

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS



200206342

**DETERMINAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E
PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DAS PRÓPOLIS DE *Apis Mellifera* COLETADAS
NO ESTADO DE SÃO PAULO**

Tatiana Andrade Rabello Carvalho Pacheco
Engenheira de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Yong Kun Park

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Tatiana Andrade Rabello Carvalho Pacheco**, aprovada pela Comissão Julgadora em 04 de dezembro de 2001.

Campinas, 04 de dezembro de 2001

Prof. Dr. Yong Kun Park
Presidente da Banca

**Dissertação apresentada à Faculdade
de Engenharia de Alimentos, como parte
dos requisitos necessários para a obtenção
do título de Mestre em Ciência de Alimentos.**

CAMPINAS – SÃO PAULO

2001

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	TIUNICAMP
	P115d
V.	
TURMA	47532
PROG.	837/02
C	☐
D	☒
PREC.	R\$ 11,00
DATA	06-02-02
N.º CPD	

CM00163061-8

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

P115d Pacheco, Tatiana Andrade Rabello Carvalho
Determinação das características físico-químicas e propriedades biológicas das própolis de *Apis Mellifera* coletadas no Estado de São Paulo / Tatiana Andrade Rabello Carvalho Pacheco. – Campinas, SP: [s.n.], 2001.

Orientador: Yong Kun Park
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Própolis. 2.*Apis Mellifera*. 3.São Paulo (Estado). I.Park, Yong Kun. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Yong Kun Park
(Orientador)



Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy
(Membro)



Profa. Dra. Hilary Castle de Menezes
(Membro)



Profa. Dra. Hélia Harumi Sato
(Membro)

Aos meus pais Tito Lívio e Marísia,

Ao meu irmão Tito Lívio,

Ao meu namorado Adriano

DEDICO

*Não é o cérebro que importa mais,
mas sim o que o orienta: o caráter,
o coração, a generosidade, as idéias.*

(Dostoievski)

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Yong Kun Park, meu agradecimento pela orientação neste trabalho.

À Profa. Hélia Harumi Sato pelo auxílio e paciência durante o mestrado.

Aos Apicultores, que colaboraram na etapa de coleta do material.

Ao CNPq, pela concessão de auxílio financeiro para a execução do presente trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica pela amizade e convívio durante o mestrado, em especial ao Severino, Ivan, Cláudio, Neiva e Luciana.

Aos técnicos do Laboratório de Bioquímica, Marcelo, Bia e Dora.

A Edma, técnica do Laboratório de Nutrição.

Ao pessoal da Secretaria do Departamento de Ciência de Alimentos.

Ao pessoal da Secretaria de Pós-Graduação da Faculdade de Engenharia de Alimentos.

Aos amigos Lucimara, Sérgio, Carlos, Valéria, Livia, Ricardo, Rafael, Suzana, Márcia, Hígia, Carla, Lillian, pelo convívio.

SUMÁRIO GERAL

	Páginas
SUMÁRIO.....	i
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO.....	1
2 – OBJETIVO.....	4
3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1 – Análise da Composição Química da Própolis.....	5
3.2 – Propriedades Biológicas da Própolis.....	12
3.2.1 – Atividade Antioxidante.....	12
3.2.2 – Atividade Antiinflamatória.....	13
3.2.3 – Atividade Antimicrobiana.....	14
3.2.4 – Atividade Antitumoral.....	18
3.3 – Toxicidade da Própolis.....	20
4 – MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1 – Coleta das Amostras de Própolis.....	22
4.2 – Preparo dos Extratos Etanólicos de Própolis.....	22
4.3 – Análises Físico-Químicas dos Extratos Etanólicos de Própolis.....	23
4.3.1 – Espectrofotometria na Região Ultravioleta-Visível.....	23
4.3.2 – Determinação dos Flavonóides Totais com Base em Quercetina.....	23
4.3.3 – Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência em Fase Reversa dos Extratos de Própolis (CCDAE).....	24

4.3.4 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (CLAE).....	24
4.4 – Análises Biológicas dos Extratos Etanólicos de Própolis.....	25
4.4.1 – Teste de Atividade Antimicrobiana	25
4.4.1.1 – Preparo dos Discos de Extrato Etanólico de Própolis.....	25
4.4.1.2 – Análise da Atividade Antibacteriana.....	25
4.4.2 – Determinação da Atividade Antioxidante.....	26
4.4.3 – Análise da Atividade Antiinflamatória.....	26
4.5 – Análise Estatística.....	27
5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
5.1 - Coleta das Amostras de Própolis.....	28
5.2 – Características Físicas da Própolis Bruta.....	34
5.3 – Extratos Etanólicos de Própolis.....	34
5.4 – Análises Químicas.....	36
5.4.1 – Espectrofotometria na Região Ultravioleta-Visível.....	36
5.4.2 – Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCDAE).....	40
5.4.3 – Determinação dos Flavonóides Totais	43
5.4.4 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	45
5.5 – Atividades Biológicas.....	52
5.5.1 – Atividade Antimicrobiana.....	52
5.5.2 – Atividade Antioxidante.....	56
5.5.3 – Atividade Antiinflamatória.....	59
6 – CONCLUSÕES.....	61
7 – BIBLIOGRAFIA.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Local de Coleta das Amostras de Própolis.....	28
Tabela 2 – Teor de Flavonóides Totais, com Base em Quercetina, dos Extratos Etanólicos de Própolis dos Grupos Representativos do Estado de São Paulo.....	43
Tabela 3 – Análise dos Flavonóides por CLAE em Fase Reversa dos Grupos de Própolis Representativos da Região Sudeste do Brasil.....	46
Tabela 4 – Atividade Antibacteriana contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 e <i>Streptococcus mutans</i> das Amostras de Própolis Representativas do Estado de São Paulo.....	53
Tabela 5 – % de Inibição da Enzima Hialuronidase das Amostras de Extrato Etanólico de Própolis dos Grupos Representativos do Estado de São Paulo.....	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Vegetação de <i>Eucalyptus citriodora</i> (SE4) sendo Visitada por Abelhas <i>Apis mellifera</i>	29
Figura 2 - Vegetação de <i>Baccharis dracunculifolia</i> (SE5) sendo Visitada por Abelhas <i>Apis mellifera</i>	30
Figura 3 - Vegetação de <i>Vernonia polyantes</i> (SE17) sendo Visitada por Abelhas <i>Apis mellifera</i>	31
Figura 4 - Vegetação de <i>Leonorus sibiricus</i> (SE18) sendo Visitada por Abelhas <i>Apis mellifera</i>	32
Figura 5 - Vegetação de <i>Croton floribundus</i> (SE19) sendo Visitada por Abelhas <i>Apis mellifera</i>	33
Figura 6 – Extratos Etanólicos de Própolis do Estado de São Paulo (amostras SE1 a SE19).....	35
Figura 7 – Espectros de Absorbância na Região UV-Visível dos Extratos Etanólicos de Própolis do Estado de São Paulo (SE1 a SE6).....	37
Figura 8 - Espectros de Absorbância na Região UV-Visível dos Extratos Etanólicos de Própolis do Estado de São Paulo (SE7 a SE12).....	38
Figura 9 - Espectros de Absorbância na Região UV-Visível dos Extratos Etanólicos de Própolis do Estado de São Paulo (SE13 a SE18).....	39
Figura 10 - Espectro de Absorbância na Região UV-Visível do Extrato Etanólico de Própolis do Estado de São Paulo (SE19).....	40
Figura 11 – Cromatogramas obtidos em Camada Delgada de Alta Eficiência ($\lambda=366\text{nm}$) das Amostras de Própolis do Estado de São Paulo (SE1 a SE19).....	42
Figura 12 – Cromatogramas obtidos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) dos Extratos Etanólicos das Amostras de Própolis Representativas do Estado de São Paulo (SE1, SE2, SE4, SE5, SE10 e SE12).....	48
Figura 13 - Cromatogramas obtidos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) dos Extratos Etanólicos das Amostras de Própolis Representativas do Estado de São Paulo (SE17, SE18 e SE19).....	49

Figura 14 - Cromatogramas Tridimensionais obtidos por CLAE das Amostras de Própolis Representativas do Estado de São Paulo (SE1, SE2, SE4, SE5, SE10 e SE12).....	50
Figura 15 - Cromatogramas Tridimensionais obtidos por CLAE das Amostras de Própolis Representativas do Estado de São Paulo (SE17, SE18 e SE19).....	51
Figura 16 – Atividade Antimicrobiana contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 das Amostras de Própolis do Estado de São Paulo (SE1 a SE19).....	55
Figura 17 – Atividade Antioxidante dos Extratos Etanólicos das Amostras de Própolis dos Grupos Representativos do Estado de São Paulo	57
Figura 18 - Atividade Antioxidante dos Extratos Etanólicos das Amostras de Própolis dos Grupos Representativos do Estado de São Paulo após 3h de incubação.....	58

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar as propriedades físico-químicas, identificando e quantificando os compostos fenólicos presentes nas própolis coletadas por *Apis mellifera* no Estado de São Paulo; bem como, estudar suas atividades biológicas antioxidante, antiinflamatória e antimicrobiana. Assim, foram coletadas 50 amostras de própolis, em 19 apiários diferentes localizados no Estado de São Paulo. Foi realizada uma coleta direcionada ao longo do ano, para comparação da composição química da própolis nas diferentes floradas.

As amostras de própolis bruta apresentaram coloração esverdeada e consistência rígida, sendo que a obtenção do extrato foi feita a quente com etanol 80%.

Através da espectrofotometria na região UV-Visível e da cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE), e considerando-se a vegetação predominante na época da coleta, as amostras foram separadas em nove grupos distintos representados pelas amostras SE1 (laranja), SE2 (pinus), SE4 (eucalipto), SE5 (alecrim), SE10, SE12, SE17 (assa-peixe), SE18 (rubim) e SE19 (capixingui).

As amostras foram analisadas quanto ao teor de flavonóides totais, apresentando diferenças significativas pelo Teste de Tukey a 5%; sendo que a amostra SE19 apresentou maior teor de flavonóides (87,60 mg/g) enquanto que a amostra SE18 mostrou quantidade muito baixa (<1,0mg/g).

A análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) detectou a presença dos compostos ácido cumárico, ácido ferrúlico, pinobanksina, kamferol, isosakuranetina e kamferide na maioria das amostras analisadas, variando apenas as quantidades encontradas. A maior variabilidade na composição química foi observada na amostra SE12, que apresentou rhamnetina, pinocembrina, crisina e tectocrisina, além dos compostos já citados. Na amostra SE18 detectou-se somente a presença de pinocembrina. Além disso, as

amostras SE4 e SE2 apresentaram composição química diferente das demais, sendo que na primeira também foi detectada a presença de quercetina, enquanto que na amostra SE2 não foi observada a presença de pinobanksina e kamferol.

O estudo da atividade antimicrobiana mostrou grande variação na inibição do crescimento dos microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans* pelas amostras, sendo o maior potencial observado na amostra SE19, e nenhuma atividade das amostras SE10 e SE18 contra os microrganismos testados. Estes resultados apresentaram correlação com o teor de flavonóides totais.

Todas as amostras apresentaram alta atividade antioxidante, com exceção da amostra SE18. Observou-se também que todos os extratos etanólicos de própolis apresentaram inibição da enzima hialuronidase variando de 11,2 a 29,2%, indicando atividade antiinflamatória.

Frente aos resultados encontrados constatou-se que as própolis do Estado de São Paulo apresentam pequena variabilidade na sua composição química, bem como nas suas propriedades biológicas.

ABSTRACT

The aim of this work was to analyse the physico-chemical properties, identifying and quantifying the phenolic compounds, presented by the propolis collected by *Apis mellifera* in São Paulo State, as well as to study their biological activities, such as antioxidant, anti-inflammatory and antibacterial properties.

Fifty samples of propolis were collected, from 19 different apiaries located in São Paulo State. An organized collect, was realized throughout the year to compare the chemical composition of the different flowerings.

The samples of crude propolis presented green coloration and hard consistency, the extract being obtained with hot 80% ethanol.

Using Ultraviolet-Spectrophotometry and High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC), and considering the predominant vegetation in the period of the collection, the samples were grouped into nine different groups, represented by the samples SE1 (*Citrus sinensis*), SE2 (*Pinus sp.*), SE4 (*Eucalyptus citriodora*), SE5 (*Baccharis dracunculifolia*), SE10, SE12, SE17 (*Vernonia polyantes*), SE18 (*Leonorus sibiricus*) and SE19 (*Croton floribundus*).

The specimens were analysed as to the total flavonoid contents, presenting significant differences at 5% in the Tukey test ; sample SE19 showing the greatest flavonoid content (87.60 mg/g) while sample SE18 showed a very low quantity (<1.0 mg/g).

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) detected the presence of the compounds cumaric acid, ferulic acid, pinobanksin, kaempferol, isosakuranetin and

kaempferide in the majority of the samples analysed, differing only in the quantities found. The main diversity in chemical composition, was observed in sample SE12 which presented rhamnetin, pinocembrin, chrysin and tectochrysin besides the compounds already mentioned. In sample SE18 only the presence of pinocembrin was detected. Besides this, differences were observed in the sample SE4 because of the presence of quercetin, and sample SE2 that did not present pinobanksin and kaempferol.

The study of the antibacterial activity showed great variation in the inhibition of the growth of the microorganisms *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* by the samples, the major potential being observed in sample SE19, and the samples SE10 and SE18 which failed to present any activity against the microorganisms tested. These results showed correlation with the total flavonoid contents.

All the samples presented high antioxidant activity, except sample SE18. It was observed that all the ethanolic extracts of propolis presented inhibition of the enzyme hyaluronidase, that is, anti-inflammatory activity, with values around 11.2 and 29.2%.

Faced with the results, it was concluded that the propolis of the São Paulo State presented low variation in their chemical composition, as well as in their biological properties.

○

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas tem se observado um interesse cada vez maior pelas medicinas alternativas e terapias naturais. Dentre elas, os produtos apícolas, como mel, própolis, geléia real e pólen, têm encontrado grande aceitação, principalmente devido às suas propriedades terapêuticas, originando assim, um novo ramo na medicina denominado Apiterapia.

Há evidências da utilização da própolis desde 300 A.C., como por exemplo, no Egito Antigo, onde era usada para embalsamar mortos, como medicamento e antisséptico. Na Itália, no século XVII, foi usada em vernizes, especialmente para violinos. Além disso, um preparado de própolis e vaselina, que possuía propriedades antibacterianas, teve grande aplicação na Guerra de Bôer, na África (Ghisalberti, 1979).

Própolis é o nome genérico dado a uma substância resinosa, de coloração e consistência variadas, coletada pelas abelhas das diversas partes da planta, como broto, botões florais e exsudados resinosos, que são misturados à cera (Koo & Park, 1996). As abelhas modificam a composição da própolis original pela ação da β -glucosidase, que elas secretam durante a coleta, hidrolisando os flavonóides glicosilados em flavonóides agliconas (Park *et al.* , 1997).

A palavra própolis deriva do grego *pro-*, em defesa, e *polis-*, a cidade, significando, defesa da cidade (no caso, da colméia) (Burdock, 1998). As abelhas utilizam a própolis para selar buracos na colméia, e embalsamar invasores mortos dentro da colméia, evitando assim sua deterioração (Marcucci *et al.* , 1996).

Em geral, a própolis é composta por 50% de resina e bálsamo vegetal, 30% de cera, 10% de óleos aromáticos e essenciais, 5% de pólen e 5% de várias outras substâncias, incluindo microelementos, como alumínio, cálcio, estrôncio, ferro, cobre, manganês e traços das vitaminas B₁, B₂, B₆, C e E (Burdock, 1998).

A composição química da própolis é muito complexa: pelo menos 200 constituintes foram identificados até agora, incluindo ácido benzóico e ésteres, ácidos fenólicos substituídos e ésteres, flavonóides (flavonas, flavanonas, flavonóis, dihidroflavonóis, chalconas), terpenos, β -esteróides, enzimas, amino ácidos livres e conjugados (Macucci *et al.*, 1996). É importante ressaltar, que esta composição química varia dependendo da ecologia vegetal de cada região, sendo que a quantidade e qualidade dos flavonóides vão depender da variedade vegetal de onde a própolis é coletada além do tipo de abelha (Koo & Park, 1997).

As abelhas atualmente encontradas no Brasil são geneticamente distintas daquelas encontradas, por exemplo, na Europa e América do Norte. No Brasil houve hibridização entre as abelhas européias *A. mellifera mellifera* e *A. mellifera lingustica* com a abelha africana *A. mellifera scutellatai*, após sua introdução no final de 1950. Desta forma, as abelhas *A. mellifera* no Brasil são denominadas africanizadas (Negri *et al.*., 1998).

As fontes vegetais de própolis das regiões de clima temperado, como Europa e América do Norte, foram caracterizadas como sendo o choupo, *Populus L.* Essa espécie vegetal também pode ser encontrada na Ásia e Norte da África. Entretanto, no Brasil, as pesquisas ainda são recentes e acredita-se que as abelhas tenham encontrado outras fontes, uma vez que há uma grande diversidade vegetal nas florestas tropicais.

As pesquisas sobre própolis vêm se intensificando a partir da década de 60, quando cientistas se interessaram em investigar sua composição química e propriedades biológicas, encontrando diversas ações farmacológicas: anti-viral, anti-bacteriana, fungicida, imunoestimulante, anestésico local, anti-úlceras, anti-hipertensiva, suprimir o crescimento de tumores, anti-inflamatória, entre outras. Além disso, a própolis tem sido usada em alimentos e bebidas visando a manutenção e melhoramento da saúde humana, bem como em pastas de dentes (anti-cárie) e cosméticos (Bankova *et al.*., 1995; Miyataka *et al.*., 1997).

Tem havido um interesse crescente no mercado mundial pela própolis produzida no Brasil, entretanto há uma completa falta de critérios para o controle de qualidade e padronização das amostras (Woisky,1998). Algumas pesquisas demonstram a grande variabilidade da composição química da própolis tropical, mostrando a necessidade de investigações mais profundas da sua atividade biológica e composição química (Marcucci *et al.*., 1998).

Este trabalho apresenta um estudo da composição química e propriedades biológicas das própolis provenientes do Estado de São Paulo.

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar as propriedades físico-químicas, identificar e quantificar os compostos fenólicos presentes nas própolis coletadas no Estado de São Paulo; bem como, estudar suas atividades biológicas antioxidante, antiinflamatória e antimicrobiana.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Análise da Composição Química da Própolis

Durante as primeiras décadas do século XX, os relatos sobre a composição da própolis bruta eram quanto à classe de compostos em geral, e pouca atenção era dada à purificação e investigação das frações individuais. Exceções dignas de nota foram encontradas nos trabalhos de Kustenmacher, que identificou o álcool cinamil e o ácido cinâmico como sendo constituintes da própolis, e Dietrich que detectou traços de 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído (vanilina). Cerca de dezesseis anos mais tarde, em 1927, Jaubert encontrou que a cor da cera de abelha era devido à presença do flavonóide 5,7-diidroxiflavona (crisina), que também poderia ser isolado da própolis (Ghisalberti, 1979).

Nenhum outro relato de identificação de algum componente da própolis foi feito até 1969. A falta de interesse e atividade ocorreu, provavelmente devido à sua natureza e falta de técnicas apropriadas de separação e análise (Ghisalberti, 1979).

Aplicando técnicas modernas de separação e identificação dos componentes da própolis, em 1969, Popravko (citado por Ghisalberti, 1979) isolou seis flavonóides: 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona (acacetina); 5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavona; 3,5,7-trihidroxi-4'-metoxiflavona (kamferide) ; 3,4',5-trihidroxi-7-metoxiflavona (ramnocitrina); 5,7-dihidroxi-3,4'-dimetoxiflavona e 3,5-dihidroxi-4',7-dimetoxiflavona. Duas flavanonas: (-)-5-hidroxi-7-metoxiflavanona (-)-pinostrobina e (-)-5-hidroxi-7-metoxiflavanona, além de um simples composto aromático 3-hidroxi-4-metoxibenzaldeído (isovanilina).

Durante a década de 70, outros compostos fenólicos foram identificados como: 3,5,7-trihidroxiflavona (galangina); 5,7-dihidroxiflavanona (pinocembrina); 5,7-dihidroxiflavona (crisina); 5-hidroxi-7-metoxiflavona (tectocrisina); 3,5-dihidroxi-7-metoxiflavona (isalpinina) (Ghisalberti, 1979).

Existem várias pesquisas na literatura científica sobre técnicas de análise de compostos fenólicos e seu comportamento cromatográfico. Ácidos fenólicos e flavonóides de vinho foram analisados através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Primeiramente, estudando a separação dos ácidos fenólicos, os autores comprovaram que os componentes polares eluíam antes dos não polares, comportamento típico de sistemas em fase reversa. Também constataram que um substituinte metoxil diminui a polaridade, aumentando a retenção, diferindo da diminuição da retenção provocada pela adição de um grupo hidroxil. Os autores estudaram ainda, a influência do grupo carbonil na posição 4, sobre a polaridade dos flavonóides, e observaram que os grupos hidroxila nas posições 3 e 5 interagem com o ceto grupo da posição 4, diminuindo assim sua polaridade. Também foram relatadas as vantagens da CLAE, em relação à cromatografia gasosa nas análises de própolis, pois a técnica de cromatografia gasosa apresentava problemas de degradação térmica e necessitava de uma etapa adicional de derivatização (Wulf & Nagel, 1976).

Foi descrita a separação de compostos fenólicos, dentre eles os flavonóides, por três métodos cromatográficos: cromatografia em camada delgada de alta performance, cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia gasosa. Os autores investigaram a cromatografia de partição, utilizando cromatoplasas RP-2, RP-8 e RP-18, sendo que a segunda apresentou melhor resolução com um sistema de fase móvel simples composto por etanol e água, na proporção de 45:55 (v/v). Na análise por CLAE, a presença de flavonóides no extrato bruto não interferiu na identificação dos ácidos aromáticos e fenóis; entretanto, a presença destes interferiu na separação dos flavonóides. Além disso, os autores salientaram a boa separação dos compostos fenólicos por cromatografia gasosa, sendo considerado o melhor método para este fim, apesar das limitações como a necessidade de derivatização e da degradação térmica, além de problemas de eluição dos flavonóides acacetina e apigenina e da separação dos flavonóides heterocíclicos (Vanhaelen & Vanhaelen-Fastre, 1980).

Foi descrito um método para analisar flavonóides agliconas através da cromatografia em camada delgada de alta performance (HPTLC) em placas prontas RP-18 (Merck) e SilC₁₈-50 (Macherey and Nagel). Foram utilizados como eluentes: ácido acético

1M em 60% de metanol, ácido acético 1M em 50% de metanol, ácido acético:metanol:água (3:3:4, v/v), amônia 0.1M em 55% de metanol ou hexano:acetato de etila: ácido acético (72:27:1). Após a eluição os flavonóides foram visualizados sob luz U.V. a 254 e 366nm. Foi observada a relação entre o comportamento cromatográfico dos flavonóides agliconas, com o número e a posição de seus grupos hidroxila. Os flavonóides com maior número de hidroxilas apresentaram maiores Rfs, com exceção da galangina e quercetina que apresentavam pequena diferença nos Rfs, quando comparadas com outros flavonóides de mesmo número de hidroxilas. Segundo a autora, a presença de um grupo hidroxila na posição 3, como na galangina e quercetina, não resulta em aumento da polaridade da molécula, devido à interação deste grupo hidroxila com o grupo carbonil na posição C-4 (Heimler, 1986).

Com o propósito de se obter uma avaliação rápida da qualidade da própolis, foi descrito um método analítico utilizando cromatografia em camada delgada (CCD). Os autores utilizaram 2 sistemas de solventes, tolueno:clorofórmio:acetona (40:25:35, v/v) e hexano:acetato de etila:ácido acético (60:40:3), cujas placas foram observadas sob luz U.V. a 254 nm. Também foram observadas diferenças na distribuição dos componentes das própolis provenientes de regiões geográficas diferentes (Ackermann *et al.*, 1991).

Foi analisada uma amostra de própolis comercial da Bulgária através da cromatografia capilar gasosa, para determinação de seus compostos fenólicos com atividade biológica. Foi detectada a presença dos flavonóides agliconas pinocembrina e galangina, do ácido caféico e de seu β -fenil-etil éster (Bankova *et al.*, 1992).

Quatro amostras de própolis do Brasil foram analisadas, sendo duas do Estado de São Paulo, uma do Paraná e outra do Ceará, por cromatografia gasosa e espectrofotometria de massa. Os autores observaram que a composição da fração polar da própolis apresentava características diferentes quando comparada às própolis provenientes das zonas temperadas (como a Europa), com baixas concentrações de flavonóides e altas concentrações de hidroquinona, ácidos hidroxibenzóico e principalmente ácido dihidrocinâmico. A

composição dos constituintes voláteis também apresentou diferenças significativas com a das regiões temperadas. As amostras de própolis brasileiras não apresentavam β -eudesmol e benzil benzoato, característicos da zona temperada, porém apresentavam altas concentrações de acetofenonas mono e dipreniladas e pequenas quantidades de alguns terpenóides como sesquiterpenóides, na sua maioria, e α -terpinol, 2Z,6E-farnesol, espatulenol e ledol. Enquanto na própolis da zona temperada os ésteres do ácido cinâmico predominam, no Brasil foram encontradas concentrações significantes do ácido dihidrocinâmico e seus ésteres. Os autores relataram que a diferença na composição química da própolis era devido à diferença na fonte vegetal (Bankova *et al.*, 1995).

Foi identificada e quantificada a maior parte dos constituintes orgânicos de amostra de própolis da Nova Zelândia por CLAE e espectrofotometria de massa - cromatografia gasosa. Os autores notaram alta proporção (70%) de dihidroflavonóides como: pinocembrina, pinobanksina e pinobanksina 3-acetato. Dentre os compostos não flavonóides presentes estavam os compostos aromáticos e pequenas quantidades de ácidos graxos. Os primeiros incluíam principalmente ácidos cinâmicos e seus ésteres, mas também ácido 5-fenil-trans-trans-2,4-pentadienóico e um novo produto natural, ácido 5-fenil-trans-3-pentenóico (Markham *et al.*, 1996).

Amostras de própolis da Eslováquia e República Checa foram analisadas por cromatografia em camada delgada e os compostos encontrados foram: tectocrisina, acacetina, crisina, genkvanina, apigenina, galangina-5-metil éter, pinobanksina-5-metil éter, 5,7,4'-trihidroxi-3,3'-dimetoxiflavona, 5,7,3'-trihidroxi-3,4'-dimetoxiflavona, 5,7,3',4'-tetrahidroxi-3-metoxiflavona, 3,5,3',4'-tetrahidroxi-7-metoxiflavona, 5,3',4'-trihidroxi-3,7-dimetoxiflavona, pinobanksina e alpinona. Além disso, utilizou-se um método colorimétrico para a determinação do conteúdo de flavanonas e dihidroflavonóides, através da formação de produtos coloridos com 2,4-dinitrofenil hidrazina em ác. sulfúrico. O conteúdo de flavonóides foi expresso como pinocembrina (Nagy & Grancai, 1996).

Foram isolados um conhecido flavonóide kaempferideo e uma nova lignana benzofurana da própolis do Brasil. O método descrito para o isolamento dos compostos foi a extração com éter, sendo esse extrato submetido à coluna cromatográfica em sílica gel e eluído com gradiente hexano-acetona, produzindo várias frações. Após repetidas colunas cromatográficas em sílica gel com hexano-acetona, clorofórmio-etil acetato e metileno clorido-metanol, os compostos foram isolados. Os autores sugeriram o uso da nova lignana como um provável marcador taxonômico, dando novas possibilidades para identificação das fontes vegetais da própolis de regiões tropicais (Bankova *et al.*, 1996).

Foram isolados e identificados os principais constituintes fenólicos de amostra de própolis brasileira: três flavonóides, um ácido cumárico prenilado e duas novas benzopiranas (E e Z 2,2-dimetil-6-carboxietenil-8-prenil-2H-benzopirana). Os três flavonóides foram: 4'-O-metil kaempferol, 5,6,7-trihidroxi-3,4'-dimetoxiflavona e aromadendrina-4'-metil éter. O método utilizado foi a diluição do extrato alcoólico em água seguido de sucessivas extrações com n-hexano e acetato de etila, produzindo várias frações. O extrato acetato de etila foi submetido à coluna cromatográfica em sílica gel, eluído com gradiente clorofórmio – acetato de etila separando várias frações. Os compostos foram isolados após repetidas purificações em colunas cromatográficas de sílica gel e eluição com clorofórmio-metanol e n-hexano-metietilcetona; e cromatografia em camada delgada preparativa em placas de sílica gel com fases móveis clorofórmio-acetona, n-hexano-acetona e n-hexano-metietilcetona (Boudorova-Krasteva *et al.*, 1997).

Foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), flavonóides e outros fenólicos de amostras de própolis da Tunísia, buscando correlações entre a origem botânica e geográfica e a composição química. Um novo flavonóide, miricetina 3,7,4',5'-tetrametil éter foi detectado, sendo característico de exsudados da folha de *Cistus spp.* Outro composto foi identificado como quercetina 3,7,3'-trimetil éter. Os resultados mostraram que em áreas como a Tunísia, onde não há choupo, característicos de zonas temperadas como a Europa, outras plantas foram usadas como fonte de própolis (Martos *et al.*, 1997).

Foram isoladas três novas (1, 3, 4) e duas conhecidas (2 e 5) lignanas da própolis do Chile. O composto 1 foi identificado como um coniferil álcool acetato trimérico e o 3 como o diastereoisômero do coniferil álcool acetato dimérico (2). O composto 4 foi identificado como um dihidrobenzofurano lignana aldeído, que foi isolado juntamente com seu acetato (5). As análises foram realizadas utilizando-se cromatografia em camada delgada, cromatografia líquida de alta eficiência e ressonância magnética nuclear (Valcic *et al.*, 1998).

Amostras de própolis do Egito foram investigadas por cromatografia em camada delgada e cromatografia gasosa - espectrofotômetro de massa. Foram identificados 39 compostos, sendo encontrados 8 compostos não descritos anteriormente: ácido pirúvico, oleato de etila, dodecil cafeato, tetradecil cafeato, tetradecenil cafeato, hexadecil cafeato, cicloartenol e β -amirina (Cristov *et al.*, 1998).

Duas amostras de própolis do Estado de São Paulo foram analisadas por cromatografia gasosa - espectrofotômetro de massa, sendo identificados 39 compostos sendo 8 novos: ácido dihidroferúlico, ácido dehidroabiético, ácido abiético, β -amirina, dois álcoois triterpênicos do tipo amirina, isômero do lanosterol com dupla ligação 9(11) e 3-vanilil propanol. As duas amostras mostraram algumas similaridades na sua composição qualitativa. Em uma, os ácidos cumáricos e seus derivados prenilados predominaram, enquanto que na outra os álcoois triterpênicos foram os constituintes principais (Marcucci *et al.*, 1998).

O extrato etanólico da amostra de própolis de Minas Gerais (Brasil) foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência, sendo identificados 24 compostos, sendo 5 flavonóides: isosakuranetina (1), pinocembrina (2), dihidrokamferide (3), kamferide (4) e betuletol (5); 3 compostos fenólicos: (+)-treo-1-C-guaiacilglicerol (6), ácido 3,4-dihidroxibenzóico (ácido protocatecóico) (7) e 3-metoxi-4-hidroxibenzaldeído (vanilina) (8); 6 ácidos cafeoilquínicos: ácido 3-cafeoilquínico (ácido clorogênico) (9), ácido 4-cafeoilquínico (10), ácido 5-cafeoilquínico (11), ácido 3,4-dicafeoilquínico (12), ácido 3,5-

dicafeoilquínico (13), ácido 4,5-dicafeoilquínico (14); 10 derivados do ácido cinâmico: ácido 4-hidroxicinâmico (ácido p-cumárico) (15), ácido 3-(4-hidroxifenil) propanóico (ácido 2,3-dihidro-p-cumárico) (16), ácido 3,4-dihidroxicinâmico (ácido cafeico) (17), ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico (drupanina) (18), ácido 3-prenil-4-(2,3-dihidrocinamoiloxi) cinâmico (19), ácido 3-prenil-4-(2-metilpropioniloxi) cinâmico (20), ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (artepilina C) (21), ácido 3-(2,2-dimetil-8-prenil-2H-1-benzopiran-6-il)-2-propenóico (22), sendo dois novos compostos: ácido (E)-3-(2,2-dimetil-3,4-dihidro-3-hidroxi-8-prenil-2H-1-benzopiran-6-il)-2-propenóico (23) e ácido (E)-3-[2,3-dihidro-2-(1-hidroxi-1-metiletil)-7-prenil-benzofuran-5-il]-2-propenóico (24). Os compostos 1, 2, 18, 19, 20 e 21 são constituintes das espécies de *Baccharis*, que pode ser uma possível fonte da própolis desta região (Tazawa *et al.*, 1998).

Frações extraídas com acetona e hexano, e não derivatizadas da própolis coletada em Sapucaia, Estado do Rio de Janeiro (Brasil), onde predomina a flora de *Citrus spp.* e *Vernonia polyantes*, foram analisadas por cromatografia gasosa de alta resolução acoplada à espectrometria de massa. Vários compostos, incluindo flavonóides agliconas, ácidos fenólicos e compostos de alto peso molecular foram caracterizados no extrato bruto. Dentre estes compostos podemos citar: ácido benzóico, ácido hidrocínâmico, vanilina, ácido cinâmico, ácido hexadecanóico, benzilcinamato, naringenina 3',4'-dimetoxi, 1-nonacosanol, betuleol, kaemferide, entre outros. Essas técnicas mostraram ser ferramentas rápidas e informativas para análise de extratos brutos sem necessidade de derivatização e purificação (Pereira *et al.*, 1998).

A utilização da eletroforese capilar com detector de arranjo de diodos para análise de própolis foi investigada. Extratos aquosos de própolis foram analisados por eletroforese capilar a pH 7.0 e 9.3, e cromatografia micelar eletrocinética com dodecil sulfato de sódio a pH 9.3. Foram obtidos compostos característicos de própolis e vários ácidos orgânicos puderam ser identificados por comparação com uma biblioteca com padrões conhecidos. Ambas as técnicas apresentaram boa separação para todos os componentes presentes, apresentando potencial para caracterização de amostras de própolis (Hilhorst *et al.*, 1998).

3.2. Propriedades Biológicas da Própolis

3.2.1. Atividade Antioxidante

Radicais livres mediam vários fenômenos biológicos como envelhecimento, diabetes, hepatite, inflamação e outras doenças crônicas. O efeito antioxidante da própolis tem sido demonstrado pela sua habilidade protetora em produtos alimentícios e pela sua habilidade em seqüestrar radicais livres, sendo de grande interesse na prevenção e tratamento de diabetes e outros distúrbios (Matsuno *et al.*, 1997; Basnet *et al.* 1997).

Foi demonstrada a habilidade de quantidades crescentes de extrato etanólico de própolis inibir a quimioluminescência de luminol-H₂O “in vitro”, sugerindo que esta capacidade antioxidante se deve, em parte, ao alto conteúdo de flavonóides presente na própolis (Krol *et al.*, 1990).

O efeito da administração intraperitoneal de própolis (50 e 100 mg/kg) foi estudado na cardiomiopatia produzida por dextrorubicina (10mg/kg, iv) em ratos. O estudo mostrou que a administração de própolis reduziu as enzimas marcadoras de tecidos específicas, lipoperóxidos e GSH, que são elevados em resposta à administração de dextrorubicina, e portanto, demonstrou o efeito cardioprotetivo da própolis (Chopra *et al.*, 1995).

O efeito da própolis vermelha cubana contra hepatite induzida por 1000mg/kg de galactosamina (GalN) em ratos foi estudado. Um extrato etanólico de própolis foi preparado e administrado aos ratos em doses de 10, 50 e 100mg/kg, 30 min antes da hepatotóxina. O extrato de própolis impediu as alterações nos hepatócitos induzidas por galactosamina, mostrando seus efeitos antiinflamatório e hepatoprotetivo contra GalN (Rodríguez *et al.*, 1997).

Foi isolado um novo composto da própolis do Brasil, um clerodano diterpenóide, que apresentou poder antioxidante maior que as vitaminas C e E e que o ácido caféico (Matsuno *et al.*, 1997).

Foi isolado um novo composto do extrato aquoso da própolis denominado ácido 3-[4-hidroxi-3-(3-oxo-but-1-enil)-fenil]-acrílico, que se apresentou como mais potente que os antioxidantes mais comuns como as vitaminas C e E (Basnet *et al.*, 1997).

3.2.2. Atividade Antiinflamatória

O efeito inibitório dos taninos sobre a ativação da hialuronidase inativa foi testado, mostrando forte efeito inibitório, sugerindo que muitos taninos possam possuir atividade antiinflamatória (Kakegawa *et al.*, 1985).

Em vários modelos “in vitro” o extrato de própolis inibiu a agregação plaquetária e a síntese de eicosanóides, sugerindo possuir propriedades antiinflamatórias. A presença dessas propriedades foi mostrada em sistemas “in vivo”, podendo esta atividade estar relacionada com seu efeito na liberação de vários mediadores de inflamação (Khayyal *et al.*, 1993)

Algumas própolis do Brasil e China foram estudadas, demonstrando possuírem efeito antiinflamatório, sendo que os extratos etanólicos se apresentaram mais potentes que os extratos aquosos. Além disso, foi demonstrado que o método enzimático, utilizando como medida a atividade de hialuronidase, foi superior ao método físico-químico (Miyataka *et al.*, 1997).

Testou-se alguns ácidos fenólicos como: p-cumárico, caféico, ferrúlico, gentísico, protocatecico, siríngico e isovanílico extraídos de *Scrophularia frutescens*. Os resultados mostraram que esses ácidos são mais efetivos como agentes antiinflamatórios quando

aplicados topicamente do que via oral, e que sua ação é influenciada pela inibição da migração de neutrófilos no tecido inflamado (Fernández *et al.*, 1998).

3.2.3 Atividade Antimicrobiana

O extrato etanólico da amostra de própolis da França foi testado quanto à sua atividade antimicrobiana “in vitro” contra algumas linhagens de bactérias Gram positivas e Gram negativas. O extrato inibiu completamente o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Branhamella catarrhalis* e *Bacillus cereus*. Houve inibição do crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, mas não houve efeito sobre *Klebsiella pneumoniae*. As propriedades antimicrobianas e os efeitos benéficos da própolis foram atribuídos à presença de flavonóides na sua composição (Grange & Davey, 1990).

Analisou-se a atividade antiviral “in vitro” contra herpes simplex vírus tipo 1 (HSV-1), dos principais flavonóides isolados da própolis da França. Os autores demonstraram que os ácidos caféico e ferúlico e as flavanonas pinocembrina e isosakuranetina apresentaram pouca ou nenhuma atividade contra HSV-1. Por outro lado, os flavonols apresentaram atividade significativa contra HSV-1, sendo a galangina com maior atividade seguida de kaempferol e quercetina. Dentre as flavonas estudadas apenas a luteolina demonstrou atividade anti HSV-1. Estudou-se também o possível sinergismo pela combinação de 2 ou mais flavonóides, contra o vírus HSV-1. Foi observado que todas as combinações entre flavonol e flavonas demonstraram sinergismo contra HSV-1, sendo as melhores combinações: kaempferol+luteolina, quercetina+crisina, galangina+apigenina, kaempferol+apigenina e quercetina+apigenina. Segundo os autores, este sinergismo pode explicar a melhor atividade anti HSV-1 dos extratos etanólicos da própolis, que seus constituintes flavonóides individuais (Amoros *et al.*, 1992a).

Foi testada a atividade antiviral “in vitro” da amostra de própolis da França. A própolis inibiu a propagação do poliovírus, reduziu a atividade do vírus de herpes simplex

(cc 30µg/ml), enquanto que o vírus da estomatite vesicular e adenovírus foram menos susceptíveis (Amoros *et al.*, 1992b).

Foram isolados três compostos antimicrobianos distintos da própolis brasileira coletada no Estado de São Paulo: ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico, ácido 3-prenil-4-dihidroxicinamoloxicinâmico e ácido 2,2-dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano. Estes compostos foram testados contra *B. cereus*, *Enterobacter aerogenes* e *Arthroderma loenhaniae*, sendo que o primeiro composto apresentou maior atividade (Aga *et al.*, 1994).

Foi verificada, “in vitro”, a atividade anti-herpes simplex vírus tipo 1 do composto 3-metil-but-2-enil cafeato isolado de exsudados resinosos da *Populus nigra L.* e encontrados em pequenas quantidades na própolis. Os autores relataram que a atividade antiviral da própolis era devido não apenas aos seus compostos principais, como os flavonóides, mas também pela contribuição significativa de seus compostos minoritários, como o 3-metil-but-2-enil cafeato (Amoros *et al.*, 1994).

A atividade antibacteriana de algumas própolis do Brasil e Bulgária foi investigada, utilizando *Staphylococcus aureus*. Os autores notaram atividade em todos os extratos alcoólicos de própolis e também na mistura de constituintes voláteis, exceto para os voláteis da Bulgária (Bankova *et al.*, 1995).

Foram isolados quatro tipos de ácidos diterpênicos e siringaldeído da própolis do Brasil, sendo que todos apresentaram atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*. Os diterpenos encontrados pela primeira vez na própolis são típicos de algumas espécies de *Araucaria*, indicando uma possível fonte vegetal da própolis do Brasil (Bankova *et al.*, 1996).

Foi testada a atividade antimicrobiana da própolis comercial preparada com os seguintes solventes: etanol 60%, glicerol puro, propilenoglicol e óleo de cereais comestíveis. Os autores mostraram que o tipo de solvente aplicado para a extração pode

aumentar a potência da atividade antimicrobiana, sendo que os melhores resultados foram obtidos utilizando óleo de cereais como solvente (Tosi *et al.*, 1996).

Algumas amostras de extrato etanólico de própolis do Brasil foram testados, mostrando que todas inibiram o crescimento de *Staphylococcus aureus* (coagulase +), não havendo inibição da *E.coli* (coagulase -) (Park *et al.*, 1997).

Foi verificada a inibição do crescimento de *Streptococcus mutans* e da enzima glicosiltransferase, pelos extratos etanólicos de amostras de própolis do Brasil, provenientes dos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Goiás, Mato Grosso do Sul, Paraná e Rio Grande do Sul. A atividade antimicrobiana foi atribuída aos compostos pinocembrina e galangina. Devido ao sinergismo dos efeitos antimicrobianos e inibição da atividade da enzima glicosiltransferase, conclui-se que a própolis poderia controlar a cárie dental (Park *et al.*, 1998).

Foi estudada a relação entre a virulência de linhagens de micobactéria e sua susceptibilidade ao extrato etanólico de própolis. Das quatro linhagens não virulentas estudadas nenhuma era susceptível ao EEP; enquanto que das 13 virulentas, 7 foram susceptíveis e 6 resistentes (Scheller *et al.*, 1998).

Os extratos etanólicos das própolis brasileiras coletadas nos seguintes Estados: Paraná, São Paulo, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e Rio Grande do Sul, foram testados quanto à sua atividade “in vitro” contra *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* e *Actinomyces naeslundii* e potencial de inibição da atividade da enzima glicosiltransferase, relacionada à formação da placa e cárie dentária. Todas as amostras inibiram a atividade enzimática e crescimento microbiano, sendo que a amostra proveniente do Rio Grande do Sul apresentou maior atividade em ambos os casos (Park *et al.*, 1998 b).

Um novo composto do extrato etanólico da própolis cubana foi isolado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), sendo identificado como uma

benzofenona poliprenilada. Suas atividades antimicrobianas e fungicidas foram testadas contra *Actinomyces*, linhagens de bactérias Gram positivas e negativas e leveduras. A maior atividade foi observada contra duas linhagens Gram positivas: *Streptomyces chartreusis* e *S. violochromogenes*. Em relação às linhagens Gram negativas e leveduras, foi verificada atividade contra *Shigella sonnei*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida parapsilosis* (Rubio *et al.*, 1999).

Foram analisados os extratos etanólicos das própolis, bem como seus compostos voláteis de diversas regiões como: Sofia (Bulgária), Tirana (Albânia), Ulan Bator (Mongólia), Bani Swaief (Egito), Prudentópolis (PR-Brasil), Rio Claro (SP-Brasil), Pacajus (CE-Brasil), Limeira (SP-Brasil), San Mateo (Ilhas Canárias), Telde (Ilhas Canárias). As atividades antibacteriana (*S. aureus* e *E. coli*), antifúngica (*Candida albicans*) e antiviral (vírus influenza) dos extratos etanólicos foram investigadas. Todas as amostras apresentaram atividades antibacteriana, antifúngica e antiviral similares, sendo que a própolis das Ilhas Canárias foi mais potente contra *S.aureus*. Nenhuma amostra apresentou atividade contra *E.coli*. Essas similaridades contradizem às diferentes composições químicas, levando os autores a concluir que as propriedades se devem à mistura de substâncias, e não a um composto específico (Kujumgiev *et al.*, 1999).

Foi testada a atividade antimicrobiana da própolis da Argentina de quatro localidades de Amaicha Del Valle (El Paraíso, La Banda Este, La Banda Oeste e El Molino), Província de Tucumã. Diferentes linhagens de bactérias Gram positivas e negativas foram testadas, sendo que nenhuma amostra mostrou atividade contra as bactérias Gram negativas. Todas as amostras apresentaram resultados similares, sendo a maior inibição observada contra *S.aureus*, seguida por *S.pyogenes*, *S.agalactiae* e *E.faecalis*. As amostras de Amaicha Del Valle, mais uma amostra de Cerrillos, Província de Santiago Del Estero, foram analisadas por cromatografia de camada delgada, sendo que as quatro amostras de Amaicha Del Valle apresentaram mesma composição, diferindo apenas a própolis de Cerrillos, devido à diferença fitogeográfica (Moreno *et al.*, 1999).

Os extratos etanólicos da própolis de Minas Gerais e extratos de *Arnica montana* foram testados contra 15 linhagens de bactérias: *Candida albicans* (duas linhagens), *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus sobrinus*, *Strep.sanguis*, *Strep.cricetus*, *Strep.mutans*, *Actinomyces naeslundii*, *Act. viscosus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porph. endodontalis* e *Prevotella denticola*. O extrato de própolis inibiu todos os microrganismos apresentando maior atividade contra *Actinomyces spp.* O extrato de *Arnica montana* não demonstrou atividade significativa. A aderência das células e formação de glucana insolúvel em água também foram quase que totalmente inibidos por uma concentração de 400µg/ml e 500 µg/ml de extrato de própolis, respectivamente; enquanto que o extrato de *Arnica montana* apresentou leve inibição da aderência das células (19% para *S.mutans* e 15% para *S.sobrinus*) e formação de glucana insolúvel em água (29%) na mesma concentração (Koo *et al.*, 2000 a).

Uma nova variedade de própolis originária da Bahia (nordeste do Brasil) foi avaliada quanto à inibição do crescimento de *Streptococcus mutans*, *S. sobrinus* e *S. cricetus*, aderência da célula e síntese de glucana insolúvel em água, sendo comparada com as amostras previamente testadas provenientes dos Estados de Minas Gerais (sudeste do Brasil) e Rio Grande do Sul. Os resultados mostraram que a nova variedade de própolis apresenta maior potência em relação a todos os parâmetros “in vitro” testados, sendo excepcionalmente efetiva contra *S. mutans* (Koo *et al.*, 2000 b).

3.2.4 Atividade Antitumoral

Um composto conhecido como CAPE (fenetil éster do ácido caféico), foi isolado e caracterizado, sendo este parcialmente responsável pela atividade citotóxica da própolis. Foi analisada a citotoxicidade em relação às células normais e células transformadas de melanomas de humanos e ratos, sendo que as transformadas foram mais susceptíveis ao CAPE, apresentando inibição de 80% numa concentração de 20µl/ml (Grunberger *et al.*, 1988).

Para testar o efeito antitumoral da própolis, ratos com carcinoma foram submetidos ao tratamento com própolis (0,5 ml 0,25% EEP) e comparados aos submetidos ao tratamento com bleomicina (0,001%). A sobrevivência foi de 55% no caso da própolis e 40% para bleomicina. Os autores concluíram que o efeito antitumoral da própolis se deve aos flavonóides inibirem a incorporação de timidina, uridina e leucina nas células de carcinoma, contribuindo para a inibição da síntese de DNA (Scheller *et al.*, 1989; citado por Burdock, 1998).

Os efeitos da dieta com feniletil-5-metilcafeato foi investigada por Rao *et al.* (1995), mostrando inibição da incidência e multiplicidade de adenocarcinomas invasivo, não invasivo e total do cólon, intestino, e tumores dos canais do ouvido. Observou-se também diminuição do volume do tumor do cólon em 43% quando comparado com o controle (citado por Burdock, 1998).

O extrato metanólico da própolis brasileira foi fracionado e analisado por cromatografia líquida de alta eficiência, sendo isolados dois isômeros diterpenóides com fórmula molecular $C_{20}H_{30}O_3$, identificados por ressonância magnética nuclear, como : ácido 15-oxo-3,13Z-kolavadieno-17-óico e ácido 15-oxo-3Z,13E-kolavadieno-17-óico. Esses compostos retardaram o crescimento das células de HuH13 (carcinoma hepatocelular humano), KB, HeLa e HLC-2 (carcinomas pulmonares humanos), com valores de ID_{50} de 20-30 $\mu\text{g/ml}$ (Matsuno *et al.*, 1997).

A fração solúvel em acetato de etila do extrato metanólico da própolis brasileira foi analisada sendo isolados 23 compostos. Esses compostos foram testados quanto à sua citotoxicidade contra células de carcinoma humano HT-1080 (fibrosarcoma) e 26-LS (cólon). Dentre os compostos testados, um coniferil aldeído, betuletol, kaemferídeo e ermanin mostraram mais potente citotoxicidade, com valores de ID_{50} iguais ou inferiores a 10 $\mu\text{g/ml}$. Além disso, as investigações sugeriram que uma possível fonte da própolis tropical seria *Baccharis spp.*, associada a *Clusia minor*, *Clusia major* e *Araucária heterophylla* (Banskota *et al.*, 1998).

O extrato metanólico de uma mistura de própolis de diversas regiões do Brasil (SP, PR e SC) foi fracionado e analisado por CLAE e um novo derivado benzo- γ -pirano, com fórmula molecular $C_{19}H_{22}O_3$ foi isolado. A estrutura do composto foi determinada como ácido 3-[2-dimetil-8-(3-metil-2-butenil) benzopirano]-6-propenóico, através de ressonância magnética nuclear 1H e ^{13}C . O composto apresentou citotoxicidade, retardando o crescimento das células de HuH13 (carcinoma hepatocelular humano), HeLa e KB (carcinoma epidermóide oral humano) e HLC-2 (carcinoma pulmonar humano), com ID_{50} de 20 $\mu g/ml$ (Matsuno *et al.*, 1998).

3.3 Toxicidade da Própolis

Têm sido reportados na literatura alguns casos de hipersensibilidade à própolis. Casos de dermatite são poucos, porém, pesquisas recentes indicam que 1 em 2000 apicultores possa ser sensível (Ghisalberti, 1979). Também tem aparecido alguma reação alérgica em pessoas submetidas ao tratamento externo com própolis para doença de pele ou administração oral (Miyataka *et al.*, 1997). A própolis contém substâncias com propriedades potencialmente alérgicas conhecidas como ácido cinâmico e vanilina. Outros ingredientes são ceras, óleos, pólen e bálsamo (Petersen, 1977).

Dobrowolski *et al.* 1991, citado por Burdock (1998) testaram a toxicidade da própolis em animais. Aproximadamente 700 mg/kg foram administradas oralmente a grupos de 10 ratos (5 fêmeas e 5 machos), que foram monitorados por 48 horas após a dose. As preparações de própolis foram bem toleradas e nenhuma morte foi registrada durante o período de observação.

Suspensões preparadas de extratos etanólicos de própolis do Brasil e China foram administradas em ratos em doses de 2230 a 4000 mg/kg. Após duas semanas de tratamento, nenhuma morte foi registrada, o peso aumentou normalmente, não sendo encontrada nenhuma anormalidade na necropsia (Kaneeda & Nishina, 1994; citado por Burdock, 1998).

A própolis possui uma baixa toxicidade oral aguda, apresentando LD₅₀ variando de 2000 a 7300 mg/kg para ratos. A administração para ratos por 90 dias de 1400 mg/kg/dia na água foi declarado NOEL (no-effect level) (Burdock, 1998).

Estudos indicam que a dermatite alérgica induzida pela própolis se deve ao éster do ácido cinâmico e ésteres do ácido caféico, e, de acordo com Hausen *et al.* (1987), o composto alergênico primário deve ser o 3-metil-but-2-enil cafeato. Entretanto, a presença destes compostos depende do local de coleta, tempo e fonte vegetal, etc. (Miyataka *et al.*, 1997).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta das Amostras de Própolis

As amostras de própolis bruta foram obtidas de colméias domésticas de abelhas *Apis mellifera*, coletadas em apiários do Estado de São Paulo.

As própolis foram obtidas através da raspagem das partes internas das caixas e bordas da melgueira, ninho e tampa das colméias. O material coletado foi separado das raspas de madeira e excesso de cera, em seguida acondicionado em pequenos sacos plásticos limpos, inertes e secos, sendo guardados sob abrigo de luz, a 5°C.

4.2 Preparo dos Extratos Etanólicos de Própolis

O extrato etanólico de própolis foi preparado de acordo com Koo (1996). Amostras de 2 gramas de própolis bruta em pó, pesadas em balança analítica, em tubos de centrífuga (25 x 180 mm), foram extraídas com 15 ml de etanol 80%, em banho-maria a 70°C durante 30 minutos, sob agitação. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm em centrífuga Beckman J2-21, por 10 minutos a 5°C. O sobrenadante obtido foi separado em tubo de vidro (15 x 150 mm) com tampa de rosca. Ao resíduo foram adicionados mais 10 ml de etanol 80%, procedendo-se uma segunda extração, nas mesmas condições por 30 minutos. Após a segunda centrifugação, os sobrenadantes foram misturados, apresentando volume final de 25 ml de extrato etanólico de própolis (EEP) por amostra. Os EEPs obtidos foram utilizados nas análises descritas a seguir.

4.3 Análises Físico-químicas dos Extratos Etanólicos de Própolis

4.3.1 Espectrofotometria na Região Ultravioleta-Visível

A determinação do espectro de absorção dos extratos etanólicos de própolis foi realizada segundo Koo (1996). Alíquotas de 25µl do extrato etanólico de própolis, obtido de acordo com o item 4.2, foram diluídas em 30 ml de etanol 95% (Merck), submetidas a leitura na faixa de comprimento de onda 200 e 600nm, através do espectrofotômetro Beckman DU-70.

4.3.2 Determinação dos Flavonóides Totais com Base em Quercetina

A determinação dos flavonóides totais 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).

Com o extrato etanólico de própolis obtido no item 4.2, previamente diluído na proporção 1:10, foi realizada uma reação colorimétrica adicionando-se em tubos de ensaio, 0,5 ml de EEP, 4,3 ml de etanol (80%), 0,1 ml de uma solução de nitrato de alumínio (10%) e 0,1 ml de acetato de potássio na concentração 1M. Como controle para cada amostra, foi utilizado 0,1 ml de água destilada em substituição ao nitrato de alumínio. Após 40 minutos de reação à temperatura ambiente, foi feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro (Beckman DU-70) a 415nm. A leitura final de absorbância, foi obtida pela diferença entre a absorbância da reação e o controle. Para obtenção da curva padrão, foi realizada a mesma reação com concentrações conhecidas de quercetina. O teor de flavonóides totais foi expresso por essa diferença com base na curva padrão de quercetina.

4.3.3 Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência em Fase Reversa dos Extratos de Própolis

A cromatografia em camada delgada de alta performance em fase reversa dos extratos de própolis foi realizada de acordo com o método descrito por Koo (1996). Aliquotas de 3 µl dos EEP, obtidos de acordo com o item 4.2, foram aplicadas em placas 100x100mm RP-18 F₂₅₄-S (Merck). Como solvente foi utilizado o sistema etanol:água destilada (55:45, v/v), sendo o tempo de desenvolvimento do cromatograma de aproximadamente 100 minutos. As placas desenvolvidas foram secas e observadas sob luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm, utilizando iluminador U. V. Cole Parmer, modelo UVP-UVGL-58.

4.3.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (CLAE)

A análise dos flavonóides por cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada utilizando cromatógrafo líquido Shimadzu modelo LC-10 equipado com coluna de fase reversa YMC PACK ODS-A e acoplado a um detector de arranjo de diodo com leitura em UV-Visível a 254 nm. Foram injetados no cromatógrafo líquido, 20 µl dos EEP obtidos no item 4.2, previamente filtrados em membrana de teflon com porosidade 0,22 µm. A fase móvel utilizada foi água:ácido acético (19:1) (solvente A) e metanol (solvente B), sendo o fluxo de 1 ml/min, temperatura de 35°C com o seguinte sistema gradiente: de 30% B para 40% B em 15 minutos, para 50% B em 30 minutos, para 60% B em 55 minutos, para 75% B em 75 minutos e para 90% B em 95 minutos, retornando à proporção inicial (30% B) em 105 minutos.

Para identificação dos compostos foram utilizados os seguintes padrões: ácido cumárico e ácido ferrúlico; os flavonóis kanferol, kanferide, quercetina, galangina, ramnetina, isoramnetina e miricetina; o flavonol glicosilado rutina; as flavonas acacetina, apigenina, crisina e tectocrisina; as flavanonas pinocembrina, hisperidina, hisperetina,

sakuranetina e isosakuranetina; e os dihidroflavonóis pinobanksina e pinobanksina-3-acetato. Todos os padrões foram obtidos da Extrasynthese A. A. Co., França.

A quantificação foi feita utilizando a padronização externa, a partir de uma curva de calibração de quatro pares ordenados (área; concentração) para cada padrão utilizado. Os resultados foram expressos em miligrama de flavonóides por grama de própolis.

4.4 Análises Biológicas dos Extratos Etanólicos de Própolis

4.4.1 Teste de Atividade Antimicrobiana

4.4.1.1 Preparo dos discos de extrato etanólico de própolis

Alíquotas de 10µl dos EEP, obtidos de acordo com item 4.2, foram pipetadas em discos de papel de filtro Whatman nº 3 (5x1 mm de diâmetro), colocados em placas de Petri estéreis. Em seguida as placas contendo os discos foram mantidas em dessecador com sílica à temperatura ambiente por 24 horas. Posteriormente foram colocadas em estufa a 60°C por 2 horas para eliminação de qualquer resíduo etanólico.

4.4.1.2 Análise da Atividade Antibacteriana

A análise da atividade antibacteriana dos extratos sobre as bactérias Gram positivas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Streptococcus mutans* foi realizada de acordo com Blair *et al.* (1958). Culturas ativas das bactérias foram inoculadas por espalhamento com “swabs” estéreis em placas contendo os meios de cultura, ágar nutriente e infusão de cérebro (Merck), para *S.aureus* e *S.mutans*, respectivamente. Os discos contendo os extratos de própolis, preparados de acordo com o item 4.4.1.1, foram colocados sobre as placas inoculadas que, em seguida, foram incubadas a 37°C por 24 horas para *S.aureus* e

37°C por 48 horas sob anaerobiose para *S.mutans*. A atividade antibacteriana foi determinada pela formação de halo inibitório ao redor dos discos.

4.4.2 Determinação da Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada pela oxidação acoplada do β -caroteno e do ácido linoléico de acordo com Pratt & Watts (1964), Hamerschidt & Pratt (1978) e Pratt & Birac (1979). Em um balão de fundo redondo, foram adicionados 60mg de ácido linoléico (Sigma), 200mg de Tween 40 e 10 mg de β -caroteno (Sigma) dissolvidos em 10 ml de clorofórmio. A solução foi concentrada em rota-evaporador a 50°C, para remoção do clorofórmio, sendo o resíduo dissolvido com a adição de 50ml de água deionizada sob vigorosa agitação. Alíquotas de 1ml desta emulsão foram transferidas para tubos de ensaio contendo 0,05 ml do extrato etanólico de própolis, previamente diluídos em etanol 80% (1:10, v/v) e 2 ml de água deionizada. A absorbância foi medida imediatamente em espectrofotômetro a 470nm, em seguida os tubos foram incubados a 40°C para a reação de oxidação, e a absorbância medida em intervalos de 60 minutos, totalizando 3 horas.

4.4.3 Análise da Atividade Antiinflamatória

A atividade antiinflamatória foi determinada pela inibição da atividade de hialuronidase conforme o método descrito por Aronson & Davidson (1967) e Reissing *et al.*(1955). A mistura de reação se constituiu de 50 μ l do extrato etanólico de própolis, obtidos de acordo com o item 4.2, 0,5ml de sal de potássio do ácido hialurônico (1,2 mg por ml de tampão acetato 0,1M pH 3,6 contendo 0,15M de NaCl), e 50 μ l da enzima hialuronidase (Tipo IV-S: obtido de testículo bovino, Sigma Co.), dissolvida no mesmo tampão, na concentração de 6,5 mg/ml. Os tubos foram incubados a 37°C por 40 minutos. Após a incubação, foram adicionados 0,01ml de NaOH 4N para neutralizar a reação. A adição dos EEP aos tubos brancos foi feita após o tempo de reação. Numa segunda etapa da reação, foram adicionados 0,1ml de tetraborato de potássio 0,8M à mistura de reação, e os

tubos foram aquecidos em banho de ebulição por 3 minutos. Em seguida foi adicionado 3ml de p-dimetilaminobenzaldeído sendo a mistura incubada a 37°C por 20 minutos. Finalmente, a absorbância da mistura foi medida em espectrofotômetro a 585nm usando água como controle. O resultado foi obtido através da diferença de inibição da enzima hialuronidase entre os tubos de reação e os tubos brancos.

4.5 Análise Estatística

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

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Coleta das Amostras de Própolis

Foram coletadas 50 amostras de própolis bruta, em 19 apiários diferentes localizados no Estado de São Paulo. A coleta foi feita em diferentes caixas, diretamente nos apiários. Também foi realizada uma coleta direcionada, durante um ano, para estudos comparativos das diferentes floradas, visando uma melhor análise da variação na composição química da própolis ao longo do ano. Associado a isso, serão desenvolvidos posteriormente no laboratório, estudos mais aprofundados sobre a origem botânica das própolis de diversas regiões do Brasil. Os locais de coleta das diferentes amostras e a vegetação predominante na época da coleta estão apresentados na Tabela 1. As Figuras 1 a 5 mostram diferentes tipos de plantas, referentes a alguns locais de coleta, sendo visitadas pelas abelhas.

Tabela 1 – Local de Coleta das Amostras de Própolis

Amostra	Vegetação	Município	Estado
SE1	<i>Citrus sinensis</i> (laranja)	Mogi Mirim	São Paulo
SE2	<i>Pinus sp.</i>	Socorro	São Paulo
SE3	<i>Eucalyptus citriodora</i> (eucalipto)	Diadema	São Paulo
SE4	<i>Eucalyptus citriodora</i> (eucalipto)	Mogi Mirim	São Paulo
SE5	<i>Baccharis dracunculifolia</i> (alecrim)	Mogi Guaçu	São Paulo
SE6		Diadema	São Paulo
SE7		Diadema	São Paulo
SE8	Mata Atlântica	Demarche	São Paulo
SE9	Mata Atlântica	Demarche	São Paulo
SE10	Mata Atlântica	R.Biling - São Paulo	São Paulo
SE11		Campos do Jordão	São Paulo
SE12		Campos do Jordão	São Paulo
SE13		Campos do Jordão	São Paulo
SE14		Souzas	São Paulo
SE15		Pinhalzinho	São Paulo
SE16		Pinhalzinho	São Paulo
SE17	<i>Vernonia polyantes</i> (assa-peixe)	Amparo	São Paulo
SE18	<i>Leonorus sibiricus</i> (rubim)	Mogi Mirim	São Paulo
SE19	<i>Croton floribundus</i> (capixingui)	Amparo	São Paulo



Figura 1 – Vegetação de *Eucalyptus citriodora* (SE4) sendo Visitada por Abelhas *Apis mellifera* .



Figura 2 – Vegetação de *Baccharis dracunculifolia* (SE5) sendo Visitada por Abelhas *Apis mellifera*.



Figura 3 – Vegetação de *Vernonia polyantes* (SE17) sendo Visitada por Abelhas *Apis mellifera*.



Figura 4 – Vegetação de *Leonorus sibiricus* (SE18) sendo Visitada por Abelhas *Apis mellifera*.



Figura 5 – Vegetação de *Croton floribundus* (SE19) sendo Visitada por Abelhas *Apis mellifera*.

5.2 Características Físicas da Própolis Bruta

A caracterização física da própolis bruta foi feita com base na sua coloração e consistência. A própolis bruta apresenta uma variação na sua coloração que vai do amarelo esverdeado ao marrom escuro, dependendo da origem e idade. Quanto à consistência pode variar de mole e pegajosa à rígida (Ghisalberti, 1979).

As amostras de própolis do Estado de São Paulo são bem características por apresentarem uma coloração esverdeada ou ligeiramente esverdeada, e consistência rígida. Desta forma não apresentaram grande variação de um local de coleta para outro, sendo bastante homogêneas.

Essas características diferem bastante das própolis de outras regiões como a Nordeste, onde apresentaram coloração amarronzada e consistência mole, na sua maioria (Moura, 2000). As mesmas características foram encontradas nas própolis da Região Centro-Oeste, enquanto que na Região Sul verificou-se colorações variando do verde escuro com traços marrons a pretos e consistência endurecida; com exceção do Estado de Santa Catarina, onde as própolis apresentavam-se geralmente de coloração marrom e textura mole (Koo, 1996).

5.3 Extratos Etanólicos de Própolis

Os extratos etanólicos de própolis obtidos de acordo com o item 4.2, estão ilustrados na Figura 6. Como se pode observar, os extratos apresentaram coloração variando do amarelo ao ligeiramente esverdeado, com exceção dos extratos SE6, avermelhado e SE10 que apresentou tonalidade marrom escura.

Tomás-Barberán *et al.* (1993) estudaram a coloração e composição dos extratos metanólicos de própolis, constatando que os extratos avermelhados escuros continham grandes quantidades de fenólicos, enquanto os menos coloridos não continham substâncias

fenólicas. Os extratos amarelados geralmente continham compostos fenólicos, porém em menores quantidades que os extratos escuros.

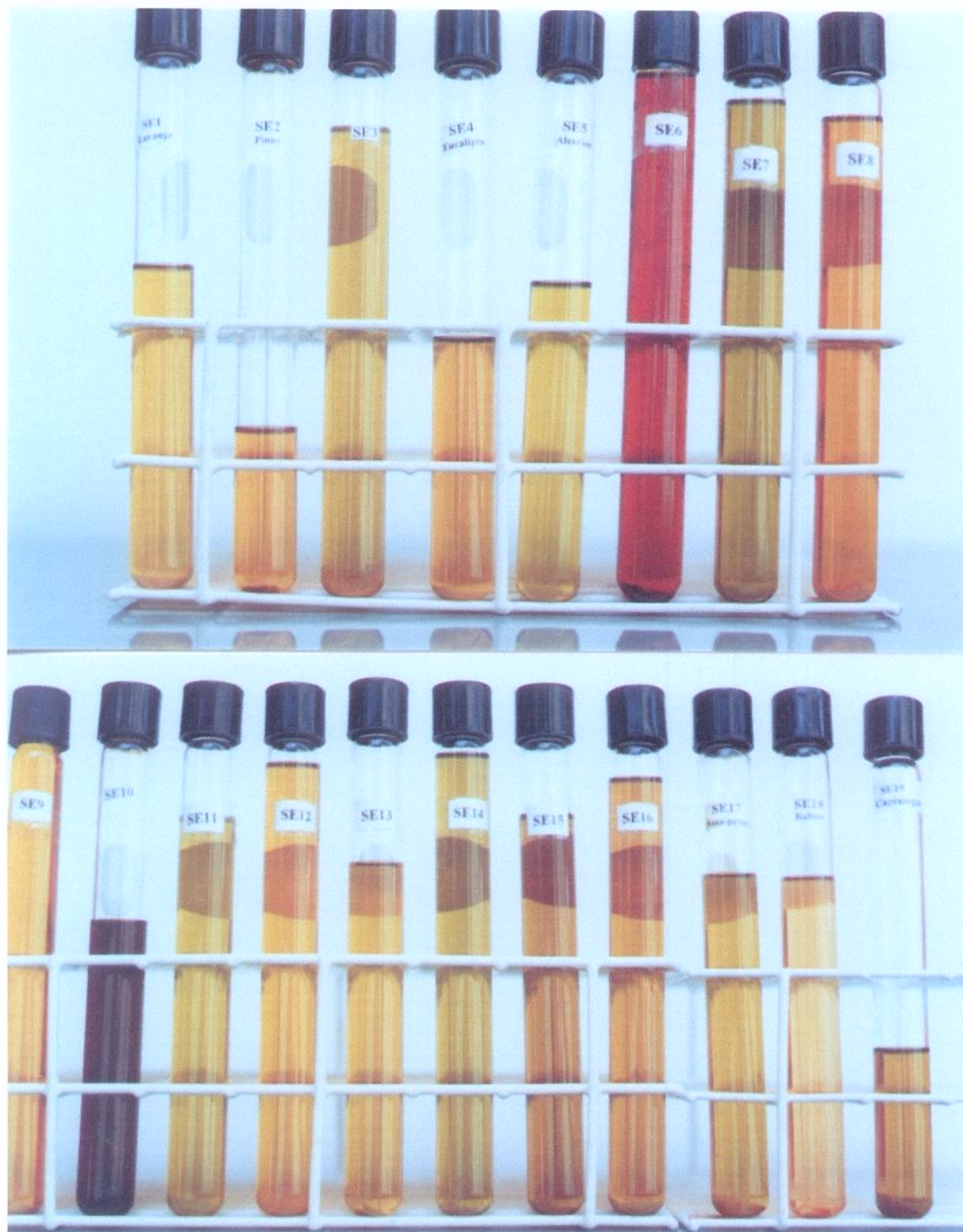


Figura 6 : Extratos Etanólicos de Própolis do Estado de São Paulo (amostras SE1 a SE19)

5.4 Análises Químicas

5.4.1 Espectrofotometria na Região Ultravioleta – Visível

A determinação do espectro de absorção na região do U.V.- Visível foi feita na faixa de comprimento de onda 200 a 600 nm, de acordo com o item 4.3.1, e os espectros obtidos estão ilustrados nas Figuras 7 a 10.

A maioria das amostras analisadas apresentaram espectro de absorção com $\lambda_{\text{máx}}$ próximo a 300 nm, sendo que as amostras SE10 e SE18 apresentaram absorbância máxima em comprimento de onda um pouco mais baixo, a 282 e 278 nm respectivamente.

Miyataka *et al.* (1997) analisaram as própolis do Brasil, e também encontraram um espectro com $\lambda_{\text{máx}}$ a 300 nm nos extratos etanólicos das própolis provenientes de regiões com vegetação *Eucalyptus globulus* LABILL e *Rosmarinus officinalis* L.

Em geral, sabe-se que o aparecimento de bandas de absorção entre 270 – 330 nm se deve à presença de flavonóides e fenóis (Kuno, 1987; Fujimoto, 1992; citados por Miyataka *et al.*, 1997).

Porém, a análise por espectrofotometria fornece apenas uma característica da própolis, sendo que a sua correlação com a análise por CCDAE foi utilizada para classificar os tipos de própolis encontrados no Estado de São Paulo.

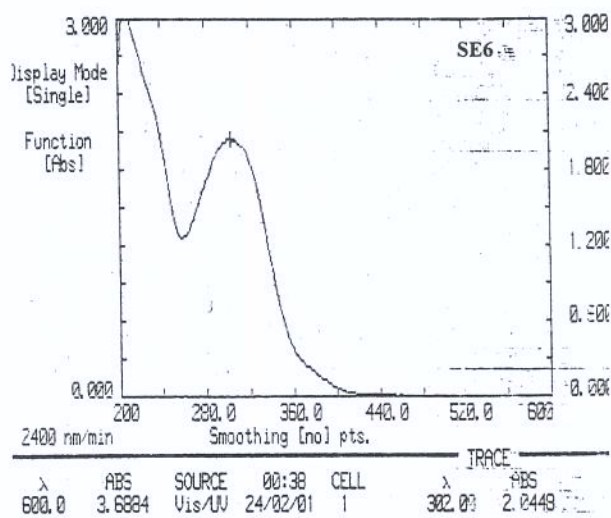
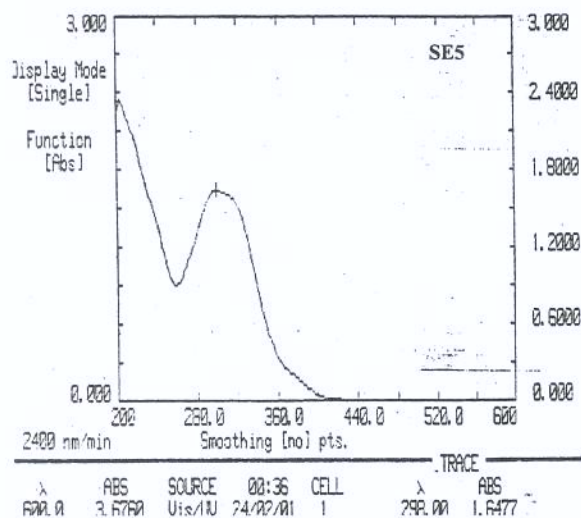
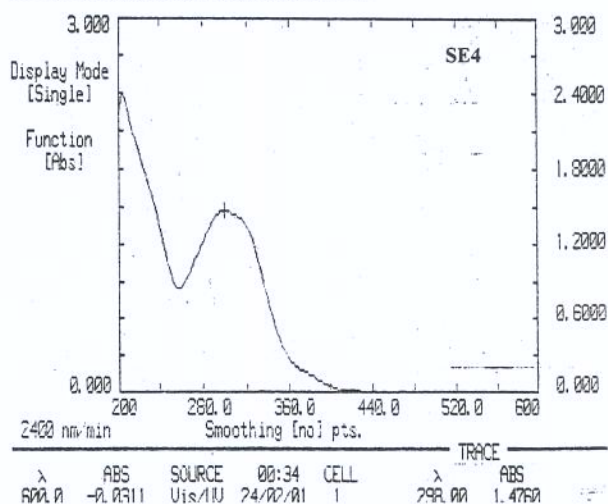
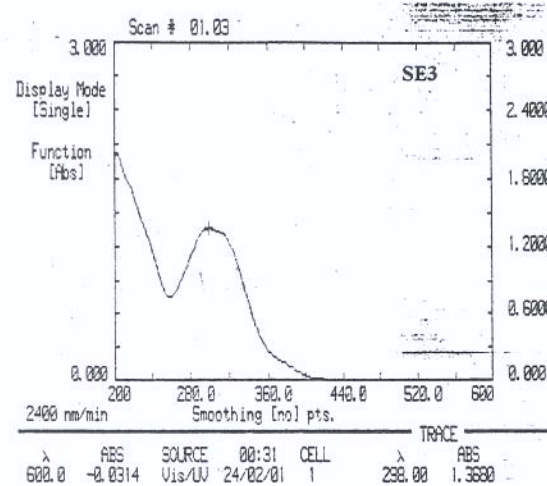
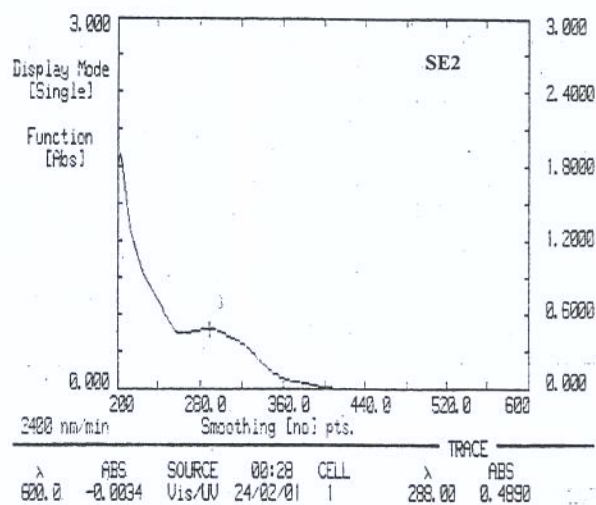
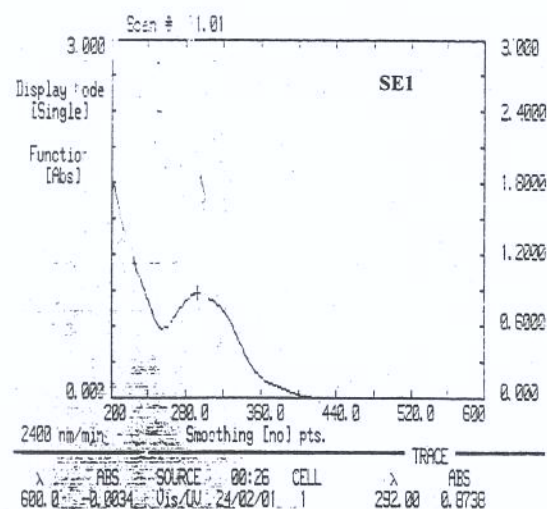


Figura 7: Espectros de Absorção na Região UV-Visível dos Extratos Etanólicos de Própolis do Estado de São Paulo (SE1 a SE6).

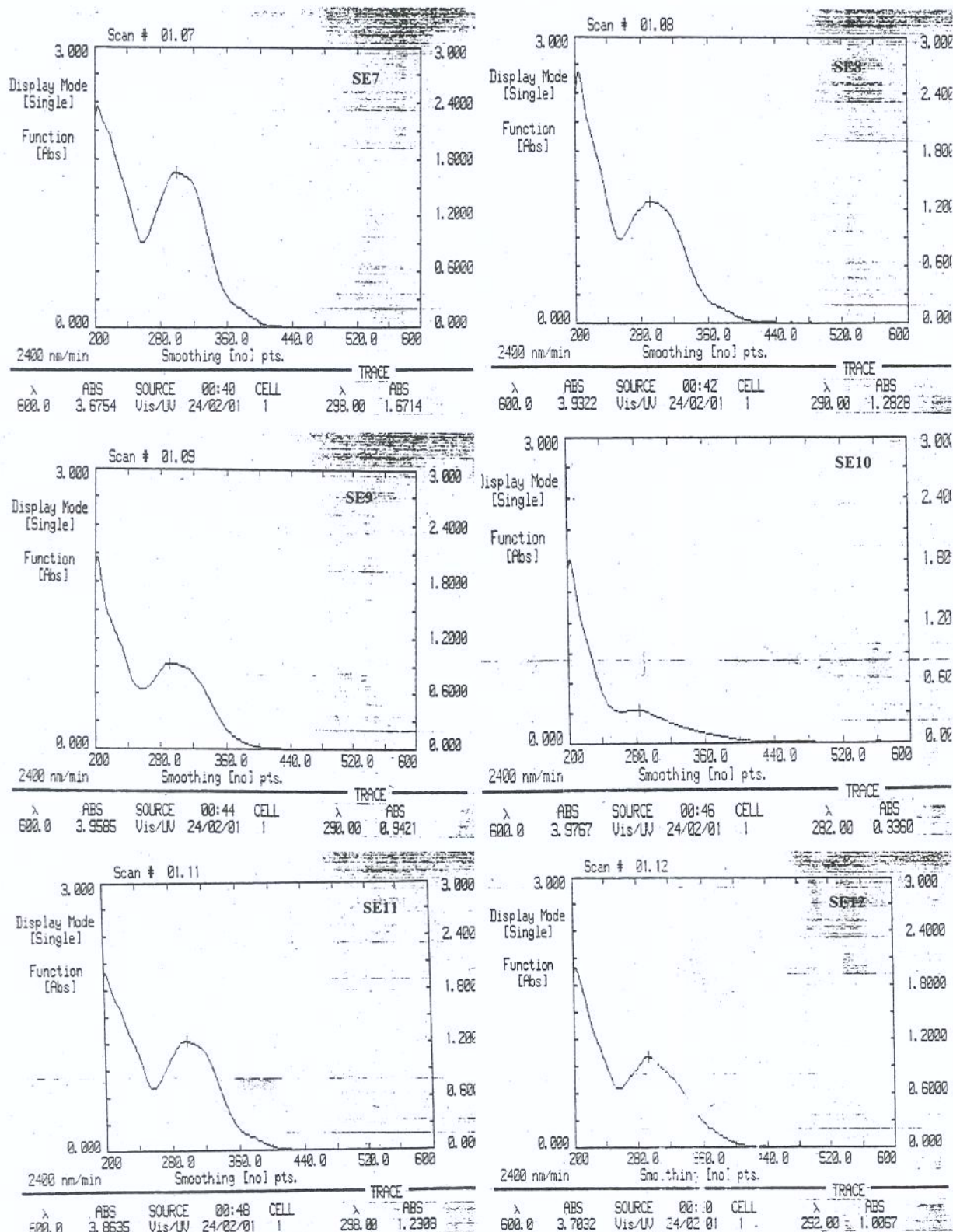


Figura 8 : Espectros de Absorção na Região UV-Visível dos Extratos Etanólicos de Própolis do Estado de São Paulo (SE7 a SE12).

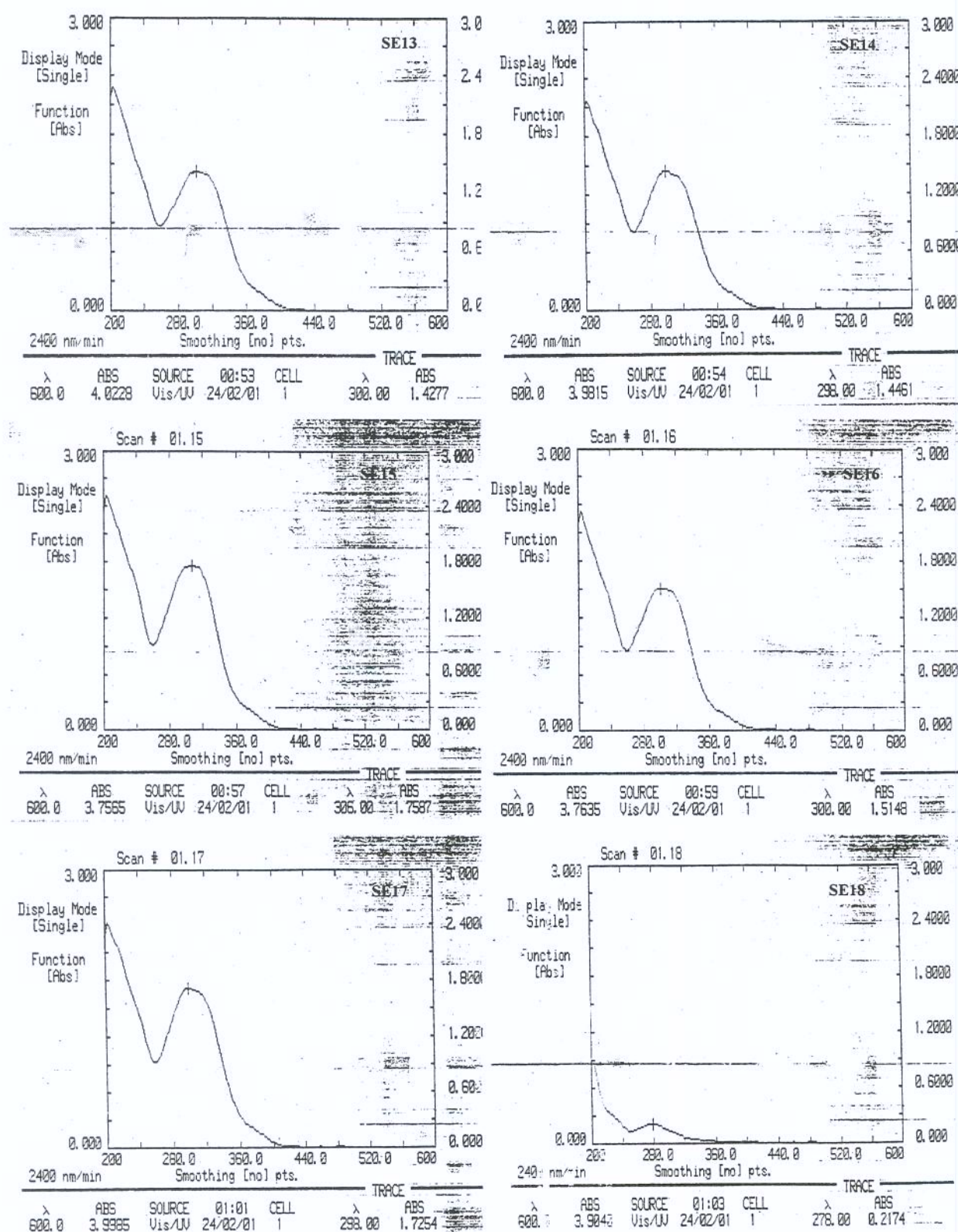


Figura 9: Espectros de Absorção na Região UV-Visível dos Extratos Etanólicos de Própolis do Estado de São Paulo (SE13 a SE18).

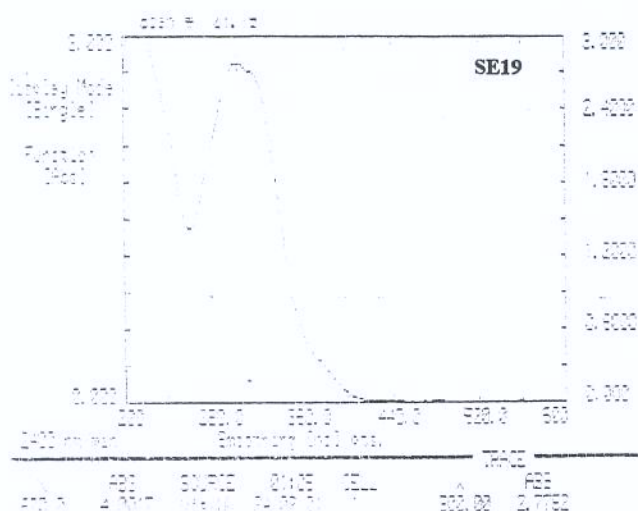


Figura 10: Espectro de Absorção na Região UV-Visível do Extrato Etanólico de Própolis do Estado de São Paulo (SE19).

5.4.2 Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCDAE)

Os EEPs foram analisados por Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCDAE) em fase reversa de acordo com o item 4.3.3. A CCDAE permite a visualização da intensidade e número de frações dos compostos fenólicos, sendo considerado um método rápido e eficiente para análise primária das própolis.

Os cromatogramas contendo as amostras do Estado de São Paulo estão apresentados na Figura 11; e foram visualizados sob luz ultravioleta no comprimento de onda de 366 nm. Observa-se uma variação muito pequena entre os perfis cromatográficos apresentados pelas amostras, levando à constatação prévia de que as própolis do Estado de São Paulo apresentam pouca variabilidade na sua composição química.

Nas placas de CCDAE notou-se que a amostra SE12 apresentou perfil bem diferenciado, onde aparecem bandas mais intensas e em maior número. As amostras SE10 e SE18 apresentaram menor número de bandas sendo que alguns compostos ficaram retidos no início do cromatograma, porém com diferenças qualitativas entre si. Além disso,

verificou-se que a amostra SE2 (*Pinus* sp) apresentou o mesmo perfil qualitativo da maioria das amostras, porém menor intensidade das bandas.

Através dos perfis obtidos em CCDAE e Espectrofotometria U.V.-Visível foi possível agrupar as amostras de São Paulo em quatro grupos distintos representados pelas amostras SE10, SE12 E SE18, sendo que no quarto grupo estaria inserida a maioria das amostras. Porém, como é de interesse analisar mais detalhadamente a variação na composição química das própolis ao longo do ano, este último grupo foi subdividido em seis de acordo com a vegetação predominante na época da coleta. Assim, as análises posteriores foram feitas baseando-se nos nove grupos a seguir: SE1 (laranja), SE2 (pinus), SE4 (eucalipto), SE5 (alecrim), SE10, SE12, SE17 (assa-peixe), SE18 (rubim) e SE19 (capixingui).

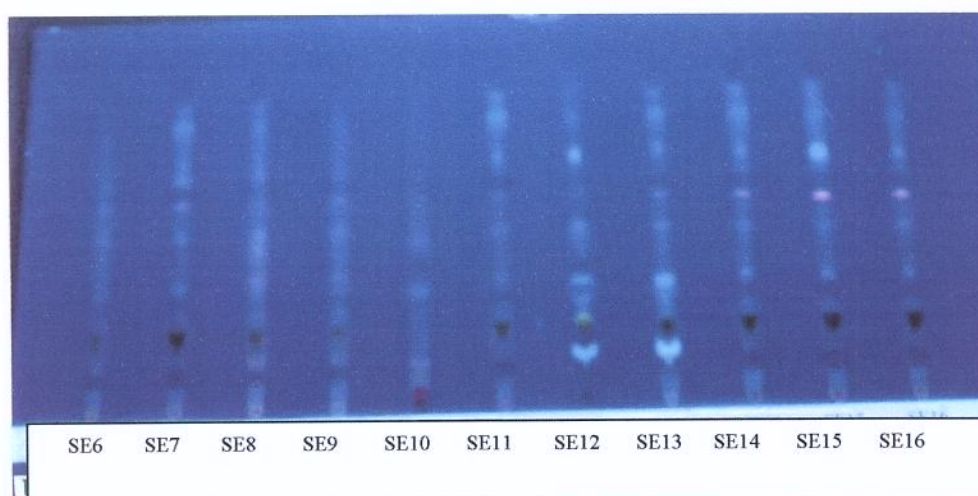
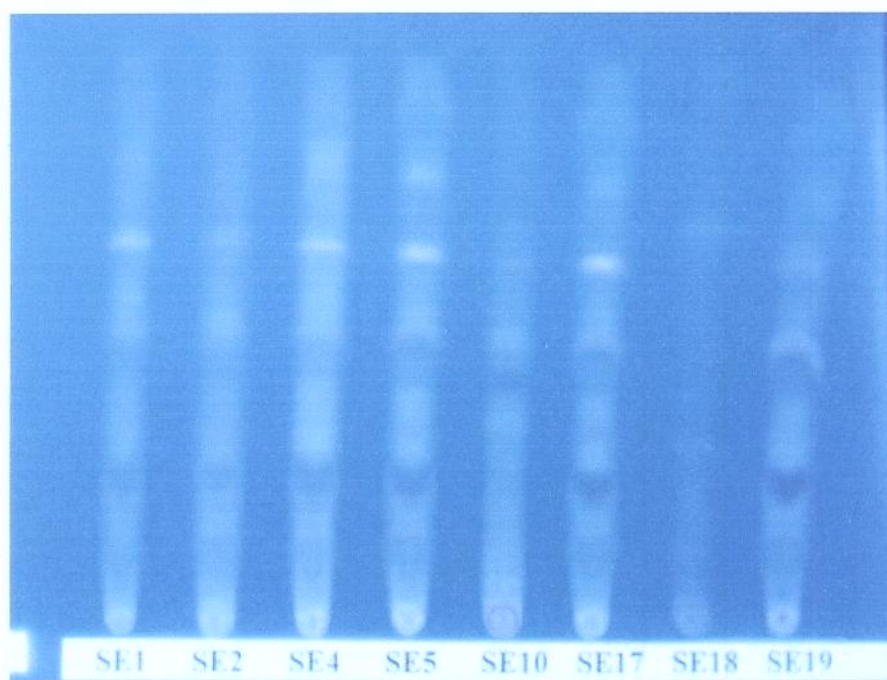


Figura 11 - Cromatogramas obtidos em Camada Delgada de Alta Eficiência ($\lambda = 366\text{nm}$) das Amostras de Própolis do Estado de São Paulo (SE1 a SE19).

5.4.3 Determinação de Flavonóides Totais

A determinação dos flavonóides totais foi realizada de acordo com o método descrito no item 4.3.2, baseado na formação do quelato entre o nitrato de alumínio e os flavonóides, sendo a quantificação feita com base no padrão quercetina. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 2 , abaixo.

Tabela 2 : Teor de Flavonóides Totais, com Base em Quercetina, dos Extratos Etanólicos de Própolis dos Grupos Representativos do Estado de São Paulo.

Amostra	Flavonóides Totais (mg/g própolis)
SE1	19,49 ^c
SE2	10,78 ^d
SE4	24,79 ^c
SE5	37,66 ^b
SE10	8,11 ^d
SE12	25,67 ^c
SE17	32,78 ^b
SE18	0,78 ^e
SE19	87,60 ^a

Teste de Tukey $p < 0,05$

Pelos resultados apresentados na Tabela 2, observa-se que as amostras apresentaram diferenças significativas pelo Teste de Tukey, quanto ao teor de flavonóides totais. A própolis SE19 (capixingui) apresentou maior teor de flavonóides (87,60 mg/g), enquanto que a amostra SE18 (rubim) mostrou quantidade muito baixa de flavonóides ($< 1,0$ mg/g). Não houve diferença significativa entre as amostras SE5 e SE17 (37,66 e 32,78 mg/g, respectivamente), SE1, SE4 e SE12 (19,49; 24,79 e 25,67 mg/g, respectivamente) e SE2 e SE10 com teores de 10,78 e 8,11 mg/g respectivamente.

Comparando-se esses resultados com aqueles obtidos através da Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência, observa-se que as amostras SE18 e SE10, que apresentaram menor número de bandas, também apresentaram menor teor de flavonóides

totais. A amostra SE2, cujo perfil cromatográfico foi qualitativamente igual às demais do mesmo grupo, porém com bandas menos intensas, apresentou menor teor de flavonóides, diferindo significativamente das demais amostras com as mesmas características cromatográficas.

É importante ressaltar que a própolis do Estado de São Paulo é considerada como uma das melhores própolis do mundo, devido a suas propriedades farmacológicas, apresentando padrão de concorrência. O mercado japonês, bastante exigente, dá preferência a um produto bem seco, aromático e de coloração marrom à esverdeada, sendo estas as características encontradas nas própolis de São Paulo analisadas.

A determinação dos flavonóides totais é um método utilizado na avaliação comercial da própolis, havendo maior valorização daquelas que apresentam maior teor de flavonóides. Apesar de ser um método rápido e preciso, não é exato, sendo que a quantidade de flavonóides presentes na amostra pode ser subestimada.

Isto ocorre porque o efeito batocrômico causado pelo alumínio, que leva a um aumento no comprimento de onda de absorção dos compostos, não é uniforme para todos os flavonóides. A formação de quelatos com o alumínio em solução de etanol ocorre com flavonas e flavonóis que contêm um grupo hidroxil livre nas posições 3 ou 5, ou ainda com os grupos 3', 4' dihidroxil (Jurd, 1969). Estes complexos absorvem próximo ao comprimento de onda de 415nm, que corresponde à banda de absorção do complexo quercetina-alumínio.

Entretanto, devido à falta de conjugação entre os anéis A e B, flavanonas, isoflavonas e dihidroflavonóis apresentam absorção máxima na região entre 270-295 nm, inferior aos espectros das flavonas e flavonóis. Além disso, o efeito batocrômico causado pelo alumínio sobre estes flavonóides é menor, havendo aumento da absorção em torno de 20 a 40 nm, não sendo, portanto, detectados por esta metodologia (Makham, 1970).

5.4.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A identificação e quantificação dos flavonóides presentes nas amostras de própolis dos grupos representativos do Estado de São Paulo foram feitas através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em Fase Reversa como descrito no item 4.3.3.

Os cromatogramas estão ilustrados nas Figuras 12 a 15, sendo os valores encontrados na quantificação dos flavonóides apresentados na Tabela 3.

Observando a distribuição dos picos nos cromatogramas, nota-se uma similaridade entre as amostras SE1, SE2, SE4, SE5, SE17 e SE19, sendo que o mesmo já havia sido verificado nos espectros na Região UV-Visível e na Cromatografia em Camada Delgada. Da mesma maneira, verifica-se que as amostras SE10, SE12 e SE18 apresentam perfis cromatográficos diferentes, sendo que a amostra SE18 possui um número bem menor de picos.

Da mesma maneira, na Tabela 3, podemos verificar que as amostras que demonstraram as similaridades acima discutidas, apresentaram os mesmos compostos fenólicos (ácido cumárico, ácido ferrúlico, pinobanksina, kamferol, isosakuranetina e kamferide), variando apenas as quantidades encontradas, com exceção das amostras SE4 onde também foi encontrado pequena quantidade de quercetina, e SE2 que não mostrou a presença dos compostos ácido ferrúlico e pinobanksina em quantidades detectáveis. A amostra SE18, como previsto nas análises anteriores, apresentou apenas o flavonóide pinocembrina (0,763 mg/g própolis); enquanto que a SE12 mostrou maior variabilidade dos compostos, encontrando-se ainda, além dos já citados acima, rhamnetina, pinocembrina, crisina e tectocrisina. Apesar da amostra SE10 apresentar um perfil diferente nas análises de Espectrofotometria na Região UV-Visível e Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência, os compostos encontrados foram os mesmos da maioria das amostras, com exceção do kamferol (ausente nesta), porém em quantidades inferiores, o que explicaria essas diferenças nos perfis cromatográficos.

Tabela 3 - Análise dos Flavonóides por CLAE em Fase Reversa dos Grupos de Própolis Representativos do Estado de São Paulo.

Amostra de Própolis	Teor de Flavonóides em mg/g de própolis								
	SE1	SE2	SE4	SE5	SE10	SE12	SE17	SE18	SE19
Ácido cumárico	4,40	1,00	6,46	8,90	0,63	2,32	7,77	-	5,45
Ácido ferrúlico	1,10	0,14	1,79	2,82	0,17	0,27	2,41	-	2,97
Quercetina	-	-	0,66	-	-	-	-	-	-
Pinobanksina	6,95	-	13,41	22,53	1,63	3,56	13,73	-	16,06
Kamferol	0,30	-	0,48	1,02	-	0,43	0,51	-	0,84
Rhamnetina	-	-	-	-	-	0,14	-	-	-
Isosakuranetina	18,82	20,31	41,76	52,86	7,71	11,41	62,42	-	47,52
Pinocembrina	-	-	-	-	-	7,48	-	0,76	-
Crisina	-	-	-	-	-	9,64	-	-	-
Kamferide	1,56	0,36	2,90	4,12	0,35	1,80	3,87	-	3,74
Tectocrisina	-	-	-	-	-	1,81	-	-	-

Os resultados encontrados estão de acordo com análises realizadas por alguns autores nas própolis da Região Sudeste do Brasil. Marcucci *et al.* (2000) encontrou os seguintes compostos: ácido caféico, ácido p-cumárico, ácido ferrúlico, pinobanksina e um derivado do kamferol, além de outros cinco fenólicos. Analisando a própolis do Estado de Minas Gerais, Tazawa *et al.* (1998) verificou a presença, dentre outros compostos, dos flavonóides isosakuranetina, pinocembrina, dihidrokamferide, kemferide e betuletol. Em análises de amostras de própolis do Rio de Janeiro, foram encontrados, por exemplo, os ácidos cinâmico e benzóico, kamferide e betuletol (Pereira *et al.*, 1998). Também há relatos de análises feitas com própolis do Estado de São Paulo, onde os compostos encontrados foram kamferide, 2 derivados do ácido cinâmico, ácido cumárico, aromadendrina-4'-metileter, 5,6,7-triidroxi-3,4'-dimetoxiflavona e ácido ferrúlico (Boudorova-Krasteva *et al.*, 1997; Bankova *et al.*, 1998).

É importante ressaltar um trabalho realizado por Marcucci *et al.* (1998) onde foram analisadas duas própolis do Estado de São Paulo, uma coletada em região de *Pinus sp* e

outra em região de floresta de *Eucalyptus sp.* As amostras mostraram similaridades no aspecto qualitativo, com presença de ácidos caféico, ferrúlico e p-cumárico, porém a concentração destes foi maior na própolis de eucalipto, que também apresentou maior quantidade de flavonóides. Em nossas análises, também pôde ser observado que a amostra SE2 (pinus) apresentou os compostos ácido cumárico, ácido ferrúlico, isosakuranetina e kamferide em menor quantidade comparada com a amostra SE4 (eucalipto), e ausência dos flavonóides quercetina, pinobanksina e kamferol, presentes na amostra de eucalipto.

Frente a estes resultados pode-se concluir que há pouca variabilidade na composição química das própolis do Estado de São Paulo, sendo que os compostos ácido cumárico, ácido ferrúlico e kamferide foram identificados na maior parte dos trabalhos descritos.

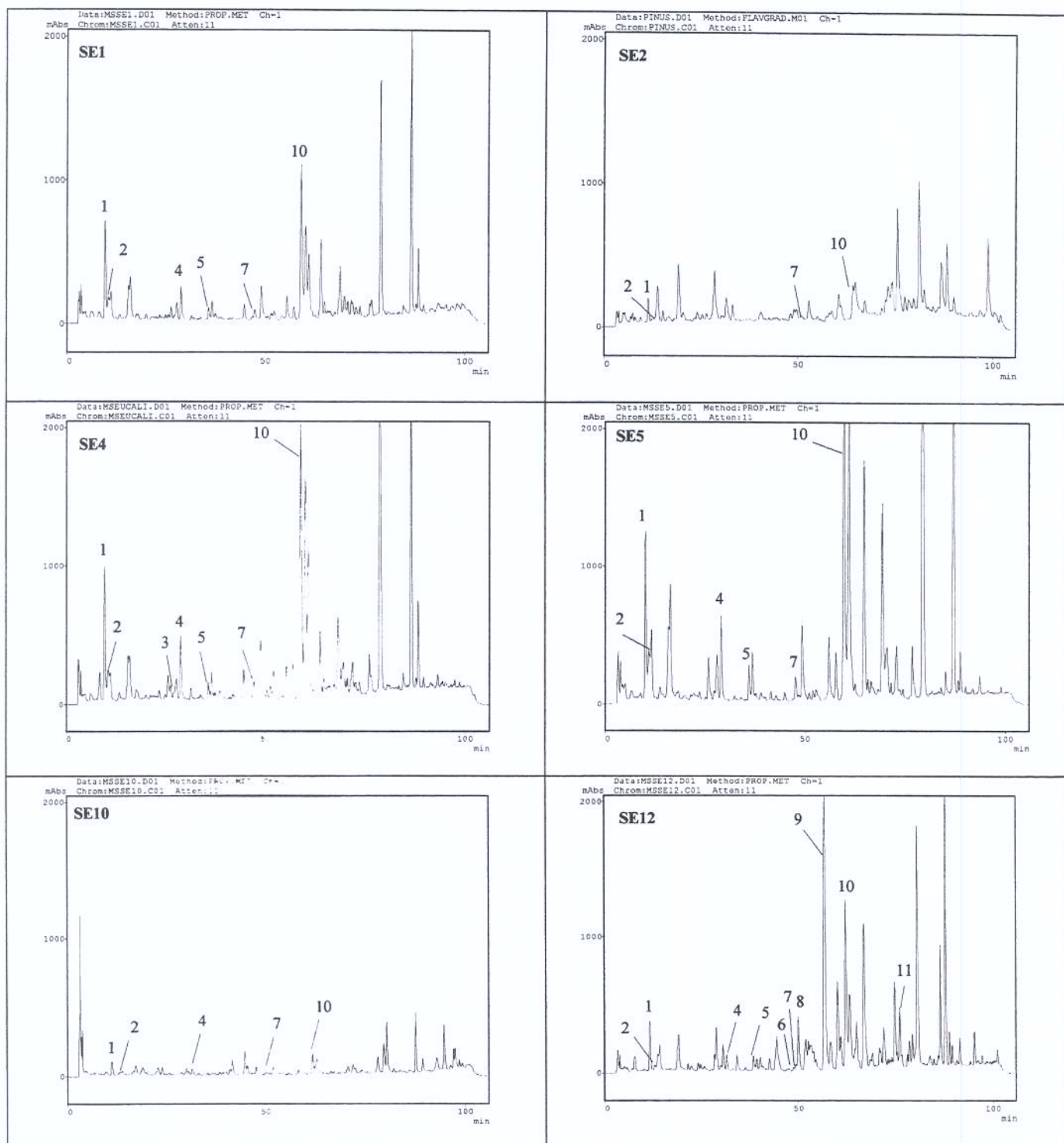


Figura 12 : Cromatogramas obtidos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) dos Extratos Etanólicos das Amostras de Própolis Representativas do Estado de São Paulo (SE1, SE2, SE4, SE5, SE10 e SE12).

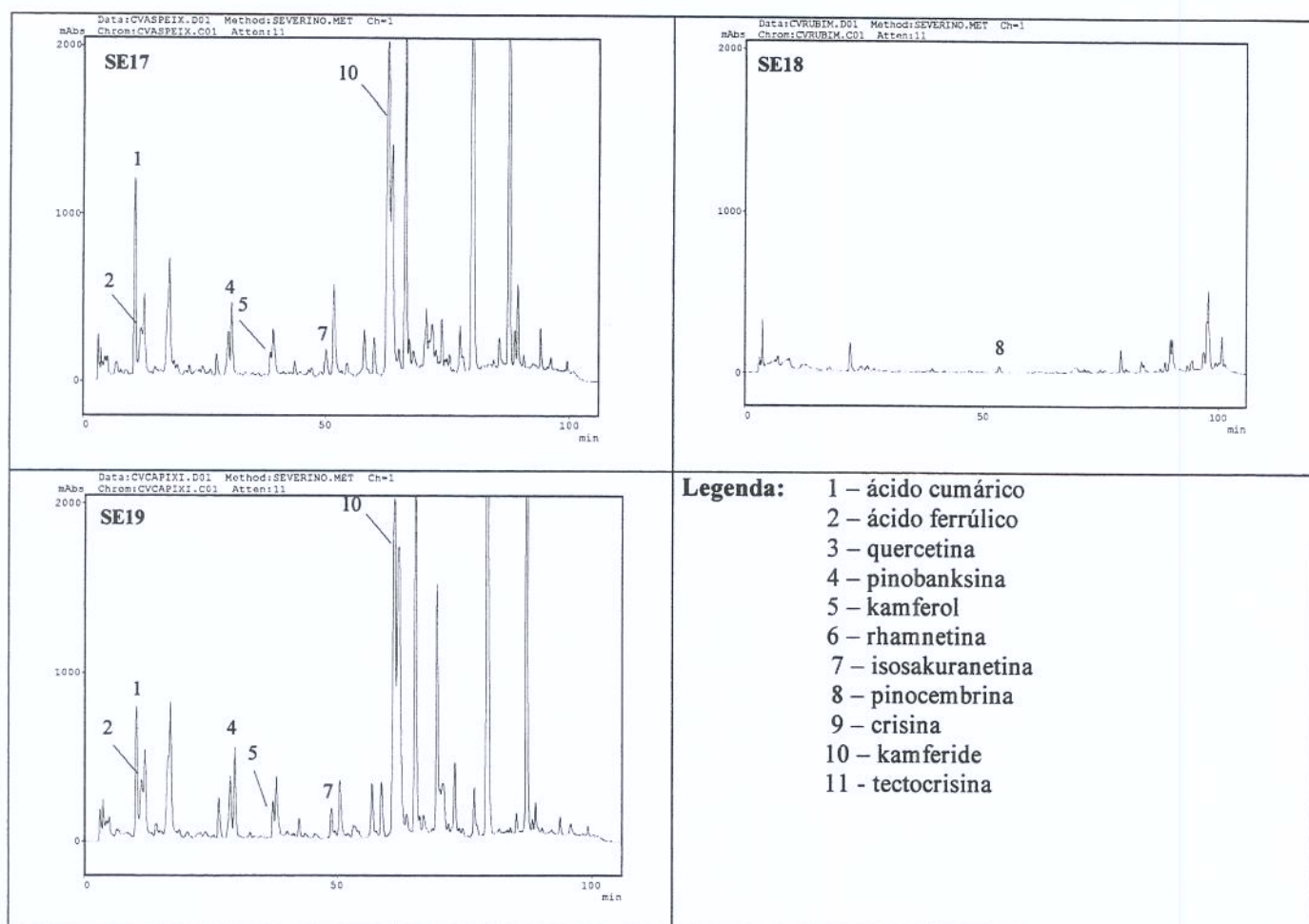


Figura 13 : Cromatogramas obtidos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) dos Extratos Etanólicos das Amostras de Própolis Representativas do Estado de São Paulo (SE17, SE18 e SE19).

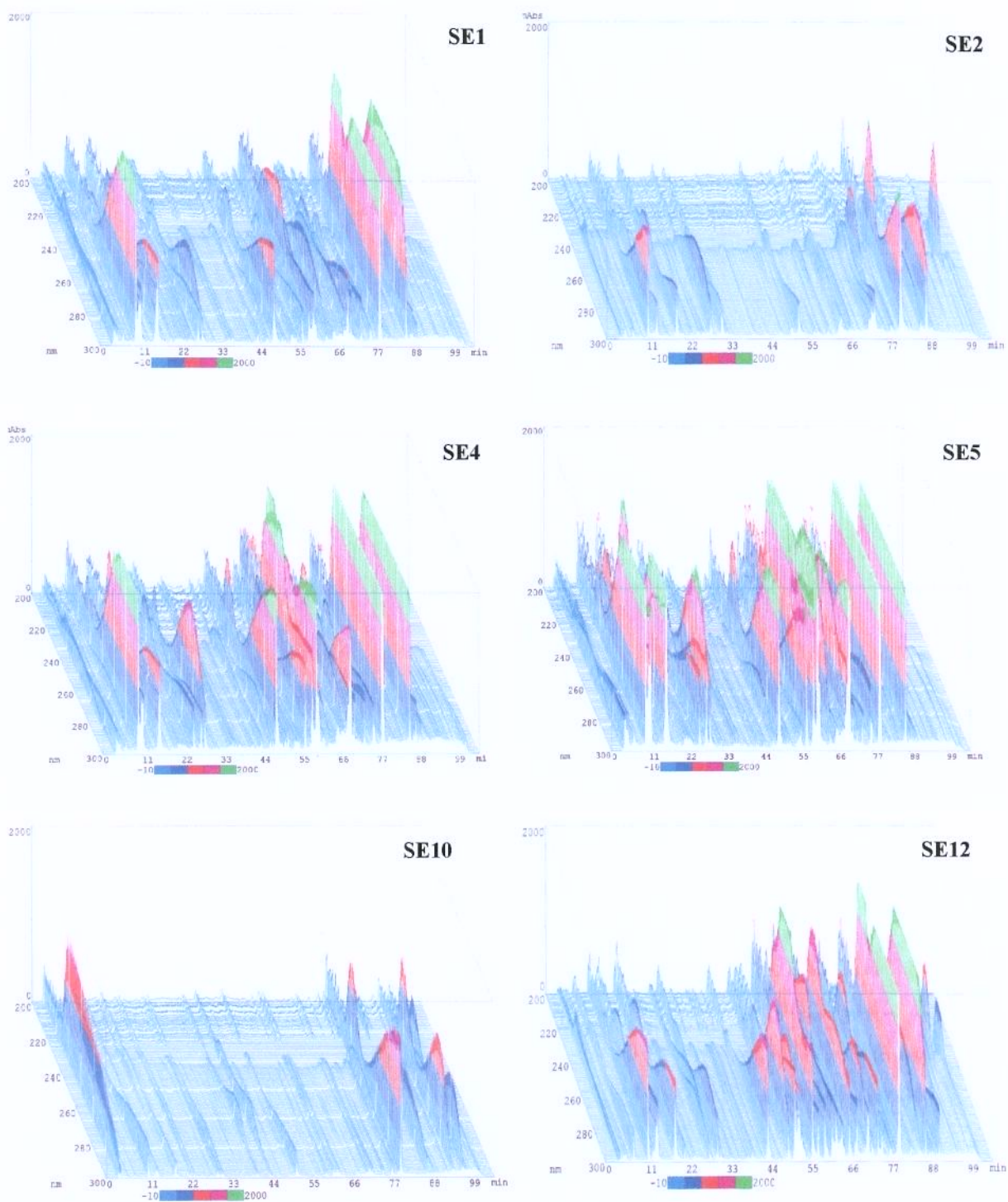


Figura 14: Cromatogramas Tridimensionais obtidos por CLAE das Amostras de Própolis Representativas do Estado de São Paulo (SE1, SE2, SE4, SE5, SE10 e SE12).

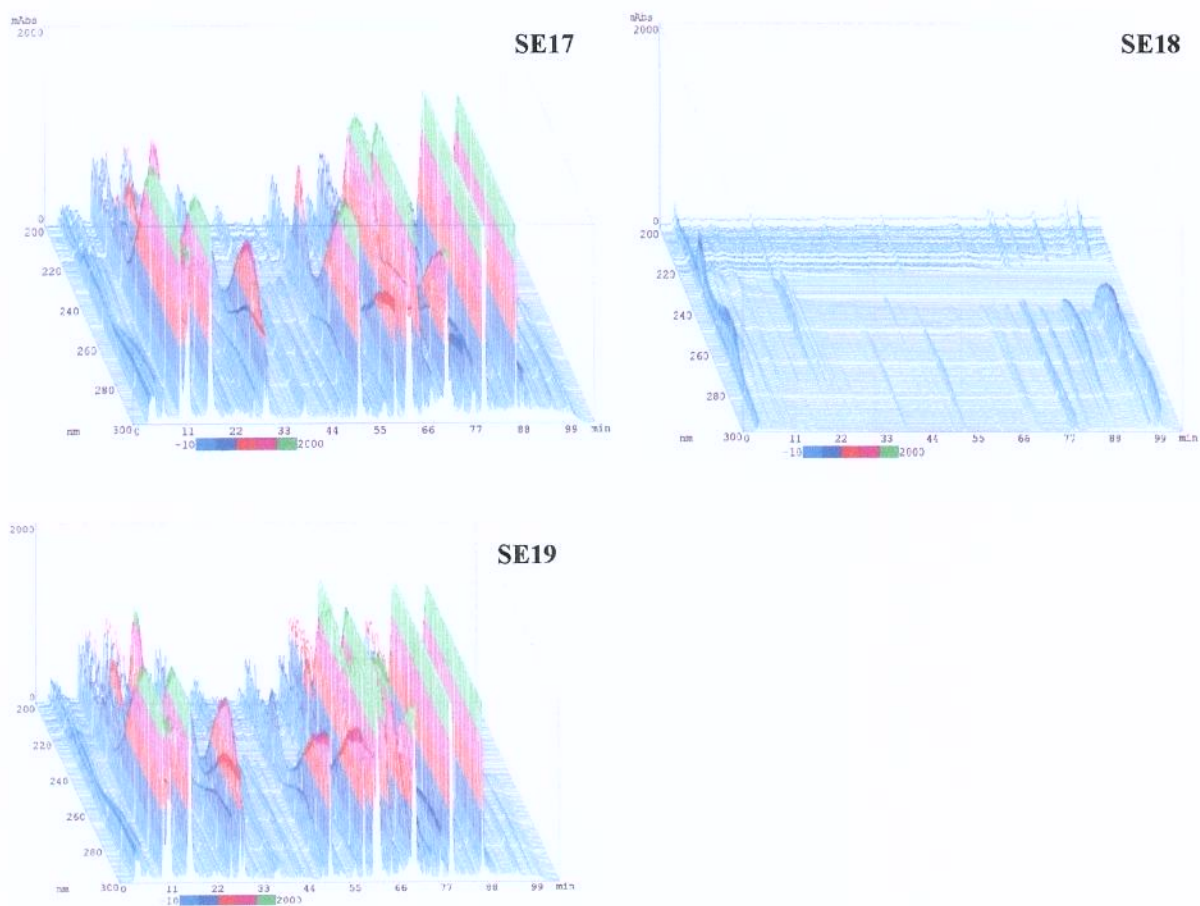


Figura 15: Cromatogramas Tridimensionais obtidos por CLAE das Amostras de Própolis Representativas do Estado de São Paulo (SE17, SE18 e SE19).

5.5 Atividades Biológicas

5.5.1 Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana das própolis do Estado de São Paulo foi testada contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Streptococcus mutans* de acordo com a metodologia descrita no item 4.4.1. Os resultados obtidos para os grupos representativos se encontram na Tabela 4, e a Figura 16 mostra os antibiogramas contra *Staphylococcus aureus*.

Observa-se que o potencial antimicrobiano variou bastante entre os grupos, sendo que o grupo SE19 apresentou maior halo inibitório, enquanto que os grupos SE10 e SE18 não apresentaram nenhuma atividade contra os microrganismos testados.

Comparando-se estes resultados com a Determinação de Flavonóides Totais realizado, verifica-se uma correlação entre os resultados obtidos, uma vez que a maior quantidade de flavonóides totais foi encontrada na amostra SE19 (87,60 mg/g) com maior atividade antimicrobiana, enquanto que os menores valores foram encontrados nas amostras SE10 (0,78 mg/g) e SE18 (8,11 mg/g) que não apresentaram halo inibitório contra os microrganismos testados.

Os resultados encontrados estão de acordo com Park *et al.* (1998 b) que analisaram duas amostras provenientes de Minas Gerais e uma de São Paulo, sendo que todas apresentaram atividade contra *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*. Bankova *et al.* (1995) e Kujungiev *et al.* (1999) também encontraram atividade contra *S. aureus* em amostras provenientes do Estado de São Paulo.

Tabela 4 - Atividade Antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Streptococcus mutans* das Amostras de Própolis Representativas do Estado de São Paulo.

Amostra de Própolis	Zona de Inibição (mm)	
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Streptococcus mutans</i>
SE1	1,0	1,0
SE2	0,5	1,0
SE4	1,5	1,5
SE5	2,0	2,0
SE10	-	-
SE12	traço	traço
SE17	2,0	1,5
SE18	-	-
SE19	3,0	2,5

Estudos têm sido realizados na tentativa de identificar os compostos responsáveis pela atividade antimicrobiana. Bankova *et al.* (1996) relacionou a atividade contra *Staphylococcus aureus* da própolis do Estado do Paraná (Brasil) a ácidos diterpênicos. Os flavonóides kamferide, galangina, apigeniana, quercetina, ramnetina, pinocembrina e kamferol demonstraram alta atividade bacteriostática contra *Staphylococcus aureus* (Maciejewicz & Meresta, 1999). A própolis da Alemanha, rica em galangina, phenietil-trans-cafeato e benzil ferulato, apresentou alta atividade contra este microrganismo (Hegaz *et al.*, 2000).

Aga *et al.* (1994) isolaram e identificaram três compostos da própolis do Estado de São Paulo: ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico, ácido 3-prenil-4-dihidrocinamoloxicinâmico e 2,2-dimetil-6-carboxietenil-2-H-1-benzopirano. Os três compostos apresentaram atividade contra *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes* e *Arthroderma benhamiae*, sendo o primeiro composto com maior atividade antimicrobiana.

Kujumgiev *et al.* (1999) analisaram amostras de própolis de diferentes localidades geográficas e composição química, encontrando em todas, significativa atividade antibacteriana e antifúngica.

Na amostra SE19, que apresentou maior atividade, foram encontrados os seguintes compostos fenólicos: isosakuranetina (47,52 mg/g), pinobanksina (16,06 mg/g), ácido cumárico (5,44 mg/g), kamferide (3,74 mg/g), ácido ferrúlico (2,97 mg/g) e kamferol (0,84 mg/g).

Frente aos resultados encontrados, bem como aos dados da literatura, e, sendo a própolis responsável pela proteção da colméia contra a propagação microbiana, acredita-se que sua atividade biológica se deve a uma combinação de compostos, e não a apenas uma substância isoladamente.

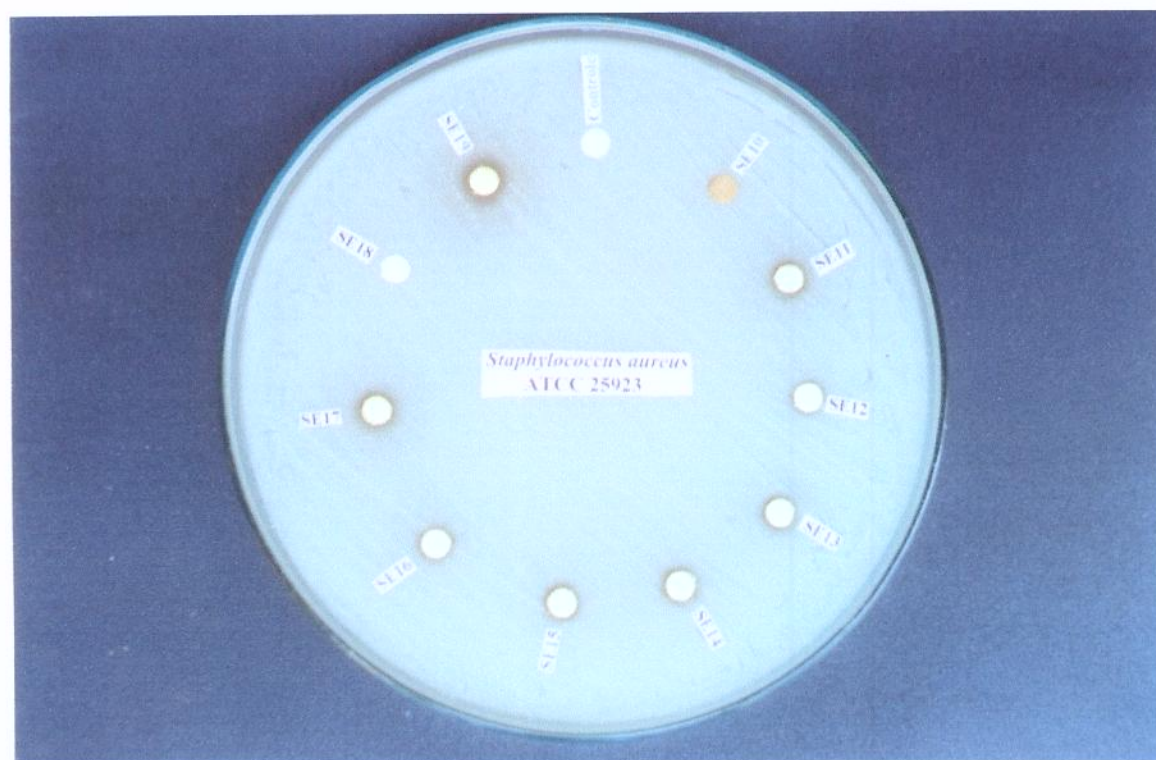
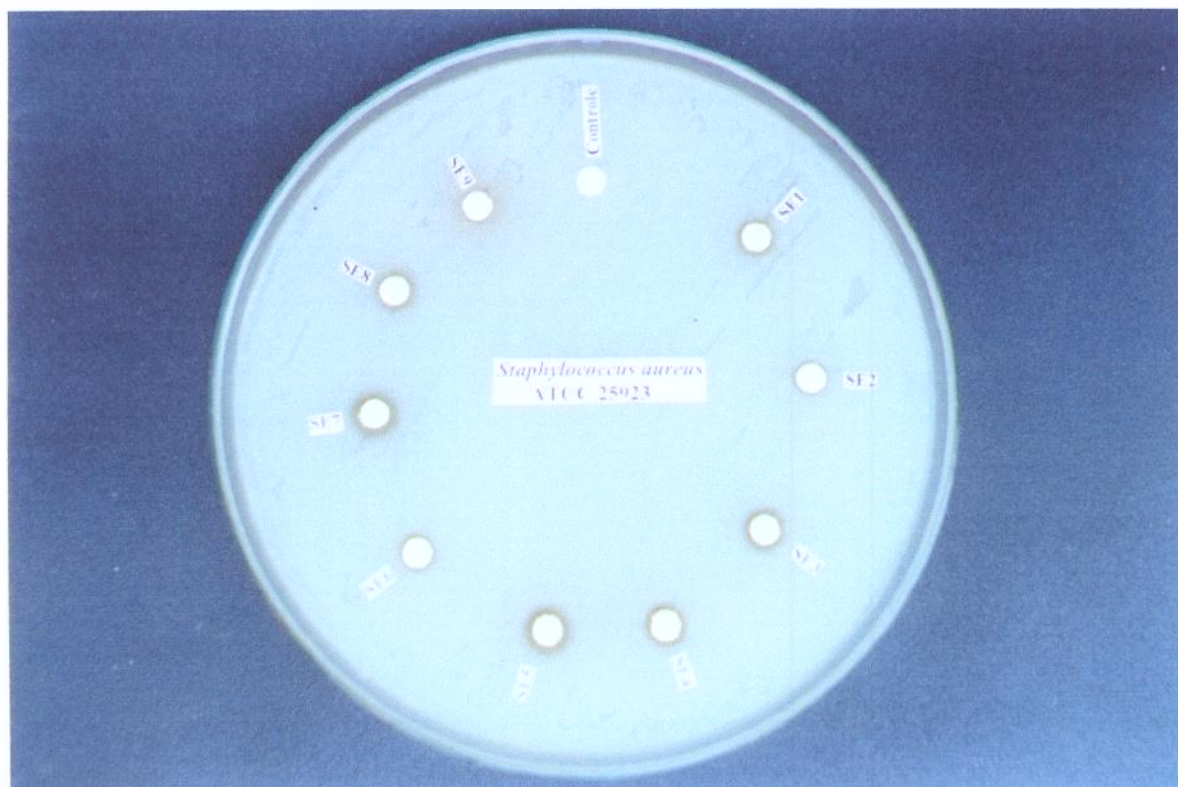


Figura 16: Atividade Antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 das Amostras de Própolis do Estado de São Paulo (SE1 a SE19).

5.5.2 Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante dos extratos etanólicos das própolis dos grupos representativos do Estado de São Paulo foi determinada pelo método descrito no item 4.4.2, baseado na oxidação acoplada do β -caroteno e ácido linoléico.

Os resultados obtidos estão representados nas Figuras 17 e 18, notando-se que a maioria das amostras de São Paulo apresentou alta atividade antioxidante, com valores entre 83 e 98,5% num período de três horas de incubação a 40°C, com exceção da amostra SE18, que apresentou baixa atividade (40,48%).

Estes valores podem ser relacionados com o teor de flavonóides totais encontrados, sendo que a amostra SE18 que apresentou baixo teor de flavonóides, mostrou menor atividade antioxidante. Entretanto não houve diferença significativa na atividade antioxidante das amostras SE1, SE4, SE5, SE17 e SE19, apesar de apresentarem variação no teor de flavonóides totais.

Flavonóides estão entre os mais potentes antioxidantes das plantas porque possuem um ou mais dos seguintes elementos estruturais envolvidos na atividade antioxidante: (1) um grupo o-difenol no anel B, (2) 2-3 dupla ligação conjugada com função 4-oxo, e (3) grupos hidroxila nas posições 3 e 5. Quercetina, um flavonol que combina todas estas características, é um dos mais potentes antioxidantes naturais. A eficiência como antioxidante dos flavonóides está diretamente correlacionada com o grau de hidroxilação e diminui na presença de açúcar ligado (Bravo, 1998).

Alguns compostos têm sido reportados como potentes antioxidantes, como o ácido caféico e seu derivado, o ácido caféico phenetil ester (CAPE), largamente distribuído nas plantas. Um estudo realizado com própolis, indicou que o benzil cafeato também apresenta atividade antioxidante (Yamauchi *et al.*, 1992). Basnet *et al.* (1997) isolaram um novo

composto do extrato aquoso da própolis brasileira denominado propol, que apresentou alta atividade antioxidante.

De maneira geral, a atividade antioxidante de plantas e da própolis tem sido relacionada com a presença de flavonóides, entretanto os compostos isolados responsáveis pela atividade, bem como seu mecanismo de ação ainda não foram elucidados.

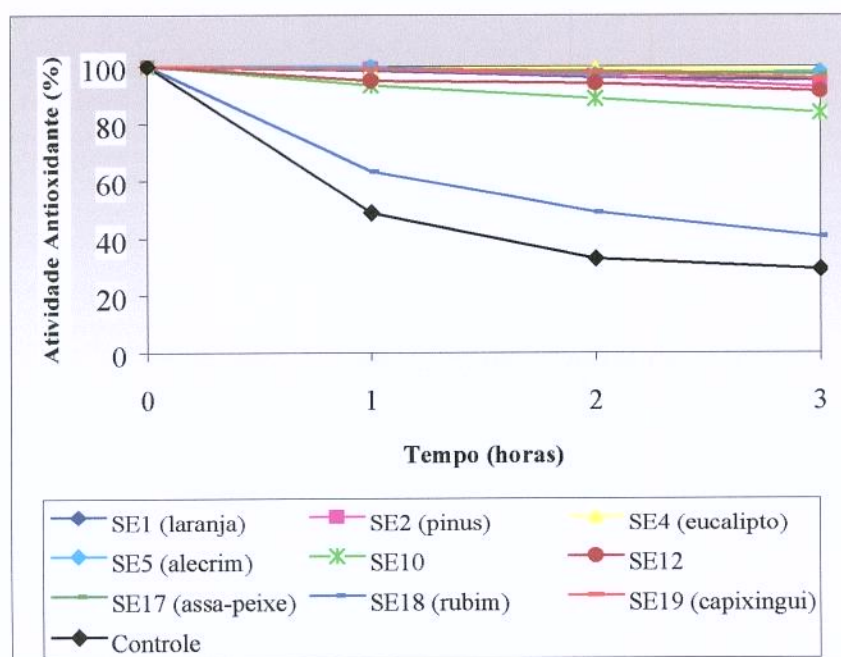
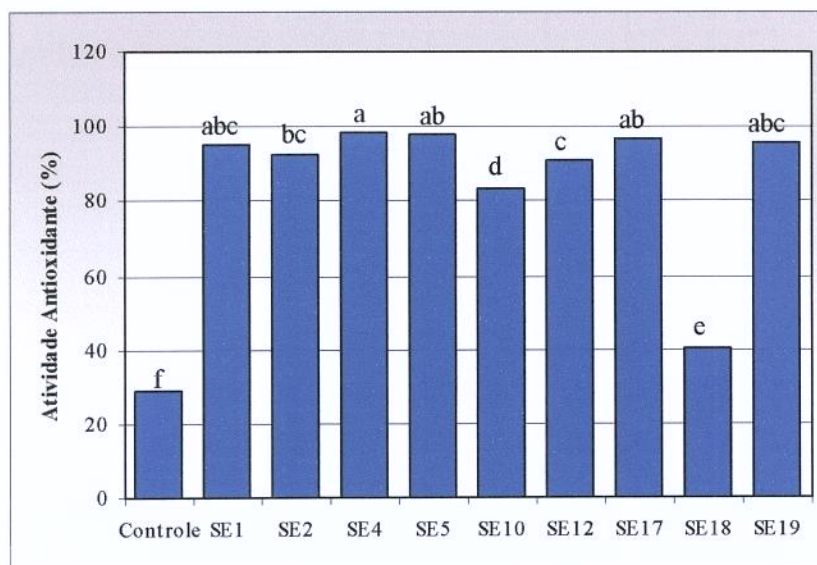


Figura 17: Atividade Antioxidante dos Extratos Etanólicos das Amostras de Própolis dos Grupos Representativos do Estado de São Paulo.



Teste de Tukey $p < 0,05$

Figura 18: Atividade Antioxidante dos Extratos Etanólicos das Amostras de Própolis dos Grupos Representativos do Estado de São Paulo após 3 horas de incubação.

5.5.3 Atividade Antiinflamatória

A atividade antiinflamatória das própolis pertencentes aos grupos representativos foi determinada de acordo com o método descrito no item 4.4.3.

A base da medida turbidimétrica da hialuronidase é o fenômeno de precipitação que ocorre quando as ligações glicosídicas do ácido hialurônico são rompidas e a cadeia despolimerizada, sendo portanto a inibição desta, uma medida de atividade antiinflamatória *in vitro*.

Como pode ser observado na Tabela 5, todos os extratos etanólicos de própolis apresentaram inibição da enzima, sendo que os maiores valores foram das amostras SE12 e SE17 em torno de 29%, amostras SE4 e SE5 (23%) e amostra SE19 (18%), não havendo diferença significativa entre as cinco amostras a nível de 5% de significância pelo Teste de Tukey.

Miyataka *et al* (1997) estudaram a inibição da enzima hialuronidase pelos extratos etanólicos da própolis brasileira, sendo que todas as amostras apresentaram atividade.

Os resultados encontrados por Moura (2000) em estudos feitos com amostras de própolis da Região Nordeste do Brasil, mostram que todas apresentaram atividade antiinflamatória, sendo três amostras com poder de inibição em torno de 50%.

Estudando o efeito de alguns flavonóides sobre a enzima hialuronidase, Kuppusamy & Das (1991) mostraram que a presença de grupos hidroxilas nas posições 5,7 e 4', uma dupla ligação entre os carbonos 2 e 3 e um grupo cetona na posição 4, refletem numa potente ação inibitória sobre a hialuronidase. Entretanto, a habilidade dos flavonóides em inibir a atividade enzimática pode ser completamente destruída na presença de substituintes glicosídeos. Os flavonóides apigenina, luteolina e kamferol mostraram-se como potentes

inibidores enzimáticos, enquanto miricetina, floretina e quercetina apresentaram inibição variável dependendo da dose de hialuronidase de veneno aplicada.

Através das análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) realizadas, foi encontrado o flavonóide kamferol nas amostras SE1, SE4, SE5, SE12, SE17 e SE19, sendo que as mesmas amostras, com exceção da SE1, apresentaram maior atividade antiinflamatória. Desta forma, pode-se constatar que este composto pode estar relacionado com a inibição da enzima hialuronidase, entretanto, outros compostos ainda não identificados como potentes inibidores, podem mostrar ação antiinflamatória.

Tabela 5 – % de Inibição da Enzima Hialuronidase das Amostras de Extrato Etanólico de Própolis dos Grupos Representativos do Estado de São Paulo.

Amostra	% Inibição da Hialuronidase
SE1	12,9 ^c
SE2	11,2 ^c
SE4	23,6 ^{abc}
SE5	23,5 ^{abc}
SE10	12,4 ^c
SE12	29,2 ^a
SE17	29,1 ^{ab}
SE18	15,6 ^{bc}
SE19	17,8 ^{abc}

Teste de Tukey $p < 0,05$

6.CONCLUSÕES

As análises por Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência e Espectrofotometria UV-Visível, demonstraram a pequena diversidade das própolis do Estado de São Paulo.

A pequena diversidade química foi confirmada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, podendo as amostras de própolis serem agrupadas em 4 grupos distintos. A maioria das amostras de própolis do Estado de São Paulo apresentou os seguintes compostos em maior quantidade: isosakuranetina, pinobanksina , ácido cumárico, kamferide, ácido ferrúlico e kamferol.

Houve diferença na atividade antibacteriana contra os microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans* entre as amostras analisadas, sendo o maior potencial encontrado na amostra SE19, enquanto que as amostras SE10 e SE18 não apresentaram atividade.

Observou-se correlação entre os resultados encontrados no Teste de Flavonóides Totais e a atividade antimicrobiana, sendo que as amostras com maior quantidade de flavonóides apresentaram maior halo inibitório.

Todas as amostras analisadas, com exceção da amostra SE18, apresentaram alta atividade antioxidante após três horas de incubação. Também foi verificada inibição da enzima hialuronidase nas amostras de própolis de São Paulo analisadas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ACKERMANN, T. Fast Chromatographic Study of Propolis Crudes. **Food Chemistry** , v.42, p.135-138, 1991.
2. AGA, H. SHIBUYA, T.; SUGIMOTO, T.; KURIMOTO, M.; NAKAGIMA, S. Isolation and Identification of Antimicrobial Compounds in Brazilian Propolis. **Biosci. Biotech. Biochem.** v.58, n.5, p.945-946, 1994.
3. AMOROS, M.; SIMÕES, C. M. O.; GIRRE, L. 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.**, v.55, n.12, p. 1732-1740, 1992.
4. AMOROS, M.; SAUVAGER, F.; GIRRE, L.; CORMIER, M. In Vitro Antiviral Activity of Propolis. **Apidologie**, v.23, p. 231-240, 1992.
5. AMOROS, M.; LURTON, E.; BOUSTIE, J.; GIRRE, L. Comparison of the Anti-herpes Simplex Virus Activities of Propolis and 3-methyl-but-2-enyl caffeate. **J. Nat. Prod.**, v.57, n.5, p. 644-647, 1994.
6. ARONSON, N. N.; DAVIDSON, E. A. Lysosomal hyaluronidase from rat liver. **J. Biol. Chem.**, v.242, p. 437-440, 1967.
7. BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; STOEV, G.; POPOV, S. Determination of phenolics from propolis by capillary gas chromatography. **J. Chromatography.**, v.607, p. 150-153, 1992.

8. BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; KUJUMGIEV, A. ; MARCUCCI, M. C.; POPOV, S.
Chemical Composition and Antibacterial Activity of Brazilian Propolis. **Zeitschrift fur Naturforschung C – A Journal of Biosciences**, v.50,.p. 167-172, 1995.
9. BANKOVA, V.; NIKOLOVA, N.; MARCUCCI, M. A New Lignan from Brazilian Propolis. **Zeitschrift fur Naturforschung B – A Journal of** , v.51, p.735-737, 1996.
10. BANKOVA, V.; MARCUCCI, M. C.; SIMOVA, S.; NIKOLOVA, N.; KUJUMGIEV, A . Antibacterial Diterpenic Acids from Brazilian Propolis. **Zeitschrift fur Naturforschung C – A Journal of Biosciences** , v.51, p. 277-280, 1996.
11. BANKOVA, V.; BOUDOUROVA-KRASTEVA, G.; POPOV, S.; SFORCIN, J. M.; FUNARI, S. R. C. Seasonal Variations of the Chemical Composition of Brazilian Propolis. **Apidologie**, v.29, p.361-367, 1998.
12. BANSKOTA, A .H.; TESUKA, Y.; PRASAIN, J.K.; MATSUSHIGA, K.; SAIKI, I.; KADOTA, S. Chemical Constituents of Brazilian Propolis and Their Cytotoxic Activities. **Journal of Natural Products**,v.61, p.896-900, 1998.
13. BASNET, P.; MATSUNO, T.; NEIDLEIN, R. Potent Free Radical Scavenging Activity of Propol Isolated from Brazilian Propolis. **Zeitschrift fur Naturforschung C – A Journal of Biosciences** , v.52, p. 828-833, 1997.
14. BLAIR, J. E., BORMAN, E. K., BYNOE, E. T., UPDYKE, E. L. & WILLIAMS, R. E. O. Hospital acquired staphylococcal disease, recommended procedure for laboratory investigation, Atlanta, Ga., United Sates, Department of Health, Education and Welfare, Public Heath Service. 1958

15. BOUDOUROVA-KRASTEVA, G.; BANKOVA, V.; SFORCIN, J. M.; NIKOLOVA, N.; POPOV, S. Phenolics from Brazilian Propolis. **Zeitschrift fur Naturforschung C – A Journal of Biosciences** ,v.52, p. 676-679, 1997.
16. BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. **Nutrition Reviews**, v.56, n.11, p.317-333, 1998.
17. BURDOCK, G. A. Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis (Propolis). **Food and Chemical Toxicology**, v.36, p. 347-363, 1998.
18. CHOPRA, S.; PILLAI, K. K.; HUSAIN, S. Z.; GIRI, D. K. Propolis Protects against Doxorubicin-Induced Myocardiopathy in Rats. **Experimental and Molecular Pathology**, v.62, p. 190-198, 1995.
19. CRISTOV, R.; BANKOVA, V.; HEGAZI, A .; ABD EL HADY, F.; POPOV, S. Chemical Composition of Egyptian Propolis. **Zeitschrift fur Naturforschung C – A Journal of Biosciences** , v.53, p.197-200, 1998.
20. FERNÁNDEZ, M. A.; SÁENZ, M. T.; GACÍA, M. D. Anti-inflammatory Activity in Rats and Mice of Phenolic Acids Isolated from *Scrophularia frutescens*. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.50,p. 1183-1186, 1998.
21. GHISALBERTI, E.L. Propolis-Review. **Bee World**, v.60, n.2, p.59-84, 1979.
22. GRANGE, J.M.; DAVEY, R.W. Antibacterial Properties of Propolis. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v.83, p.159-160, 1990.

23. GRUNBERGER, D.; BANERJEE, R.; EISINGER, K.; OLTZ, E.M.; EFROS, L.; CALDWELL, M.; ESTEVEZ, V.; NAKANISHI, K. Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. **Experientia**, v.44, 1998.
24. HAMERSCHIDT, P. A.; PRATT, D. E. Phenolic antioxidants of dried soybeans. **Journal of Food Science**, v.43, p. 556-559, 1978.
25. HEIMLER, D. High Performance Thin Layer Chromatography of Selected Flavonoid Aglycones on Ready-for-use Layers of Silanized Silica Gel. **J. Chromatogr.**, v.366, p. 407-411, 1986.
26. HEGAZI, A. G.; ABD EL HADY, F. K.; ABD ALLAH, F. A. M. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of European Propolis. **Zeitschrift für Naturforschung C – A Journal of Biosciences**, v.55, n.1-2, p.70-75, 2000.
27. HILHORST, M. J.; SOMSEN, G. W.; JONG, G. J. Potential of Capillary Electrophoresis for the Profiling of Propolis. **J. High Resol. Chromatogr.**, v.21, n.11, p.608-612, 1998.
28. JURD, L. Aluminum Complexes of Phenolic Flavones. Spectral and Structural Correlations. **Phytochemistry**, v.8, p.445-462, 1969.
29. KAKEGAWA, H.; MATSUMOTO, H.; ENDO, K.; SATOH, T.; NONAKA, G.; NISHIOKA, I. Inhibitory Effects of Tannins on Hyaluronidase Activation and on the Degranulation from Rat Mesentery Mast Cells. **Chem. Pharm. Bull.**, v.33, n.11, p. 5079-5082, 1985.

30. **Kenkōsyokuhin Kikaku Kijun no Kōshi.** Standard of Propolis as Food, Boletim Informativo da Associação Japonesa de Saúde e Nutrição, June, p.8-10, 1994.
31. KHAYYAL, M. T.; EL-GHAZALY, M. A .; EL-KHATIB, A . S. Mecanisms Involved in the Antiinflammatory Effect of Propolis Extract. **Drugs under Experimental and Clinical Research** , v.19, n.5, p. 197-203, 1993.
32. KOO, HYUN. **Estudo dos Flavonóides da Própolis de *Apis mellifera* Africanizada Provenientes de Diversas Regiões do Brasil.** Campinas, 1996. 67p. Tese de Mestrado em Ciência de Alimentos – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
33. KOO, M.H.; PARK, Y. K.. Investigação do teor de flavonóides nas própolis comerciais. **Revista Brasileira de Apicultura.** 6-11, Nov-Dez/1996.
34. KOO, M. H.; PARK, Y. K. Investigation of Flavonoid Aglycones in Propolis Collected by Two Different Varieties of Bees in the Same Region. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v.61, n.2, p. 367-369, 1997.
35. 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. **Archives of Oral Biology**, v.45, p.141-148, 2000 a.
36. 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. **Current Microbiology**, v.41, p.192-196, 2000 b.

37. KROL, W.; CZUBA, Z.; SCHELLER, S.; GABRYS, J; GRABIEC, S.; SHANI, J. Anti-Oxidant Property of Ethanolic Extract of Propolis (EEP) as Evaluated by Inhibiting Chemiluminescence Oxidation of Luminol. **Biochemistry International** , v.21, n.4, p.593-597, 1990.
38. KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; YU. SERKEDJIEVA; BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**, v.64, n.3, p.235-240, 1999.
39. KUPPUSAMY, U. R. & DAS, N. P. Inhibitory Effects of Flavonoids on Several Venom Hyaluronidases. **Experientia**, v.47, p.1196-1200, 1991.
40. MACIEJEWICZ, W. & MERESTA, T. Quantitative Determination of the Bacteriostatic Activity against *Staphylococcus aureus* of Certain Flavonoids, Phenolic Acids and Esters Occurring in Propolis. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v.43, n.1, p.71-76, 1999.
41. MARCUCCI, M. C.; CAMARGO, F. A.; LOPES, M. A. Identification of Amino Acids in Brazilian Propolis. **Zeitschrift fur Naturforschung C – A Journal of Biosciences** , v.51, p.11-14, 1996.
42. MARCUCCI, M. C.; RODRIGUEZ, J.; FERRERES, F.; BANKOVA, V.; GROTO, R.; POPOV, S. Chemical Composition of Brazilian Propolis from São Paulo State. **Zeitschrift fur Naturforschung C – A Journal of Biosciences** , v.53, p.117-119, 1998.

43. 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. **Zeitschrift fur Naturforschung C – A Journal of Biosciences** , v.55, n.1-2, p.76-81, 2000.
44. MARKHAM, K. R. Ultraviolet and Visible Absorption Spectroscopy. IN: **The Flavonoids**. Harborne, J. B.; Mabry, T. J.; Mabry, H. New York, Academic Press, p.47-61, 1975.
45. MARKHAM, K. R.; MITCHELL, K. A.; WILKINS, A. L.; DALDY, J. A.; LU, Y. HPLC and GC-MS Identification of the Major Organic Constituents in New Zealand Propolis. **Phytochemistry** , v.42, n.1, p. 205-211, 1996.
46. MARTOS, I.; COSSENTINI, M.; FERRERES, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Flavonoid Composition of Tunisian Honeys and Propolis. **J. Agric. Food Chem.**, v.45, p. 2824-2829, 1997.
47. MSTAT-C. A microputer program for the design, management and analysis of agronomic research experiments. Norway: MSTAT Distribution, n. p.,1988.
48. MATSUNO, T.; CHEN, C.; BASNET, P. A Tumoricidal and Antioxidant Compound Isolated from an Aqueous Extract of Propolis. **Med. Sci. Res.**, v.25, p. 583-584, 1997.
49. MATSUNO, T.; SAITO, M.; MATSUMOTO, H.; MORIKAWA, J. A New Benzo- γ -piran Derivative Isolated from Propolis. **Zeitschrift fur Naturforschung C – A Journal of Biosciences**, v.53, p.1037-1039, 1998.

50. MIYATAKA, H.; NISHIKI, M.; MATSUMOTO, H.; FUJIMOTO, T.; MATSUKA, M.; SATOH, T. Evaluation of Propolis. I. Evaluation of Brazilian and Chinese Propolis by Enzymatic and Physico-Chemical Methods. **Biol. Pharm. Bull.**, v.20, n.5, p. 496-501, 1997.
51. MORENO, M. I. N.; ISLA, M. I.; CUDMANI, N. G.; VATTUONE, M. A.; SAMPIETRO, A. R. Screening of Antibacterial Activity of Amaicha del Valle (Tucuman, Argentina) Propolis. **Journal of Ethnopharmacology** , v. 68, n.1-3, p.97-102, 1999.
52. MOURA, Fabiana Fonseca. **Determinação das Propriedades Físico-Químicas e Biológicas das Própolis Produzidas por *Apis mellifera* na Região Nordeste do Brasil**. Campinas, 2000. 69p. Tese de Mestrado em Ciência de Alimentos – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
53. NAGY, M. & GRANCAI, D. Colorimetric Determination of Flavanones in Propolis. **Pharmazie** , v.51, p. 100-101, 1996.
54. NEGRI, G.; MARCUCCI, M. C.; SALATINO, A. ; SALATINO, M. L. F. Hydrocarbons and Monoesters of Propolis Waxes from Brazil. **Apidologie**, v.29, p. 305-314, 1998.
55. 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. Technol.**, v.40, n.1, p.97-106, 1997.
56. PARK, Y. K.; KOO, M. H.; ABREU, J. A. S.; IKEGAKI, M.; CURY, J. A. ; ROSALEN, P. L. Antimicrobial Activity of Propolis on Oral Microorganisms. **Current Microbiology** , v.36, p. 24-28, 1998.

57. PARK, Y.K.; KOO, M. H.; IKEGAKI, M.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L. Effects of propolis on *Streptococcus mutans*, *Actinomyces naeslundii* and *Staphylococcus aureus*. **Revista de Microbiologia**, v.29, p.143-148, 1998.
58. PEREIRA, A. S.; PINTO, A C.; CARDOSO, J. N.; NETO, F. R. ^ª; RAMOS, M. F. S.; DELLAMORA-ORTIZ, G. M.; SANTOS, E. P. Application of High Temperature High Resolution Gas Chromatography to Crude Extracts of Propolis. **J. High Resol. Chromatogr.**, v.21, n.7, p.396-400, 1998.
59. PETERSEN, H.O. Hipersensitivity to Propolis. **Contact Dermatitis**, v.3, n.5, p.278-279, 1977.
60. PRATT, D. E.; WATTS, B. M. The antioxidant activity of vegetable extracts. I: Flavone aglycones. **Journal of Food Science** , v.29, p.27-31, 1964.
61. PRATT, D. E.; BIRAC, P. M. Source of antioxidant activity of soybeans and soy products. **Journal of Food Science** ,v.44, p.1720-1722, 1979.
62. REISSIG, J. L.; STROMINGER, J. L., LELOIR, L. F. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. **J. Biol. Chem.**, v.217, p. 959-966, 1955.
63. RODRÍGUEZ, S.; ANCHIETA, ^º; RAMOS, M. E.; REMÍREZ, D.; ROJAS,E.; GONZÁLEZ, R. Effects of Cuban Red Propolis on Galactosamine-Induced Hepatitis in Rats. **Pharmacological Research**, v.35, n.1, p. 1-4, 1997.
64. RUBIO, O. C.; CUELLAR, A . C.; ROJAS, N.; CASTRO, H. V.; RASTRELLI, L.; AQUINO, R. A Polyisoprenylated Benzophenone from Cuban Propolis. **J. Nat. Prod.**, v.62, p.1013-1015, 1999.

65. SCHELLER,S.; KAWALSKI, H.; OKLEK, K.; DWORNICZAK, S.; MATSUNO,T.; WALDEMAR-KLIMMEK, K.; RAJCA, M.; SHANI, J. Correlation between Virulence of Various Strains of Mycobacteria and their Susceptibility to Ethanolic Extract of Propolis (EEP). **Zeitschrift fur Naturforschung C – A Journal of Biosciences** , v.53, p. 1040-1044, 1998.

66. TAZAWA, S.; WARASHINA, T.; NORO, T.; MIYASE, T. Studies on the Constituents of Brazilian Propolis. **Chem. Pharm. Bull.**, v.46, n.9, p.1477-1479, 1998.

67. TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; GARCÍA-VIGUERA, C.; VIT-OLIVIER, P.; FERRERES, F.; TOMÁS-LORENTE, F. Phytochemical Evidence for the Botanical Origin of Tropical Propolis from Venezuela. **Phytochemistry**, v.34, n.1, p.191-196, 1993.

68. TOSI, B.; DONINI, A.; ROMAGNOLI, C.; BRUNI, A . Antimicrobial Activity of Some Commercial Extracts of propolis Prepared with Different Solvents. **Phytoterapy Research**, v.10, p. 335-336, 1996.

69. VALCIC, S.; MONTENEGRO, G.; TIMMERMANN, B. N. Lignans from Chilean Propolis. **J. Nat. Prod**, v.61, p. 771-775, 1998.

70. VANHAELEN, M. & VANHAELEN-FASTRÉ, R. High Performance-Liquid, Gas-Liquid and Thin-Layer Chromatography of Naturally Occurring Flavonoids, Phenolic and Related Compounds. **J. Chromatogr.**, v.187, p. 255-260, 1980.

71. WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v.37, n.2, p. 99-105, 1998.

72. WULF, L. W. & NAGEL, C. W. Analysis of Phenolic Acids and Flavonoids by High-Pressure Liquid Chromatography. **J. Chromatogr.** , v.116, p. 271-279, 1976.
73. YAMAUCHI, R.; KATO, K.; OIDA, S.; KANAEDA, J.; UENO, Y. Benzyl Caffate, na Antioxidative Compound Isolated from Propolis. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.56, p.1321-1322, 1992.