66 | 1,68 | 0,00 | 15,57 |
| Pb - 8 | 26 | 50 | 250 | 15 | 51,34 | 12,76 | 2,86 | 4,23 | 0,00 | 12,53 |
| Pb - 9 | 27 | 35 | 200 | 10 | 37,47 | 52,02 | 10,81 | 23,72 | 44,38 | 13,77 |
| Pb - 10 | 28 | 20 | 150 | 0 | 3,29 | 20,41 | 1,35 | 1,89 | 24,86 | 22,47 |
| Pb - 11 | 29 | 50 | 150 | 0 | 3,50 | 0,82 | 0,17 | 0,13 | 1,15 | 27,07 |
| Pb - 12 | 30 | 20 | 250 | 0 | 4,03 | 24,63 | 2,09 | 2,87 | 29,48 | 19,30 |
| Pb - 13 | 31 | 50 | 250 | 0 | 7,30 | 57,81 | 1,88 | 1,82 | 0,00 | 16,80 |

C: extração supercrítica realizada a partir do EEP.

CS: extração supercrítica realizada a partir do EEP com a adição de etanol como co-solvente

PB: extração supercrítica realizada a partir da própolis bruta, com ou sem adição de etanol como co-solvente.

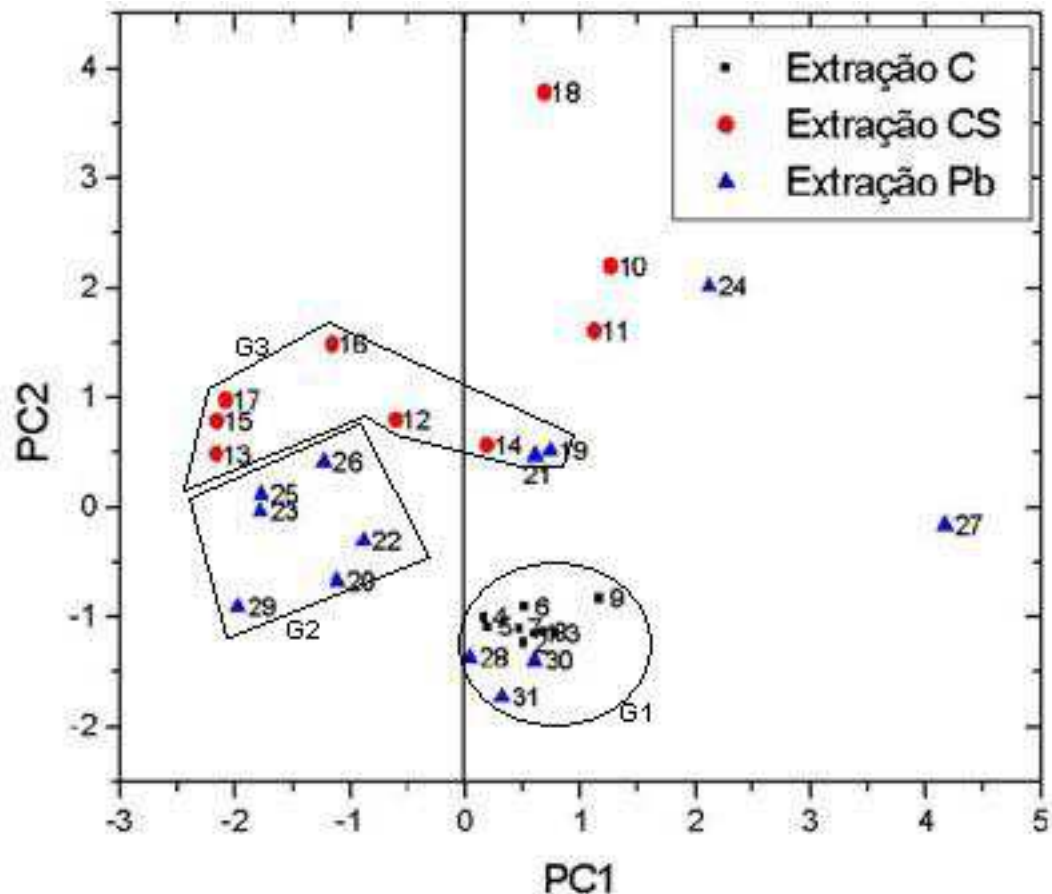


Figura 4.18. Gráfico dos escores: PC1 X PC2, representando as análises das amostras submetidas a diferentes tipos de extração.

Na Figura 4.18, extração C representa as extrações supercríticas feitas a partir do extrato etanólico de própolis seco nas temperaturas de 20 °C, 35 °C e 50 °C, pressões de 150, 200 e 250 bar. Extração CS representa o grupo de extrações supercríticas feitas a partir do extrato etanólico de própolis seco nas mesmas condições de temperatura e pressão citado anteriormente e adição de etanol como co-solvente nas proporções de 5, 10 e 15 %. Extração Pb são relativas a extração supercrítica da própolis bruta nas condições de temperatura de 20, 35 e 50°C,

pressões de 150, 200 e 250 bar, com adição de etanol como co-solvente nas proporções de 0, 5, 10 e 15 %.

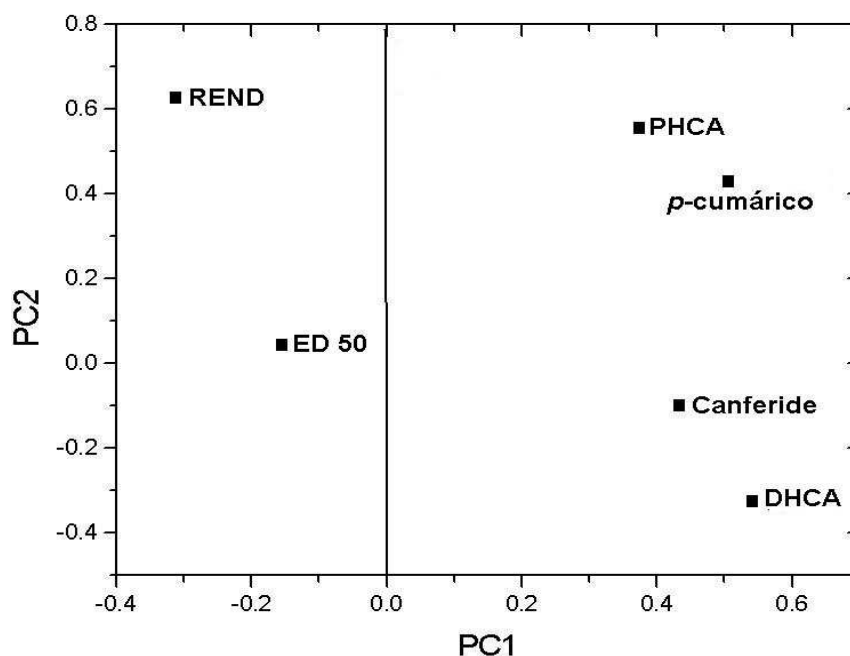


Figura 4.19. Gráfico dos Loading: PC1 X PC2, onde pode ser visualizada as variáveis que contribuem para a separação das amostras na Figura 4.17.

A partir da Figura 4.18 pode-se observar que os diferentes tipos de extração foram divididos em três grandes grupos (G1, G2 e G3). O G1 é composto principalmente da extração supercrítica do EEPS e da própolis bruta sem adição de co-solvente. Este grupo apresentou baixo rendimento global de extração, porém apresentou maior concentração de Artepillin C e canferide.

Os grupos G2 e G3, os quais representam a extração supercrítica a partir do extrato etanólico de própolis com adição de co-solvente e a extração

supercrítica a partir da própolis bruta com adição de co-solvente apresentaram valores maiores de ED₅₀ e maiores rendimentos de extração.

Através da comparação entre a Figura 4.18 e da Figura 4.19, pode-se observar que os pontos 24 e 27 apresentaram diferenças entre si e com o restante das amostras que pertencem ao mesmo grupo. O ponto 24 apresenta maior concentração de ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico e *p*-cumárico, enquanto a amostra 27 apresenta maior concentração de Artepillin C e canferide.

Avaliando os pontos 10, 11 e 18 pode-se observar que os pontos 10 e 11 são muito semelhantes entre si, já o ponto 18 difere na concentração de Artepillin C, que é significativamente inferior e o rendimento de extração é superior.

CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES

Uma das áreas mais ascendentes da Engenharia de Alimentos e Química na atualidade é a tecnologia com fluidos supercríticos. As taxas de crescimento das publicações científicas, congressos, patentes e o aumento de grupos de pesquisas espalhados pelo mundo confirmam este fato.

Neste trabalho foram apresentados estudos sobre a extração supercrítica a partir do extrato etanólico de própolis e da própolis bruta, utilizando ou não etanol como co-solvente.

O extrato etanólico de própolis a partir da própolis bruta apresentou um rendimento médio de 39,45 % e a análise antioxidante do extrato etanólico de própolis seco (EEPS), através do método de sequestro do DPPH, mostrou que o extrato apresenta alta atividade antioxidante, ou seja, ED₅₀ de 7,58 µg/mL.

Foram realizados experimentos de extração supercrítica a partir do extrato etanólico de própolis nas condições de temperatura de 20 °C, 35 °C e 50 °C e pressões de 150, 200 e 250 bar. O maior rendimento total foi obtido na condição de 50 °C e 250 bar. A concentração de Artepillin C não varia muito com a temperatura e pressão de extração, quando comparado com o EEPS de partida.

O experimento de extração supercrítica a partir do EEPS nas condições de 20 °C e 250 bar apresentou alta atividade antioxidante, cerca de 7,91 µg/mL, muito próximo ao valor obtido para o EEPS. Na pressão de 200 bar, o extrato obtido também apresentou alta atividade antioxidante frente às demais amostras.

As curvas de extração obtidas com os resultados experimentais descreveram comportamento semelhante ao obtido por diversos autores que trabalharam com fluidos pressurizados, ou seja, as curvas de extração possuem três fases distintas, uma de taxa constante de extração, uma etapa decrescente e a outra etapa nula.

A extração supercrítica a partir do extrato etanólico de própolis com adição de 5, 10 e 15 % não apresentou resultados satisfatórios. Com a adição de 15 % de co-solvente a extração foi de praticamente 100 %, ou seja, não se obteve fracionamento do extrato etanólico de própolis. Neste caso, seria aconselhável a utilização de menores teores de co-solvente.

Foram realizadas extrações supercríticas a partir da própolis bruta nas condições de 20 °C, 35 °C e 50 °C, pressões de 150, 200 e 250 bar e adição de 0, 5, 10 e 15 % de etanol como co-solvente. Como a própolis possui grande afinidade com o etanol, os maiores rendimentos de extração foram os experimentos que utilizaram 15 % de co-solvente, ou seja o etanol ajuda a solubilizar os compostos presente na própolis. O melhor resultado de atividade antioxidante dos extratos obtidos com adição de 15 % de etanol como co-solvente foi na extração feita nas condições de 50 °C, 250 bar e adição de 15 % de co-solvente, que apresentou o maior rendimento global, de 51,34 % e menor ED₅₀ (12,53 µg/mL).

A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) permitiu a identificação e confirmação da presença dos 4 marcadores selecionados, Artepillin C, PHCA, *p*-cumárico e canferide. O Artepillin C é um dos responsáveis pela atividade antioxidante dos extratos etanólicos de própolis.

Foram avaliadas a atividade antimicrobiana contra três microorganismos: uma bactéria Gram positiva, *S. aureus*, uma bactéria Gram negativa: *E. coli* e uma levedura: *C. albicans* para todos os extratos obtidos neste trabalho. Não se verificou atividade antimicrobiana contra *C. albicans* e *E. coli* em nenhum extrato analisado.

O extrato etanólico de própolis seco (EEPS) apresentou halo de inibição de 10 mm frente a *S. aureus*. As extrações supercríticas realizadas a partir do EEPS, nas condições de 35 °C, 200 bar e 50 °C e 250 bar de pressão, também apresentaram 10 mm de halo de inibição frente ao *S. aureus* e a concentração de Artepillin C destes extratos foi alta.

Os extratos supercríticos obtidos a partir da própolis bruta não apresentaram inibição contra *S. aureus*, porém os extratos supercríticos obtidos a partir da própolis bruta nas condições de temperatura de 20 °C, 200 bar de pressão e 10 % de adição de etanol como co-solvente, que correspondia ao ponto central das extrações, apresentaram fraca atividade antimicrobiana frente ao *S. aureus*.

Dentro das faixas de temperatura, pressão e porcentagem de co-solvente investigadas neste trabalho, os resultados de fracionamento utilizando CO₂-SC não apresentaram vantagens em termos de concentrar os compostos analisados, atividade antioxidante e antimicrobiana quando comparados com o extrato etanólico de própolis seco.

CAPÍTULO 6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Empregar pressões mais elevadas com o objetivo de obter um possível aumento de concentração do Artepillin C.
- Fazer análises de fenóis e flavonóides totais e verificar se existe correlação com a atividade antioxidante e antimicrobiana.
- Utilizar menos de 5 % de co-solvente nas extrações supercríticas para fracionar a própolis, pois a baixas concentrações pode-se obter frações que sejam interessantes.

CAPÍTULO 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKERMANN, T. Fast chromatographic study of propolis crudes. *Food Chemistry*, 42(2),135-138, 1991.

AGA, H.; SHIBUTA, T.; SUGIMOTO, T.; KURIMOTO, M.; NAKAJIMA, S. Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 58(5), 945-946, 1994.

ALDEMANN, J. Própolis: Variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana/antioxidante, Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná – Curitiba, 36-37, 2005.

ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L.; PAREDES-GUZMÁN, J.; PARK, Y. K. Chemical composition of *Baccharis dracunculifolia*, the botanical source of propolis from the states of São Paulo and Minas Gerais, Brazil. *Ciência Rural*, 35(4), 909-915, 2005.

AMOROS, M., LURTON, E., BOUSTIE, J., GIRRE, L., SAUVAGER, F., CORMIER, M. Comparison of the anti-herpes simplex virus activities of propolis and 3-methylbut-2-enyl caffeate. *Journal of Natural Products*, 64, 235-240, 1994.

ANGUS, S.; ARMSTRONG, B.; REUCK, K. M. International Thermodynamic Table of the Fluid State: Carbon Dioxide. 1ª Ed. London: Pergamon Press, 3, 385, 1976.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, Official methods of Analysis of AOAC International. Maryland: Ed. Patricia Cunnif, 30.1.4, 1997.

APICULTURA.< www.breyer.ind.br/apicultura_propolis.htm>. Acesso em 25 agosto 2006.

BADALYAN, A. G.; WILKINSON, G. T.; CHUN, B. Extraction of Australian ginger root with carbon dioxide and ethanol entrainer. *Journal of Supercritical Fluids*, 13, 319-324, 1998.

BANKOVA, V. S.; MARCUCCI, M. C. Standardization of propolis: present status and perspectives. *International Bee Research Association*, 81(4), 182-188, 2000.

BANKOVA, V. S.; CASTRO, S. L. d.; MARCUCCI, M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31, 3-15, 2000.

BANKOVA, V.; BOUDOURAVA-KRASTEVA, G.; POPOV, S.; SFORCIN, J. M.; FRETE, X.; KUJUMGIEV, A.; MAIMONI-RODELLA, R.; POPOV, S. Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from São Paulo state. *Zeitschrift für Naturforschung*, 54c, 401-405, 1999.

BANKOVA, V.; BOUDOURAVA-KRASTEVA, G.; POPOV, S.; SFORCIN, J. M.; FUNARI, S. R. C. Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. *Apidologie*, 29(4), 361-367, 1998.

BANKOVA, V.; MARCUCCI, M. C.; SIMOVA, S.; NIKOLOVA, N.; KUJUMGIEV, A.; POPOV, S. Antibacterial diterpenic acids from Brazilian propolis. *Zeitschrift für Naturforschung*, 51c, 277-280, 1996.

BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; KUJUMGIEV, A.; MARCUCCI, M. C.; POPOV, S. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. *Zeitschrift für Naturforschung*, 50c, 167-172, 1995.

BANSKOTA, A. H.; TEKUZA, Y.; ADNYANA, I. K.; MIDORIKAWA, K.; MATSUSHIGE, K.; MESSAGE, D.; HUERTAS, A. A. G.; KADOTA, S. Cytotoxic hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. *Journal of Ethnopharmacology*, 72(1-2), 239-246, 2000a.

BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; MIDORIKAWA, K.; MATSUSHIGE, K.; KADOTA, S. Two novel cytotoxic benzofuran derivatives from Brazilian propolis. *Journal of Natural Products*, 63(9), 1277-1279, 2000b.

BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; PRASAIN, J. K.; MATSUSHIGE, K.; SAIKI, I.; KADOTA, S. Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities. *Journal of Natural Products*, 61(7), 896-900, 1998.

BASNET, P.; MATSUNO, T.; NEIDLEIN, R. Potent free radical scavenging activity of propolis isolated from Brazilian propolis. *Zeitschrift für Naturforschung*, 52c(11-12), 828-833, 1997.

BASNET, P.; MATSUSHIGE, K.; HASE, K.; KADOTA, S.; NAMBA, T. Four Di-O-caffeoyl quinic acid derivatives from propolis. Potent hepatoprotective activity in experimental liver injury models. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 19(11), 1479-1484. 1996.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76, 1996.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199-1200, 1958.

BORRELLI, F.; MAFFIA, P.; PINTO, L.; IANARO, A.; RUSSO, A.; CAPASSO, F.; IALENTI, A. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. *Fitoterapia*, 1, S53-S63, 2002.

BOSIO, K.; AVANZINI, C.; D'AVOLIO, A.; OZINO, O.; SAVOIA, D. In vitro activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, 31, 174-177, 2000.

BOTT, T. R. Fundamentals of carbon dioxide in solvent extraction. *Chemistry and Industry*, 19(6), 394-396, 1982.

BRAGA, M. E. M.; LEAL, P. F.; CARVALHO, J. E.; MEIRELES, M. A. A. Comparison of yield, composition and antioxidant activity of Turmeric (*Curcuma longa* L.) extracts obtained using various techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(22), 6604-6611, 2003.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm – Wiss Technol*, 22, 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa nº3, de 19 de janeiro 2001. Aprova os regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Ceras de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e extrato de Própolis, conforme consta nos Anexos desta Instrução Normativa.

BROGLE, H. CO₂ in solvent extraction. *Chemistry and Industry*, [s.l.], 12, 385-390, 1982.

BRUNNER, G. Gas extraction: An introduction to fundamentals of supercritical fluid and the application to separation process. Darmstadt, Germany, Steinkopff; New York Springer, 387, 1994.

BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of the bee propolis. *Food and Chemical Toxicology*, 36, 347-363, 1998.

CATCHPOLE, O. J.; GREG, J. B.; MITCHELL, K. A.; LAN, J. S. Supercritical antisolvente fractionation of propolis tincture. *Journal of Supercritical Fluids*, 29, 97-106, 2004.

CAZAR, R. A. An exercise on chemometrics for a quantitative analysis course. *Journal of Chemical Education*, 80(9), 1026-1029, 2003.

CIZMARIK, J.; LAHITOVA, N. Antimutagenicity of propolis. *Pharmazie*, 53(12), 883-884, 1998.

CLSI, Clinical Laboratory Standards Institute. <www.nccl.org>. Acesso em 15 janeiro 2008.

CLIFFORD, T. *Fundamentals of Supercritical Fluids*, Oxford University Press: New York, E.U.A., 210, 1999.

COELHO, L. A. F. Extração supercrítica de óleo essencial de *Rosmarinus Officinalis* L.: dados experimentais, modelagem do processo e predição da solubilidade. Dissertação de mestrado – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, 1996.

CRISAN, L.; ZAHARIA, C. N.; POPOVICI, F.; JUCU, V.; BELU, O.; DASCALU, C.; MUTIU, A. PRETESCU, A. Natural propolis extract NIVCRISOL in the treatment of acute and chronic rhinopharyngitis in children. *Romanian Journal of Virology*, 46(3-4), 115-33, 1995.

CROFT, K. D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Annals of the New York Academy of Science*, 854, 435-442, 1998.

DAUGSCH, A.; MORAES, C. S.; FORT, P.; PACHECO, E.; LIMA, I. B.; ABREU, J. A.; PARK, Y. K. Própolis vermelha e sua origem botânica. *Mensagem Doce*, 89(2-15), 2006.

DIMOV, V., IVANOVSKA, N., MANOLOVA, N., BANKOVA, V., NIKOLOV, N. E POPOV, S. Immunomodulatory action of propolis - Influence on antiinfectious protection and macrophage function. *Apidologie*, 22(2), 155-162, 1991.

DOBROWOLSKI, J. W.; VOHORA, S. B.; SHARMA, K.; SHAH, S. A.; NAQVI, S. A. 1991. H.; DANDIYA, P. C. Antibacterial, antifungal, antiamoebic, anti inflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *Journal of Ethnopharmacology*, 35, 77-82, 1991.

EGGERS, R.; SIEVERS, U.; STEIN, W. High pressure extraction of oil seed. *Journal of the American oil Chemists Society*, 62(8), 1222-1230, 1985.

EKART, M. P.; BENNETT, K. L.; EKART, S. M.; GURDIAL, G. S.; LIOTTA, C. L.; ECKERT, C. A. Co-solvent interactions in Supercritical Fluid Solutions. *AIChE Journal*, 39, 235-248, 1993.

EMBRAPA, Meio Norte. PEREIRA, F. M.; LOPES, M. T. R.; CAMARGO, R. C. R.; VILELA, S. L.O. Produção de mel.< www.cpamn.embrapa.br/pesquisa/apicultura/mel/importancia.html>. Acesso em 16 julho 2007.

FAHMY, T. M.; PAULAITIS, M. E.; JOHNSON, D. M. MCNALLY, A. E. P. Modifier effects in the supercritical fluid extraction of solutes from Clay, Soil and Palnt Materials. *Analytical Chemistry*, 65, 1462-1469, 1993.

FONTANA, J. D., ADELMANN, J., PASSOS, M., MARASCHIN, M., LACERDA, C. A.; LANÇAS, F. M. Propolis: chemical micro-heterogeneity and bioactivity. In: New Jersey: Humana press, 203-218, 2004.

FONTANA, J. D.; PASSOS, M.; SANTOS, M. H. R.; FONTANA, C. K.; OLIVEIRA, B. H.; SCHAUSE, L.; PONTAROLO, R.; BARBIRATO, M. A.; RUGGIERO, M. A.; LANÇAS, F. M. Profiling propolis flavonoids by means of micellar electrokinetic capillary chromatography, capillary gas chromatography and bactericidal action. *Chromatographia*, 52(3-4), 147-151, 2000.

FUENTES, A.M.; HERNANDEZ, N. Accion antimicrobiana de los extractos alcholicos de propoleo. *Revista Cubana de Farmacia*, 24, 34-44, 1990.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O.; MATHOR, M. B. Analysis of propolis from *Baccharis dracunculifolia* DC. (Compositae) and its effects on mouse fibroblasts. *Journal of Ethnopharmacology*, 111(2), 206-212, 2007.

GERMER, S. P. M. Extração do óleo essencial de cravo-da-índia em leito fixo com dióxido de carbono líquido subcrítico. Dissertação de mestrado – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Unicamp, 1989.

GHISALBERTI, E. L. Propolis: A review. *Bee World*, 60, 59-84, 1979.

GRANGE, J. M.; DAVEY, R. W. Antibacterial properties of propolis (bee glue). *Journal of the Royal Society of Medicine*, 83(3), 159-160, 1990.

GREENAWAY, W.; MAY, J.; SCAYSBROOK, T.; WHATLEY, F. R. Identification by gas- chromatography mass-spectrometry of 150 compounds in propolis. *Zeitschrift für Naturforschung*, 46c, 111-121, 1991.

GRUNBERGER, D.; BANERJEE, R.; EISINGER, K.; OLTZ, E. M.; EFROS, L.; CALDWELL, M.; ESTEVEZ, V.; NAKANISHI, K. preferential cyto-toxicity on tumor-cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. *Experientia*, 44(3), 230-232, 1988.

HATANO, T.; EDAMATSU, R.; MORI, A.;FUJITA, Y.; YASUHARA, T.; YOSHIDA, T.; OKUDA, T. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical, and on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 37, 2016-2021, 1989.

HAUTHAL, W. H. Advances with supercritical fluids (review). *Chemosphere*, 43(2), 123-135, 2001.

HAYASHI, K.; KOMURA, S.; ISAJI, N.; OHISHI, N.; YAGI, K. Isolation of antioxidative compounds from Brazilian propolis: 3,4-dihidroxy-5-prenylcinnamic

acid, a novel potent antioxidant. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 47(11), 1521-1524, 1999.

HEGAZI, A. G.; HADY, F. K. A. E.; ALLAH, F. A. M. A. Chemical composition and antimicrobial activity of European propolis. *Zeitschrift für Naturforschung*, 55c, 70-75, 2000.

IBAÑEZ, E.; KUBÁTOVÁ, A.; SEÑORÁNS, F. J.; CAVERO, S.; REGLERO, G.; HAWTHORNE, S. B. Subcritical Water Extraction of Antioxidant Compounds from Rosemary Plants, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 375, 2003.

IVANOVSKA, N. D., DIMOV, V. B., BANKOVA, V. S. E POPOV, S. S. Immunomodulatory action of propolis. VI. Influence of a water soluble derivative on complement activity *in vivo*. *Journal of Ethnopharmacology*, 47, 145-147, 1995.

JAFRA (Japan Functional Food Research Association), <<http://jafra.gr.jp/eng/propolis.html>>. Acesso em 30 julho 2007.

KEDZIA, A. sensitivity of anaerobic bacteria to the ethanol extract of propolis. *Phytotherapie*, 6, 4-6, 1990.

KIMOTO, T., AGA, M., HINO, K., KOYA-MIYATA, S., YAMAMOTO, Y., MICALLEF, M. J., HANAYA, T., ARAI, S., IKEDA, M., KURIMOTO, M. Apoptosis of human leukemia cells induced by Artepillin C, an active ingredient of Brazilian propolis. *Anticancer Research*, 21, 221-228, 2001.

KIMOTO, T.; ARAI, S.; KOUGUCHI, M.; AGA, M.; NOMURA, Y.; MICALLEF, M. J.; KURIMOTO, M.; MITO, K. Apoptosis and suppression of tumor growth by Artepillin C extracted from Brazilian propolis. *Cancer detection and Prevention*, 22(6), 506-515, 1998.

KING, M. B.; BOOT, T. R. Extraction of Natural Products Using Near-Critical Solvents, Chapman & Hall, 325 , 1993.

KÖNIG, B. Plant sources of propolis. *Bee World*, 66(4), 136-139, 1994.

KOO, M. H.; PARK, Y. K. Investigação do teor de flavonóides nas pópolis comerciais. *Revista Brasileira de Apicultura*, 6-11, Nov-Dez, 1996.

KROL, W.; SCHELLER, S.; SHANI, J.; PIETSZ, G.; CZUBA, Z.; Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on the growth of *Staphylococcus aureus*. *Arzneimittel-Forschung Drug Research*, 43, 607-609, 1993.

KUJUMGIEV, A., TSVETKOVA, I., SERKEDJIEVA, Y., BANKOVA, V., CHRISTOV, R., POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology*, 64, 235-240, 1999.

LANG, Q.; WAI, C. M. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies-practical review. *Talanta*, 53, 771-782, 2001.

LEE, Y-N.; CHEN, C-R.; YANG, H-L.; LIN, C-C.; CHANG, C-M. J. Isolation and purification of 3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid (artepillin C) in Brazilian propolis by supercritical fluid extraction. *Separation and Purification Technology*, 54, 130-138, 2007.

LINDENFELSER, L. A. Antimicrobial activity of propolis. *American Bee Journal*, 107(3), 130-131, 1967.

MARCUCCI, M. C. Própolis tipificada: um novo caminho para a elaboração de medicamentos de origem natural, contendo este produto apícola. *Revista Fitos*, 1(3), 36-46, 2006.

MARCUCCI, M. C.; FERRERES, F.; GARCÍA-VIGUERA, C. BANKOVA, V. S.; CASTRO, S. L. d.; DANTAS, A. P.; VALENTE, P. H. M.; PAULINO, N. Phenolic compound from Brazilian propolis with pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 74(2), 105-112, 2001.

MARCUCCI, M. C.; FERRERES, F.; CUSTÓDIO, A. R.; FERREIRA, M. M. C.; BANKOVA, V. S.; GARCÍA-VIGUEIRA, C.; BRETZ, W. A. Evaluation of phenolic compounds in Brazilian propolis from different geographic regions. *Zeitschrift für Naturforschung*, 55c, 76-81, 2000.

MARCUCCI, M.C.; BANKOVA, V.S. Chemical composition, plant origin and biological activity of Brazilian propolis. *Current Topics in Phytochemistry*, 2, 115-123, 1999.

MARCUCCI, M. C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. *Química Nova*, 19(5), 529-535, 1996.

MARCUCCI, M. C. Propolis; chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, 26, 83-99, 1995.

MARENTIS, R. T. Steps to developing a Comercial Supercritical Carbon Dioxed Processing Plant – in Chapernter & Sevenants. *Supercritical Fluid extraction in Chromatography*, 2^a ed., Ed. Copyringht, 245, 1988.

MATOS, G. D.; PEREIRA-FILHO, E. R.; POPPI, R. J.; ARRUDA, M. A. Z. Análise exploratória em química analítica com emprego de quimiometria: PCA e PCA de imagens. *Revista Analítica*, agosto/setembro, 6, 38-50, 2003.

MATSUDA, S. H. Propolis – health care food. *Foods and Foods Ingredients Journal of Japan*, 160, 64-73, 1994.

MATSUNO, T.; JUNG, S. K.; MATSUMOTO, Y.; SAITO, M.; MORIKAWA, J. Preferential cytotoxicity to tumor cells of 3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid (Artepillin C) isolated from propolis. *Anticancer*, 17, 3565-3568, 1997.

MATSUNO, T. A new clerodane diterpenoid isolated from propolis. *Zeitschrift für Naturforschung*, 50c, 93-97, 1995.

McHUGH, M. A.; KRUKONIS, V. J. Supercritical fluid extraction: Principles and Practice. Butterworth Stoncham: Boston, MA, 3 ed, 1994.

MEIRELES, M. A. A.; NIKOLOV Z. L. Extraction and fractionation of essential oil with liquid carbon dioxide, In: Spices, Herbs and Edible Fungi. G. Charalambous Ed, 171, 1994.

MEIRELES, M. A. A. Supercritical Extraction from Solid: process desingn data (2001-2003), *Current Opinion in Solid State Material Science*, 7, 321-330, 2003.

MENEZES, H.; Jr, M. B.; OLIVEIRA, S. D.; PAGNOCCA, F. C. Antibacterial properties of propolis and products containing propolis from Brazil. *Apidologie*, 28(2), 71-76, 1997.

MIORIN, P. L.; LEVY JUNIOR, N. C.; CUSTODIO, A. R.; BRETZ, W. A.; MARCUCCI, M. A. Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology*, 95, 913-920, 2003.

MIDORIKAWA, K.; BANSKOTA, A. H.; TEKUZA, Y.; NAGAOKA, T.; MATSUSHIGE, K.; MESSAGE, D.; HUERTAS, A. A. G.; KADOTA, S. Liquid chromatography-mass spectrometry analysis of propolis. *Phytochemical Analysis*, 12, 366-373, 2001.

MISHIMA, k.; MATSUYAMA, K.; UCHIYAMA, H.; IDE, M. Microcoating of Flavone and 3-Hydroxyflavone with Polymer using Supercritical Carbon Dioxide. The 4th

International Symposium on Supercritical Fluids. 11-14 May, 267-270. Sendai (Japan), 1997.

MOITA NETO, J. M.; MOITA, G. C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. *Química Nova*, 21(4), 467-469, 1998.

MOURA, M. C. S.; LOPES, A. N. C.; MOITA, G. C.; MOITA NETO, J. M. Estudo multivariado de solos urbanos da cidade de teresina. *Química Nova*, 29(3), 429-425, 2006.

MORENO, M. I. N.; ISLA, M. I.; SAMPIETRO, A. R.; VATTUONE, M. A. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*, 71, 109-114, 2000.

NAGAI, T.; SAKAI, M.; INOUE, H.; SUZUKI, N. Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly and propolis. *Food Chemistry*, 75, 237-240, 2001.

NAKANISHI, I.; UTO, Y.; OHKUBO, K.; MIYAZAKI, K.; YAKUMARU, H.; URANO, S.; OKUDA, H.; UEDA, J-I.; OZAWA, T.; FUKUHARA, K.; FUKUZUMI, S.; NAGASAWA, H.; HORI, H.; IKOTA, N. Efficient radical scavenging ability of Artepillin C, a major component of Brazilian propolis and the mechanism. *Organic Biomolecula Chemical*, 3, 1452-1454, 2003.

NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C.; SILVA, G. L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31(4), 247-256, 2000.

NEGRI, G.; MARCUCCI, M. C. SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F. Hydrocarbons and monoesters of propolis waxes from Brazil. *Apidologie*, 29, 305-314, 1998.

NOTHENBERG, M. Própolis enfrenta bem o desafio das pesquisas. *Química e Derivados*, 348, 24-28, 1997.

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

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; SCAMPARINI, A. R. P.; AGUIAR, C. L. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. *Ciência Rural*, 32(6), 997-1003, 2002.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M. Estudo da preparação dos extratos etanólicos de própolis e suas aplicações. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 18(3), 313-318, 1998a.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; Preparation of water and ethanolic extracts of propolis and evaluation of the preparations. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 62(11), 2230-2232, 1998b.

PARK, Y. K.; KOO, M. H.; IKEGAKI, M.; CONTADO, J. L. Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, 40, 97-106, 1997.

PELLERIN, P. Extraction of natural raw material for the flavor industry. *Perfumer & Flavorist*, 56, 37-41, 1991.

PEREIRA, A. D. S.; SEIXAS, F. R. M. S.; NETO, F. R. D. A. Propolis: 100 anos de pesquisas e suas perspectivas futuras. *Química Nova*, 25(2), 321-326, 2002.

PERRUT, M. Supercritical fluid application: industrial development and economic issues. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 39,4351-4535,2000.

PIANTINO, C. Extração de compostos fenólicos de alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*) com dióxido de carbono supercrítico, Dissertação (mestre em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas – Campinas, 2008.

PIANTINO, C.; AQUINO, F. W. B.; FOLEGATTI-ROMERO, L. A.; CABRAL, F. A. Supercritical CO₂ extraction of phenolic compound from *Baccharis dracunculifolia*. *Journal of Supercritical Fluids*, doi: 10.1016/j.supflu.2008.07.012, 2008.

PIETTA, P. G.; GARDANA, C.; PIETTA, A. M. Analytical methods for quality control of propolis. *Fitoterapia*, 73 (Suppl.1), S7-S20, 2002.

PRADO, P. I., LEWINSOHN, THOMAS M., CARMO, R. L., HOGAN, D. J. Ordenação multivariada na ecologia e seu uso em ciências ambientais. *Ambiente e Sociedade*, 10, 69-83, 2002.

REVERCHON, E. Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products. *Journal of Supercritical Fluids*, 10, 1-37, 1997.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N. J.; BOLWELL, G. P. BRAMLEY, P. M.; PRIDHAM, J. B. The relative antioxidant activities of plant derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical. Research*. 22(4), 375-383, 1995.

RIZVI, S. S. H., BENADO, A. L., ZOLLWEG, J. A., DANIELS, J. A. Supercritical fluid extraction: fundamental principles and modeling methods. *Food Technology*, [s.l.], 40(6), 55-65, 1986.

ROSSI, A.; LONGO, R.; RUSSO, A.; BORRELLI, F. SAUTEBIN, L. The role of the phenethyl Ester of caffeic acid (CAPE) in the inhibition of rat lung cyclooxygenase activity by propolis. *Fitoterapia*, 73, S30-S37, 2002.

RÓNYAI, E.; SIMANDI, B.; TOMOSKOZI, S.; DEAK, A.; VIGH, L.; WEINBRENNER, ZS. Supercritical fluid extraction of corn germ with carbon dioxide-ethyl alcohol mixture. *Journal of Supercritical Fluids*, 14, 75-81, 1998.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76(2), 270-276, 1998.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Compuestos polifenólicos: Efectos fisiológicos. Actividad antioxidante. *Alimentaria*, Ene-Feb, 329, 29-40, 2002.

SAWAYA, A. C. H. F. Análise da composição química de própolis brasileira por espectrometria de massas. Tese de doutorado – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas, 31-36, 2006

SAWAYA, A. C. H. F.; TOMAZELA, D. M.; CUNHA, I. B. S.; BANKOVA, V. S.; MARCUCCI, M. C.; CUSTODIO, A. R. EBERLIN, M. N. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis. *Analyst*, 129, 739-744, 2004.

SENA, M. M.; POPPI, R. J.; FRIGHETTO, R. T. S.; VALARINI, P. J. Avaliação do uso de métodos quimiométricos em anális de solos. *Química Nova*, 23(4), 547-556, 2000.

SHIMIZU, K.; ASHIDA, H.; MATSURA, Y.; KANAZAWA, K. Antioxidative bioavailability of Artepillin C in Brazilian propolis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 424, 181-188, 2004.

SFORCIN, J. M.; Jr., A. F.; LOPES, C. A. M.; BANKOVA, V.; FUNARI, S. R. C. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 73, 243-249, 2000.

STAHL, E.; QUIRIN, K. W.; GERARD, D. Dense gases for extraction and refining. Springer, Berlin, 176-186, 1988.

TAZAWA, S.; WARASHIMA, T.; NORO, T. Studies on the chemical constituents of Brazilian propolis. II *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 47(10), 1388-1392, 1999.

TAYLOR, L. T. Supercritical Fluid Extraction. John Wiley & Sons Inc., Canada, 180, 1996.

UNIFLORA, < www.uniflora.ind.br/conteudo/omercado.asp >. Acesso em 16 julho 2007.

VALDÉS, V.; ROJAS, N. M.; MORALES, C. Ensayo preliminar de la acción antifúngica de extractos de propoleo sobre *Candida albicans*. *Ciência e Tecnologia Agrícola Apicultura*, 3, 41-49, 1987.

YAMAUCHI, R.; KATO, K.; OIDA, S.; KANAEDA, J.; UENO, Y. Benzyl caffeate, an antioxidative compound isolated from propolis. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 56(8), 1321-1322, 1992.

YOU, G. S.; LIN, S. C.; CHEN, C. R.; TSAI, W. C.; CHANG, C. J. HUANG, W. W. Supercritical carbon dioxide extraction enhances flavonoids in water-soluble propolis. *Journal of Chinese Institute of Chemical Engineers*, 33, 233-241, 2002

WALKER, P.; CRANE, E. Constituents of Propolis. *Apidologie*, 18, 327-334, 1987.

WANG, B. J.; LIEN, Y. H.; YU, Z. R. Supercritical fluid extractive fractionation-study of the antioxidant activities of propolis. *Food Chemistry*, 86, 237-243, 2004.

WANG, H.; CHEN, C.; CHANG, C. J. Carbon dioxide extraction of ginseng root hair oil and ginsenosides. *Food Chemistry. Analytical, Nutritional and Clinical Methods Section*, 72, 505-509, 2001.

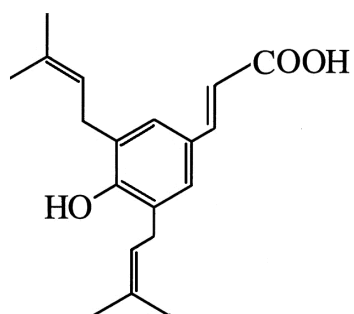
WOLD, S. Principal analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2, 37-52, 1987.

WU, J. e LUYU, Q. Supercritical multiple extraction of bee glue. Chinese Patent CN 1.258.511, 2000

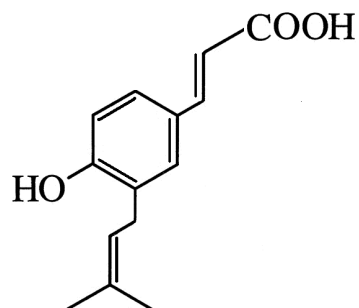
ZANCAN, K. C.; MARQUES, M. O. M.; PETENATE, A. J.; MEIRELES, M. A. A. Extraction of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) oleoresin with CO₂ and co-solvents: a study of the antioxidant action of the extracts. *Journal of Supercritical Fluids*, 24, 57-76, 2002.

ANEXOS

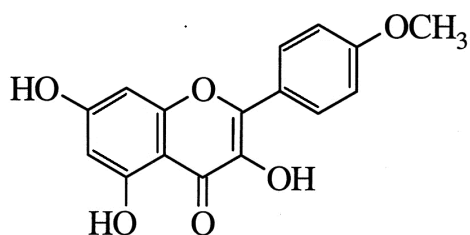
ANEXO A – Estrutura química de alguns compostos encontrados na própolis de origem brasileira com alguma propriedade biológica



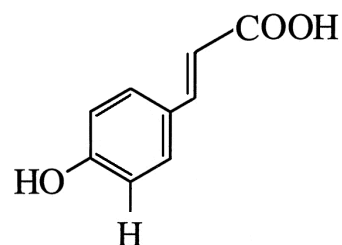
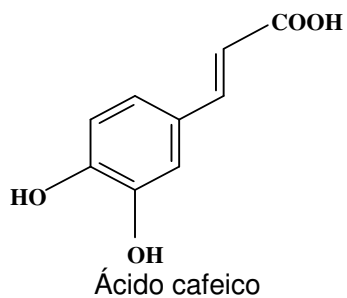
Artepillin C



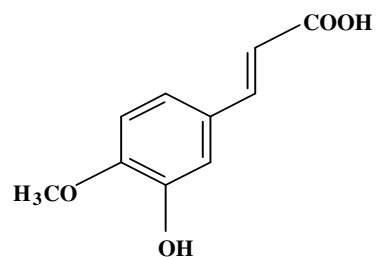
Ácido 3-prenil-4-hidroxicinnâmico



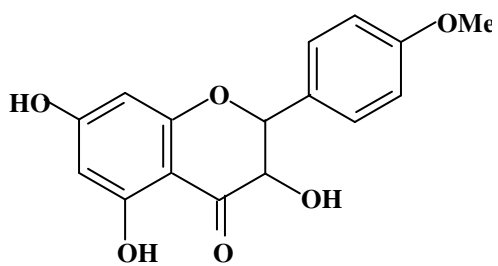
Canferide

Ácido *p*-cumárico

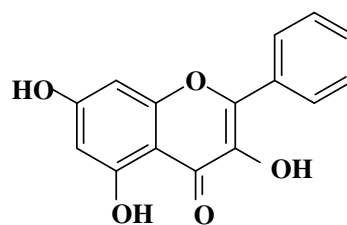
Ácido cafeico



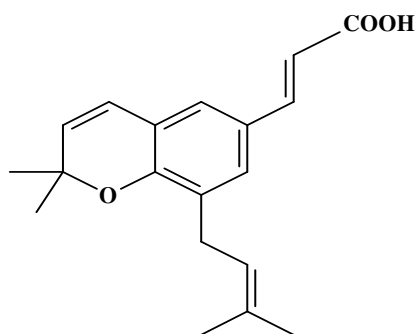
Ácido ferúlico



Pinobanksina



Canferol

Ácido. 2,2-dimethyl-8-prenil-2H-1-benzopiran-
6-propenoico

ANEXO B – RESULTADOS EXPERIMENTAIS

B.1 Determinação de rendimento total (X_0) da extração supercrítica do extrato etanólico de própolis seco (EEPS) em diferentes temperaturas, pressões.

Tabela B.1.1. Corrida 1: Ensaio de determinação de rendimento total a 20 °C, 150 bar.

| Tempo [min] | Massa CO ₂ [g] | Massa Pontual [g] | Massa Acumulada [g] | Rend [%] |
|----------------|------------------------------|----------------------|------------------------|--------------|
| 0 | 0,00 | 0,000 ± 0,00 | 0,000 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 |
| 10 | 14,54 | 0,037 ± 0,02 | 0,037 ± 0,02 | 1,82 ± 0,67 |
| 20 | 29,07 | 0,044 ± 0,01 | 0,072 ± 0,01 | 3,67 ± 0,25 |
| 30 | 43,61 | 0,037 ± 0,01 | 0,100 ± 0,01 | 5,15 ± 0,83 |
| 40 | 58,15 | 0,027 ± 0,01 | 0,126 ± 0,01 | 6,51 ± 1,08 |
| 50 | 72,68 | 0,020 ± 0,01 | 0,141 ± 0,01 | 7,28 ± 1,36 |
| 60 | 87,22 | 0,018 ± 0,01 | 0,154 ± 0,01 | 7,96 ± 1,38 |
| 80 | 116,29 | 0,022 ± 0,00 | 0,176 ± 0,01 | 9,08 ± 1,52 |
| 100 | 145,37 | 0,015 ± 0,00 | 0,191 ± 0,02 | 9,86 ± 1,80 |
| 120 | 174,44 | 0,010 ± 0,00 | 0,201 ± 0,02 | 10,39 ± 1,97 |
| 140 | 203,51 | 0,010 ± 0,00 | 0,211 ± 0,02 | 10,89 ± 2,19 |
| 160 | 232,58 | 0,006 ± 0,00 | 0,216 ± 0,02 | 11,19 ± 2,38 |
| 180 | 261,66 | 0,015 ± 0,02 | 0,231 ± 0,02 | 11,90 ± 2,07 |

Tabela B.1.2. Corrida 2: Ensaio de determinação de rendimento total a 20 °C, 200 bar.

| Tempo [min] | Massa CO ₂ [g] | Massa Pontual [g] | Massa Acumulada [g] | Rend [%] |
|----------------|------------------------------|----------------------|------------------------|--------------|
| 0 | 0,00 | 0,000 ± 0,00 | 0,000 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 |
| 10 | 14,90 | 0,033 ± 0,01 | 0,033 ± 0,01 | 1,75 ± 0,58 |
| 20 | 29,81 | 0,042 ± 0,01 | 0,076 ± 0,00 | 4,07 ± 0,22 |
| 30 | 44,71 | 0,028 ± 0,00 | 0,104 ± 0,01 | 5,58 ± 0,39 |
| 40 | 59,62 | 0,024 ± 0,01 | 0,128 ± 0,01 | 6,89 ± 0,69 |
| 50 | 74,52 | 0,018 ± 0,00 | 0,146 ± 0,01 | 7,86 ± 0,85 |
| 60 | 89,42 | 0,014 ± 0,00 | 0,160 ± 0,02 | 8,62 ± 1,03 |
| 80 | 119,23 | 0,021 ± 0,00 | 0,181 ± 0,02 | 9,77 ± 1,19 |
| 100 | 149,04 | 0,016 ± 0,00 | 0,197 ± 0,02 | 10,63 ± 1,29 |
| 120 | 178,85 | 0,036 ± 0,04 | 0,207 ± 0,02 | 11,17 ± 1,34 |
| 140 | 208,66 | 0,010 ± 0,00 | 0,217 ± 0,02 | 11,69 ± 1,37 |
| 160 | 238,46 | 0,007 ± 0,00 | 0,223 ± 0,02 | 12,04 ± 1,40 |
| 180 | 268,27 | 0,003 ± 0,00 | 0,226 ± 0,02 | 12,18 ± 1,29 |

Tabela B.1.3. Corrida 3: Ensaio de determinação de rendimento total a 20 °C, 250 bar.

| Tempo [min] | Massa CO ₂ [g] | Massa Pontual [g] | Massa Acumulada [g] | Rend [%] |
|----------------|------------------------------|----------------------|------------------------|--------------|
| 0 | 0,0 | 0,000 ± 0,00 | 0,000 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 |
| 10 | 15,2 | 0,030 ± 0,00 | 0,030 ± 0,00 | 1,56 ± 0,09 |
| 20 | 30,4 | 0,050 ± 0,00 | 0,080 ± 0,00 | 4,19 ± 0,02 |
| 30 | 45,6 | 0,035 ± 0,01 | 0,116 ± 0,01 | 6,03 ± 0,32 |
| 40 | 60,8 | 0,028 ± 0,00 | 0,144 ± 0,00 | 7,50 ± 0,04 |
| 50 | 76,0 | 0,019 ± 0,00 | 0,162 ± 0,00 | 8,47 ± 0,07 |
| 60 | 91,2 | 0,018 ± 0,00 | 0,180 ± 0,00 | 9,38 ± 0,20 |
| 80 | 121,6 | 0,021 ± 0,01 | 0,201 ± 0,01 | 10,49 ± 0,55 |
| 100 | 152,0 | 0,013 ± 0,00 | 0,214 ± 0,01 | 11,16 ± 0,73 |
| 120 | 182,4 | 0,009 ± 0,00 | 0,222 ± 0,01 | 11,60 ± 0,96 |
| 140 | 212,9 | 0,005 ± 0,00 | 0,227 ± 0,01 | 11,84 ± 1,07 |
| 160 | 243,3 | 0,005 ± 0,00 | 0,232 ± 0,02 | 12,11 ± 1,13 |
| 180 | 273,7 | 0,005 ± 0,00 | 0,237 ± 0,02 | 12,37 ± 1,37 |

Tabela B.1.4. Corrida 4: Ensaio de determinação de rendimento total a 35 °C, 150 bar.

| Tempo [min] | Massa CO ₂ [g] | Massa Pontual [g] | Massa Acumulada [g] | Rend [%] |
|----------------|------------------------------|----------------------|------------------------|--------------|
| 0 | 0,00 | 0,000 ± 0,00 | 0,000 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 |
| 10 | 14,54 | 0,033 ± 0,00 | 0,033 ± 0,00 | 1,88 ± 0,01 |
| 20 | 29,07 | 0,039 ± 0,01 | 0,071 ± 0,01 | 4,12 ± 0,76 |
| 30 | 43,61 | 0,028 ± 0,00 | 0,100 ± 0,02 | 5,74 ± 1,05 |
| 40 | 58,15 | 0,022 ± 0,00 | 0,121 ± 0,01 | 6,98 ± 0,98 |
| 50 | 72,68 | 0,018 ± 0,00 | 0,139 ± 0,02 | 7,99 ± 1,07 |
| 60 | 87,22 | 0,014 ± 0,00 | 0,152 ± 0,02 | 8,78 ± 1,14 |
| 80 | 116,29 | 0,023 ± 0,00 | 0,176 ± 0,01 | 10,12 ± 1,00 |
| 100 | 145,37 | 0,016 ± 0,01 | 0,192 ± 0,01 | 11,06 ± 0,64 |
| 120 | 174,44 | 0,013 ± 0,00 | 0,201 ± 0,00 | 11,58 ± 0,37 |
| 140 | 203,51 | 0,100 ± 0,01 | 0,214 ± 0,00 | 12,32 ± 0,36 |
| 160 | 232,58 | 0,009 ± 0,00 | 0,223 ± 0,00 | 12,86 ± 0,18 |
| 180 | 261,66 | 0,009 ± 0,00 | 0,232 ± 0,00 | 13,35 ± 0,02 |

Tabela B.1.5. Corrida 5: Ensaio de determinação de rendimento total a 35 °C, 200 bar.

| Tempo [min] | Massa CO ₂ [g] | Massa Pontual [g] | Massa Acumulada [g] | Rend [%] |
|----------------|------------------------------|----------------------|------------------------|--------------|
| 0 | 0,00 | 0,000 ± 0,00 | 0,000 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 |
| 10 | 14,90 | 0,037 ± 0,02 | 0,037 ± 0,02 | 1,96 ± 0,76 |
| 20 | 29,81 | 0,040 ± 0,01 | 0,081 ± 0,01 | 4,36 ± 0,22 |
| 30 | 44,71 | 0,032 ± 0,00 | 0,113 ± 0,01 | 6,07 ± 0,11 |
| 40 | 59,62 | 0,027 ± 0,00 | 0,139 ± 0,01 | 7,51 ± 0,08 |
| 50 | 74,52 | 0,020 ± 0,00 | 0,159 ± 0,01 | 8,57 ± 0,05 |
| 60 | 89,42 | 0,015 ± 0,00 | 0,174 ± 0,01 | 9,37 ± 0,15 |
| 80 | 119,23 | 0,029 ± 0,00 | 0,203 ± 0,01 | 10,95 ± 0,08 |
| 100 | 149,04 | 0,017 ± 0,00 | 0,220 ± 0,01 | 11,88 ± 0,00 |
| 120 | 178,85 | 0,018 ± 0,00 | 0,238 ± 0,01 | 12,87 ± 0,20 |
| 140 | 208,66 | 0,014 ± 0,00 | 0,253 ± 0,01 | 13,63 ± 0,24 |
| 160 | 238,46 | 0,014 ± 0,00 | 0,267 ± 0,01 | 14,40 ± 0,13 |
| 180 | 268,27 | 0,010 ± 0,00 | 0,276 ± 0,01 | 14,91 ± 0,06 |

Tabela B.1.6. Corrida 6: Ensaio de determinação de rendimento total a 35 °C, 250 bar .

| Tempo [min] | Massa CO ₂ [g] | Massa Pontual [g] | Massa Acumulada [g] | Rend [%] |
|----------------|------------------------------|----------------------|------------------------|--------------|
| 0 | 0,00 | 0,000 ± 0,00 | 0,000 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 |
| 10 | 15,20 | 0,043 ± 0,01 | 0,043 ± 0,01 | 2,11 ± 0,05 |
| 20 | 30,41 | 0,053 ± 0,01 | 0,096 ± 0,00 | 4,78 ± 0,78 |
| 30 | 45,61 | 0,039 ± 0,00 | 0,135 ± 0,00 | 6,70 ± 1,08 |
| 40 | 60,82 | 0,027 ± 0,01 | 0,162 ± 0,01 | 8,02 ± 0,95 |
| 50 | 76,02 | 0,030 ± 0,01 | 0,184 ± 0,01 | 9,14 ± 0,87 |
| 60 | 91,22 | 0,019 ± 0,01 | 0,203 ± 0,02 | 10,04 ± 0,76 |
| 80 | 121,63 | 0,031 ± 0,00 | 0,234 ± 0,02 | 11,59 ± 0,88 |
| 100 | 152,04 | 0,029 ± 0,01 | 0,263 ± 0,03 | 13,00 ± 0,70 |
| 120 | 182,45 | 0,015 ± 0,00 | 0,279 ± 0,03 | 13,76 ± 0,73 |
| 140 | 212,86 | 0,012 ± 0,00 | 0,290 ± 0,04 | 14,32 ± 0,65 |
| 160 | 243,26 | 0,015 ± 0,00 | 0,305 ± 0,04 | 15,04 ± 0,67 |
| 180 | 273,67 | 0,007 ± 0,01 | 0,312 ± 0,04 | 15,36 ± 0,40 |

Tabela B.1.7. Corrida 7: Ensaio de determinação de rendimento total a 50 °C, 150 bar.

| Tempo [min] | Massa CO ₂ [g] | Massa Pontual [g] | Massa Acumulada [g] | Rend [%] |
|----------------|------------------------------|----------------------|------------------------|--------------|
| 0 | 0,00 | 0,000 ± 0,00 | 0,000 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 |
| 10 | 14,54 | 0,058 ± 0,01 | 0,043 ± 0,01 | 2,11 ± 0,05 |
| 20 | 29,07 | 0,052 ± 0,01 | 0,096 ± 0,00 | 4,78 ± 0,78 |
| 30 | 43,61 | 0,036 ± 0,00 | 0,135 ± 0,00 | 6,70 ± 1,08 |
| 40 | 58,15 | 0,028 ± 0,01 | 0,162 ± 0,01 | 8,02 ± 0,95 |
| 50 | 72,68 | 0,023 ± 0,01 | 0,184 ± 0,01 | 9,14 ± 0,87 |
| 60 | 87,22 | 0,019 ± 0,01 | 0,203 ± 0,02 | 10,04 ± 0,76 |
| 80 | 116,29 | 0,031 ± 0,00 | 0,234 ± 0,02 | 11,59 ± 0,88 |
| 100 | 145,37 | 0,029 ± 0,01 | 0,263 ± 0,03 | 13,00 ± 0,70 |
| 120 | 174,44 | 0,015 ± 0,00 | 0,279 ± 0,03 | 13,76 ± 0,73 |
| 140 | 203,51 | 0,012 ± 0,00 | 0,290 ± 0,04 | 14,32 ± 0,65 |
| 160 | 232,58 | 0,015 ± 0,00 | 0,305 ± 0,04 | 15,04 ± 0,67 |
| 180 | 261,66 | 0,007 ± 0,01 | 0,312 ± 0,04 | 15,36 ± 0,40 |

Tabela B.1.8. Corrida 8: Ensaio de determinação de rendimento total a 50 °C, 200 bar.

| Tempo [min] | Massa CO ₂ [g] | Massa Pontual [g] | Massa Acumulada [g] | Rend [%] |
|----------------|------------------------------|----------------------|------------------------|--------------|
| 0 | 0,00 | 0,000 ± 0,00 | 0,000 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 |
| 10 | 14,90 | 0,046 ± 0,00 | 0,046 ± 0,00 | 2,35 ± 0,13 |
| 20 | 29,81 | 0,046 ± 0,00 | 0,090 ± 0,00 | 4,64 ± 0,28 |
| 30 | 44,71 | 0,030 ± 0,00 | 0,122 ± 0,00 | 6,29 ± 0,34 |
| 40 | 59,62 | 0,026 ± 0,00 | 0,148 ± 0,01 | 7,63 ± 0,50 |
| 50 | 74,52 | 0,020 ± 0,00 | 0,168 ± 0,01 | 8,66 ± 0,57 |
| 60 | 89,42 | 0,016 ± 0,00 | 0,184 ± 0,01 | 9,48 ± 0,53 |
| 80 | 119,23 | 0,027 ± 0,00 | 0,211 ± 0,01 | 10,87 ± 0,66 |
| 100 | 149,04 | 0,021 ± 0,00 | 0,232 ± 0,01 | 11,97 ± 0,66 |
| 120 | 178,85 | 0,016 ± 0,00 | 0,248 ± 0,01 | 12,79 ± 0,75 |
| 140 | 208,66 | 0,016 ± 0,00 | 0,265 ± 0,02 | 13,62 ± 0,89 |
| 160 | 238,46 | 0,013 ± 0,00 | 0,277 ± 0,02 | 14,28 ± 0,96 |
| 180 | 268,27 | 0,009 ± 0,00 | 0,286 ± 0,02 | 14,75 ± 0,97 |

Tabela B.1.9. Corrida 9: Ensaio de determinação de rendimento total a 50 °C, 250 bar.

| Tempo [min] | Massa CO ₂ [g] | Massa Pontual [g] | Massa Acumulada [g] | Rend [%] |
|----------------|------------------------------|----------------------|------------------------|--------------|
| 0 | 0,00 | 0,000 ± 0,00 | 0,000 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 |
| 10 | 15,20 | 0,048 ± 0,00 | 0,0481 ± 0,00 | 2,52 ± 0,08 |
| 20 | 30,41 | 0,054 ± 0,00 | 0,102 ± 0,00 | 5,36 ± 0,27 |
| 30 | 45,61 | 0,039 ± 0,00 | 0,142 ± 0,00 | 7,41 ± 0,28 |
| 40 | 60,82 | 0,030 ± 0,01 | 0,171 ± 0,00 | 8,98 ± 0,67 |
| 50 | 76,02 | 0,025 ± 0,00 | 0,196 ± 0,00 | 10,28 ± 0,79 |
| 60 | 91,22 | 0,020 ± 0,00 | 0,216 ± 0,00 | 11,32 ± 0,91 |
| 80 | 121,63 | 0,034 ± 0,01 | 0,250 ± 0,01 | 13,10 ± 1,36 |
| 100 | 152,04 | 0,027 ± 0,00 | 0,276 ± 0,01 | 14,50 ± 1,60 |
| 120 | 182,45 | 0,020 ± 0,00 | 0,297 ± 0,01 | 15,56 ± 1,62 |
| 140 | 212,86 | 0,020 ± 0,00 | 0,316 ± 0,01 | 16,60 ± 1,63 |
| 160 | 243,26 | 0,016 ± 0,01 | 0,332 ± 0,01 | 17,42 ± 1,98 |
| 180 | 273,67 | 0,010 ± 0,00 | 0,342 ± 0,02 | 17,95 ± 2,17 |

B.1.2 Cromatogramas obtidos por HPLC das extrações supercríticas dos extratos etanólicos de própolis seco

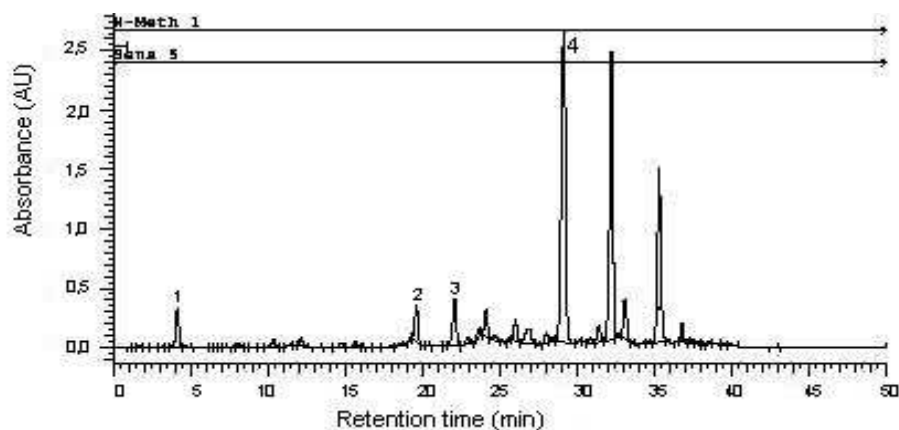


Figura B.1.2.1. Cromatograma do extrato supercrítico de própolis referente à Corrida 1. (1: ácido p-cumárico; 2: ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico; 3: canferide; 4: Artepillin C)

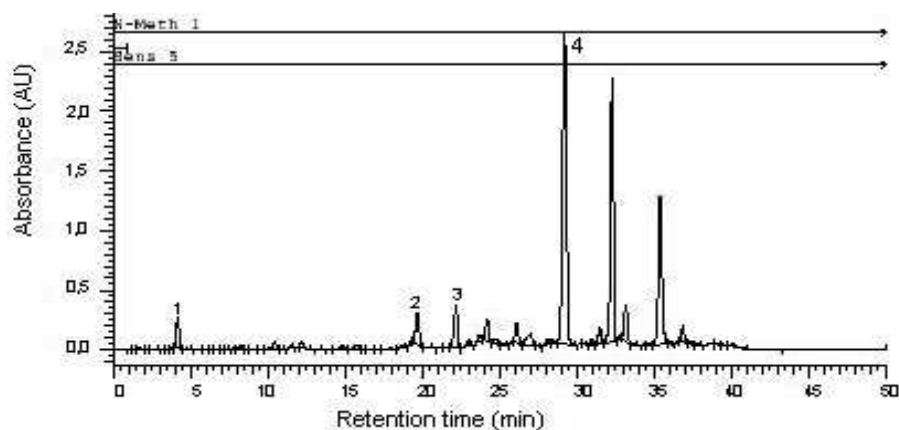


Figura B.1.2.2. Cromatograma do extrato supercrítico de própolis referente à Corrida 2. (1: ácido p-cumárico; 2: ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico; 3: canferide; 4: Artepillin C)

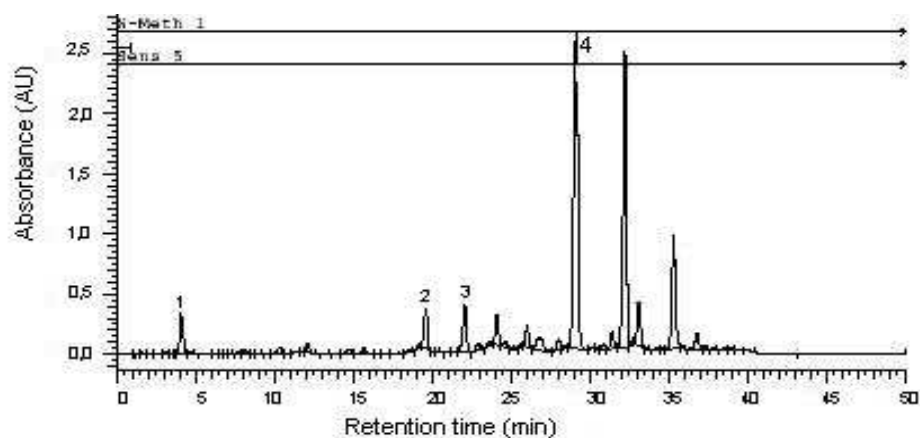


Figura B.1.2.3. Cromatograma do extrato supercrítico de própolis referente à Corrida 3.
(1: ácido p-cumárico; 2: ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico; 3: canferide; 4: Artepillin C)

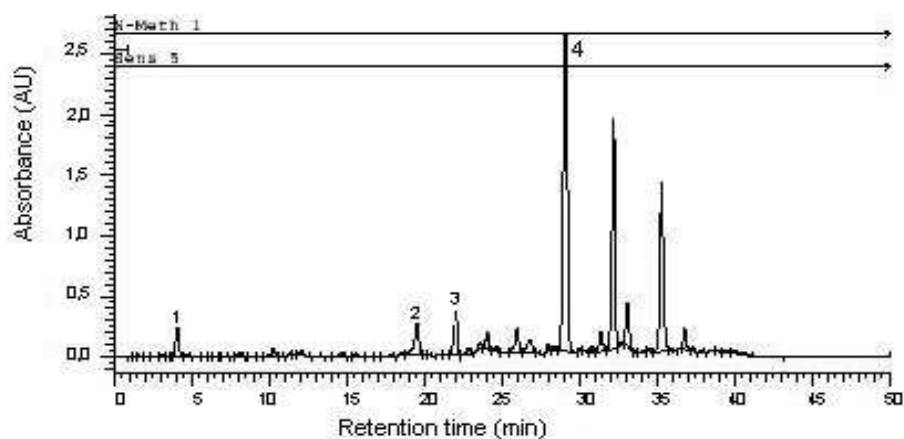


Figura B.1.2.4. Cromatograma do extrato supercrítico de própolis referente à Corrida 4.
(1: ácido p-cumárico; 2: ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico; 3: canferide; 4: Artepillin C)

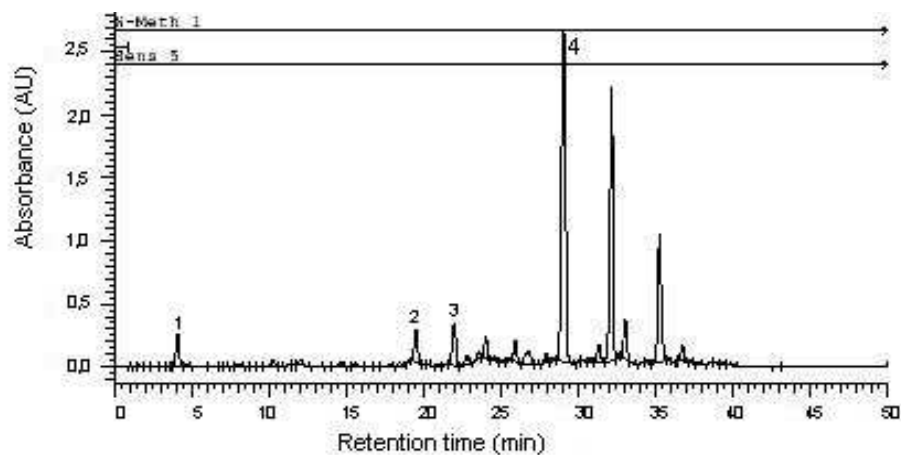


Figura B.1.2.5. Cromatograma do extrato supercrítico de própolis referente à Corrida 5.
(1: ácido p-cumárico; 2: ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico; 3: canferide; 4: Artepillin C)

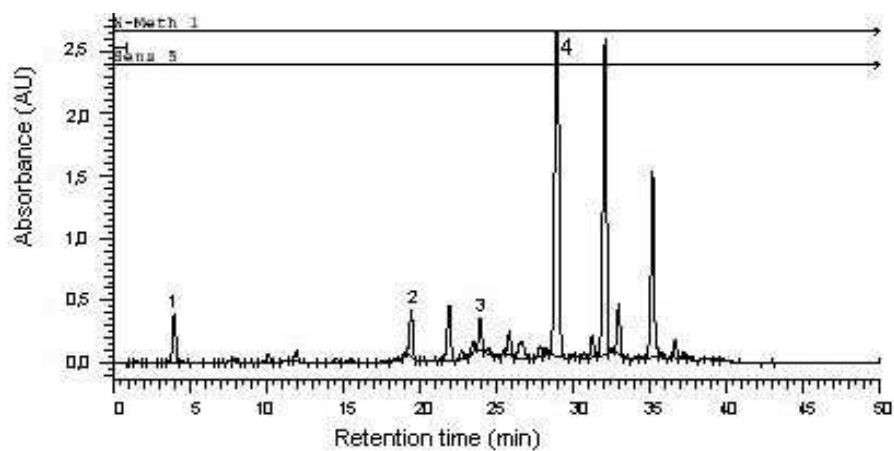


Figura B.1.2.6. Cromatograma do extrato supercrítico de própolis referente à Corrida 6.
(1: ácido p-cumárico; 2: ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico; 3: canferide; 4: Artepillin C)

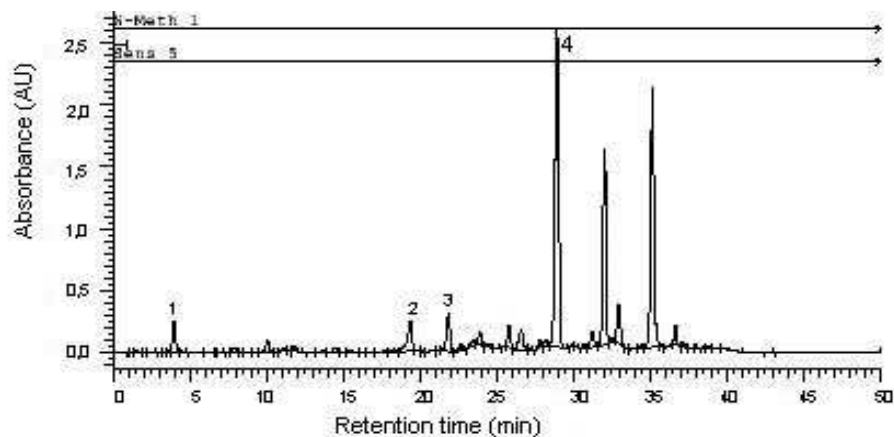


Figura B.1.2.7. Cromatograma do extrato supercrítico de própolis referente à Corrida 7.
(1: ácido p-cumárico; 2: ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico; 3: canferide; 4: Artepillin C)

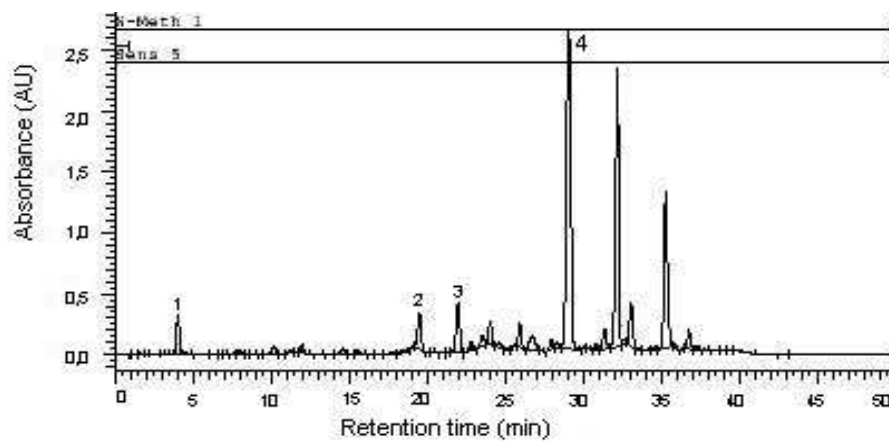


Figura B.1.2.8. Cromatograma do extrato supercrítico de própolis referente à Corrida 8.
(1: ácido p-cumárico; 2: ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico; 3: canferide; 4: Artepillin C)

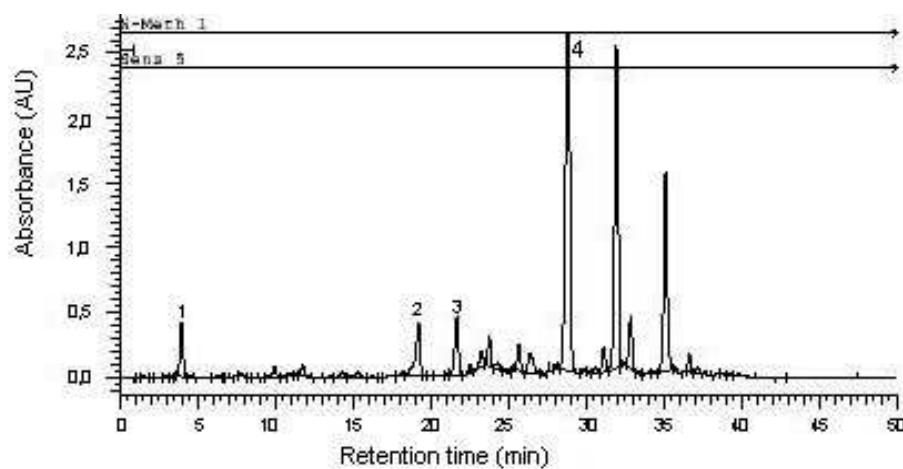


Figura B.1.2.9. Cromatograma do extrato supercrítico de própolis referente à Corrida 9.
(1: ácido p-cumárico; 2: ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico; 3: canferide; 4: Artepillin C)

B.2 Determinação de rendimento total (X_o) da extração supercrítica do extrato etanólico de própolis seco (EEPS) em diferentes temperaturas, pressões e concentração de co-solvente.

B.2.1. CS-1: Ensaio de determinação de rendimento total a 20 °C, 150 bar e 5 % de etanol como co-solvente.

| Tempo [min] | Massa CO ₂ [g] | Massa pontual [g] | Massa Acumulada [g] | Rend [%] |
|----------------|------------------------------|----------------------|------------------------|-------------|
| 0 | 0,00 | 0,000 | 0,000 | 0,00 |
| 15 | 22,05 | 0,472 | 0,472 | 25,58 |
| 30 | 44,10 | 0,509 | 0,980 | 53,15 |
| 45 | 66,15 | 0,100 | 1,080 | 58,58 |
| 60 | 88,20 | 0,072 | 1,152 | 62,45 |
| 90 | 132,30 | 0,091 | 1,242 | 67,39 |
| 120 | 176,40 | 0,098 | 1,340 | 72,68 |
| 150 | 220,50 | 0,092 | 1,433 | 77,69 |
| 180 | 264,60 | 0,080 | 1,513 | 82,05 |

B.2.2. CS-2: Ensaio de determinação de rendimento tal a 20 °C, 250 bar e 5 % de etanol como co-solvente.

| Tempo [min] | Massa CO ₂ [g] | Massa pontual [g] | Massa Acumulada [g] | Rend [%] |
|----------------|------------------------------|----------------------|------------------------|-------------|
| 0 | 0,00 | 0,000 | 0,000 | 0,00 |
| 15 | 21,00 | 0,183 | 0,183 | 8,29 |
| 30 | 42,00 | 0,142 | 0,325 | 14,75 |
| 45 | 63,00 | 0,154 | 0,478 | 21,73 |
| 60 | 84,00 | 0,151 | 0,630 | 28,59 |
| 90 | 126,00 | 0,295 | 0,925 | 42,00 |
| 120 | 168,00 | 0,306 | 1,231 | 55,90 |
| 150 | 210,00 | 0,271 | 1,502 | 68,19 |
| 180 | 252,00 | 0,239 | 1,740 | 79,04 |

B.2.3. CS-3: Ensaio de determinação de rendimento total a 20 °C, 150 bar e 15 % de etanol como co-solvente.

| Tempo [min] | Massa CO ₂ [g] | Massa pontual [g] | Massa Acumulada [g] | Rend [%] |
|----------------|------------------------------|----------------------|------------------------|-------------|
| 0 | 0,00 | 0,000 | 0,000 | 0,00 |
| 15 | 19,65 | 0,161 | 0,161 | 7,78 |
| 30 | 39,30 | 0,229 | 0,389 | 18,83 |
| 45 | 58,95 | 0,278 | 0,668 | 32,27 |
| 60 | 78,60 | 0,421 | 1,089 | 52,62 |
| 90 | 117,90 | 0,403 | 1,492 | 72,10 |
| 120 | 157,20 | 0,215 | 1,707 | 82,50 |
| 150 | 196,50 | 0,152 | 1,858 | 89,83 |
| 180 | 235,80 | 0,136 | 1,994 | 96,39 |

B.2.4. CS-4: Ensaio de determinação de rendimento total a 20 °C, 250 bar e 15 % de etanol como co-solvente.

| Tempo [min] | Massa CO ₂ [g] | Massa pontual [g] | Massa Acumulada [g] | Rend [%] |
|----------------|------------------------------|----------------------|------------------------|-------------|
| 0 | 0,00 | 0,000 | 0,000 | 0,00 |
| 15 | 18,75 | 0,782 | 0,782 | 40,33 |
| 30 | 37,50 | 0,163 | 0,945 | 48,72 |
| 45 | 56,25 | 0,176 | 1,121 | 57,80 |
| 60 | 75,00 | 0,279 | 1,408 | 72,20 |
| 90 | 112,50 | 0,219 | 1,619 | 83,47 |
| 120 | 150,00 | 0,114 | 1,733 | 89,34 |
| 150 | 187,50 | 0,106 | 1,839 | 94,81 |
| 180 | 225,00 | 0,101 | 1,940 | 100,00 |

B.2.5. CS-5: Ensaio de determinação de rendimento total a 50 °C, 150 bar e 5 % de etanol como co-solvente.

| Tempo [min] | Massa CO ₂ [g] | Massa pontual [g] | Massa Acumulada [g] | Rend [%] |
|----------------|------------------------------|----------------------|------------------------|-------------|
| 0 | 0,00 | 0,000 | 0,000 | 0,00 |
| 15 | 22,05 | 0,228 | 0,228 | 11,63 |
| 30 | 44,10 | 0,160 | 0,388 | 19,77 |
| 45 | 66,15 | 0,158 | 0,546 | 27,82 |
| 60 | 88,20 | 0,167 | 0,712 | 36,33 |
| 90 | 132,30 | 0,245 | 0,957 | 48,82 |
| 120 | 176,40 | 0,237 | 1,194 | 60,90 |
| 150 | 220,50 | 0,201 | 1,396 | 71,16 |
| 180 | 264,60 | 0,197 | 1,593 | 81,22 |

B.2.6. CS-6: Ensaio de determinação de rendimento total a 50 °C, 250 bar e 5 % de etanol como co-solvente.

| Tempo [min] | Massa CO ₂ [g] | Massa pontual [g] | Massa Acumulada [g] | Rend [%] |
|----------------|------------------------------|----------------------|------------------------|-------------|
| 0 | 0,00 | 0,000 | 0,000 | 0,00 |
| 15 | 21,00 | 0,818 | 0,818 | 46,09 |
| 30 | 42,00 | 0,130 | 0,948 | 53,42 |
| 45 | 63,00 | 0,140 | 1,088 | 61,33 |
| 60 | 84,00 | 0,140 | 1,228 | 69,22 |
| 90 | 126,00 | 0,192 | 1,420 | 80,06 |
| 120 | 168,00 | 0,145 | 1,565 | 88,24 |
| 150 | 210,00 | 0,117 | 1,683 | 94,85 |
| 180 | 252,00 | 0,091 | 1,774 | 100,00 |

B.2.7. CS-7: Ensaio de determinação de rendimento total a 50 °C, 150 bar e 15 % de etanol como co-solvente.

| Tempo [min] | Massa CO ₂ [g] | Massa pontual [g] | Massa Acumulada [g] | Rend [%] |
|----------------|------------------------------|----------------------|------------------------|-------------|
| 0 | 0,00 | 0,000 | 0,000 | 0,00 |
| 15 | 19,65 | 0,088 | 0,089 | 4,79 |
| 30 | 39,30 | 0,159 | 0,248 | 13,38 |
| 45 | 58,95 | 0,238 | 0,485 | 26,24 |
| 60 | 78,60 | 0,350 | 0,835 | 45,14 |
| 90 | 117,90 | 0,475 | 1,310 | 70,81 |
| 120 | 157,20 | 0,288 | 1,598 | 86,36 |
| 150 | 196,50 | 0,152 | 1,750 | 94,59 |
| 180 | 235,80 | 0,100 | 1,850 | 100,00 |

B.2.8. CS-8: Ensaio de determinação de rendimento total a 50 °C, 250 bar e 15 % de etanol como co-solvente.

| Tempo [min] | Massa CO ₂ [g] | Massa pontual [g] | Massa Acumulada [g] | Rend [%] |
|----------------|------------------------------|----------------------|------------------------|-------------|
| 0 | 0,00 | 0,000 | 0,000 | 0,0000 |
| 15 | 18,75 | 0,175 | 0,175 | 9,8982 |
| 30 | 37,50 | 0,276 | 0,451 | 25,5034 |
| 45 | 56,25 | 0,371 | 0,821 | 46,4593 |
| 60 | 75,00 | 0,311 | 1,132 | 64,0328 |
| 90 | 112,50 | 0,305 | 1,437 | 81,2952 |
| 120 | 150,00 | 0,174 | 1,611 | 91,1256 |
| 150 | 187,50 | 0,092 | 1,703 | 96,3009 |
| 180 | 225,00 | 0,0656 | 1,768 | 100,0000 |

B.2.9. CS-9: Ensaio de determinação de rendimento total em triplicata a 35 °C, 200 bar e 10 % de etanol como co-solvente.

| Tempo [min] | Massa CO ₂ [g] | Massa pontual [g] | Massa Acumulada [g] | Rend [%] |
|----------------|------------------------------|----------------------|------------------------|---------------|
| 0 | 0,00 | 0,000 ± 0,00 | 0,000 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 |
| 15 | 20,25 | 1,320 ± 0,01 | 1,320 ± 0,01 | 70,87 ± 0,11 |
| 30 | 40,50 | 0,753 ± 0,00 | 1,409 ± 0,00 | 75,67 ± 0,75 |
| 45 | 60,75 | 0,815 ± 0,01 | 1,520 ± 0,01 | 81,59 ± 0,05 |
| 60 | 81,00 | 0,856 ± 0,00 | 1,610 ± 0,00 | 86,46 ± 0,84 |
| 90 | 121,50 | 0,891 ± 0,01 | 1,697 ± 0,01 | 91,09 ± 0,35 |
| 120 | 162,00 | 0,920 ± 0,00 | 1,765 ± 0,00 | 94,77 ± 1,01 |
| 150 | 202,50 | 0,930 ± 0,00 | 1,814 ± 0,00 | 97,38 ± 0,76 |
| 180 | 243,00 | 0,956 ± 0,02 | 1,863 ± 0,02 | 100,00 ± 0,01 |

B.2.1 Cromatogramas obtidos por HPLC das extrações supercríticas dos extratos etanólicos de própolis seco utilizando etanol como co-solvente

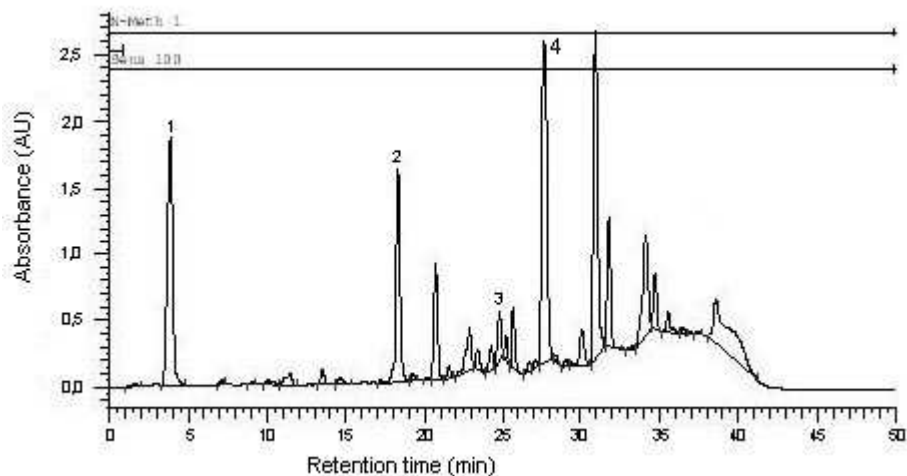


Figura B.2.1.1. Cromatograma do extrato de própolis referente ao experimento CS-1. (1: ácido p-cumárico; 2: ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico; 3: canferide; 4: Artepillin C)

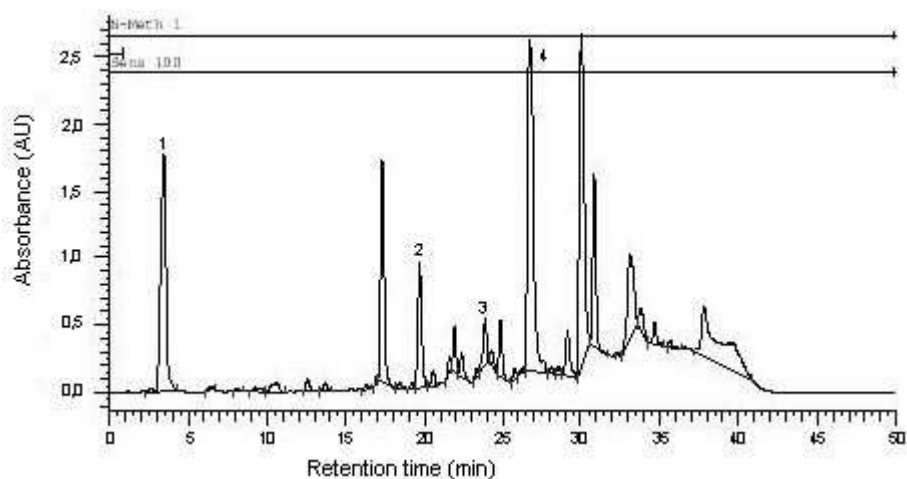


Figura B.2.1.2. Cromatograma do extrato de própolis referente ao experimento CS-2. (1: ácido p-cumárico; 2: ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico; 3: canferide; 4: Artepillin C)

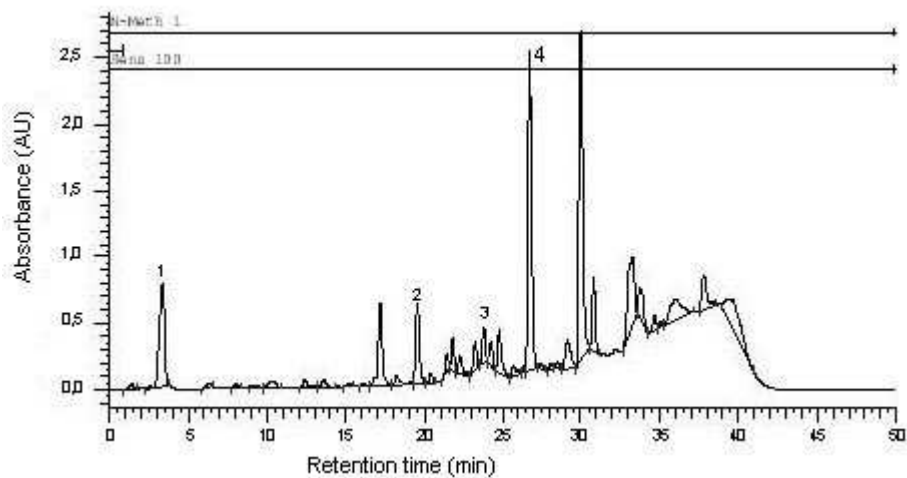


Figura B.2.1.3. Cromatograma do extrato de própolis referente ao experimento CS-3. (1: ácido p-cumárico; 2: ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico; 3: canferide; 4: Artepillin C)

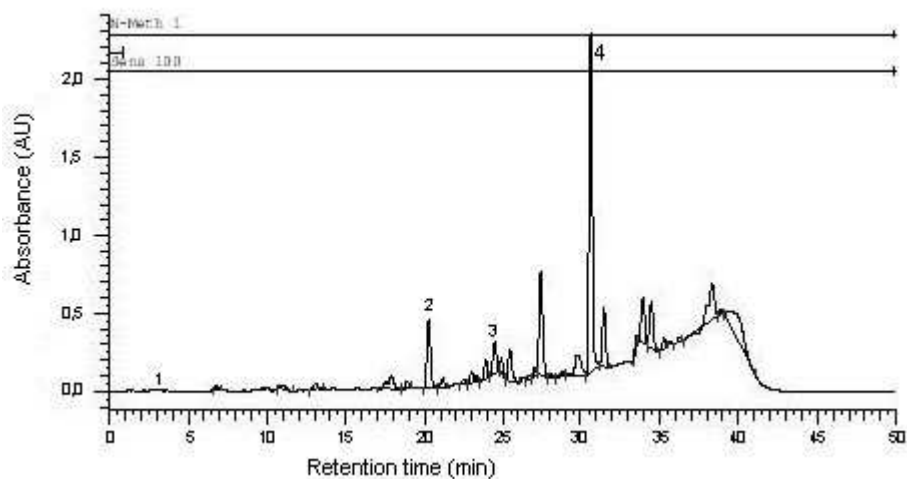


Figura B.2.1.4. Cromatograma do extrato de própolis referente ao experimento CS-4. (1: ácido p-cumárico; 2: ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico; 3: canferide; 4: Artepillin C)

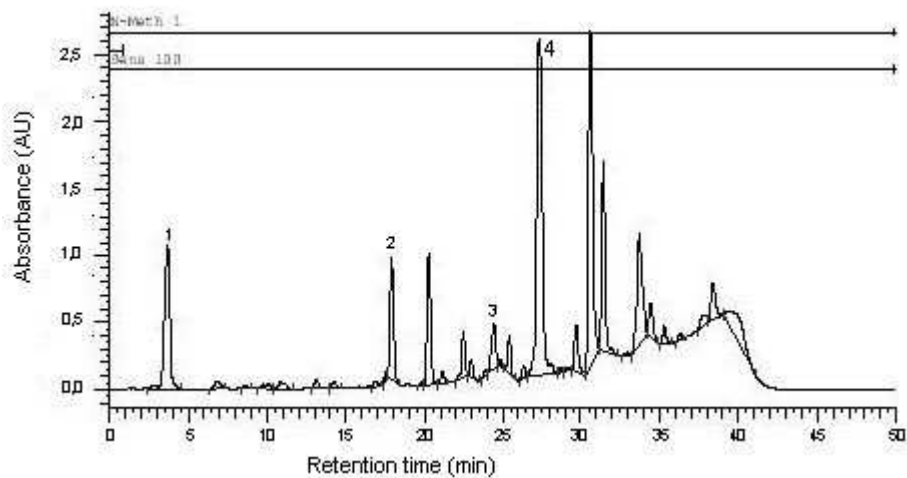


Figura B.2.1.5. Cromatograma do extrato de própolis referente ao experimento CS-5.
(1: ácido p-cumárico; 2: ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico; 3: canferide; 4: Artepillin C)

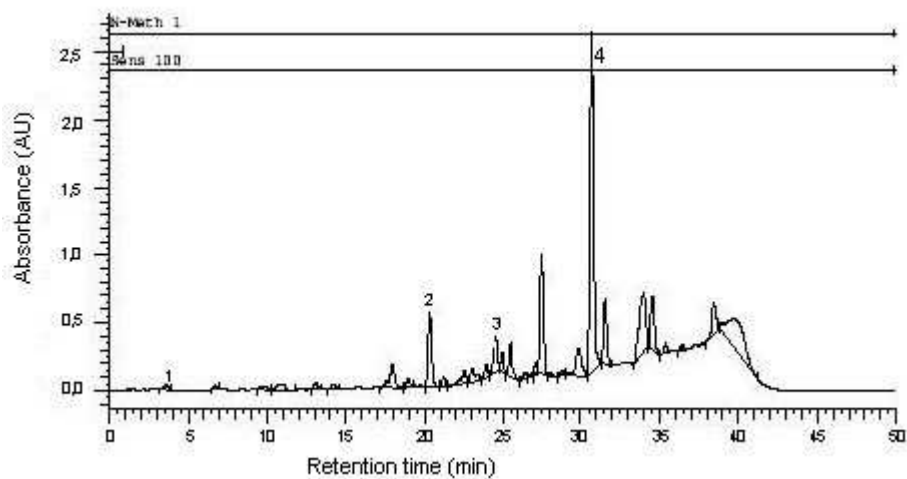


Figura B.2.1.6. Cromatograma do extrato de própolis referente ao experimento CS-6.
(1: ácido p-cumárico; 2: ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico; 3: canferide; 4: Artepillin C)

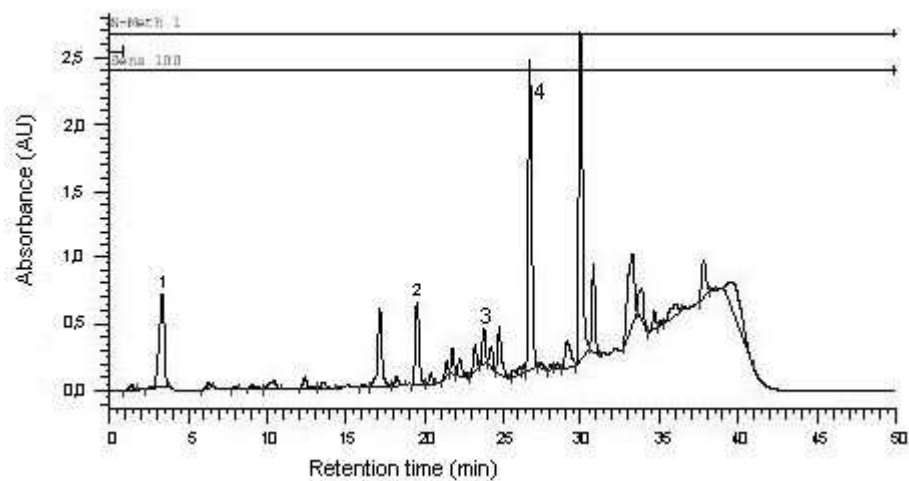


Figura B.2.1.7. Cromatograma do extrato de própolis referente ao experimento CS-7. (1: ácido p-cumárico; 2: ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico; 3: canferide; 4: Artepillin C)

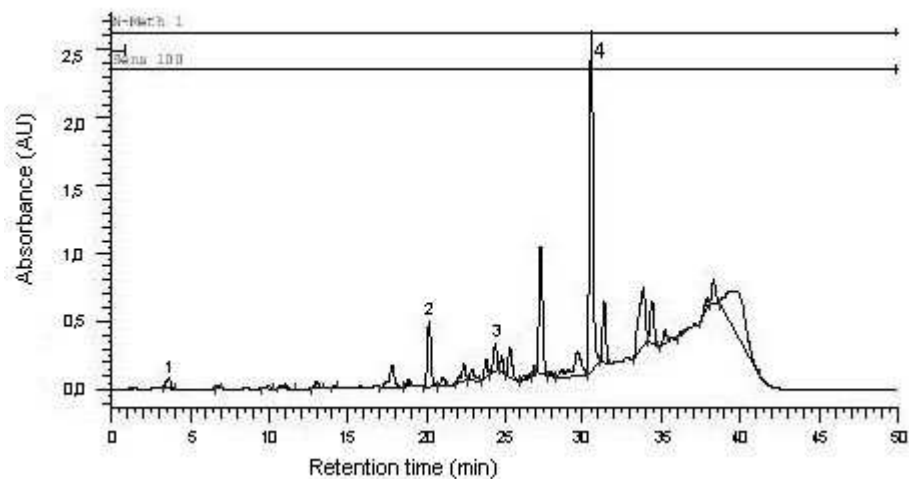


Figura B.2.1.8. Cromatograma do extrato de própolis referente ao experimento CS-8. (1: ácido p-cumárico; 2: ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico; 3: canferide; 4: Artepillin C)

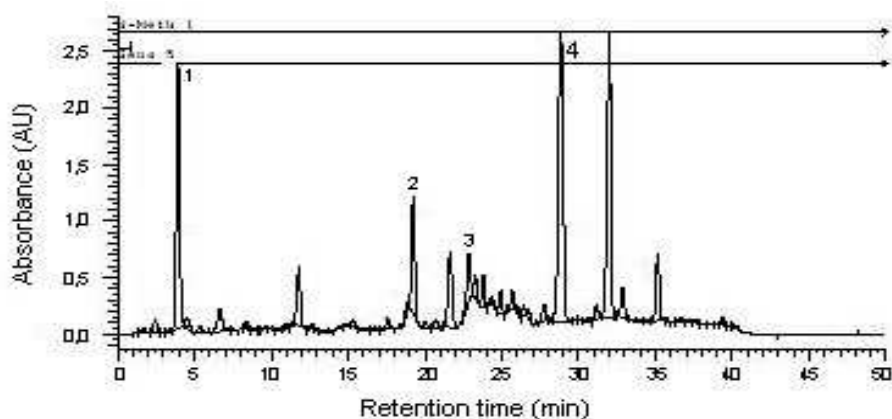


Figura B.2.1.9. Cromatograma do extrato de própolis referente ao experimento CS-9 F1. (1: ácido p-cumárico; 2: ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico; 3: canferide; 4: Artepillin C)

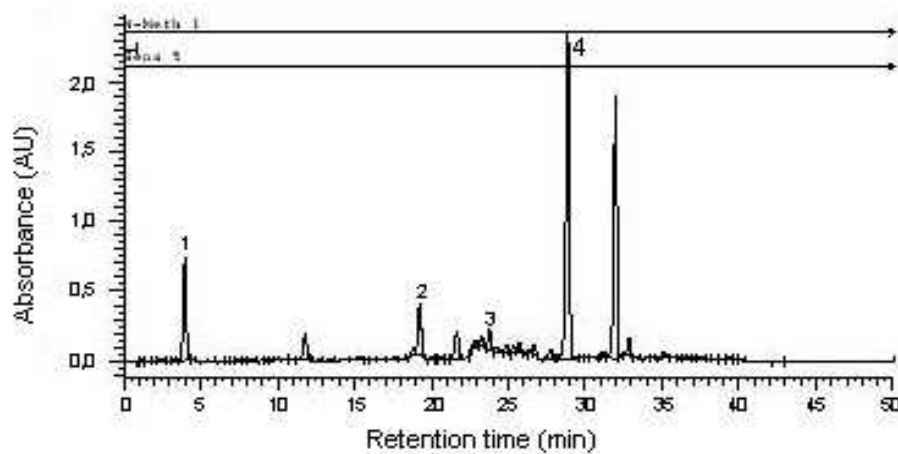


Figura B.2.1.10. Cromatograma do extrato de própolis referente ao experimento CS-9 F2. (1: ácido p-cumárico; 2: ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico; 3: canferide; 4: Artepillin C)

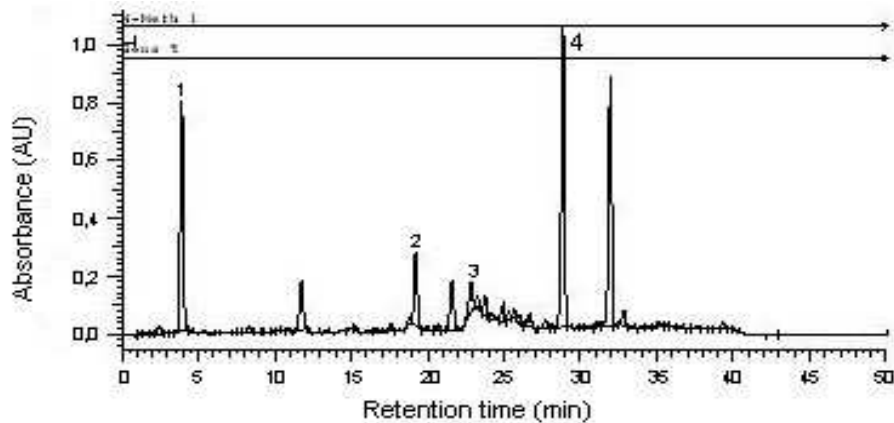


Figura B.2.1.11. Cromatograma do extrato de própolis referente ao experimento CS-9 F3. (1: ácido p-cumárico; 2: ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico; 3: canferide; 4: Artepillin C)

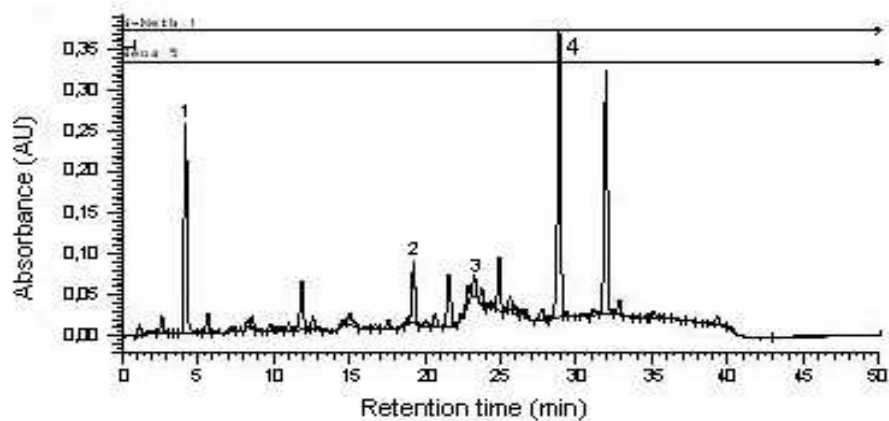


Figura B.2.1.12. Cromatograma do extrato de própolis referente ao experimento CS-9 F4. (1: ácido p-cumárico; 2: ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico; 3: canferide; 4: Artepillin C)

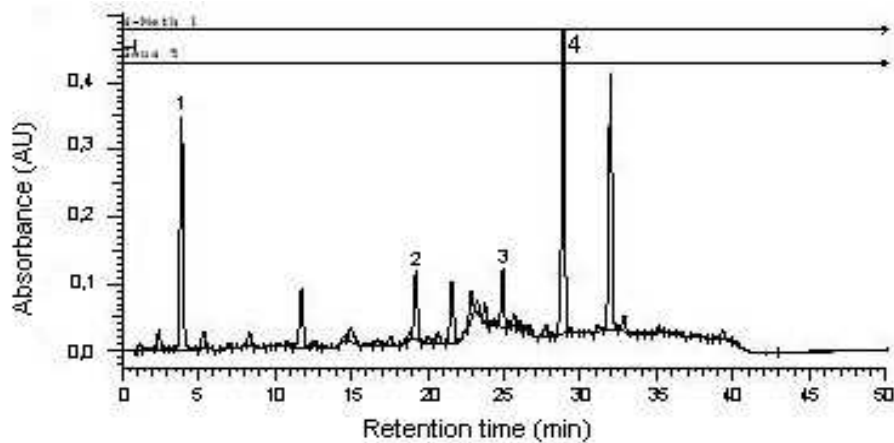


Figura B.2.1.13. Cromatograma do extrato de própolis referente ao experimento CS-9 F5. (1: ácido p-cumárico; 2: ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico; 3: canferide; 4: Artepillin C)

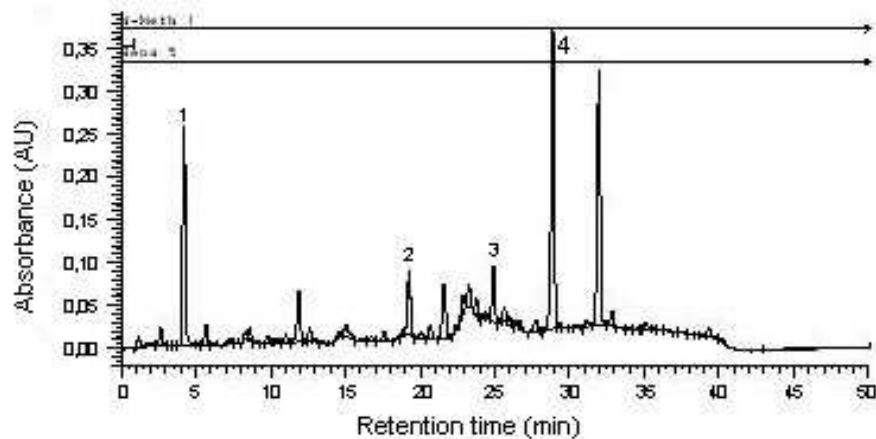


Figura B.2.1.14. Cromatograma do extrato de própolis referente ao experimento CS-9 F6. (1: ácido p-cumárico; 2: ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico; 3: canferide; 4: Artepillin C)

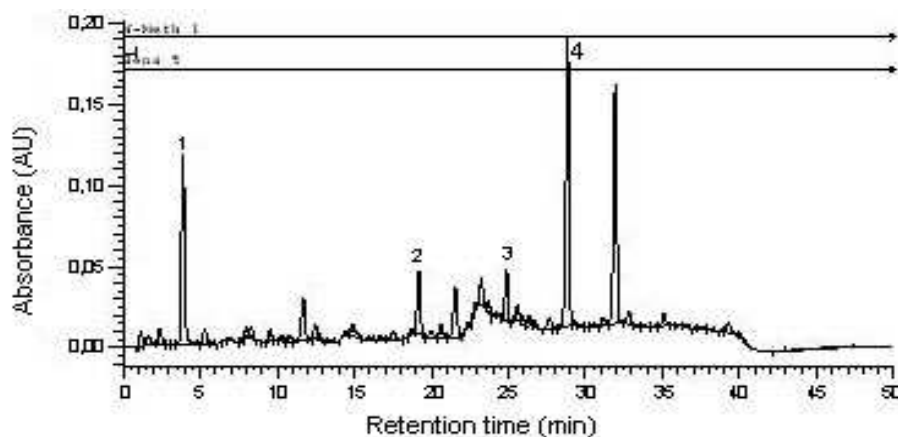


Figura B.2.1.15. Cromatograma do extrato de própolis referente ao experimento CS-9 F7.
(1: ácido p-cumárico; 2: ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico; 3: canferide; 4: Artepillin C)

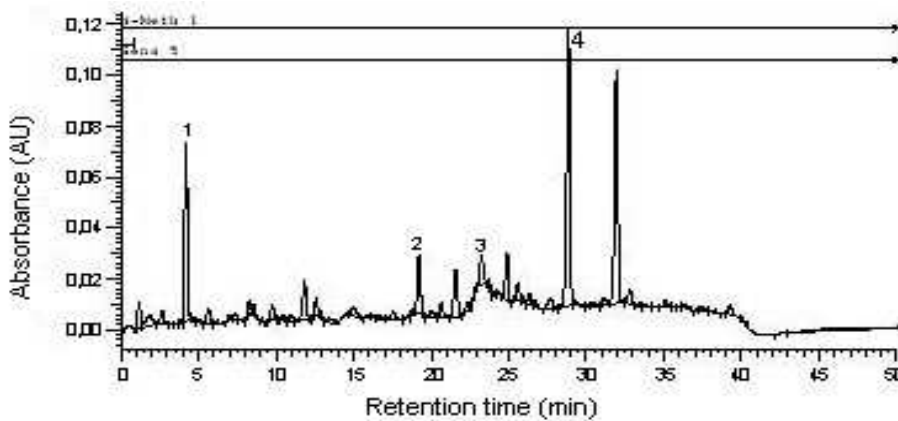


Figura B.2.1.16. Cromatograma do extrato de própolis referente ao experimento CS-9 F8.
(1: ácido p-cumárico; 2: ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico; 3: canferide; 4: Artepillin C)

B.3 Ensaios de determinação de rendimento total (X_o) da extração supercrítica da própolis bruta em diferentes temperaturas, pressões e concentração de co-solvente.

Tabela B.3.1. PB-1: Ensaio de determinação de rendimento total a 20 °C, 150 bar e 5 % de etanol como co-solvente.

| Tempo [min] | Massa CO ₂ [g] | Massa Pontual [g] | Massa Acumulada [g] | Rend [%] |
|----------------|------------------------------|----------------------|------------------------|-------------|
| 0 | 0,00 | 0,000 | 0,000 | 0,0 |
| 15 | 22,05 | 0,033 | 0,033 | 0,65 |
| 30 | 44,10 | 0,086 | 0,118 | 2,35 |
| 45 | 66,15 | 0,085 | 0,204 | 4,04 |
| 60 | 88,20 | 0,093 | 0,297 | 5,89 |
| 90 | 132,30 | 0,189 | 0,486 | 9,63 |
| 120 | 176,40 | 0,192 | 0,678 | 13,45 |
| 150 | 220,50 | 0,141 | 0,819 | 16,25 |
| 180 | 264,60 | 0,112 | 0,932 | 18,47 |

Tabela B.3.2. PB-2: Ensaio de determinação de rendimento total a 50 °C, 150 bar e 5 % de etanol como co-solvente.

| Tempo [min] | Massa CO ₂ [g] | Massa Pontual [g] | Massa Acumulada [g] | Rend [%] |
|----------------|------------------------------|----------------------|------------------------|-------------|
| 0 | 0,00 | 0,000 | 0,000 | 0,00 |
| 15 | 22,05 | 0,295 | 0,295 | 5,80 |
| 30 | 44,10 | 0,093 | 0,389 | 7,62 |
| 45 | 66,15 | 0,053 | 0,441 | 8,65 |
| 60 | 88,20 | 0,086 | 0,527 | 10,34 |
| 90 | 132,30 | 0,147 | 0,674 | 13,22 |
| 120 | 176,40 | 0,139 | 0,812 | 15,94 |
| 150 | 220,50 | 0,119 | 0,931 | 18,27 |
| 180 | 264,60 | 0,103 | 1,034 | 20,30 |

Tabela B.3.3. PB-3: Ensaio de determinação de rendimento total a 20 °C, 250 bar e 5 % de etanol como co-solvente.

| Tempo [min] | Massa CO ₂ [g] | Massa Pontual [g] | Massa Acumulada [g] | Rend [%] |
|----------------|------------------------------|----------------------|------------------------|-------------|
| 0 | 0,00 | 0,000 | 0,000 | 0,00 |
| 15 | 21,00 | 0,028 | 0,028 | 0,56 |
| 30 | 42,00 | 0,062 | 0,090 | 1,79 |
| 45 | 63,00 | 0,084 | 0,174 | 3,47 |
| 60 | 84,00 | 0,134 | 0,308 | 6,14 |
| 90 | 126,00 | 0,239 | 0,547 | 10,91 |
| 120 | 168,00 | 0,168 | 0,715 | 14,26 |
| 150 | 210,00 | 0,161 | 0,876 | 17,48 |
| 180 | 252,00 | 0,130 | 1,006 | 20,06 |

Tabela B.3.4. PB-4: Ensaio de determinação de rendimento total a 50 °C, 250 bar e 5 % de etanol como co-solvente.

| Tempo [min] | Massa CO ₂ [g] | Massa Pontual [g] | Massa Acumulada [g] | Rend [%] |
|----------------|------------------------------|----------------------|------------------------|-------------|
| 0 | 0,00 | 0,000 | 0,000 | 0,00 |
| 15 | 21,00 | 0,400 | 0,400 | 8,00 |
| 30 | 42,00 | 0,081 | 0,482 | 9,63 |
| 45 | 63,00 | 0,115 | 0,597 | 11,93 |
| 60 | 84,00 | 0,104 | 0,701 | 14,01 |
| 90 | 126,00 | 0,232 | 0,933 | 18,64 |
| 120 | 168,00 | 0,220 | 1,153 | 23,04 |
| 150 | 210,00 | 0,158 | 1,311 | 26,20 |
| 180 | 252,00 | 0,082 | 1,392 | 27,83 |

Tabela B.3.5. PB-5: Ensaio de determinação de rendimento total a 20 °C, 150 bar e 15 % de etanol como co-solvente.

| Tempo [min] | Massa CO ₂ [g] | Massa Pontual [g] | Massa Acumulada [g] | Rend [%] |
|----------------|------------------------------|----------------------|------------------------|-------------|
| 0 | 0,00 | 0,000 | 0,000 | 0,00 |
| 15 | 19,65 | 0,110 | 0,110 | 2,14 |
| 30 | 39,30 | 0,168 | 0,278 | 5,42 |
| 45 | 58,95 | 0,384 | 0,662 | 12,88 |
| 60 | 78,60 | 0,403 | 1,065 | 20,73 |
| 90 | 117,90 | 0,535 | 1,600 | 31,15 |
| 120 | 157,20 | 0,240 | 1,840 | 35,81 |
| 150 | 196,50 | 0,107 | 1,947 | 37,89 |
| 180 | 235,80 | 0,054 | 2,001 | 38,95 |

Tabela B.3.6. PB-6: Ensaio de determinação de rendimento total a 50 °C, 150 bar e 15 % de etanol como co-solvente.

| Tempo [min] | Massa CO ₂ [g] | Massa Pontual [g] | Massa Acumulada [g] | Rend [%] |
|----------------|------------------------------|----------------------|------------------------|-------------|
| 0 | 0,00 | 0,000 | 0,000 | 0,00 |
| 15 | 19,65 | 0,215 | 0,215 | 4,05 |
| 30 | 39,30 | 0,166 | 0,381 | 7,17 |
| 45 | 58,95 | 0,224 | 0,605 | 11,38 |
| 60 | 78,60 | 0,352 | 0,957 | 18,01 |
| 90 | 117,90 | 0,732 | 1,689 | 31,79 |
| 120 | 157,20 | 0,352 | 2,041 | 38,41 |
| 150 | 196,50 | 0,151 | 2,192 | 41,25 |
| 180 | 235,80 | 0,047 | 2,239 | 42,14 |

Tabela B.3.7. PB-7: Ensaio de determinação de rendimento total a 20 °C, 250 bar e 15 % de etanol como co-solvente.

| Tempo [min] | Massa CO ₂ [g] | Massa Pontual [g] | Massa Acumulada [g] | Rend [%] |
|----------------|------------------------------|----------------------|------------------------|-------------|
| 0 | 0,00 | 0,000 | 0,000 | 0,00 |
| 15 | 18,75 | 0,145 | 0,145 | 2,87 |
| 30 | 37,50 | 0,149 | 0,294 | 5,82 |
| 45 | 56,25 | 0,428 | 0,722 | 14,31 |
| 60 | 75,00 | 0,446 | 1,168 | 23,15 |
| 90 | 112,50 | 0,546 | 1,714 | 33,99 |
| 120 | 150,00 | 0,193 | 1,907 | 37,81 |
| 150 | 187,50 | 0,099 | 2,007 | 39,79 |
| 180 | 225,00 | 0,053 | 2,059 | 40,83 |

Tabela B.3.8. PB-8: Ensaio de determinação de rendimento total a 50 °C, 250 bar e 15 % de etanol como co-solvente.

| Tempo [min] | Massa CO ₂ [g] | Massa Pontual [g] | Massa Acumulada [g] | Rend [%] |
|----------------|------------------------------|----------------------|------------------------|-------------|
| 0 | 0,00 | 0,000 | 0,000 | 0,00 |
| 15 | 18,75 | 0,130 | 0,130 | 2,52 |
| 30 | 37,50 | 0,227 | 0,357 | 6,93 |
| 45 | 56,25 | 0,407 | 0,765 | 14,82 |
| 60 | 75,00 | 0,556 | 1,320 | 25,60 |
| 90 | 112,50 | 0,757 | 2,077 | 40,27 |
| 120 | 150,00 | 0,349 | 2,426 | 47,04 |
| 150 | 187,50 | 0,164 | 2,590 | 50,22 |
| 180 | 225,00 | 0,056 | 2,648 | 51,34 |

Tabela B.3.9. PB-9: Ensaio de determinação de rendimento total em triplicata a 35 °C, 200 bar e 10 % de etanol como co-solvente.

| Tempo [min] | Massa CO ₂ [g] | Massa Pontual [g] | Massa Acumulada [g] | Rend [%] |
|----------------|------------------------------|----------------------|------------------------|--------------|
| 0 | 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,00 ± 0,00 | 0,0 ± 0,00 |
| 15 | 20,25 | 0,16 ± 0,20 | 0,16 ± 0,20 | 3,15 ± 4,08 |
| 30 | 40,50 | 0,11 ± 0,03 | 0,27 ± 0,23 | 5,43 ± 4,65 |
| 45 | 60,75 | 0,20 ± 0,03 | 0,46 ± 0,26 | 9,09 ± 5,18 |
| 60 | 81,00 | 0,20 ± 0,05 | 0,66 ± 0,31 | 13,12 ± 6,19 |
| 90 | 121,50 | 0,46 ± 0,01 | 1,12 ± 0,32 | 22,29 ± 6,41 |
| 120 | 162,00 | 0,34 ± 0,06 | 1,46 ± 0,26 | 29,08 ± 5,24 |
| 150 | 202,50 | 0,20 ± 0,7 | 1,65 ± 0,19 | 33,00 ± 3,77 |
| 180 | 243,00 | 0,12 ± 0,01 | 1,77 ± 0,15 | 35,32 ± 3,05 |

Tabela B.3.10. PB-10: Ensaio de determinação de rendimento total a 20 °C, 150 bar e 0 % de etanol como co-solvente.

| Tempo [min] | Massa CO ₂ [g] | Massa Pontual [g] | Massa Acumulada [g] | Rend [%] |
|----------------|------------------------------|----------------------|------------------------|-------------|
| 0 | 0,00 | 0,000 | 0,000 | 0,00 |
| 15 | 23,25 | 0,028 | 0,028 | 0,54 |
| 30 | 46,50 | 0,027 | 0,055 | 1,07 |
| 45 | 69,75 | 0,019 | 0,074 | 1,44 |
| 60 | 93,00 | 0,088 | 0,082 | 1,60 |
| 90 | 139,50 | 0,022 | 0,110 | 2,15 |
| 120 | 186,00 | 0,018 | 0,129 | 2,51 |
| 150 | 232,50 | 0,017 | 0,145 | 2,83 |
| 180 | 279,00 | 0,024 | 0,169 | 3,29 |

Tabela B.3.11. PB-11: Ensaio de determinação de rendimento total a 50 °C, 150 bar e 0 % de etanol como co-solvente.

| Tempo [min] | Massa CO ₂ [g] | Massa Pontual [g] | Massa Acumulada [g] | Rend [%] |
|----------------|------------------------------|----------------------|------------------------|-------------|
| 0 | 0,00 | 0,000 | 0,000 | 0,00 |
| 15 | 23,25 | 0,022 | 0,022 | 0,43 |
| 30 | 46,50 | 0,035 | 0,057 | 1,10 |
| 45 | 69,75 | 0,013 | 0,070 | 1,36 |
| 60 | 93,00 | 0,011 | 0,081 | 1,57 |
| 90 | 139,50 | 0,031 | 0,112 | 2,17 |
| 120 | 186,00 | 0,037 | 0,149 | 2,88 |
| 150 | 232,50 | 0,008 | 0,157 | 3,04 |
| 180 | 279,00 | 0,024 | 0,181 | 3,50 |

Tabela B.3.12. PB-12: Ensaio de determinação de rendimento total a 20 °C, 250 bar e 0 % de etanol como co-solvente.

| Tempo [min] | Massa CO ₂ [g] | Massa Pontual [g] | Massa Acumulada [g] | Rend [%] |
|----------------|------------------------------|----------------------|------------------------|-------------|
| 0 | 0,00 | 0,000 | 0,000 | 0,00 |
| 15 | 22,20 | 0,059 | 0,059 | 1,15 |
| 30 | 44,40 | 0,038 | 0,097 | 1,89 |
| 45 | 66,60 | 0,017 | 0,115 | 2,24 |
| 60 | 88,80 | 0,016 | 0,130 | 2,55 |
| 90 | 133,20 | 0,016 | 0,147 | 2,87 |
| 120 | 177,60 | 0,021 | 0,167 | 3,27 |
| 150 | 222,00 | 0,015 | 0,182 | 3,56 |
| 180 | 266,40 | 0,024 | 0,206 | 4,03 |

Tabela B.3.13. PB-13: Ensaio de determinação de rendimento total a 50 °C, 250 bar e 0 % de etanol como co-solvente.

| Tempo [min] | Massa CO ₂ [g] | Massa Pontual [g] | Massa Acumulada [g] | Rend [%] |
|----------------|------------------------------|----------------------|------------------------|-------------|
| 0 | 0,00 | 0,000 | 0,000 | 0,00 |
| 15 | 22,20 | 0,062 | 0,062 | 1,19 |
| 30 | 44,40 | 0,039 | 0,101 | 1,94 |
| 45 | 66,60 | 0,053 | 0,154 | 2,96 |
| 60 | 88,80 | 0,038 | 0,192 | 3,68 |
| 90 | 133,20 | 0,067 | 0,258 | 4,96 |
| 120 | 177,60 | 0,057 | 0,315 | 6,05 |
| 150 | 222,00 | 0,036 | 0,352 | 6,75 |
| 180 | 266,40 | 0,029 | 0,381 | 7,30 |

B.3.1 Cromatogramas obtidos por HPLC das extrações supercríticas da própolis bruta

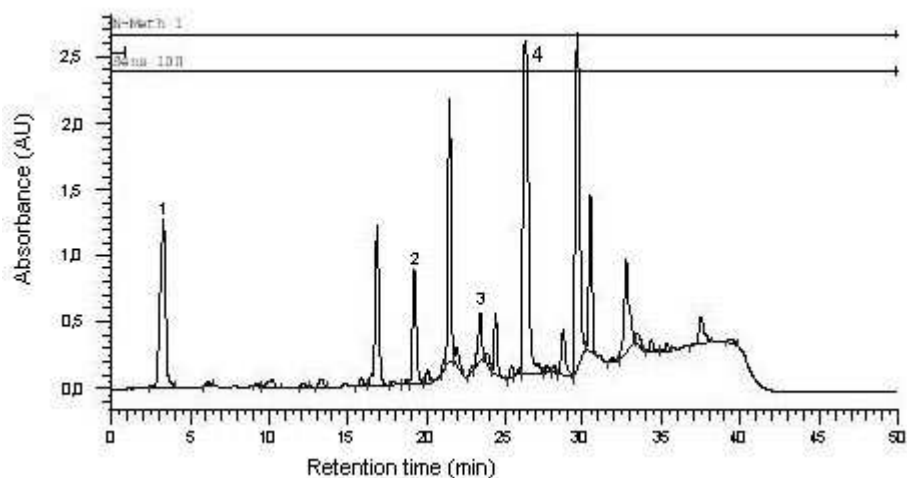


Figura B.3.1.1. Cromatograma do extrato supercrítico de própolis referente ao experimento PB-1.

(1: ácido p-cumárico; 2: ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico; 3: canferide; 4: Artepillin C)

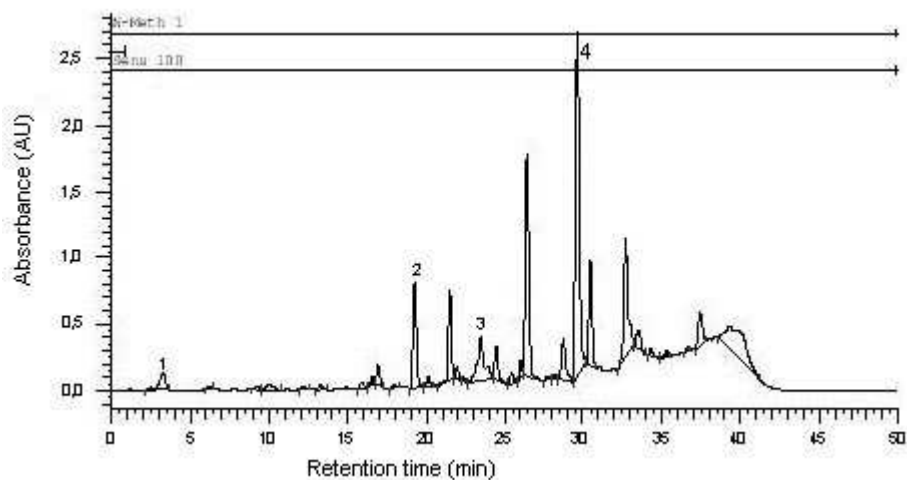


Figura B.3.1.2. Cromatograma do extrato supercrítico de própolis referente ao experimento PB-2.

(1: ácido p-cumárico; 2: ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico; 3: canferide; 4: Artepillin C)

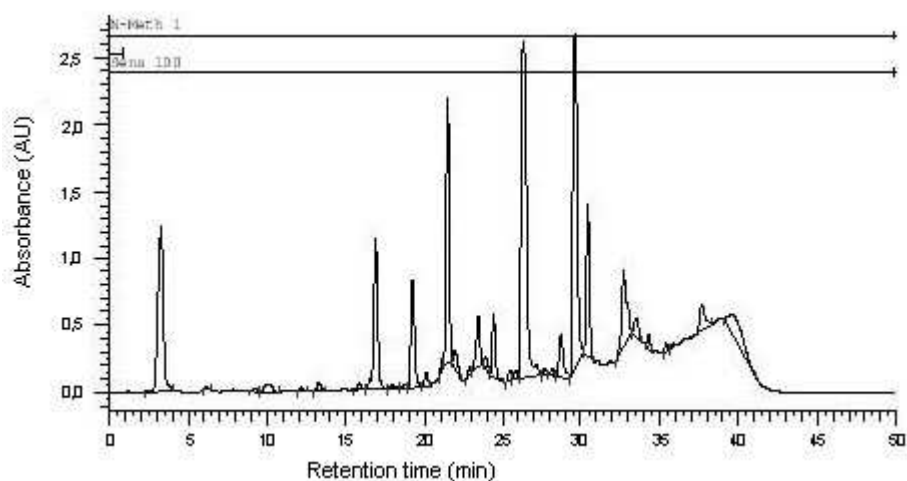


Figura B.3.1.3. Cromatograma do extrato supercrítico de própolis referente ao experimento PB-3.

(1: ácido p-cumárico; 2: ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico; 3: canferide; 4: Artepillin C)

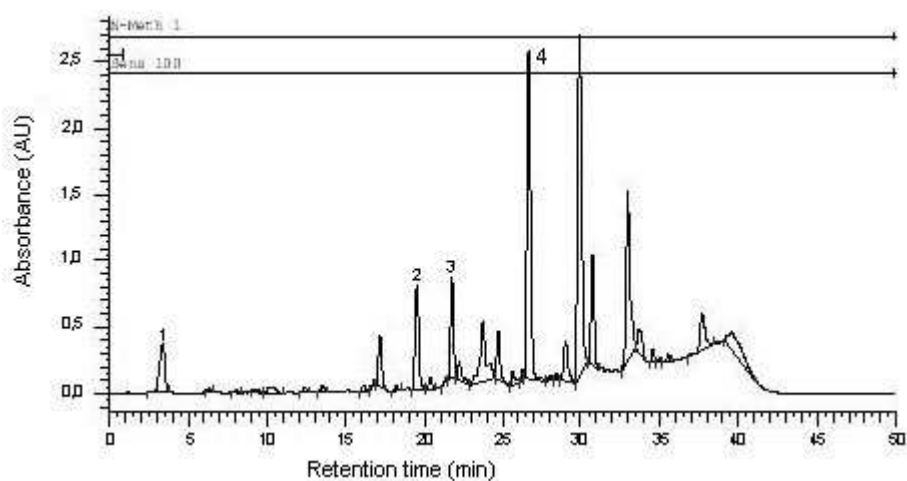


Figura B.3.1.4. Cromatograma do extrato supercrítico de própolis referente ao experimento PB-4.

(1: ácido p-cumárico; 2: ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico; 3: canferide; 4: Artepillin C)

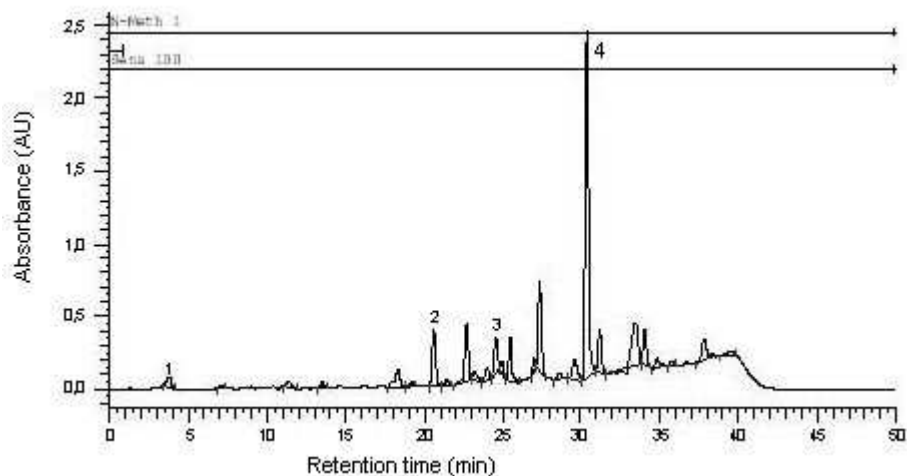


Figura B.3.1.5. Cromatograma do extrato supercrítico de própolis referente ao experimento PB-5.

(1: ácido p-cumárico; 2: ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico; 3: canferide; 4: Artepillin C)

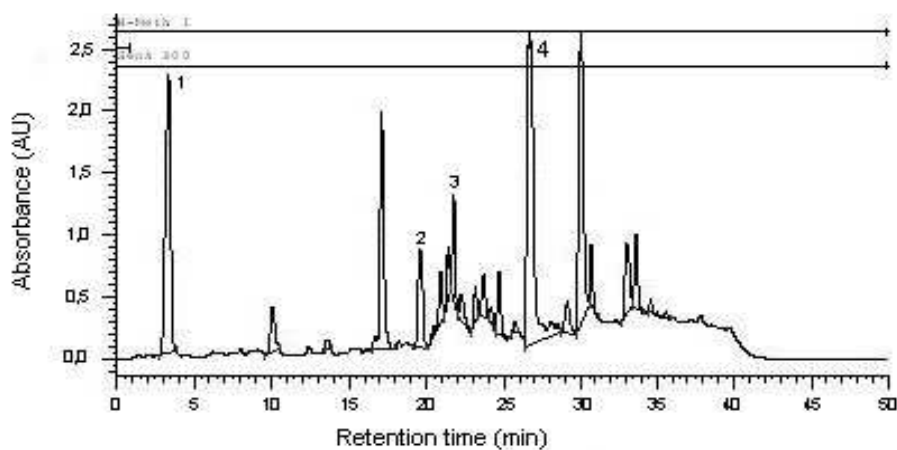


Figura B.3.1.6. Cromatograma do extrato supercrítico de própolis referente ao experimento PB-6.

(1: ácido p-cumárico; 2: ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico; 3: canferide; 4: Artepillin C)

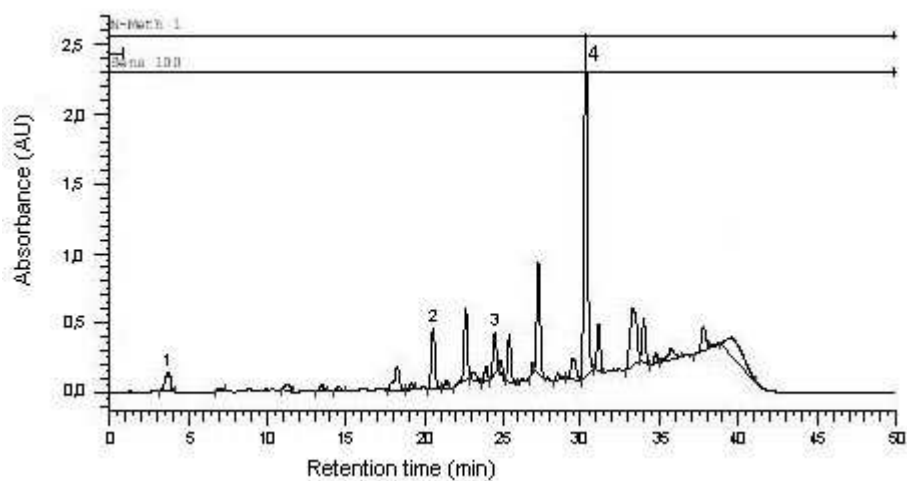


Figura B.3.1.7. Cromatograma do extrato supercrítico de própolis referente ao experimento PB-7.

(1: ácido p-cumárico; 2: ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico; 3: canferide; 4: Artepillin C)

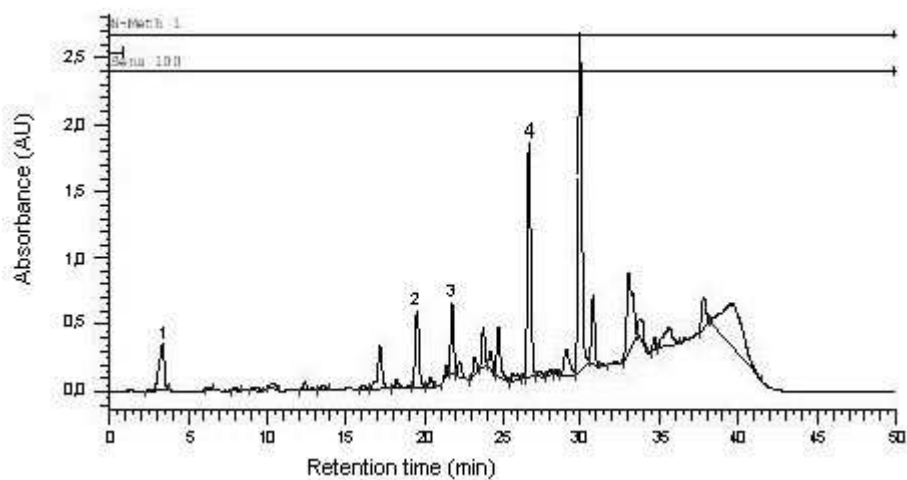


Figura B.3.1.8. Cromatograma do extrato supercrítico de própolis referente ao experimento PB-8.

(1: ácido p-cumárico; 2: ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico; 3: canferide; 4: Artepillin C)

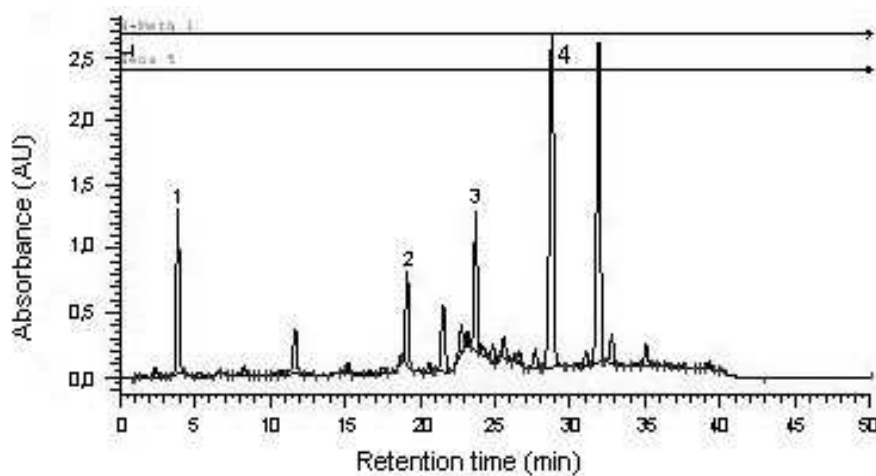


Figura B.3.1.9. Cromatograma do extrato supercrítico de própolis referente ao experimento PB-9 F1.

(1: ácido p-cumárico; 2: ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico; 3: canferide; 4: Artepillin C)

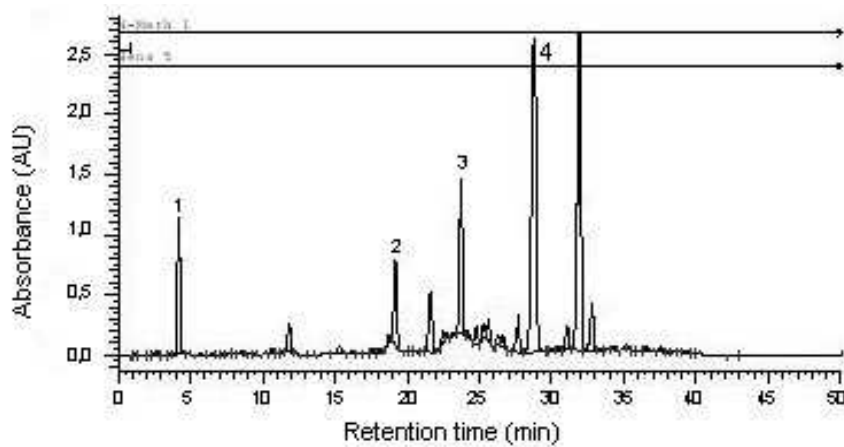


Figura B.3.1.10. Cromatograma do extrato supercrítico de própolis referente ao experimento PB-9 F2.

(1: ácido p-cumárico; 2: ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico; 3: canferide; 4: Artepillin C)

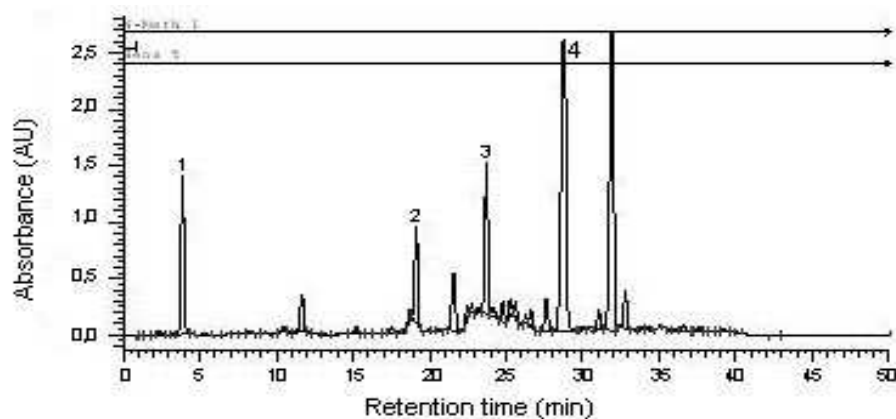


Figura B.3.1.11. Cromatograma do extrato supercrítico de própolis referente ao experimento PB-9 F3.

(1: ácido p-cumárico; 2: ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico; 3: canferide; 4: Artepillin C)

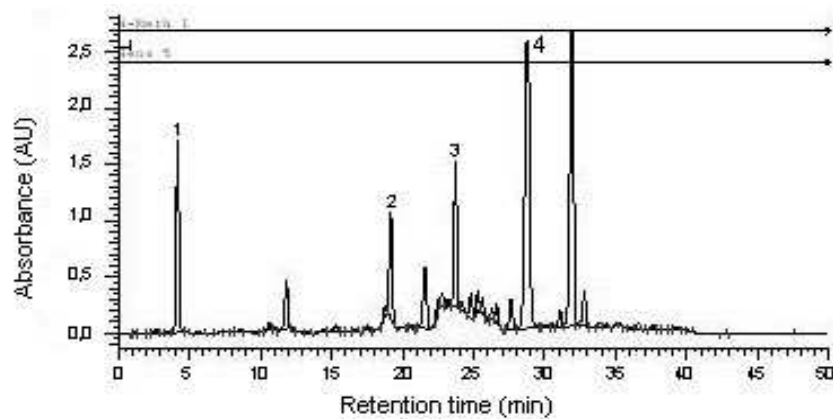


Figura B.3.1.12. Cromatograma do extrato supercrítico de própolis referente ao experimento PB-9 F4.

(1: ácido p-cumárico; 2: ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico; 3: canferide; 4: Artepillin C)

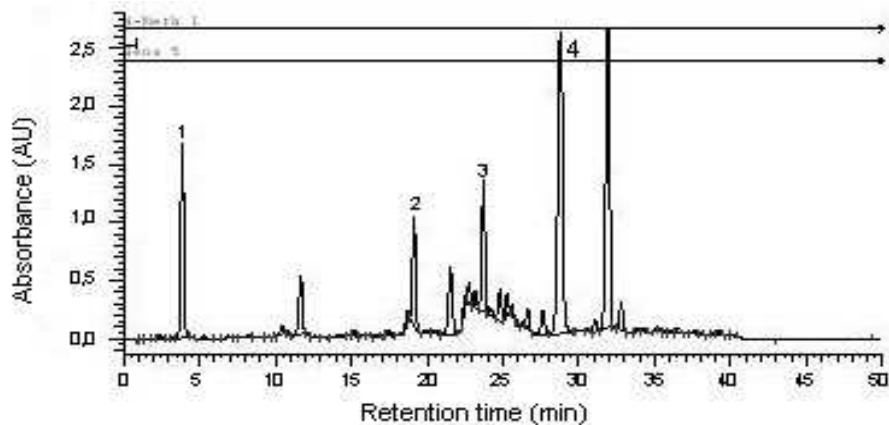


Figura B.3.1.13. Cromatograma do extrato supercrítico de própolis referente ao experimento PB-9 F5.

(1: ácido p-cumárico; 2: ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico; 3: canferide; 4: Artepillin C)

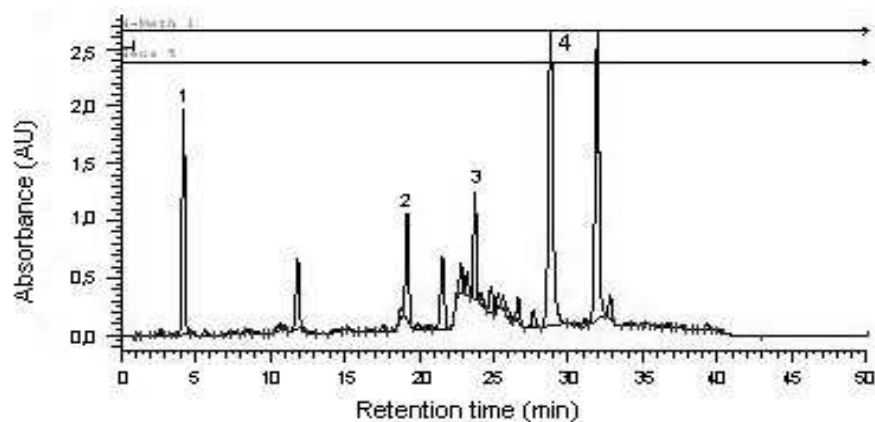


Figura B.3.1.14. Cromatograma do extrato supercrítico de própolis referente ao experimento PB-9 F6.

(1: ácido p-cumárico; 2: ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico; 3: canferide; 4: Artepillin C)

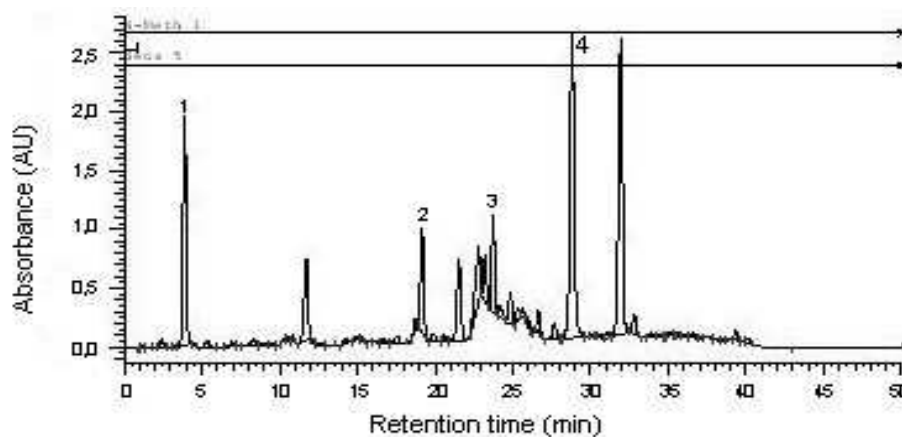


Figura B.3.1.15. Cromatograma do extrato supercrítico de própolis referente ao experimento PB-9 F7.

(1: ácido p-cumárico; 2: ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico; 3: canferide; 4: Artepillin C)

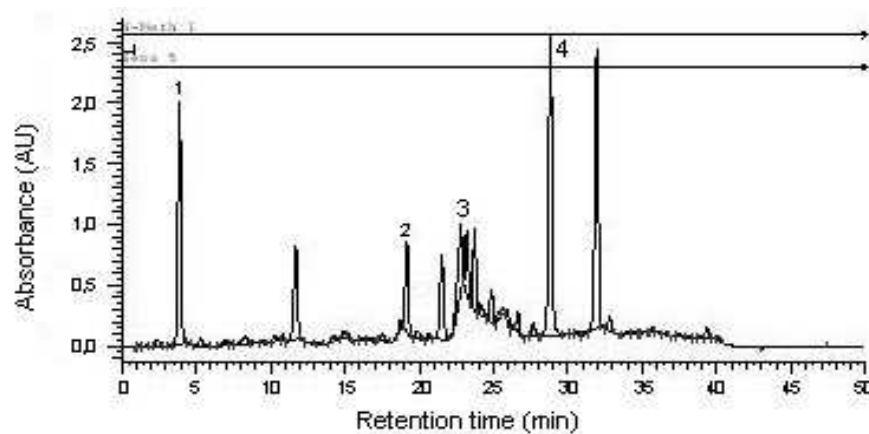


Figura B.3.1.16. Cromatograma do extrato supercrítico de própolis referente ao experimento PB-9 F8.

(1: ácido p-cumárico; 2: ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico; 3: canferide; 4: Artepillin C)

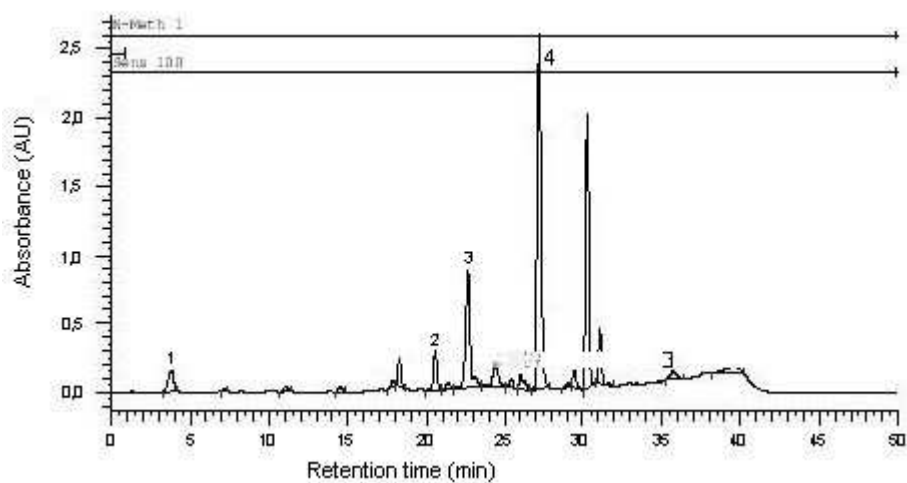


Figura B.3.1.17. Cromatograma do extrato supercrítico de própolis referente ao experimento PB-10.

(1: ácido p-cumárico; 2: ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico; 3: canferide; 4: Artepillin C)

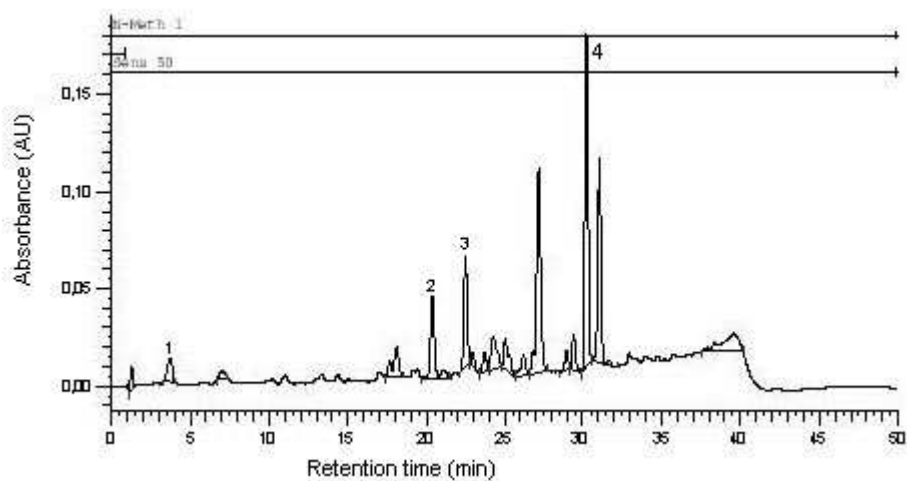


Figura B.3.1.18. Cromatograma do extrato supercrítico de própolis referente ao experimento PB-11.

(1: ácido p-cumárico; 2: ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico; 3: canferide; 4: Artepillin C)

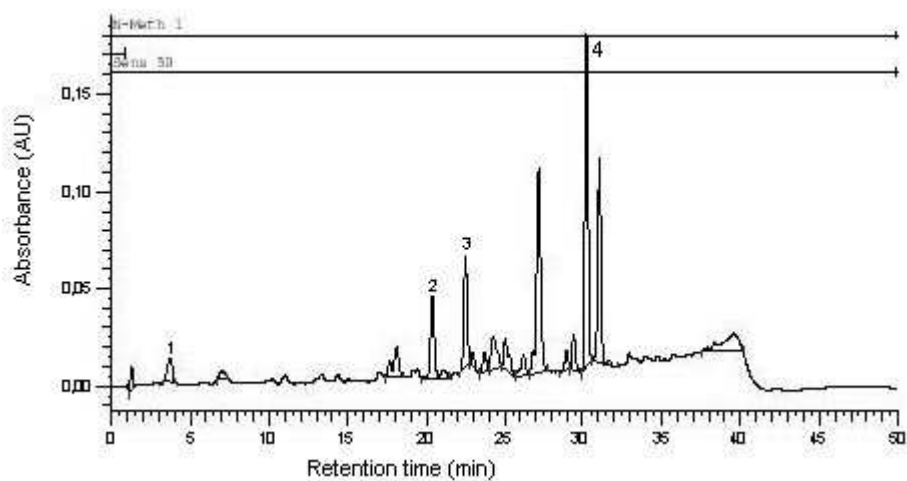


Figura B.3.1.19. Cromatograma do extrato supercrítico de própolis referente ao experimento PB-12.

(1: ácido p-cumárico; 2: ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico; 3: canferide; 4: Artepillin C)

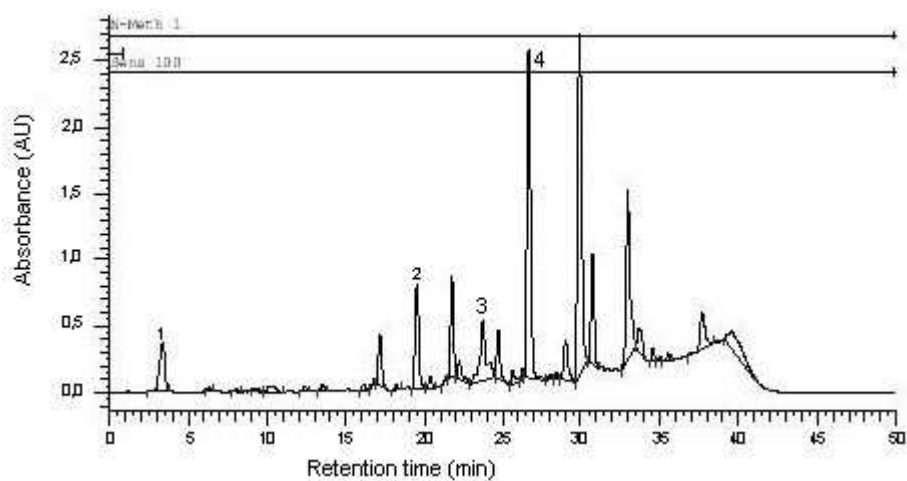


Figura B.3.1.20. Cromatograma do extrato supercrítico de própolis referente ao experimento PB-13.

(1: ácido p-cumárico; 2: ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico; 3: canferide; 4: Artepillin C)

B.3.2 Cromatogramas obtidos por HPLC das extrações supercríticas da própolis bruta com 10% de acetato de etila e etanol como co-solvente.

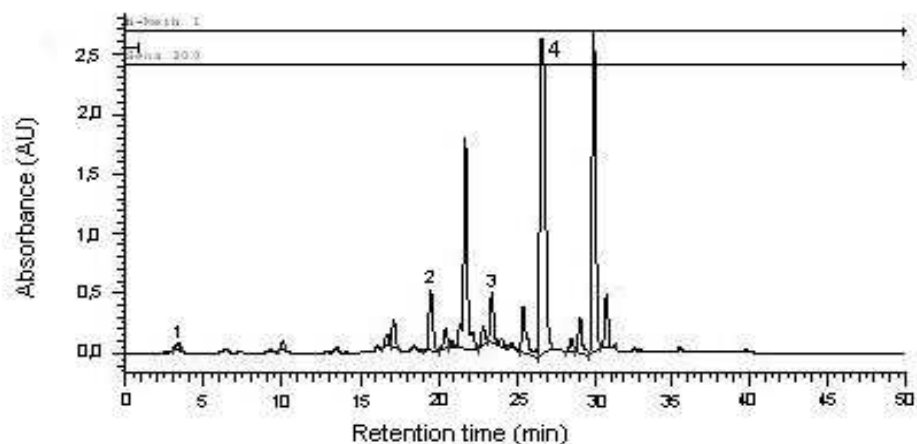


Figura B.3.2.1. Cromatograma do extrato supercrítico de própolis referente ao experimento PB-AE.

(1: ácido p-cumárico; 2: ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico; 3: canferide; 4: Artepillin C)

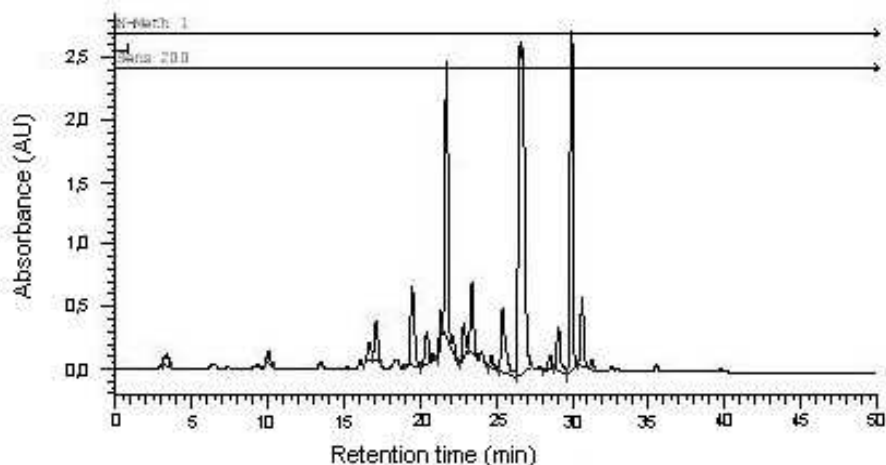


Figura B.3.2.2. Cromatograma do extrato supercrítico de própolis referente ao experimento PB-EtOH.

(1: ácido p-cumárico; 2: ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico; 3: canferide; 4: Artepillin C)

ANEXO C – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**C.1 Determinação da atividade antioxidante dos extratos obtidos da extração supercrítica do extrato etanólico de própolis seco (EEPS)**

Tabela C.1.1. Determinação da Atividade Antioxidante do EEPS:

| Concentração | Absorbância [nm] | % |
|--------------|------------------|--------|
| 0 | 0,3166 | 100,00 |
| 2 | 0,2725 | 86,07 |
| 4 | 0,1936 | 61,15 |
| 6 | 0,1468 | 46,37 |
| 10 | 0,0750 | 23,69 |
| 12 | 0,0540 | 17,06 |
| 14 | 0,0433 | 13,68 |
| 18 | 0,0379 | 11,97 |
| 20 | 0,0328 | 10,36 |

- MÉTODO DOS MÍNIMOS QUADRADOS ATRAVÉS DA EQUAÇÃO DA RETA:

$$y = -4,4903x + 84,057$$

$$x = (50 - b) / a$$

$$x = (50 - 84,057) / -4,4903$$

$$x = 7,58$$

$$ED_{50} = 7,58 \mu\text{g/mL}$$

C.2 Determinação da atividade antioxidante dos extratos obtidos a partir da extração supercrítica do extrato etanólico de própolis seco (EEPS):

Tabela C.2.1. Determinação da Atividade Antioxidante referente à Corrida 1 (T=20 °C; P=150 bar) e Corrida 2 (T=20 °C; P=200 bar):

| Concentração | 20 °C | | | | | |
|--------------|------------------|--------|-------------------------|------------------|--------|-------------------------|
| | 150 bar | | | 200 bar | | |
| | Absorbância [nm] | % | Eq. Reta | Absorbância [nm] | % | Eq. Reta |
| 0 | 0,3087 | 100,00 | | 0,3001 | 100,00 | |
| 2 | 0,2863 | 92,74 | | 0,2456 | 81,84 | |
| 4 | 0,2465 | 79,85 | | 0,2111 | 70,34 | |
| 6 | 0,2333 | 75,57 | | 0,1692 | 56,38 | |
| 10 | 0,1700 | 55,07 | $y = - 3,3139x + 95,95$ | 0,1297 | 43,22 | $y = - 3,732x + 87,281$ |
| 12 | 0,1644 | 53,26 | | 0,1049 | 34,96 | |
| 14 | 0,1552 | 50,28 | | 0,0950 | 31,66 | |
| 18 | 0,1218 | 39,46 | | 0,0731 | 24,36 | |
| 20 | 0,0998 | 32,33 | | 0,0655 | 21,83 | |

Tabela C.2.2. Determinação da Atividade Antioxidante referente à Corrida 3 (T=20 °C; P=250 bar):

| Concentração | 20 °C | | |
|--------------|------------------|--------|------------------------|
| | 250 bar | | |
| | Absorbância [nm] | % | Eq. Reta |
| 0 | 0,3444 | 100,00 | |
| 2 | 0,269 | 78,11 | |
| 4 | 0,2131 | 61,88 | |
| 6 | 0,1660 | 48,20 | |
| 10 | 0,0957 | 27,79 | $y = - 4,014x + 81,75$ |
| 12 | 0,0780 | 22,65 | |
| 14 | 0,0648 | 18,82 | |
| 18 | 0,0605 | 17,57 | |
| 20 | 0,0536 | 15,56 | |

Tabela C.2.3. Determinação da Atividade Antioxidante referente à Corrida 4 (T=35 °C; P=150 bar) e Corrida 5 (T=35 °C; P=200 bar):

| Concentração | 35 °C | | | | | |
|--------------|------------------|--------|--------------------------|------------------|--------|--------------------------|
| | 150 bar | | | 200 bar | | |
| | Absorbância [nm] | % | Eq. Reta | Absorbância [nm] | % | Eq. Reta |
| 0 | 0,2781 | 100,00 | | 0,3010 | 100,00 | |
| 2 | 0,2712 | 97,52 | | 0,2768 | 91,96 | |
| 4 | 0,2560 | 92,05 | | 0,2512 | 83,46 | |
| 6 | 0,2251 | 80,94 | | 0,2374 | 78,87 | |
| 10 | 0,2039 | 73,32 | $y = - 2,5893x + 100,02$ | 0,2001 | 66,48 | $y = - 2,8971x + 96,723$ |
| 12 | 0,1842 | 66,24 | | 0,1768 | 58,74 | |
| 14 | 0,1743 | 62,68 | | 0,1618 | 53,75 | |
| 18 | 0,1488 | 53,51 | | 0,1377 | 45,75 | |
| 20 | 0,1426 | 51,28 | | 0,1275 | 42,36 | |

Tabela C.2.4. Determinação da Atividade Antioxidante referente à Corrida 6 (T=35 °C; P=250 bar):

| Concentração | 35 °C | | |
|--------------|------------------|--------|--------------------------|
| | 250 bar | | Eq. Reta |
| | Absorbância [nm] | % | |
| 0 | 0,2945 | 100,00 | |
| 2 | 0,2764 | 93,85 | |
| 4 | 0,2729 | 92,67 | |
| 6 | 0,2455 | 83,36 | |
| 10 | 0,2070 | 70,29 | $y = - 2,5479x + 99,548$ |
| 12 | 0,1967 | 66,79 | |
| 14 | 0,1984 | 67,37 | |
| 18 | 0,1517 | 51,51 | |
| 20 | 0,1501 | 50,97 | |

Tabela C.2.5. Determinação da Atividade Antioxidante referente à Corrida 7 (T=50 °C; P=150 bar) e Corrida 8 (T=50 °C; P=200 bar):

| Concentração | 50 °C | | | | | |
|--------------|------------------|--------|--------------------------|------------------|--------|--------------------------|
| | 150 bar | | | 200 bar | | |
| | Absorbância [nm] | % | Eq. Reta | Absorbância [nm] | % | Eq. Reta |
| 0 | 0,2915 | 100,00 | | 0,3061 | 100,00 | |
| 2 | 0,2541 | 87,17 | | 0,2629 | 85,89 | |
| 4 | 0,2223 | 76,26 | | 0,2375 | 77,59 | |
| 6 | 0,1828 | 62,71 | | 0,2214 | 72,33 | |
| 10 | 0,1384 | 47,48 | $y = - 3,8292x + 92,146$ | 0,1447 | 47,27 | $y = - 3,7267x + 93,119$ |
| 12 | 0,1227 | 42,09 | | 0,1256 | 41,03 | |
| 14 | 0,1046 | 35,88 | | 0,1197 | 39,10 | |
| 18 | 0,0774 | 26,55 | | 0,0830 | 27,12 | |
| 20 | 0,0637 | 21,85 | | 0,0834 | 27,25 | |

Tabela C.2.6. Determinação da Atividade Antioxidante referente à Corrida 9 (T=50 °C; P=250 bar):

| Concentração | 50 °C | | |
|--------------|------------------|--------|--------------------------|
| | 250 bar | | |
| | Absorbância [nm] | % | Eq. Reta |
| 0 | 0,3056 | 100,00 | |
| 2 | 0,2642 | 86,45 | |
| 4 | 0,2504 | 81,94 | |
| 6 | 0,2350 | 76,90 | |
| 10 | 0,1703 | 55,73 | $y = - 3,3951x + 95,385$ |
| 12 | 0,1603 | 52,45 | |
| 14 | 0,1417 | 46,37 | |
| 18 | 0,1067 | 34,91 | |
| 20 | 0,0970 | 31,74 | |

C.3 Determinação da atividade antioxidante dos extratos obtidos da extração supercrítica do extrato etanólico de própolis seco (EEPS) e adição de co-solvente

Tabela C.3.1. Determinação da Atividade Antioxidante referente à CS-1 (T=20 °C; P=150 bar; 5 % co-solvente), CS-3 (T=20 °C; P=250 bar; 5 % co-solvente):

| Concentração | 20 °C / 5 % co-solvente | | | | | |
|--------------|-------------------------|--------|--------------------------|------------------|--------|--------------------------|
| | 150 bar | | | 250 bar | | |
| | Absorbância [nm] | % | Eq. Reta | Absorbância [nm] | % | Eq. Reta |
| 0 | 0,2868 | 100,00 | | 0,2992 | 100,00 | |
| 2 | 0,2782 | 97,00 | | 0,2705 | 90,41 | |
| 4 | 0,2488 | 86,75 | | 0,257 | 85,9 | |
| 6 | 0,2329 | 81,21 | | 0,221 | 73,86 | |
| 10 | 0,1842 | 64,23 | $y = - 3,0358x + 98,972$ | 0,1850 | 61,83 | $y = - 2,8124x + 95,108$ |
| 12 | 0,1629 | 56,80 | | 0,1748 | 58,42 | |
| 14 | 0,1561 | 54,43 | | 0,1568 | 52,41 | |
| 18 | 0,1310 | 45,68 | | 0,1467 | 49,03 | |
| 20 | 0,1250 | 43,58 | | 0,1264 | 42,25 | |

Tabela C.3.2. Determinação da Atividade Antioxidante referente à CS-5 (T=20 °C; P=150 bar; 15 % co-solvente), CS-7 (T=20 °C; P=250 bar; 15 % co-solvente):

| Concentração | 20 °C / 15 % co-solvente | | | | | |
|--------------|--------------------------|--------|--------------------------|------------------|--------|--------------------------|
| | 150 bar | | | 250 bar | | |
| | Absorbância [nm] | % | Eq. Reta | Absorbância [nm] | % | Eq. Reta |
| 0 | 0,3011 | 100,00 | | 0,3346 | 100,00 | |
| 2 | 0,2711 | 90,04 | | 0,2837 | 84,79 | |
| 4 | 0,2478 | 82,30 | | 0,2637 | 78,81 | |
| 6 | 0,2247 | 74,63 | | 0,2664 | 79,62 | |
| 10 | 0,1759 | 58,42 | $y = - 3,1331x + 95,358$ | 0,2254 | 67,36 | $y = - 2,3892x + 92,848$ |
| 12 | 0,1714 | 56,92 | | 0,2147 | 64,17 | |
| 14 | 0,1470 | 48,82 | | 0,1864 | 55,71 | |
| 18 | 0,1240 | 41,18 | | 0,1841 | 55,02 | |
| 20 | 0,1098 | 36,47 | | 0,1495 | 44,68 | |

Tabela C.3.3. Determinação da Atividade Antioxidante referente à CS-2 (T=50 °C; P=150 bar; 5 % co-solvente), CS-4 (T=50 °C; P=250 bar; 5 % co-solvente):

| Concentração | 50 °C / 5 % co-solvente | | | | | |
|--------------|-------------------------|--------|--------------------------|------------------|--------|--------------------------|
| | 150 bar | | | 250 bar | | |
| | Absorbância [nm] | % | Eq. Reta | Absorbância [nm] | % | Eq. Reta |
| 0 | 0,3116 | 100,00 | | 0,2982 | 100,00 | |
| 2 | 0,2908 | 93,32 | | 0,2699 | 90,51 | |
| 4 | 0,2670 | 85,69 | | 0,2297 | 77,03 | |
| 6 | 0,2462 | 79,01 | | 0,2298 | 77,06 | |
| 10 | 0,1940 | 62,26 | $y = - 3,2285x + 98,461$ | 0,1932 | 64,79 | $y = - 2,7135x + 93,784$ |
| 12 | 0,1782 | 57,19 | | 0,1748 | 58,62 | |
| 14 | 0,1650 | 52,95 | | 0,1513 | 50,74 | |
| 18 | 0,1345 | 43,16 | | 0,1449 | 48,59 | |
| 20 | 0,1088 | 34,92 | | 0,1293 | 43,36 | |

Tabela C.3.4. Determinação da Atividade Antioxidante referente à CS-6 (T=50 °C; P=150 bar; 15 % co-solvente), CS-8 (T=50 °C; P=250 bar; 15 % co-solvente):

| Concentração | 50 °C / 15 % co-solvente | | | | | |
|--------------|--------------------------|--------|-------------------------|------------------|--------|-------------------------|
| | 150 bar | | | 250 bar | | |
| | Absorbância [nm] | % | Eq. Reta | Absorbância [nm] | % | Eq. Reta |
| 0 | 0,3285 | 100,00 | | 0,2900 | 100,00 | |
| 2 | 0,3069 | 93,42 | | 0,2604 | 89,79 | |
| 4 | 0,2699 | 82,16 | | 0,2374 | 81,86 | |
| 6 | 0,2473 | 75,28 | | 0,2171 | 74,86 | |
| 10 | 0,2081 | 63,35 | $y = - 2,8833x + 95,74$ | 0,1884 | 64,97 | $y = - 2,7968x + 94,74$ |
| 12 | 0,1875 | 57,08 | | 0,1636 | 56,41 | |
| 14 | 0,1777 | 54,09 | | 0,1641 | 56,59 | |
| 18 | 0,1529 | 46,54 | | 0,1342 | 46,28 | |
| 20 | 0,1372 | 41,77 | | 0,1200 | 41,38 | |

Tabela C.3.5. Determinação da Atividade Antioxidante referente à CS-9 F1 e CS-9 F2 (T=35 °C; P=200 bar ; 10 % co-solvente):

| Concentração | 35 °C /200 bar/ 15 % co-solvente | | | | | |
|--------------|----------------------------------|--------|------------------------|------------------|--------|-------------------------|
| | Fração 1 | | | Fração 2 | | |
| | Absorbância [nm] | % | Eq. Reta | Absorbância [nm] | % | Eq. Reta |
| 0 | 0,3056 | 100,00 | | 0,3191 | 100,00 | |
| 2 | 0,2642 | 86,45 | | 0,2646 | 82,92 | |
| 4 | 0,2504 | 81,94 | | 0,2501 | 78,38 | |
| 6 | 0,235 | 76,90 | | 0,2153 | 67,47 | |
| 10 | 0,1703 | 55,73 | $y = -3,395x + 95,384$ | 0,1684 | 52,77 | $y = -3,3593x + 91,284$ |
| 12 | 0,1603 | 52,45 | | 0,1455 | 45,60 | |
| 14 | 0,1417 | 46,37 | | 0,1342 | 42,06 | |
| 18 | 0,1067 | 34,91 | | 0,1037 | 32,50 | |
| 20 | 0,0970 | 31,74 | | 0,0988 | 30,96 | |

Tabela C.3.6. Determinação da Atividade Antioxidante referente à CS-9 F3 e CS-9 F4 (T=35 °C; P=200 bar ; 10 % co-solvente):

| Concentração | 35 °C /200 bar/ 15 % co-solvente | | | | | |
|--------------|----------------------------------|--------|-------------------------|------------------|--------|------------------------|
| | Fração 3 | | | Fração 4 | | |
| | Absorbância [nm] | % | Eq. Reta | Absorbância [nm] | % | Eq. Reta |
| 0 | 0,2493 | 100,00 | | 0,3237 | 100,00 | |
| 2 | 0,2408 | 96,59 | | 0,2677 | 82,70 | |
| 4 | 0,2345 | 94,06 | | 0,2488 | 76,86 | |
| 6 | 0,1908 | 76,53 | | 0,2302 | 71,12 | |
| 10 | 0,1569 | 62,94 | $y = -3,4801x + 101,05$ | 0,1837 | 56,75 | $y = -3,237x + 91,972$ |
| 12 | 0,1353 | 54,27 | | 0,1656 | 51,16 | |
| 14 | 0,1230 | 49,34 | | 0,1442 | 44,55 | |
| 18 | 0,1050 | 42,12 | | 0,1114 | 34,41 | |
| 20 | 0,0856 | 34,34 | | 0,1030 | 31,82 | |

Tabela C.3.7. Determinação da Atividade Antioxidante referente à CS-9 F5 e CS-9 F6 (T=35 °C; P=200 bar; 10 % co-solvente):

| Concentração | 35 °C /200 bar/ 15 % co-solvente | | | | | |
|--------------|----------------------------------|---------------|-------------------------|------------------|---------------|-------------------------|
| | Absorbância [nm] | Fração 5 % | Eq. Reta | Absorbância [nm] | Fração 6 % | Eq. Reta |
| 0 | 0,334 | 100 | | 0,2955 | 100,00 | |
| 2 | 0,3132 | 93,77 | | 0,2851 | 96,48 | |
| 4 | 0,2987 | 89,43 | | 0,2625 | 88,83 | |
| 6 | 0,2768 | 82,87 | | 0,233 | 78,85 | |
| 10 | 0,2424 | 72,57 | $y = - 2,357x + 98,011$ | 0,1731 | 58,58 | $y = - 3,638x + 100,52$ |
| 12 | 0,2251 | 67,4 | | 0,1633 | 55,26 | |
| 14 | 0,2096 | 62,75 | | 0,1326 | 44,87 | |
| 18 | 0,1899 | 56,86 | | 0,1042 | 35,26 | |
| 20 | 0,1793 | 53,68 | | 0,0994 | 33,64 | |

Tabela C.3.8. Determinação da Atividade Antioxidante referente à CS-9 F7 (T=35 °C; P=200 bar; 10 % co-solvente):

| Concentração | 35 °C /200 bar / 10 % co-solvente | | |
|--------------|-----------------------------------|---------------|--------------------------|
| | Absorbância [nm] | Fração 7 % | Eq. Reta |
| 0 | 0,3008 | 100,00 | |
| 2 | 0,2741 | 91,12 | |
| 4 | 0,2508 | 83,38 | |
| 6 | 0,2487 | 82,68 | |
| 10 | 0,2151 | 71,51 | $y = - 2,4143x + 96,423$ |
| 12 | 0,1966 | 65,36 | |
| 14 | 0,1862 | 61,90 | |
| 18 | 0,1736 | 57,71 | |
| 20 | 0,1399 | 46,51 | |

C.4 Determinação da atividade antioxidante dos extratos obtidos da extração supercrítica da própolis bruta com e sem adição de co-solvente

Tabela C.4.1. Determinação da Atividade Antioxidante referente à PB-1 (T=20 °C; P=150 bar; 5 % co-solvente), PB-3 (T=20 °C; P=250 bar; 5 % co-solvente):

| Concentração | 20 °C / 5 % co-solvente | | | | | |
|--------------|-------------------------|--------|-------------------------|------------------|--------|--------------------------|
| | 150 bar | | | 250 bar | | |
| | Absorbância [nm] | % | Eq. Reta | Absorbância [nm] | % | Eq. Reta |
| 0 | 0,3168 | 100,00 | $y = - 2,8187x + 96,87$ | 0,2861 | 100,00 | $y = - 3,2694x + 101,68$ |
| 2 | 0,2899 | 91,51 | | 0,2776 | 97,03 | |
| 4 | 0,2713 | 85,64 | | 0,2528 | 88,36 | |
| 6 | 0,2524 | 79,67 | | 0,2554 | 89,27 | |
| 10 | 0,205 | 64,71 | | 0,1908 | 66,69 | |
| 12 | 0,1962 | 61,93 | | 0,1564 | 54,67 | |
| 14 | 0,1719 | 54,26 | | 0,1486 | 51,94 | |
| 18 | 0,1513 | 47,76 | | 0,1390 | 48,58 | |
| 20 | 0,1392 | 43,94 | | 0,1070 | 37,40 | |

Tabela C.4.2. Determinação da Atividade Antioxidante referente à PB-5 (T=20 °C; P=150 bar; 15 % co-solvente), PB-7 (T=20 °C; P=250 bar; 15 % co-solvente):

| Concentração | 20 °C / 15 % co-solvente | | | | | |
|--------------|--------------------------|--------|--------------------------|------------------|--------|-------------------------|
| | 150 bar | | | 250 bar | | |
| | Absorbância [nm] | % | Eq. Reta | Absorbância [nm] | % | Eq. Reta |
| 0 | 0,3171 | 100,00 | $y = - 3,4734x + 98,718$ | 0,2972 | 100,00 | $y = - 2,845x + 94,289$ |
| 2 | 0,3038 | 95,81 | | 0,2603 | 87,58 | |
| 4 | 0,2791 | 88,02 | | 0,2435 | 81,93 | |
| 6 | 0,2398 | 75,62 | | 0,2237 | 75,27 | |
| 10 | 0,1968 | 62,06 | | 0,1889 | 63,56 | |
| 12 | 0,1545 | 48,72 | | 0,1734 | 58,34 | |
| 14 | 0,1400 | 44,15 | | 0,1536 | 51,68 | |
| 18 | 0,1205 | 38,00 | | 0,1294 | 43,54 | |
| 20 | 0,1185 | 37,37 | | 0,1249 | 42,03 | |

Tabela C.4.3. Determinação da Atividade Antioxidante referente à PB-2 (T=50 °C; P=150 bar; 5 % co-solvente), PB-4 (T=50 °C; P=250 bar; 5 % co-solvente):

| Concentração | 50 °C / 5 % co-solvente | | | | | |
|--------------|-------------------------|--------|--------------------------|------------------|--------|-------------------------|
| | 150 bar | | | 250 bar | | |
| | Absorbância [nm] | % | Eq. Reta | Absorbância [nm] | % | Eq. Reta |
| 0 | 0,2958 | 100,00 | | 0,2909 | 100,00 | |
| 2 | 0,2686 | 90,80 | | 0,2870 | 98,66 | |
| 4 | 0,2309 | 78,06 | | 0,2511 | 86,32 | |
| 6 | 0,2039 | 68,93 | | 0,2319 | 79,72 | |
| 10 | 0,1639 | 55,41 | $y = - 3,1946x + 93,298$ | 0,2029 | 69,75 | $y = - 2,950x + 99,554$ |
| 12 | 0,1535 | 51,89 | | 0,1798 | 61,81 | |
| 14 | 0,1360 | 45,98 | | 0,1561 | 53,66 | |
| 18 | 0,1170 | 39,55 | | 0,1392 | 47,85 | |
| 20 | 0,1015 | 34,31 | | 0,1293 | 44,45 | |

Tabela C.4.4. Determinação da Atividade Antioxidante referente à PB-6 (T=50 °C; P=150 bar; 15 % co-solvente), PB-8 (T=50 °C; P=250 bar; 15 % co-solvente):

| Concentração | 50 °C / 15 % co-solvente | | | | | |
|--------------|--------------------------|--------|--------------------------|------------------|--------|--------------------------|
| | 150 bar | | | 250 bar | | |
| | Absorbância [nm] | % | Eq. Reta | Absorbância [nm] | % | Eq. Reta |
| 0 | 0,2944 | 100,00 | | 0,3025 | 100,00 | |
| 2 | 0,2823 | 95,89 | | 0,2529 | 83,60 | |
| 4 | 0,2554 | 86,75 | | 0,2287 | 75,60 | |
| 6 | 0,2348 | 79,76 | | 0,1923 | 63,57 | |
| 10 | 0,1992 | 67,66 | $y = - 2,6986x + 98,533$ | 0,1570 | 51,90 | $y = - 3,1612x + 89,623$ |
| 12 | 0,2020 | 68,61 | | 0,1423 | 47,04 | |
| 14 | 0,1746 | 59,31 | | 0,1367 | 45,19 | |
| 18 | 0,1484 | 50,41 | | 0,1104 | 36,50 | |
| 20 | 0,1364 | 46,33 | | 0,0948 | 31,34 | |

Tabela C.4.5. Determinação da Atividade Antioxidante referente à PB-9 F1 e PB-9 F2 (T=35 °C; P=200 bar; 10 % co-solvente):

| Concentração | 35 °C /200 bar/ 15 % co-solvente | | | | | |
|--------------|----------------------------------|--------|--------------------------|------------------|--------|--------------------------|
| | Fração 1 | | | Fração 2 | | |
| | Absorbância [nm] | % | Eq. Reta | Absorbância [nm] | % | Eq. Reta |
| 0 | 0,3151 | 100,00 | | 0,2996 | 100,00 | |
| 2 | 0,2870 | 91,08 | | 0,2731 | 91,15 | |
| 4 | 0,2533 | 80,39 | | 0,2373 | 79,21 | |
| 6 | 0,2315 | 73,47 | | 0,2208 | 73,70 | |
| 10 | 0,2059 | 65,34 | $y = - 2,8975x + 94,769$ | 0,1879 | 62,72 | $y = - 2,9201x + 94,421$ |
| 12 | 0,1764 | 55,98 | | 0,1673 | 55,84 | |
| 14 | 0,1641 | 52,08 | | 0,1559 | 52,04 | |
| 18 | 0,1443 | 45,79 | | 0,1342 | 44,79 | |
| 20 | 0,1248 | 39,61 | | 0,1175 | 39,22 | |

Tabela C.4.6. Determinação da Atividade Antioxidante referente à PB-9 F3 e PB-9 F4 (T=35 °C; P=200 bar; 10 % co-solvente):

| Concentração | 35 °C /200 bar/ 15 % co-solvente | | | | | |
|--------------|----------------------------------|--------|--------------------------|------------------|--------|--------------------------|
| | Fração 3 | | | Fração 4 | | |
| | Absorbância [nm] | % | Eq. Reta | Absorbância [nm] | % | Eq. Reta |
| 0 | 0,3018 | 100,00 | | 0,3024 | 100,00 | |
| 2 | 0,2694 | 89,26 | | 0,2846 | 94,11 | |
| 4 | 0,2428 | 80,45 | | 0,2603 | 86,08 | |
| 6 | 0,2224 | 73,69 | | 0,2327 | 76,95 | |
| 10 | 0,1789 | 59,28 | $y = - 3,0374x + 93,949$ | 0,1826 | 60,38 | $y = - 3,1027x + 97,464$ |
| 12 | 0,1559 | 51,66 | | 0,1708 | 56,48 | |
| 14 | 0,1507 | 49,93 | | 0,1620 | 53,57 | |
| 18 | 0,1226 | 40,62 | | 0,1279 | 42,29 | |
| 20 | 0,1190 | 39,43 | | 0,1224 | 40,48 | |

Tabela C.4.7. Determinação da Atividade Antioxidante referente à PB-9 F5 e PB-9 F6 (T=35 °C; P=200 bar; 10 % co-solvente):

| Concentração | 35 °C /200 bar/ 15 % co-solvente | | | | | |
|--------------|----------------------------------|--------|--------------------------|------------------|--------|--------------------------|
| | Fração 5 | | | Fração 6 | | |
| | Absorbância [nm] | % | Eq. Reta | Absorbância [nm] | % | Eq. Reta |
| 0 | 0,3348 | 100,00 | | 0,2810 | 100,00 | |
| 2 | 0,2819 | 84,20 | | 0,2361 | 84,02 | |
| 4 | 0,2559 | 76,43 | | 0,2238 | 79,64 | |
| 6 | 0,2286 | 68,28 | | 0,2095 | 74,56 | |
| 10 | 0,2007 | 59,95 | $y = - 3,2435x + 91,988$ | 0,1867 | 66,44 | $y = - 2,7146x + 92,516$ |
| 12 | 0,1683 | 50,27 | | 0,1550 | 55,16 | |
| 14 | 0,1454 | 43,43 | | 0,1473 | 52,42 | |
| 18 | 0,1147 | 34,26 | | 0,1243 | 44,23 | |
| 20 | 0,1076 | 32,14 | | 0,120 | 42,70 | |

Tabela C.4.8. Determinação da Atividade Antioxidante referente à PB-9 F7 e PB-9 F8 (T=35 °C; P=200 bar; 10 % co-solvente):

| Concentração | 35 °C /200 bar / 10 % co-solvente | | | | | |
|--------------|-----------------------------------|--------|--------------------------|------------------|--------|--------------------------|
| | Fração 7 | | | Fração 8 | | |
| | Absorbância [nm] | % | Eq. Reta | Absorbância [nm] | % | Eq. Reta |
| 0 | 0,3071 | 100,00 | | 0,3298 | 100,00 | |
| 2 | 0,2892 | 94,17 | | 0,2797 | 84,81 | |
| 4 | 0,2438 | 79,39 | | 0,2512 | 76,17 | |
| 6 | 0,2024 | 65,91 | | 0,1876 | 56,88 | |
| 10 | 0,1404 | 45,72 | $y = - 4,2338x + 96,167$ | 0,1385 | 42,00 | $y = - 3,9431x + 90,333$ |
| 12 | 0,1271 | 41,39 | | 0,1269 | 38,48 | |
| 14 | 0,1031 | 33,57 | | 0,1130 | 34,26 | |
| 18 | 0,0693 | 22,57 | | 0,0739 | 22,41 | |
| 20 | 0,0574 | 18,69 | | 0,0623 | 18,89 | |

Tabela C.4.9. Determinação da Atividade Antioxidante referente à PB-10 (T=20 °C; P=150 bar; 0 % co-solvente), PB-12 (T=20 °C; P=250 bar; 0 % co-solvente):

| Concentração | 20 °C / 0 % co-solvente | | | | | |
|--------------|-------------------------|--------|-------------------------|------------------|--------|-------------------------|
| | 150 bar | | | 250 bar | | |
| | Absorbância [nm] | % | Eq. Reta | Absorbância [nm] | % | Eq. Reta |
| 0 | 0,3089 | 100,00 | | 0,3004 | 100,00 | |
| 2 | 0,2960 | 95,82 | | 0,2774 | 92,34 | |
| 4 | 0,2199 | 71,19 | | 0,2743 | 91,31 | |
| 6 | 0,3270 | 105,86 | | 0,2382 | 79,29 | |
| 10 | 0,2265 | 73,32 | $y = -2,1429x + 98,143$ | 0,2206 | 73,44 | $y = -2,4916x + 98,095$ |
| 12 | 0,2128 | 68,89 | | 0,1988 | 66,18 | |
| 14 | 0,2048 | 66,30 | | 0,1850 | 61,58 | |
| 18 | 0,1945 | 62,97 | | 0,1630 | 54,26 | |
| 20 | 0,1688 | 54,65 | | 0,1507 | 50,17 | |

Tabela C.4.10. Determinação da Atividade Antioxidante referente à PB-11 (T=50 °C; P=150 bar; 0 % co-solvente), PB-13 (T=50 °C; P=250 bar; 0 % co-solvente):

| Concentração | 50 °C / 0 % co-solvente | | | | | |
|--------------|-------------------------|--------|-------------------------|------------------|--------|-------------------------|
| | 150 bar | | | 250 bar | | |
| | Absorbância [nm] | % | Eq. Reta | Absorbância [nm] | % | Eq. Reta |
| 0 | 0,3363 | 100,00 | | 0,2909 | 100,00 | |
| 2 | 0,3077 | 91,50 | | 0,2870 | 98,66 | |
| 4 | 0,2832 | 84,21 | | 0,2511 | 86,32 | |
| 6 | 0,2902 | 86,29 | | 0,2319 | 79,72 | |
| 10 | 0,2658 | 79,04 | $y = -1,6985x + 95,836$ | 0,2029 | 69,75 | $y = -2,9508x + 99,554$ |
| 12 | 0,2510 | 74,64 | | 0,1798 | 61,81 | |
| 14 | 0,2461 | 73,18 | | 0,1561 | 53,66 | |
| 18 | 0,2191 | 65,15 | | 0,1392 | 47,85 | |
| 20 | 0,2100 | 62,44 | | 0,1293 | 44,45 | |

ANEXO D – PADRÕES PARA A PRÓPOLIS E EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS DO MINISTÉRIO DA AGRICULTURA

D.1 Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis (ANEXO VI)

1. Alcance

1.1 Objetivo: Estabelecer a identidade e os requisitos mínimos de qualidade a que deve atender a Própolis.

1.2 âmbito de Aplicação: O presente Regulamento refere-se à Própolis destinada ao comércio nacional ou internacional.

2. Descrição

2.1 Definição: entende-se por Própolis o produto oriundo de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas, colhidas pelas abelhas, de brotos, flores e exudados de plantas, nas quais as abelhas acrescentam secreções salivares, cera e pólen para a elaboração final do produto.

2.2 Classificação

2.2.1 Quanto ao teor de flavonóides:

2.2.1.1 A própolis será classificada em:

- Baixo teor: até 1,0 % (m/m);
- Médio teor: >1,0 % - 2,0 % (m/m);
- Alto teor: > 2,0 % (m/m)

2.3 Designação (Denominação de Venda): Própolis

3. Referências:

- ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. Normas ABNT. Plano de Amostragem e Procedimentos na Inspeção por atributos- 03.011 - NBR 5426 - JAN/1985.
- AOAC. Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemists. Arlington, , 1992.

-
- AOAC. Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemists, 16 th Edition, cap. 4.1.03, 1995.
 - ASIS, M. Propoleo - El Oro Purpura de las Abejas. Cuba, 1989.
 - BRASIL. Código de Defesa do Consumidor. Lei nº 8.078, de 11 de Setembro de 1990.
 - BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria nº 368, de 04/09/97 - Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Elaboração para Estabelecimentos Elaboradores / Industrializadores de Alimentos, 1997.
 - BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Resolução GMC 36/93 - Mercosul, Portaria nº. 371, de 04/09/97 - Regulamento técnico para Rotulagem de Alimentos.
 - BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria 001, de 07 de outubro de 1981. Métodos Analíticos Oficiais para Controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes: Métodos Físico-Químicos, Cap. 2, p. 3, met. 3, 1981.
 - BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Programa Nacional de Controle de Resíduos Biológicos. Instrução Normativa n. 3 de 22 de Janeiro de 1999.
 - BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria 248, de 30 de dezembro de 1998, publicada no DOU de 05 de janeiro de 1999. Estabelece o Método Oficial para Detecção de Paenibacillus larvae em Mel e Produtos Apícolas.
 - BRASIL. Ministério da Saúde. Padrões Microbiológicos. Portaria nº 451, de 19/09/97 - Publicada no DOU de 02/07/98.
 - BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997 - Publicada no DOU de 28 de outubro de 1997. Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares - definições, classificação e emprego.
 - BRASIL. RIISPOA - Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952.
 - FAO/OMS. Organización de las Naciones unidas para la Agricultura y la Alimentación. Codex Alimentarius, CAC/vol. A, 1985.
 - Farmacopéia Brasileira, 4ª Edição, p. 988, 1977 (Método Modificado).

- ICMSF - Microorganismus in foods. 2. Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications. University of Toronto. Press, 1974.
- ICMSF. Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods, 1992.
- WOISKY, R.G.R. Métodos de Controles químicos de Amostras de Própolis. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, 1996.

4. Composição e Requisitos

4.1. Composição: A Própolis compõem-se basicamente de resinas, produtos balsâmicos, cera, óleos essenciais, pólen e microelementos.

4.2. Características Sensoriais:

4.2.1. Aroma: característico (balsâmico e resinoso) dependendo da origem botânica;

4.2.2. Cor: amarelada, parda, esverdeada, marrom e outras, variando conforme a origem botânica;

4.2.3. Sabor: característico de suave balsâmico a forte e picante, dependendo da origem botânica;

4.2.4. Consistência (à temperatura ambiente): maleável a rígida, dependendo da origem botânica;

4.2.5. Granulometria: heterogênea.

4.3. Requisitos físico-químicos:

4.3.1. Perda por dessecação: máximo de 8 % (m/m);

4.3.2. Cinzas: máximo de 5% (m/m);

4.3.3. Cera: máximo de 25 % (m/m);

4.3.4. Compostos Fenólicos: mínimo 5 % (m/m);

4.3.5. Flavonóides: mínimo de 0,5 % (m/m);

4.3.6. Atividade de oxidação: máximo de 22 segundos;

4.3.7. Massa Mecânica : máximo 40% (m/m);

4.3.8. Solúveis em Etanol : mínimo de 35% (m/m).

4.4. Provas Qualitativas:

4.4.1. Espectro de Absorção de Radiações Ultravioleta e Visível - a própolis deverá apresentar picos característicos das principais classes de flavonóides entre 200 e 400 nm;

4.4.2. Acetato de chumbo - Positivo;

4.4.3. Hidróxido de Sódio - Positivo.

4.4. Acondicionamento: O produto deverá ser embalado com materiais adequados para as condições de armazenamento e que lhe confirmam uma proteção apropriada contra a contaminação.

5. Aditivos

Não se autoriza.

6. Contaminantes

Os contaminantes orgânicos e inorgânicos não devem estar presentes em quantidades superiores aos limites estabelecidos pelo Regulamento específico.

6.1. Outros contaminantes: Pesquisa de esporos de *Paenibacillus larvae* em 25g de própolis (utilizando a metodologia descrita na Portaria 248, de 30/12/1998). Resultado Aceitável: ausência de esporos em 25g.

7. Higiene

7.1. Considerações Gerais: As práticas de higiene para elaboração do produto devem estar de acordo com o estabelecido na Portaria nº 368, de 04/09/97 - Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Elaboração para Estabelecimentos Elaboradores/Industrializadores de Alimentos - Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Brasil.

7.2. Critérios Macroscópicos e Microscópicos: O produto não deve conter substâncias estranhas, com exceção dos fragmentos, acidentalmente presentes, de: abelhas, madeira, vegetais e outros, inerentes ao processo de obtenção da própolis pelas abelhas.

Nota: Os critérios de tolerância, macro e microscópicos, serão estabelecidos em regulamento específico.

7.3. Critérios Microbiológicos: Aplica-se o Regulamento Específico.

8. Pesos e Medidas

Aplica-se o Regulamento específico.

9. Rotulagem

Aplica-se o Regulamento específico.

10. Métodos de Análise

Farmacopéia Brasileira 4ª Edição - 1988 - V 2.9 e V 2.10.

Métodos Analíticos Oficiais para Controle de Produto de Origem Animal e seus Ingredientes. Portaria nº 001/81 - 07/10/1981. Ministério da Agricultura e do Abastecimento.

Metodologias validadas pelo Ministério da Agricultura.

Métodos de Análise Microbiológica para Alimentos. Pesquisa de Paenibacillus larvae em mel e produtos apícolas. Portaria 248 - 30/12/1998. Ministério da Agricultura e do Abastecimento.

11. Amostragem

Seguem-se os procedimentos recomendados na norma vigente.

D.1 Regulamento de identidade e qualidade de extratos própolis (ANEXO VI)

1. Alcance

1.1. Objetivo: Estabelecer a identidade e os requisitos mínimos de qualidade a que deve atender o Extrato de Própolis.

1.2. Âmbito de Aplicação: O presente Regulamento refere-se ao Extrato de Própolis destinado ao comércio nacional ou internacional.

2. Descrição

2.1. Definição: Entende-se por Extrato de Própolis o produto proveniente da extração dos componentes solúveis da Própolis em álcool neutro (grau alimentício), por processo tecnológico adequado.

2.2. Designação (Denominação de Venda): Extrato de Própolis.

3. Referências:

- ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. Normas ABNT. Plano de Amostragem e Procedimentos na Inspeção por atributos- 03.011 - NBR 5426 - JAN/1985.
- AOAC. Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemists. Arlington, , 1992.
- AOAC. Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemists, 16 th Edition, cap. 4.1.03, 1995.
- ASIS, M. Propoleo - El Oro Purpura de las Abejas. Cuba, 1989
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria nº 368, de 04/09/97 - Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Elaboração para Estabelecimentos Elaboradores / Industrializadores de Alimentos, 1997.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Resolução GMC 36/93 - Mercosul, Portaria nº. 371, de 04/09/97 - Regulamento técnico para Rotulagem de Alimentos.

-
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria 001, de 07 de outubro de 1981. Métodos Analíticos Oficiais para Controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes: Métodos Físico-Químicos, Cap. 2, p. 3, met. 3, 1981.
 - BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Programa Nacional de Controle de Resíduos Biológicos. Instrução Normativa n. 3 de 22 de Janeiro de 1999.
 - BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria 248, de 30 de dezembro de 1998, publicada no DOU de 05 de janeiro de 1999. Estabelece o Método Oficial para Detecção de *Paenibacillus larvae* em Mel e Produtos Apícolas.
 - BRASIL. Ministério da Saúde. Padrões Microbiológicos. Portaria nº 451 de 19/09/97 - Publicada no DOU de 02/07/98.
 - BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997 - Publicada no DOU de 28 de outubro de 1997. Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares - definições, classificação e emprego.
 - BRASIL. RIISPOA - Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952.
 - BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria SIPA no. 06/84. Normas Higiênico-Sanitárias e Tecnológicas para Mel, Cera de Abelhas e Derivados.
 - FAO/OMS. Organización de las Naciones unidas para la Agricultura y la Alimentación. Codex Alimentarius, CAC/vol. A, 1985.
 - Farmacopéia Brasileira, 4ª Edição, p. 988, 1977 (Método Modificado)
 - ICMSF - Microorganism in foods. 2. Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications. University of Toronto. Press, 1974.
 - ICMSF. Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods, 1992.

4. Composição e Requisitos

4.1. Composição: O extrato de Própolis compõe-se de elementos solúveis da própolis em solução hidroalcoólica, álcool e água.

4.2. Requisitos:

4.2.1. Características Sensoriais:

4.2.1.1. Aroma: característico, dependendo da origem botânica (balsâmico e resinoso);

4.2.1.2. Cor: variada, dependendo da origem e da concentração (tons de âmbar, avermelhada e esverdeada);

4.2.1.3. Sabor: característico, de suave a forte, amargo e picante;

4.2.1.4. Aspecto: líquido límpido e homogêneo.

4.2.2. Requisitos Físico-Químicos:

4.2.2.1. Extrato seco: Mínimo de 11% (m/v);

4.2.2.2. Cera: máximo 1% do extrato seco (m/m);

4.2.2.3. Compostos flavonóides: Mínimo 0,25%(m/m);

4.2.2.4. Compostos fenólicos: Mínimo 0,50% (m/m);

4.2.2.5. Atividade de oxidação: Máximo 22 seg.;

4.2.2.6. Teor alcoólico: Máximo de 70o GL (v/v);

4.2.2.7. Metanol: Máximo 0,40 mg/l;

4.2.2.8. Espectro de Absorção de Radiações UV visível: o extrato de própolis deve apresentar picos característicos das principais classes de flavonóides entre 200 nm e 400 nm;

4.2.2.9. Acetato de Chumbo: Positivo;

4.2.2.10. Hidróxido de Sódio: Positivo.

4.2.3. Acondicionamento: Deverá ser embalado em material bromatologicamente apto e que confira ao produto uma proteção adequada.

5. Aditivos

Não se admite.

6. Contaminantes

Os contaminantes orgânicos e inorgânicos não devem estar presentes em quantidades superiores aos limites estabelecidos pelo Regulamento vigente.

6.1. Outros contaminantes: Pesquisa de esporos de *Paenibacillus larvae* em 25ml de extrato de própolis (utilizando a metodologia descrita na Portaria 248, de 30/12/1998). Resultado Aceitável: ausência de esporos em 25ml.

7. Higiene

7.1. Considerações Gerais: As práticas de higiene para elaboração do produto devem estar de acordo com o Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Elaboradores / Industrializadores de Alimentos.

7.2. Critérios Macroscópicos: O produto não deverá conter matérias estranhas, de qualquer natureza.

7.3. Critérios Microscópicos: O produto não deverá conter matérias estranhas, de qualquer natureza.

8. Pesos e Medidas

Aplica-se o Regulamento específico.

9. Rotulagem

Aplica-se o Regulamento específico, com a seguinte informação adicional - Extrato Seco: mínimo de ...%.

10. Métodos de Análise

Métodos Analíticos Oficiais para Controle de Qualidade;

Metodologias validadas pelo Ministério da Agricultura;

Métodos de Análise Microbiológica para Alimentos. Pesquisa de *Paenibacillus larvae* em mel e produtos apícolas. Portaria 248 - 30/12/1998. Ministério da Agricultura e do Abastecimento.

11. Amostragem

Seguem-se os procedimentos recomendados pela norma vigente (ABNT).