



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
LABORATÓRIO DE ANÁLISES DE MEDICAMENTOS E ALIMENTOS

RELATÓRIO DE ANÁLISE

Campo 1 – Identificação Geral

1. Número de Protocolo: 010/2022
2. Modalidade de Análise: Laudo de Orientação
3. Nome do Produto: Extrato de Própolis Vermelha – Rubee Apis
4. Data da Produção: Lote 27102022 (outubro/2022)
5. Data de Validade: **não informado**
6. Empresa responsável pelo bioproduto: Rubee Apis
7. Endereço: R. Caribé - Maragogi, AL, 57955-000.
CNPJ-MF : **Não informado**
8. Requerente da Análise: Juliana Cecchetto – Diretora de Qualidade
9. Pessoa de Contato: Juliana Cecchetto
10. Hora e Data de Entrada da Amostra: 10:00h de 27/10/2022
11. Descrição da Amostra: 01 amostra de matéria-prima própolis vermelha de Alagoas, em quantidade de 30g, embalada em caixa dos correios de papelão, acondicionada em embalagem saco plástico hermético característica de matéria-prima. Amostra 01 com o código **Rubee Apis M-P 1 PVA**.
12. Estocagem: A amostra foi identificada pelo laboratório como **Rubee Apis M-P 1 PVA** estocada no laboratório a temperatura ambiente até o momento da análise.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
LABORATÓRIO DE ANÁLISES DE MEDICAMENTOS E ALIMENTOS

RELATÓRIO DE ANÁLISE

2. Descrição dos Ensaiois

2.1. Identificação e processamento da amostra de Matéria-Prima de Própolis Vermelha da empresa Rubee Apis

- a) Amostra: Matéria-Prima de Própolis Vermelha (matéria-prima PVA)
- b) Procedência: Rubee Apis/Maragogi/Alagoas
- c) Data de recebimento: 27/10/2022
- d) Data do início do processamento das amostras: 26/12/2022 a 29/12/2022 e 09/01/2023 e 11/01/2023.
- e) Elaboração do Laudo: 23/02/2023
- f) Amostra ensaiada: **Rubee Apis M-P 1 PVA**

2.2 – Extração dos flavonóides da Matéria-Prima Rubee Apis M-P 1 PVA

Uma quantidade de 5 gramas da amostra foi pesada em balança analítica, fracionada em pequenos pedaços menores e submetida a um processo rápido de extração com etanol 70°GL por maceração e agitação com bastão de vidro a cada 30 minutos durante 3 horas. A amostra ficou em repouso por 1 hora. O extrato formado (líquido vermelho) após 4 horas de maceração no etanol 70°GL foi submetido a filtração em papel de filtro e em seguida o extrato foi filtrado em unidades filtrantes 0,22 µm e transferido para vials HPLC. Para ser submetido a ensaio de identificação dos flavonóides da própolis vermelha de Alagoas pelo método aqui desenvolvido e validado para identificação e quantificação.

2.3 Determinação da massa sólida solúvel da Matéria-Prima Rubee Apis M-P 1 PVA

A determinação da massa sólida solúvel não foi realizada pois no período de final de ano outros laboratórios estavam fechados para uso da balança de determinação de massa sólida solúvel.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
LABORATÓRIO DE ANÁLISES DE MEDICAMENTOS E ALIMENTOS

RELATÓRIO DE ANÁLISE

- 2.3. Análise de identificação e teor de isoflavonóides da própolis vermelha de Alagoas por UPLC-DAD
- a) Padrões analíticos utilizados: Usou-se 7 padrões analíticos da sigma-aldrich. Sendo eles: Daidzeína, Liquiritigenina, Pinobanksina, Isoliquiritigenina, formononetina, pinocembrina e biochanina A.
 - b) Pesou-se 5mg de cada padrão e transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL, solubilizando cada amostra com metanol grau HPLC.
 - c) Curva de calibração dos padrões analíticos: Solução estoque 500 µg/mL de cada padrão foi preparado em metanol e diluído para concentrações entre 0,15 µg/mL, 0,50 µg/mL, 1,00 µg/mL, 2,50 µg/mL, 5,00 µg/mL e 7,50 µg/mL também com metanol para obter as respostas no UPLC-DAD e ensaios de adequabilidade, precisão, exatidão e linearidade de resposta.
 - d) Preparação: 1mL do extrato de própolis vermelha (amostra piloto experimental comercial) foi diluído com etanol para balão volumétrico de 10 mL (solução estoque), em seguida uma segunda diluição foi realizada tomando-se 460µL da solução estoque e transferindo-se para outro balão volumétrico de 10mL e completando o volume com etanol, para ser injetada no UPLC-DAD. A amostra foi diluída em unidade filtrante de 0,22µm e transferida para vials HPLC de 2 mL. Foi injetado 2 µL da amostra.
 - e) Método de Ensaio de identificação dos isoflavonóides e flavonoides: UPLC-DAD
 - a. Coluna cromatográfica: C₁₈ (150 x 4.6 mm; 5µm) Kinitex da phenomenex
 - b. λ Max: 249, 260, 275, 281, 289, 291, 366nm. Temperatura da coluna: 33°C
 - c. Fase móvel: água milliQ:acetonitrila
 - d. Modo Gradiente: 30% de água: 70% de acetonitrila no tempo 0 minutos e 100 % de acetonitrila em 40 minutos. O modo gradiente volta a condição inicial em 47 minutos.
 - e. Volume de injeção: 2µL com sistema de autoinjeção.
 - f. Tempo de análise: 47 minutos.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
LABORATÓRIO DE ANÁLISES DE MEDICAMENTOS E ALIMENTOS
RELATÓRIO DE ANÁLISE

3. Resultados dos Ensaios

3.1 Identificação dos isoflavonóides/flavonóides da própolis vermelha usando UPLC-DAD

O método UPLC-DAD foi previamente validado e obteve-se boa linearidade, boa precisão e boa exatidão com valores de variabilidade menor que 10% (<10%). Os dados são mostrados a seguir:

Tabela 1- Dados de precisão da curva de calibração dos 7 flavonóides presentes na própolis vermelha de Alagoas

Concentração	1	2	3	4	5	6	7
0,150 µg/mL	0,163±0,40	-	0,165±2,65	-	-	0,170±6,02	0,141±4,65
0,500 µg/mL	0,530±1,03	-	0,543±1,38	-	-	0,515±0,47	0,515±0,80
1,000 µg/mL	0,988±0,41	0,970±0,53	1,018±0,69	0,975±1,03	0,978±0,71	0,947±0,77	0,993±0,12
2,500 µg/mL	2,518±4,94	2,460±0,05	-	2,386±0,58	2,400±5,07	2,516±0,61	-
5,000 µg/mL	5,233±0,29	4,786±0,26	-	4,688±0,12	4,786±0,27	-	-
7,500 µg/mL	-	7,654±0,864	-	7,740±0,409	7,672±0,004	-	-

1) Daidzeína; 2) Liquiritigenina; 3) Pinobanksina; 4) Isoliquiritigenina; 5) Formononetina; 6) pinocembrina;
7) Biochanina A

Tabela 2- Dados de exatidão da curva de calibração dos 7 flavonóides presentes na própolis vermelha de Alagoas

Concentração	1	2	3	4	5	6	7
0,150 µg/mL	8,4252	-	9,9444			13,3919	-6,1582
0,500 µg/mL	6,1036	-	8,7107			3,1020	3,1418
1,000 µg/mL	-1,1623	-3,0016	1,8103	-2,4659	-2,1824	-5,2190	-0,6460
2,500 µg/mL	0,7463	-1,6520		-4,5581	-4,0422	0,6605	
5,000 µg/mL	4,6789	-4,2783		-6,2376	-4,2687		
7,500 µg/mL	-	2,0647		3,2068	2,2997		

1) Daidzeína; 2) Liquiritigenina; 3) Pinobanksina; 4) Isoliquiritigenina; 5) Formononetina; 6) pinocembrina;
7) Biochanina A



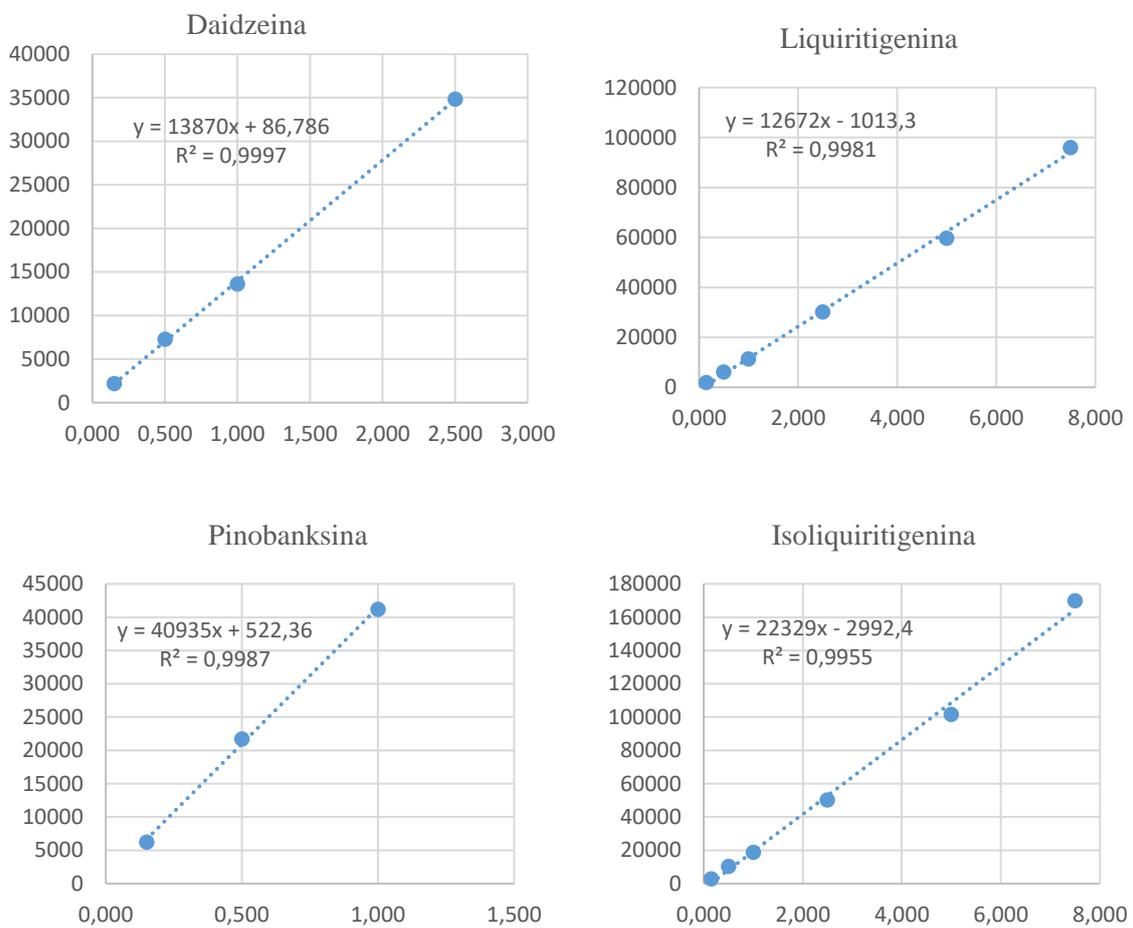
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

LABORATÓRIO DE ANÁLISES DE MEDICAMENTOS E ALIMENTOS

RELATÓRIO DE ANÁLISE

Figura 1 – Curva de calibração dos padrões analíticos daidzeína, liquiritigenina, pinobanksina e isoliquiritigenina.





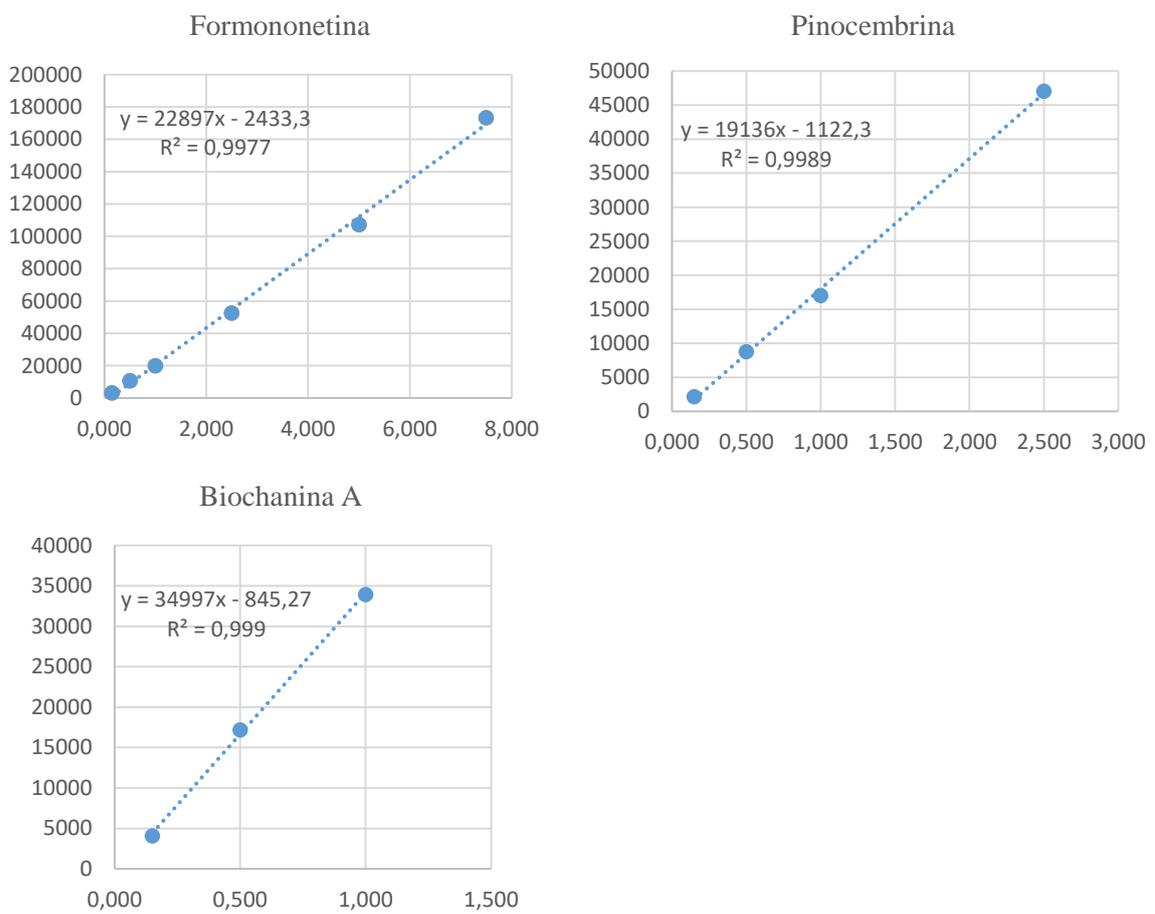
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

LABORATÓRIO DE ANÁLISES DE MEDICAMENTOS E ALIMENTOS

RELATÓRIO DE ANÁLISE

Figura 2 – Curva de calibração dos padrões analíticos formononetina, pinocembrina e Biochanina A.





UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
LABORATÓRIO DE ANÁLISES DE MEDICAMENTOS E ALIMENTOS
RELATÓRIO DE ANÁLISE

3.1 Identificação dos isoflavonóides/flavonoides da própolis vermelha usando UPLC-DAD

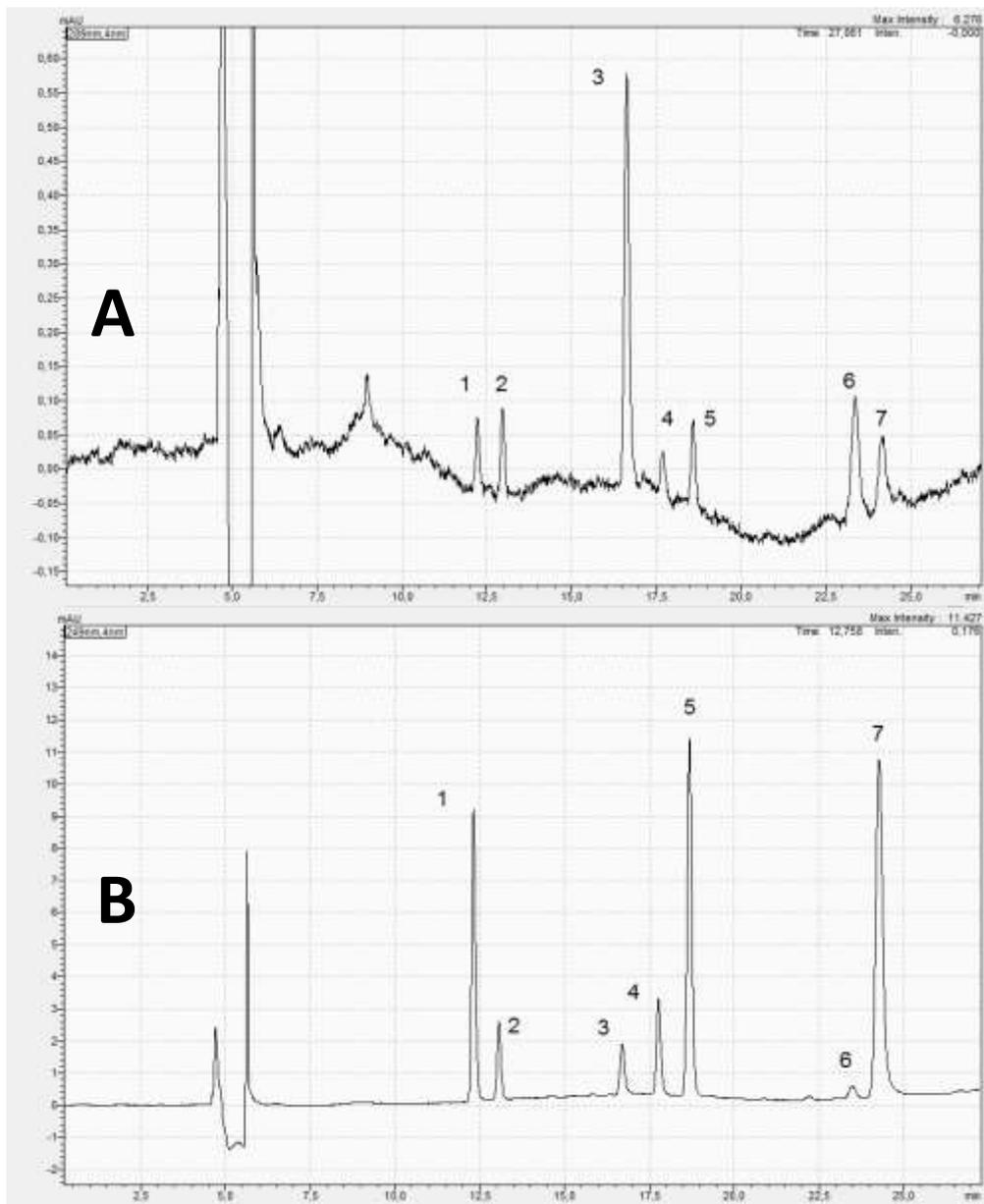


Figura 3 – Cromatograma dos padrões analíticos 1) Daidzeína; 2) Liquiritigenina; 3) Pinobanksina; 4) Isoliquiritigenina; 5) Formononetina; 6) pinocembrina; 7) Biochanina A da própolis vermelha de Alagoas na concentração de 0,150 µg/mL (289nm) (A) e 7,50 µg/mL (249nm) (B).



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
LABORATÓRIO DE ANÁLISES DE MEDICAMENTOS E ALIMENTOS
RELATÓRIO DE ANÁLISE

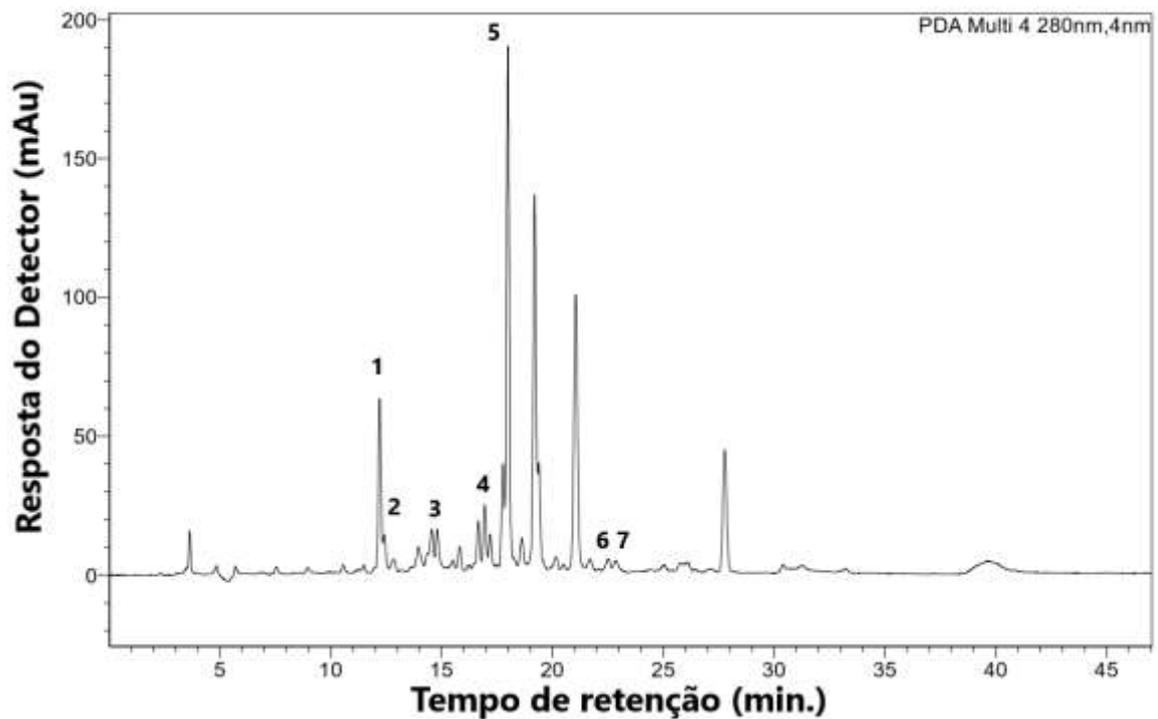


Figura 4 – Cromatograma do Extrato obtido da Matéria-Prima de Própolis Vermelha **Rubee Apis (Rubee Apis M-P 1 PVA)** em concentração não definida. O equipamento foi monitorado nos comprimentos de onda de 280 nm (cromatograma de visualização). Identificação de 1) Liquiritigenina (275 nm); 2) Daidzeína (249 nm); 3) Pinobanksina (291 nm); 4) Isoliquiritigenina (366 nm); 5) Formononetina (249 nm); 6) pinocembrina (289 nm); 7) Biochanina A (260 nm) no extrato de própolis vermelha de Alagoas da **Rubee Apis**.

3.2 Determinação do teor dos flavonoides e isoflavonóides identificados por UPLC-DAD

As análises foram realizadas tomando-se como base as especificações de referência do MAPA (instrução normativa 02/2001) em que os extratos de própolis devem conter uma massa sólida mínima (extrato seco) de 11% em solução hidroalcoólica.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

LABORATÓRIO DE ANÁLISES DE MEDICAMENTOS E ALIMENTOS

RELATÓRIO DE ANÁLISE

Tabela 3 – Determinação da concentração ($\mu\text{g/mL}$) dos flavonoides da própolis vermelha na amostra **Rubee Apis M-P 1 PVA** da empresa **Rubee Apis** recebida em **27/10/2022** submetida a processo de extração rápido por maceração com coleta de alíquota filtrada e injetada sem diluição no UPLC-DAD em concentração não definida. A amostra apresentava-se super-concentrada.

Amostra	FLAVONÓIDE DETERMINADO						
	1	2	3	4	5	6	7
Rubee Apis M-P 1 PVA	47,727	15,209	5,192	57,672	37,988	3,419	4,105
Rubee Apis M-P 1 PVA	47,728	15,210	5,192	57,688	38,010	3,420	4,108
MÉDIA	47,727	15,209	5,192	57,680	37,999	3,420	4,106
Desvio padrão	0,000	0,000	0,000	0,011	0,015	0,001	0,002
%CV	0,000	0,003	0,006	0,019	0,040	0,016	0,053

1) Liquiritigenina; 2) Daidzeína; 3) Pinobanksina; 4) Isoliquiritigenina; 5) Formononetina; 6) Pinocebrina 7) Biochanina A

4. Análise Crítica dos Resultados

Os resultados apresentados neste relatório têm caráter orientacional para ensaios de características de identificação e teor dos isoflavonóides/flavonoides que atestam a identidade da própolis vermelha. O ensaio de identificação aqui apresentado tem caráter de ensaio específico para identificar os flavonoides e isoflavonóides específicos da própolis vermelha.

Os resultados obtidos por técnica moderna de UPLC-DAD mostram a autenticidade da amostra de extrato de própolis vermelha **Rubee Apis M-P 1 PVA** obtida da matéria-prima de própolis vermelha da **empresa Rubee Apis** recebida em 27 de outubro de 2022 e analisada entre dezembro de 2022 e janeiro de 2023 com emissão de laudo em fevereiro de 2023. Foram identificados 7 marcadores (daidzeína, liquiritigenina, pinobanksina, isoliquiritigenina, formononetina, pinocebrina e Biochanina A) já citados na literatura científica como presentes na própolis vermelha de Alagoas.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
LABORATÓRIO DE ANÁLISES DE MEDICAMENTOS E ALIMENTOS
RELATÓRIO DE ANÁLISE

5. Conclusão

Satisfatória para a amostra Rubee Apis M-P 1 PVA. A amostra de Extrato de própolis vermelha **Rubee Apis M-P 1 PVA** da requisitante Juliana Cecchetto apresenta qualidade satisfatória para extrato de própolis vermelha baseado nas características organolépticas, químicas de solubilidade de própolis vermelha e das características do ensaio de UPLC-DAD-UV-Vis que identifica e quantifica marcadores químicos que comprovam a autenticidade da matéria-prima de Própolis Vermelha analisada.

Em, 23/02/2023

<p>Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento Coordenador do Laboratório de Análises farmacêutica e Alimentícia – LAFA Instituto de Ciências Farmacêuticas / UFAL</p>
--