

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

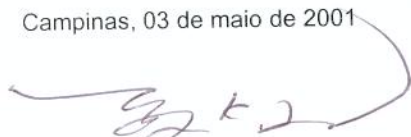
Masaharu Ikegaki

DETERMINAÇÃO DA QUALIDADE DE PRÓPOLIS DE *Apis mellifera*
AFRICANIZADA DA REGIÃO SUL DO BRASIL: AVALIAÇÃO DE
ALGUMAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DA
PRÓPOLIS

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Masaharu Ikegaki, aprovado pela Comissão Julgadora em 03 de maio de 2001.

Campinas, 03 de maio de 2001



Prof. Dr. Yong Kun Park
Presidente da Banca

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do grau de DOUTOR em Ciências de Alimentos.

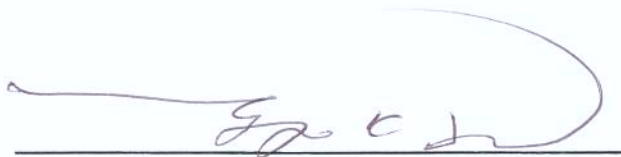
Orientador: Prof. Dr. Yong Kun Park

Faculdade de Engenharia de Alimentos
FEA – UNICAMP
2001



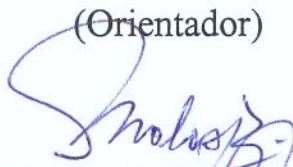
4964/11/01

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Yong Kun Park

(Orientador)



Prof. Dr. Osmar Malaspina
(Membro)



Profa. Dra. Hélia Harumi Sato
(Membro)



Profa. Dra. Helena Teixeira de Godoy
(Membro)



Profa. Dra. Hilary Castle de Menezes
(Membro)

Prof. Dr. Ademilson Espencer Egea Soares
(Membro)

Profa. Dra. Adilma Regina Pippa Scamparini
(Membro)

Campinas, de maio de 2001.

À DEUS

Que me concedeu o Dom da vida,
Que está presente em todos os momentos,
Mostrando sempre o melhor caminho a seguir.

Aos meus Pais e Irmãos,
Que sempre me incentivaram nesse caminho,
Sem jamais reclamarem da minha ausência.

À minha esposa Luciana,
Companheira inseparável, amiga de todas as horas,
Com quem compartilhei e continuarei compartilhando
todos os momentos da minha vida,

DEDICO

(...) Por isso, eu supliquei e a inteligência me foi dada. Invoquei, e o espírito da sabedoria veio até mim. Eu a preferi aos cetros e tronos e, em comparação com ela, considerei a riqueza como um nada. Não a comparei com a pedra mais preciosa, porque todo o ouro, ao lado dela, é como um punhado de areia. E junto dela, a prata vale o mesmo que um punhado de barro.

Amei a sabedoria mais do que a saúde e a beleza, e resolvi tê-la como luz, porque o brilho dela nunca se apaga. Com ela me vieram todos os bens, e em suas mãos existe riqueza incalculável. Gozei de todos esses bens, porque é a sabedoria que o traz, mas eu ignorava que fosse ela a mãe de todos eles.

Sem malícia, aprendi a sabedoria, e agora a distribuo sem inveja nenhuma. Não vou esconder sua riqueza, porque ela é um tesouro inesgotável para os homens. Aqueles que a adquirem, atraem a amizade de Deus, porque são recomendados pelo dom da instrução dela.

Deus me conceda falar com propriedade e pensar de forma correspondente aos dons que me foram dados, porque ele é o guia da sabedoria e o orientador dos sábios. Em seu poder estamos nós, as nossas palavras, a nossa inteligência e as nossas habilidades. Ele me concedeu o conhecimento exato de tudo o que existe, para eu compreender a estrutura do mundo e a propriedade dos elementos, o começo, o meio e o fim dos tempos, a alternância dos solstícios e as mudanças de estações, os ciclos do ano e a posição dos astros, a natureza dos animais e o instinto das feras, o poder dos espíritos e o raciocínio dos homens, a variedade das plantas e a propriedade das raízes. Aprendi tudo o que está oculto e tudo o que se pode ver, porque a sabedoria, artífice de todas as coisas, foi quem me ensinou.

(Sb 7, 7-21)

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Yong Kun Park pela orientação, apoio e incentivo durante todos estes anos de convívio, servindo de exemplo de dedicação à pesquisa,

À Profa. Dra. Hélia Harumi Sato pela amizade e apoio constante,

À Diretora, Profa. Dra Gláucia Maria Pastore, e ao pessoal Técnico-Administrativo da Faculdade de Engenharia de Alimentos e do Departamento de Ciência de Alimentos pela amizade durante todos esses anos,

Aos apicultores brasileiros, representados na pessoa do Dr. Paulo Gustavo Sommer, Ex-Presidente da Confederação Brasileira de Apicultura e exemplo de dedicação à apicultura, no auxílio à coleta das própolis,

À Sra. Leni Schause, ao Sr. Henrique Breyer e ao Sr. Fernando Borges de Assis, pelo carinho que me receberam e pela confiança depositada na realização deste trabalho,

Aos amigos Severino, Luciana Liboni, Ivanilton, Fabiana, Airton, Contado, Ila Maria, pelo companheirismo e amizade durante todo desenvolvimento do trabalho,

Aos (Às) companheiros (as) do Laboratório de Bioquímica de Alimentos pelo sorriso no decorrer de cada dia,

Aos colegas do Laboratório Geral pelo suporte técnico para a realização deste trabalho,

Ao Marcelo, a Biazinha e a Dora pelo carinho do dia-a-dia,

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudo,

A todos que, mesmo em pensamento, torceram pela realização deste trabalho.

UM AGRADECIMENTO ESPECIAL...

... para uma pessoa especial, que acompanhou de perto todo os momentos da minha passagem pela Pós-graduação. Uma pessoa que com o tempo se tornou amiga, namorada e, hoje, esposa. Alguém que jamais reclamou a minha ausência nos finais de semana e feriados. Sempre paciente e compreensiva, capaz de reavivar o animo com palavras carinhosas de apoio.

Não poderia deixar de dedicar essa página a você, Luciana, por tudo que fez e por tudo que continuaremos fazendo por nós.

ÍNDICE

RESUMO	1
SUMMARY	2
1. INTRODUÇÃO	3
2. OBJETIVO	6
3. MATERIAL E MÉTODOS	7
3.1. Coleta e Preparo da Amostra	7
3.2. Obtenção do Extrato Etanólico de Própolis (EEP)	7
3.3. Determinação Qualitativa dos Compostos Fenólicos Presentes nos Extratos Etanólicos de Própolis	8
3.3.1. Espectrofotometria na Região Ultravioleta-Visível (UV-Scanning)	8
3.3.2. Cromatografia em Camada Delgada de Alta Performance em Fase Reversa dos Extratos Etanólicos de Própolis	8
3.4. Determinação Quantitativa dos Compostos Fenólicos Presentes no Extrato Etanólico de Própolis	8
3.4.1. Determinação de Flavonóides Totais com Base em Quercetina	8
3.4.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa dos Extratos Etanólicos de Própolis	9
3.5. Determinação da Atividade Antimicrobiana dos Extratos Etanólicos de Própolis sobre Bactérias Patogênicas	10
3.6. Determinação da Atividade Antioxidante dos Extratos Etanólicos de Própolis	10
3.7. Determinação da Inibição da Atividade da Hialuronidase dos Extratos Etanólicos de Própolis	11
3.8. Determinação da Atividade Citotóxica <i>in vitro</i> dos Extratos Etanólicos de Própolis	11
3.9. Análise Estatística	12
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
4.1. Propriedades Organolépticas e Físico-químicas das amostras de própolis coletadas nos estados do Paraná e Rio Grande do Sul	13
4.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência dos Extratos Etanólicos de Própolis	21

4.3. Determinação de Flavonóides Totais com Base em Quercetina dos Extratos Etanólicos de Própolis	24
4.4. Determinação da Atividade Antimicrobiana dos Extratos Etanólicos de Própolis	27
4.5. Atividade Antioxidante dos Extratos Etanólicos de Própolis	30
4.6. Inibição da Atividade da Enzima Hialuronidase pelos Extratos Etanólicos de Própolis	32
4.7. Determinação da Atividade Citotóxica dos Extratos Etanólicos de Própolis	35
5. CONCLUSÕES	39
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
7. ARTIGO 1	51
8. ARTIGO 2	63
9. ANEXO	73

RESUMO

A própolis é uma resina de coloração e consistência variada coletada por abelhas da espécie *Apis mellifera* de diversas partes da planta como brotos, botões florais e exsudados resinosos, sendo transportados para dentro da colmeia para ser utilizado como meio de defesa e vem se destacando pelas suas propriedades terapêuticas, como atividade antimicrobiana, antiinflamatória, cicatrizante, anestésica, anticariogênica e anticancerígena. Todos esses efeitos terapêuticos têm sido atribuídos aos diversos compostos polifenólicos que compõe a própolis coletadas pela *Apis mellifera*. O objetivo deste trabalho foi analisar as amostras de própolis coletadas em diferentes localidades da região sul do Brasil, na intenção de fazer um mapeamento das variedades de própolis encontradas nessa região. As 116 amostras coletadas foram analisadas por cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE) e espectrofotometria na região UV-visível. As amostras analisadas apresentaram grande variação de composição dependendo da região onde foram coletadas. Através da análise dos extratos etanólicos de própolis em CCDAE, utilizando cromatoplasas RP-18F₂₅₄-S e irradiadas com luz ultravioleta a 366 nm, pode-se agrupar as amostras em 7 grupos distintos. Dentre as amostras classificadas, uma (RS3 e PR7) apresentou alta atividade antimicrobiana contra *Streptococcus mutans*, enquanto uma outra variedade apresentou maior atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*. A maioria das própolis selecionada apresentou alta atividade antioxidante inibindo a oxidação da reação acoplada de β -caroteno e ácido linoléico em torno de 90%. Nos testes de atividade antiinflamatória, onde foi testada a inibição da enzima hialuronidase pelos extratos etanólicos de própolis, os valores de inibição enzimática variam de 7,7% na amostra que apresentou menor inibição e de 40% na amostra que apresentou maior inibição. Entre as amostras testadas quanto a atividade antitumoral, apenas a amostra RS5 apresentou resultado satisfatório contra diferentes tipos de células cancerosas.

SUMMARY

One hundred sixteen samples of propolis were collected from various locations in the states of Rio Grande do Sul and Paraná and analyzed by UV-spectrophotometer, RP-HPTLC and RP-HPLC. The samples were classified in accordance with their patterns of UV-absorption spectra and RP-HPTLC and it was found that all samples consisted of 7 kinds of propolis. Some biological properties were determined such as their antimicrobial, antioxidant, antiinflammatory and antitumoral activities. Antimicrobial activities of all groups of propolis were examined by using pathogenic *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans*. Propolis from southeastern Brazil inhibits the growth of *Staphylococcus aureus*, and RS3 and PR7 inhibit the growth of *Streptococcus mutans*. The results of the antioxidant activity indicated that all groups of propolis showed more than 85% of antioxidant capacity, but RS5 showed less than 80%. In the case of antiinflammatory activity, propolis of PR7 and PR9 demonstrated higher antiinflammatory activity as compared with the other samples. Only one sample (RS5) demonstrated antitumoral activity.

1. INTRODUÇÃO

De um modo geral, os alimentos apresentam três características básicas: 1) Manter a vida do ser humano fornecendo os elementos nutricionais necessários para o funcionamento do organismo, como por exemplo os carboidratos, lipídios, proteínas, vitaminas e minerais, 2) conferir sabor, cor, aroma e propriedades reológicas (como a textura e viscosidade) desejáveis e 3) ajustar e modular, fisiologicamente, o organismo, buscando o equilíbrio do corpo humano de modo a promover a saúde (ARAI, 1996). Até recentemente, os profissionais da indústria de alimentos apenas preocupavam-se com os aspectos nutricionais e de melhoramento do sabor, da cor e das propriedades reológicas e físico-químicas dos alimentos com o objetivo de torná-los mais atraentes aos consumidores. Conseqüentemente, observou-se um aumento no consumo dos alimentos, promovido, em boa parte, pelo melhoramento de suas propriedades sensoriais, principalmente com relação ao sabor e à textura. Paralelamente, ganhou-se importância a terceira função dos alimentos uma vez que aliado aos problemas da vida moderna, surgiram inúmeros distúrbios na saúde humana, tais como o estresse, a hipertensão, a obesidade e os problemas cardíacos. Os alimentos que apresentam componentes ou substâncias que desempenham essa função no organismo são denominados de alimentos funcionais. Desta maneira, alimentos funcionais correspondem aos alimentos que apresentam componentes que ajustam e/ou modulam o sistema fisiológico do organismo humano, de modo a promover a saúde e prevenir doenças, bem como aumentar as propriedades nutricionais dos alimentos (HAUMANN, 1993; PSCOZOLA, 1993; BYRNE, 1994; MATSUDA, 1994; TULEY, 1995; ARAI, 1996).

Por meio da utilização dos alimentos funcionais acredita-se ser possível a prevenção de inúmeras doenças, como por exemplo, distúrbios cardiovasculares, tumores e doenças crônicas, levando o ser humano a ter uma vida mais saudável.

Dentro deste contexto, os produtos apícolas vêm despertando maior interesse dentro da área alimentícia. Produtos como mel, geléia real, pólen e própolis têm recebido atenção especial entre os pesquisadores e os consumidores. Dentre esses produtos, a própolis tem se destacado, tanto pelas suas diversas propriedades terapêuticas tais como atividade antimicrobiana, antiinflamatória, cicatrizante, anestésica (GHISALBERTI, 1979), anticariogênica (IKENO *et al.*, 1991; PARK *et al.*, 1998; KOO *et al.*, 1999; KOO *et al.*, 2000a; KOO *et al.*, 2000b; KOO *et al.*, 2000c) antitumorais (SCHELLER *et al.*, 1989; FRENKEL *et al.*, 1993; RAO *et al.*, 1995), citotóxicas (GRUNDBERGER *et al.*, 1988;

MATSUNO, 1995; MATSUNO *et al.*, 1997a; MATSUNO *et al.*, 1997b; BANSKOTA *et al.*, 1998; BANSKOTA *et al.*, 2000) e antiviral (DEBIAGGI *et al.*, 1990; SERKEDJIEVA *et al.*, 1992; AMOROS *et al.*, 1992a; AMOROS *et al.*, 1992b; AMOROS *et al.*, 1994; HARISH *et al.*, 1997; KUJUMGIEV *et al.*, 1999; VYNOGRAD *et al.*, 2000) como pela sua aplicabilidade nas indústrias de alimentos e cosméticos, utilizada como ingrediente em formulações de balas, chocolates, pasta de dente, xampus, creme para pele, entre outras (ACKERMANN, 1991; MATSUDA, 1994).

Como definição, a própolis é uma resina produzida pelas abelhas, misturando-se substâncias coletadas de diferentes partes das plantas, como brotos, botões florais e exsudados resinosos, com as secreções produzidas em seu organismo, dando origem a um material de coloração e consistência variada, utilizada para fechar pequenas frestas, embalsamar insetos mortos no interior da colméia e proteger contra a invasão de insetos e microrganismos (GHISALBERTI, 1979). Historicamente, há relatos da utilização da própolis desde a época dos antigos egípcios que a utilizavam como um dos ingredientes para embalsamar as múmias.

Atualmente, existem diversos trabalhos onde foi estudada a composição química da própolis sendo verificado que esta pode conter de 50 a 60% de resina, 30 a 40% de cera, 5 a 10% de óleos essenciais, 5% de pólen, além de microelementos como alumínio, cálcio, estrôncio, ferro, cobre, manganês e quantidades traços de vitaminas B₁, B₂, B₆, C e E (GHISALBERTI, 1979; MARCUCCI, 1995). Dentre as substâncias biologicamente ativas presentes na própolis, os compostos fenólicos são os mais estudados. A maioria dos compostos fenólicos identificados pertence a dois grandes grupos: 1) fenilpropanóides (ácidos hidroxicinâmicos, flavonóides; lignanas, entre outros) e 2) terpenóides (mono, sesqui, di e triterpenóides), cuja composição varia de acordo com a flora da região estudada (GREENAWAY *et al.*, 1990; GREENAWAY *et al.*, 1991; BANKOVA *et al.*, 1992b; TOMAS-BARBERAN *et al.*, 1993; PARK *et al.*, 1997; BANKOVA *et al.*, 1999), a variedade da abelha rainha (KOO & PARK, 1997) e ainda, com a variação sazonal (BANKOVA *et al.*, 1998a; SFORCIN *et al.*, 2000). Diversos trabalhos já foram publicados ressaltando as propriedades biológicas desses compostos, principalmente, dos flavonóides das própolis européias, dos derivados do ácido cinâmico e dos terpenóides de própolis brasileiras. Entre os derivados do ácido cinâmico um dos mais importantes e estudados tem sido o ácido 3,5-diprenil-hidroxicinâmico (comercialmente conhecido como Artepillin C)

ao qual tem sido atribuído inúmeras propriedades biológicas, com maior ênfase ao seu potencial antimicrobiano (AGA *et al.*, 1994) e a sua atividade antitumoral (MATSUNO *et al.*, 1997a; KIMOTO *et al.*, 1998). Um outro grupo de compostos identificados em própolis e que já foi estudado devido a sua atividade citotóxica corresponde aos terpenóides (MATSUNO, 1995; MITAMURA *et al.*, 1996; MATSUNO *et al.*, 1997b; RUBIO *et al.*, 1999). Um terceiro composto bastante citado devido a sua grande versatilidade de atividade biológica é o conhecido como CAPE (éster fenetilílico de ácido caféico). Esse ácido já foi descrito por apresentar propriedades antivirais (SU *et al.*, 1994), antioxidantes (ILHAN *et al.*, 1999) e, principalmente, antitumorais (FRENKEL *et al.*, 1993; CHEN *et al.*, 1996; LEE *et al.*, 2000).

Vários outros trabalhos foram realizados com o intuito de identificar os compostos existentes na própolis produzida em diferentes países (CIZMARIK & MATEL, 1970; BANKOVA *et al.*, 1992a; GARCIA-VIGUERA *et al.*, 1992; GARCIA-VIGUERA *et al.*, 1993; JOHNSON *et al.*, 1994; BONHEVI & COLL, 1994; MARTOS *et al.*, 1997; CHRISTOV *et al.*, 1998; VALCIC *et al.*, 1999; HEGAZI *et al.*, 2000; VELIKOVA *et al.*, 2000) e no Brasil (MARCUCCI, 1995; BANKOVA *et al.*, 1995; BANKOVA *et al.*, 1996a; BANKOVA *et al.*, 1996b; BOUDOUROVAKRASTEVA *et al.*, 1997; MARCUCCI *et al.*, 1998; BANKOVA *et al.*, 1998; NEGRI *et al.*, 1998; MATSUNO *et al.*, 1998; TAZAWA *et al.*, 1998; TAZAWA *et al.*, 1999; HAYASHI *et al.*, 1999; BANKOVA *et al.*, 1999; MARCUCCI *et al.*, 2000; BANKOVA *et al.*, 2000; NEGRI *et al.*, 2000).

No entanto, poucos autores preocuparam-se em realizar um estudo com o intuito de verificar a existência de diferentes tipos de própolis no Brasil. Um dos primeiros pesquisadores a realizar esse tipo de trabalho foi KOO (1996) que coletou várias amostras de própolis nas capitais e cidades próximas nos Estados brasileiros onde a apicultura tem sido praticada.

Desta forma, baseado nos resultados obtidos por KOO (1996) os Estados do Rio Grande do Sul e do Paraná foram escolhidos para o desenvolvimento de um estudo mais detalhado dos tipos de própolis produzidos nessas regiões e para a determinação de algumas propriedades biológicas associadas a essas própolis.

2. OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo a coleta de amostras de própolis de diferentes localidades dos Estados do Paraná e do Rio Grande do Sul com a finalidade de classificar este material de acordo com as suas características físico-químicas. Uma vez classificadas, as própolis foram testadas quanto às seguintes propriedades biológicas: atividade antimicrobiana, antiinflamatória, antioxidante e anticancerígena.

Juntamente com as amostras da região sul, foram analisadas algumas amostras de própolis coletadas na região sudeste (São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro), uma vez que as própolis produzidas nessa região, principalmente Minas Gerais e São Paulo, são as mais utilizadas comercialmente e que a mais tempo vem sendo utilizada pela população.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta e Preparo da Amostra

As amostras de própolis foram coletadas em diferentes localidades nos Estados do Rio Grande do Sul e do Paraná. As amostras de própolis destes Estados foram escolhidas para um estudo detalhado devido as características biológicas promissoras previamente citadas por KOO (1996). As própolis coletadas nessas regiões apresentaram características peculiares, justificando o interesse para a realização de um estudo mais aprofundado.

O material foi coletado diretamente nos apiários, raspando-se a própolis produzida nas fendas entre a parte inferior da tampa e a melgueira superior da colmeia. Após a raspagem, o material coletado foi acondicionado em sacos plásticos devidamente etiquetados e armazenado em refrigerador (4°C) até o momento da sua utilização.

Antes do manuseio, as amostras foram examinadas criteriosamente para a retirada de eventuais impurezas como pedaços de madeira, abelhas mortas e cera, com a finalidade de se obter amostras de própolis mais puras.

3.2. Obtenção do Extrato Etanólico de Própolis (EEP)

Para a obtenção do extrato etanólico de própolis (EEP), foram pesados 2 gramas de própolis desidratada em estufa a 60°C, previamente triturada em liquidificador e peneirada, em tubos de centrífuga com tampa de rosca, onde foram adicionados 15 mL de uma solução de álcool etílico a 80% e incubados sob agitação a 70°C por 30 minutos. Após a incubação, a mistura foi centrifugada a 10.000 x g por 5 minutos e o sobrenadante separado em tubos de ensaio com tampa de rosca. O procedimento acima foi repetido por mais uma vez, porém na segunda extração foram utilizados 10 mL de solução de álcool etílico a 80%. Após a segunda centrifugação, os sobrenadantes foram misturados, obtendo-se o extrato etanólico de própolis (EEP).

3.3. Determinação Qualitativa dos Compostos Fenólicos Presentes nos Extratos Etanólicos de Própolis

3.3.1. Espectrofotometria na Região Ultravioleta-Visível (UV-Scanning)

Com os extratos obtidos de acordo com o item 3.2 foram realizados os ensaios para determinação do espectro de absorção na faixa de comprimento de onda entre 200 a 600 nm (espectrofotômetro Beckman DU-70). Para isso, uma alíquota de 25 µl do extrato etanólico de própolis foi diluída em 30 mL de álcool etílico 95% e submetida a leitura em espectrofotômetro para a obtenção do espectro de absorção nesse intervalo de comprimento de onda. Para cada amostra foi verificada as faixas de comprimento de onda onde cada extrato apresentou maior absorbância.

3.3.2. Cromatografia em Camada Delgada de Alta Performance em Fase Reversa dos Extratos Etanólicos de Própolis

A metodologia utilizada para realização da cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE) foi baseada no trabalho publicado por PARK *et al.* (1995). Foram utilizados cromatoplasmas do tipo RP-18 F₂₅₄-S (Merck Co.), onde foram aplicadas alíquotas de 3 µl das amostras obtidas de acordo com o item 3.2. O sistema de solvente utilizado foi composto de álcool etílico 95% : água destilada (55:45, v/v) e o desenvolvimento do cromatograma foi observado através de irradiação ultravioleta a 366 nm.

3.4. Determinação Quantitativa dos Compostos Fenólicos Presentes no Extrato Etanólico de Própolis

3.4.1. Determinação de Flavonóides Totais com Base em Quercetina

A determinação de flavonóides totais com base em quercetina foi realizada de acordo com a metodologia descrita no Boletim Informativo da Associação Japonesa de Saúde e Nutrição (1994) e por PARK, *et al.* (1995). Em tubos de ensaio contendo alíquotas de 0,5 mL do extrato etanólico de própolis preparado de acordo com o item 3.2,

previamente diluídas na proporção de 1:10, foram adicionados 4,3 mL de álcool etílico 80%, sendo em seguida adicionados 0,1 mL de uma solução de nitrato de alumínio 10% e 0,1 mL de acetato de potássio na concentração de 1M. No tubo controle não foi adicionado o nitrato de alumínio colocando-se água destilada em seu lugar. Ao final de 40 minutos de reação, a absorbância das amostras foi medida em espectrofotômetro a 415 nm. A concentração de flavonóides totais foi determinada utilizando-se padronização externa, sendo a curva construída com diferentes concentrações de quercetina.

3.4.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa dos Extratos Etanólicos de Própolis

As análises em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) dos extratos etanólicos de própolis foram realizadas utilizando-se cromatógrafo líquido (Shimadzu modelo LC-10) equipado com coluna de fase reversa C-18 ODS-A (4,6 x 250 mm) com tamanho de partícula de 5 µm e acoplado a um detector de arranjo de fotodiodo. A fase móvel utilizada foi água:ácido acético glacial (19:1 v/v) (solvente A) e metanol (solvente B), em sistema de eluição por gradiente construído da seguinte forma: 30% B para 40% B em 15 min, para 50% B em 30 min, para 60% B em 55 min, para 75% B em 75 min e para 90% B em 95 min, retornando a 30% B em 105 min. A vazão utilizada foi de 1 mL/min e a temperatura da coluna foi mantida a 35°C. Na tentativa de identificar alguns compostos, foram utilizados os seguintes padrões analíticos: ácido *p*-cumárico e ferrúlico, kanferol, kanferide, quercetina, rutina, galangina, ramnetina, isoramnetina e miricetina (flavonol); acacetina, apigenina, crisina e tectrocrisina (flavona); pinocembrina, hisperidina, hisperetina, sakuranetina, isosakuranetina (flavanonas); pinobanksina e pinobanksina-3-acetato (dihidroflavanol) e ácido dimetil dialil caféico (composto alergênico). Todos os padrões foram obtidos da Extrasynthese A.A. Co. (França), exceto pinobanksina, pinobanksina-3-acetato e éster do ácido dimetil dialil caféico que foi gentilmente doado pelo Dr. Eckhard Wollenweber, do Intitut fur Botanik der Technischen Hochschule, Alemanha.

3.5. Determinação da Atividade Antimicrobiana dos Extratos Etanólicos de Própolis sobre Bactérias Patogênicas

Em discos de papel de filtro Whatman nº 3 (5 x 1 mm de diâmetro) foram aplicados 10 µL dos respectivos extratos de própolis e então colocados em dessecador com sílica à temperatura ambiente por 24 horas. Posteriormente, foram mantidos em estufa a 60°C por 2 horas para eliminação de qualquer resíduo etanólico.

A análise da atividade antimicrobiana dos extratos de própolis nas bactérias Gram positiva *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Streptococcus mutans* IB 1600, que foram cultivadas em meio Agar Nutriente e BHI Agar, respectivamente, foi realizada de acordo com o método descrito por BLAIR *et al.* (1958). Culturas ativas dos microrganismos testados foram inoculadas por espalhamento com *swabs* estéreis, em placas de Petri contendo os respectivos meios de cultura. Os discos com os extratos foram colocados sobre as placas previamente inoculadas com *S. aureus*, sendo estas, posteriormente, incubadas a 37°C por 24 horas. Para o *S. mutans*, as placas foram incubadas em jaras de anaerobiose por 24 a 48 horas a 37°C.

A atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos de própolis foi determinada pela medição do halo de inibição formado ao redor dos discos após o período de incubação.

3.6. Determinação da Atividade Antioxidante dos Extratos Etanólicos de Própolis

A atividade antioxidante foi determinada pela oxidação acoplada do β-caroteno e do ácido linoléico de acordo com PRATT & WATTS (1964), HAMMERSCHMIDT & PRATT (1978) e PRATT & PAULA (1979). Em um balão de fundo redondo, foram adicionados 60 mg de ácido linoléico, 200 mg de Tween 40 e 5 mg de β-caroteno, dissolvidos em 5 mL de clorofórmio que, posteriormente, foi retirado utilizando rota-evaporador a 50°C. Após a remoção do clorofórmio, o resíduo foi dissolvido com a adição de 50 mL de água deionizada e oxigenada sob vigorosa agitação. Alíquotas de 5 mL desta emulsão foram transferidas para tubos de ensaio contendo 0,5 mL dos respectivos extratos de própolis e a absorbância foi medida imediatamente em espectrofotômetro a 470 nm. Os tubos foram incubados a 40°C para a reação de oxidação e a leitura da absorbância foi realizada em intervalos de 60 minutos.

3.7. Determinação da Inibição da Atividade da Hialuronidase dos Extratos Etanólicos de Própolis

A inibição da atividade de hialuronidase foi determinada conforme trabalho realizado por REISSING *et al.* (1955) e ARONSON & DAVIDSON (1967). A mistura de reação consistindo de 50 µL dos respectivos extratos de própolis, 0,5 mL do sal de potássio do ácido hialurônico (Sigma Co.) em tampão acetato 0,1M, pH 3,6 contendo 0,15 M de NaCl e 50 µl (350 unidades) da enzima hialuronidase (Tipo IV-S: obtido de testículo bovino, Sigma Co.), dissolvida no mesmo tampão, foi incubada a 37°C por 40 minutos. Após a incubação, 0,1 mL de tetraborato de potássio 0,8 M foi adicionado à mistura de reação e esta colocada em banho de ebulição por 3 minutos. Em seguida, adicionou-se 3 mL de p-dimetilaminobenzaldeído e a mistura foi, novamente, incubada a 37°C por 20 minutos. Finalmente, a absorbância da mistura foi medida em espectrofotômetro (Beckman DU 70) a 585 nm utilizando-se água como controle.

3.8. Determinação da Atividade Citotóxica *in vitro* dos Extratos Etanólicos de Própolis

A determinação da atividade citotóxica *in vitro* dos extratos etanólicos de própolis foi testada contra seis tipos de células tumorais humana (HTCL) sendo elas: KB (carcinoma nasofaríngeo), HCT-8 (adenocarcinoma ileocecal – ATCC CCL 224), MCF-7 (adenocarcinoma de mama – ATCC HTB 22), A549 (carcinoma pulmonar – ATCC CCL 185), 1A9 (carcinoma ovariano) e EH-118MG (glioma vírus transformado), segundo a metodologia descrita por SKEHAN *et al.* (1990) e RUBINSTEIN *et al.* (1990). A suspensão de células cancerosas devidamente diluída, foram cultivadas em meio RPMI-1640 (suplementado com 10% (v/v) de soro de embrião bovino e 100 mg/mL de kanamicina) e incubadas em atmosfera controlada com 5% de CO₂ a 37°C por 24 horas. Decorrido esse período, foram adicionados 100 µL das amostras de própolis em diferentes concentrações, até o máximo de 30 µg/mL, dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO) devidamente diluído, e incubadas por mais 48 horas. Terminado o período de incubação, as células foram fixadas com ácido tricloroacético (TCA) a 50%, durante uma a duas horas, a 4°C e, em seguida, lavados em água corrente. Após a secagem total do material fixado, os mesmos foram corados pela adição de 50 µL de sulforrodamina B (SRB) a 0,4% (p/v),

dissolvido em ácido acético a 1%, durante um período de 10 a 20 minutos, a 4°C. O excesso de corante foi retirado por lavagens sucessivas (5x) utilizando solução de ácido acético a 1%, sendo a placa seca a temperatura ambiente. O corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com solução de protease em ultra-som por 5 minutos. A leitura espectrofotométrica foi realizada a 562 nm. Para comparação, foi utilizado a droga etoposide VP-16 como controle positivo. Os resultados foram expressos em valores de ED-50, que tem, por definição, a concentração do agente teste necessário para reduzir em 50% o número de células cancerosas com relação a um controle (sem tratamento). Este experimento foi desenvolvido pelo Dr. Kenneth Bastow da Universidade da Carolina do Norte, Chapel Hill, EUA.

3.9. Análise Estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. Os dados foram analisados pelo programa Mstac-C (MSTAT-C, 1988) para a determinação da análise de variância. A separação entre as médias dos tratamentos foi conduzida utilizando-se o teste de Tukey com um nível de confiança de 95%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Propriedades Organolépticas e Físico-químicas das Amostras de Própolis Coletadas nos Estados do Paraná e do Rio Grande do Sul

Foram coletadas 116 amostras de própolis nas duas regiões estudadas sendo que 45 amostras foram coletadas no Estado do Rio Grande do Sul e 71 no Estado do Paraná (Tabelas 1 e 2).

Utilizando as metodologias descritas nos itens 3.3.1 e 3.3.2, foram selecionadas 7 diferentes tipo de própolis, sendo 3 no Estado do Rio Grande do Sul e 4 no Estado do Paraná (Figura 1).

TABELA 1. Localidades onde foram coletadas as amostras de própolis no Estado do Rio Grande do Sul, entre novembro de 1997 a janeiro de 1998.

Cidades do Estado do Rio Grande do Sul	Número das amostras Série RS
Alegrete	1
Bagé	2, 3, 4, 5, 6 e 7
Barracão	8
Bom Jesus	9, 10, 11, 12, 13, e 14
Cambará do Sul	15, 16, 17, 18, 19 e 20
Camaquã	21
Candelária	22
Caxias do Sul	23, 24 e 25
Gramado	26
Jaguari	27 e 28
Lageado	29, 30, 31 e 32
Lagoa Vermelha	33, 34 e 35
Pelotas	36, 37 e 38
Porto Alegre	39 e 40
Santa Cruz do Sul	41
Santiago	42
Taquara	43, 44 e 45

TABELA 2. Localidades onde foram coletadas as amostras de própolis no Estado do Paraná, entre fevereiro de 1998 a abril de 1998.

Cidades do Estado do Paraná	Número das Amostras Série PR
Agudos do Sul	1
Antônio Olinto	2
Bocaiúva do Sul	3, 4, 5, 6, 7, 8
Campina Grande do Sul	9, 10
Cândido de Abreu	11
Candoi	12, 13
Chopinzinho	14
Clevelândia	15, 16
Cruz Machado	17, 18, 19, 20
Curitiba	21
General Carneiro	22, 23
Imbituva	24
Irineópolis	25
Itapejara do Sul	26
Lapa	27
Madirituba	28
Mariópolis	29, 30
Palmeiras	48
Pato Branco	40, 41, 42, 43, 44
Paula Freitas	33
Paulo Fontin	31, 32
Prudentópolis	34, 35, 36, 37, 38, 39
Quatro Barras	45, 46
Quitandinhas	47
Reserva	49
Tibagi	50
Tunas do Paraná	51
União da Vitória	52, 53, 54, 55, 56, 57, 58
Cianorte	59, 60, 61, 62
Maringá	63, 64, 65
Umuarama	66, 67, 68
Altônia	69, 70, 71

Entre as 116 amostras coletadas foram observadas própolis que apareceram com menor frequência, coletadas em ambientes peculiares, que não foram classificadas devido a sua baixa incidência.

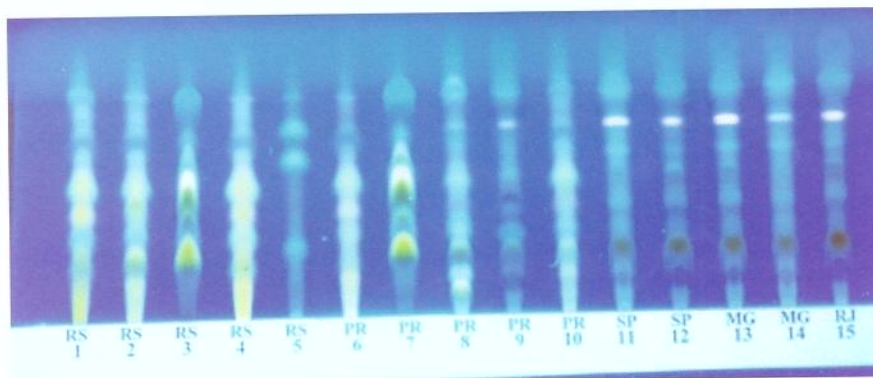


FIGURA 1: Cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE) dos extratos etanólicos de própolis das amostras selecionadas irradiada com luz ultravioleta a 366 nm coletadas no Estado do Rio Grande do Sul (RS); Paraná (PR) e em alguns Estados da região sudeste (SP, MG e RJ) para efeito de comparação.

A vegetação nos locais onde foram coletadas as amostras foi classificada segundo uma adaptação da Resolução número 34, de 7 de dezembro de 1994 do CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente), assim nas regiões de coleta ocorria a predominância de espécies de vegetação secundária em estágios iniciais e de média regeneração. Algumas espécies existentes próximas ao local dos apiários estão ilustrados no Quadro 1.

Quadro 1: Espécies vegetais existentes próximas ao local dos apiários.

Amostra	Localidade	Espécies vegetais*
RS1	Caxias do Sul (RS)	Plátano, castanheiras, araucária, eucalipto, bracatinga, pé de bugre, erva mate, açoita cavalo, farinha seca, entre outras.
RS2	Taquara (RS)	Eucalipto, pinheiro, araucária.
RS3	Candelária (RS)	Eucalipto, vassoura, pinheiro.
RS4	Cambará do Sul (RS)	Guarapeiro, pinheiro, aroeira, araucária.
RS5	Bagé (RS)	Aroeira cinzenta, murta, molho, corunilha, entre outras.
PR6	General Carneiro (PR)	Embuia, uváia, pinheiro, araucária, araçá gigante, pau de bugre, cedro vassourão.
PR7	Irineópolis (PR)	Reflorestamento de álamo, eucalipto, vassoura.
PR8	Mandirituba (PR)	Erva mate, pimenteira brava, vassourão, tubixava preta, aroeira, pinheiro, araucária e eucalipto.
PR9	Paulo Fontin (PR)	Camabará, embuia, guamirim, pimenteira, voadeira, araçá anã.
PR10	Paula Freitas (PR)	Erva santaneira, várias espécies de vassoura, aroeira, carqueja, assa peixe, rabo de lobo, bracatinga, erva mate, cauna, congonha, maria mole, cambará, branquilha, pessegueiro bravo.

*Os nomes populares das espécies citadas no quadro acima foram fornecidos pelos apicultores locais.

As características organolépticas foram avaliadas e verificou-se que existe uma grande variação entre as amostras de própolis selecionadas. Com relação a aparência *in natura*, as própolis selecionadas apresentaram uma coloração que variou desde um amarelo-castanho (RS5), até um verde-amarronzado com matizes em vermelho (RS2), como pode ser observado na Figura 2. A textura variou de extremamente dura (RS5), dura e seca (SP11, SP12, MG13, MG14 e RJ15) até amostras muito moles e pegajosas (RS1, RS2, RS3, RS4, PR7). Com relação ao aroma, algumas amostras apresentaram odor levemente acético (RS1 e RS2), outra com aroma semelhante a desinfetante (RS5) e as amostras coletadas na região sudeste que apresentaram aromas característicos de própolis.



FIGURA 2: Aparência morfológica das amostras *in natura* de própolis coletadas em diferentes localidades dos Estado do Rio Grande do Sul (RS); Paraná (PR) e em alguns Estados da região sudeste (SP, MG e RJ) para efeito de comparação.

Da mesma forma que nas amostras *in natura*, os extratos etanólicos de própolis (EEP) apresentaram grande variação tanto na sua coloração (Figura 3) quanto no aroma. A Tabela 3 ilustra algumas características dos EEPs. A coloração dos extratos variou do amarelo claro até amostras com coloração esverdeada, comercialmente conhecidas como *green propolis*. Quanto a porcentagem de sólidos solúveis em etanol (Tabela 3) variou entre 54,5% a 65%.

TABELA 3. Características de coloração e teor de substâncias solúveis dos extratos etanólicos de própolis.

Amostras	Extrato Etanólico de Própolis	
	Cor	Substâncias Solúveis (%)
RS1	Castanho escuro	57,5
RS2	Castanho escuro	58,0
RS3	Castanho escuro	62,4
RS4	Castanho claro	57,5
RS5	Amarelo claro	63,0
PR6	Amarelo escuro	60,5
PR7	Castanho claro	65,0
PR8	Castanho claro	54,5
PR9	Esverdeado	58,7
PR10	Castanho escuro	59,0
SP11	Castanho esverdeado	60,0
SP12	Esverdeado	61,0
MG13	Castanho esverdeado	59,6
MG14	Castanho esverdeado	58,7
RJ15	Castanho esverdeado	62,0

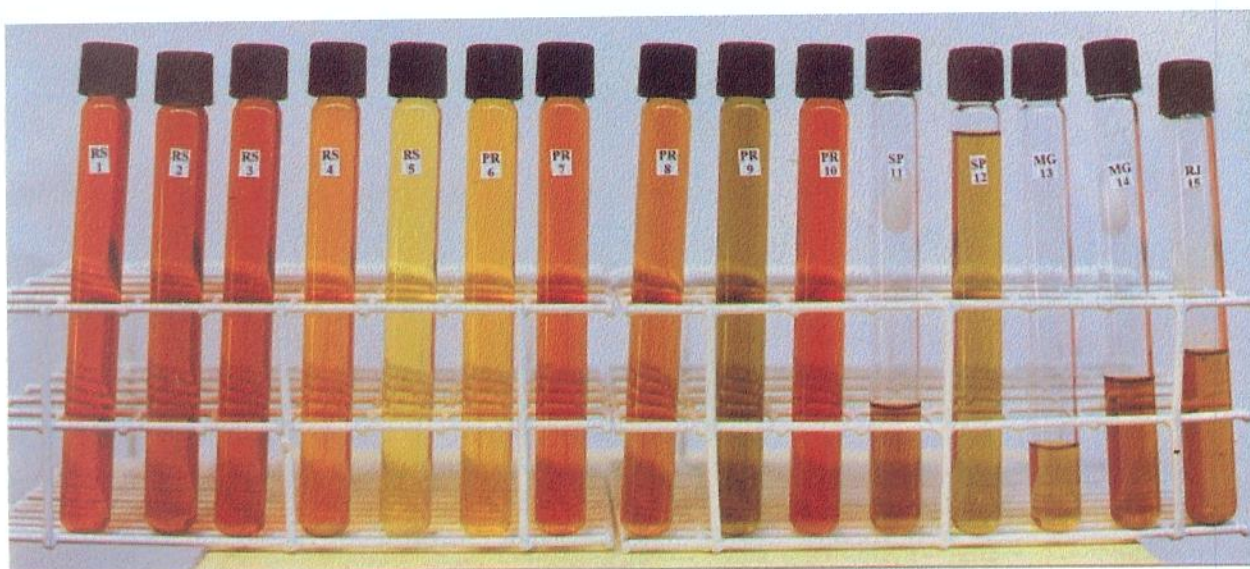


FIGURA 3: Extrato etanólico das amostras selecionadas de própolis coletadas em diferentes localidades dos Estados do Rio Grande do Sul (RS1 a RS5), Paraná (PR6 a PR10) e em alguns Estados da região sudeste (SP, MG e RJ) para efeito de comparação.

Torna-se importante salientar que não foi observada qualquer relação entre a coloração ou o aroma dos extratos etanólicos de própolis com a sua atividade biológica. Essa constatação é de extrema importância uma vez que no mercado atual de própolis, o

seu valor comercial encontra-se intimamente relacionado com o seu cheiro e a sua cor, tanto do extrato etanólico quanto da própria matéria-prima.

Quanto à variação da própolis em relação ao local da coleta, verificou-se que um mesmo perfil de própolis foi encontrado em lugares bem distintos. Assim, por exemplo, a amostra PR7 foi coletada em Irineópolis, cidade que faz fronteira entre os Estados do Paraná e Santa Catarina, possui o mesmo perfil da amostra RS3 coletada em Candelária - RS e que também foi encontrada em Bagé e Porto Alegre, ambas no Rio Grande do Sul. Por outro lado, diferentes tipos de própolis foram coletadas dentro de um mesmo apiário. Essas ocorrências podem ser explicadas, primeiramente, pela grande variedade de espécies vegetais encontradas nessas regiões e, também, pela variabilidade genética das abelhas rainhas conforme estudo realizado por KOO & PARK (1997). Nesse trabalho, abelhas colocadas em um mesmo apiário produziram própolis de constituição química diferente, provavelmente pelo fato de que, no código genético dessas abelhas, deva existir um ou mais grupos de genes que codifiquem a informação no qual sugere o tipo de vegetal que devem ser visitadas. É possível supor, desta maneira, que mesmo abelhas habitando locais completamente distintos, apresentem o mesmo comando genético que as façam procurar determinadas espécies de plantas, originando própolis de mesma composição. Com relação ao tipo de vegetação torna-se difícil determinar uma semelhança entre as diferentes localidades, uma vez que os apiários são colocados em locais de flora complexa onde é possível encontrar uma grande variedade de espécies. No entanto, a coleta da amostra PR7 em um apiário muito próximo a um reflorestamento de álamo (*Populus albus*), pode ser um indicativo de que esta espécie vegetal seja uma provável fonte vegetal de onde as abelhas coletam o material para a produção de própolis. Esse vegetal, que não é nativo dos trópicos, foi trazido por imigrantes europeus e cultivado nessa região. Diversos trabalhos anteriores citam plantas desse mesmo gênero como principal fonte de matéria-prima para a produção de própolis nos países do Hemisfério Norte (WOLLENWEBER *et al.*, 1987; BANKOVA *et al.*, 1989; GREENAWAY *et al.*, 1991; BANKOVA *et al.*, 1992).

Também foram encontradas no Rio Grande do Sul e, principalmente, no Paraná, amostras que apresentaram o mesmo perfil de CCDAE das própolis coletadas na região sudeste (SP, MG e RJ), ilustradas na Figura 1. Cidades como Prudentópolis e Cândido Abreu, no Estado do Paraná, fazem parte de uma região bastante desenvolvida com relação à produção de própolis.

Um outro parâmetro utilizado para a classificação das amostras de própolis foi a

espectrofotometria de varredura (item 3.3.1). De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que cada variedade de própolis apresenta um perfil espectrofotométrico distinto como pode ser observado na Figura 4.

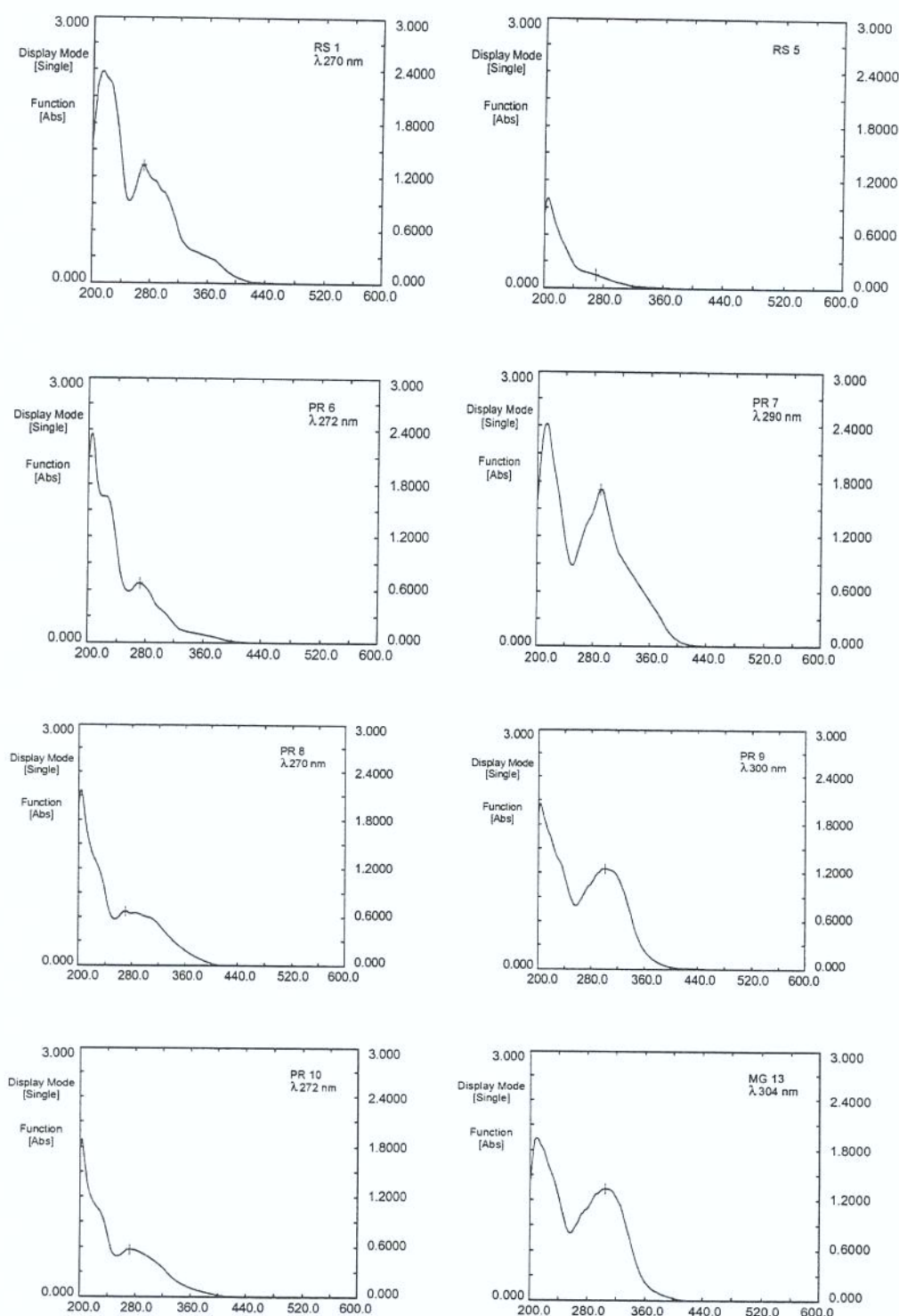


FIGURA 4: Espectro de absorção dos extratos etanólicos das amostras selecionadas de própolis.

Comparando-se as Figuras 1 e 4 observou-se que existe uma relação entre os perfis cromatográficos e os espectros de absorção dos extratos de própolis. As amostras RS3 e PR7 apresentaram o mesmo perfil em CCDAE e comprimento de onda máximo de absorção de 290 ± 2 nm, sendo que essa relação se repetiu para todas as amostras testadas com o mesmo perfil cromatográfico. Isto também ocorreu com as amostras RS1 e RS4 e todos os extratos preparados com própolis coletadas na região sudeste. No entanto, não foi possível fazer a relação inversa, ou seja, com os dados do espectro de absorção prever qual o perfil na placa de camada delgada.

Dessa forma, a melhor maneira de realizar a classificação da própolis foi utilizando as placas de CCDAE onde os perfis cromatográficos indicavam cada variedade de própolis. Essa técnica poderia ser empregada como uma alternativa para determinação qualitativa das própolis brasileiras uma vez que corresponde a uma técnica simples e rápida, com a utilização de um sistema de solvente barato (etanol e água) e bastante simples. A única desvantagem na utilização desta técnica corresponde ao alto custo das placas de CCDAE.

Alguns autores sugeriram procedimentos para determinar a qualidade tanto da própolis bruta como nos extratos. Parâmetros como fenólicos totais, flavonóides, cera e substâncias voláteis seriam medidos na tentativa de garantir a qualidade do produto (WOISKY & SALATINO, 1998). BONVEHI & COLL (2000) sugeriram que a qualidade de própolis pode ser estabelecida através da determinação do potencial antioxidante.

4.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência dos Extratos Etanólicos de Própolis

As condições para a realização dos ensaios em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) estão descritas no item 3.4.2 e os resultados apresentados na Figura 5.

Da mesma forma que nos ensaios em CCDAE, os perfis de CLAE apresentaram-se bastante distintos entre as amostras sendo possível a identificação de alguns compostos. A identificação dos compostos foi realizada utilizando detector de arranjo de diodo comparando-se o tempo de retenção, o espectro de absorção e co-cromatografia com os padrões disponíveis. Devido a escassez de padrões, não foi possível a identificação de compostos importantes como o CAPE (ester fenético de ácido caféico) e o Artepillin C (ácido 3,5-diprenil-hidroxicinâmico).

Entre as amostras analisadas, a que apresentou maior número de compostos identificados foi a PR7. Essa amostra, coletada na cidade de Irineópolis, apresentou os

seguintes flavonóides: quercetina, pinocembrina, pinobanksina, galangina, crisina e tectocrisina, fato este que explica em parte sua atividade antimicrobiana. Além desses flavonóides, foram identificados nesta amostra alguns ácidos (ρ -cumárico e ferrúlico) e também um éster do ácido dimetil dialil caféico, conhecido pela sua atividade alergênica (HAUSEN *et al.*, 1987; GINANNESCHI *et al.*, 1989).

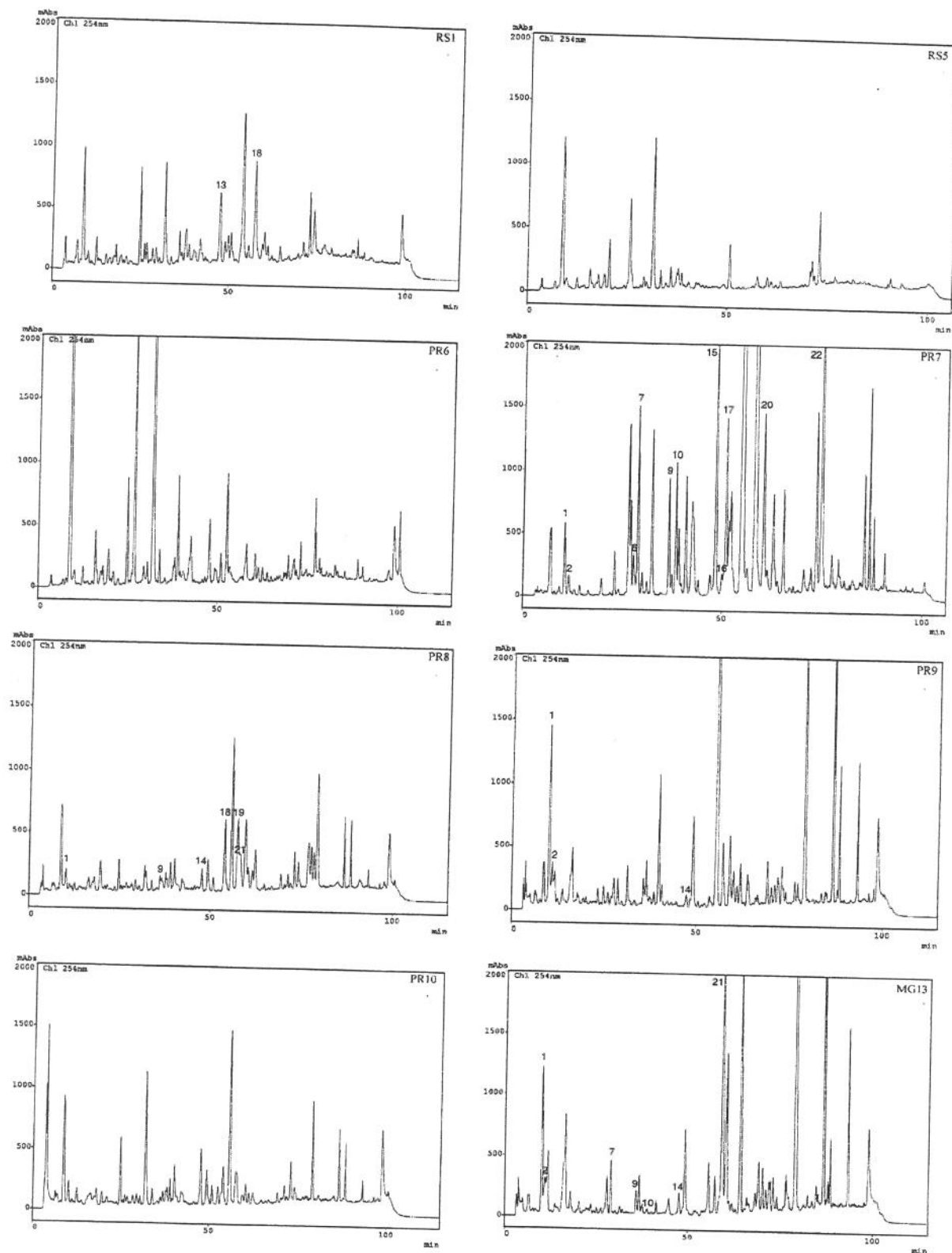


Figura 5: Cromatografia líquida de alta eficiência dos extratos etanólicos de própolis. 1) ácido cumárico, 2) ácido ferrúlico, 6) quercetina, 7) pinobanksina, 9) kanferol, 10) apigenina, 14) isosakuranetina, 15) pinocembrina, 16) ácido dimeti dialil caféico, 17) pinobanksina-3-acetato, 18) crisina, 19) acacetina, 20) galangina, 21) kanferide, 22) tectocrisina. Condições cromatográficas descritas no texto.

Todas as própolis coletadas na região sudeste apresentaram o mesmo perfil sendo identificados flavonóides como kanferide, kanferol, pinocembrina, isosakuranetina e apigenina, flavonóides estes, já identificados por outros autores (MIYASE *et al.*, 1998; BANSKOTA *et al.*, 1998; WOISKY & SALATINO, 1998).

O ácido *p*-cumárico esteve presente na maioria das amostras analisadas. Este ácido, também conhecido com ácido *p*-hidroxicinâmico, é muito comum nos vegetais superiores pois serve como precursores da biossíntese de diversos compostos fenilpropanoídicos, que compreendem compostos mais simples, como outros ácidos e álcoois hidroxicinâmicos e os fenilpropenos (por exemplo, o anetol e o eugenol), bem como compostos quimicamente mais complexos, como os flavonóides, as lignanas, as neolignanas e as ligninas (ROBBERS *et al.*, 1997).

Nas amostras RS5, PR6 e PR10 não foi possível identificar qualquer tipo de composto entre os padrões analisados.

4.3. Determinação de flavonóides totais com base em quercetina dos extratos etanólicos de própolis

A determinação de flavonóides totais com base em quercetina foi realizada de acordo com o item 3.4.1 e os resultados apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Teor de flavonóides totais com base em quercetina dos extratos etanólicos das amostras selecionadas de própolis.

Amostras de própolis	Flavonóides totais com base em quercetina (mg/g) [#]
RS1	3,4 ^f
RS2	7,8 ^{de}
RS3	18,5 ^b
RS4	3,7 ^{fg}
RS5	0,0 ^g
PR6	1,39 ^g
PR7	23,4 ^a
PR8	10,5 ^{cd}
PR9	11,97 ^c
PR10	5,6 ^{ef}
SP11	23,5 ^a
SP12	22,4 ^a
MG13	25,7 ^a
MG14	24,3 ^a
RJ15	28,6 ^a

[#]Médias seguidas de letras diferentes são significativas a nível de 5% (Teste de Tukey P<0,05).

Esse método baseia-se na formação de complexos entre o alumínio e alguns flavonóides, ocasionando um efeito batacrômico, o que leva a um aumento do comprimento de onda de absorção desses compostos (JURD & GEISSMAN, 1956). Estes complexos tem máxima absorção nos comprimentos de onda próximo a 415 nm que corresponde à banda de absorção do complexo quercetina-alumínio utilizado como padrão.

Como pode ser observado na Tabela 4, existe uma grande variação no teor de flavonóides totais presente nas amostras selecionadas de própolis. Assim, enquanto a amostra RS5 não apresentou teor de flavonóides totais; a amostra RJ15 apresentou 28,6 mg/mL sendo esta o maior teor de flavonóides totais encontrado nas amostras de própolis examinadas. De modo geral, as amostras coletadas na região sul, com exceção das amostras RS3 e PR7, apresentaram baixa concentração de flavonóides totais quando comparadas com as amostras coletadas na região sudeste que, por sua vez, não apresentaram diferença

estatisticamente significativa entre elas. Todas as amostras da região sudeste apresentaram o mesmo perfil cromatográfico em CCDAE, indicando que esse tipo de própolis reage melhor ao teste com nitrato de alumínio. No entanto, comparando os perfis cromatográficos das amostras da região sul com os seus respectivos valores de flavonóides totais, pode-se constatar que o resultado obtido foi, na verdade, subestimado, uma vez que é possível observar a presença de outros compostos que não foram quantificados devido a falha do próprio método. O teste em espectrofotometria de varredura reforça essa tendência posto que, determinadas amostras que apresentam um espectro de absorção bastante alto (RS1, RS2 e RS4, como pode ser visto na Figura 4) apresentam também valores muito baixo quando submetidos ao teste do nitrato de alumínio. No caso das amostras coletadas na região sudeste, pode se afirmar que existe uma correlação entre os valores obtidos no teste de nitrato com os valores de absorbância máxima do espectro de absorção, tal como foi descrito no trabalho desenvolvido por KOO (1996). Entretanto, essa correlação não existiu para a maioria das amostras coletadas na região sul, indicando, efetivamente, que esse método não deve ser empregado para análise das própolis coletadas nessa região.

Comercialmente, para a exportação de própolis especificamente para o Japão, tem sido realizada a análise de flavonóides totais por meio do teste de nitrato de alumínio. Dessa forma, as própolis da região sudeste sempre foram bastante valorizadas devido aos bons resultados obtidos neste teste. No entanto, existe um grande preconceito com relação às própolis da região sul pelo fato dos valores obtidos neste teste serem, na maioria das vezes, insatisfatórios, levando essas própolis a serem considerada de qualidade inferior.

De modo geral, utiliza-se este teste para a determinação de alguns flavonóides, mais especificamente os flavonols, como por exemplo a quercetina. Esse método embora apresentando grande reprodutibilidade dos resultados, em alguns casos fornece valores subestimados uma vez que a reação com o alumínio não é igual para todos os compostos. Isto ocorre porque a formação de quelatos entre o alumínio e os flavonóides acontece de forma diferenciada dependendo da natureza dos flavonóides, levando a uma alteração colorimétrica que pode ser maior ou menor a 415 nm (JURD, 1969).

Desta forma, torna-se fundamental o desenvolvimento de novas metodologias para a análise de própolis, principalmente da própolis brasileira, com o intuito de não prejudicar os produtores da região sul e mesmo para estimular a produção de própolis nessa região, pois como foi observado neste trabalho, as propriedades biológicas destas própolis foram consideradas as mais promissoras até o presente momento.

4.4. Determinação da Atividade Antimicrobiana dos Extratos Etanólicos de Própolis

A atividade antimicrobiana da própolis sobre os microorganismos patogênicos Gram positivos *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Streptococcus mutans* IB 1600 foi realizada utilizando-se o material preparado como descrito no item 3.5. O microorganismo *S. aureus*, foi escolhido por ser o agente responsável pela maioria das infecções do trato respiratório e de septicemia, e o microorganismo *S. mutans* por ser o responsável pela formação da placa bacteriana, ocasionando o surgimento de cárie (KOO, 1999).

Como observa-se na Tabela 5, a maioria dos extratos etanólicos de própolis selecionadas inibiu o crescimento da linhagem de *S. aureus* quando colocado em contato com este microorganismo. As amostras SP11, SP12, MG13, MG14 e RJ15 apresentaram as maiores atividades inibitórias. Verificou-se durante o decorrer dos experimentos que esta linhagem tem maior sensibilidade quando em contato com as própolis que apresentam o perfil cromatográfico em camada delgada como pode ser observado na Figura 1.

Tabela 5. Atividade antimicrobiana dos extratos etanólico das amostras selecionadas de própolis contra bactérias patogênicas *S. aureus* ATCC 29213 e *S. mutans* IB 1600. Medida da inibição do crescimento bacteriano através da formação do halo ao redor do disco.

Amostras de própolis	Halo de inibição (mm) <i>Staphylococcus aureus</i> *	Halo de inibição(mm) <i>Streptococcus mutans</i> #
	ATCC 29213	IB1600
RS1	nd	-
RS2	nd	<1
RS3	1	3
RS4	nd	<1
RS5	nd	-
PR6	<1	<1
PR7	1,5	3
PR8	nd	<1
PR9	2	<1
PR10	<1	nd
SP11	2	nd
SP12	2	<1
MG13	3	nd
MG14	1	nd
RJ15	4	1

nd – não detectado

* linhagem gentilmente doada pelo Laboratório de Patologia Clínica do HC da UNICAMP.

linhagem gentilmente doada pelo Dr. J. A. Cury, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

No entanto, esses extratos analisados não apresentaram os mesmos efeitos sobre o microrganismo *S. mutans* IB1600. Para essa linhagem, as amostras RS3 e PR7 foram as que demonstraram as maiores atividades inibitórias. Os resultados obtidos neste estudo também foram comprovados em outros dois trabalhos anteriores, realizados *in vitro* por PARK *et al.* (1998) em que foram testadas a atividade antimicrobiana e a inibição da enzima glicosiltransferase bruta de *Streptococcus mutans* e, em um estudo *in vivo* realizado posteriormente por KOO *et al.* (1999). No trabalho desenvolvido por estes últimos autores a própolis com o perfil RS3 e PR7 foi testada determinando-se que a concentração inibitória mínima (CIM) para *S. mutans* variou de 50 a 100 µg/mL, resultado este que pode

ser considerado superior quando comparado com a própolis com o perfil cromatográfico das amostras SP11 a RJ15, cujos valores de CIM variaram entre 200 a 400 µg/mL para o mesmo microrganismo.

Alguns compostos responsáveis pela atividade antimicrobiana já foram identificados em trabalhos anteriores. A galangina, pinocembrina, benzil- ρ -cumarato, entre outros, são compostos conhecidos pela sua ação antibiótica (VILLANUEVA *et al.*, 1964; VILLANUEVA *et al.*, 1970; DIMOV *et al.*, 1992). Atualmente, com o estudo mais intensivo das própolis brasileiras, foram descritos que outros compostos fenólicos, como os derivados do ácido cinâmico, também possui excelente atividade antimicrobiana. AGA *et al.* (1994) isolaram e identificaram de amostras de própolis brasileira coletadas no Estado de São Paulo, três novos compostos derivados do ácido cinâmico, sendo que o ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (comercialmente conhecido como Artepillin C) apresentou maior atividade antimicrobiana com valores de CIM de 15,6; 31,3 e 15,6 µg/mL para os microrganismos *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes* e *Arthroderma benhamiae*, respectivamente. Os autores relataram que essa atividade está associada ao número de resíduo prenil existente na molécula, sendo que quanto maior o seu número, maior será a atividade biológica. Outros compostos já estudados que apresentaram atividade antimicrobiana em própolis brasileira foram os ácidos diterpênicos (BANKOVA *et al.* 1996a). Segundo os autores, esses diterpenos com atividade bactericida foram encontrados pela primeira vez em própolis e são típicos de algumas espécies de araucária, o que leva a concluir ser essa planta uma das fontes de obtenção de matéria-prima para fabricação da própolis.

Analisando a composição química dos extratos etanólicos de própolis (EEP) das amostras PR7 e MG13 verificou-se que na primeira foi identificado um grande número de flavonóides agliconas, entre eles, pinocembrina, galangina, pinobanksina, conhecidos por possuírem atividade antimicrobiana. Já no EEP MG13, foi identificado um número menor destes compostos, o que pode explicar em parte a sua menor atividade antimicrobiana contra *S. mutans*. Porém, esta mesma própolis possui maior atividade contra *S. aureus*, mostrando que esses flavonóides agem de forma distinta sobre os microrganismos testados. De acordo com AGA *et al.* (1994), na própolis de São Paulo existe o composto 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico que possui alta atividade microbicida, que poderia estar inibindo o crescimento do *S. aureus*.

Assim, uma vez realizada a classificação, torna-se possível determinar qual dessas própolis poderia ser utilizada para o combate de um determinado microrganismo, uma vez que a sua atividade é seletiva.

Diversos trabalhos atribuem à própolis a característica de ser um excelente produto antimicrobiano natural, tanto sobre fungos e leveduras como sobre as bactérias, principalmente as Gram positivas. Segundo BANKOVA *et al.* (1999), que testaram amostras de própolis de diferentes países, inclusive própolis brasileira, concluíram que a atividade antimicrobiana corresponde a uma característica intrínseca à própolis, uma vez que a sua função primordial é servir como barreira microbiológica. No entanto, algumas amostras coletadas neste trabalho (RS1 e RS5), não apresentaram qualquer atividade antimicrobiana sobre *S. aureus* e nem sobre *S. mutans*. Existe, porém, a possibilidade de haver atividade inibitória sobre outros microrganismos que não foram testadas. Para os dois microrganismos testados nesse trabalho, a própolis provavelmente tem uma atuação mais como uma barreira física do que propriamente uma proteção biológica.

4.5. Atividade Antioxidante dos Extratos Etanólicos de Própolis

A atividade antioxidante dos extratos selecionados de própolis foi determinada de acordo com o método descrito no item 3.6. O princípio deste método baseia-se na descoloração (oxidação) do β -caroteno induzida pelos produtos da degradação oxidativa de um ácido graxo, no caso o ácido linoléico, que foi acompanhada através de um ensaio espectrofotométrico. A manutenção da cor alaranjada do β -caroteno foi acompanhada em espectrofotômetro utilizando-se tubos testes contendo os respectivos extratos. O efeito antioxidante da própolis pode ser observado na Tabela 6.

Tabela 6. Atividade antioxidante dos extratos etanólicos das amostras selecionadas de própolis medida através da descoloração (oxidação) do β -caroteno induzidas pelos produtos da degradação oxidativa do ácido linoléico.

Amostras de própolis	Inibição da oxidação do β -caroteno (%) [#]
Controle	19,0 ^e
RS1	90,5 ^{abc}
RS2	93,6 ^{abc}
RS3	95,9 ^a
RS4	95,0 ^{ab}
RS5	65,5 ^d
PR6	95,1 ^{ab}
PR7	91,6 ^{abc}
PR8	91,7 ^{abc}
PR9	93,8 ^{abc}
PR10	95,1 ^{ab}
SP11	92,8 ^{abc}
SP12	88,7 ^{abc}
MG13	88,0 ^{bc}
MG14	86,1 ^c
RJ15	88,8 ^{abc}

[#]Médias seguidas de letras diferentes são significativas a nível de 5% (Teste de Tukey $P < 0,05$).

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que a maioria das amostras apresentou alta atividade antioxidante, variando na faixa entre 86,1 a 95,1% da manutenção da coloração, que representa a atividade antioxidante, após 3 horas de reação. Praticamente não houve diferença estatisticamente significativa entre as amostras. Porém, no controle sem própolis a absorbância decresceu até 20% da sua coloração inicial. Apenas uma amostra (RS5) apresentou diferença significativa ao nível de 5% pelo teste de Tukey, com uma atividade antioxidante relativamente baixa (65,5%), o que pode ser explicado pela menor quantidade de compostos fenólicos presentes que atuam, efetivamente, como agentes antioxidantes como pode ser observado nas Figuras 1 e 4.

Esse resultado já era esperado uma vez que a própolis é formada basicamente por

compostos fenólicos, cuja atividade antioxidante é bastante conhecida, sendo que alguns destes compostos existentes já foram estudados. Um composto derivado do ácido caféico, o benzil cafeato, foi isolado em amostra de própolis coletada na cidade de Beijing, na China e apresentou forte atividade antioxidante (YAMAUCHI *et al.*, 1992). É interessante salientar que nesse estudo foi testada uma amostra de própolis brasileira de procedência desconhecida que apresentou baixa atividade antioxidante e após seu fracionamento verificou-se que não existia essa substância na sua composição, enquanto que na amostra chinesa quantificaram 160 mg de benzil cafeato/g de bálsamo. Num outro estudo, desenvolvido por KROL *et al.* (1990) avaliou-se a propriedade antioxidante do extrato etanólico de própolis (EEP) através da inibição da quimiluminescência da oxidação do luminol, constatando-se que o EEP inibiu acima de 80% da quimiluminescência quando 0,13 mg de própolis foi utilizando.

Recentemente, HAYASHI *et al.* (1999) isolaram de uma própolis brasileira um novo composto denominado ácido 3,4-dihidroxi-5-prenilcinâmico que possui uma atividade antioxidante maior que o ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepillin C), composto bastante comum em própolis brasileira.

4.6. Inibição da Atividade da Enzima Hialuronidase pelos Extratos Etanólicos de Própolis

A resposta inflamatória pode ser desencadeada a partir de estímulos diversos podendo ser caracterizada como uma resposta tríplice onde ocorre, primeiramente, um eritema primário, decorrente da dilatação dos microvasos atingidos; posteriormente, um eritema secundário promovido pela dilatação de microvasos adjacentes, e, em seguida, a formação do edema em consequência do aumento da permeabilidade vascular e saída de material plasmático e celular para o local afetado. Todo esse processo acontece devido à liberação de mediadores inflamatórios tais como histaminas, serotonina, bradicinina e eicosanóides (prostaglandinas). Esta última é formada a partir da hidrólise dos fosfolipídios presente na membrana celular pela ação da enzima fosfolipase A2. Um dos produtos formados pela ação da fosfolipase A2 é o ácido araquidônico. Por sua vez, este ácido graxo pode sofrer a ação de duas enzimas, a lipoxigenase e as cicloxigenases (COX 1 e COX2). Pela ação da lipoxigenase são formados os leucotrienos e pela ação das cicloxigenases são formadas as prostaglandinas. Além das prostaglandinas, um outro composto conhecido

como mediador do processo inflamatório é a histamina. Sabe-se que a liberação da histamina é induzida pelo influxo de íons cálcio para o interior das células, nos mastócitos, no caso de tecidos e, nos basófilos, no caso de sangue, através dos canais de cálcio e estes íons desencadeiam uma série de reações enzimáticas ainda não totalmente esclarecidas (BENDITT & ARASE, 1959; LICHTENS & DEBERNAR, 1971; BACH, 1974). Acredita-se que a hialuronidase seja uma das principais enzimas que participa dessas reações enzimáticas e alguns autores estudaram a possibilidade de modular a sua atividade utilizando drogas associada à liberação de histamina, tais como o composto 48/80, que apresenta propriedade de ativação da hialuronidase, e agentes anti-alérgicos acídicos, tais como o cromoglicato disódio (DSCG), o ácido *N*-(trans-3,4-dimetoxicinamoil) antranílico (conhecido como tranilast) que são compostos inibidores de histamina em células de mamíferos induzida pela reação antígeno IgE anticorpo, que, quando testadas apresentaram-se como potentes inibidores da hialuronidase (KAKEGAWA *et al.*, 1985; KAKEGAWA *et al.*, 1992).

O ácido hialurônico é uma macromolécula de natureza proteoglicana caracterizada pela suas cadeias altamente polimerizadas formadas, por unidades de ácido glucurônico e N-acetilglicosamina ligadas à proteína (ARKINS & SHEEHAN, 1972). Esse ácido exerce importante papel na lubrificação das articulações, diminuindo o atrito e permitindo maior facilidade de movimento. A ausência desse polissacarídeo nas articulações pode causar um desgaste das cartilagens e, conseqüentemente, um desgaste ósseo, desencadeando o processo inflamatório e dor, descrito anteriormente. Portanto, a inibição da enzima hialuronidase pode ser uma forma indireta para a determinação da atividade antiinflamatória. Desta forma, a importância da inibição da enzima hialuronidase está relacionada com a sua ação catalítica na hidrólise do ácido hialurônico e por outras atividades fisiológicas relacionadas ao processo inflamatório.

Além dessa metodologia, existem, na literatura, outros modelos para a determinação da atividade antiinflamatória, muitos deles baseados em modelos vivos nos quais são induzidas inflamações de diferentes níveis, utilizando-se substâncias geradoras de inflamação. Nestes casos, outros mecanismos que fazem parte do processo fisiológico da inflamação são analisados.

Os resultados da inibição da atividade da hialuronidase estão apresentados na Tabela 7. De acordo com esses resultados, verificou-se que a atividade inibitória da enzima hialuronidase foi menor nas amostras RS1 e RS4 que apresentaram um perfil em

cromatografia em camada delgada semelhantes, como pode ser observado na Figura 1.

As amostras que apresentaram maior atividade inibitória foram PR7 e PR9 seguidas pelas maioria das amostras selecionadas na região sudeste. Essa atividade inibitória pode ser explicada pela presença de derivados do ácido cinâmico nessas amostras. Segundo KAKEGAWA *et al.* (1985), o tranilast, uma droga obtida pela modificação química de derivados do ácido cinâmico, apresentou uma potente atividade inibitória da hialuronidase.

Tabela 7. Inibição da enzima hialuronidase pelos extratos etanólicos das amostras selecionadas de própolis.

Amostras de própolis	Inibição da enzima hialuronidase (%) [#]
RS1	11,7 ^{gh}
RS2	20,0 ^d
RS3	25,7 ^{bc}
RS4	7,7 ^h
RS5	12,6 ^{fg}
PR6	20,3 ^d
PR7	34,7 ^a
PR8	21,7 ^{de}
PR9	40,0 ^a
PR10	12,9 ^{fg}
SP11	15,5 ^{ef}
SP12	24,1 ^{cd}
MG13	19,2 ^d
MG14	27,1 ^b
RJ15	22,1 ^{cd}

[#]Médias seguidas de letras diferentes são significativas a nível de 5% (Teste de Tukey P<0,05)

Os diferentes trabalhos realizados para determinação da atividade antiinflamatória de própolis tentaram desvendar os mecanismos envolvidos nesse processo. KHAYYAL *et al.* (1993), foram um dos primeiros autores a verificar que, em vários modelos *in vitro*, os extratos etanólicos de própolis apresentaram inibição da agregação plaquetária e da síntese de eicosanóides, sugerindo que a própolis possui uma potente propriedade antiinflamatória. Além dos testes *in vitro*, os autores testaram ainda dois modelos *in vivo* concluindo que o extrato de própolis atuou sobre a síntese de prostaglandinas, histaminas e leucotrienos,

diminuindo a sua liberação e, conseqüentemente, atenuando o processo inflamatório. O efeito antiinflamatório foi atribuída ao fato da própolis agir como inibidor das cicloxigenase (COX) e da lipoxigenase, que estão presentes na maioria dos processos inflamatórios conhecidos.

A partir deste trabalho outros autores também estudaram essa propriedade biológica da própolis, cada qual utilizando modelos diferentes. Entre eles GONZALEZ *et al.* (1994); GONZALEZ *et al.* (1995); MIRZOEVA & CALDER (1996); BASNET *et al.* (1996a); BASNET *et al.* (1996b); MIYATAKA, *et al.* (1997); MIYATAKA *et al.* (1998); MENEZES *et al.* (1999).

4.7. Determinação da Atividade Citotóxica dos Extratos Etanólicos de Própolis

A imensa procura por drogas antineoplásicas (anticancerígenas) reflete a importância que essa doença tem nos tempos atuais. As estimativas realizadas pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) com relação às taxas brutas de incidência, de mortalidade e de número de casos novos e de óbitos por câncer, em homens e mulheres, podem ser observadas nas Tabelas 8 e 9.

Tabela 8. Estimativas para o ano 2000 das taxas brutas de incidência e mortalidade por 100.000 e de número de casos novos e de óbitos por câncer, em homens, segundo localização primária.

Localização Primária	Estimativa dos Casos Novos		Estimativa dos Óbitos	
	Nº de Casos	Taxa Bruta	Nº de Óbitos	Taxa Bruta
Neoplasia maligna da Pele não Melanoma	21.895	26,81	402	0,47
Neoplasia maligna da Traquéia, Brônquios e Pulmão	14.460	17,69	10.290	12,61
Neoplasia maligna do Estômago	13.680	16,76	7.090	8,66
Neoplasia maligna da Próstata	14.830	18,14	6.850	8,34
Neoplasia maligna do Cólon e Reto	7.399	9,07	3.172	3,86
Neoplasia maligna do Esôfago	6.608	8,42	3.968	4,83
Leucemias	3.826	4,68	2.311	2,68
Neoplasia maligna da Boca	8.282	10,09	2.471	2,99
Outras Localizações	47.775	58,46	24.968	30,55
Total	138.755	169,78	61.522	75,28

Fonte: Instituto Nacional do Câncer.

Tabela 9. Estimativas para o ano 2000 das taxas brutas de incidência e mortalidade por 100.000 e de número de casos novos e de óbitos por câncer, em mulheres, segundo localização primária.

Localização Primária	Estimativa dos Casos Novos		Estimativa dos Óbitos	
	Nº de Casos	Taxa Bruta	Nº de Óbitos	Taxa Bruta
Neoplasia maligna da Pele não Melanoma	20.410	24,17	267	0,31
Neoplasia maligna da Mama Feminina	28.340	33,58	8.245	9,78
Neoplasia maligna da Traquéia, Brônquios e Pulmão	5.622	6,66	4.232	4,97
Neoplasia maligna do Estômago	6.180	7,30	3.610	4,24
Neoplasia maligna do Colo do Útero	17.251	20,48	3.606	4,25
Neoplasia maligna do Cólon e Reto	6.074	7,19	3.563	4,24
Neoplasia maligna do Esôfago	2.333	2,74	1.194	1,40
Leucemias	3.000	3,52	1.880	2,19
Neoplasia maligna da Boca	2.608	3,05	606	0,73
Outras Localizações	53.632	63,55	25.234	29,90
Total	145.450	172,36	52.437	62,14

Fonte: Instituto Nacional do Câncer.

As células cancerosas distinguem-se das células normais por apresentarem as seguintes características: proliferação incontrolada, perda da função, poder invasivo e metástase. Essas características malignas surgem em decorrência de uma alteração do DNA, principalmente, por causa da inativação de alguns genes denominados supressores tumorais e, também, devido a ativação dos chamados proto-oncogenes em oncogenes, que são genes que conferem malignidade a uma célula.

As drogas empregadas no combate ao câncer atuam de diversas maneiras sobre as células cancerosas, basicamente, na síntese e replicação do DNA e no processo de divisão celular. Drogas como nitrosouréia, bussulfan, ciclofosfamida (agentes alquilantes); metotrexato, fluotouracil, citarabina (antimetabólitos); doxorubicina, epirubicina, mitozantrone (antibióticos citotóxicos) e vincristina, etopósido, taxol (derivados de plantas) são alguns exemplos de fármacos anticâncer. No entanto, a utilização desses medicamentos provoca efeitos colaterais tais como toxicidade à medula óssea, distúrbio da cicatrização, depressão do crescimento, esterilidade, teratogenicidade, alopecia (queda de cabelo) e danos ao epitélio gastrointestinal, e ainda, náuseas e vômitos intensos. Desta forma, a procura por drogas que atuem somente sobre as células neoplásicas e que causem menos efeitos colaterais é extremamente necessária.

A determinação da atividade citotóxica dos extratos etanólicos de própolis foi realizada de acordo com a metodologia descrita no item 3.8, sendo os resultados

apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Determinação da atividade citotóxica dos extratos etanólicos de própolis sobre diferentes células cancerosas humanas. Quando a inibição foi menor que 50% na maior concentração testada (30 $\mu\text{g/mL}$), a porcentagem de inibição observada é dada em parênteses. Os valores estão apresentados em ED-50 ($\mu\text{g/mL}$) que tem, por definição, a concentração do agente teste necessário para reduzir em 50% o número de células cancerosas com relação a um controle (sem tratamento).

Amostra	KB	A549	HCT-8	1A9	MCF-7	EH-118MG
RS5	22,0	23,0	>30 (48)	15,2	>30 (43)	>30 (26)
VP-16	0,1	1,2	3,0	ND	3,0	ND

ND = não detectado

Entre as amostras testadas, a RS 5 foi a única que apresentou atividade citotóxica. As demais amostras apresentaram atividade abaixo da concentração mínima testada, de forma que não foram apresentadas na Tabela 10. No entanto, a droga utilizada como padrão positivo (etoposídeo VP-16) apresentou atividade bastante superior. O etoposídeo é um derivado semi-sintético da podofilotoxina, obtido a partir do rizoma e da raiz da mandrágora-americana (*Podophyllum peltatum* L.). Essa droga é largamente utilizada comercialmente, atuando sobre as células cancerosas inibindo a síntese de DNA por uma ação sobre a topoisomerase II. Essa enzima, uma DNA-girase, realiza um giro reversível em torno do filamento de replicação da hélice do DNA para impedir que a molécula se enovele irremediavelmente durante a segregação mitótica. A topoisomerase II indenta ambas as hélices de DNA e, posteriormente, fecha novamente as rachaduras. O etoposídeo intercala-se ao DNA e seu efeito é basicamente o de estabilizar o complexo DNA-topoisomerase II, após as hélices serem indentadas, fazendo assim com que o processo cesse nesse ponto (RANG *et al.*, 1997).

Porém, mesmo a atividade citotóxica da amostra sendo inferior ao padrão testado, o resultado obtido foi bastante satisfatório uma vez que a amostra testada encontrava-se no estado bruto e ainda, o perfil de atividade foi diferente daquele da droga padrão, o que sugere um mecanismo de ação ainda desconhecido, necessitando estudos complementares.

Em estudos realizados por SCHELLER *et al.* (1989) foi verificado que ratos com carcinoma de Ehrlich tratados com extratos etanólicos de própolis apresentaram maior sobrevivência (55%) que aqueles tratados com bleomicina (40%) após 50 dias de tratamento. Os autores concluíram que o efeito antitumoral da própolis era devido a presença de flavonóides que inibiam a síntese de DNA das células cancerosas.

Diversos outros autores estudaram a atividade da própolis e seus constituintes sobre diferentes células cancerosas (HLÁDON *et al.*, 1980; MATSUNO, 1995; MITAMURA *et al.*, 1996), sendo que, um dos constituintes mais estudado foi o CAPE (ácido caféico fenetil éster) primeiramente descrito por GRUNBERGER *et al.* (1988). Em seguida, outros autores comprovaram a sua atividade antitumoral através de vários trabalhos (FRENKEL *et al.*, 1993; RAO *et al.*, 1993; SU *et al.*, 1994; CHIAO *et al.*, 1995; JAISWAL *et al.*, 1997).

Em estudos mais recentes, BANSKOTA *et al.* (1999) após identificar 23 compostos em própolis brasileira, verificaram que 3 deles apresentavam alta atividade citotóxica. Os compostos betuletol, kanferide, coniferil aldeído e ermanin apresentaram valores de ED-50 que variaram de 5,83 a 2,30 µg/mL para fibrosarcoma HT-1080 e 10,44 a 4,95 µg/mL para carcinoma de cólon 26-L5.

Comparando os resultados obtidos por BANSKOTA *et al.* (1999) e os dados obtidos neste trabalho, verificou-se que o extrato etanólico da própolis RS5 (Tabela 8) atuou sobre diferentes células cancerosas nas concentrações entre 15,2 µg/mL (carcinoma de ovário) a >30 µg/mL (glioma transformado de vírus), enquanto que o extrato metanólico do trabalho destes autores atuou na faixa entre 62,35 a 67,33 µg/mL sobre as células cancerosas testadas.

Conclusões

5. CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos foi possível concluir que:

- 1- Através dos perfis de cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE), foram classificadas pelo menos 7 tipos diferentes de própolis nos Estados do Paraná e do Rio Grande do Sul;
- 2- A constituição química da própolis varia conforme a vegetação do local onde se encontra o apiário, sendo que mesmo em locais distantes, porém com vegetação semelhante, é possível produzir própolis com as mesmas características;
- 3- O método de avaliação de qualidade da própolis com base na determinação de flavonóides totais utilizando nitrato de alumínio é bastante falho, uma vez que existe uma grande variedade de própolis no Brasil que não se enquadra com esse método de análise mas que, no entanto, apresentam propriedades biológicas extremamente satisfatórias;
- 4- Para cada tipo específico de própolis pode ser atribuída uma propriedade biológica particular, sendo possível, através de estudos mais detalhados, direcionar o uso da própolis para uma finalidade terapêutica específica;
- 5- A amostra coletada na cidade de Bagé – RS, apresentou atividade citotóxica contra diferentes células cancerosas através de um mecanismo ainda desconhecido que estimula a realização de estudos posteriores.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACKERMANN, T. Fast chromatographic study of propolis crudes. **Food Chem.**, 42, 135-138, 1991.
- AGA, H.; SHIBUYA, T.; SUGIMOTO, T.; KURIMOTO, M.; NAKAJIMA, S. Isolation and Identification of Antimicrobial Compounds in Brazilian Propolis. **Biosci. Biotech. Biochem.**, 58(5), 945-946, 1994.
- AMOROS, M.; SAUVAGER, F.; GIRRE, L.; CORMIER, M. In vitro antiviral activity of propolis. **Apidologie**, 23, 231-240, 1992a.
- AMOROS M, SIMOES CMO, GIRRE L, SAUVAGER F, CORMIER M Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes-simplex virus type-1 in cell-culture - comparison with the antiviral activity of propolis. **J. Nat. Prod.**, 55, 1732-1740, 1992b.
- AMOROS, M.; LURTON, E.; BOUSTIE, J.; GIRRE, L.; SAUVAGER, F.; CORMIER, M. Comparison of the anti-herpes simplex virus activities of propolis and 3-methyl-but-2-enyl caffeate. **J. Nat. Prod.**, 57, 644-647, 1994.
- ARAI, S. Studies on functional foods in Japan - State of the art. **Biosci. Biotech. Biochem.**, 60 (1): 9-15, 1996.
- ARKINS, E.; SHEEHAN, J. Structure of hyaluronic acid. **Nature New Biol.**, 235, 253, 1972.
- ARONSON, N. N.; DAVIDSON, E. A. Lysosomal hyaluronidase from rat liver. **J. Biol. Chem.**, 242, 437-440 (1967).
- BACH, M. K. Molecular theory to explain mechanisms of allergic histamine-release. **J. Theor. Biol.**, 45(1), 131-151, 1974.
- BANKOVA, V.S.; POPOV, S. S.; MAREKOV, N. L. Isopentenyl cinnamates from poplar buds and propolis. **Phytochemistry**, 28(3), 871-873, 1989.
- BANKOVA, V.S.; DYULGEROV, A.; POPOV, S. S.; EVSTATIEVA, L.; KULEVA, L.; PUREB, O.; ZAMJANSAN, Z. Propolis produced in Bulgaria and Mongolia – phenolic compounds and plant-origin. **Apidologie**, 23(1), 79-85, 1992a.
- BANKOVA, V.S.; POPOV, S. S.; MAREKOV, N. L. High performance liquid chromatography analysis of flavonoids from propolis. **J. Chromatogr.**, 242(1), 135-143, 1992b.

- BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; KUJUMGIEV, A.; MARCUCCI, M. C.; POPOV, S. Chemical-composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. **Z. Naturforsch. C**, 50, 167-172, 1995.
- BANKOVA, V. S.; MARCUCCI, M. C.; SIMOVA, S.; NIKOLOVA, N.; KUJUMGIEV, A.; POPOV, S. S. Antibacterial diterpenic acids from Brazilian propolis. **Z. Naturforsch. C**, 51, 277-280, 1996a.
- BANKOVA, V.; NIKOLOVA, N.; MARCUCCI, M. C. New lignan from Brazilian propolis **Z. Naturforsch. C**, 51, 735-737, 1996b.
- BANKOVA, V. S.; BOUDOUROVA-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, 1998a.
- BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; MARCUCCI, C.; POPOV, S. Constituents of Brazilian geopropolis. **Z. Naturforsch. C**, 53, 402-406, 1998b.
- BANKOVA, V.; BOUDOUROVA-KRASTEVA, G.; 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 **Z. Naturforsch. C**, 54, 401-405, 1999.
- BANKOVA, V. S.; DE CASTRO, S. L.; MARCUCCI, M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, 31(1), 3-15, 2000.
- BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; PRASAIN, J. K.; MATSUSHIGE, K.; SAIKI, I.; KADOTA, S. Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities. **J. Nat. Prod.**, 61, 896-900, 1998.
- BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, 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. **J. Ethnopharmacol.**, 72, 239-246, 2000.
- BASNET, P.; MATSUSHIGE, K.; HASE, K.; KADOTA, S.; NAMBA, T. Potent antihepatotoxic activity of dicaffeoyl quinic acids from propolis. **Biol. Pharm. Bull.**, 19(4), 655-657, 1996a.
- 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 model. **Biol. Pharm. Bull.**, 19(11), 1479-1484, 1996b.

- BENDITT, E. P.; ARASE, M. An enzyme in mast cells with properties like chymotrypsin. **J. Exp. Med.**, 110(3), 451-460, 1959.
- BLAIR, J. E.; BORMAN, E.K.; BYONE, E.T.; UPDYKE, E. L.; WILLIAMS, R. E. O. Hospital acquired staphylococcal disease, recommended procedures for laboratory investigation, Atlanta, Ga., **Public Health Service**, United States, Department of Health, Education and Welfare, 1958.
- Boletim Informativo da Associação Japonesa de Saúde e Nutrição – **Kenkoshyokuhin Kikaku Kijun no Koshi** – Standard of Propolis as Food, 6, 8-10, 1994.
- BONVEHÍ, J. S.; COLL, F. V.; JORDÁ, R. E. The Composition, active components and bacteriostatic activity of propolis in dietetics. **JAOCs.**, 71(5), 529-532, 1994.
- BONVEHÍ, J. S.; COLL, F. V. Phenolic composition of propolis from China and from South-America. **Z. Naturforsch.**, 49, 712-718, 1994.
- BONVEHÍ, J. S.; COLL, F. V. Study on propolis quality from China and Uruguay. **Z. Naturforsch. C**, 55, 778-784, 2000.
- BOUDOUROVAKRASTEVA, G.; BANKOVA, V. S.; SFORCIN, J. M.; NIKOLOVA, N.; POPOV, S. S. Phenolics from Brazilian propolis. **Z. Naturforsch. C**, 52, 676-679, 1997.
- BYRNE, M. Nutraceuticals: Food fad or future trend. **Food Engine.**, 19 (1), 42-43, 1994.
- CHEN, J. H.; SHAO, Y.; HUANG, M. T.; CHIN, C. K.; HO, C. T. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on human leukemia HL-60 cells. **Cancer Lett.**, 108(2), 211-214, 1996.
- CHIAO, C.; CAROTHERS, A. M.; GRUNBERGER, D.; SOLOMON, G.; PRESTON, G. A.; BARRETT, J. C. Apoptosis and altered redox state induced by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in transformed rat fibroblast cells. **Cancer Res.**, 55, 3576-3583, 1995.
- CHRISTOV, R.; BANKOVA, V.; HEGAZI, A.; ABD EL HADY, F.; POPOV, S. Chemical composition of Egyptian propolis. **Z. Naturforsch. C**, 53, 197-200, 1998.
- CIZMARIK, J.; MATEL, I. Examination of chemical composition of propolis .1. Isolation and identification of 3,4-dihydroxycinnamic acid (caffeic acid) from propolis. **Experientia**, 26, 713, 1970.
- DEBIAGGI, M.; TATEO, F.; PAGANI, L.; LUINI, M.; ROMERO, E. Effects of propolis flavonoids on virus infectivity and replication. **Microbiologica**, 13, 207-213, 1990.

- DIMOV, V.; IVANOVSKA, N.; BANKOVA, V.; NIKOLOV, N.; POPOV, S. Immunomodulatory action of propolis: IV. Prophylactic activity against gram-negative infections and adjuvant effect of water-soluble derivate. **Vaccine**, 10, 817-823, 1992.
- FRENKEL, K.; WEI, H.; BHIMANI, R.; YE J., ZADUNAISKY, J. A.; HUANG, M. T.; FERRARO, T.; CONNEY, A. H.; GRUNBERGER, D. Inhibition of tumor promoter-mediated processes in mouse skin and bovine lens by caffeic acid phenethyl ester. **Cancer Res.**, 53, 1255-1261, 1993.
- GARCIA-VIGUERA, C.; GREENAWAY, W.; WHATLEY, F. R. Composition of propolis from 2 different Spanish regions. **Z. Naturforsch. C**, 47, 634-637, 1992.
- GARCIA-VIGUERA, C.; FERRERES, F.; TOMASBARBERAN, F. A. study of Canadian propolis by GC-MS and HPLC. **Z. Naturforsch. C**, 48, 731-735, 1993.
- GHISALBERTI, E. L. Propolis: A review. **Bee World**, 60, 59-84, 1979.
- GINANNESCHINI, M.; ACCIAI, M. C.; SERTOLI, A.; BRACCI, S. Propolis allergy – Synthesis and patch testing of γ , γ - dimethylallyl caffeic acid ester and its o-methyl derivatives. **Contact Dermat.**, 19, 296-303, 1989.
- GONZALEZ, R.; REMIREZ, D.; RODRIGUEZ, S.; GONZALES A.; ANCHETA, O.; MERINO, N.; PASCUAL, C. Hepatoprotective effects of propolis extract on paracetamol-induced liver damage in mice. **Phytotherapy Res.**, 8, 229-232, 1994.
- GONZALEZ, R.; CORCHO, I.; REMIREZ, D.; RODRIGUEZ, S.; GONZALES, A.; ANCHETA O.; MERINO, N.; PASCUAL, C. Hepatoprotective effects of propolis extract on carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. **Phytotherapy Res.**, 9, 114-117, 1995.
- GREENAWAY, W.; SCAYSBROOK, T.; WHATLEY, F.R. The composition and plant origins of propolis: a report of work at Oxford. **Bee World**, 71, 107-118 (1990).
- GREENAWAY, W.; MAY, J.; SCAYSBROOK, T.; WHATLEY, F. R. Identification by gas chromatography - mass spectrometry of 150 compounds in propolis. **Z. Naturforsch. C**, 46, 111-121, 1991.
- GRUNDBERGER, D.; BARNERJEE, R.; EISINGER, K.; OLTZ, E. M.; EFROS, L., CALDWELL M.; ESTEVEZ, V.; NAKANISHI, K. Preferential cytotoxicity on tumor cell by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. **Experientia**, 44, 230-232, 1988.
- HLADON, B.; BYLKA, W.; ELLNAINWOJTASZEK, M.; SKRZYPCZAK, L.; SZAFAREK, P.; CHODERA, A.; KOWALEWSKI, Z. In vitro studies on the cytostatic activity of propolis extracts. **Arzneimittel Forsch.**, 30-2, 1847-1848, 1980.

- HAMMERSCHMIDT, P. A.; PRATT, D. E. Phenolic antioxidants of dried soybeans. **J. Food Sci.**, 43, 556-559, (1978).
- HARISH, Z.; RUBINSTEIN, A.; GOLODNER, M.; ELMALIAH, M.; MIZRACHI, Y. Suppression of HIV-1 replication by propolis and its immunoregulatory effect. **Drug. Exp. Cli. Res.**, 23, 89-96, 1997.
- HAUMANN, B. F. Designing foods - Manipulating foods to promote health. **INFORM**, 4(4), 344-356, 1993.
- HAUSEN, B.M.; WOLLWNWEBER, E.; SENFF, H.; POST, B. Propolis allergy. 2. The sensitizing properties of 1,1-dimethylallyl caffeic acid ester. **Contact. Dermat.**, 17, 171-177, 1987.
- HAVSTEEN, B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. **Biochem. Pharmacol.**, 32, 1141-1148, 1983.
- HAYASHI, K.; KOMURA, S.; ISAJI, N.; OHISHI, N.; YAGI, K. Isolation of antioxidative compounds from Brazilian propolis: 3,4-dihydroxy-5-prenylcinnamic acid, a novel potent antioxidant. **Chem. Pharm. Bull.**, 47(11), 1521-1524, 1999.
- HEGAZI, A. G.; ABD EL HADY, F. K.; ABD ALLAH, F. A. M. Chemical composition and antimicrobial activity of European propolis. **Z. Naturforsch. C**, 55, 70-75, 2000.
- ILHAN, A.; KOLTUKSUZ, U.; OZEN, S.; UZ, E.; CIRALIK, H.; AKYOL, O. The effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on spinal cord ischemia/reperfusion injury in rabbits. **Eur. J. Cardio-Thoracic Sur.**, 16(4), 458-463, 1999.
- IKENO, K.; IKENO, T.; MIYAZAWA, C. Effects of propolis on dental caries in rats. **Caries. Res.**, 25, 347-351, 1991.
- JASIWAL, A. K.; VENUGOPAL, R.; MUCHA, J.; CAROTHERS, A. M.; GRUNBERGER, D. Caffeic acid phenethyl ester stimulates human antioxidant response element-mediated expression of the NAD(P)H:quinone oxidoreductase (*NQO1*) gene. **Cancer Res.**, 57, 440-446, 1997.
- JOHNSON, K. S.; EISCHEN, F. A.; GIANNASI, D. E. Chemical-composition of North-American bee propolis and biological-activity towards larvae of greater wax moth (Lepidoptera, Pyralidae). **J. Chem. Ecol.**, 20, 1783-1791, 1994.
- JURD, L.; GEISSMAN, T. A. Absorption spectra of metal complex of flavonoid compounds. **J. Org. Chem.**, 21, 1395-1401, 1956.
- JURD, L. Aluminum complexes of phenolic flavones. Spectral and structural correlations. **Phytochemistry**, 8, 445-462, 1969.

- KHAYYAL, M. T.; ELGHAZALY, M. A.; ELKHATIB, A. S. Mechanisms involved in the antiinflammatory effect of propolis extract. **Drug. Exp. Cli. Res.**, 19(5), 197-203, 1993.
- KAKEGAWA, H.; MITSUO N.; MATSUMOTO, H.; SATOH, T.; AKAGI, M.; TASAKA, K. Hyaluronidase-inhibitory and anti-allergic activity of the photo-irradiated products of tranilast. **Chem. Pharm. Bull.**, 33, 3738-3744, 1985.
- KAKEGAWA, H.; MATSUMOTO, H.; SATOH, T. Inhibitory effects of some natural-products on the activation of hyaluronidase and their antiallergic actions. **Chem. Pharm. Bull.**, 40, 1439-1442, 1992.
- KIMOTO, T.; ARAI S.; KOGUCHI, 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 Detect. Prev.**, 22(6), 506-515, 1998.
- KOO, M. H.; PARK, Y. K. Investigation of flavonoid aglycones in propolis collected by two different varieties of bees in the same region. **Biosc. Biotech. Biochem.**, 61(2), 367-369, 1992.
- KOO, M. H. Estudo dos flavonóides da própolis de *Apis mellifera* africanizada provenientes de diversas regiões do Brasil. **Dissertação de Mestrado** - Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas, 1996.
- KOO, H. Avaliação do potencial anti-cárie e anti-placa de própolis de *Apis mellifera* selecionadas de duas regiões do Brasil. **Tese de Doutorado** - Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Universidade Estadual de Campinas, 1999.
- KOO, H.; PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; CURY, J.A., ROSALEN, P.L. Effect of *Apis mellifera* propolis from two Brazilian regions on caries development in desalivated rats. **Caries Res.**, 33, 393-400, 1999.
- KOO, H.; SMITH, A. M. V.; BOWEN, W. H.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; PARK, Y. K. Effects of *Apis mellifera* propolis on the activities of streptococcal glucosyltransferases in solution and adsorbed onto saliva-coated hydroxyapatite. **Caries Res.**, 34, 418-426, 2000a.
- KOO, H.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; AMBROSANO, G. M. B.; MURATA, R. M.; YATSUDA, R.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M.; PARK, Y. K. Effect of a new variety of *Apis mellifera* propolis on mutans streptococci. **Cur. Microbiol.**, 41, 192-196, 2000b.

- KOO, H.; GOMES, B. P. F. A.; ROSALEN, P. L.; AMBROSANO, G. M. B.; PARK, Y. K.; CURY, J. A. In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. **Arch. Oral Biol.**, 45, 141-148, 2000c.
- KROL, W.; CZUBA, Z.; SCHELLER, S.; GABRYS, J.; GRABIEC, S.; SHANI, J. Antioxidant property of ethanolic extract of propolis (EEP) as evaluated by inhibiting the chemiluminescence oxidation of luminol. **Biochem. Internat.**, 21, 593-597, 1990.
- KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, Y.; BANKOVA, V.; CHRISTOV, R. POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **J. Ethnopharmacol.**, 64, 235-240, 1999.
- LEE, Y. J.; LIAO, P. H.; CHEN, W. K.; YANG, C. C. Preferential cytotoxicity of caffeic acid phenethyl ester analogues on oral cancer cells. **Cancer Lett.**, 153, 51-56, 2000.
- LICHTENS, L. M.; DEBERNAR, R. Immediate allergic response - in-vitro action of cyclic AMP-active and other drugs on 2 stages of histamine release. **J. Immunol.**, 107(4), 1131, 1971.
- MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R. **The systematic identification of flavonoids**, Springer Verlag, Berlin, 1970.
- MARCUCCI, M. C. Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, 26(2), 83-99, 1995.
- MARCUCCI, M. C.; RODRIGUEZ, J.; FERRERES, F.; BANKOVA, V.; GROTO, R.; POPOV, S. Chemical composition of Brazilian propolis from São Paulo State. **Z. Naturforsch. C**, 53, 117-119, 1998.
- MARCUCCI, M. C.; FERRERES, F.; CUSTODIO, A. R.; FERREIRA, M. M.C.; BANKOVA, V. S.; GARCIA-VIGUERA, C.; BRETZ, W. A. Evaluation of phenolic compounds in Brazilian propolis from different geographic regions **Z. Naturforsch. C**, 55, 76-81, 2000.
- MARTOS, I.; COSSENTINI, M.; FERRERES, F.; TOMASBARBERAN, F. A. Flavonoid composition of Tunisian honeys and propolis. **J. Agric. Food Chem.**, 45, 2824-2829, 1997.
- MATSUDA, S. H. Propolis – health care food. **Foods and Foods Ingred. J. Jap.**, 160, 64-73, 1994.
- MATSUNO, T. A new clerodane diterpenoid isolated from propolis. **Z. Naturforsch. C**, 50, 93-97, 1995.

- 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 Res.**, 17(5A), 3565-3568, 1997a.
- MATSUNO, T.; MATSUMOTO, Y.; SAITO, M.; MORIKAWA, J. Isolation and characterization of cytotoxic diterpenoid isomers from propolis. **Z. Naturforsch. C**, 52, 702-704, 1997b.
- MATSUNO, T.; SAITO, M.; MATSUMOTO, Y.; MORIKAWA, J. A new benzo-gamma-pyrone derivative isolated from propolis. **Z. Naturforsch. C**, 53, 1037-1039, 1998.
- MENEZES, H.; ALVAREZ, J. M.; ALMEIDA, E. Mouse ear edema modulation by different propolis ethanol extracts. **Arzneimittel Forsch.**, 49(8), 705-707, 1999.
- MIRZOEVA, O. K.; CALDER P. C. The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response. **Prostag. Leukotr Ess.**, 55(6), 441-449, 1996.
- MITAMURA, T.; MATSUNO, T.; SAKAMOTO, S.; MAEMURA, M.; KUDO, H.; SUZUKI, S.; KUWA, K.; SASSA, S.; NAKAYAMA, T.; NAGASAWA, H.; YOSHIMURA, S. Effects of a new clerodane diterpenoid isolated from propolis on chemically induced skin tumors in mice. **Anticancer Res.** 16(5A), 2669-2672, 1996.
- MIYATAKA, H.; NISHIKI, M.; MATSUMOTO, H.; FUJIMOTO, T.; MATSUKA, M.; SATOH, T. Evaluation of propolis .1. Evaluation of Brazilian and Chinese propolis by enzymatic and physico-chemical methods. **Biol. Pharm. Bull.**, 20(5), 496-501, 1997.
- MIYATAKA, H.; NISHIKI, M.; MATSUMOTO, H.; FUJIMOTO, T.; MATSUKA, M.; ISOBE, A.; SATOH, T. Evaluation of propolis II: Effects of Brazilian and Chinese propolis on histamine release from rat peritoneal mast cells induced by compound 48/80 and concanavalin A. **Biol. Pharm. Bull.**, 21(7), 723-729, 1998.
- MSTAT-C. A microcomputer program for the design, management and analysis of agronomic research experiments. Norway: MSTAT Distribution, n.p., 1988.
- NEGRI, G.; MARCUCCI, M. C.; SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F. Hydrocarbons and monoesters of propolis waxes from Brazil. **Apidologie**, 29(4), 305-314, 1998.
- NEGRI, G.; MARCUCCI, M. C.; SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F. Comb and propolis waxes from Brazil: Triterpenoids in propolis waxes. **J. Apicult. Res.**, 39, 86-88, 2000.

- PARK, Y. K.; KOO, M. H.; SATO, H. H.; CONTADO, J. L. Estudo de alguns componentes da própolis coletada por *Apis mellifera* no Brasil. **Arq. Biol. Tecnol.**, 38(4), 1253-1259, 1995.
- 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. **Arq. Biol. Tecnol.**, 40(1), 97-106, 1997.
- PARK, Y. K.; KOO, M. H.; ABREU, J. A. S.; IKEGAKI, M.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L. Antimicrobial Activity of Propolis on oral microorganism. **Cur. Microbiol.**, 34, 24-28, 1998.
- PARK, Y. K.; KOO, M. H.; OLIVEIRA, I. M. A. Biochemical characteristics of osmophilic yeasts isolated from pollens and honey. **Biosci. Biotech. Biochem.**, 60(11), 1872-1873, 1996.
- PRATT, D. E.; PAULA, M. B. Source of antioxidant activity of soybeans and soy products. **J. Food Sci.**, 44, 1720-1722, 1979.
- PRATT, D. E.; WATTS, B. M. The antioxidant activity of vegetable extracts. I: Flavone aglycones. **J. Food Sci.**, 29, 27-31, 1964.
- PSZCZOLA, D. E. Designer foods: An evolving concept. **Food. Technol.**, 47 (3), 92, 1993.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. Farmacologia. 3 ed. São Paulo: Editora GuanabaraKoogan, 1997. p. 692
- RAO, C. V.; DESAI, D.; RIVENSON, A.; SIMI, B.; AMIN, S.; REDDY, B. S. Inhibitory effect of caffeic acid esters on azoxymethane-induced biochemical changes and aberrant crypt foci formation in rat colon. **Cancer Res.**, 53, 4182-4188, 1995.
- REISSING, J. L.; STROMINGER, J. L.; LELOIR, L. F. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. **J. Biol. Chem.**, 217, 959-966, 1955.
- ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e Farmacobiotechnologia**. Editorial Premier, São Paulo, 1997.
- RUBINSTEIN, L. V.; SHOEMAKER, R. H.; PAUL, K. D.; SIMON, R. M.; TOSINI, S.; SHEKAN, P.; SCUDIERO, D. A. MONKS, A.; BOYD, M. R. Comparison of *in vitro* anticancer-drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor-cell lines. **J. Natl. Cancer Inst.**, 82, 1113-1118, 1990.

- RUBIO, O. C.; CUELLAR, A. C.; ROJAS, N.; CASTRO, H. V.; RASTRELLI, L.; AQUINO, R. A polyisoprenylated benzophenone from Cuban propolis. **J. Nat. Prod.**, 62(7), 1013-1015, 1999.
- SCHELLER, S.; STOJKO A.; SZWARNOWIECKA I.; TUSTANOWSKI, J.; OBUSZKO, Z. Biological properties and clinical application of propolis.VI. Investigation of the influence of ethanol extracts of propolis (EEP) on cartilaginous tissue regeneration. **Arzneimittel Forsch.**, 27, 2138-2140, 1977.
- SERKEDJIEVA, J.; MANOLOVA, N.; BANKOVA, V. Antiinfluenza virus effect of some propolis constituents and their analogs (esters of substituted cinnamic-acids). **J. Nat. Prod.**, 55, 294-297, 1992.
- SFORCIN, J. L.; FERNANDES JR, A.; LOPES, C. A. M.; BANKOVA, V.; FUNARI, S. R. C. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **J. Ethnopharmacol.**, 73, 243-249, 2000.
- SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **J. Natl. Cancer Inst.**, 82, 1107-1112, 1990.
- SU, Z.; LIN, J.; GRUNBERGER, D.; FISHER, P. B. Growth suppression and toxicity induced by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in type 5 adenovirus-transformed rat embryo cells correlate directly with transformation progression. **Cancer Res.**, 54, 1865-1870, 1994.
- TAZAWA, S.; WARASHINA, T.; NORO, T.; MIYASE, T. Studies on the constituents of Brazilian propolis. **Chem. Pharm. Bull.**, 46(9), 1477-1479, 1998.
- TAZAWA, S.; WARASHINA, T.; NORO, T. Studies on the constituents of Brazilian propolis. II. **Chem. Pharm. Bull.**, 47(10), 1388-1392, 1999.
- TOMAS-BARBERAN, F. A.; GARCIA-VIGUEIRA, C.; VIT-OLIVEIRA, P.; FERRERES, F.; TOMAS-LORENTE, F. Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. *Phytochemistry*, 34, 191-196, 1993.
- TULEY, L. Functional Foods - The technical issues. **Food Manufacture**, 70 (4), 30-32, 1995.

- VALCIC, S.; MONTENEGRO, G.; MUJICA, A. M.; AVILA, G.; FRANZBLAU, S.; SINGH, M. P.; MAIESE, W. M.; TIMMERMAN, B. N. Phytochemical, morphological, and biological investigations of propolis from Central Chile. **Z. Naturforsch. C**, 54, 406-416, 1999.
- VELIKOVA, M.; BANKOVA, V.; SORKUN, K.; HOUCINE, S.; TSVETKOVA, I.; KUJUMGIEV, A. Propolis from the mediterranean region: Chemical composition and antimicrobial activity. **Z. Naturforsch. C**, 55(9-10), 790-793, 2000.
- VILLANUEVA, V. R.; BARBIER, M.; GONNET, M.; LAVIE, P. Les flavonoides de la propolis. Isolement d'une nouvelle substance bacteriostatique: la pinocembrine. **Annals Inst. Pasteur Paris**, 118, 84-87, 1970.
- VILLANUEVA, V. R.; BOGDANOVSKY, D.; BARBIER, M.; GONNET, M.; LAVIE, P. Sur l'identification de la 3,5,7-trihydroxy flavone (galangine) à partir de la propolis. **Annals Inst. Pasteur Paris**, 106, 292-302, 1964.
- VYNOGRAD, N.; VYNOGRAD, I.; SOSNOWSKI, Z. A comparative multi-centre study of the efficacy of propolis, acyclovir and placebo in the treatment of genital herpes (HSV). **Phytomedicine**, 7, 1-6, 2000.
- YAMAUCHI, R.; KATO, K.; OIDA, S.; KANEDA, J.; UENO, Y. Benzyl caffeate, an antioxidative compound isolated from propolis. **Biosci. Biotech. Biochem.**, 56(8), 1321-1322, 1992.
- WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **J. Apicult. Res.**, 37(2), 99-105, 1998.
- WOLLENWEBER, E.; ASAKAWA, Y.; SCHILLO, D.; LEHMANN, U.; WIGEL, H. Novel caffeic acid derivative and other constituents of Populus bud excretion and propolis (bee-glue). **Z. Naturforsch. C**, 42(9-10), 1030-1034, 1987.

Preparation of Water and Ethanolic Extracts of Propolis

Preparation and Evaluation of Water and Ethanolic Extracts of Propolis

Masaharu IKEGAKI and Yong Kun PARK

*State University of Campinas, College of Food Engineering (UNICAMP), 13081-970,
Caixa Postal 6177, Campinas, SP, Brasil*

Corresponding author: Yong K. Park

Synopsis.

Propolis was extracted using water and various concentrations of ethanol as solvents. The extracts were investigated by measurement of their absorption spectra with a UV spectrophotometer, reversed phase-high pressure thin-layer chromatography and reversed phase-HPLC. Maximum absorption of all extracts was at 290 nm, resembling flavonoid compounds, and the 80% ethanolic extract showed highest absorption at 290 nm. Greater quantities of isosakuranetin, quercetin and kaempferol were extracted from the propolis using 60% ethanol, while 70% ethanol extracted more pinocembrin and sakuranetin, and 80% ethanol extracted more kaempferide, acacetin and isorhamnetin. The 60 to 80% ethanolic extracts of propolis strongly inhibited microbial growth and the 70 and 80% ethanolic extracts showed the greatest antioxidant activity. The 80% ethanolic extract strongly inhibited hyaluronidase activity.

Key words: propolis; flavonoids; *Apis mellifera*; ethanolic extract

Propolis is bee glue, collected by bees from various plant sources. Bees mix the original propolis with beeswax and β -glucosidase which they secrete while collectiong the propolis. This hydrolyzes the flavonoid glycosides into flavonoid aglycones. The propolis is used by bees as a glue to seal the opening of the hives and to eliminate outside invaders.¹⁻
³⁾ Various polyphenolic compounds have been identified in the propolis collected by *Apis mellifera*. The main polyphenols are flavonoids, accompanied by phenolic acids and their esters, phenolic aldehydes, alcohols, and ketones.⁴⁾ It is also known that the ethanolic extracts of propolis have various pharmacological activities such as antibacterial, antiviral, antifungal, anaesthetic, anti-inflammatory, hypotensive, immunostimulatory and cytostatic properties.^{5,6)} Therefore, the medical applications of propolis preparations have led to an increased interest in its chemical composition as well as to its origin.

Recently, propolis preparations have been used for the production of health foods and cosmetics. These propolis preparations are ethanolic extracts of propolis and rarely water extracts. Therefore, the objective of this work was to investigate concentrations of flavonoid aglycones in ethanolic extracts of propolis in relation to the ethanol concentration as an organic solvent. The ethanolic extracts were also compared with a water extract of propolis. Finally, both water and ethanolic extracts of propolis were evaluated for their antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory activities.

Approximately 100 g of propolis collected by *Apis mellifera* were obtained directly from bee hives in the state of Minas Gerais, Brazil. The specimens of propolis were stored immediately in an ice box at 4°C and kept at this temperature for one week. They were then dehydrated under vacuum and the dried propolis ground to a fine powder. Ethanolic extracts of propolis (EEP) were prepared by adding 2 g of the specimens of propolis to 25 ml of 10 - 95% ethanol in test tubes (3 x 30 cm) and shaking at 70°C for 30 min. After extraction, the mixture was centrifuged to obtain the supernatant. The various ethanolic

extracts of propolis were used in this study. On the other hand, a water extract of propolis (WEP) was prepared as described by Matsushige *et al.*⁷⁾ The appearances of the WEP and the 10 to 50% EEP presented a yellow color and the 60% EEP was a greenish yellow. As the percentage of ethanol further increased, so this green color became deeper and deeper.

The absorption spectra of the propolis extracts were prepared using mixtures of 25 μ l of the extracts and 30 ml of 80% ethanol, the mixtures being scanned at wavelengths between 200-500 nm by UV spectrophotometer. The absorption spectra of WEP and EEP showed similar peaks, with maximum absorption at 290 nm. However, the degree of absorption at 290 nm was variable, depending on the ethanol concentration. WEP showed the lowest absorption, and with the EEP, the absorption increased with increasing concentration of ethanol up to 80%. The EEP obtained with 90 and 95% ethanol showed decreasing absorption at 290 nm. Previously, it was reported that the appearance of absorption bands in the range from 270-330 nm was attributable to flavonoids and phenols.^{8,9)} Therefore, these results indicate that the highest concentrations of flavonoids were liberated from the propolis when using 80% ethanol. On the other hand, mixtures of EEP, aluminium nitrate and potassium acetate, which were prepared as described in references 10 and 11, changed the spectrum completely, with the production of a new peak with maximum absorption at 310 nm. The change in maximum absorption was due to the formation of metal (aluminium) complexes with the flavonoids. Most of the naturally-occurring compounds of the flavonoids are polyphenols which contain one or more of the O-dihydroxyl and the hydroxy-keto groups that are involved in the complex formation with metals. The formation of metal-flavonoid complexes induces a shift in the maximum absorption spectrum.^{10,11)} It was shown that the sample from the 80% EEP contained the highest concentrations of flavonoids.

A quantitative analysis of the flavonoids was done by RP-HPLC, using a chromatograph equipped with a YMC PACK ODS-A column. The mobile phase was acetic acid:methanol:water (5:75:60, by v/v) and the flow rate was 1 ml/min and detection with a diode array detector. Chromatograms were recorded at 254 nm. The quantities of flavonoids in the extracts of propolis were calculated by using authentic standards of flavonoids purchased from Extrasynthese A.A. Co., France. An HPLC analysis of the WEP did not show any flavonoids peaks, except for traces of quercetin and pinocembrin, but increasing concentrations of ethanol produced large peaks of flavonoids. Identification of the flavonoids was confirmed by single peaks when the sample was co-injected with authentic flavonoid standards and the quantities of flavonoids were also estimated by using authentic standards. Figure 1 illustrates the relationship between the quantities of flavonoids in the EEP and the percentage of ethanol. It was noted that 60% ethanol extracted the most isosakuranetin, quercetin, and kaempferol from the propolis, the amounts then decreased with further increases in the ethanol concentrations, while the most pinocembrin and sakuranetin were extracted with 70% ethanol. Furthermore the highest concentrations of kaempferide, acacetin, and isorhamnetin were extracted when 80% ethanol was used.

An examination of propolis sensitivity to pathogenic bacteria was done by inoculating an actively growing nutrient broth culture of pathogenic *Staphylococcus aureus* in to nutrient agar plates with sterile swabs which were dipped in broth culture and applied to the extracts of propolis disk on the inoculated plate, and incubated overnight at 37°C. The extracts of propolis disks were prepared by submerging Whatman filter paper n° 3 (5 x 1 mm) in the extracts of propolis and drying them under low vacuum at room temperature overnight, and then incubating at 60°C for 4 h.¹²⁾ The results of the test for the sensitivity of the propolis samples to *Staphylococcus aureus* are shown in Table 1. The samples of WEP

and 10 and 20% EEP did not inhibit microbial growth but 30% EEP inhibited it slightly (0.5 mm zone of inhibition). Sixty to 80% EEP strongly inhibited microbial growth (1.5 mm zone of inhibition), then inhibition decreased with increasing ethanol concentrations. In fact, Metzner *et al.*¹³⁾ reported that flavonoids such as galangin, pinocembrin, and pinobanksin inhibited *Bacillus* sp, *Staphylococcus aureus*, *Candida* sp, etc. As shown in Figure 1, sixty to 80% EEP extracted the highest pinocembrin concentration.

The antioxidant activity was measured by the coupled oxidation of β -carotene and linoleic acid as described in references 14, 15 and 16. The results of the examination for antioxidant activity are illustrated in Figure 2. These results indicated that all the samples of WEP and EEP showing antioxidant ability, and that 70 and 80% EEP demonstrated the greatest antioxidant activity, followed by the 90, 60, 50 and 40% EEP in that order, the WEP and 20% EEP showed the lowest antioxidant activity. The antioxidant activity of the WEP and EEP is due to the presence of flavonoids. The antioxidant ability of flavonoid compounds has been well established in the literature.¹⁴⁻¹⁶⁾ We intend to isolate the individual flavonoids and find out which of the flavonoids act as antioxidants.

The inhibition of hyaluronidase activity was measured as described in references 17 and 18. The inhibitory effects of the WEP and EEP on hyaluronidase activity were investigated and the results are shown in Figure 3. It is apparent that the 80% EEP showed the highest inhibition of hyaluronidase activity, then decreased with increasing ethanol concentration, while WEP and 10% EEP did not inhibit the enzyme activity. Previously it was reported that hyaluronidase activity is related to an inflammatory process of animal tissues.^{19,20)} From these results, we intend to verify further that the inhibition of hyaluronidase activity really acts as an anti-inflammatory action in the next step.

References

- 1) Greenaway, W., Scaysbrook, T., and Whatley, F.R., The composition and plant origins of propolis: a report of work at Oxford. *Bee World*, **71**, 107-118 (1990).
- 2) Bonhevi, J. S., Cole, F. V., and Jordá, R. E., The composition, active components and bacteriostatic activity of propolis in dietetics. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **71**, 529-532 (1994).
- 3) Meyer, W., 'Propolis bees' and their activities. *Bee World*, **37**, 25-28 (1956).
- 4) Bankova, V., Christov, R., Stoev, G., and Popov, S., Determination of phenolic from propolis by capillary gas chromatography. *J. Chromatogr.*, **607**, 150-153 (1992).
- 5) Ghisalberti, E. L., Propolis: A review. *Bee World*, **60**, 59-84 (1979).
- 6) Bankova, V., Popov, S., and Marekov, N. L., Isopentenyl cinnamates from poplar buds and propolis. *Phytochemistry*, **28**, 871-873 (1989).
- 7) Matsushige, K., Basnet, P., Hase, K., Kadota, S., Tanaka, K., and Namba, T., Propolis protects pancreatic β -cells against the toxicity of streptozotocin (STZ). *Phytomedicine*, **3**, 139-145 (1996).
- 8) Markham, K. R., Ultraviolet-visible absorption spectroscopy. In "Techniques of Flavonoid Identification", Academic Press, pp. 36-51 (1982).
- 9) Kuno, K., Analysis of propolis and its quality evaluation. *Fragrance J.*, **83**, 36-39 (1987).
- 10) Jurd, L. and Geissman, T. A., Absorption spectra of metal complex of flavonoid compounds. *J. Org. Chem.*, **21**, 1395-1401 (1956).
- 11) Porter, L. J. and Markham, K. H., The unsuitability of ethanol as a solvent for the spectroscopic detection of functional groups in hydroxyflavones with aluminium chloride. *Phytochemistry*, **9**, 1363-1365 (1970).

- 12) Griffith, L. J., Bacterial sensitivity testing. In "Gradwohl's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis", Vol. 1, 6th Ed., eds. Frankel, S. and Reitman, S., C. V. Mosby Co., Saint Louis, pp. 706-716 (1963).
- 13) Metzner, J.; Bekemeier, H., Paintz, M., and Schneidewind, E., Zur antimicrobiellen Wirksamkeit von Propolis und Propolisinhaltsstoffen. *Pharmazie*, **34**, 97, (1979).
- 14) Hammerschmidt, P. A., and Pratt, D. E., Phenolic antioxidants of dried soybeans. *J. Food Sci.*, **43**, 556-559 (1978).
- 15) Pratt, D. E., and Paula, M. B., Source of antioxidant activity of soybeans and soy products. *J. Food Sci.*, **44**, 1720-1722 (1979).
- 16) Pratt, D. E. and Watts, B. M., The antioxidant activity of vegetable extracts. I: Flavone aglycones. *J. Food Sci.*, **29**, 27-31 (1964).
- 17) Aronson, N. N., and Davidson, E. A., Lysosomal hyaluronidase from rat liver. *J. Biol. Chem.*, **242**, 437-440 (1967).
- 18) Reissing, J. L., Strominger, J. L., and Leloir, L. F., A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. *J. Biol. Chem.*, **217**, 959-966 (1955).
- 19) Kakegawa, H., Matsumoto, H., and Satoh, T., Inhibitory effects of some natural products on the activation of hyaluronidase and their antiallergic actions. *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 1439-1442 (1992).
- 20) Miyataka, H., Nishiki, M., Matsumoto, H., Fujimoto, T., Matsuka, M., and Satoh, T., Evaluation of propolis. I. Evaluation of Brazilian and Chinese propolis by enzymatic and physico-chemical methods. *Biol. Pharm. Bull.*, **20**, 496-501 (1997).

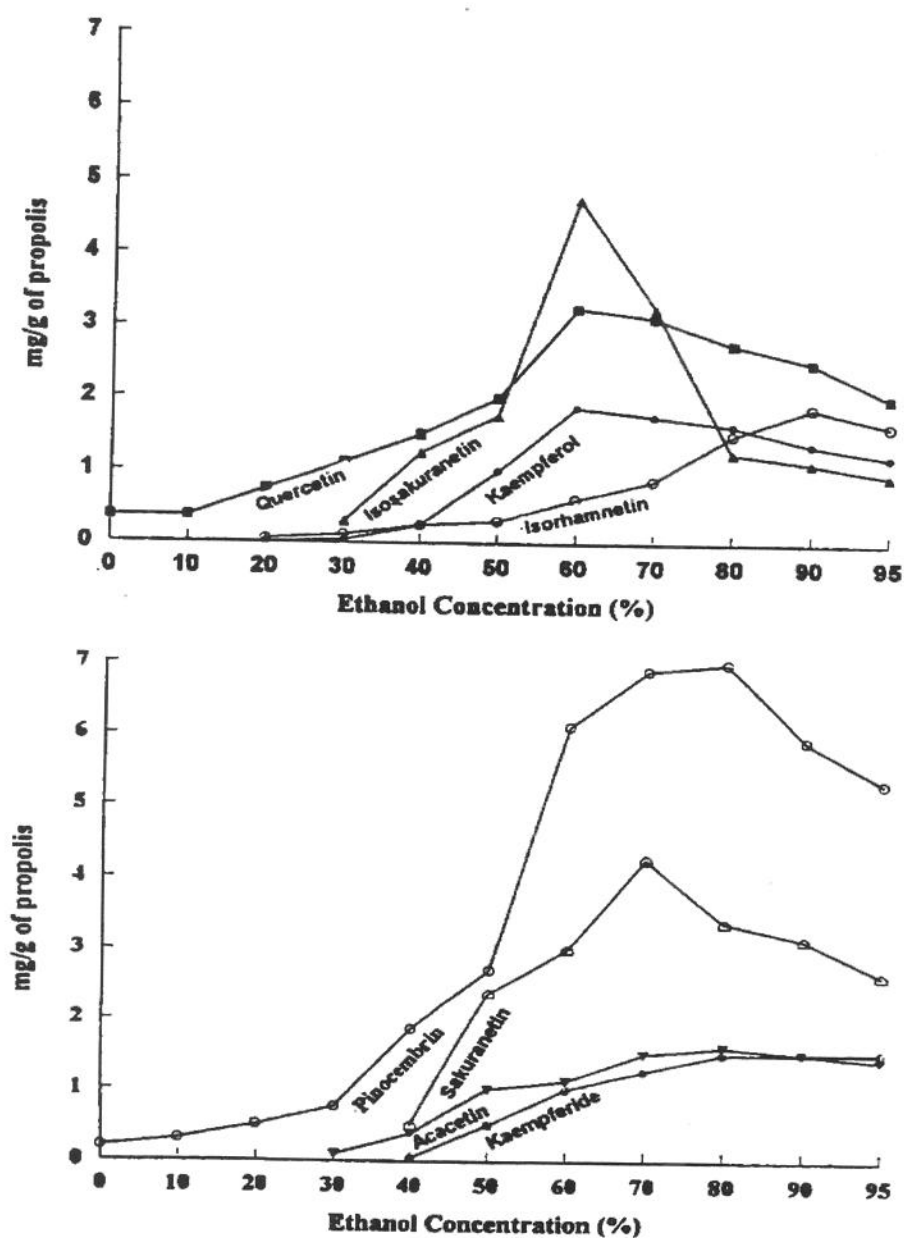


Fig. 1. Relationship between Quantities of Flavonoids in the Ethanolic Extracts of Propolis and the Percentage of Ethanol. The experimental method is described in the text.

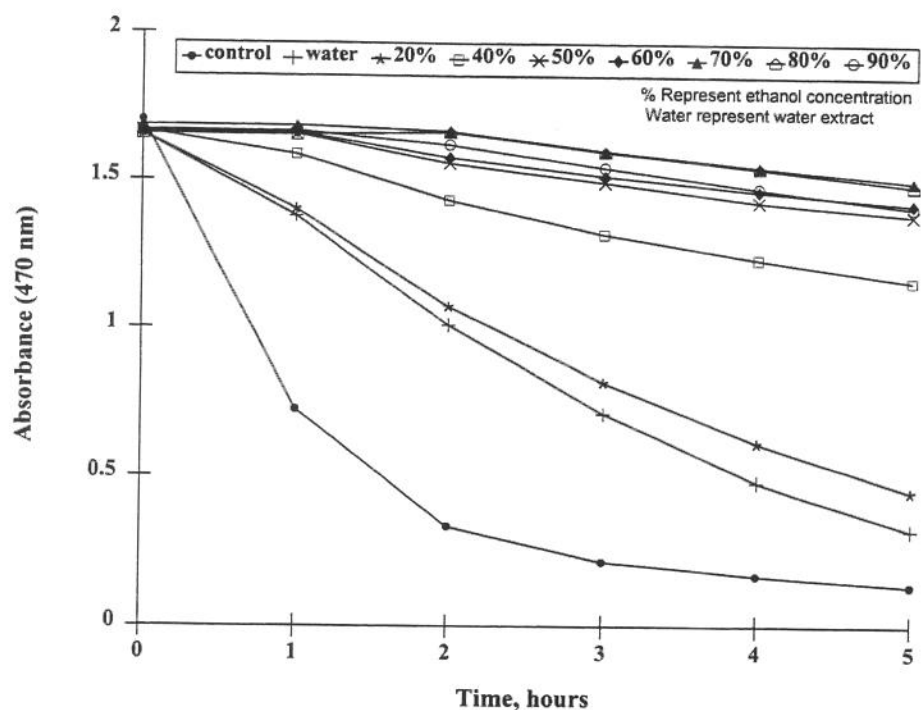


Fig. 2. Antioxidant Activity of Water and Ethanolic Extracts of Propolis. Mixtures of 0.5-ml of respective propolis extracts and 5.0-ml samples of the emulsion, which contained linoleic acid, Tween 40 and β -carotene as substrate, were incubated at 40°C and the absorption at 470 nm read in the spectrophotometer.

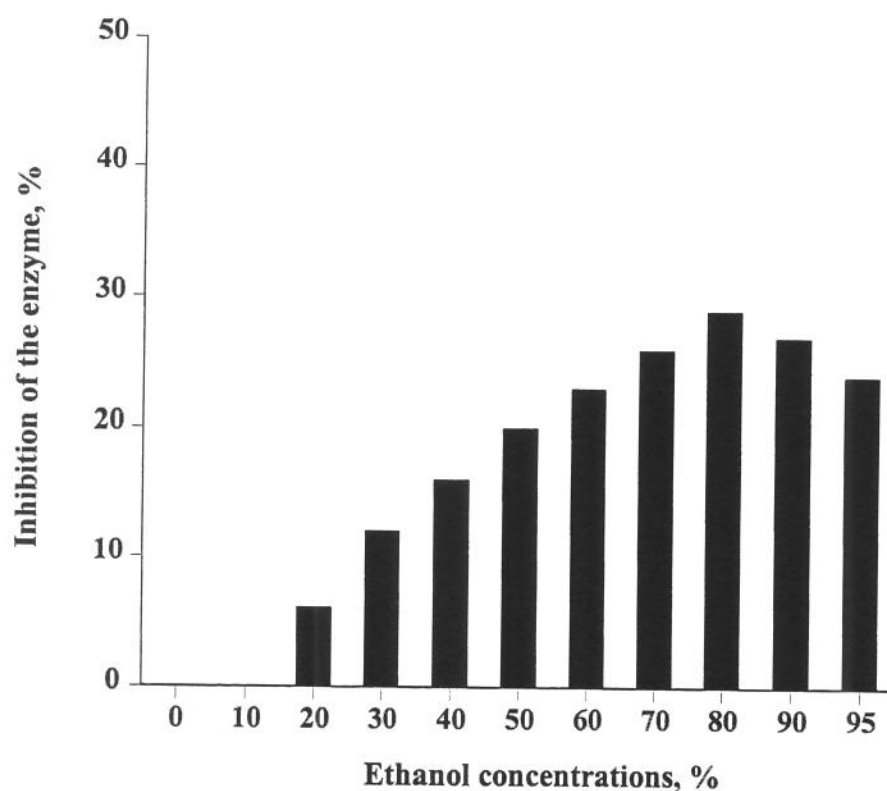


Fig. 3. Inhibition of Hyaluronidase Activity by Water and Ethanolic Extracts of Propolis.

Mixtures of 50 μ l of the respective propolis extracts, 0.5-ml of 0.1 M acetate buffer, pH 3.6, which contained 0.6 mg potassium salt of hyaluronic acid (Sigma Co.) and 0.15 M NaCl, and 50 μ l of same buffer containing 350 units of hyaluronidase (Type IV-S: from bovine testes, Sigma Co.) were incubated at 37°C for 40 min. After incubation, 0.1-ml of 0.8 M potassium tetraborate was added and the reaction mixtures were boiled for 3 min, and then 3-ml of *p*-dimethylaminobenzaldehyde added. After 20 min of reaction at 37°C, all tubes were measured for absorbance at 585 nm using water as a control. 0 - represents water extract.

Table 1. Antimicrobial Activity of Water and Ethanolic Extracts of Propolis to *Staphylococcus aureus*

Extracts of propolis	Zone of inhibition of microbial growth (mm)
water extract	0
10% ethanol	0
20% "	0
30% "	0.5
40% "	1.0
50% "	1.0
60% "	1.5
70% "	1.5
80% "	1.5
90% "	1.0
95% "	1.0

EVALUATION OF ETHANOLIC EXTRACTS OF PROPOLIS FROM BRAZIL AND KOREA BY PHYSICOCHEMICAL AND BIOLOGICAL METHODS

Masaharu Ikegaki & Yong K. Park

Abstracts

Four specimens of propolis, collected by *Apis mellifera*, were obtained from Southeastern and Southern Brazil and South Korea. The respective propolis were extracted with 80% ethanol. The ethanolic extracts of propolis (EEP) were analyzed by UV-spectrophotometer, reversed phase high performance thin layer chromatography (RP-HPTLC) and reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). RP-HPTLC indicated that the quality of the flavonoid aglycones of EEP from South Korea was closely similar to EEP from Southern Brazil, but different compared to the EEP from Southeastern Brazil. Eleven flavonoid aglycones were identified in the EEP from Southern Brazil and South Korea, whereas 6 flavonoid aglycones were identified in the EEP from Southeastern Brazil. The EEP from Southern Brazil and South Korea showed more inhibition of the growth of *Staphylococcus aureus* than EEP from Southeastern Brazil.

1. INTRODUCTION

Propolis is a resinous hive product collected by bees from tree buds and mixed with beeswax, which they secrete. It is used by bees as a glue to seal the opening of the hives (GHISALBERTI, 1979). Some authors affirm that bees modify the composition of the original propolis by the action of β -glucosidase, which they secrete while collecting the propolis. This hydrolyzes the flavonoid heterosides into flavonoid aglycones (BANKOVA *et al.*, 1992).

It is known that the ethanol extract of propolis exhibits various pharmacological activities such as antibacterial (BONHEVI *et al.*, 1994), antiviral (DEBIAGGI *et al.*, 1990), fungicidal (PEPELJNJAK *et al.*, 1982), immunostimulatory property (DIMOV *et al.*, 1998), local anesthetic (GHISALBERTI, 1979), anti-ulcer (KOROCHKIN *et al.*, 1986), anti-inflammation (MIYATAKA *et al.*, 1997) and anti tumoral activity (MATSUNO *et al.*,

1997). The medical applications of propolis preparations have led to an increased interest in its chemical composition as well as in its origin. So far, polyphenolic compounds have been mainly identified in the propolis collected by *Apis mellifera* in different regions. In some kinds of propolis, the main polyphenols are flavonoid aglycones, accompanied by phenolic acids and their esters, phenolic aldehydes, alcohols and ketones (GREENWAY *et al.*, 1990).

It was also found that the polyphenols of the propolis collected by *Apis mellifera* were qualitatively and quantitatively variable, depending on the regional plant ecology. A previous report on some components of Brazilian propolis, showed that the concentrations of total flavonoids and quality of the flavonoid aglycones were significantly variable, depending on the environmental plant ecology and the genetic variety of the bees (PARK *et al.*, 1997; KOO & PARK, 1997).

The objective of this research was to investigate the flavonoid aglycones of ethanolic extracts of propolis from Southeastern and Southern Brazil and South Korea. An attempt was also made to examine the ethanolic extracts of the propolis for antibacterial activity.

2. MATERIALS AND METHODS

Propolis. Approximately, 50g of propolis collected by *Apis mellifera*, were obtained from the States of Minas Gerais and São Paulo, both located in Southeastern Brazil, and the State of Rio Grande do Sul (Southern Brazil). Propolis from South Korea (SK) was collected near Taegu, Kyung-Buk. The specimens of propolis were dehydrated under vacuum and the dried propolis ground to a fine powder. In the case of propolis from Southern Brazil and Korea, they did not solidify and remained as highly viscous materials.

Preparation of ethanolic extracts of propolis (EEP). Two grams samples of propolis were mixed with 25 ml of 80% ethanol, and shaken at 70°C for 30 min. After extraction, the mixture was centrifuged to give the supernatants. These supernatants were used for this investigation.

Measurement of the absorption spectra of EEP using a UV-spectrophotometer. 25 μ L EEP were mixed with 30 mL of 80% ethanol, and the mixture scanned to obtain the absorption spectra with the range of wavelength between 200 ~ 400 nm using a UV-spectrophotometer.

Reversed phase high performance thin layer chromatography (HPTLC) of EEP. HPTLC precoated plates of silica gel RP-18 F₂₅₄S were purchased from Merck Co. EEP, 3 μ L or 5 μ L was applied to the lower edge of the plate, and ascending chromatography run using a mobile phase of ethanol : water (55:45, v/v). The detection of flavonoids was carried out using a UV detector at 366 nm.

Reversed phase high performance liquid chromatography (HPLC) of EEP. A quantitative analysis of the flavonoids was performed by reversed phase HPLC using a chromatograph equipped with a YMC PACK ODS-A column. The mobile phase was acetic acid : methanol : water (5:75:60, by vol.), the flow rate 1 mL/min and detection using a diode array detector. Chromatograms were recorded at 254 nm. The quantities of flavonoids in the extracts of propolis were calculated by using authentic standards of flavonoids purchased from Extrasyntheses A.A. Co., France.

Examination of propolis sensitivity to pathogenic bacteria. Actively growing nutrient broth cultures of pathogenic *Staphylococcus aureus* coagulase positive bacteria were inoculated in to nutrient agar plates with sterile swabs which were dipped in broth culture and applied to the extracts of propolis disk on the inoculated plate, and incubated overnight at 37°C. The extracts of propolis disks were prepared by submerging Whatman filter paper No. 3 (5 x 1 mm) in the extracts of propolis, drying at overnight at low vacuum and room temperature, and then incubating at 60°C for 4 hours (BLAIR *et al.*, 1958; PARK *et al.*, 1997).

III- RESULTS AND DISCUSSION

Most of the propolis preparations, which are commercially available in many countries, are ethanolic extracts of propolis, and these extracts are used as folk medicine or ingredients of functional foods. Unfortunately, the propolis preparations are used with knowledge of the exact chemical composition. As mentioned above, the propolis contained polyphenolic compounds, but the distributions of these compounds are variable depending on the plant ecology and genetic variety of the bees (PARK *et al.*, 1997; KOO & PARK, 1997). Therefore, we attempted to analysis the flavonoid aglycones in the ethanolic extracts of propolis from 4 different regions. In case of the propolis from SK, 5 samples of propolis were collected from different regions in SK. One sample from SK showed high amounts of flavonoids, whereas the rest of the samples showed only trace amounts of flavonoids. Therefore the samples which contained high amounts of flavonoids, were used in this study.

UV absorption spectra of EEP. The UV absorption spectra of 4 samples of EEP are shown in Fig. 1. Samples from SP and MG which are located in Southeastern Brazil, showed one main absorption band at 300 nm, whereas the SK (South Korea) and RS (Southern Brazil) samples also showed one main absorption band at 290 nm. Furthermore, the shape of the absorption band at 300 nm was similar, and the absorption band at 290 nm showed another type of similarity of shape as compared to the absorption band at 300 nm. It is also interesting that the colors of the ethanolic extract of propolis (EEP) from SK and RS are reddish brown but from SK is the denser than the others. Extracts from MG and SP are yellowish green and those from MG are denser than SP.

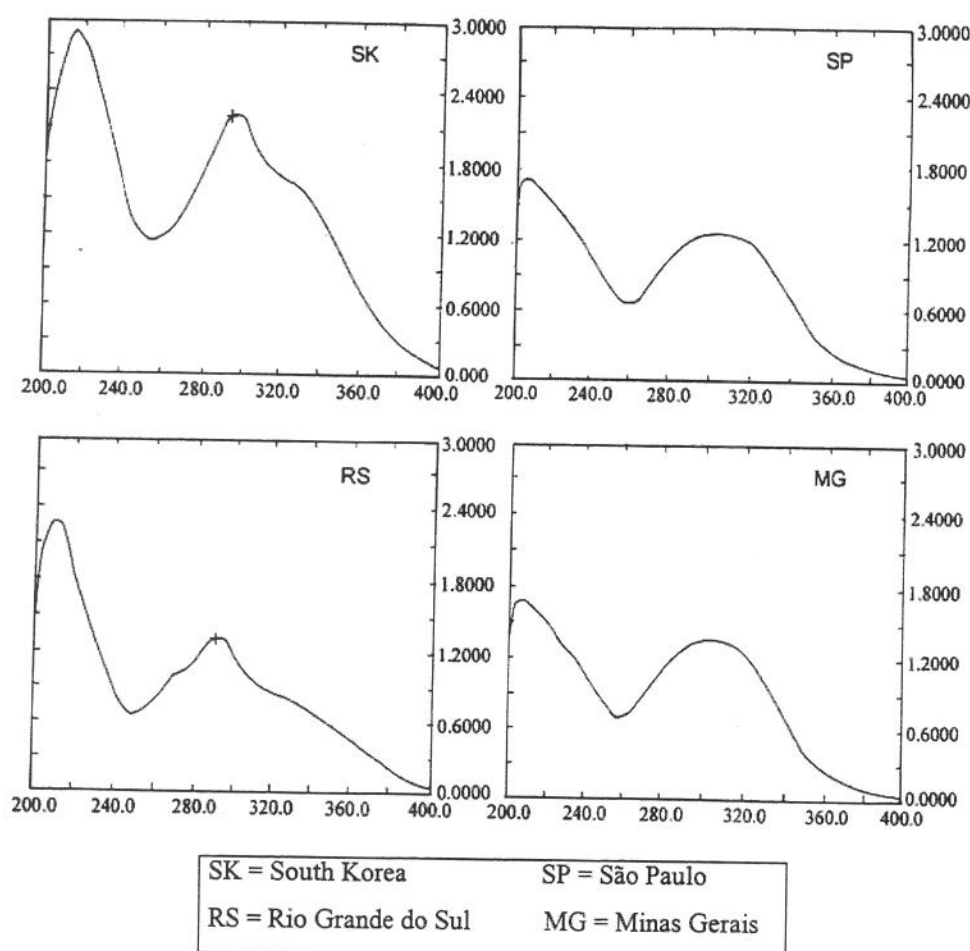


Fig. 1. Absorption spectra of 80% ethanolic extract of propolis.

Previously, we reported that 90 samples of propolis collected from all over Brazil, showed maximum absorption in the range from 290 to 310 nm and this interval represent the total flavonoids concentrations (PARK *et al.*, 1997). It was also reported that the appearance of absorption peaks at 270 ~330 nm was attributable to flavonoids and phenols (MARKHAM, 1982). The results of absorption in the range from 290 to 310 nm of EEP are shown in Table 1. It was found that the maximum absorption at 290 nm of EEP from SK was 2,200, which is greater than that from RS, SP and MG.

Table 1. Absorbance of ethanol extract of propolis at 290 ~300 nm.

80% Ethanol extracts of propolis	Absorbance at 290 nm	Absorbance at 300 nm
South Korea (SK)0	2,200	
Rio Grande do Sul (RS)	1,300	
São Paulo (SP)		1,250
Minas Gerais (MG)		1,350

SP & MG: located in Southeastern Brazil; RS: located in Southern Brazil.

Reversed Phase HPTLC. Four samples of EEP were examined by RP-HPTLC and the results are shown in Fig.2. It was found that the chromatograms of EEP from MG and SP showed similar patterns, whereas the patterns of EEP from SK and RS were also similar. The similarity of the chromatograms of EEP from Southeastern and Southern Brazil has already been reported by this laboratory (PARK *et al.*, 1997). The dissimilarity of chromatograms of EEP means that the distribution of flavonoids, including other polyphenolic compounds, in propolis, is different. It is interesting to note the similarity of the chromatograms of EEP from RS and SK. Therefore, a further study of the plant ecology, where the samples of propolis were collected is desirable.

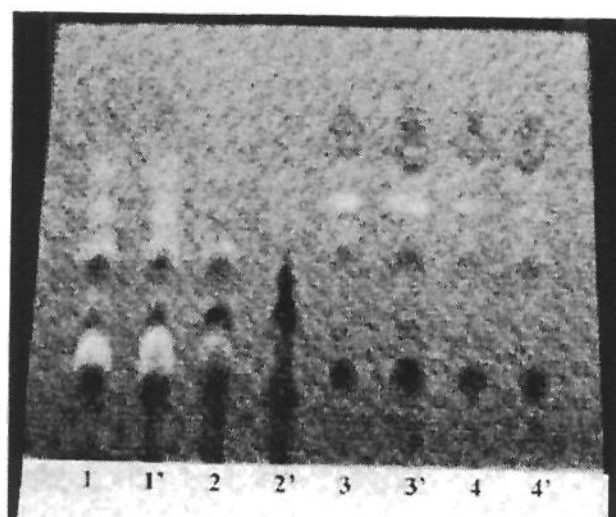


Fig. 2. Reversed phase high performance thin layer chromatography (RP-HPTLC) of the ethanol extract of propolis. (1 = RS; 2 = SK; 3 = MG; 4 = SP / 1, 2, 3 & 4 – applied 3 μ L of EEP / 1', 2', 3' & 4' – applied 5 μ L EEP).

Reversed Phase HPLC. The results of RP-HPLC are demonstrated in Fig. 3. The chromatograms of RP-HPLC of EEP from SP and MG also showed similar patterns of phenolic profile and 6 flavonoid aglycones were identified: quercetin, kaenferol, isorhamnetin, pinocembrin, acacetin and kaempferide. On the other hand, patterns of the RP-HPLC chromatograms of EEP from RS and SK were completely different from those of the SP and MG, and the EEP from RS and SK contained 11 flavonoid aglycones such as quercetin, kaempferol, apigenin, rhamnetin, pinocembrin, sakuranetin, chrysin, acacetin, galangin, kaempferide and tectochrysin. Pinocembrin, sakuranetin and chrysin contained another unknown compound as shown in Fig 3. It is apparent that EEP from SK and RS contained more flavonoid aglycone than the EEP from MG and SP. Furthermore, EEP from RS and SK contained higher concentrations of galangin, whereas the EEP from SP and MG were absent. Previously, METZNER *et al.* (1979) reported that galangin, pinocembrin and pinobanksin acted as antimicrobial agents.

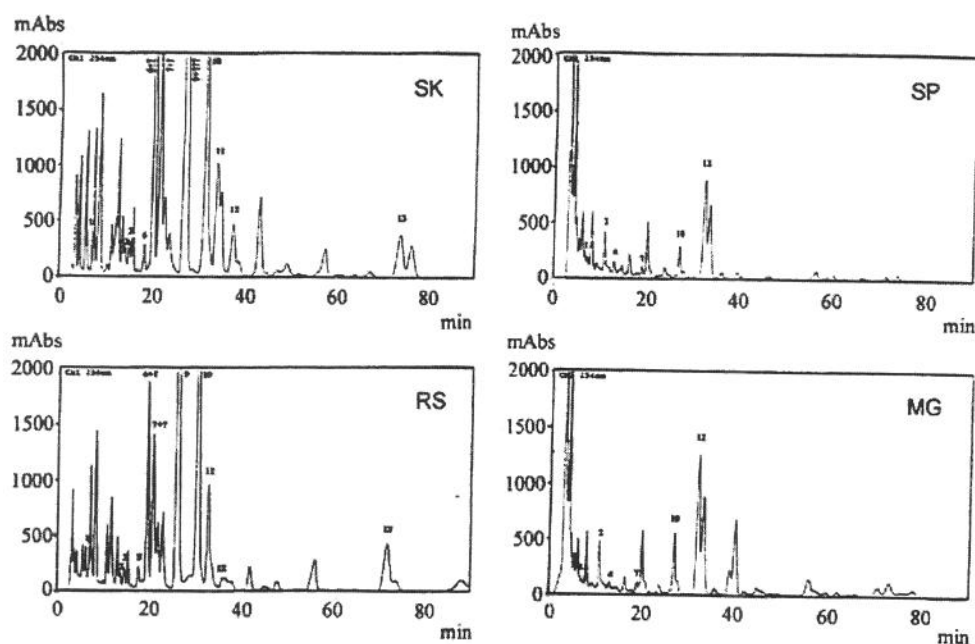


Fig. 3. Reversed phase high performance liquid chromatography. 1) quercetin; 2) kaempferol; 3) apigenin; 4) isorhamnetin; 5) rhamnetin; 6) sakuranetin; 7) pinocembrin; 8) isosakuranetin; 9) chrysin; 10) acacetin; 11) galangin; 12) kaempferide; 13) tectochrysin; ?) One unknown compound; ??) three unknown compounds.

Antimicrobial Activity of EEP. The sensitivity of *Staphylococcus aureus*, a coagulase positive bacteria, to EEP was performed and the results are shown in Table 2.

Table 2. Antimicrobial activity of water and ethanolic extracts of propolis to coagulase positive *Staphylococcus aureus*.

Propolis Extract	Zone of inhibition of microbial growth (mm)
RS	2.0
SK	3.0
SP	1.0
MG	1.0

It is apparent that the EEP from SK and RS showed more inhibition of the growth of *S. aureus* than the EEP from SP and MG. Previously, it was reported that the same EEP

from RS showed the highest inhibition of glucosyltransferase of *Streptococcus mutans*, which causes dental caries, and growth of this bacteria (PARK *et al.*, 1998).

Finally, it is concluded that the quality of the flavonoids in propolis is variable depending on the regions where the samples were collected. Therefore, further studies are required.

REFERENCES

- Bankova, V., Christov, R., Stoev, G., and Popov, S. Determination of phenolic from propolis by capillary gas chromatography. *J. Chromatogr.*, 607, 150-153, 1992.
- Blair, J. E., Borman, E.K., Byone, E.T., Updyke, E. L. & Williams, R. E. O. Hospital acquired staphylococcal disease, recommended procedures for laboratory investigation, Atlanta, Ga., United States, Department of Health, Education and Welfare, **Public Health Service**.
- Bonvehí, J. S.; Coll, F. V.; Jordá, R. E. The Composition, active Components and bacteriostatic activity of propolis in dietetics. **JAOCs.**, 71(5):529-532, 1994.
- Debiaggi, M., Tateo, F., Pagani, L., Luini, N.L., Romero, E. Effects of propolis flavonoids on virus infectivity and replication. **Microbiologica**, 13, 207-213, 1990.
- Dimov, V., Ivanovska, N., Bankova, V., Nikolov, N., Popov, S. Immunomodulatory action of propolis. **Cancer Detect. Prev.**, 22(6), 506-515, 1998.
- Greenway, w., Scaysbrook, t., Whatley, F.R. The composition and plant origins of propolis: a report of work at oxford. **Bee World**, 71, 107-118, 1990.
- Koo, M. H.; Park, Y. K. Investigation of Flavonoid aglycones in propolis collected by two different varieties of bees in the same region. **Biosc. Biotech. Biochem.**, 61(2):367-369, 1992.
- Korochkin, I.M., Poslavskii, M.V. Treatment of chronic gastroduodenal ulcers by local administration of propolis. **Sov. Med.**, 10, 105-107, 1986.
- Markham, K. R. Ultraviolet-visible absorption spectroscopy. In: Techniques of flavonoids identification, Academic Press, pp. 36-51, 1982.
- Matsuno, T., Matsumoto, Y., Saito, M., Morikawa, J. Isolation and characterization of cytotoxic diterpenoid isomers from propolis. **Z. Naturforsch. C**, 52(9-10), 702-704, 1997.

- Metzner, J.; Bekemeier, H., Paintz, M., and Schneidewind, E., Zur antimicrobiellen Wirksamkeit von Propolis und Propolisinhaltstoffen. **Pharmazie**, 34, 97, 1979.
- Miyataka, H., Nishiki, M., Matsumoto, H., Fujimoto, T., Matsuka, M., Satoh, T. Evaluation of propolis .1. Evaluation of Brazilian and Chinese propolis by enzymatic and physico-chemical methods. **Biol. Pharm. Bull.**, 20(5), 496-501, 1997.
- 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. **Arq. Biol. Tecnol.**, 40(1):97-106, 1997.
- Park, Y. K.; Koo, M. H.; Abreu, J. A. S.; Ikegaki, M.; Cury, J. A.; Rosalen, P. L. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganism. **Cur. Microbiol.**, 34(1):24-28, 1998.
- Pepeljnjak, S., Jalsenjak, I., Maysinger, D. Inhibition of growth and bioynthesis of ochratoxin A in *Aspergillus sulphureus* NRRL 4077 by propolis extract. **Pharmazie**, 37, 439-440, 1982.

ANEXO

Trabalhos realizados durante o desenvolvimento da Tese de Doutorado:

Revistas Indexadas

- PARK, Y. K.; IKEGAKI M.; ALENCAR, S. M. Determinação da concentração de β -glucano em cogumelo *Agaricus blazei* Murill, por método enzimático. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** (submetido).
- PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M. & SUZUKI, C. Screening of erythritol producing osmophilic yeast and production of erythritol from sucrose. **Biotechnol. Lett.** (Submitted).
- CARVALHO, P. O.; VISENTAINER, J. V.; IKEGAKI, M.; PARK, Y. K. Determinação de ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) em peixes marinhos da costa brasileira. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 20(1), 90-93, 2000.
- KOO, H.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; AMBROSANO, G. M. B.; MURATA, R. M.; YATSUDA, R.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M.; PARK, Y. K. Effect of a new variety of *Apis mellifera* propolis on mutans streptococci. **Cur. Microbiol.**, 41, 192-196, 2000.
- PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M. MOURA, F. F. Evaluation of Brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. **Honey Bee Sci.** 21(2), 85-90, 2000.
- KOO, H; PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; CURY, J. A. & ROSALEN, P. L. Effect of *Apis mellifera* propolis from two Brazilian regions on caries development in desalivated rats. **Caries Res.**, 33, 393-400, 1999.
- PARK, Y. K.; KOO, H.; ABREU, J. A. S.; IKEGAKI, M.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. **Cur. Microbiol.**, 36, 24-28, 1998.
- PARK, Y. K.; KOO, H; IKEGAKI, M.; CURY, J. A. & ROSALEN, P. L. Effect of propolis on *Streptococcus mutans*, *Actinomyces naeslundii* and *Staphylococcus aureus*. **Rev. Microbiol.**, 29, 143-148, 1998.

PARK, Y. K.; KOO, M. H.; **IKEGAKI, M.** & CONTADO, J. L. Comparison of the flavonoid aglycones contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. **Arq. Biol. Tecnol.**, 40(1), 97-106, 1997.

IKEGAKI, M. & PARK, Y. K. Produção de lactosacarose por β -frutofuranosidase de *Bacillus* sp n° 417 a partir de sacarose e lactose. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 17(2), 188-191, 1997.

Revistas Não Indexadas

PARK, Y. K.; **IKEGAKI, M.**; ALENCAR, S. M.; Classificação das própolis brasileira a partir de suas propriedades físico-químicas e propriedades biológicas. **Mensagem Doce**, 58, 2-6, 2000.

PARK, Y. K.; **IKEGAKI, M.**; ALENCAR, S. M.; WANG, H. K.; BASTOW, K.; LEE, K. H. Determinação das atividades citotóxicas e anti-HIV ds extratos etanólicos de própolis coletadas em diferentes regiões do Brasil. **Mensagem Doce**, 56, 2-5, 2000.

PARK, Y. K.; **IKEGAKI, M.**; ALENCAR, S. M.; MOURA, F. F. Atividade biológica das própolis. **Revista OESP – Alimentação**, Ano 4, n° 2, novembro-dezembro, 46-53, 1999.

PARK, Y.K.; KOO, H; **IKEGAKI, M.**; CURY, J.A. & ROSALEN, P.L. Andamento das pesquisas sobre própolis na UNICAMP. **Mensagem Doce**, 47, 06-08, 1998.