

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DE ALIMENTOS**

**ESTUDO FITOQUÍMICO DA ORIGEM BOTÂNICA DA PRÓPOLIS E
AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE MEL DE *Apis
mellifera* AFRICANIZADA DE DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL.**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Severino Matias de Alencar**, aprovada pela Comissão Julgadora em 15 de fevereiro de 2002.

Severino Matias de Alencar

Campinas, 15 de fevereiro de 2002

Prof. Dr. Yong Kun Park
Orientador


Prof. Dr. Yong Kun Park
Presidente da Banca

**Tese apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas,
para a obtenção do título de Doutor em
Ciência de Alimentos.**

Campinas – São Paulo

2002

i
UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE	PC
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	AL25e
V	
TOMBO	48238
PROC.	16-837102
C	
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	16/04/02
Nº CPD	

CM00166081-9

BIB ID 236388

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

AL25e Alencar, Severino Matias de
Estudo fitoquímico da origem botânica da própolis e
avaliação da composição química de mel de *Apis mellifera*
africanizada de diferentes regiões do Brasil / Severino Matias de
Alencar. – Campinas, SP: [s.n.], 2002.

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

1.Própolis. 2.Mel. 3.*Apis mellifera*. 4.Composição. I.Park,
Yong Kun. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de
Engenharia de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA

Tese defendida e aprovada em _____ de _____ de 2002, pela banca examinadora constituída pelos professores:



Prof. Dr. Yong Kun Park
Orientador



Profa. Dra. Hélia Harumi Sato
Membro



Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy
Membro



Profa. Dra. Hilary Castle de Menezes
Membro



Prof. Dr. Fred Yukio Fujiwara
Membro

Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore
Membro

Profa. Dra. Adilma Regina Pippa Scamparini
Membro

À DEUS...

**... por ter iluminado e abençoado o meu caminho
pela força nos momentos de desânimo
pela inspiração no trabalho**

A minha esposa...

**...pelo permanente apoio, colaboração
e compreensão em todos os momentos**

Aos meus pais...

...por tudo que fizeram por mim

Aos meus irmãos...

...pelo companheirismo e compreensão

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Yong K. Park pelo incentivo e orientação deste trabalho.

Às Prof^{as} Dr^a. Hélia Harumi Sato e Dr^a Gláucia Maria Pastore pela amizade e apoio durante todo o doutorado.

À Profa. Dr^a. Adilma Regina Pippa Scamparini do Laboratório Geral.

À FAPESP pela concessão da bolsa de estudo e auxílio financeiro para a execução do presente trabalho.

Aos apicultores, que gentilmente colaboraram na etapa de coleta do material.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica pela amizade e convívio durante o doutorado, em especial a Luciana Liboni, Fabiana, Masaharu, Ivan, Cláudio, Cristina Lui, Júlio e Alice.

As técnicas Dora e Bia do Laboratório de Bioquímica de Alimentos.

À Edma, técnica do Laboratório de Nutrição.

Ao pessoal da Secretaria do Departamento de Ciência de Alimentos.

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

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xv
LISTA DE QUADROS.....	xvii
RESUMO.....	xix
ABSTRACT.....	xxi
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS.....	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
3.1 Própolis	7
3.1.1 Origem vegetal da própolis	7
3.1.2 Composição química da própolis	10
3.1.3 Propriedades biológicas das própolis.....	20
3.1.3.1 Atividade antimicrobiana da própolis	20
3.1.3.2 Atividade antioxidante da própolis	24
3.1.3.3 Atividade citotóxica da própolis.....	25
3.1.3.4 Outras atividades biológicas das própolis	26
3.2 Mel.....	27
3.2.1 Origem vegetal	27
3.2.2 Composição química do mel	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 MATERIAIS	33
4.1.1 Própolis	33
4.1.1.1 Coleta das amostras de própolis.....	33
4.1.1.2 Tratamento das amostras de própolis bruta	33
4.1.1.3 Preparo dos extratos etanólicos de própolis (EEP)	33
4.1.2 Material vegetal	34
4.1.2.1 Coleta das amostras vegetais fontes de própolis.....	34
4.1.2.2 Preparo dos extratos metanólicos vegetais (EMV).....	34
4.1.3 Mel.....	35
4.1.3.1 - Coleta das amostras de mel	35
4.1.3.2 – Preparo dos extratos metanólicos de mel (EMM).....	35

4.2 MÉTODOS	36
4.2.1 Análises físico-químicas dos extratos alcoólicos de própolis, vegetais e mel ..	36
4.2.1.1 Espectrofotometria na região ultravioleta-visível.....	36
4.2.1.2 Cromatografia em camada delgada de alta eficiência em fase reversa (CCDAE-FR)	36
4.2.1.3 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR)	36
4.2.1.4 Cromatografia gasosa com espectrometria de massa (CG-EM).....	37
4.2.2 Análises biológicas dos extratos etanólicos de própolis	38
4.2.2.1 Teste de antibiograma para bactérias patogênicas	38
4.2.2.2 Análise da atividade antioxidante	39
4.2.2.3 Análise da atividade antiinflamatória.....	39
4.2.2.4 Análise da atividade citotóxica “in vitro”	40
4.2.3 Análise Estatística.....	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1 Própolis	43
5.1.1 Coleta das amostras de própolis	43
5.1.2 Análises físico-químicas dos EEP	44
5.1.2.1 Cromatografia em camada delgada de alta eficiência em fase reversa (CCDAE-FR) e espectrofotometria na região ultravioleta-visível	44
5.1.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR)	49
5.1.2.3 Cromatografia gasosa com espectrometria de massas (CG-EM)	53
5.1.3 Análises biológicas dos extratos etanólicos de própolis	56
5.1.3.1 Teste de antibiograma para bactérias patogênicas	56
5.1.3.2 Atividade antioxidante dos extratos etanólicos de própolis	58
5.1.3.3 Atividade antiinflamatória dos extratos etanólicos de própolis.....	59
5.1.3.4 Atividade citotóxica dos extratos etanólicos de própolis	62
5.2 Material vegetal.....	64
5.2.1 Estudo fitoquímico da origem vegetal das própolis do grupo 3 (G3), grupo 6 (G6) e grupo 12 (G12) por meio de técnicas espectrofotométricas e cromatográficas	64
5.2.1.1 Evidências fitoquímicas da origem vegetal das própolis do Grupo 3.....	64

5.2.1.2 Evidências fitoquímicas da origem das própolis do Grupo 6.....	75
5.2.1.3 –Evidências fitoquímicas da origem das própolis do Grupo 12.....	85
5. 3 Mel.....	95
5.3.1 Coleta das amostras de mel	95
5.3.2 Análises físico-químicas dos extratos metanólicos de mel (EMM)	97
5.3.2.1 Cromatografia em camada delgada de alta eficiência em fase reversa (CCDAE-FR)	97
5.3.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR)	99
5.3.2.3 Cromatografia gasosa com espectrometria de massas (CG-EM)	102
6.CONCLUSÕES.....	105
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Cromatograma obtido por CCDAE, irradiado a 366 nm, dos extratos etanólicos dos 12 grupos de própolis brasileiras.	45
FIGURA 2: Espectros de absorção na região UV-visível, dos EEP, dos 12 grupos de própolis brasileiras.	45
FIGURA 3: Aparência dos EEP dos 12 grupos de própolis brasileiras	49
FIGURA 4: Cromatograma obtido por CLAE dos grupos de própolis brasileiras.....	51
FIGURA 5: Cromatograma obtido por CLAE dos grupos de própolis brasileiras.....	52
FIGURA 6: Atividade antioxidante, dos 12 grupos de própolis brasileiras, medida através da oxidação do β -caroteno.	59
FIGURA 7: Atividade antiinflamatória dos 12 grupos de própolis brasileiras, expresso em porcentagem de inibição da enzima hialuronidase.	61
FIGURA 8: Espectro de absorção na região UV-visível do extrato etanólico de própolis (G3) e metanólico da resina de álamo (<i>Populus alba</i>).....	65
FIGURA 9: Reflorestamento de álamo (<i>P. alba</i>) na cidade de Santa Cruz – SC.....	67
FIGURA 10: Cromatograma obtido por CCDAE, irradiado a 366 nm, do extrato etanólico da própolis do grupo 3 e do extrato metanólico da resina de álamo (<i>Populus alba</i>).	69
FIGURA 11: Cromatograma obtido por CLAE do extrato etanólico da própolis do grupo 3 e do extrato metanólico da resina de álamo (<i>P. alba</i>).....	71
FIGURA 12: Cromatograma obtido por CG-EM da própolis do grupo 3 e da resina de álamo (<i>P. alba</i>).	73
FIGURA 13: Espectro de absorção na região UV-visível do extrato etanólico da própolis (G6) e metanólico do alecrim da Bahia (<i>Hyptis divaricata</i>).	75
FIGURA 14: Vegetação de <i>Hyptis divaricata</i> em seu <i>habitat</i> natural na região de mata atlântica da Bahia.....	77
FIGURA 15: Cromatograma obtido por CCDAE, irradiado a 366 nm, do extrato etanólico da própolis do grupo 6 e extrato metanólico dos botões apicais do alecrim da Bahia (<i>Hyptis divaricata</i>).	79
FIGURA 16: Cromatograma obtido por CLAE do extrato etanólico da própolis do grupo 6 e do extrato metanólico dos botões apicais do alecrim da Bahia (<i>Hyptis divaricata</i>).	81

FIGURA 17: Cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas da própolis do grupo 6 e alecrim da Bahia (<i>H. divaricata</i>).....	83
FIGURA 18: Espectro de absorção na região UV-visível do extrato etanólico da própolis (G12) e metanólico de alecrim do campo (<i>Baccharis dracunculifolia</i>).....	85
FIGURA 19: Abelha coletando material resinoso do alecrim do campo (<i>Baccharis dracunculifolia</i>) para elaboração da própolis.	87
FIGURA 20: Cromatograma obtido CCDAE, irradiado a 366 nm, do extrato etanólico da própolis do grupo 12 e do extrato metanólico dos botões apicais do alecrim do campo (<i>Baccharis dracunculifolia</i>)	89
FIGURA 21: Cromatograma obtido por CLAE do extrato etanólico da própolis do grupo 12 e extrato metanólico dos botões apicais do alecrim do campo (<i>Baccharis dracunculifolia</i>).	91
FIGURA 22: Cromatograma obtido por CG-EM da própolis do grupo 12 e alecrim do campo (<i>B. dracunculifolia</i>).....	93
FIGURA 23: Cromatograma obtido por CCDAE, irradiado a 366 nm, dos extratos etanólicos de própolis e metanólicos de mel de mesma colméia.....	97
FIGURA 24: Cromatograma obtido por CCDAE, irradiado a 254 nm, dos extratos etanólicos de própolis e metanólicos de mel de mesma colméia.	99
FIGURA 25: Cromatograma obtido por CLAE dos extratos metanólicos de amostras de mel unifloral do Estado de São Paulo.	101

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Localidades de amostragem de própolis nas regiões Nordeste, Norte, Sudeste e Sul.....	44
TABELA 2: Características de coloração e teor de substâncias solúveis dos EEP dos 12 grupos de própolis brasileiras.	47
TABELA 3: Cromatografia gasosa com espectrometria de massas dos 12 grupos das própolis brasileiras.....	55
TABELA 4: Atividade antimicrobiana dos EEPs dos 12 grupos de própolis brasileira contra as bactéria patogênicas <i>S.aureus</i> ATCC 25923 e <i>S. mutans</i>	57
TABELA 5: Atividade citotóxica dos extratos etanólicos de própolis contra células cancerosas humanas.	62
TABELA 6: Localidades de amostragem de mel nas regiões Nordeste, Sudeste e Sul.	95
TABELA 7: Teor de flavonóides determinados por CLAE nos 6 tipos de mel unifloral da região Sudeste do Brasil.	102
TABELA 8: Cromatografia gasosa com espectrometria de massas dos 6 tipos de mel unifloral da região sudeste do Brasil.....	104

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1: Teor de compostos fenólicos determinados por CLAE nos 12 grupos de própolis brasileiras.....	53
---	----

RESUMO

O objetivo deste estudo foi classificar e analisar a origem botânica dos principais tipos de própolis brasileiras produzidas por abelhas *Apis mellifera* africanizadas, bem como avaliar a composição de amostras de mel e própolis da mesma colméia coletados em várias regiões do Brasil. Assim, foram coletadas 201 amostras de própolis nas regiões Norte, Nordeste, Sul e Sudeste e 47 amostras de mel das regiões das regiões Nordeste, Sul e Sudeste do Brasil. Através das análises por espectrofotometria na região UV-visível e cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE) foi possível classificar as amostras coletadas de própolis em 12 grupos distintos. As diferenças na composição química dos grupos de própolis foram detectadas pelas técnicas de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massas (CG-EM). As própolis do grupo 3 mostraram a presença do éster do ácido dimetil dialil caféico, o qual é um composto altamente alergênico e comumente encontrado em própolis de climas temperados. Própolis do grupo 6 apresentaram uma composição química distinta dos demais grupos, principalmente pela completa ausência de flavonóides. Entretanto, este foi o grupo que apresentou as maiores atividades contra os microrganismos *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*. Todos os grupos, exceto os de número 9 and 10, mostraram um índice de antioxidação superior a 4. Com relação à atividade antiinflamatória, as própolis dos grupos 3, 5, 6, 7, 8, e 12 demonstraram uma alta atividade quando comparadas com as própolis dos grupos 1, 2, 4, 9, 10 e 11. No teste da atividade citotóxica, as própolis dos grupos 6 e 7 apresentaram as maiores atividades “in vitro” contra 4 linhagens de células tumorais humanas. Com base nas evidências fitoquímicas, determinadas por meio das técnicas de espectrofotometria na região UV-visível, CCDAE, CLAE e CG-EM, as espécies vegetais *Populus alba*, *Hyptis divaricata* e *Baccharis dracunculifolia* mostraram ser as principais fontes vegetais das própolis do grupo 3, grupo 6 e grupo 12, respectivamente. As amostras de mel, coletadas de diferentes regiões brasileiras e analisadas pela técnica de CCDAE, mostraram um perfil cromatográfico totalmente diferente das amostras de própolis da mesma colméia de origem. Observou-se que as abelhas utilizaram fontes vegetais diferentes para a elaboração do mel unifloral de laranja, eucalipto e alecrim do campo, mas somente uma única fonte vegetal (*B.*

dracunculifolia) para a produção das própolis oriundas da mesma colméia. O mel de alecrim do campo foi o que apresentou o maior número de flavonóides, com alto teor de quercetina. Estes resultados demonstraram uma grande diversidade das própolis brasileiras, não somente em relação as suas composição química, mas sobretudo, em relação as suas atividades biológicas.

ABSTRACT

The aim of this study was to classify and analyze the botanical origin of the main Brazilian propolis produced by africanized *Apis mellifera*; as well as to evaluate the composition of honey and propolis from the same beehive from various Brazilian regions. Therefore, two hundred and one propolis samples were collected, in northern, northeastern, southern and southeastern Brazil, in addition to forty and seven honey samples collected in northeastern, southern and southeastern Brazil. Using Ultraviolet-visible spectrophotometry and High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) it was possible to classify the samples into 12 different groups of propolis. The differences in the chemical composition of the groups were detected by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Gas Chromatography – Mass Spectrometer (GC-MS). Group 3 showed the presence of the compound dimethylallyl ester of caffeic acid, which has been implicated as an allergenic substance in propolis from temperate zones. Group 6 showed a very different chemical composition, in which flavonoids were not detected. Nevertheless, this group showed high antibacterial activity against *Streptococcus mutans* and *Staphylococcus aureus*. All groups of propolis, except for the groups 9 and 10, showed an antioxidant index higher than 4. Regarding the antiinflammatory activity, propolis from the groups 3, 5, 6, 7, 8 and 12 demonstrated higher antiinflammatory activity as compared to that of groups 1, 2, 4, 9, 10 and 11. Propolis from the groups 6 and 7 were highly active “in vitro” against 4 human tumoral cell lines. Based on phytochemical evidence, obtained by means of UV-visible Spectrophotometry, HPTLC, HPLC and GC-MS techniques, *Populus alba*, *Hyptis divaricata* and *Baccharis dracunculifolia* were shown to be the main source of propolis for groups 3, 6 and 12 respectively. Honey samples collected from various Brazilian regions showed a distinct chromatographic profile when compared to propolis collected at the same beehive, as shown by the CCDAE technique. In the southern Brazil samples, it was observed that bees used several vegetable sources to produce unifloral orange, eucalyptus and rosemary honeys. However, the chemical analysis of the propolis samples from the respective beehives showed that the bees had used only one plant source (*B. dracunculifolia*) to make the propolis. Rosemary honey showed more flavonoids than the others, with high amounts

of quercetin. The results demonstrated a great diversity of Brazilian propolis, not only in their chemical composition, but especially in their biological activity.

1. INTRODUÇÃO

Praticamente todas as civilizações antigas com as suas terapias milenares conheceram e utilizaram os produtos das abelhas como valiosos recursos na sua medicina. As histórias das medicinas das civilizações Chinesa, Tibetana, Egípcia e também a Greco-Romana são muito ricas, todas contendo em seus escritos antigos, centenas de receitas, onde entram principalmente mel, própolis, larvas de abelhas e às vezes as próprias abelhas para curar ou prevenir enfermidades. Merece destaque a Bíblia Sagrada, oriunda da Civilização Hebraica, que em alguns textos enaltece ao mesmo tempo em que enobrece as propriedades alimentícias e medicinais do mel. Outros textos referem-se à propolis que era conhecida como “O bálsamo de Gileade”. Era utilizada para curar feridas e atingia altos preços no mercado daquela época.

A própolis é uma substância resinosa coletada pelas abelhas de diversas partes da planta como broto, botões florais e exsudatos resinosos. Sua composição química é bastante complexa e variada, estando intimamente relacionada com a ecologia da flora de cada região visitada pelas abelhas. De modo geral contém 50-60% de resinas e bálsamos, 30-40% de ceras, 5-10% de óleos essenciais, 5% de grãos de pólen, além de microelementos como alumínio, cálcio, estrôncio, ferro, cobre, manganês, e pequenas quantidades de vitaminas B₁, B₂, B₆, C e E (Ghisalberti, 1979). A própolis é conhecida, principalmente, por suas propriedades antimicrobiana, antioxidante, antiinflamatória, imunomodulatória, hipotensiva, cicatrizante, anestésica, anticâncer, anti-HIV e anticariogênica (Ghisalberti, 1979; Bankova *et al.*, 1989; Park *et al.*, 1998a; Park *et al.*, 1998b; Park *et al.*, 2000; Isla *et al.*, 2001). A presença de compostos fenólicos, principalmente os flavonóides, explicam em parte a grande diversidade de propriedades biológicas relatadas na literatura (Bankova *et al.*, 1983; Park *et al.*, 1995; Banskota *et al.*, 1998).

Na Europa, América do Norte e oeste da Ásia a fonte dominante de própolis é o exsudato do botão de álamo (*Populus* sp.) (Markham *et al.*, 1996; Wollenweber & Buchmann, 1997). Entretanto, na América do Sul, a espécie vegetal do gênero *Populus* não é nativa, existindo uma grande diversidade vegetal para a retirada de resina, o que dificulta

a correlação da própolis com a fonte produtora. A dependência geográfica e vegetal da própolis é exemplificada nos trabalhos, como por exemplo, de própolis da América do Sul, Europa, China, Canadá e Espanha (König, 1985; Greenaway *et al.*, 1990; Garcia-Viguera *et al.*, 1992; Tomás-Barberán *et al.*, 1993; Bonvehí & Coll, 1994; Park *et al.*, 1998b). A origem botânica e química das própolis tropicais tem sido ainda uma questão em aberto devido, principalmente, a grande diversidade de vegetais para a retirada de resinas vegetais. Além disso, poucos trabalhos foram desenvolvidos sobre a composição química e as possíveis plantas produtoras de resinas (Aga *et al.*, 1994; Tomás-Barberán *et al.*, 1993; Bankova *et al.*, 1995; Alencar *et al.*, 2000).

Em adição, a própolis também tem sido considerada como a principal fonte de compostos fenólicos presentes no mel, e isto tem sugerido que a origem geográfica do mel pode ser determinada a partir do perfil fenólico (Ferrerres *et al.*, 1991; Ferreres *et al.*, 1992). Apesar dos carboidratos encontrados no mel serem objetos de diversas revisões (Siddiqui, 1970; White, 1975, 1978; Doner, 1977), outros componentes presentes não foram extensivamente estudados, como por exemplo os compostos fenólicos. Ferreres *et al.*, (1991) e Amiot *et al.* (1989), mostraram claramente a presença de flavonóides em mel. Entre os flavonóides presentes no mel, a flavanona pinocembrina tem sido relatada e estudada por sua atividade antibacteriana (Berahia *et al.*, 1993). Outros estudos também demonstraram a presença dos flavonóides pinobanksina (Ribeiro-campos *et al.*, 1990), galangina e crisina (Sabatier *et al.*, 1992), kanferol (Ferrerres *et al.*, 1998) e ácidos benzóico e cinâmico (Weston *et al.*, 1999). Segundo Sabatier *et al.* (1988), Amiot *et al.* (1989), Ferreres *et al.* (1998), Martos *et al.* (2000a) e Tomás-Barberán *et al.* (2001) a análise de flavonóides e outros compostos fenólicos pode ser utilizada para a determinação da origem botânica e autenticidade de cada tipo de mel.

Dessa forma a determinação da origem geográfica e, principalmente, a origem botânica, aliada a composição química, se faz importante em um controle de qualidade e até mesmo em uma padronização do mel e da própolis brasileira para uma efetiva aplicação terapêutica. Este trabalho apresenta um estudo da composição química de amostras de mel e própolis provenientes de diferentes regiões do Brasil, bem como a avaliação de algumas

propriedades biológicas e evidências fitoquímicas da origem botânica dos principais grupos de própolis brasileiras.

2. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivos: 1) Classificar as amostras de própolis provenientes de diferentes regiões do Brasil; 2) Avaliar o potencial antioxidante, antiinflamatório, antimicrobiano e anticâncer das própolis brasileiras; 3) Identificar a origem botânica dos principais tipos de própolis brasileiras; 3) Verificar se há diferenças entre compostos fenólicos de própolis e mel da mesma colméia; 4) Quantificar flavonóides em própolis e mel; 5) Avaliar a composição química de diferentes amostras de mel unifloral.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Própolis

3.1.1 Origem vegetal da própolis

Apesar da origem vegetal da própolis da Europa, Ásia ocidental e América do Norte terem sido bem estudadas, a origem botânica e geográfica das própolis tropicais ainda é uma questão em aberto com poucos trabalhos no realizados na área (Aga *et al.*, 1993).

König (1985) relatou as fontes vegetais da própolis de diversas regiões. Segundo o autor, na Europa a principal fonte vegetal para própolis são as árvores da família das Salicaceas, particularmente do gênero *Populus* (conhecidas popularmente como “álamo”). Nos Estados Unidos, além dos “álamos”, os pinheiros de modo geral são importantes fontes para própolis. Na Austrália os eucaliptos são fontes vegetais importantes, sendo que na região Ocidental as plantas da espécie *Xanthorrhoea pressii* e *X. australis* são as fontes vegetais predominantes de própolis. O autor também descreveu que praticamente não existe na literatura relatos sobre as possíveis fontes vegetais de própolis na região da América do Sul e devido a ausência de “álamo” nesta região (pois é uma vegetação de clima temperado), outras fontes vegetais devem ser utilizadas pelas abelhas na coleta de própolis.

Nos estudos de identificação da origem botânica, a composição química da própolis comparada com a composição da provável fonte vegetal hipotética tem se mostrado um dos melhores indicadores da origem da própolis. Analisando própolis da parte ocidental da Austrália, Ghisalberti *et al.* (1978) isolaram e estudaram os principais constituintes destas própolis. Foram identificados os compostos pterostilbene, xantorroeol, sakuranetina e pinostrobin. Os autores também identificaram o xantorroeol e a sakuranetina nas plantas do gênero *Xanthorrhoea*, as quais são endêmicas nesta região da Austrália.

Estudando os botões florais de árvores de *Populus nigra*, *Populus italica*, e de própolis da Bulgária, Bankova *et al.* (1989) isolaram dois ésteres do ácido caféico e dois ésteres do ácido ferrúlico. Os autores confirmaram a hipótese da origem vegetal da própolis da Bulgária pela sua relação com os botões da família das salicáceas, principalmente *Populus nigra*.

Martos *et al.* (1997) analisaram as própolis da Tunísia que apresentaram características muito parecida com a própolis da Europa pelo conteúdo de crisina, galangina, tectocrisina, pinocembrina, pinobanksina e cafeatos, diferindo apenas pela presença da grande quantidade de miricetina 3,7,4',5'-tetrametil éter e quercetina 3,7,3'-trimetil éter em menor quantidade. Nesta região, onde não existe "álamo", os autores identificaram os mesmos compostos nos exsudato de folhas de *Cistus* sp.

Tomás-Barberán *et al.* (1993) realizaram um estudo sobre a composição de compostos fenólicos em amostras de própolis de *Apis mellifera* e de abelhas nativas, e as evidências fitoquímicas da origem vegetal da própolis da região tropical da Venezuela. Os autores concluíram que os exsudatos das flores de *Clusia minor* e *Clusia major* (Guttiferae) continham os benzofenonas poliprenilados encontrados na maioria das amostras de própolis estudadas. Neste estudo foi sugerido que estas plantas eram as principais fontes de própolis da região tropical da Venezuela. Os autores também verificaram que poucas amostras de própolis apresentaram flavonóides.

Alencar *et al.* (2000) estudaram, por cromatografia líquida de alta eficiência, a relação vegetal entre um grupo de própolis encontrado no sul do Brasil com as própolis do Uruguai, Argentina, China e Estados Unidos. Os autores verificaram que todas as amostras estudadas apresentaram o mesmo perfil cromatográfico, o qual também foi idêntico ao perfil da resina de álamo (*Populus alba*). Esta espécie vegetal foi encontrada no mesmo local onde foi coletada a amostra brasileira, indicando assim ser a provável fonte vegetal deste grupo de própolis.

Utilizando a técnica de cromatografia gasosa com espectrometria de massa, Nagy *et al.* (1985) demonstraram que 35 compostos químicos, na maioria fenólicos, isolados de amostras de própolis da Hungria também estavam presentes em árvores da espécie *Populi gemma*. Os autores relataram que a composição da própolis era dependente da ecologia vegetal e que *Populi gemma* é uma importante fonte vegetal para a própolis da Hungria.

Greenaway *et al.* (1990) relataram um estudo sobre a composição química e origem vegetal de própolis. Neste trabalho foi utilizada a técnica de cromatografia gasosa com espectrometria de massas para analisar os constituintes das própolis e dos exsudatos resinosos das plantas, principalmente “álamo”, muito comuns na Europa. Os autores analisaram amostras de própolis da Áustria, Equador, Alemanha, Israel, Reino Unido e Estados Unidos e demonstraram que, com exceção das amostras do Equador, os constituintes da própolis eram característicos de exsudatos resinosos dos botões de “álamo”, principalmente do gênero *Populus*, como *Populus nigra*, *deltadoides* e *euroamericana*. A própolis do Equador apresentava uma composição química bastante diferente devido, principalmente, à ausência de “álamo” nesta região. Também foi relatado que apesar da composição química da própolis ser qualitativamente semelhante aos exsudatos de “álamo”, quantitativamente apresentavam diferenças significativas.

Bankova *et al.* (1999) investigaram usando CG-EM, própolis e secreções de 3 espécies de plantas, (*Baccharis dracunculifolia*, *Araucaria angustifolia* e *Eucalyptus citriodora*), que são comumente mencionadas como as prováveis fontes botânicas de própolis. Baseado nas evidências químicas os autores relataram que *B. dracunculifolia* mostrou ser uma das fontes de própolis no estado de São Paulo. Em um outro trabalho realizado, Bankova *et al.*, (1998) investigaram por CG e CG-EM a variação sazonal na composição química de própolis brasileira coletada por duas sub-espécies de abelhas, *Apis mellifera* africanizada e *Apis mellifera* ligustica européia. Os principais componentes das amostras foram os compostos fenólicos, especialmente derivados do ácido cinâmico. Houve exceção para as amostras de outono de *Apis mellifera* ligustica, onde os diterpenos predominaram. Nas própolis de ambas as subespécies os diterpenos apareceram no verão e atingiram a porcentagem máxima no outono, mas estiveram ausentes durante as outras

estações. Os autores concluíram que ambas as subespécies de abelhas coletam própolis do mesmo grupo de plantas e existem pelo menos duas fontes vegetais importantes, que no entanto ainda não foram identificadas.

3.1.2 Composição química da própolis

Os estudos realizados sobre a composição química da própolis até 1970 foram poucos, com destaque para Villanueva *et al.* (1964), que isolaram da própolis a galangina (3,5,7-trihidroxiflavona), um composto químico pertencente ao grupo dos flavonóides. Os flavonóides são compostos fenólicos de baixo peso molecular que têm como base um núcleo flavana, constituído de 15 carbonos dispostos numa configuração C₆-C₃-C₆. Segundo Cook & Samman (1996), a atividade bioquímica dos flavonóides e seus metabólitos depende da estrutura química e orientação relativa das várias partes da molécula.

Schneidweind *et al.* (1975) isolaram e identificaram 14 flavonóides de própolis sendo que 9 já haviam sido descritos: crisina, tectocrisina, 5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavona, ramnocitrina, galangina, isalpinina, pinostrobina, 5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavanona, pinocembrina. Os outros 5 flavonóides não haviam sido antes mencionados na literatura: pectolinarigenina (5,7-dihidroxi-4',6-dimetoxiflavona), quercetina-3,3'-dimetil éter (4',5,7-trihidroxi-3,3',-dimetoxiflavona), sakuranetina (4',5-dihidroxi-7-metoxiflavanona), pinobanksina (3,5,7-trihidroxiflavanona) e pinobanksina-3-acetato (5,7-dihidroxi-3-acetilflavanona).

Greenaway *et al.* (1991) identificaram 150 compostos nas própolis do Hemisfério Norte. Dentre eles, foram confirmados os compostos voláteis 2-metilbutil acetato, isobutil isobutirato, 3-metil-3-buten-1-ol e prenil acetato, nunca antes relatados em extratos de própolis.

A análise de compostos voláteis em amostras de própolis também foi realizada por Janes & Bumba (1974), que mostrou a presença dos seguintes compostos: álcool benzílico, vanilina e eugenol. Além disso foram identificados fenil vinil éter, anisil vinil éter, ciclohexilbenzoato, ácido benzóico e ácido sórbico.

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

Tazawa *et al.* (1999) isolaram 7 novos derivados do ácido *p*-cumárico juntamente com outros 17 compostos conhecidos, incluindo 4 flavonóides, 1 ácido fenólico prenilado, 4 ácidos diterpênicos, 1 lignana, 2 ésteres do ácido *p*-cumárico e 5 derivados do ácido cinâmico. Os compostos novos foram identificados como sendo (E)-2,3-dihidroconiferil *p*-cumarato, (E)-3-{2,3-dihidro-2-[2-[(E)-*p*-cumaroloxi]-1-metiletil]-5-benzofuranil}-2-ácido propenóico, (E)-4-(2,3-dihidrocinamoloxi)ácido cinâmico, (E)-3-(2,2-dimetil-3,4-dihidro-3-hidroxi-2H-1-benzopirano-6-yl)-2-ácido propenóico, (E)-3-[2,3-dihidro-2-(1-metiletenil)-5-benzofuranil]-2-ácido propenóico, (E)-3-[2,3-dihidro-2-(1-metiletenil)-7-prenil-5-benzofuranil]-2-ácido propenóico e (E)-3-{3-[(E)-4-(2,3-dihidrocinamoloxi)-3-metil-2-butenil]-4-hidroxi-5-prenilfenil}-2-ácido propenóico. Os compostos dihidrokanferol (aromadendrina), 6-metoxikanferol, 4-hidroxi-3-ácido prenilbenzóico, plicatina B e capilartemisina A foram isolados de própolis pela primeira vez.

Munoz *et al.* (2001) isolaram os seguintes compostos de própolis do Chile: viscidona, vanilina, 3',4'-(metilendioxi) acetofenona, 3-etoxi-4-metoxibenzaldeído, ácido cinâmico, 3-metoxi-4-hidroximetil éster. Este foi o primeiro relato da composição química de própolis de clima árido típico do mediterrâneo.

Marcucci *et al.* (2001) isolaram quatro compostos de própolis e os identificaram como sendo: (1) 3-prenil-4-ácido hidroxicinâmico (PHCA); (2) 2,2-dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano (DCBEN); (3) 3,5-diprenil-4-ácido hidroxicinâmico (DHCA) e (4) 2,2-dimetil-6-carboxietenil-8-prenil-2H-1-benzopirano (DPB). As estruturas desses compostos foram determinadas pelas técnicas de espectrometria de massa e ressonância magnética nuclear. Os compostos isolados foram testados contra o *Trypanosoma cruzi* e as bactérias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus faecalis*. Todos os compostos foram ativos contra o *T. cruzi*. Com exceção do composto 1, todos os outros foram ativos contra as demais bactérias testadas.

Bonvehi & Coll, (1994) analisaram a composição química e a atividade bacteriostática das amostras de própolis provenientes de diferentes regiões geográficas e botânicas do Uruguai e da China. Neste estudo foi demonstrado que os compostos fenólicos, principalmente os flavonóides, apresentavam variabilidade dependendo da região. De modo geral a apigenina e a acacetina apresentavam-se em maiores concentrações, seguidas da pinocembrina e quercetina, além dos derivados do ácido benzóico, cinâmico, benzaldeídos e da vanilina.

Existem vários relatos na literatura sobre o comportamento cromatográfico dos flavonóides e outros compostos fenólicos. Castele *et al.* (1982) analisaram a separação de flavonóides de própolis através de cromatografia líquida de alta eficiência equipado com uma coluna LiChrosorb RP-18. Os autores verificaram os tempos de retenção de 141 flavonóides e relataram que a sequência de eluição dos compostos pode ser interpretada do seguinte modo: os compostos inicialmente adsorveriam na fase estacionária hidrofóbica e seriam subsequentemente eluídos com a fase móvel, dependendo do grau de formação de

pontes de hidrogênio. Os autores explicaram que nas flavonas e isoflavonas o grupo carbonil na posição C₄, devido a ressonância, apresentariam carga parcial negativa, sendo assim as principais responsáveis pela formação de pontes de hidrogênio com o solvente. A presença do grupo OH na posição 5 permitiria a formação de uma ponte de hidrogênio intramolecular forte, diminuindo assim a capacidade de interação com o solvente e aumentando o seu tempo de retenção. O mesmo ocorreria com a presença do grupo OH na posição 3. A interação seria mais fraca e interferiria menos no seu tempo de retenção.

Com relação a cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE), Heimler (1986) relacionou o comportamento cromatográfico dos flavonóides agliconas com o número e a posição dos grupos hidroxilas substituintes. Utilizando placas RP-18 e Sil C₁₈-50, e fase móvel ácido acético em 60% de metanol, foi observado que as flavanonas ficaram pouco retidas na placa quando comparou-se com as flavonas, devido a sua maior polaridade. De um modo geral, o aumento no número de hidroxilas diminuiu o tempo de retenção dos compostos.

Ackermann (1991) descreveu um método analítico rápido, através da cromatografia de camada delgada (CCD), para estudar os diversos componentes da própolis. Foram utilizados 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. O autor concluiu que através deste método pode-se ter uma avaliação rápida dos diversos componentes mobilizados na placa de CCD. Também foram observadas diferenças na distribuição dos componentes das própolis provenientes de regiões geográficas diferentes.

Estudando algumas técnicas cromatográficas, Vanhaelen & Vanhaelen-Fastré (1980) analisaram a separação de compostos fenólicos, dentre eles os flavonóides, por 3 métodos distintos: cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gás-líquido (CGL). Os autores destacaram a utilização de placas prontas RP-8, utilizando um sistema solvente

simples, compostos de água e etanol (45:55, v/v), que apresentou melhor resolução dentre outros sistemas testados. Neste estudo foi demonstrada a boa separação dos compostos fenólicos pela CGL, apesar de limitações como a necessidade de derivatização e de degradação térmica, além de problemas de eluição dos flavonóides acacetina e apigenina e da separação dos flavonóides heterocíclicos. Na técnica de CLAE foi observado que alguns fenóis interferiram na separação dos flavonóides presentes nas amostras.

Matsuno *et al.* (1998) fracionaram o extrato metanólico de própolis brasileira por cromatografia líquida de alta eficiência e isolaram um novo derivado benzo-gama-pirano, com fórmula molecular $C_{19}H_{22}O_3$ (PM:298.38), baseando-se em ensaios de citotoxicidade sobre o carcinoma hepatocelular humano (HuH 13). A estrutura deste composto foi determinada como 3-[2-dimetil-8-(3-metil-2-bulenil)benzopirano]-6-ácido propenóico. Este composto foi sintetizado quimicamente por ciclização do artepilin C (3-[4-hidroxi-3,5-bis(3-metil-2-butenil)fenil]-2-ácido propenóico).

Wulf & Nagel (1976) analisaram ácidos fenólicos e flavonóides de própolis através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Neste estudo foi utilizado uma coluna μ Bondapak/ C_{18} e um detector U.V. operando a 254 e 280 nm, em um sistema isocrático com solvente água:ácido acético:metanol (65:5:30, v/v). Os autores estudaram a influência do grupo carbonil na posição 4 sobre a polaridade dos flavonóides, e observaram que os grupos hidroxilas nas posições 3 e 5 interagem com o ceto grupo da posição 4, diminuindo assim a sua polaridade. Também foram relatadas as vantagens da CLAE em relação a cromatografia gasosa nas análises de própolis, pois a técnica de cromatografia gasosa apresenta problemas de degradação térmica e necessita de uma etapa adicional de derivatização.

Park *et al.* (1995) estudaram amostras de própolis provenientes de diferentes regiões do Brasil através de espectrofotometria em U.V., cromatografia em camada delgada de alta eficiência e cromatografia líquida de alta eficiência. Foi verificado que as concentrações de flavonóides totais e de flavonóides agliconas, como galangina, crisina e quercetina,

variaram dependendo da região de coleta. Em um outro trabalho, Park *et al.* (1997) analisaram amostras de própolis originárias de duas variedades de abelhas *Apis mellifera* localizadas em uma mesma região, pelas técnicas descritas acima, e mostraram que a composição química dos flavonóides foi dependente da variedade da abelha.

Menghinello *et al.* (1999) desenvolveram um método cromatográfico, CLAE-FR, para separação simultânea dos 16 principais flavonóides agliconas e 3 glicosídeos presentes em amostras de própolis. A separação foi feita em uma coluna Supelcosil LC-318, utilizando água, acetonitrila e ácido trifluoroacético. Os autores concluíram que as análises cromatográficas forneceram uma descrição precisa da composição qualitativa e quantitativa dos flavonóides analisados.

Marcucci *et al.* (2000) analisaram 40 amostras de própolis do sul e sudeste do Brasil por CLAE. Estes autores estudaram 18 compostos de interesse: ácido caféico; ácido cumárico; ácido ferrúlico e alguns derivados destes ácidos; pinobanksina, um derivado do kanferol e 5 compostos fenólicos [3-prenil-4- ácido hidroxicinâmico (PHCA); 2,2-dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano (DCBE); 3,5-diprenil-4-ácido hidroxicinâmico (DHCA); composto E (desconhecido) e 6-propenóico-2,2-dimetil-8-prenil-2H-1- ácido benzopirano (DPB)]. As amostras do grupo do sudeste eram ricas em derivados do kanferol. As amostras do grupo I do sul mostraram alto conteúdo do composto DPB, mas baixa concentração dos derivados do kanferol e do composto DCBE. Amostras do grupo II do sul foram caracterizadas pela alta concentração de DCBE, DHCA, ácido cumárico e DPB. Os autores concluíram que a identificação de novos compostos nas própolis brasileiras podem dar indícios sobre a sua origem vegetal.

Koo *et al.* (1999) avaliaram o efeito da própolis de *Apis mellifera* coletada de duas regiões do Brasil (Minas Gerais e Rio Grande do Sul) no desenvolvimento de cárie em ratos dessalivados. A composição dos flavonóides dos extratos etanólicos de própolis (EEP), foi analisada por CCDAE e CLAE em fase reversa. O padrão de CCDAE e o perfil da CLAE demonstraram que a qualidade e a quantidade de flavonóides agliconas do EEP

de Minas Gerais foi diferente das do EEP do Rio Grande do Sul. O EEP do Rio Grande do Sul apresentou altas concentrações de pinocembrina, crisina, acacetina, e galangina. Os autores concluíram que o efeito cariostático da própolis depende da composição do extrato e conseqüentemente da região de coleta.

Bogdanov (1989) analisou a composição de flavonóides de 4 amostras de mel e 2 amostras de própolis da Suíça. O principal flavonóide identificado tanto no mel quanto nas amostras de própolis foi a pinocembrina, além de pequenas quantidades de crisina e galangina. O autor também relatou que o perfil de flavonóides, tanto na cromatografia em camada delgada quanto na cromatografia líquida de alta eficiência, foi semelhante entre as amostras de própolis.

A técnica de cromatografia com espectrometria de massas (CG-EM) tem se mostrado uma ferramenta muito útil na confirmação e identificação de compostos químicos presentes em própolis. Através do uso desta técnica, Velikova *et al.* (2000) analisaram a composição química de própolis da Bulgária, Turquia, Grécia e Algéria. Foi encontrado que todas as amostras apresentaram flavonóides e ésteres do ácido caféico e ácido ferrúlico. Algumas amostras da Turquia mostraram baixa porcentagem de ácidos diterpênicos, enquanto que as amostras da Algéria apresentaram um conteúdo significativo do ácido hidroxiditerpênico (M=322, estrutura não determinada por EM).

Maciejewicz *et al.* (2001) isolaram 10 flavonóides de própolis do sul da Polônia. O espectro de massas dos compostos isolados foi comparado com o espectro de massas da biblioteca do EM e os compostos foram identificados como tectocrisina, pinocembrina, crisina, galangina, genkwanina, apigenina, kanferol, piloína, 5-hidroxi-4',7'-dimetoxiflavona e pinostrobina. Os flavonóides piloína e pinostrobina foram isolados em própolis pela primeira vez.

Novotny *et al.* (1999) investigaram a ocorrência natural de derivados do benzo[b]pirano e dos flavonóides crisina, tectocrisina e galangina, além do efeito

secundário da mudança da estrutura química e a sua separação usando CG-EM. Os autores também estudaram os parâmetros polarográficos básicos em relação a sua estrutura química fechada. Os resultados mostraram pouco potencial carcinogênico, não impedindo assim o uso dos flavonóides investigados na dieta humana.

Os constituintes das própolis provenientes da região sudeste da parte ocidental da Austrália foram analisadas através da técnica de espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear. Neste estudo os autores identificaram os flavonóides pinostrobin, sakuranetina, isosakuranetina (5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavanona), 5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavanona e traços de crisina. Ainda foram encontrados outros compostos como o derivado do naftaleno, denominado xantorrocol, e traços do álcool 3,5-dimetoxibenzil, além do composto pterostilbeno (4'-hidroxi-5,7-dimetoxistilbeno) (Ghisalberti *et al.*, 1977).

A Análise de própolis da Bulgária através das técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência com espectrometria de massas mostrou a presença dos flavonóides pinocembrina, galangina, crisina, tectocrisina, quercetina, isoramnetina (3,5,7,4'-tetrahidroxi-3'-metoxiflavona) e kanferol (3,5,7,4'-tetrahidroxiflavona). Também foi encontrada a presença de três novos flavonóides, sendo dois identificados como 3,7-dihidroxi-5-metoxiflavanona e 2,5-dihidroxi-7-metoxiflavanona, respectivamente (Bankova *et al.* 1983).

Sokolov & Torgov (1990) determinaram por espectrometria de massas os flavonóides de amostras de própolis coletadas em regiões de *Populus tremulus*. Foi observado que os flavonóides isolados pertenciam a 2 grupos distintos: flavonas, como apigenina e acetina e flavonols, como o kanferide.

Bankova *et al.* (1998) investigaram por CG e CG-EM a variação sazonal na composição química de própolis brasileira coletada por duas sub-espécies de abelhas, *Apis mellifera* africanizada e *Apis mellifera* ligustica européia. Os principais componentes identificados foram os compostos fenólicos, especialmente os derivados do ácido cinâmico.

Houve exceção nas amostras de própolis da abelha *Apis mellifera* *lingustica* coletadas no outono, onde os diterpenos predominaram. Nas própolis de ambas as subespécies de abelhas os compostos diterpênicos apareceram no verão e atingiram a porcentagem máxima no outono, no entanto estiveram ausentes durante as outras estações. Os autores concluíram que as duas subespécies de abelhas coletam própolis do mesmo grupo de plantas, e existem pelo menos duas fontes vegetais importantes, as quais ainda são desconhecidas.

Bankova *et al.* (1995), analisaram 4 amostras de própolis provenientes do Brasil através da cromatografia gasosa com espectrometria de massas. Os autores observaram que a composição da fração polar da própolis apresentava características diferentes quando comparada com as própolis provenientes da zona temperada, como 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 relação as própolis das regiões temperadas. Foi observada a presença de altas concentrações de acetofenonas preniladas e pequenas quantidades de alguns terpenóides como sesquiterpenóides e α -terpinol. Estes compostos foram encontrados apenas nas amostras de própolis brasileiras. Os autores concluíram que a composição química da própolis brasileira foi significativamente diferente da própolis da região temperada devido a diferença da fonte vegetal.

No estudo realizado por Pereira *et al.* (1998) é enfatizado a vantagem da técnica da cromatografia gasosa de alta resolução à alta temperatura (HT-HRGC) e cromatografia gasosa de alta resolução à alta temperatura com espectrômetro de massas (HT-HRGC-EM). Os autores mostraram como principal vantagem a injeção direta das amostras de própolis, sem a necessidade de derivatização e purificação prévia. Vários compostos, incluindo flavonóides agliconas, ácidos fenólicos e compostos de alto peso molecular foram caracterizados nos extratos brutos através destes métodos, mostrando serem ferramentas úteis e informativas. Em outro trabalho, Pereira *et al.* (1999) caracterizaram pela primeira vez uma série de ésteres de terpenóides pentacíclicos de alto peso molecular em extratos hexânicos da própolis de Minas Gerais. A identificação foi feita pelas técnicas de HT-HRGC e HT-HRGC-EM.

As técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN) tem proporcionado a elucidação da estrutura química de vários compostos desconhecidos nos extratos de própolis. Propavko *et al.* (1969) já utilizaram técnicas modernas de separação e identificação, como ressonância magnética nuclear (RMN), na análise da composição química da própolis e isolaram os seguintes compostos: acacetina (5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona); 5-hidroxi-4', 7-dimetoxiflavona; kanferide (3,5,7-trihidroxi-4'-metoxiflavona); ramnocitrina (3,4,5-trihidroxi-7-metoxiflavona); 5,7-dihidroxi-3,4'-dimetoxiflavona; 3,5,-dihidroxi-4',7-metoxiflavona; pinostrobin ((-)-5,-hidroxi-7-metoxiflavanona) e (-)-5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavanona, além de evidências da presença da quercetina (3,5,7,3',4'-petahidroxiflavona). Neste trabalho também foi isolado e identificado um derivado aldeídico, a isovanilina.

Cizmarik & Matel (1970) isolaram e identificaram o ácido caféico (3,4-ácido dihidroxicinâmico). Posteriormente os mesmos autores, em 1973, isolaram o ácido ferrúlico (ácido 4-hidroxi-3-metoxicinâmico) de amostras de própolis provenientes da Europa. Os autores identificaram os compostos através das técnicas de espectrometria na região ultra violeta, infravermelho e ressonância magnética nuclear.

Sokolov & Torgov (1989) isolaram e identificaram em própolis os compostos ferrulato, p-coumarato e p-hidroxibenoato do álcool trans-coniferil através do uso das técnicas de ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas. Estes compostos também foram isolados nos exsudatos de botões da espécie vegetal *Populus tremula*.

Rubio *et al.* (1999) isolaram um nova benzofenona poliisoprenilada de extratos etanólicos de própolis cubana e determinaram a sua estrutura química usando a técnica de RMN. Este composto mostrou atividade antimicrobiana e antifúngica significativa contra uma variedade de bactérias e leveduras.

Hirota *et al.* (2000) isolaram de própolis brasileira o ácido (Z)-2,2-Dimetil-8-(3-metil-2-butenil) (1) juntamente com o derivado benzopirano (E)-2,2-dimetil-8-(3-met-2-

butenil)-benzopirano-6-ácido propenóico (2). Os autores determinaram a estrutura química através das análises de RMN, EM, IR e espectroscopia de UV. O composto 1 mostrou uma atividade citotóxica de aproximadamente 7 vezes maior contra as células do carcinoma de pulmão humano quando comparado com o composto 2.

3.1.3 Propriedades biológicas das própolis

3.1.3.1 Atividade antimicrobiana da própolis

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

A atividade antimicrobiana de própolis já foi verificada “in vitro” contra várias linhagens de bactérias gram positivas (*Bacillus brevis*, *B. cereus*, *B. cereus* var. *mycoides*, *B. megatherium*, *B. polymixa*, *B. pumilus*, *B. sphaericus*, *B. subtilis*, *Cellulomonas fimi*, *Nocardia globerula*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Micrococcus lysodeikticus*, *Sarcina lutea*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus faecalis*) e gram negativas (*Aerobacter aerogenes*, *Alcaligenes* sp., *Bordetella bronchiseptica*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia marcescens* (Marcucci, 1996).

Grange & Davey (1990) analisaram as propriedades antibacterianas das própolis contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus* sp. *Branhamella catarrhalis*, *Corynebacterium* sp, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Klebsiella pneumoniae*. Os

autores verificaram que a própolis, na concentração de 3 mg/mL, inibiu completamente o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus* sp., *Branhamella catarrhalis*, *Corynebacterium* sp, *Bacillus cereus*. Também inibiu parcialmente o crescimento de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, porém não apresentou efeito contra *Klebsiella pneumoniae*. Os autores observaram que o extrato de própolis mostrou atividade antibacteriana principalmente em microrganismos gram positivos.

Kujumgiev *et al.* (1999) investigaram as atividades antibiótica (*Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*), antifúngica (*Candida albicans*) e antiviral (vírus da influenza aviária) de amostras de própolis de diferentes origens geográficas. Todas as amostras mostraram atividade antifúngica e antibacteriana contra as linhagens gram-positivas testadas, e antiviral para boa parte das amostras. Segundo os autores em diferentes amostras diferentes combinações de substâncias são essenciais para as atividades biológicas das própolis, sugerindo que o valor farmacológico é o resultado de uma mistura natural de vários compostos.

Maciejewicz & Meresta (1999) determinaram quantitativamente a atividade bacteriostática contra *Staphylococcus aureus* utilizando compostos de ocorrência natural em própolis. Os compostos utilizados foram 7 flavonóides simples, pinostrobin, ácido cinâmico, 4 derivados do ácido cinâmico, ácido hidroxicinâmico, ácido benzoico, 6 derivados do ácido benzoico e vanilina. Os autores verificaram que a alta atividade bacteriostática contra *Staphylococcus aureus* foi mostrada pelos seguintes flavonóides: kanferide, galangina, apigenina, quercetina, raminetina, pinocembrina e kanferol.

Koo *et al.* (2000a) avaliaram a atividade antimicrobiana “in vitro”, inibição da aderência do microrganismo *Streptococcus mutans* e inibição da formação de glucanos insolúveis em água utilizando a espécie vegetal *Arnica montana* e extratos etanólicos de própolis de Minas Gerais. Os extratos de própolis inibiram significativamente todos os microrganismos testados. Entretanto os extratos de *Arnica montana* não mostraram uma

atividade antimicrobiana significativa. Os autores constataram que o extrato de própolis mostrou atividade antibacteriana, inibição da aderência celular e inibição da formação de glucanos insolúveis em água, enquanto que o extrato de *Arnica montana* foi pouco ativo nestas mesmas três condições.

Koo *et al.* (2000b) avaliaram o efeito de uma nova variedade de própolis do Nordeste do Brasil (BA) sobre o crescimento do microrganismo *Streptococcus mutans*, aderência celular e síntese de glucanos insolúveis em água. Neste trabalho os autores também testaram as própolis do sudeste (MG) e sul (RS) do Brasil. O perfil da nova variedade de própolis foi totalmente diferente das própolis do Sudeste e Sul, não sendo detectado nenhum flavonóide ou ácido cumárico. Todos os EEPs demonstraram atividade biológica contra o microrganismo *Streptococcus mutans*, entretanto o EEP da Bahia mostrou 80% de inibição da aderência celular e baixa síntese de glucanos insolúveis. Os autores concluíram que a nova variedade de própolis foi excepcionalmente efetiva em todos os parâmetros testados “in vitro” contra o microrganismo *S. mutans*, e que os efeitos biológicos não estão relacionados somente com flavonóides e derivados do ácido cinâmico.

Park *et al.* (1998a, 1998b) estudaram a atividade antimicrobiana das própolis de várias regiões do Brasil contra os microrganismos *Streptococcus mutans*, *Actinomyces naeslundii* e *Staphylococcus aureus*. Os autores constataram que todos os extratos inibiram tanto o crescimento dos microrganismos quanto a enzima glicosiltransferase do microrganismo *S. mutans*. Uma amostra de própolis do Rio Grande do Sul foi a que apresentou maior inibição contra crescimento das bactérias e atividade da glicosiltransferase.

Bonvehi *et al.* (1994) analisaram a composição química e a atividade bacteriostática de amostras de própolis provenientes de diferentes regiões geográficas e botânicas, principalmente Uruguai e China. Os autores observaram que os compostos fenólicos, principalmente os flavonóides, apresentaram variabilidade dependendo da região. Porém, de modo geral, a apigenina e a acacetina apresentaram-se em maiores concentrações. A

atividade bacteriostática dos extratos etanólicos de própolis foi maior contra *Staphylococcus aureus* do que contra *Bacillus subtilis*, entretanto pouca atividade foi encontrada contra *Escherichia coli*.

A avaliação da inibição da atividade da glicosiltransferase e o crescimento dos microrganismos *Streptococcus sobrinus* 6715, *Streptococcus mutans* PS14, *Streptococcus cricetus* OMZ 61 foi analisado “in vitro” por Ikeno *et al.* (1991). A própolis analisada demonstrou atividade antimicrobiana contra as 3 linhagens testadas e inibiu tanto a síntese de glucanos insolúveis em água quanto a atividade da glicosiltransferase. Os autores concluíram que devido ao sinergismo dos efeitos antimicrobianos, inibição da síntese de glucanos e da atividade da glicosiltransferase, a própolis pode controlar a cárie dental em ratos.

Os extratos de própolis podem potencializar o efeito de certos antibióticos. Ghisalberti (1979) verificou que a ação da biomicina, tetraciclina, neomicina, polimixina, penicilina e estreptomicina contra *S. aureus* e *E. coli* foi aumentada pela adição de própolis ao meio. Em alguns casos o efeito bacteriostático teve um aumento de 10 a 100 vezes.

Aga *et al.* (1994), isolaram da própolis brasileira um composto identificado como 3,5-diprenil-4-ácido hidroxicinâmico (Artepin C), que mostrou atividade antimicrobiana relativamente alta contra os fungos *Microsporum gypseum* e *Arthroderma benhamiae*. Este composto também mostrou atividade antimicrobiana contra as bactérias *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium equi*, *Micrococcus lysodeikticus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium phlei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Thermoactinomyces intermedius*.

3.1.3.2 Atividade antioxidante da própolis

Os ensaios realizados por Krol *et al.* (1990) sobre a atividade antioxidante da própolis e da quercetina, um flavonol presente na própolis, mostraram um efeito antioxidante do extrato etanólico de própolis de aproximadamente um terço do efeito antioxidante da quercetina.

Apesar dos flavonóides serem considerados os antioxidantes mais abundantes e comuns em própolis, outros compostos fenólicos, como por exemplo o benzil cafeato, também apresentam atividade antioxidante (Yamauchi *et al.*, 1992).

Os flavonóides, principalmente flavonols, demonstraram ser potentes antioxidantes em estudos “in vitro” de oxidação lipoprotéica (Vinson *et al.*, 1995). Neste estudo, foram analisados os efeitos antioxidantes em lipoproteínas de baixa densidade, responsáveis pela arteriosclerose. Segundo os autores os resultados deste estudo demonstraram uma possível ação benéfica dos flavonóides na dieta humana contra os problemas cardíacos, como a arteriosclerose.

Isla *et al.* (2001) examinaram a possível ação protetiva da própolis contra a modificação lipídica em soro não fracionado. Foi observado que alguns grupos de própolis inibiram e/ou diminuíram a oxidação lipoprotéica. Os autores concluíram que estes resultados justificam o uso de determinados tipos de própolis como uma fonte natural de antioxidante.

Park *et al.* (1998c, 1998d), determinaram que os extratos etanólicos de própolis preparados com 70 e 80% de etanol apresentaram maior atividade antioxidante em relação aos extratos obtidos com menor concentração de etanol. Nestas condições também houve uma maior extração de flavonóides

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

3.1.3.3 Atividade citotóxica da própolis

Hladón *et al.* (1980) demonstraram que o extrato etanólico de própolis possuía propriedades citotóxicas contra o carcinoma da epiderme oral humana (KB) e linhagens de células HeLa. Baseado em ensaios de inibição de células Ltk⁻, Grunberger *et al.* (1998) isolaram e caracterizaram um composto biologicamente ativo, com atividade citostática conhecido como CAPE (fenil éster do ácido caféico). Os autores observaram diferentes citotoxicidades do CAPE com relação as células normais e células transformadas de melanomas de humanos e ratos.

O artepilin C (3,5-diprenil-4-ácido hidroxcinâmico), composto isolado de própolis, exibiu efeito citotóxico contra células malignas tanto “in vivo” quanto “in vitro”. O artepilin C causou citotoxicidade em tumores sólidos e em células leucêmicas. A apoptose, mitose abortiva, também foi confirmada através dos estudos histológicos (Kimoto *et al.* 1998).

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

Matsuno *et al.* (1997) isolaram da própolis brasileira dois isômeros diterpenóides com atividade citotóxica sobre o carcinoma hepatocelular humano. Os compostos químicos isolados foram caracterizados como sendo clerodenos diterpenóides.

3.1.3.4 Outras atividades biológicas das própolis

Paintz & Metzner (1979) observaram o efeito anestésico local de própolis sobre a córnea de coelho e de rato. Os autores também relataram que a pinocembrina e a mistura de ésteres do ácido caféico, quando aplicados subcutâneamente, produziram efeito anestésico próximo ao produzido pela lindocaína.

A atividade antiinflamatória da própolis foi verificada por Mirzoeva & Calder (1996). Os autores observaram que o extrato etanólico de própolis diminuiu a formação de prostaglandina e leucotrieno por macrófagos murine peritoneal “in vitro” e durante a inflamação “in vivo”. A dieta com própolis também diminuiu a via metabólica da lipoxigenase e o metabolismo do ácido araquidônico durante a inflamação “in vivo”.

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

Cizmarik & Lahitova (1998) avaliaram o efeito protetor da própolis contra os agentes mutagênicos nitrovin e nitrosoguanidina. Os autores observaram uma redução da mutagenicidade desses compostos sobre as linhagens de *Salmonella thyphimurium* TA97 e TA 100 em torno de 50 e 60%, respectivamente.

3.2 Mel

3.2.1 Origem vegetal

O trabalho realizado por Bastos *et al.* (1996) apresenta uma caracterização da origem vegetal de amostras de mel de apiários de Minas Gerais através de uma correlação entre o espectro polínico e propriedades físico-químicas. Ficou estabelecida a participação de diferentes espécies vegetais na produção de pólen e néctar. As propriedades físico-químicas (cor, cinzas, acidez, açúcares redutores, sacarose, açúcares superiores, hidroximetil furfural e atividade diastática) tipificaram o mel de *Eucalyptus*.

Conte *et al.* (1998) avaliaram alguns parâmetros químicos para a caracterização da origem unifloral do mel. Os parâmetros estudados incluíram a atividade de água, composição de aminoácidos livres, açúcares redutores, açúcares totais e pH. Os estudos foram avaliados por métodos colorimétricos, permitindo a diferenciação entre amostras de mel de diferentes origens florais.

A análise de 17 flavonóides agliconas em amostras de mel comercial de citrus foi realizada por meio da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência. A flavanona hesperetina foi encontrada em todas as amostras, porém não foi encontrada em qualquer outra amostra de mel de origem floral diferente. Estes resultados sugerem que hesperetina pode ser usada como um marcador da origem floral em mel de citrus (Ferrerres *et al.*, 1993).

Ferrerres *et al.* (1994) analisaram os compostos metil antranilato (MA) e hesperetina em 18 amostras de mel de citrus da Espanha por CG e CLAE. Não houve uma correlação entre o conteúdo de MA e hesperetina, entretanto os autores concluíram que a análise de hesperetina poder ser usada como um marcador da origem floral do mel de citrus.

Gil *et al.*, (1995) estudaram por meio da cromatografia líquida de alta eficiência os compostos fenólicos presentes, no mel e néctar de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.),

passíveis de serem usados como marcadores bioquímicos de origem floral. O néctar de alecrim, presente no estômago das abelhas, apresentou o kanferol 3-sophoroside (93%) e quercetina 3-sophoroside (7%). A quantidade de kanferol encontrado nas amostras de mel foi entre 0,4 e 1,2 µg/g. Entretanto os autores concluíram que a presença de kanferol em mel de alecrim não pode ser considerado como a única fonte para determinação da origem floral, pois este flavonóide pode ser originado de outras fontes de néctar. De qualquer forma, a sua ausência ou presença em pequenos níveis (< 0,3 µg/g) pode ser considerado como evidência de uma origem floral diferente.

Ferreres *et al.* (1998) avaliaram por CLAE o conteúdo de kanferol em diferentes amostras de mel de alecrim produzidos na Espanha. O conteúdo encontrado ficou na faixa de 0,33-2,48 mg/Kg de mel. O pólen de alecrim mostrou a presença de kanferol 3-diglicosídeo e kanferol 3-glicosídeo podendo, dessa forma, ser uma fonte alternativa desse flavonóide. De qualquer forma, não houve uma correlação entre o kanferol presente no mel e no pólen. Os autores observaram que a contribuição dos flavonóides do pólen na quantidade total de flavonóides presentes no mel foi muito pouca, e que a pesquisa de marcadores fenólicos para a determinação da origem floral deve ser direcionada para os flavonóides ou outros constituintes do néctar.

No estudo realizado por Tomás-Barberan *et al.* (2001) foram analisados por CLAE os perfis de compostos fenólicos de 52 amostras de mel unifloral produzidos na Europa, para se detectar os possíveis marcadores de origem floral. Para o mel de limeira foram encontrados 5 marcadores, para o de castanha 5 marcadores, para o de eucalipto seis marcadores e para o mel de “heather” 3 marcadores. Além disso, a flavanona hesperetina foi confirmada como um bom marcador para as amostras de mel de citrus, kanferol para o mel de alecrim e quercetina para o mel de girassol. O ácido abscísico, já relatado como um possível marcador para o mel de “heather”, também foi detectado em mel de mostarda, limeira e acácia.

Andrade *et al.* (1997) descreveram uma técnica analítica que permitiu a identificação de 12 ácidos fenólicos diferentes em amostras de mel. Após a otimização das condições por CLAE, 20 amostras de mel *Erica* sp e 20 amostras de lavanda foram analisados quanto a composição de ácidos fenólicos. Uma correlação entre perfis de ácidos fenólicos e a origem botânica foi encontrada. Os autores demonstraram que as amostras de mel de *Erica* sp. foram caracterizados pela presença de ácido elágico, ácido p-hidroxibenzóico, ácido siríngico e ácido cumárico, enquanto que as amostras de lavanda foram caracterizados pela presença de ácido gálico.

Guyot *et al.* (1998) identificaram através da cromatografia gasosa com espectrometria de massa marcadores florais para o mel de castanha e tília. O mel de castanha foi distinguível de outros por possuir altas concentrações de acetofenona, 1-feniletanol (>88 ppb) e 2-aminoacetofenona (>154 ppb). O mel de tília foi caracterizado por possuir quantidades de derivados do shikimato (etilmetilfenol isômero) (>31 ppb), 4-tert-butilfenol, estragole (>51 ppb), p-metil-acetofenona, altas concentrações de compostos derivados de monoterpenos (mentol, timol, 8-p-menteno-1,2-diol, e carvacrol (>76 ppb)) e metil(1-metilenotenil)benzeno.

Berahia *et al.* (1993) analisaram os flavonóides de mel sem derivatização por cromatografia gasosa com espectrometria de massa (CG/EM). Essa técnica permitiu a identificação de 6 flavonas-flavonols e 4 flavanona-flavanonols. Os autores concluíram que a técnica de CG/EM pode ser usada na determinação da origem floral do mel.

Cabras *et al.* (1999) analisaram ácidos orgânicos em mel de morango e encontraram a presença de um ácido desconhecido como principal constituinte. O composto foi isolado e identificado como ácido homogenístico (ácido 2,5-dihidroxifenilacético) por meio de técnicas de EM e RMN. O conteúdo médio desse ácido no mel foi de 378 ± 92 mg/Kg. As análises do néctar confirmaram a origem floral deste composto. Segundo os autores esse ácido não foi detectado em qualquer outra fonte de mel monofloral podendo, então, ser usado como um marcador da origem do mel de morango.

3.2.2 Composição química do mel

O trabalho realizado por Weston *et al.* (1999) mostra descrição de vários métodos para o isolamento da fração fenólica ativa do mel de “manuka” (*Leptospermum scoparium*) da Nova Zelândia. A fração fenólica consistiu de derivados do ácido benzóico, ácido cinâmico e flavonóides. Os flavonóides foram diferentes daqueles encontrados em folhas de “manuka”, entretanto foram os mesmos que os encontrados em mel e propólis da Europa. Apesar da maioria destes compostos possuir atividade antibiótica, os autores concluíram que eles não podem ser usados para avaliar individualmente ou coletivamente a atividade antibacteriana do mel “manuka”.

Martos *et al.* (1997) analisaram flavonóides e outros compostos fenólicos de amostras de mel da Tunísia para verificar a origem botânica, geográfica e a composição química. O conteúdo de flavonóides nas amostras de mel foi muito variável (20-2400 µg/100g). Em mel e propólis da Tunísia um novo flavonóide, miricetina 3,7,4, 5-tetrametil éter, foi encontrado. Este composto mostrou ser característico dos exsudatos das folhas de *Cistus sp.* Outro composto presente em menor quantidade foi identificado como quercetina 3,7,3-trimetil éter. Ambos os compostos estavam presentes em grandes quantidades em propólis, mas foram detectados somente em pequenas quantidades no mel. Os autores concluíram que em áreas de fronteiras, tal como a Tunísia, onde o álamo não está sempre presente para a produção de propólis, outras fontes de plantas podem ser usadas, sendo os seus constituintes detectados no mel.

Vit *et al.* (1997) analisaram o perfil de flavonóides de *Apis mellifera* e *Melipona sp.* em amostras de mel da Venezuela. A presença de ácido elágico foi característico do mel de *A. mellifera* e *Melipona sp.*, no entanto a presença deste ácido nas amostras de *Melipona sp.* foi muito variável. O número de flavonóides presentes nas amostras individuais não excederam a seis. Os autores observaram que a diversidade de flavonóides nas amostras de mel da Venezuela foi inferior a da de mel de clima temperado. Flavonóides como a mirecetina, uma chalcona não identificada e um flavonol glicosilado foram encontrados somente em amostras de mel de *Melipona sp.*

Martos *et al.* (2000a) analisaram amostras de mel de eucalipto da Europa, por meio da técnica de CLAE, e encontraram os flavonóides miricetina (3,5,7,3',4',5'-hexahidroxiflavona), tricetina (5,7,3',4',5'-pentahidroxiflavona) e quercetina (3,5,7,3',4'-pentahidroxiflavona). As quantidades destes compostos foram constantes, indicando assim a mesma origem floral. Em adição, o ácido elágico e flavonóides derivados de própolis, como a pinobanksina, pinocembrina e crisina foram detectados em todas as amostras. A miricetina, a tricetina e a luteolina não foram identificados como marcadores florais em nenhuma outra amostra de mel analisada, sugerindo assim que estes compostos podem ser usados como marcadores de origem floral. Os autores concluíram que a miricetina, tricetina e luteolina originaram do néctar de eucalipto, onde devem ser encontrados as formas glicosiladas correspondentes.

Martos *et al.* (2000b) analisaram amostras de mel unifloral de eucalipto da Austrália por meio da técnica de CLAE, e encontraram os flavonóides miricetina (3,5,7,3',4',5'-hexahidroxiflavona), tricetina (5,7,3',4',5'-pentahidroxiflavona), quercetina (3,5,7,3',4'-pentahidroxiflavona), luteolina (5,7,3',4'-tetrahidroxiflavona), e kanferol (3,5,7,4'-tetrahidroxiflavona) em todas as amostras. O mel de *Eucalyptus camaldulensis* apresentou tricetina como principal marcador, enquanto que o mel de *Eucalyptus pilligaensis* apresentou luteolina. Estes dados sugerem que a análise de flavonóides pode ser utilizada para diferenciar espécies florais. Os autores observaram que a principal diferença entre o perfil de flavonóides encontrados no mel de eucalipto australiano e mel de eucalipto europeu foi a maior quantidade dos flavonóides pinobanksina, pinocembrina e crisina.

Sabatier *et al.* (1992) analisaram os flavonóides de mel de girassol por diferentes métodos: cromatografia em camada delgada de alta eficiência em fase reversa, cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa e cromatografia gasosa com espectrometria de massas. Os autores identificaram os flavonóides pinocembrina, pinobanksina, crisina, galangina e quercetina, além de pequenas quantidades de tectocrisina e kanferol. Segundo os autores o mel pode ser considerado uma importante fonte de flavonóides na dieta humana.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Própolis

4.1.1.1 Coleta das amostras de própolis

As amostras de própolis brutas foram coletadas em apiários das regiões Nordeste, Norte, Sudeste e Sul do Brasil, no período de novembro de 1998 a janeiro de 2001. As amostras foram coletadas por raspagem das partes internas, bordas da melgueira, ninho e tampa das colméias. Todo material foi previamente acondicionado em pequenos sacos de plástico limpos, inertes e secos e armazenados sob o abrigo da luz, a 5° C.

4.1.1.2 Tratamento das amostras de própolis bruta

As amostras de própolis bruta foram limpas retirando-se a poeira, pedaços de madeira, abelhas mortas, traças e qualquer outro tipo de material estranho. Em seguida foram trituradas, peneiradas em peneiras de 18 “mesh”, homogeneizadas, pesadas e armazenadas, a 5°C.

4.1.1.3 Preparo dos extratos etanólicos de própolis (EEP)

Para o preparo dos extratos etanólicos de própolis (EEP) foram pesados em balança analítica dois gramas de própolis triturada, obtida como descrito no item 4.1.1.2. Em seguida transferiu-se para tubos de centrifuga e adicionou-se 15 mL de etanol Merck P.A (80%). A extração foi feita a 70°C, em banho de água termostatizado, por 30 minutos, sob agitação constante. Em seguida, foi feita uma centrifugação a 7000 x g por 10 minutos a 5°C, em centrifuga Beckman J2-21. Os sobrenadantes foram transferidos para tubos de ensaio (15 x 160 mm) com tampa de rosca. Ao resíduo foram adicionados 10 mL de etanol

(80%) e a extração foi realizada mais uma vez nas mesmas condições. Os sobrenadantes obtidos das duas extrações foram homogeneizados e armazenados em tubos de ensaio com tampa de rosca (15 x 160 mm), a 5°C (EEP).

4.1.2 Material vegetal

4.1.2.1 Coleta das amostras vegetais fontes de própolis

As amostras vegetais fontes de própolis foram coletadas nas mesmas localidades e na mesma época que as amostras de própolis. A espécie vegetal *Populus alba* (álamo) foi coletada na cidade de Santa Cruz - PR, a espécie *Hyptis divaricata* (alecrim da Bahia) na cidade de Entre Rios – BA. A amostra vegetal de *Baccharis dracunculifolia* (alecrim do campo) foi coletadas nas cidades de Mogi Mirim e Campinas, no Estado de São Paulo. Os materiais vegetais foram identificados pelo Dr. João Semir e Dr. Jorge Yoshio Tamashiro do Instituto de Biologia da Unicamp.

4.1.2.2 Preparo dos extratos metanólicos vegetais (EMV)

Para o preparo dos extratos metanólicos vegetais (EMV) foram pesados 5 gramas do material fresco e adicionados 25 mL de metanol P.A. (Merck Co.). A extração foi feita a temperatura de 50°C por 30 minutos. No caso das espécies vegetais *Hyptis divaricata* e *Baccharis dracunculifolia* o material vegetal utilizado foram os brotos apicais, enquanto que na espécie vegetal *Populus alba* o material utilizado foi o exsudato resinoso dos botões florais.

4.1.3 Mel

4.1.3.1 - Coleta das amostras de mel

As amostras de mel foram coletadas em apiários dos Estados da Bahia (BA), Pernambuco (PE), Ceará (CE), São Paulo (SP) e Rio Grande do Sul (RS), no período de novembro de 1998 a dezembro de 2000. As amostras foram coletadas diretamente das colméias através da retirada de pedaços de favos, acondicionadas e armazenadas em frascos de vidro limpos, a 5 °C.

4.1.3.2 – Preparo dos extratos metanólicos de mel (EMM)

A extração dos compostos fenólicos de mel foi feita de acordo com o método descrito por Ferreres *et al.* (1991). Para o preparo dos extratos metanólicos de mel (EMM) foram pesados 100 gramas de mel os quais foram misturados com 500 mL de água destilada. A solução resultante foi filtrada para remoção das partículas sólidas e o pH ajustado para 2,0, com HCl 1N. O filtrado foi então misturado com 100 g da resina Amberlite XAD-2 (poro 9 nm; tamanho da partícula 0,3-1,2mm), agitado por 10 minutos e empacotado em uma coluna de vidro (25 x 2 cm). O material contido na coluna foi lavado com 200 mL de água ácida (pH 2,0) e subsequentemente com 300 mL de água destilada neutra (pH 7,0). A fração fenólica foi eluída com 300 mL de metanol, concentrada sob baixa pressão e ressuspensa em 10 mL de metanol. A fração fenólica concentrada (10 mL) foi então passada através de uma coluna de Sephadex LH-20 (21 x 1cm) para a purificação dos flavonóides e dos compostos fenólicos presentes no extrato. A fração recolhida foi concentrada em evaporador rotatório e redissolvida em 5 mL de metanol.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Análises físico-químicas dos extratos alcoólicos de própolis, vegetais e mel

4.2.1.1 Espectrofotometria na região ultravioleta-visível

A determinação do espectro de absorção dos extratos etanólicos de própolis e metanólicos vegetais foi realizada segundo o método descrito por Park *et al.* (2000). Aliquotas de 25 µL de cada EEP e EMV obtidos de acordo com o item 4.1.1.3 e 4.1.2.2, respectivamente, foram diluídas em 30 mL de álcool etílico 96% (Merck Co), e os espectros de absorção na região UV-visível foram determinados na faixa de comprimento de onda de 200 a 600 nm, em espectrofotômetro Beckman modelo DU-70.

4.2.1.2 Cromatografia em camada delgada de alta eficiência em fase reversa (CCDAE-FR)

A cromatografia em camada delgada de alta eficiência dos EEP, EMV e EMM foi feita de acordo com o método descrito por Park *et al.* (1995) e Park *et al.* (1997). Aliquotas de 3 µL dos EEP foram aplicadas em placas RP18 F₂₅₄ S (Merck Co). O tempo de desenvolvimento dos cromatogramas foi de aproximadamente 2 horas, utilizando-se um sistema etanol:água destilada (55:45, v/v), como fase móvel. As placas desenvolvidas foram observadas sob luz ultravioleta, no comprimento de onda de 254 e 366 nm, utilizando um iluminador UV Cole Parmer, modelo UVP-UVGL-58.

4.2.1.3 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR)

As análises por CLAE em fase reversa dos EEP, EMV e EMM foram feitas de acordo com o método modificado de Park *et al.* (1997) e Koo *et al.* (2000b). Vinte microlitros de cada extrato foram injetados em um cromatógrafo líquido (Shimadzu modelo LC-10) acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos a 254 nm e uma coluna de fase

reversa YMC PACK ODS (250 x 4,6 mm) com tamanho de partícula de 5 µm. A fase móvel utilizada foi água/ácido acético (19:1, v/v) (solvente A) e metanol (solvente B), com vazão constante de 1 mL/min. O gradiente iniciou com 30% do solvente B até 40% de B em 15 minutos, 50% de B em 30 minutos, 60% de B em 45 minutos, 75% de B em 65 minutos, 75% de B em 85 minutos, 90% de B em 95 minutos e 30% de B em 105 minutos. A coluna foi mantida a uma temperatura constante de 35°C e os cromatogramas foram processados utilizando “software” específico. Os compostos foram identificados pelo espectro de absorção na região ultravioleta, utilizando os recursos do detector de arranjo de fotodiodos (SPD-M10A, Shimadzu Co.), pela comparação do tempo de retenção e co-cromatografia de padrões. Neste trabalho, foram utilizados os seguintes padrões autênticos de flavonóides e ácidos fenólicos (Extrasynthese Co.): quercetina, kanferol, apigenina, pinocembrina, crisina, acacetina, galangina, kanferide, isosakuranetina, sakuranetina, ácido cumárico e ácido ferrúlico. Adicionalmente, pinobanksina, pinobanksina-3-acetato e o éster do ácido dimetil dialil caféico que foram gentilmente cedidos pelo Dr. Eckhard Wollenweber, do “Intitut für Botanik der Technischen Hochschule”, Alemanha. A quantificação dos compostos identificados foi feita utilizando-se o método da padronização externa.

4.2.1.4 Cromatografia gasosa com espectrometria de massa (CG-EM)

As análises por CG-EM dos EEP, EMV e EMM foram feitas de acordo com o método modificado descrito por Markham *et al.* (1996). Aliquotas de 400 µL de cada extrato alcoólico foram colocados dentro de “vials” de vidro e adicionadas 1 mL de uma solução etérea de diazometano (CH_2N_2) para a metilação. As amostras foram mantidas em banho de gelo por 4 horas para completa reação de metilação. Após esta reação adicionaram-se 300 µL de diclorometano (CH_2Cl_2) e filtraram-se as amostras. As amostras foram analisadas em um cromatógrafo gasoso CG 17A (Shimadzu Co.) acoplado a um espectrômetro de massas QP 5000 (Shimadzu Co.), equipado com uma coluna capilar CBP5 30 m x 0,25 mm e um detector operando no modo “scanning” (m/z 40-400). A programação de temperatura foi 50°C (0,3 min) a 285°C (15 min), com um incremento de

6°C/min. As amostras (0,6 µl) foram injetadas por auto-injetor AOC-17, utilizando a técnica de injeção “splitless”. A integração foi feita através do software específico do equipamento (QP5000 software). Flavonóides e ácidos fenólicos (quercetina, kanferol, apigenina, pinocembrina, crisina, acacetina, galangina, kanferide, isosakuranetina, sakuranetina, pinobanksina, pinobanksina-3-acetato, éster do ácido dimetil dialil caféico, ácido *p*-cúmarico e ácido ferrúlico) foram identificados por comparação com os dados obtidos do CG-EM (tempo de retenção e fragmentação iônica) de padrões autênticos metilados e eluídos nas mesmas condições. Os outros compostos químicos foram identificados por comparação com os dados do espectro de massas da biblioteca do equipamento (Willey139-Shimadzu).

4.2.2 Análises biológicas dos extratos etanólicos de própolis

4.2.2.1 Teste de antibiograma para bactérias patogênicas

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

A análise da atividade antimicrobiana dos extratos de própolis nas bactérias Gram positiva *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Streptococcus mutans*, que foram cultivadas em meio Agar Nutriente e BHI Agar, respectivamente, foi realizada de acordo com o método descrito por Blair *et al.* (1958). Culturas ativas destes microrganismos foram inoculadas por espalhamento com “swabs” estéreis, em placas de Petri contendo os respectivos meios de cultura. Os discos com os extratos foram colocados sobre as placas previamente inoculadas com *S. aureus*, sendo estas, posteriormente, incubadas a 37°C por 24 horas. Para o *S. mutans*, as placas foram incubadas em jaras de anaerobiose por 48 horas a 37°C. A atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos de própolis foi determinada pela medida do halo inibitório formado ao redor dos discos após o período de incubação.

4.2.2.2 Análise da atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada pela oxidação acoplada do β -caroteno e do ácido linoléico, de acordo com Hammerschmidt & Pratt (1978). Em um balão de fundo redondo foram adicionados 60 mg de ácido linoléico (Sigma Co.), 200mg de Tween 40 e 5 mg de β -caroteno (Sigma Co.), os quais foram dissolvidos em 5 mL de clorofórmio. Posteriormente a fração de clorofórmio foi evaporada em evaporador rotatório a 50°C. O resíduo obtido da evaporação foi dissolvido em 50 mL de água deionizada e oxigenada sob agitação vigorosa. Aliquotas de 1 mL desta emulsão foram transferidas para tubos de ensaio contendo 2 mL de água deionizada e oxigenada e 0,5 mL do EEP, previamente diluídos na proporção de 1:10. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 470 nm no tempo inicial e em intervalos de 60 minutos durante o período de 3 horas. A reação de oxidação foi conduzida a 40 °C. A absorbância dos tubos controle, medidos em cada intervalo de tempo, não continham o extrato etanólico de própolis diluído (1:10). A taxa de branqueamento do β -caroteno foi determinada pela diferença entre a absorbância inicial e a absorbância final, a 470 nm, dividido pelo tempo de incubação. O índice de antioxidação foi calculado como sendo a razão entre a taxa de branqueamento de cada grupo sobre a taxa de branqueamento do controle, conforme sugerido por Pratt & Birac (1979).

4.2.2.3 Análise da atividade antiinflamatória

A atividade antiinflamatória foi determinada através da atividade da enzima hialuronidase de acordo com Reissing *et al.* (1955) e Aronson & Davidson (1967). Foram adicionados 50 μ L de cada EEP, obtidos de acordo com o item 4.1.3, nos tubos de reação. Em seguida adicionou-se 0,5 mL de ácido hialurônico (Sigma Co.) (1,2 mg por mL de tampão acetato 0,1M, pH 3,6, contendo 0,15M de NaCl) nos tubos de reação e controle. Os tubos foram incubados a 37°C por 5 minutos, e logo em seguida foram adicionados 50 μ L (350 unidades) da enzima hialuronidase (Tipo IV-S: obtida de testículo bovino, Sigma Co.), dissolvida no mesmo tampão do substrato, na concentração de 6,5 mg/mL. Os tubos foram incubados a 37 °C por 40 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 10 μ L de

NaOH 4N. A adição dos EEP nos tubos brancos foi feita após decorrido o tempo de reação. Após a incubação 0,1 mL de tetraborato de potássio 0,8 M foi adicionado na mistura de reação e aquecida à ebulição por 3 minutos. Em seguida adicionou-se 3 mL de *p*-dimetilaminobenzaldeído (10%, em ácido acético concentrado contendo 12,5% de HCl 10N), e incubou-se novamente a 37°C por 20 minutos. A absorbância foi medida em espectrofotômetro (Beckman DU-70) a 585 nm, utilizando-se água como controle.

4.2.2.4 Análise da atividade citotóxica “in vitro”

A determinação da atividade citotóxica “in vitro” dos EEP foi testada contra 4 tipos de células tumorais humana (HTCL) sendo elas: KB (carcinoma nasofaríngeo), HCT-8 (adenocarcinoma ileocecal – ATCC CCL 224), MCF-7 (adenocarcinoma de mama – ATCC HTB 22) e carcinoma renal, HTB46 (CAKI-1), segundo a metodologia descrita por Skehan *et al.* (1990) e Rubinstein *et al.* (1990). As suspensões de células cancerosas devidamente diluídas foram cultivadas em meio RPMI-1640 (suplementado com 10% (v/v) de soro de embrião bovino e 100 mg/mL de kanamicina), e incubadas em atmosfera controlada com 5% de CO₂ a 37°C por 24 horas. Decorrido esse período foram adicionados 100 µL das amostras de própolis em diferentes concentrações, até o máximo de 30 µg/mL, dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO) devidamente diluído, e incubadas por mais 48 horas. Após a incubação as células foram fixadas com ácido tricloroacético (TCA) a 50% por um período aproximado de uma a duas horas, a 4°C e, em seguida, lavadas em água corrente. Após a secagem total do material fixado foi feita a coloração pela adição de 50 µL de sulforrodamina B (SRB) a 0,4% (p/v), dissolvido em ácido acético a 1%, durante o tempo de 10 a 20 minutos, a 4°C. O excesso de corante foi retirado por lavagens sucessivas (5x) com uma solução de ácido acético a 1%, sendo a placa seca a temperatura ambiente. O corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com solução de protease em ultra-som por 5 minutos. A leitura espectrofotométrica foi realizada a 562 nm. Para comparação foi utilizado a droga etoposídeo VP-16 como controle positivo. O Etoposídeo (VP-16) é uma droga utilizada comercialmente e atua sobre as células cancerosas através da síntese do DNA por uma ação sobre a topoisomerase II. Os valores de inibição foram expressos em

porcentagem de inibição das células cancerosas. Este estudo foi realizado pelo Dr. Kenneth Bastow da Universidade da Carolina do Norte, Chapel Hill, EUA.

4.2.3 Análise Estatística

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

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 *Própolis*

5.1.1 Coleta das amostras de própolis

Foram coletadas 201 amostras de própolis nas regiões Norte, Nordeste, Sul e Sudeste do Brasil, conforme mostrado na Tabela 1. A coleta foi realizada diretamente nos apiários, onde foi feita a identificação de cada caixa, de modo que fosse possível o retorno a cada colméia, caso necessário. Este tipo de coleta foi muito importante para o trabalho porque proporcionou um zoneamento entre os diferentes tipos de própolis e o local de produção.

Para fins de classificação dos principais grupos de própolis existentes no Brasil, foram também utilizadas amostras de própolis coletadas anteriormente nas regiões Sul e Sudeste do Brasil (Koo, 1996 & Ikegaki, 2001), perfazendo um total de aproximadamente 500 amostras analisadas.

TABELA 1: Localidades de amostragem de própolis nas regiões Nordeste, Norte, Sudeste e Sul.

Estado	Município	Nº de amostras coletadas
Bahia (BA)	Salvador, Juazeiro, Senhor do Bonfim, Remanso, Entre Rios, Barra da Choça, Vitória da Conquista, Anagé, Jacobina	75
Pernambuco (PE)	Salgueiro, Belo Jardim e Ouricuri	17
Ceará (CE)	Crato	8
Piauí (PI)	Picos	6
Paraná (PR)	União da Vitória, Porto União	15
Santa Catarina (SC)	Santa Cruz	11
São Paulo (SP)	Mogi Mirim, Socorro, Amparo, Mogi-Guaçu	25
Minas Gerais (MG)	Belo Horizonte, Carvalhópolis	10
Rio Grande do Sul (RS)	Pelotas, Bagé, Bom Jesus, Cambará do Sul, São Francisco de Paula	26
Pará (PA)	Belém	8

5.1.2 Análises físico-químicas dos EEP

5.1.2.1 Cromatografia em camada delgada de alta eficiência em fase reversa (CCDAE-FR) e espectrofotometria na região ultravioleta-visível

Os extratos etanólicos de própolis foram analisados por CCDAE-FR e Espectrofotometria na região ultravioleta-visível, de acordo com os métodos descritos nos itens 4.2.1.2 e 4.2.1.1, respectivamente. Com base nestas duas metodologias, foram selecionados os tipos de própolis de grande ocorrência, os quais foram classificados e

denominados de grupos de própolis. Ao todo foram encontrados 12 grupos distintos, sendo 6 na região Nordeste, 1 na região Sudeste e 5 na região Sul do Brasil (Figuras 1 e 2).

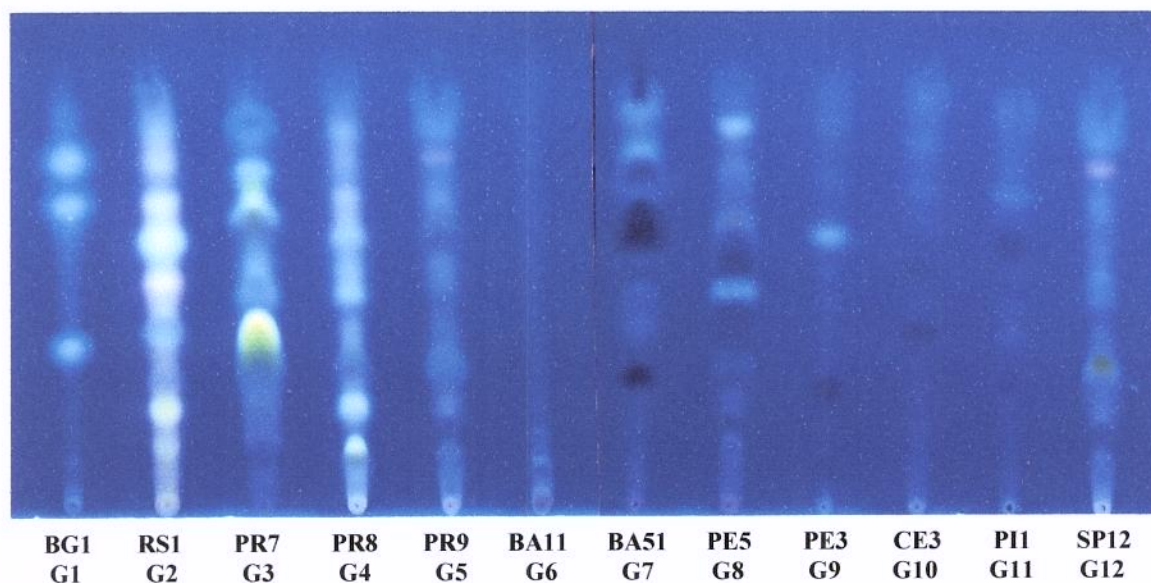


FIGURA 1: Cromatograma obtido por CCDAE, irradiado a 366 nm, dos extratos etanólicos dos 12 grupos de própolis brasileiras. (BG1 e RS1= Estado do Rio Grande do Sul; PR7, PR8 e PR9=Estado do Paraná; BA11 e BA51= Estado da Bahia; PE5 e PE3=Estado de Pernambuco; PI1= Estado do Piauí e SP12= Estado de São Paulo)

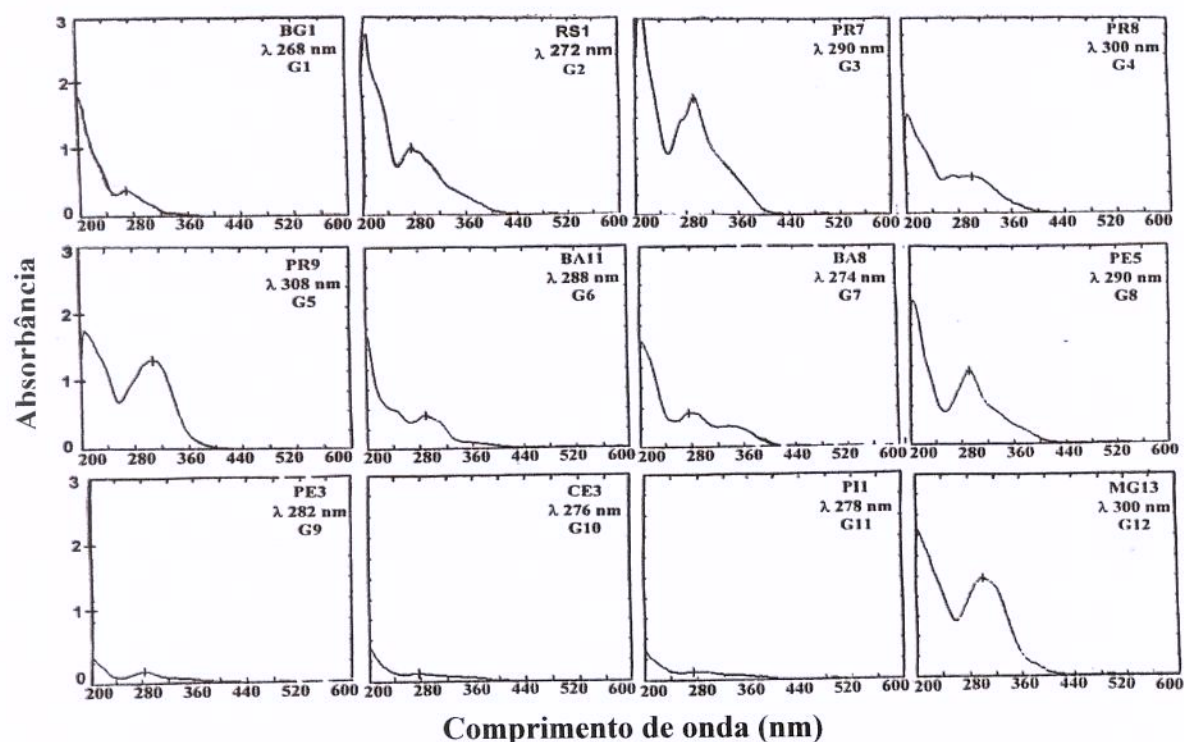


FIGURA 2: Espectros de absorção na região UV-visível, dos EEP, dos 12 grupos de própolis brasileiras.

A CCDAE permitiu uma visualização rápida e distinta de cada grupo de própolis. Na Figura 1, pode-se observar 12 diferentes perfis cromatográficos apresentados pelos EEP, demonstrando assim uma grande diversidade na composição química das própolis brasileiras. Apesar da existência de outros tipos de própolis nessas regiões eles não foram incluídos devido a sua rara ocorrência. Moura (2000) e Ikegaki (2001) também verificaram diferenças nos perfis cromatográficos dos diversos EEP, utilizando a técnica de CCDAE, nas própolis das regiões Nordeste e Sul do Brasil, respectivamente. As própolis do grupo 6 mostraram uma característica distinta em relação aos outros grupos, pois os compostos presentes no EEP não eluíram com a fase móvel, água:etanol 95% (45:55), ficando adsorvidos no início da fase estacionária durante todo o tempo de corrida. De um modo geral as própolis do Sul do Brasil (G1 a G5) apresentaram um grande número de frações em relação as própolis do Nordeste (G6 a G11). A grande maioria das amostras de própolis coletadas na região Sudeste apresentaram o perfil do grupo 12, o qual mostrou, pela CCDAE, várias bandas semelhante com as própolis do grupo 5. Isto evidencia, de certa forma, um parentesco entre a fonte vegetal destes grupos de própolis.

Os espectros de absorção na região UV-visível dos EEP, representativos dos 12 grupos, estão ilustrados na Figura 2. Cada grupo de própolis apresentou um valor máximo de absorbância nos comprimentos de onda que variou de 268 a 308 nm. De um modo geral os flavonóides também apresentam valores máximos de absorção na faixa de 250 a 350 nm (Markham, 1975). No entanto a análise por espectrofotometria dos EPP fornece apenas uma característica geral de todos os compostos fenólicos presentes. As própolis do grupo 8 apresentaram o mesmo valor máximo de absorção que as própolis do grupo 3 (Figura 2), apesar destes dois grupos mostrarem, pela CCDAE, um padrão cromatográfico totalmente diferente (Figura 1). Entretanto, a análise em conjunto dos resultados obtidos pelas técnicas de CCDAE e absorbância na região UV-visível, sugerem ser ferramentas rápidas e eficazes para a identificação e classificação de diferentes tipos de própolis.

A Tabela 2 e a Figura 3, ilustram algumas características dos EEP utilizados na CCDAE e espectrofotometria na região UV-visível. Como pode ser notado, os EEP dos diferentes grupos mostraram uma coloração que variou do amarelo ao castanho escuro.

Quando se comparou a coloração do extrato (Figura 3 e Tabela 2) com o padrão de CCDAE (Figura 1), foi possível verificar que não houve uma correlação entre estas duas variáveis. Desta forma fica claro que a variável coloração dos extratos não pode ser utilizada como uma função para predizer grupos distintos de própolis. Todos os grupos apresentaram, com exceção dos grupos 10 e 11, substâncias solúveis que variaram de 41,3 a 63,0%. Os grupos 10 e 11 apresentaram os menores teores de substâncias solúveis com valores de 24,1 e 23,1%, respectivamente (Tabela 2).

TABELA 2: Características de coloração e teor de substâncias solúveis dos EEP dos 12 grupos de própolis brasileiras.

Classificação	Origem	Extrato etanólico de própolis	
		Cor	Substâncias solúveis
Grupo 1 (BG1)	Sul do Brasil	Amarelo	63,0
Grupo 2 (RS1)	"	Castanho claro	57,5
Grupo 3 (PR7)	"	Castanho escuro	65,0
Grupo 4 (PR8)	"	Castanho claro	54,5
Grupo 5 (PR9)	"	Marrom esverdeado	58,7
Grupo 6 (BA11)	Nordeste do Brasil	Marrom avermelhado	45,9
Grupo 7 (BA51)	"	Marrom esverdeado	43,8
Grupo 8 (PE5)	"	Castanho escuro	41,3
Grupo 9 (PE3)	"	Amarelo	46,7
Grupo 10 (CE3)	"	Amarelo escuro	24,1
Grupo 11 (PI1)	"	Amarelo	23,1
Grupo 12 (SP12)	Sudeste do Brasil	Verde ou Marrom esverdeado	61,0



FIGURA 3: Aparência dos EEP dos 12 grupos de própolis brasileiras

5.1.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR)

A CLAE-FR dos EEP representativos dos 12 grupos de própolis foi realizada de acordo com o item 4.2.1.3. Da mesma forma que na CCDAE, a CLAE também permitiu uma diferenciação entre os 12 grupos de própolis classificados nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste do Brasil (Figuras 4 e 5).

Quando se observa os cromatogramas (Figuras 4 e 5) verifica-se uma grande diferença na composição dos compostos fenólicos presentes. Por exemplo, nas própolis do grupo 1 e do grupo 6 não foi identificado nenhum flavonóide. Além disso, as própolis do grupo 6 mostraram um perfil cromatográfico totalmente diferente dos perfis encontrados até o momento. Esse grupo de própolis somente apresentou eluição dos seus componentes após os 80 minutos de corrida. Tomás-Barberan *et al.* (1993) também encontraram em própolis da Venezuela um perfil similar ao grupo 6, e concluíram que a composição química era principalmente de benzofenonas isopreniladas.

As própolis do grupo 3 foram as que apresentaram o maior número de flavonóides identificados com os padrões utilizados. Como pode ser visto no Quadro 1, este também foi o grupo que apresentou os maiores teores dos flavonóides pinobanksina, apigenina, pinobanksina-3-acetato, crisina e galangina. Os flavonóides pinobanksina-3-acetato, crisina e galangina são característicos de própolis oriundas de clima temperado, onde árvores da espécie *Populus* sp. estão presentes (Tomás-Barberan *et al.*, 1993; Bankova *et al.*, 1987; Wollenweber *et al.*, 1987). Entretanto o grupo 8, oriundo de clima semi-árido do Nordeste do Brasil, também apresentou altos teores dos flavonóides pinobanksina-3-acetato, crisina, galangina e pinocembrina, não corroborando assim com a hipótese de Tomás-Barberan *et al.* (1993), Aga *et al.* (1994) e Bankova *et al.* (1995), que as própolis de clima tropical não possuem flavonóides ou os possuem em quantidades muito pequenas. O grupo 8 apresentou altos teores da flavanona pinocembrina (72,1 mg/g), o que de certa forma explica porque esse perfil de própolis tem o seu o máximo de absorção, pela espectrometria de UV-visível, em 290 nm (Markham, 1975). O grupo 3 de própolis foi o único que mostrou a presença do éster do ácido dimetil dialil caféico, o qual é um composto altamente alergênico e comumente encontrado em própolis de clima temperado (Wollenweber *et al.*, 1987) (Figura 4 e Quadro 1). As própolis dos grupos 9, 10 e 11 apresentaram poucos compostos fenólicos e com teores que não excederam a 1,2 mg/g (Quadro 1). Já as própolis do grupo 12, de maior valor econômico para o mercado externo, mostraram a presença dos compostos fenólicos ácido cumárico, ácido ferrúlico, kanferol, apigenina, isosakuranetina e kanferide. Uma característica importante das própolis deste grupo foi a presença constante do flavonóide kanferide, e a uma concentração sempre superior às dos outros compostos fenólicos identificados (Figura 5 e Quadro 1).

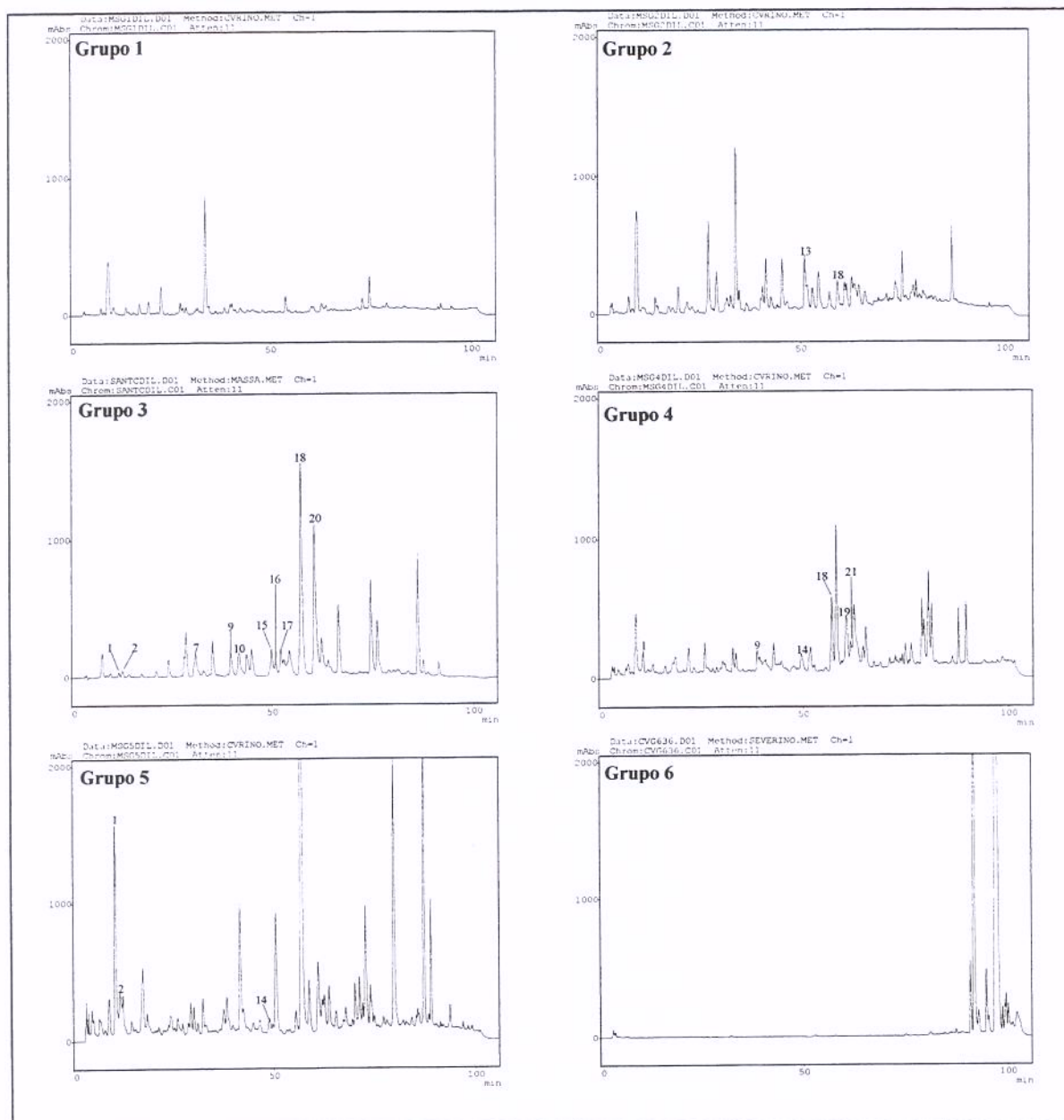


FIGURA 4: Cromatograma obtido por CLAE dos grupos de própolis brasileiras. (Volume de amostra injetada: 20µL; detector utilizado: arranjo de fotodiodos a 254 nm; coluna: fase reversa YMC PACK ODS (250 x 4,6 mm) com tamanho de partícula de 5 µm; fase móvel utilizada: água/ácido acético (19:1, v/v) (solvente A) e metanol (solvente B) em sistema de gradiente, iniciando com 30% do solvente B até 40% de B em 15 minutos, 50% de B em 30 minutos, 60% de B em 45 minutos, 75% de B em 65 minutos, 75% de B em 85 minutos, 90% de B em 95 minutos e 30% de B em 105 minutos; vazão: 1 mL/min; temperatura da coluna: 35°C).

1=ácido cumárico; 2=ácido ferrúlico; 6=quercetina; 7=pinobanksina; 9=kanferol; 10=apigenina; 13=sakuranetina; 14=isosakuranetina; 15=pinocembrina; 16=éster do ácido dimetil dialil caféico; 17=pinobanksina 3-acetato; 18=crisina; 19=acetetina; 20=galangina; 21=kanferide.

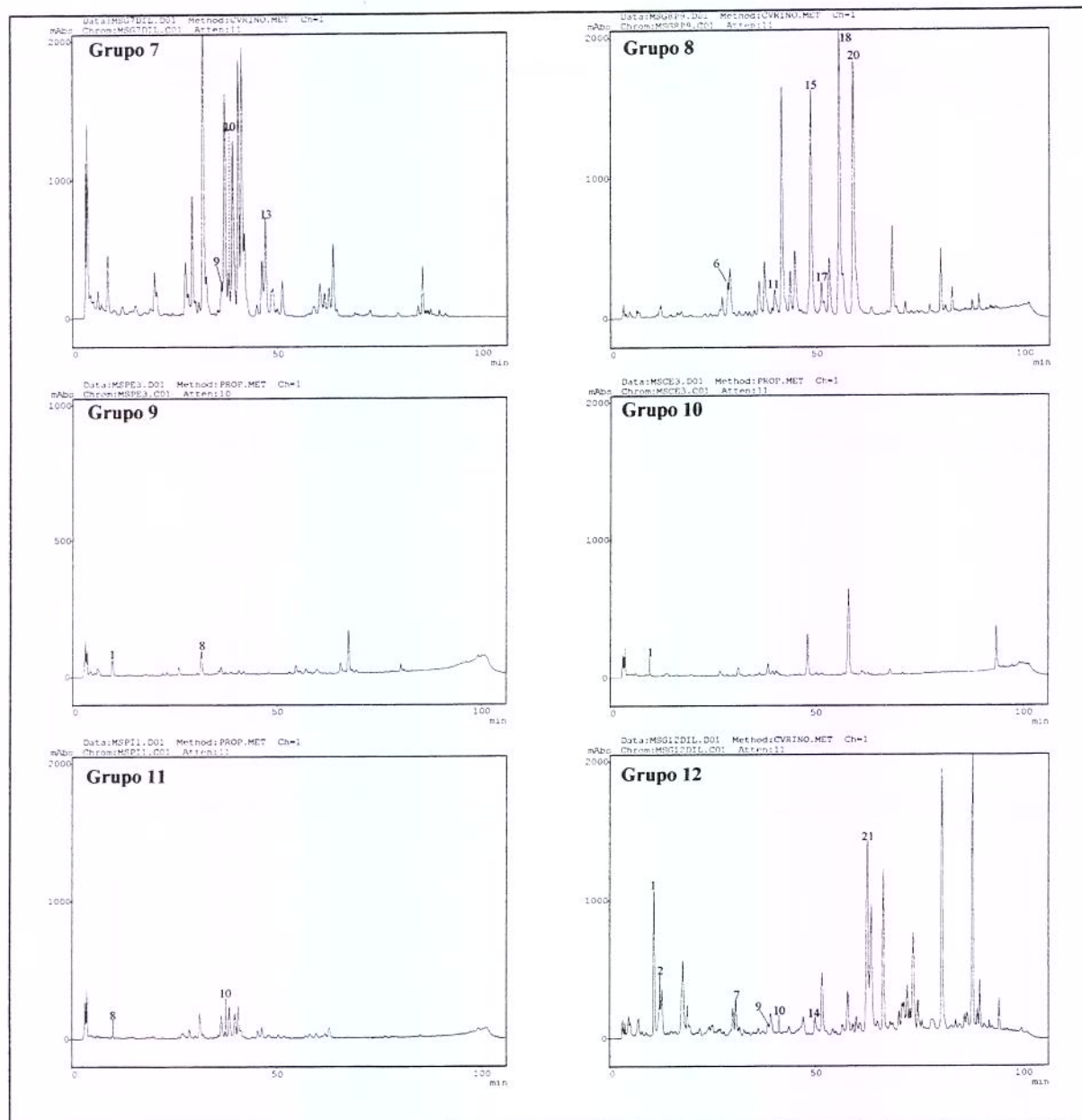


FIGURA 5: Cromatograma obtido por CLAE dos grupos de própolis brasileiras. (Volume de amostra injetada: 20µL; detector utilizado: arranjo de fotodiodos a 254 nm; coluna: fase reversa YMC PACK ODS (250 x 4,6 mm) com tamanho de partícula de 5 µm; fase móvel utilizada: água/ácido acético (19:1, v/v) (solvente A) e metanol (solvente B) em sistema de gradiente, iniciando com 30% do solvente B até 40% de B em 15 minutos, 50% de B em 30 minutos, 60% de B em 45 minutos, 75% de B em 65 minutos, 75% de B em 85 minutos, 90% de B em 95 minutos e 30% de B em 105 minutos; vazão: 1 mL/min; temperatura da coluna: 35°C).

1=ácido cumárico; 2=ácido ferrúlico; 6=quercetina; 7=pinobanksina; 8=hisperetina; 9=kanferol; 10=apigenina; 11=isoramnetina; 13=sakuranetina; 14=isosakuranetina; 15=pinocembrina; 17=pinobanksina 3-acetato; 18=crisina; 20=galangina; 21=kanferide.

QUADRO 1: Teor de compostos fenólicos determinados por CLAE nos 12 grupos de própolis brasileiras.

Compostos fenólicos identificados	Teor em mg/g de própolis											
	Grupos de própolis											
	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
1 (ácido cumárico)	-	-	1,2	3,8	17,7	-	-	-	0,5	0,2	0,2	8,5
2 (ácido ferrúlico)	-	-	1,4	-	4,6	-	-	-	-	-	-	2,4
6 (quercetina)	-	-	-	-	-	-	-	6,8	-	-	-	-
7 (pinobanksina)	-	-	37,4	-	-	-	-	-	-	-	-	8,7
8 (hisperetina)	-	-	-	-	-	-	-	-	1,2	-	-	-
9 (kanferol)	-	-	5,1	1,6	-	-	1,4	-	-	-	-	0,4
10 (apigenina)	-	-	7,9	-	-	-	2,2	-	-	-	0,3	0,3
11 (isoramnetina)	-	-	-	-	-	-	-	3,4	-	-	-	-
13 (sakuranetina)	-	13,2	-	-	-	-	18,1	-	-	-	-	-
14 (isosakuranetina)	-	-	-	12	7,5	-	-	-	-	-	-	7,3
15 (pinocembrina)	-	-	22,6	-	-	-	-	72,1	-	-	-	-
16 (éster do ácido dimetil dialil caféico)	-	-	9,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17 (pinobanksina-3- acetato)	-	-	36,2	-	-	-	-	14,1	-	-	-	-
18 (crisina)	-	2,1	39,9	4,2	-	-	-	19,7	-	-	-	-
19 (acacetina)	-	-	-	6,5	-	-	-	-	-	-	-	-
20 (galangina)	-	-	33,6	-	-	-	-	21,1	-	-	-	-
21 (kanferide)	-	-	-	2,4	-	-	-	-	-	-	-	12,3

*Os valores acima representam média de duas repetições

5.1.2.3 Cromatografia gasosa com espectrometria de massas (CG-EM)

A composição química das amostras representativas dos 12 grupos foram analisadas por CG-EM, de acordo com a metodologia descrita no item 4.2.1.4. Ao todo foram encontrados, nos 12 grupos de própolis, 69 compostos diferentes, incluindo compostos da classe dos flavonóides, ácidos fenólicos, terpenóides, ácidos graxos e derivados e aldeídos (Tabela 3). As própolis do grupo 1 apresentaram vários terpenóides na sua composição, como por exemplo ácido murônico, mirtenol, 1-alfa terpineol, junipeno, 1-trans-pinocarveol, verbinona, viridiflorol spatulenol e [(+)-aromadendreno], que não foram encontrados em nenhum outro grupo de própolis. Apesar do terpenóide 1-alfa terpineol ter sido encontrado em amostras de própolis de São Paulo (Bankova *et al.*, 1995), os outros terpenóides nunca foram identificados simultaneamente em amostras de própolis do Brasil. Conforme já demonstrado pela técnica de CLAE, a técnica de CG-EM confirmou a

presença do composto alergênico, éster do ácido dimetil dialil caféico, nas própolis do grupo 3, as quais provavelmente devem ter a sua origem vegetal em árvores da espécie *Populus* sp. Nenhum composto comum aos 12 grupos de própolis foi identificado, entretanto alguns derivados de ácido graxo, como o ácido palmítico, estiveram presente na maioria dos grupos estudados (Tabela 3). O grupo 6 foi o único grupo onde foi identificado o composto β -cariofileno, o qual também está presente em folhas de *Baccharis notoserigila*. Este composto, juntamente com outros terpenóides como α -pineno, limoneno e espatulenol, mostrou moderada atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas e gram-negativas (Cobos *et al.*, 2001). O óleo essencial das folhas de *Eugenia dysenterica*, o qual é composto principalmente de β -cariofileno e α -humuleno, mostrou forte atividade contra *Candida albicans* isolada de indivíduos portadores do vírus HIV (Costa *et al.*, 2000). Isto pode explicar, em parte, a alta atividade antimicrobiana apresentada por este grupo de própolis. As própolis do grupo 12 mostraram a presença do flavonóide kanferide e de um grande número de derivados do ácido cinâmico e hidrocinâmico, principalmente nas formas metil e etil ésters (Tabela 3). Aga *et al.* (1994) demonstraram que a atividade antimicrobiana das própolis do Brasil é devida principalmente a derivados do ácido hidrocinâmico. Entretanto, as amostras de própolis do grupo 6 demonstraram atividade antimicrobiana superior ao grupo 12, não possuindo contudo nenhum derivado do ácido hidrocinâmico.

TABELA 3: Cromatografia gasosa com espectrometria de massas dos 12 grupos das própolis brasileiras

Compostos identificados (Principais picos do EM: intensidade relativa)	Grupo
1: Crisina: 268 (100, M ⁺), 239 (40), 95 (18), 69 (22), 51 (16), 44 (32).	2, 3, 4, 8
2: Pinobanksina 3-acetato (7-metil): 328 (36, M ⁺), 268 (73), 167 (100), 166 (46), 120 (51), 43 (54).	3
3: Pinobanksina 3-acetato (5,7-dimetil): 342 (3, M ⁺), 181 (64), 180 (100), 91 (22), 43 (38).	2, 3
4: Pinocembrina: 284 (M ⁺), 256 (93), 255 (63), 179 (96), 152 (100), 124 (63), 78 (30), 77 (29), 69 (44).	3, 8
5: Galangina: 298 (77, M ⁺), 297 (100), 135 (16), 105 (23), 77 (33).	3, 4, 8
6: Apigenina: 312 (100, M ⁺), 311 (62), 283 (32), 266 (40), 142 (18).	3, 12
7: Kanferol: 328 (100, M ⁺), 327 (98), 285 (48), 150 (30), 135 (26), 44 (64).	3, 4, 5, 7, 8
8: Tectocrisina: 298 (100, M ⁺), 269 (31), 207 (18), 135 (28), 132 (18), 44 (49).	4
9: Isosakuranetina: 300 (53, M ⁺), 229 (30), 193 (18), 166 (18), 134 (100), 121 (82), 119 (22), 44 (21).	7, 12
10: Kanferide: 328 (100, M ⁺), 327 (87), 285 (45), 242 (10), 150 (28), 135 (24), 77 (18), 44 (24).	12
11: 2-beta-pineno: 136 (8, M ⁺), 93 (100), 91 (21), 79 (25), 77 (24), 69 (44), 53 (16), 41 (77).	1, 12
12: Éster metílico do ácido benzóico: 136 (32, M ⁺), 105 (100), 77 (66), 51 (36).	1, 2, 3, 6, 8
13: Éster metílico do ácido benzóico, 4-metoxi: 166 (31, M ⁺), 135 (100), 92 (20), 77 (27), 64 (15).	4, 7, 12
14: Éster metílico do ácido benzóico 3,4 dimetoxi: 196 (100, M ⁺), 166 (16), 165 (100), 79 (27), 77 (17), 51 (23).	7
15: Éster metílico do ácido benzóico 3,4,5 trimetoxi: 226 (100, M ⁺), 211 (55), 195 (29), 155 (40), 125 (17), 66 (18).	7
16: Éster etílico do ácido benzóico: 150 (16, M ⁺), 122 (34), 105 (100), 77 (65), 51 (34), 50 (13).	8
17: 1-trans-Pinocarveol: 152 (M ⁺), 134 (32), 119 (31), 92 (83), 91 (54), 83 (57), 81 (34), 70 (68), 69 (40), 55 (87), 53 (33), 43 (30), 41 (100).	1
18: 1-Alfa-terpineol: 154 (M ⁺), 136 (28), 121 (33), 93 (44), 81 (30), 59 (100), 41 (23).	1
19: Verbinona: 150 (57, M ⁺), 135 (69), 119 (27), 108 (31), 107 (100), 91 (88), 82 (25), 80 (58), 79 (42), 78 (13), 77 (27), 67 (27), 65 (21), 55 (32), 53 (28), 51 (22), 43 (32), 41 (66).	1
20: [(+)-Aromadendreno]: 204 (15, M ⁺), 161 (43), 121 (30), 119 (30), 107 (43), 105 (43), 95 (24), 93 (50), 91 (50), 81 (44), 79 (42), 69 (53), 67 (40), 55 (47), 43 (42), 41 (100).	1
21: Junipeno: 204 (15, M ⁺), 161 (44), 119 (34), 107 (38), 105 (42), 95 (34), 94 (42), 93 (43), 91 (53), 79 (38), 77 (30), 67 (26), 55 (44), 53 (29), 41 (100).	1
22: Spatuleno: 220 (6, M ⁺), 205 (33), 159 (34), 119 (42), 105 (34), 95 (20), 93 (40), 91 (42), 79 (32), 69 (35), 67 (24), 55 (28), 43 (100), 41 (69).	1
23: Viridiflorol: 222 (M ⁺), 61 (31), 109 (50), 107 (26), 95 (26), 93 (26), 81 (34), 69 (54), 67 (31), 55 (33), 43 (100), 41 (61).	1
24: Ácido murônico: 468 (M ⁺), 173 (42), 106 (10), 105 (32), 95 (38), 91 (42), 82 (26), 81 (32), 79 (26), 77 (16), 69 (100), 67 (20), 55 (39), 44 (37), 41 (84).	1
25: Vanilina: 152 (95, M ⁺), 151 (100), 123 (21), 109 (26), 81 (37), 53 (20).	2, 4
26: Éster metílico de vanilina: 166 (100, M ⁺), 165 (49), 95 (28), 77 (23), 51 (26).	2, 4
27: Éster metílico do ácido cinâmico: 162 (51, M ⁺), 131 (100), 103 (58), 77 (41), 51 (34).	2, 3, 8
28: Ácido hidrocinâmico: 150 (36, M ⁺), 105 (26), 104 (39), 91 (100).	4
29: Éster metílico do ácido hidrocinâmico: 164 (24, M ⁺), 105 (35), 104 (100), 91 (74), 79 (13), 77 (22), 51 (21).	4, 5, 8, 9, 12
30: Éster etílico do ácido hidrocinâmico: 178 (31, M ⁺), 107 (44), 105 (44), 104 (100), 91 (58), 77 (26).	4, 5, 8, 12
31: Éster metílico do ácido hidrocinâmico, p- hidroxi: 180 (26, M ⁺), 120 (33), 107 (100).	5, 12
32: Éster etílico do ácido cinâmico: 176 (32, M ⁺), 131 (100), 104 (17), 103 (50), 102 (14), 77 (35), 51 (21).	9
33: Ácido Ferrúlico: 222 (100, M ⁺), 191 (54), 147 (17), 77 (16), 51 (24).	2, 3, 6, 12
34: 1,4-Metanonaftaleno-9-ol, 1,4-dihidro: 158 (18, M ⁺), 129 (100), 128 (44), 127 (33).	3
35: Éster do ácido dimetil dialil caféico: 276 (35, M ⁺), 208 (100), 193 (30), 67 (42), 53 (40), 41 (92).	3
36: Pinostrobina chalcona: 270 (93, M ⁺), 269 (48), 193 (100), 167 (26), 166 (78), 138 (49), 95 (34).	3
37: Ácido p-cumárico: 192 (64, M ⁺), 161 (100), 133 (33), 89 (17), 63 (18).	4, 5, 9, 11, 12
38: Metil trans-comunato: 316 (M ⁺), 175 (41), 147 (30), 121 (42), 119 (41), 107 (38), 105 (42), 93 (52), 91 (52), 81 (66), 79 (70), 55 (56), 53 (41), 45 (47), 43 (51), 41 (100).	4
39: Agatato dimetilico: 362 (M ⁺), 189 (35), 121 (100), 114 (33), 109 (23), 107 (30), 82 (36), 81 (81), 79 (34), 67 (35), 59 (32), 55 (57), 53 (32), 43 (23), 41 (71).	4
40: Beta-cariofileno: 204 (7, M ⁺), 107 (26), 105 (25), 93 (68), 91 (36), 81 (30), 79 (39), 77 (25), 69 (65), 67 (24), 55 (36), 41 (100).	6
41: 10-(dimetilaminometil)-alfa-pineno: 193 (M ⁺), 58 (100), 42 (7), 41 (6).	7
42: 3,4-dimetoxifenol: 154 (100, M ⁺), 139 (78), 111 (54), 93 (22), 69 (20), 65 (19), 55 (22), 53 (15).	7
43: 4-fenilbutenona: 146 (92, M ⁺), 145 (78), 131 (100), 103 (94), 102 (19), 77 (68), 51 (42), 43 (38).	8

44: 1H-Cicloprop[<i>e</i>]azulen-4-ol, decahidro-1, 1, 1,7-tetrametil-, [1aR-(1a.alfa., 4a.alfa., 7.alfa., 7a.beta., 7b.alfaa)]:	222 (M ⁺), 161 (18), 122 (34), 121 (20), 111 (22), 109 (40), 107 (36), 105 (23), 95 (30), 93 (32), 91 (20), 82 (26), 81 (43), 79 (22), 69 (55), 67 (38), 55 (40), 43 (100), 41 (76).	10
45: 4H-pirano-4-one, 2, 3-dihidro-3, 5-dihidroxi-6-metil:	144 (37, M ⁺), 101(31), 72 (20), 55 (25), 45 (25), 44 (76), 43 (100).	11
46: Alfa-pineno:	136 (6, M ⁺), 93 (100), 92 (35), 91 (27), 79 (23), 77 (30), 55 (12), 43 (19), 41 (33).	12
47: 1,1,3,3,4-Pentametil-6-T-butil-2,3-dihidroindeno:	244 (18, M ⁺), 230 (20), 229 (100), 173 (5), 57 (10).	12
48: Éster metílico do ácido palmítico:	270 (8, M ⁺), 87 (58), 74 (100), 57 (16), 55 (25), 43 (37), 41 (30).	1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12
49: Éster metílico do ácido 10-octadecenoico:	296 (M ⁺), 97 (34), 96 (29), 87 (37), 84 (32), 83 (45), 74 (55), 69 (60), 67 (30), 56 (24), 55 (100), 43 (59), 41 (72).	1, 2, 5, 6, 7, 9, 11
50: Éster metílico do ácido láctico:	104 (M ⁺), 45 (100), 43 (10).	3
51: Éster metílico do ácido eicosanoico:	326 (1, M ⁺), 87 (56), 74 (100), 57 (30), 55 (33), 43 (64), 41 (37).	3, 4, 7, 11
52: Éster metílico do ácido 9,12-Octadecadienoico (E, E):	294 (M ⁺), 95 (45), 82 (45), 81 (67), 79 (33), 69 (35), 68 (40), 67 (100), 55 (72), 43 (32), 41 (91).	3, 4, 5, 6, 7, 10, 12
53: Éster metílico do ácido 9-Octadecenoico (E):	296 (M ⁺), 74 (40), 69 (43), 55 (96), 43 (72), 41 (100).	4, 8, 10
54: Éster etílico do ácido etoxiacético:	132 (M ⁺), 88 (36), 61 (18), 60 (21), 59 (100), 45 (14), 42 (16).	6, 12
55: Éster metílico do ácido octadecanoico:	298 (11, M ⁺), 87 (65), 75 (21), 74 (100), 69 (17), 57 (23), 41 (46).	6, 7, 8, 10
56: Éster etílico do ácido nonadecanoico:	326 (M ⁺), 101 (52), 88 (100), 73 (20), 70 (21), 69 (24), 57 (40), 55 (44), 43 (82), 41 (60).	6, 10
57: Éster dimetílico do ácido butanodióico:	146 (M ⁺), 115 (71), 114 (20), 87 (18), 59 (73), 55 (100).	6, 9, 10, 12
58: Éster dimetílico do ácido propanodióico:	132 (M ⁺), 101 (92), 74 (42), 59 (100), 57 (24), 43 (25), 42 (47).	8
59: Ácido palmítico:	256 (16, M ⁺), 129 (21), 85 (15), 73 (90), 73 (90), 71 (28), 69 (31), 61 (22), 60 (84), 57 (64), 56 (15), 55 (62), 43 (100), 42 (17), 41 (75).	8, 9, 10, 11
60: Éster etílico do ácido palmítico:	284 (2, M ⁺), 101 (55), 89 (16), 88 (100), 73 (23), 70 (22), 57 (26), 55 (34), 43 (52), 41 (33).	8, 9
61: Éster metílico do ácido láurico:	214 (2, M ⁺), 87 (54), 74 (100), 55 (26), 43 (39), 41 (36).	9, 10
62: Ácido oléico:	282 (M ⁺), 98 (21), 97 (23), 83 (34), 81 (24), 73 (20), 69 (51), 68 (19), 67 (33), 60 (22), 57 (33), 56 (24), 55 (95), 54 (27), 43 (65), 41 (100).	10
63: Mirtenol:	152 (5, M ⁺), 108 (30), 93 (20), 91 (38), 79 (100), 77 (20), 41 (38).	1
64: Farnesol:	222 (M ⁺), 93 (38), 81 (20), 71 (34), 69 (84), 67 (24), 55 (34), 43 (62), 41 (100).	1, 12
65: Eudesmol:	222 (3, M ⁺), 164 (19), 149 (34), 109 (20), 59 (100), 43 (19), 41 (22).	3
66: Nerolidol:	222 (M ⁺), 93 (47), 79 (18), 71 (38), 69 (100), 68 (10), 55(39), 43 (76), 41 (96).	5
67: Esterealdeído:	268 (M ⁺), 97 (27), 96 (40), 95 (27), 83 (40), 82 (63), 81 (31), 71 (33), 69 (43), 68 (39), 67 (33), 57 (80), 55 (74), 44 (26), 43 (100), 41 (86).	6
68: Aldeído benzóico:	106 (91, M ⁺), 105 (89), 78 (20), 77 (100), 52 (15), 51 (58), 50 (34).	8
69: n-tetradecano:	198 (2, M ⁺), 85 (30), 71 (48), 57 (90), 56 (14), 55 (23), 43 (100), 41 (59).	12

5.1.3 Análises biológicas dos extratos etanólicos de própolis

5.1.3.1 Teste de antibiograma para bactérias patogênicas

A atividade antimicrobiana dos EEPs dos 12 grupos foi feita usando os microrganismos patogênicos *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Streptococcus mutans*, de acordo com o método descrito no item 4.2.2.1. A Tabela 4 ilustra que as própolis do grupo 1 não inibiram o crescimento do *Staphylococcus aureus*, mas as dos grupos 2, 9, 10 e 11 inibiram ligeiramente. As própolis dos grupos 3, 4, 5, 8, e 12 inibiram moderadamente e as própolis dos grupos 6 e 7 inibiram fortemente. As própolis do grupo 6 demonstraram alta

atividade antimicrobiana contra o microrganismo *Streptococcus mutans*, as própolis do grupo 3 apresentaram uma atividade moderada, enquanto as própolis dos grupos 1, 4, 5, 7, 8, e 12 mostraram uma atividade mínima. Koo *et al.* (1999) e Park *et al.* (1998b) também verificaram que as própolis do tipo grupo 3 apresentam uma atividade antimicrobiana maior sobre os microrganismos *S. mutans* do que os microrganismos *S. aureus*. As própolis do grupo 3 e grupo 8, apresentaram uma composição química muito semelhante com relação aos flavonóides identificados. De fato estes dois grupos de própolis mostraram uma atividade antimicrobiana semelhante, tanto para o *S. aureus* quanto *S. mutans*. Apesar de compostos fenólicos como a galangina, pinocembrina, benzil- ρ -cumarato, entre outros, possuírem atividade antimicrobiana (Villanueva *et al.*, 1964; Maciejewicz & Meresta, 1999; Dimov *et al.*, 1992), nenhum destes foi encontrado nas própolis do grupo 6. Koo *et al.* (2000b) também demonstraram que as própolis do tipo grupo 6 possuem atividade antimicrobiana maior do que as própolis dos tipos grupo 3 e grupo 12. As própolis do grupo 12, apresentaram vários derivados do ácido hidrocínâmico (Tabela 3) o que pode explicar, juntamente com os flavonóides identificados, a atividade antimicrobiana encontrada para este grupo, visto que diversos derivados do ácido hidrocínâmico possuem forte atividade antimicrobiana (Aga *et al.*, 1994).

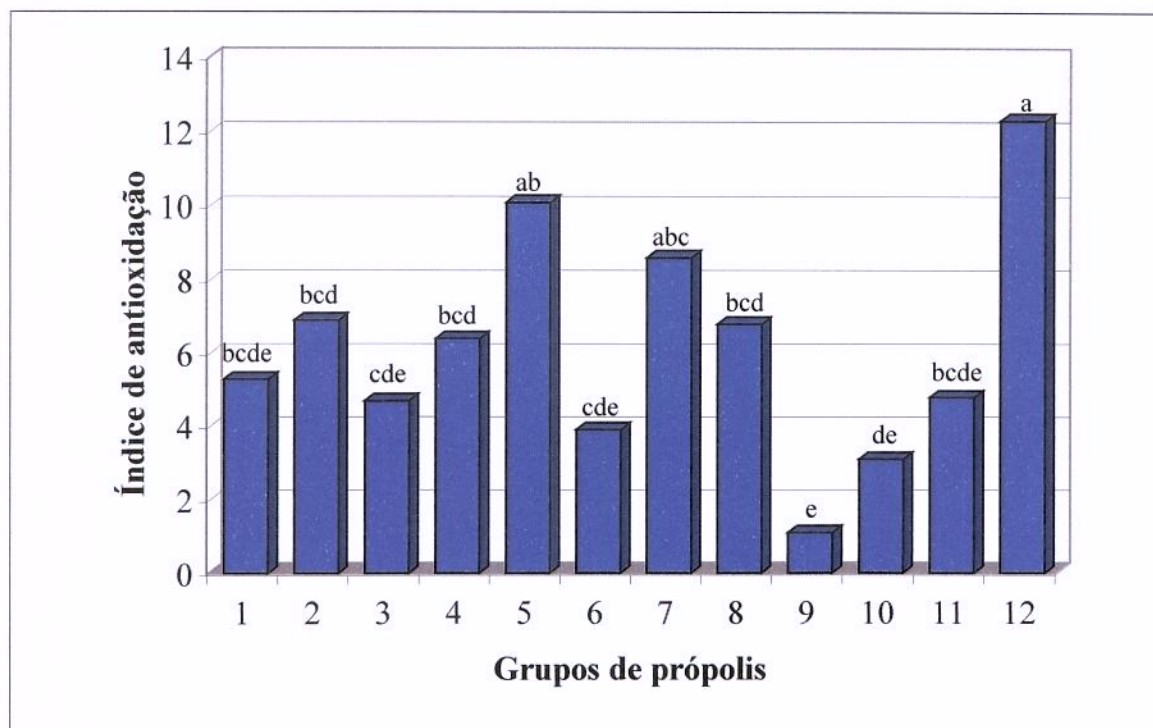
TABELA 4: Atividade antimicrobiana dos EEPs dos 12 grupos de própolis brasileira contra as bactérias patogênicas *S.aureus* ATCC 25923 e *S. mutans*.

Grupos	Halo de inibição (mm)	
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Streptococcus mutans</i>
Grupo 1 (BG1)	nd	<1
Grupo 2 (RS1)	<1	nd
Grupo 3 (PR7)	2,0	2,8
Grupo 4 (PR8)	1,0	<1
Grupo 5 (PR9)	3,0	<1
Grupo 6 (BA11)	6,0	9,0
Grupo 7 (BA51)	5,0	<1
Grupo 8 (PE5)	2,0	1,0
Grupo 9 (PE3)	<1	nd
Grupo 10 (CE3)	<1	nd
Grupo 11 (PI1)	<1	nd
Grupo 12 (SP12)	3,0	1,0

nd=não detectado

5.1.3.2 Atividade antioxidante dos extratos etanólicos de própolis

A atividade antioxidante dos extratos etanólicos dos 12 grupos de própolis foi determinada de acordo com o método da oxidação acoplada do β -caroteno, conforme descrito no item 4.2.2.2. Os resultados da atividade antioxidante estão ilustrados na Figura 6. Todos os grupos de própolis apresentaram alguma atividade antioxidante. O grupo 12 foi significativamente diferente dos grupos 9 e 10, os quais mostraram as menores atividades antioxidantes, entretanto foi estatisticamente igual aos grupos 5 e 7. De fato, o grupo 5 apresentou um perfil pela CCDAE muito similar ao grupo 12 (Figura 1), apesar dos flavonóides identificados pela técnica de CLAE não serem comuns a estes dois grupos (Figuras 4 e 5 e Quadro 1). Contudo, quando se observa os dados do CG-EM (Tabela 3), verifica-se a presença de vários derivados do ácido hidrocinâmico em comum aos grupos 5 e 12. Hayashi *et al.* (1999) e Aga *et al.* (1994), demonstraram a atividade antioxidante de vários derivados do ácido cinâmico e ácido hidrocinâmico presentes em própolis. As própolis dos grupos 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 e 11 foram estatisticamente iguais, apesar de apresentarem uma composição química totalmente diferente (Figuras 1, 4 e 5 e Tabela 3). As própolis dos grupos 3 e 8 demonstraram a presença de poucos derivados do ácido cinâmico e ácido caféico e um grande teor e número de flavonóides (Tabela 3, Figuras 4 e 5 e Quadro 1). Dessa forma pode-se inferir que a atividade antioxidante destes grupos foi proporcionada principalmente pelos flavonóides presentes. De fato, um grande número de flavonóides possuem atividade antioxidante, seqüestrando radicais livres oxidantes e inibindo a ação do oxigênio “singlet” (Harborne & Willians, 2000; Pietta, 2000).



Médias seguidas de letras diferentes são significativas a nível de 5% (Teste de Tukey $p \leq 0,05$).

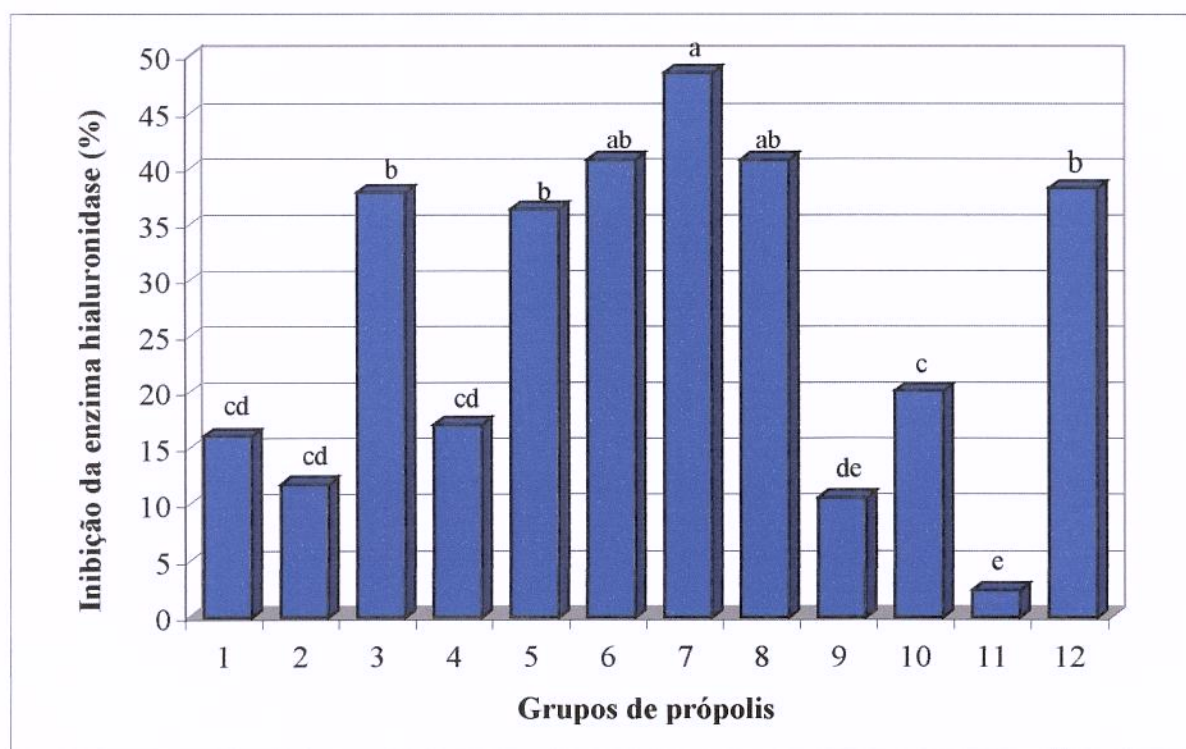
FIGURA 6: Atividade antioxidante, dos 12 grupos de própolis brasileiras, medida através da oxidação do β -caroteno.

5.1.3.3 Atividade antiinflamatória dos extratos etanólicos de própolis

A hialuronidase é uma enzima que atua despolimerizando o ácido hialurônico, um mucopolissacarídeo encontrado no tecido conjuntivo (Arkins & Sheehan, 1972), com conseqüente diminuição da sua viscosidade, provocando assim o atrito das juntas e acarretando em problemas como artrite reumatóide e artrose, ou até mesmo a formação de edemas e sensação de dor. A importância da inibição da enzima hialuronidase está relacionada com a sua ação catalítica na hidrólise do ácido hialurônico e por outras atividades fisiológicas relacionadas ao processo inflamatório. Acredita-se que a hialuronidase seja uma das principais enzimas envolvida neste processo. Portanto, a inibição da enzima hialuronidase caracteriza uma forma indireta na determinação da atividade antiinflamatória.

Como pode-se observar na Figura 7 as amostras de própolis dos grupos 6, 7 e 8 apresentaram o maior poder de inibição enzimática, sendo estatisticamente idênticos pelo teste de Tukey, a nível de 5%. As amostras dos grupos 9 e 11 apresentaram as menores

atividades antiinflamatórias, não diferindo significativamente entre si. Estes dados corroboram com os obtidos por Miyataka *et al.* (1997), onde todos os EEP de própolis brasileira analisados mostraram alguma atividade antiinflamatória. A atividade inibitória da hialuronidase pode ser explicada, em parte, pela presença de derivados do ácido cinâmico e hidrocinâmico (Kakegawa *et al.*, 1985), como no caso do grupo 12 (Tabela 3). Entretanto, a maioria dos outros grupos de própolis não apresentaram ou apresentaram poucos derivados desses ácidos. Kuppasamy *et al.* (1990) determinaram que os flavonóides com dupla ligação no carbono C_{2,3}, grupos hidroxilas nas posições 5, 7, 4' e um grupo cetona na posição 4 possuem um potente efeito sobre a enzima hialuronidase. Os flavonóides apigenina, luteolina e kanferol inibiram a atividade da hialuronidase. Em contrapartida, a presença de substituintes glicosilados impedem completamente a habilidade dos flavonóides de inibir a atividade enzimática. Isto pode explicar, em parte, a atividade inibitória apresentada pelos grupos G3, G4, G7 e G11 que possuem apigenina e/ou kanferol na sua composição química (Figuras 4 e 5 e Quadro 1).



Médias seguidas de letras diferentes são significativas a nível de 5% (Teste de Tukey $p \leq 0,05$).

FIGURA 7: Atividade antiinflamatória dos 12 grupos de própolis brasileiras, expresso em porcentagem de inibição da enzima hialuronidase.

5.1.3.4 Atividade citotóxica dos extratos etanólicos de própolis

A determinação da atividade citotóxica dos extratos etanólicos de própolis foi realizada de acordo com a metodologia descrita no item 4.2.2.4, e os resultados apresentados na Tabela 5. Entre os 12 grupos testados, apenas os grupos 1, 2, 6, 7, 8 e 10 apresentaram atividade citotóxica. Os grupos 6 e 7 foram os que apresentaram as maiores porcentagens de inibição das células cancerígenas, sendo que o grupo 7 mostrou uma inibição superior a 90% em todas as linhagens de células testadas (Tabela 5). Estes dois grupos de própolis possuem uma composição química totalmente diferente (Figuras 4 e 5 e Tabela 3), evidenciando assim que os compostos responsáveis pela citotoxicidade são de natureza química distinta.

TABELA 5: Atividade citotóxica dos extratos etanólicos de própolis contra células cancerosas humanas.

Grupos de própolis	Porcentagem de inibição utilizando 20µg/mL de própolis			
	Células cancerígenas			
	Carcinoma nasofaríngeal (KB)	Adenocarcinoma ileocecal (HCT-8)	Carcinoma renal (CAKI-1)	Adenocarcinoma de mama (MCF-7)
1 (RS5)	68	19	15	NT
1 (BG1)	50	48	09	37
1 (PL1)	53	45	12	31
1 (PL3)	50	47	13	33
1 (BG3)	14	39	08	18
2 (RS38)	75	32	16	NT
2 (RS42)	34	09	NA	NT
6 (BA12)	88	79	72	77
6 (BA11)	85	77	74	80
7 (BA8)	97	95	94	96
8 (PE5)	43	31	12	43
10 (CE3)	37	22	12	31
Etoposideo VP-16	90	46	25	41

NA: sem atividade

NT: não testado

Etoposideo VP-16: Droga antitumor atividade a 2µg/mL.

Matsuno *et al.* (1998) isolaram do extrato metanólico de uma mistura de própolis de diversas regiões do Brasil um novo derivado benzo-γ-pirano, com fórmula molecular C₁₉H₂₂O₃. Este composto apresentou citotoxicidade retardando o crescimento de células HuH13 (carcinoma hepatocelular humano), HeLa e KB (carcinoma epidermóide oral

humano) e HLC-2 (carcinoma pulmonar humano). Um outro composto conhecido como CAPE (fenetil éster do ácido caféico) foi isolado e caracterizado, sendo este parcialmente responsável pela atividade citotóxica da própolis. O CAPE apresentou uma inibição de 80%, numa concentração de 20 $\mu\text{L/mL}$, em células tumorais transformadas de humanos e ratos (Grunberger *et al.*, 1998). De acordo com os estudos feitos até o momento, os constituintes que mostraram forte atividade anticâncer de própolis do Brasil foram os derivados do ácido caféico, flavonóides, 2,2-dimetil-8-prenil-cromeno-6-ácido propenóico (Marcucci, 1995), artepilin C (Matsushige *et al.*, 1996) e 17-hidroxiclerodano-3, (13Z)-dien-15-ácido óico (Matsuno *et al.*, 1997). Ainda que os diterpenos clerodano tenham sido relatados por possuírem forte atividade citotóxica contra o carcinoma hepatocelular humano HuH13, carcinoma pulmonar HLC-2, HeLA, KB e células de rato W3Y (Matsuno, 1995), vários diterpenóides labdano mostraram fraca atividade citotóxica contra as linhagens de células humanas HT-1080 e células do cólon L5 (Banskota *et al.*, 1998). Estes resultados indicam que a atividade anticâncer das própolis brasileiras é devida, primariamente, aos compostos fenólicos, os quais são responsáveis por outras atividades biológicas.

5.2 Material vegetal

5.2.1 Estudo fitoquímico da origem vegetal das própolis do grupo 3 (G3), grupo 6 (G6) e grupo 12 (G12) por meio de técnicas espectrofotométricas e cromatográficas

Em virtude do grande número de grupos de própolis presentes nas regiões brasileiras, não foi possível realizar um estudo fitoquímico da origem botânica de todos os grupos. Desta forma, foram selecionados três grupos de própolis para a identificação da origem vegetal. O primeiro grupo selecionado para o estudo foi o grupo 3 (Figuras 1 e 4), em virtude deste apresentar um perfil cromatográfico característico de países de clima temperado, como os da Europa. Entretanto é também encontrado na região sul do Brasil. Além disso este perfil de própolis mostrou bons resultados “in vivo” contra o microrganismo *S. mutans*, causador da cárie dental, assim como inibição da enzima glicosiltransferase (Koo *et al.*, 1999). O segundo grupo de própolis selecionado para o estudo foi o grupo 6, principalmente devido as propriedades biológicas e pelo fato deste grupo nunca ter sido relatado antes no Brasil (Figuras 1 e 4). As própolis do grupo 6 apresentaram maior atividade antibiótica, tanto para o microrganismo *S. aureus* quanto para o *S. mutans*. As própolis do grupo 6 também mostraram forte atividade citotóxica (Tabela 5). O grupo 12 foi o terceiro grupo de própolis incluído para a identificação da origem vegetal, pelo motivo deste ser o tipo de própolis de maior valor econômico para o mercado externo, principalmente o mercado japonês.

5.2.1.1 Evidências fitoquímicas da origem vegetal das própolis do Grupo 3

A primeira etapa na identificação da origem vegetal dos 3 grupos de própolis selecionados foi a observação visual de campo. Para isso foi necessário retornar a cada localidade e observar diretamente no campo a fonte de coleta de própolis pelas abelhas. Desta maneira foi possível fazer uma coleta das prováveis fontes vegetais com um bom grau de confiabilidade para as análises fitoquímicas de laboratório. As amostras das própolis do grupo 3 foram coletadas na cidade de Santa Cruz – SC, assim como o material vegetal fonte destas própolis.

A primeira análise para a identificação da origem vegetal foi a comparação do espectro de absorção na região UV-visível. Os EEP deste grupo apresentaram um máximo de absorção em 290 nm (Figuras 2 e 8), o qual também foi encontrado no extrato metanólico vegetal (Figura 8). O material vegetal coletado nesta região, em função das observações visuais, foi a resina dos botões vegetais de uma planta chamada de álamo e identificada pelo Instituto de Biologia da Unicamp, como *Populus alba*. Esta planta historicamente não é nativa do Brasil, e foi trazida para a região Sul do Brasil por imigrantes alemães com fins ornamentais. Hoje esta espécie vegetal é cultivada em grande escala para a produção de palitos de dentes. A Figura 9 ilustra uma plantação de álamo na cidade de Santa Cruz, no estado de Santa Catarina.

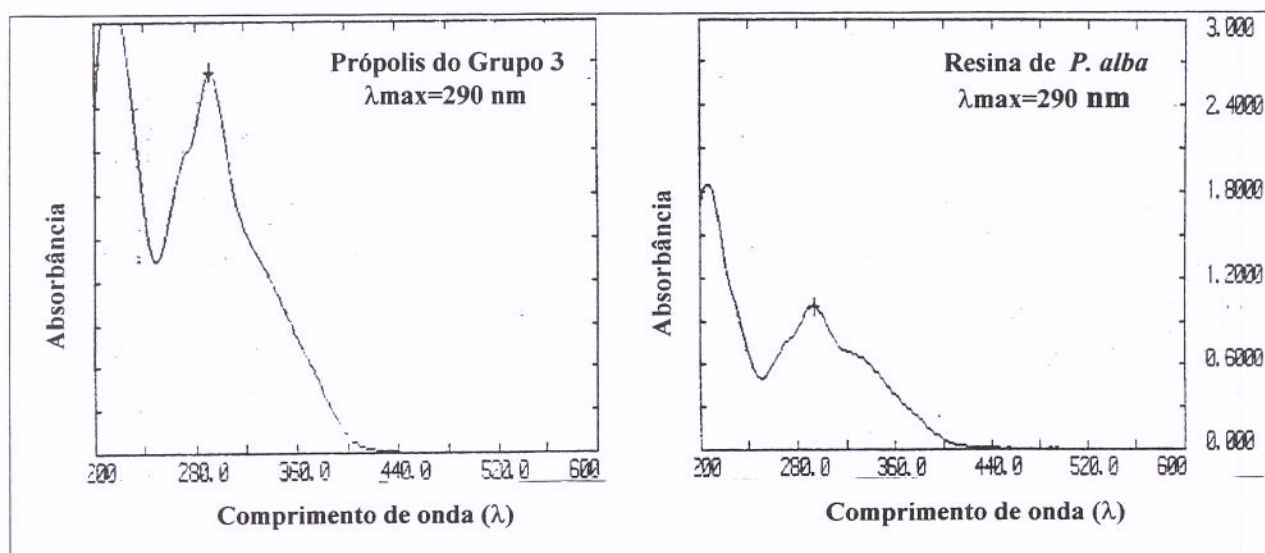


FIGURA 8: Espectro de absorção na região UV-visível do extrato etanólico de própolis (G3) e metanólico da resina de álamo (*Populus alba*).



FIGURA 9: Reflorestamento de álamo (*P. alba*) na cidade de Santa Cruz – SC.

As análises por cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) também confirmaram uma alta similaridade entre perfil químico da própolis e o da resina de álamo (Figuras 10 e 11). Pela técnica de CLAE pode-se confirmar a existência de pelo menos 25 compostos idênticos. De fato, os flavonóides crisina e galangina e o éster do ácido dimetil dialil caféico, encontrados em todas as amostras de própolis do grupo 3, são característicos de própolis oriundas de árvores da espécie *Populus* sp. (Bankova *et al.*, 1987; Wollenweber *et al.*, 1987). A técnica de CG-EM confirmou o mesmo padrão de composição química entre a própolis e a resina de álamo (*Populus alba*) e a existência do composto alergênico éster do ácido dimetil dialil caféico (Figura 12). O éster do ácido dimetil dialil caféico foi relatado pela primeira vez como um produto natural presente em resinas de *Populus* sp e amostras de própolis da Europa Central (Wollenweber *et al.*, 1987). Bankova *et al.* (1992), utilizando a técnica de CG-EM, encontraram 31 compostos nas própolis da Bulgária, dos quais 26 estavam presentes na resina de *Populus nigra*. Neste mesmo trabalho, os autores analisaram a resina

de *Populus italica*, e dos 24 compostos identificados 21 estavam presentes nas amostras de própolis. As diferenças observadas na composição das própolis da Bulgária foram atribuídas a participação de diferentes espécie de *Populus* sp. Entretanto em amostras de própolis da Mongólia, Bankova *et al.* (1992) verificaram que todos os compostos fenólicos identificados na própolis também estavam presentes, em concentrações similares, na resina de *Populus suaveolens*. Com base nos trabalhos de Ghisalbert (1979), Wollenweber *et al.* (1987) e Bankova *et al.* (1992) fica evidente que em várias regiões ecológicas diferentes as espécies vegetais do gênero *Populus* sp. são uma das mais importantes fontes para obtenção de própolis, e de grande importância ecológica para as abelhas.

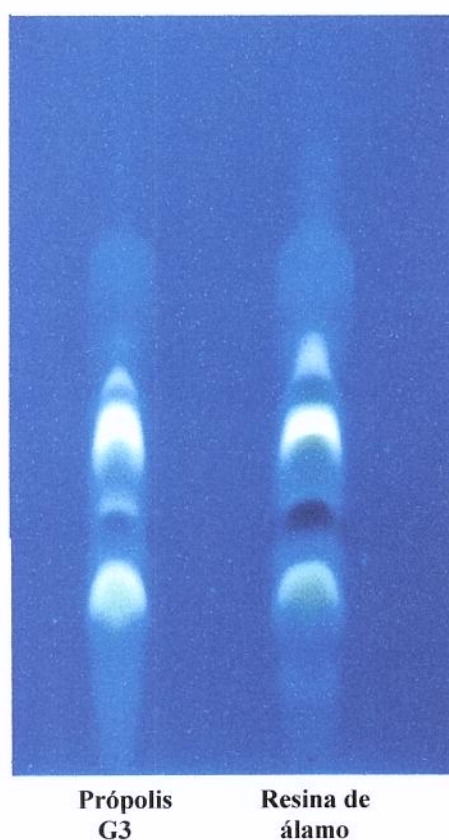


FIGURA 10: Cromatograma obtido por CCDAE, irradiado a 366 nm, do extrato etanólico da própolis do grupo 3 e do extrato metanólico da resina de álamo (*Populus alba*).

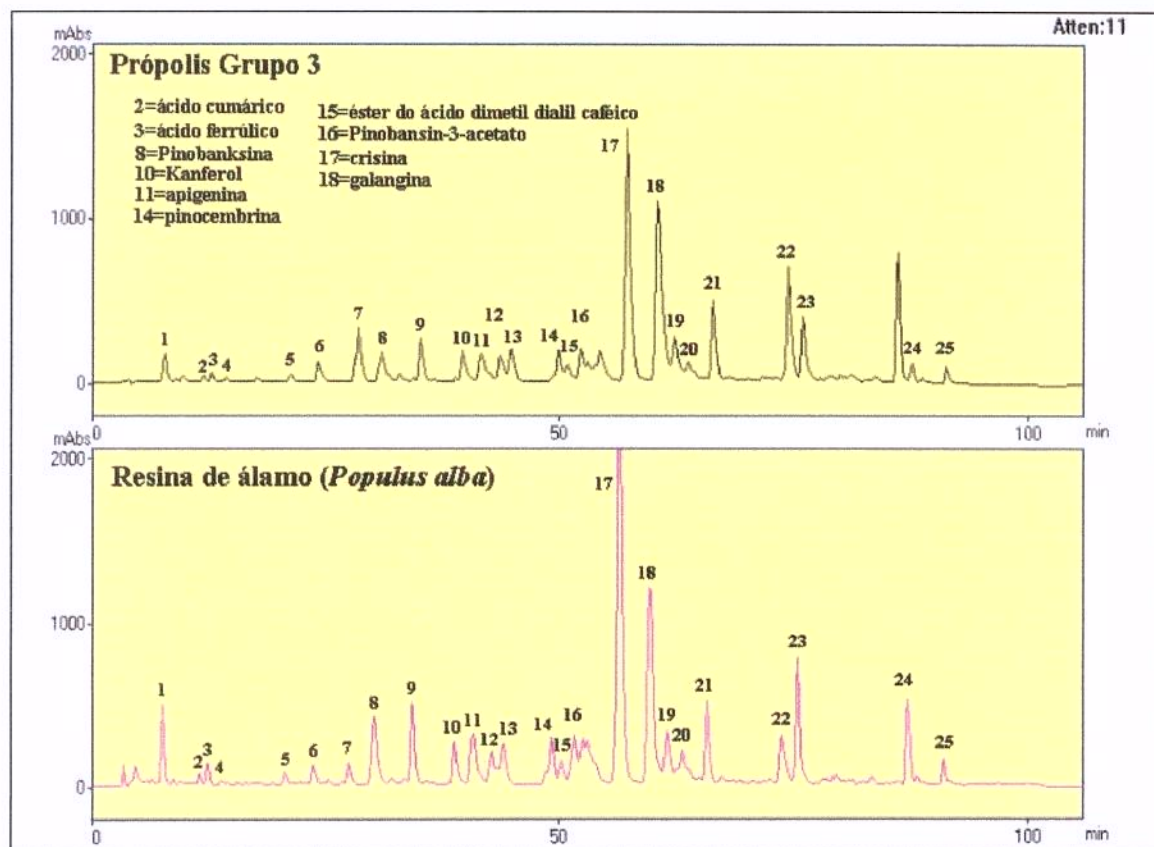


FIGURA 11: Cromatograma obtido por CLAE do extrato etanólico da própolis do grupo 3 e do extrato metanólico da resina de álamo (*P. alba*). (Volume de amostra injetada: 20µL; detector utilizado: arranjo de fotodiodos a 254 nm; coluna: fase reversa YMC PACK ODS (250 x 4,6 mm) com tamanho de partícula de 5 µm; fase móvel utilizada: água/ácido acético (19:1, v/v) (solvente A) e metanol (solvente B) em sistema de gradiente, iniciando com 30% do solvente B até 40% de B em 15 minutos, 50% de B em 30 minutos, 60% de B em 45 minutos, 75% de B em 65 minutos, 75% de B em 85 minutos, 90% de B em 95 minutos e 30% de B em 105 minutos; vazão: 1 mL/min; temperatura da coluna: 35°C).

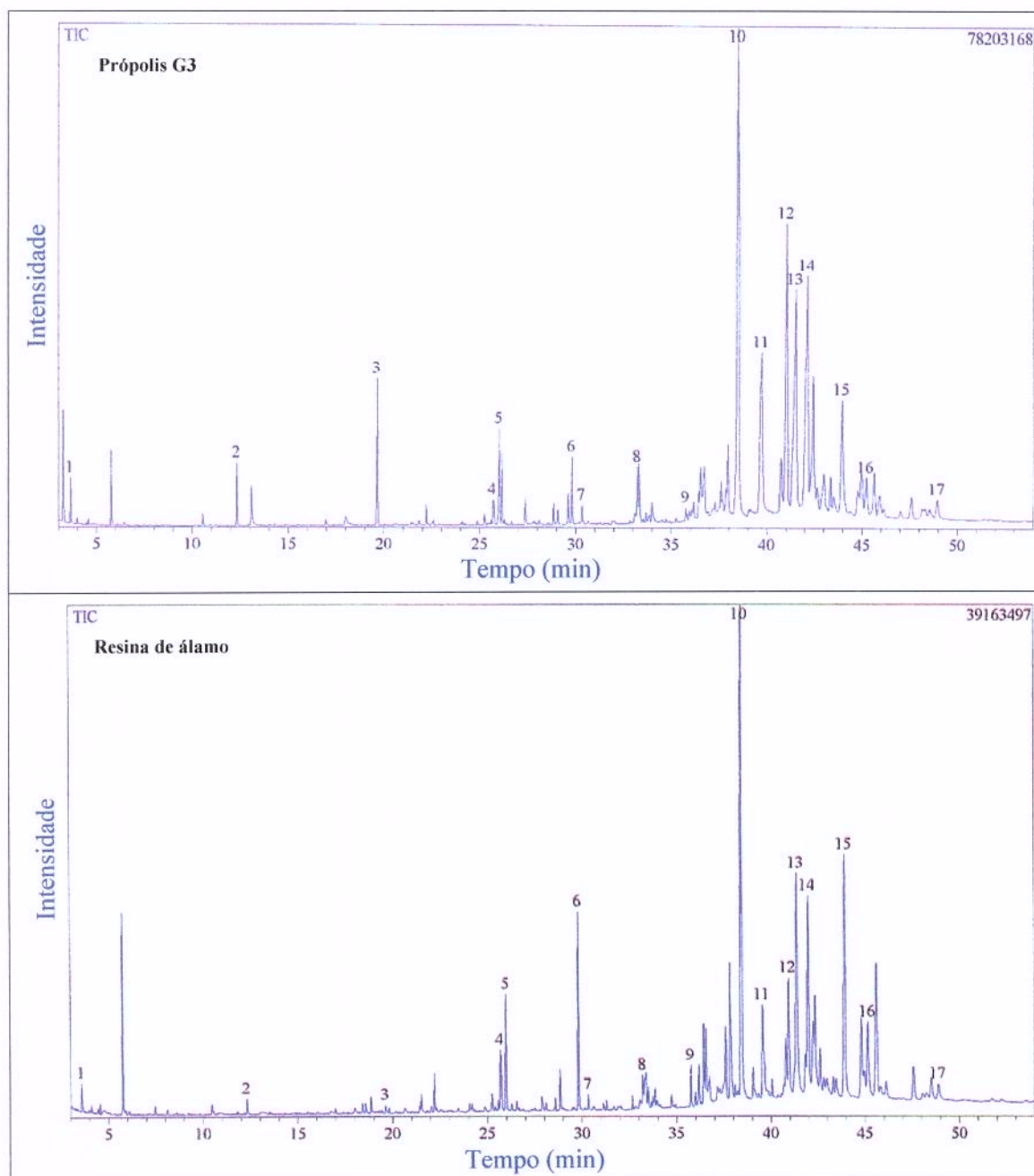


FIGURA 12: Cromatograma obtido por CG-EM da própolis do grupo 3 e da resina de álamo (*P. alba*). Volume de amostra metilada injetada: 0,6 μ L; tipo de injeção: “splitless”; coluna utilizada: coluna capilar CBP5 30 m x 0,25 mm; modo de operação do detector de massa: “scanning” (m/z 40-400); programação de temperatura do forno: 50°C (0,3 min) a 285°C (15 min), com um incremento de 6°C/min.

Dados do MS para os compostos identificados

1- éster metílico do ácido láctico: 104 (M^+), 61 (3), 46 (2); 45 (100), 43 (10); *2*- éster metílico do ácido benzóico: 136 (32, M^+), 106 (8), 105 (100), 77 (66), 51 (36), 50 (18); *3*- éster metílico do ácido cinâmico: 162 (46, M^+), 132 (12), 131 (100), 103 (63), 102 (17), 77 (45), 51 (39); *4*- eudesmol: 222 (3, M^+), 204 (16), 189 (15), 164 (19), 149 (34), 109 (20), 108 (15), 95 (15), 81 (18), 59 (100), 43 (19), 41 (22); *5*- 1,4-metanonaftaleno-9-ol, 1,4-dihidro: 158 (18, M^+), 141 (8), 130 (13), 129 (100), 128 (44), 127 (23), 115 (8), 77 (8), 51 (11), 50 (6); *6*- ácido ferrúlico: 222 (100, M^+), 207 (17), 191 (54), 147 (17), 119 (12), 77 (16), 51 (24); *7*- éster metílico do ácido eicosanóico: 326 (1, M^+), 143 (14), 87 (56), 45 (27), 74 (100), 69 (19), 57 (30), 55 (33), 43 (64); *8*- éster metílico do ácido 9,12-octadecadienóico (E, E): 294 (M^+), 136 (7), 135 (7), 123 (9), 109 (21), 96 (29), 95 (45), 94 (8), 83 (15), 82 (45), 81 (67), 80 (20), 79 (33), 77 (10), 69 (35), 68 (40), 67 (100), 66 (9), 59 (14), 55 (72), 54 (38), 43 (32); *9*- éster do ácido dimetil dialil caféico: 276 (35, M^+), 209 (13), 208 (100), 193 (30), 191 (28), 164 (14), 151 (11), 77 (15), 69 (29), 68 (26), 67 (42), 53 (40), 51 (18), 44 (17), 41 (92); *10*- pinostrobina chalcona: 270 (93, M^+), 269 (48), 194 (11), 193 (100), 167 (26), 166 (78), 138 (49), 103 (19), 95 (34), 51 (19); *11*- pinocembrina: 284 (M^+), 256 (93), 255 (63), 179 (96), 153 (28), 152 (100), 124 (63), 104 (24), 103 (23), 96 (25), 78 (30), 77 (29), 69 (44), 51 (28), 44 (14); *12*- pinobansina 3-acetato 7-metil éter (pinobansina 3-acetato): 328 (36, M^+), 268 (73), 167 (100), 166 (46), 120 (51), 91 (35), 43 (54); *13*- crisina: 268 (100, M^+), 267 (15), 239 (40), 225 (14), 138 (12), 120 (12), 95 (18), 69 (22), 51 (16), 44 (32); *14*- galangina: 298 (77, M^+), 297 (100), 279 (14), 267 (16), 171 (13), 135 (16), 105 (23), 77 (33), 69 (14), 51 (17), 44 (16); *15*- pinobansina 3-acetato (5,7-dimetil éter): 342 (3, M^+), 282 (10), 181 (64), 180 (100), 152 (18), 137 (13), 120 (21), 91 (22), 43 (38); *16*- apigenina: 312 (100, M^+), 311 (62), 295 (8), 283 (32), 282 (12), 267 (11), 266 (40), 239 (14), 171 (9), 142 (18), 89 (10); *17*- kanferol: 328 (100, M^+), 327 (98), 310 (15), 309 (19), 299 (14), 297 (14), 285 (48), 207 (16), 150 (30), 135 (26), 77 (18), 44 (64), 40 (16).

5.2.1.2 Evidências fitoquímicas da origem das própolis do Grupo 6

As própolis do grupo 6 foram coletadas na cidade de Entre Rios - BA, assim como o material vegetal fonte desse perfil própolis. A primeira análise na identificação da origem vegetal deste grupo, após a observação visual da coleta de própolis pelas abelhas, foi a varredura do espectro na região UV-visível. De acordo com a Figura 13, tanto a própolis quanto o vegetal apresentaram máximos de absorção semelhantes de 284 e 288 nm, respectivamente.

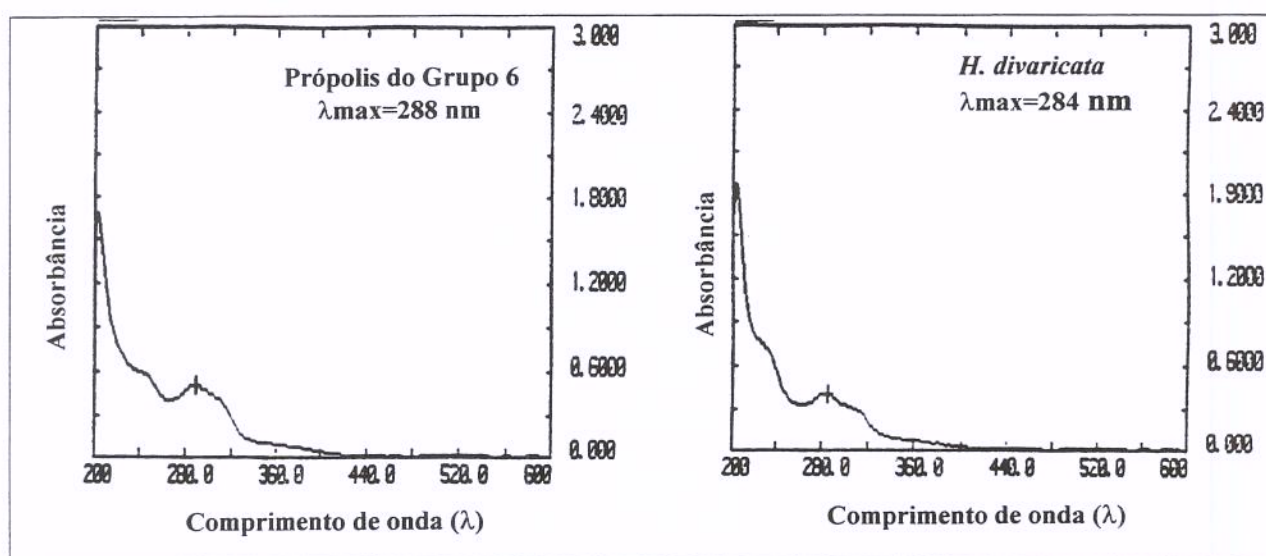


FIGURA 13: Espectro de absorção na região UV-visível do extrato etanólico da própolis (G6) e metanólico do alecrim da Bahia (*Hyptis divaricata*).

O material vegetal coletado na região de Entre Rios (BA) foram os botões apicais de uma planta nativa conhecida como alecrim da Bahia. Esta planta foi identificada, pelo Instituto de Biologia da Unicamp como *Hyptis divaricata*. A Figura 14, ilustra o aspecto desse arbusto na região de coleta. Este vegetal apresenta como característica um aroma forte semelhante à própolis, e flores azuis.



FIGURA 14: Vegetação de *Hyptis divaricata* em seu *habitat* natural na região de mata atlântica da Bahia.

As análises por CCDAE e CLAE confirmaram um perfil químico muito semelhante entre a própolis do grupo 6 e a espécie vegetal *H. divaricata* (Figuras 15 e 16), sendo identificados pelo tempo de retenção e varredura do espectro de absorção 3 compostos em comum (Figura 16). Entretanto, e diferentemente das própolis do grupo 3, este tipo de própolis não mostrou a presença de nenhum flavonóide, visto que todos padrões típicos eluem, nas condições usadas na CLAE, antes de 80 minutos. Esse perfil cromatográfico, em relação aos outros grupos, indica uma grande presença de compostos apolares. Tomás-Barberán *et al.* (1993) encontraram em amostras de própolis da Venezuela benzofenonas poliisopreniladas. As própolis da Venezuela apresentaram um perfil cromatográfico, pela técnica de CLAE, muito semelhante às das própolis do grupo 6. Neste estudo os autores demonstraram, segundo as evidências fitoquímicas, que a própolis da Venezuela tem sua origem vegetal nas espécies vegetais *Clusia minor* e *Clusia major*. Rubio *et al.* (1999) também encontraram resultados semelhantes em amostras de própolis de Cuba, da qual foi

isolada uma nova benzofenona isoprenilada com forte atividade antimicrobiana e antifúngica. Entretanto vários estudos demonstraram a existência, na espécie vegetal *Hyptis* sp, de diterpenóides (Frangoso-serrano *et al.*, 1999), diterpenóides tricíclicos (Urones *et al.*, 1998), triterpenóides (Rao *et al.*, 1990) e triterpenóides pentacíclicos (Peredamiranda & Gasconfiguero, 1988), que são compostos com atividade biológica e de natureza apolar em relação aos flavonóides e ácidos fenólicos.

Pela técnica de CG-EM foi possível a identificação, tanto na própolis quanto no *H. divaricata*, do terpenóide β -cariofileno (Figura 17) o qual possui atividade antimicrobiana (Cobos *et al.*, 2001). Os compostos 12, 13, 14 e 15 não foram identificados pela biblioteca do EM (Figura 17), entretanto foram que apresentaram fragmentos m/z 105, o que indica uma possível natureza benzofenona, e fragmentos m/z 77, 69, 59 e 55 indicando uma característica prenilada, segundo Monache *et al.* (1991), Tomás-Barberan *et al.* (1993), Markham *et al.* (1996) e Rubio *et al.* (1999).



FIGURA 15: Cromatograma obtido por CCDAE, irradiado a 366 nm, do extrato etanólico da própolis do grupo 6 e extrato metanólico dos botões apicais do alecrim da Bahia (*Hyptis divaricata*).

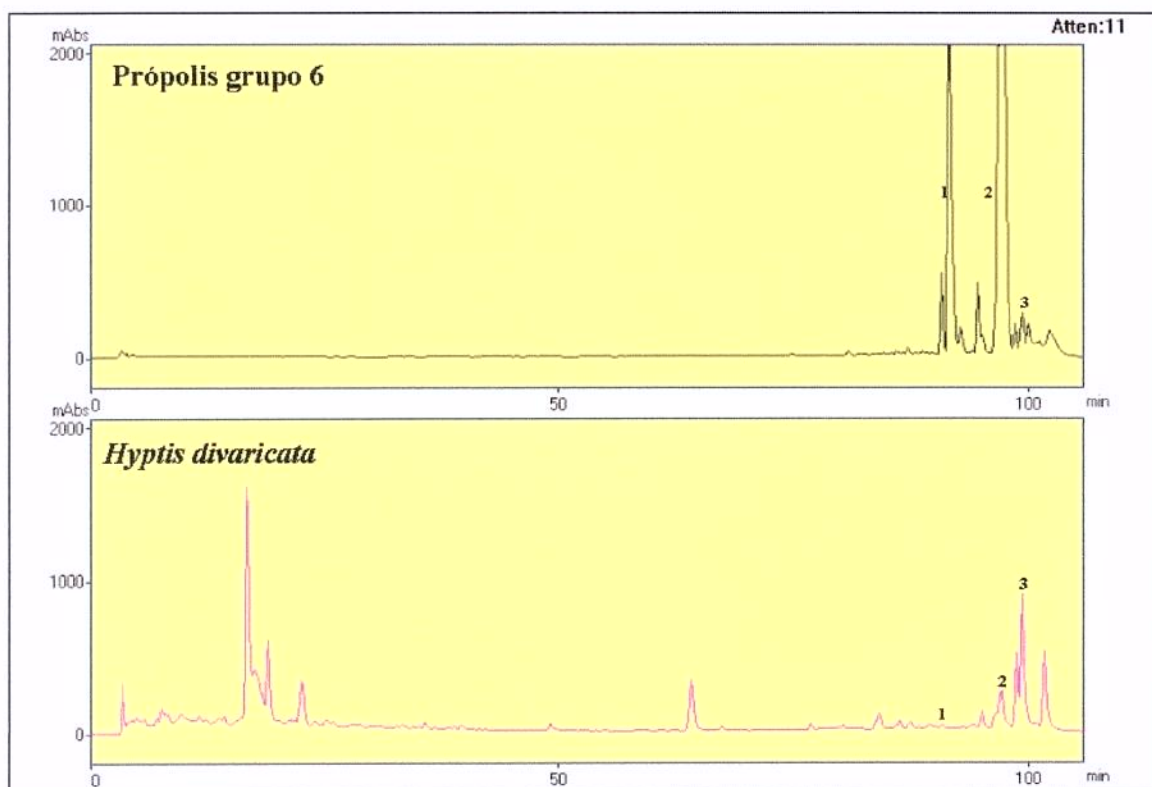


FIGURA 16: Cromatograma obtido por CLAE do extrato etanólico da própolis do grupo 6 e do extrato metanólico dos botões apicais do alecrim da Bahia (*Hyptis divaricata*) (Volume de amostra injetada: 20 μ L; detector utilizado: arranjo de fotodiodos a 254 nm; coluna: fase reversa YMC PACK ODS (250 x 4,6 mm) com tamanho de partícula de 5 μ m; fase móvel utilizada: água/ácido acético (19:1, v/v) (solvente A) e metanol (solvente B) em sistema de gradiente, iniciando com 30% do solvente B até 40% de B em 15 minutos, 50% de B em 30 minutos, 60% de B em 45 minutos, 75% de B em 65 minutos, 75% de B em 85 minutos, 90% de B em 95 minutos e 30% de B em 105 minutos; vazão: 1 mL/min; temperatura da coluna: 35°C).

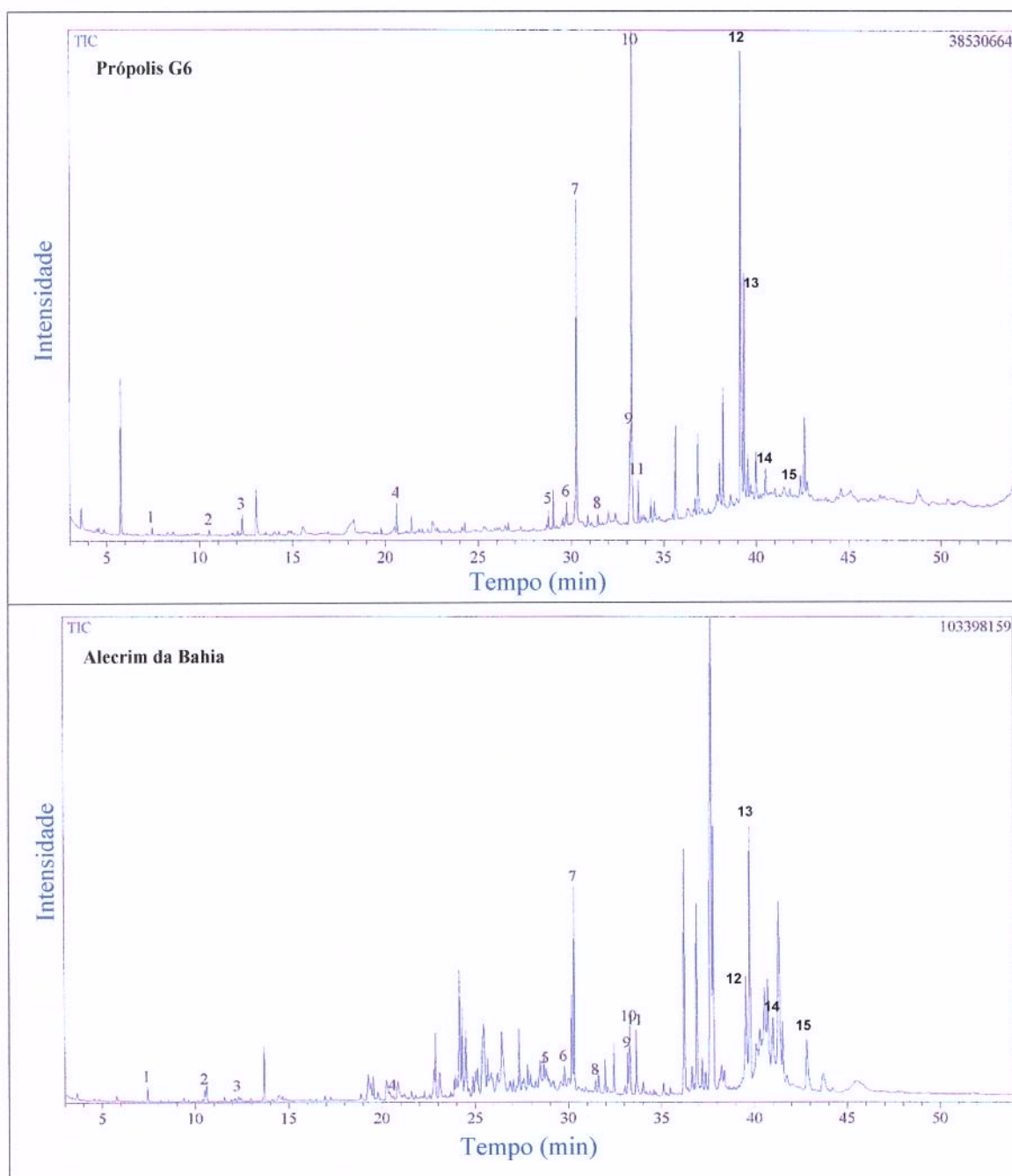


FIGURA 17: Cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas da própolis do grupo 6 e alecrim da Bahia (*H. divaricata*). Volume de amostra metilada injetada: 0,6 μ L; tipo de injeção: “splitless”; coluna utilizada: coluna capilar CBP5 30 m x 0,25 mm; modo de operação do detector de massa: “scanning” (m/z 40-400); programação de temperatura do forno: 50°C (0,3 min) a 285°C (15 min), com um incremento de 6°C/min.

Dados do MS para os compostos identificados

1- etil éster do ácido etoxiacético: 132 (M^+), 88 (36), 70 (9), 61 (18), 60 (21), 59 (100), 45 (14), 42 (16); 2-éster dimetílico do ácido butanedióico: 146 (M^+), 115 (71), 114 (20), 87

(18), 59 (73), 55 (100), 45 (14); **3-** Éster metílico do ácido benzóico 136 (32, M^+), 106 (8), 105 (100), 77 (66), 51 (36), 50 (18); **4-** beta-cariofileno: 204 (7, M^+), 161 (18), 147 (15), 133 (39), 121 (20), 120 (20), 119 (20), 107 (26), 105 (25), 95 (15), 94 (14), 93 (68), 92 (15), 91 (36), 81 (30), 80 (15), 79 (39), 77 (25), 69 (65), 67 (24), 55 (36), 53 (26), 43 (18), 41 (100); **5:** Esterealdeído: 268 (M^+), 250 (4), 111 (11), 110 (13), 109 (13), 97 (27), 96 (40), 95 (27), 85 (18), 83 (40), 82 (63), 81 (31), 71 (33), 69 (43), 68 (39), 67 (33), 57 (80), 55 (74), 44 (26), 43 (100); **6-** ácido ferrúlico: 222 (100, M^+), 207 (17), 191 (54), 147 (17), 119 (12), 77 (16), 51 (24); **7-** éster metílico do ácido palmítico: 270 (8, M^+), 143 (10), 87 (58), 75 (18), 74 (100), 69 (13), 57 (16), 55 (25), 43 (37), 41 (30); **8-** Éster etílico do ácido nonadecanóico: 326 (M^+), 157 (9), 101 (52), 89 (18), 88 (100), 83 (14), 73 (20), 70 (21), 71 (15), 70 (21), 69 (24), 57 (40), 55 (44), 43 (82), 41 (60); **9-** Éster metílico do ácido 9,12-Octadecadienóico (E, E): 294 (M^+), 136 (7), 135 (7), 123 (9), 109 (21), 96 (29), 95 (45), 94 (8), 83 (15), 82 (45), 81 (67), 80 (20), 79 (33), 77 (10), 69 (35), 68 (40), 67 (100), 66 (9), 59 (14), 55 (72), 54 (38), 43 (32); **10-** éster metílico do ácido 10-octadecenóico: 296 (M^+), 265 (11), 264 (20), 123 (11), 111 (16), 110 (16), 98 (25), 97 (34), 96 (29), 95 (19), 87 (37), 82 (17), 81 (25), 74 (55), 70 (17), 69 (60), 98 (19), 67 (30), 57 (25), 56 (24), 55 (100), 43 (59), 41 (72); **11-** éster metílico do ácido octadecanóico: 298 (11, M^+), 143 (11), 87 (65), 75 (21), 74 (100), 69 (17), 57 (23), 41 (46).

5.2.1.3 –Evidências fitoquímicas da origem das própolis do Grupo 12.

O material vegetal (brotos apicais de alecrim do campo) foi coletado nas cidades de Mogi Mirim e Campinas, no Estado de São Paulo. Os resultados preliminares obtidos pela varredura do espectro na região UV-visível (do extrato etanólico de própolis e extrato metanólico vegetal) mostraram evidências para uma mesma composição de compostos fenólicos. Como pode ser visto na Figura 18, tanto a própolis quanto o extrato vegetal apresentaram valores máximos de absorção semelhantes de 300 e 299 nm, respectivamente. Este arbusto foi identificado pelo Instituto de Biologia da Unicamp, como *Baccharis dracunculifolia*. Esta espécie vegetal é considerada como uma planta daninha e é dominante em áreas de mata secundária. A Figura 19 ilustra a coleta de material resinoso para a elaboração de própolis por uma abelha da espécie *Apis mellifera*.

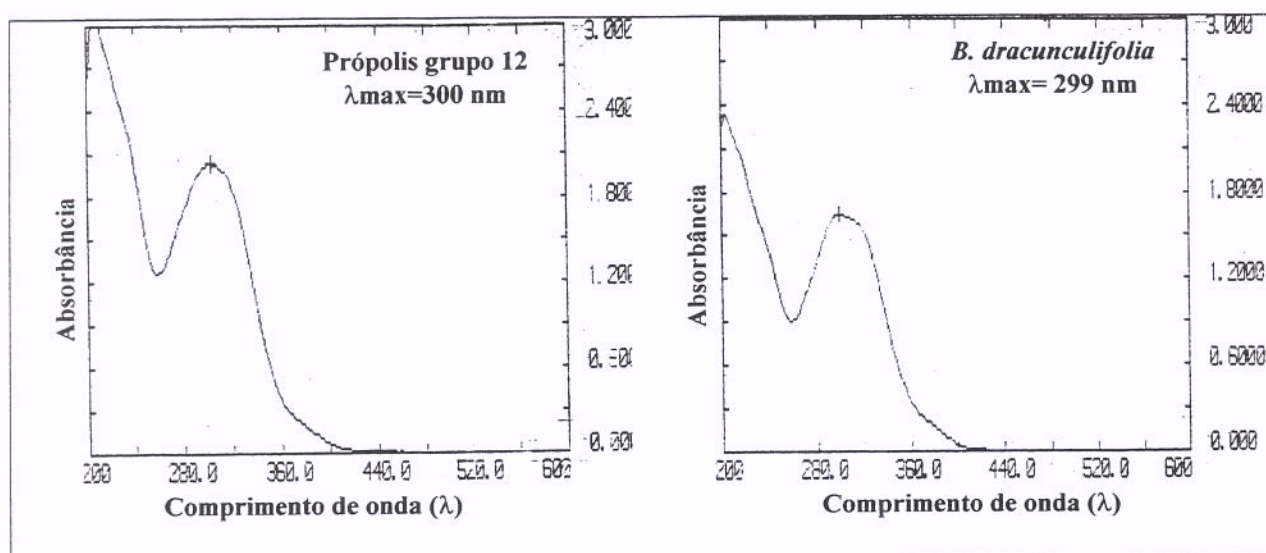


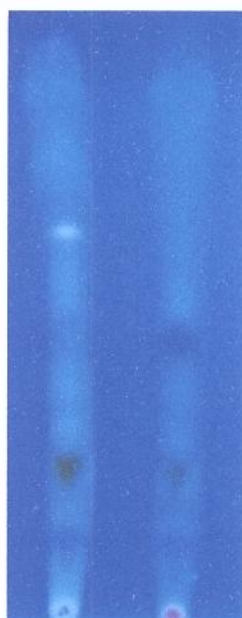
FIGURA 18: Espectro de absorção na região UV-visível do extrato etanólico da própolis (G12) e metanólico de alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*).



FIGURA 19: Abelha coletando material resinoso do alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*) para elaboração da própolis.

A cromatografia em camada delgada de alta eficiência quando irradiado a 366 nm mostrou um perfil muito semelhante entre a própolis e o extrato vegetal do *B. dracunculifolia* (Figura 20). Da mesma forma, os resultados obtidos pela CLAE também mostraram um perfil químico similar entre o EEP e o EMV de *B. dracunculifolia*, sendo confirmados 18 compostos químicos idênticos pelo tempo de retenção e varredura do espectro (Figura 21). Os compostos 16 e 17 foram majoritários tanto na própolis quanto no extrato metanólico vegetal, contudo não puderam ser identificados com os padrões utilizados (Figura 21). Os trabalhos realizados por Greenaway *et al.* (1987) e Bankova *et al.* (1995) mostraram algumas evidências fitoquímicas da própolis do Estado de São Paulo, entretanto os resultados não foram conclusivos quanto a sua origem vegetal. Nos extratos analisados, EEP de própolis e metanólico de *B. dracunculifolia*, o kanferide foi o flavonóide majoritário. Entretanto ainda são necessários estudos para verificar se este composto fenólico pode ser utilizado como um marcador químico deste perfil de própolis,

em virtude da sua fácil identificação por CLAE (Figura 21). Segundo Wollenweber *et al.* (1987) e Tomás-Barberán *et al.* (1993) as própolis de clima temperado podem ser caracterizadas por apresentarem como principais componentes fenólicos os flavonóides pinobanksina-3-acetato, pinocembrina, crisina, galangina e tectocrisina.



Própolis G12 Alecrim do campo

FIGURA 20: Cromatograma obtido por CCDAE, irradiado a 366 nm, do extrato etanólico da própolis do grupo 12 e do extrato metanólico dos botões apicais do alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*).

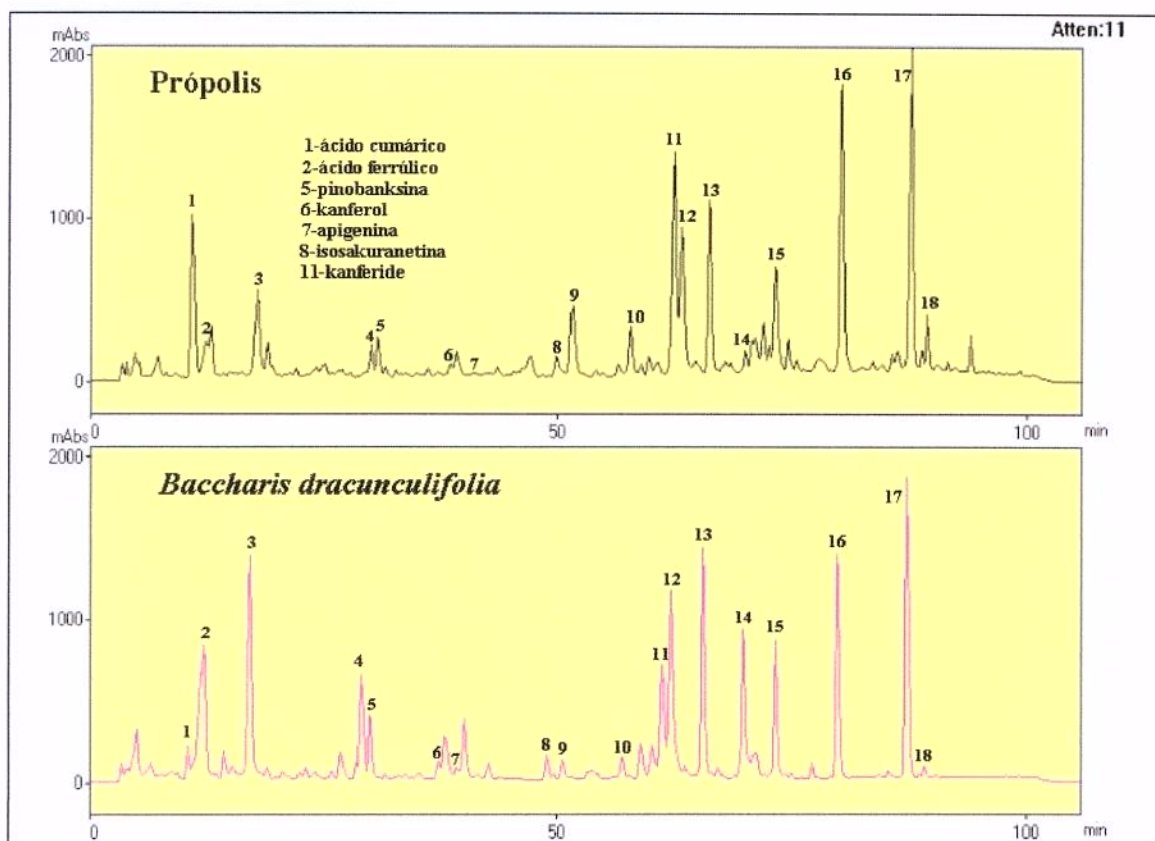


FIGURA 21: Cromatograma obtido por CLAE do extrato etanólico da própolis do grupo 12 e extrato metanólico dos botões apicais do alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*). (Volume de amostra injetada: 20µL; detector utilizado: arranjo de fotodiodos a 254 nm; coluna: fase reversa YMC PACK ODS (250 x 4,6 mm) com tamanho de partícula de 5 µm; fase móvel utilizada: água/ácido acético (19:1, v/v) (solvente A) e metanol (solvente B) em sistema de gradiente, iniciando com 30% do solvente B até 40% de B em 15 minutos, 50% de B em 30 minutos, 60% de B em 45 minutos, 75% de B em 65 minutos, 75% de B em 85 minutos, 90% de B em 95 minutos e 30% de B em 105 minutos; vazão: 1 mL/min; temperatura da coluna: 35°C).

A Figura 22, ilustra os cromatogramas obtidos por meio da técnica de CG-EM. Pelos dados obtidos observa-se pelo menos 18 compostos idênticos entre a própolis e a sua provável fonte vegetal. Mediante o uso desta técnica foi possível a identificação, tanto na própolis quanto no *B. dracunculifolia*, do composto farnesol, o qual possui atividade citotóxica (Voziyan, *et al.*, 1995) e induzem apoptose celular (Rioja, *et al.*, 2000; Wright *et al.*, 2001). As própolis do grupo 12 e o alecrim do campo mostraram a existência de vários derivados do ácido hidrocinâmico, principalmente nas formas metil e etil ésters (Figura 22). Bankova *et al.* (1995), também relataram a existência de derivados do ácido cinâmico e hidrocinâmico em amostras de própolis do Estado de São Paulo. De acordo com os resultados obtidos pelo CG-EM pode-se dizer que o perfil das própolis do Sudeste do Brasil

é quimicamente semelhante ao extrato de *B. dracunculifolia*, tendo possivelmente a sua origem nesta espécie vegetal.

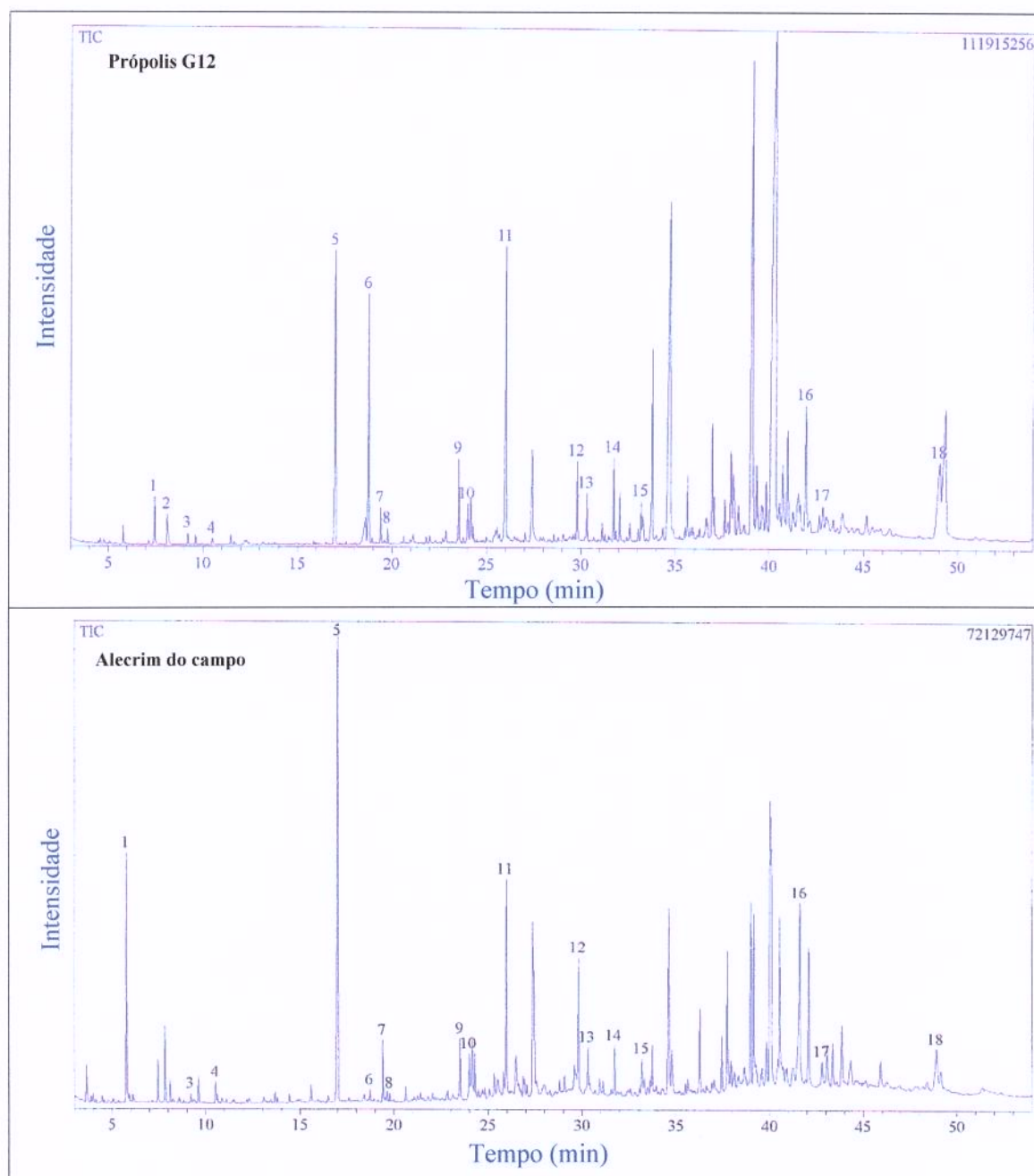


FIGURA 22: Cromatograma obtido por CG-EM da própolis do grupo 12 e alecrim do campo (*B. dracunculifolia*). Volume de amostra metilada injetada: 0,6 μ L; tipo de injeção: “splitless”; coluna utilizada: coluna capilar CBP5 30 m x 0,25 mm; modo de operação do detector de massa: “scanning” (m/z 40-400); programação de temperatura do forno: 50°C (0,3 min) a 285°C (15 min), com um incremento de 6°C/min.

Dados do MS para os compostos identificados

1- etil éster do ácido etoxiacético: 132 (M^+), 88 (36), 70 (9), 61 (18), 60 (21), 59 (100), 45 (14), 42 (16); *2*- alfa-pineno: 136 (6, M^+), 121 (12), 93 (100), 92 (35), 91 (27), 80 (12), 79 (23), 77 (30), 55 (12), 43 (19), 41 (33); *3*-beta pineno 136 (9, M^+), 121 (12), 94 (13), 93 (100), 91 (20), 79 (24), 77 (22), 69 (42), 67 (12), 53 (16), 41 (56); *4*-éster dimetílico do ácido butanedióico: 146 (M^+), 115 (71), 114 (20), 87 (18), 59 (73), 55 (100), 45 (14); *5*- éster metílico do ácido hidroxicinâmico: 164 (34, M^+), 133 (12), 105 (36), 104 (100), 91 (63), 79 (26), 78 (14), 52 (14), 51 (18); *6*- éster etílico do ácido hidroxicinâmico: 178 (31, M^+), 133 (11), 107 (44), 105 (44), 104 (100), 103 (15), 91 (58), 79 (22), 78 (18), 77 (26), 65 (12), 51 (12); *7*- Éster metílico do ácido benzóico, 4-metoxi: 166 (31), 135 (100), 107 (13), 92 (20), 77 (27), 64 (15); *8*- n-tetradecano: 198 (2, M^+), 85 (30), 71 (48), 57 (90), 56 (14), 55 (23), 43 (100), 41 (59); *9*- farnesol: 222 (M^+), 107 (19), 93 (38), 81 (20), 79 (16), 69 (84), 67 (24), 55 (34), 53 (15), 43 (62), 41 (100); *10*- Éster metílico do ácido hidrocinâmico, *p*- hidroxí: 180 (26, M^+), 120 (33), 107 (100), 77 (9); *11*- ácido cumárico: 192 (64, M^+), 162 (11), 161 (100), 134 (14), 133 (33), 118 (13), 90 (13), 89 (17), 63 (18), 51 (10); *12*- ácido ferrúlico: 222 (100, M^+), 207 (17), 191 (54), 147 (17), 119 (12), 77 (16), 51 (24); *13*- Éster metílico do ácido palmítico: 270 (8, M^+), 143 (10), 87 (58), 75 (18), 74 (100), 69 (13), 57 (16), 55 (25), 43 (37), 41 (30); *14*- 1,1,3,3,4-pentametil-6-butil-2,3-dihidroindeno: 244 (18, M^+), 230 (20), 229 (100), 173 (5), 57 (10); *15*- éster metílico do ácido 9,12-octadecadienóico (E, E): 294 (M^+), 149 (6), 123 (9), 109 (21), 96 (29), 83 (15), 82 (45), 81 (67), 80 (20), 79 (33), 69 (35), 68 (40), 67 (100), 55 (72), 54 (38), 43 (32); *16*- apigenina: 312 (100, M^+), 311 (62), 295 (8), 283 (32), 282 (12), 267 (11), 266 (40), 239 (14), 171 (9), 142 (18), 89 (10); *17*- isosakuranetina: 300 (53, M^+), 229 (30), 193 (18), 166 (18), 138 (13), 138 (12), 135 (14), 134 (100), 121 (82), 119 (22), 69 (11), 65 (13), 44 (21); *18*- kanferide: 328 (100, M^+), 327 (87), 309 (17), 285 (45), 242 (10), 150 (28), 135 (24), 77 (18), 69 (13), 44 (24).

5.3 Mel

5.3.1 Coleta das amostras de mel

Foram coletadas 47 amostras de mel nas regiões Nordeste, Sul e Sudeste do Brasil, conforme mostrado na Tabela 6. As colorações das amostras se mostraram bastante distintas, variando desde o laranja até o amarelo claro. Este fator parece estar intrinsicamente relacionado com a vegetação visitada pelas abelhas, pois foi possível encontrar em um mesma localidade amostras de mel de colorações e intensidades variadas.

Na região sudeste do Brasil também foram realizadas coletas de mel unifloral de laranja (*Citrus aurantium*) (SE1), eucalipto (*Eucalyptus citriodora*) (SE4), alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*) (SE5), assa-peixe (*Vernonia polyanthes*) (SE17), rubim (*Leonurus sibiricus*) (SE18) e capixingui (*Croton floribundus*) (SE19), juntamente com as amostras de própolis das respectivas colméias.

TABELA 6: Localidades de amostragem de mel nas regiões Nordeste, Sudeste e Sul.

Estado	Município	Nº de amostras coletadas
Bahia (BA)	Salvador, Juazeiro, Senhor do Bonfim, Remanso, Entre Rios, Tremedal, Brumado Barra da Choça, Vitória da Conquista, Jacobina	14
Pernambuco (PE)	Salgueiro, Belo Jardim, Ouricuri	10
Ceará (CE)	Crato	7
São Paulo (SP)	Mogi Mirim, Socorro, Amparo, Mogi-Guaçu	14
Rio Grande do Sul (RS)	Bagé	2

5.3.2 Análises físico-químicas dos extratos metanólicos de mel (EMM)

5.3.2.1 Cromatografia em camada delgada de alta eficiência em fase reversa (CCDAE-FR)

Os extratos metanólicos das amostras de mel foram analisados por cromatografia em camada delgada de alta eficiência em fase reversa, como descrito no item 4.2.1.2. As figuras 23 e 24, ilustram os cromatogramas observados a 366 e 254 nm, respectivamente. A cromatografia em camada delgada permitiu uma visualização rápida da intensidade das frações fenólicas existentes em cada amostra de mel e própolis. Por meio desta técnica foi possível verificar uma grande diferença entre os perfis cromatográficos do EMM e do EEP da mesma colméia. De qualquer modo, e diferentemente da própolis, os compostos fenólicos presentes no mel podem ser originados do néctar das flores, da própolis (Tomás-Barberán *et al.*, 1993) e pólen (Ferrerres *et al.*, 1993). As Figuras 23 e 24 mostram claramente que apesar das amostras de mel e própolis do sudeste (SE1, SE4 e SE5) terem sido coletadas em localidades de vegetação uniflora de laranja, eucalipto e alecrim do campo, respectivamente, as própolis apresentaram o mesmo perfil cromatográfico do grupo 12. Estes resultados demonstram que as abelhas utilizaram fontes vegetais diferentes para elaboração do mel e uma única fonte vegetal para a produção da própolis.

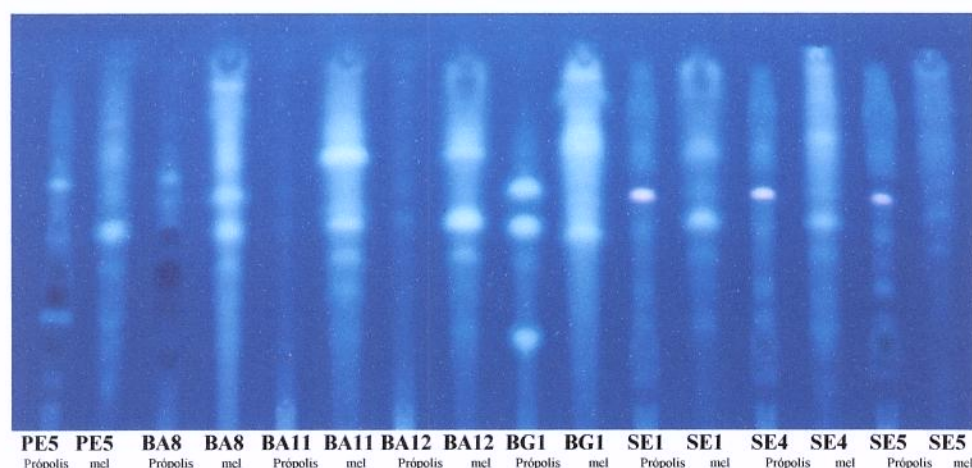


FIGURA 23: Cromatograma obtido por CCDAE, irradiado a 366 nm, dos extratos etanólicos de própolis e metanólicos de mel de mesma colméia.

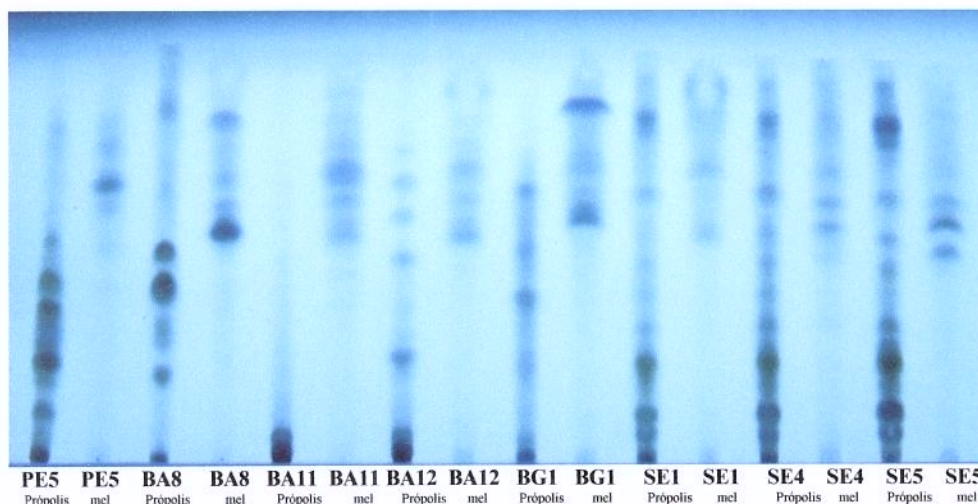


FIGURA 24: Cromatograma obtido por CCDAE, irradiado a 254 nm, dos extratos etanólicos de própolis e metanólicos de mel de mesma colméia.

5.3.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR)

A CLAE dos extratos metanólicos das amostras de mel unifloral da região sudeste do Brasil foi realizada de acordo com o item 4.2.1.3. Nos estudos realizados por Ferreres *et al.* (1991) a CLAE permitiu a identificação de 16 flavonóides em amostras de mel. De acordo com Anklam (1998) somente flavonóides agliconas estão presentes em amostras de própolis e mel. Como pode ser observado na Figura 25 e Tabela 7, os 6 tipos de mel unifloral analisado mostraram uma composição fenólica bastante distinta. O mel de laranja (SE1) mostrou a presença dos flavonóides hesperetina e apigenina. De fato a flavanona hesperetina foi sugerida como um possível marcador da origem floral deste tipo de mel, pois este flavonóide não foi encontrado em nenhum outro tipo de mel e a hesperidina (forma glicosilada) é encontrada no néctar de laranja (Ferreres *et al.*, 1998). O mel de alecrim do campo (SE5) foi o que apresentou o maior número de flavonóides. Além disso este tipo de mel mostrou um alto teor do flavonóide quercetina (8,1 µg/g de mel) (Tabela 7), o qual deve ser também responsável pela coloração laranja intensa deste mel. Os flavonóides isosakuranetina e kanferide, identificados no mel de alecrim do campo, também foram comuns nas própolis do grupo 12, as quais têm a sua origem botânica nesta

espécie vegetal. Contudo, os flavonóides quercetina e crisina não estiveram presentes nas própolis do grupo 12. Estes compostos fenólicos devem ser provavelmente oriundos do néctar das flores do alecrim. É notável que os flavonóides presentes no mel sejam exclusivamente agliconas e a maioria deles sejam flavonóides metilados ou outros compostos lipofílicos. Estes não são detectados no pólen, mas são comuns em exudatos de plantas e resinas (Wollenweber & Dietz, 1981). Isto significa que os flavonóides agliconas do mel podem ser parcialmente oriundos dos flavonóides contidos no pólen, resultantes da hidrólise pelas enzimas presentes na saliva das abelhas. Desta forma há a necessidade de mais estudos para se verificar a existência dos flavonóides, principalmente a quercetina, no néctar do alecrim do campo. Este parâmetro poderá funcionar como um marcador químico da origem botânica deste tipo de mel.

O mel de eucalipto mostrou a presença do flavonóide kanferol, o qual também foi encontrado em mel unifloral de eucalipto da Austrália por Martos *et al.*, 2000b. Estes autores constataram que dependendo da espécie de eucalipto há variação na composição dos flavonóides presentes. A apigenina foi identificada em pequena quantidade nas amostras de mel de laranja e rubim (Tabela 7). Gil *et al.* (1995) também encontraram a presença deste flavonóide em pequenas concentrações (0,1 a 1,0 µg/g de mel) em amostras de mel de *Rosmarinus officinalis* L. Da mesma forma Ferreres *et al.* (1993) demonstraram que, em mel de laranja da Espanha, a ocorrência de apigenina representava uma pequena porcentagem em relação aos demais flavonóides presentes. Não foi identificado nenhum flavonóide nas amostras de mel de assa-peixe e capixingui. Entretanto flavonóides encontrados em outros tipos de mel, como por exemplo luteolina, genkwanina, 8-metoxikanferol, pinocembrina 7-metil éter e miricetina 3,7,4', 7' metil éter (Siess *et al.*, 1996) não foram utilizados como padrões nestas análises de CLAE.

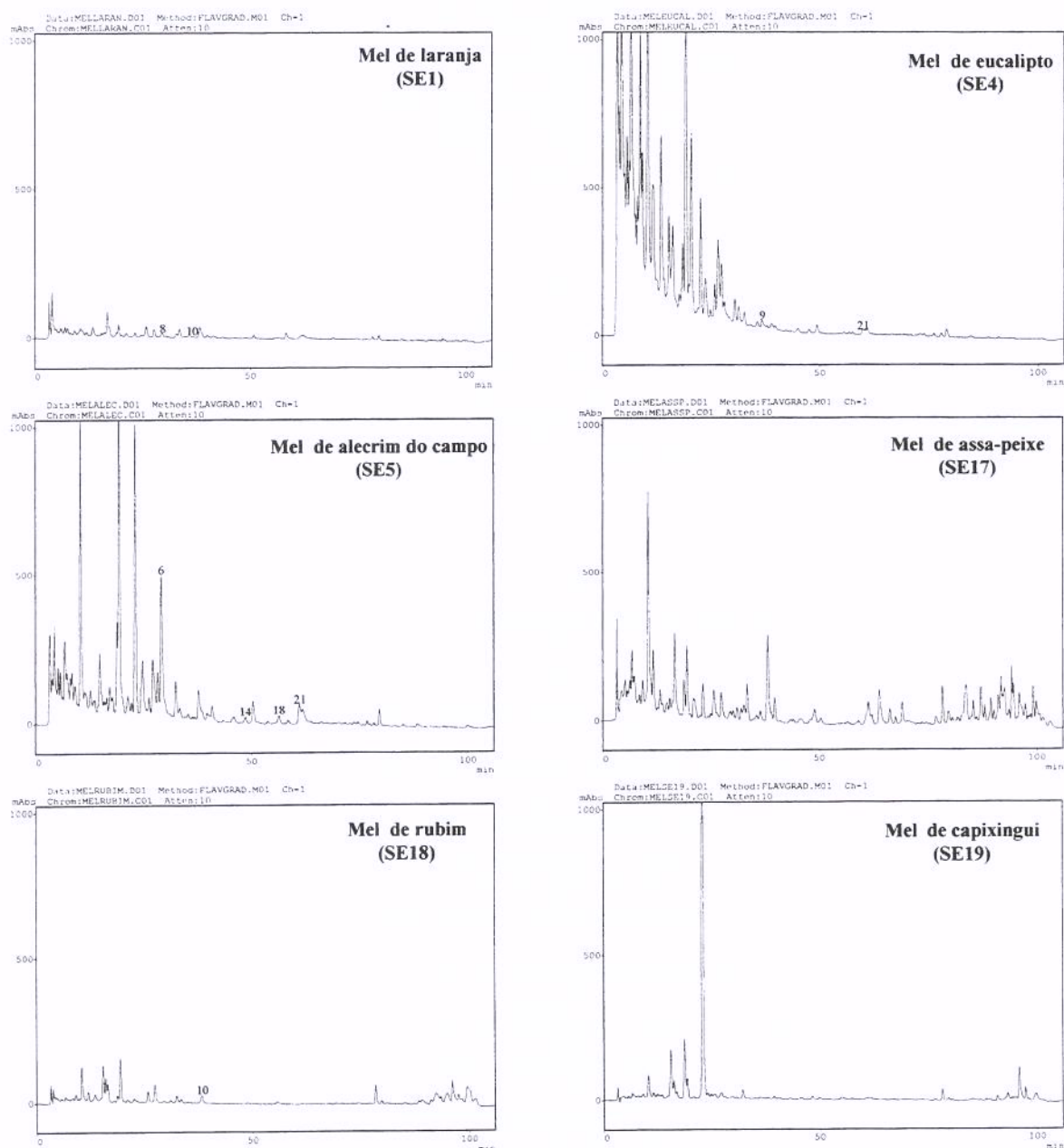


FIGURA 25: Cromatograma obtido por CLAE dos extratos metanólicos de amostras de mel unifloral do Estado de São Paulo. (Volume de amostra injetada: 20µL; detector utilizado: arranjo de fotodiodos a 254 nm; coluna: fase reversa YMC PACK ODS (250 x 4,6 mm) com tamanho de partícula de 5 µm; fase móvel utilizada: água/ácido acético (19:1, v/v) (solvente A) e metanol (solvente B) em sistema de gradiente, iniciando com 30% do solvente B até 40% de B em 15 minutos, 50% de B em 30 minutos, 60% de B em 45 minutos, 75% de B em 65 minutos, 75% de B em 85 minutos, 90% de B em 95 minutos e 30% de B em 105 minutos; vazão: 1 mL/min; temperatura da coluna: 35°C).

6=quercetina; 8=hesperetina; 9=kanferol; 10=apigenina; 14=isosakuranetina; 18=crisina; 21=kanferide.

TABELA 7: Teor de flavonóides determinados por CLAE nos 6 tipos de mel unifloral da região Sudeste do Brasil.

Compostos fenólicos identificados	Teor em $\mu\text{g/g}$ de mel					
	Tipo de mel					
	SE1	SE4	SE5	SE17	SE18	SE19
6 (quercetina)	-	-	8,1	-	-	-
8 (hesperetina)	< 0,1	-	-	-	-	-
9 (kanferol)	-	0,1	-	-	-	-
10 (apigenina)	<0,1	-	-	-	0,2	-
14 (isosakuranetina)	-	-	0,5	-	-	-
18 (crisina)	-	-	0,1	-	-	-
21 (kanferide)	-	0,2	0,4	-	-	-

SE1=laranja; SE4=eucalipto; SE5= alecrim do campo; SE17=assa-peixe; SE18=rubim e SE19=capixingui

* Os valores representam média de duas repetições

5.3.2.3 Cromatografia gasosa com espectrometria de massas (CG-EM)

A composição química das amostras representativas dos 6 tipos de mel unifloral foram também analisadas por CG-EM, de acordo com a metodologia descrita no item 4.2.1.4 A análise por meio desta técnica permitiu a confirmação dos flavonóides apigenina, crisina, isosakuranetina, kanferide e kanferol, os quais também já foram previamente relatados em amostras de mel (Sabatier *et al.*, 1992; Ribeiro-Campos *et al.*, 1990; Ferreres *et al.*, 1991) (Tabela 8). Contudo a hesperetina, do mel de laranja, e a quercetina, do mel do alecrim do campo, previamente identificados por CLAE (Figura 25), não foram confirmados pela técnica de CG-EM. Todavia a presença da hesperetina já foi confirmada em mel de laranja, e sua forma glicosilada (hesperedina) foi confirmada no néctar deste vegetal (Ferreres *et al.*, 1993).

O éster metílico do ácido benzenoacético e o éster metílico do ácido benzóico, com exceção do mel de rubim, não foram encontrados simultaneamente em nenhum outro tipo de mel (Tabela 8). Entretanto pelo menos um derivado de ácido fenólico, como por exemplo o éster metílico do ácido benzóico 2-hidroxi, ácido ferrúlico, éster butil octil do ácido 1,2-benzenodicarboxílico, éster do ácido 1,2-benzenodicarboxílico, bis (2-metipropil) e o éster dioctil do ácido 1,2-benzenodicarboxílico foi identificado na maior parte das

amostras de mel analisada (Tabela 8). Segundo Gross (1981) durante o metabolismo secundário das plantas vários ácidos fenólicos e seus derivados, principalmente do ácido benzóico, são formados. Também tem sido demonstrado que as concentrações destas substâncias são variáveis entre as diferentes espécies vegetais (Herrmann, 1989). Steeg & Montag (1988a) verificaram por CG, após a metilação, que o mel de “trigo mourisco” podia ser caracterizado pelo alto conteúdo do ácido 4-hidroxibenzóico e ausência do ácido fenilacético.

Vários derivados de ácidos orgânicos foram encontrados nas amostras de mel analisada, como por exemplo o éster metílico do ácido palmítico presentes no mel de laranja, alecrim e rubim, e o éster dimetílico do ácido octanodióico identificado no mel de eucalipto. Wilkins *et al.* (1995) identificaram, utilizando a técnica de CG-EM, 32 ácidos dicarboxílicos alifáticos nas formas de ésteres metílicos em 4 extratos de amostras de mel unifloral da Nova Zelândia. Estes autores propuseram o ácido 2-metilbutanodióico e o ácido 4-hidroxi-3-metil-trans-2-pentenodióico como substâncias marcadoras da origem floral do mel de *Knigtea excelsa* produzido na Nova Zelândia.

O estudo da composição química dos vários tipos de mel produzido no Brasil possibilitará, através da seleção de marcadores químicos, uma identificação de autenticidade e melhoria no controle de qualidade deste produto apícola.

TABELA 8: Cromatografia gasosa com espectrometria de massas dos 6 tipos de mel unifloral da região sudeste do Brasil.

Compostos identificados (Principais picos do EM: intensidade relativa)	Mel
1: Apigenina: 312 (100, M ⁺), 311 (62), 283 (32), 266 (40), 142 (18).	SE1, SE18
2: Crisina: 268 (100, M ⁺), 239 (40), 95 (18), 69 (22), 51 (16), 44 (32).	SE5
3: Isosakuranetina: 300 (53, M ⁺), 229 (30), 193 (18), 166 (18), 134 (100), 121 (82), 119 (22), 44 (21).	SE5
4: Kanferide: 328 (100, M ⁺), 327 (87), 285 (45), 242 (10), 150 (28), 135 (24), 77 (18), 44 (24).	SE5
5: Kanferol: 328 (100, M ⁺), 327 (98), 285 (48), 150 (30), 135 (26), 44 (64).	SE4
6: Éster metílico do ácido benzenoacético: 150 (20, M ⁺), 91 (100), 65 (14).	SE5, SE17, SE18, SE19
7: Metil trimetiléter: 164 (28, M ⁺), 149 (100), 119 (14), 91 (14).	
8: Éster metílico do ácido benzóico: 136 (32, M ⁺), 105 (100), 77 (66), 51 (36).	SE1, SE4, SE17, SE18
9: Éster metílico do ácido benzóico 2-hidroxi: 152 (42, M ⁺), 120 (100), 65 (27), 64 (17), 63 (17).	SE4
10: ciclohexeno-1-one, 3,5,5-trimetil-4-(3-oxo-1-butenil): 206 (2, M ⁺), 150 (18), 108 (89), 43 (100), 40 (37).	SE4
11: Cafeína: 194 (100, M ⁺), 109 (88), 82 (53), 69 (17), 67 (88), 55 (70), 43 (32), 42 (41), 41 (39), 40 (19).	SE4
12: Ácido Ferrúlico: 222 (100, M ⁺), 191 (54), 147 (17), 77 (16), 51 (24).	SE5
13: Ácido propanóico 2-oxo: 88 (1, M ⁺), 45 (16), 43 (100).	SE19
14: Ácido acético: 60 (56, M ⁺), 45 (97), 43 (100), 42 (26).	SE17, SE19
15: 1, 2 Propanodiol: 76 (1, M ⁺), 45 (100), 43 (19).	SE18
16: Acetilcarbinol: 74 (7, M ⁺), 43 (100).	SE17
17: Butanona, 3-hidroxi: 88 (5, M ⁺), 45 (100), 43 (80), 42 (9).	SE4
18: 4H-pirano-4-one, 2, 3-dihidro-3, 5-dihidroxi-6-metil: 144 (37, M ⁺), 101(31), 72 (20), 55 (25), 45 (25), 44 (76), 43 (100).	SE5
19: Éster metílico do ácido palmítico: 270 (8, M ⁺), 87 (58), 74 (100), 57 (16), 55 (25), 43 (37), 41 (30).	SE1, SE5, SE18
20: Éster metílico do ácido eicosanóico: 326 (1, M ⁺), 87 (56), 74 (100), 57 (30), 55 (33), 43 (64), 41 (37).	SE4, SE19
21: Éster dimetílico do ácido Octanodióico: 202 (M ⁺), 138 (49), 129 (58), 97 (54), 87 (37), 83 (40), 74 (100), 55(89), 43 (73), 41 (72).	SE4
22: Éster metílico do ácido octadecanóico: 298 (11, M ⁺), 87 (65), 75 (21), 74 (100), 69 (17), 57 (23), 41 (46).	SE1, SE18
23: Éster metílico do ácido 9,12-Octadecadienóico (E, E): 294 (M ⁺), 95 (45), 82 (45), 81 (67), 79 (33), 69 (35), 68 (40), 67 (100), 55 (72), 43 (32), 41 (91).	SE1
24: Éster metílico do ácido 9-Octadecenóico (E): 296 (M ⁺), 74 (40), 69 (43), 55 (96), 43 (72), 41 (100).	SE5, SE18
25: Éster metílico do ácido 9,12,15-Octadecatrienóico (Z,Z,Z): 292 (M ⁺), 108 (27), 95 (40), 93 (47), 81 (43), 80 (42), 79 (100), 67 (78), 55 (57), 41 (61).	SE1
26: Éster metílico do ácido 9-Octadecenóico (E): 296 (M ⁺), 74 (40), 69 (43), 55 (96), 43 (72), 41 (100).	SE1
27: Éster metílico do ácido tetradecanóico: 242 (3, M ⁺), 87 (58), 74 (100), 57 (42), 55 (27), 43 (43), 42 (30), 41 (41).	SE1, SE18
28: 3, 4-Dihidroxi-3, 4-dimetil-hexano-2,5-diono: 174 (M ⁺), 89 (11), 88 (25), 43 (100).	SE4
29: Éster metílico do ácido propanóico 2-metil: 102 (8, M ⁺), 87 (16), 71 (26), 59 (23), 43 (100), 41 (36).	SE4
30: Éster metílico do ácido nonanóico: 172 (M ⁺), 87 (60), 74 (100), 59 (17), 57 (16), 55 (26), 41 (36).	SE18
31: Éster dioctil do ácido hexadecanóico: 370 (M ⁺), 129 (100), 71 (38), 70 (46), 57 (75), 55 (56), 43 (44), 41 (41).	SE1, SE4, SE5, SE18
32: Éster dimetílico do ácido butanodióico: 146 (M ⁺), 115 (71), 114 (20), 87 (18), 59 (73), 55 (100).	SE1, SE4
33: Éster metílico do ácido 2-oxo-hexanóico: 144 (2, M ⁺), 85 (57), 57 (100), 41 (66).	SE4
34: Metil 9, 10, 10, 13, 15, 16-trimetileno octadecanoato: 334 (M ⁺), 121 (27), 109 (27), 96 (42), 95 (55), 93 (32), 82 (34), 81 (76), 79 (43), 69 (43), 67 (89), 55 (93), 54 (48), 43 (40), 41 (100).	SE4, SE5
35: Éster dimetílico do ácido octanodióico: 202 (M ⁺), 129 (58), 97 (54), 87 (37), 83 (40), 74 (100), 69 (92), 59 (70), 55 (89), 43 (73), 41 (72).	SE4
36: Éster metílico do ácido 2-hidroxi isocapróico: 146 (M ⁺), 87 (26), 45 (54), 44 (18), 43 (100), 41 (57).	SE4
37: Éster butil octil do ácido 1,2-benzenodicarboxílico: 334 (M ⁺), 149 (100), 43 (14), 41 (22).	SE1, SE4, SE18
38: Éster do ácido 1,2-benzenodicarboxílico, bis (2-metipropil): 278 (M ⁺), 149 (100), 57 (38), 41 (17).	SE1, SE18, SE19
39: Éster dioctil do ácido 1,2-benzenodicarboxílico: 390 (M ⁺), 149 (100), 71 (28), 70 (28), 57 (48), 41 (30).	SE1
40: Éster metílico do ácido láurico: 214 (2, M ⁺), 87 (54), 74 (100), 55 (26), 43 (39), 41 (36).	SE1, SE18

SE1=laranja; SE4=eucalipto; SE5=alecrim do campo; SE17=assa-peixe; SE18=rubim e SE19=capixingui

6. CONCLUSÕES

As análises por Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência e Espectrofotometria na região UV-visível demonstraram uma grande diversidade das própolis brasileiras. Foram identificadas nas regiões sul, sudeste e Nordeste do Brasil 12 grupos distintos de própolis de grande ocorrência.

Dentre os grupos de própolis identificados o grupo 6, da região Nordeste, mostrou alta atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*, apesar de não apresentar flavonóides em sua composição química. Isto demonstra que os efeitos biológicos das própolis não são devidos unicamente a presença de flavonóides.

As técnicas de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massas possibilitaram a identificação e confirmação da presença do composto alergênico, éster do ácido dimetil dialil caféico, nas própolis do grupo 3.

As própolis dos grupos 6 e 7 foram as que apresentaram as maiores atividades citotóxicas contra diferentes células cancerosas apesar de possuírem uma composição química totalmente distinta.

As análises fitoquímicas realizadas por meio das técnicas espectrofométricas e cromatográficas confirmaram a origem botânica do grupo 3, grupo 6 e grupo 12 de própolis como sendo as espécies vegetais *Populus alba*, *Hyptis divaricata* e *Baccharis dracunculifolia*, respectivamente.

As amostras de mel, coletadas de diferentes regiões brasileiras, mostraram um perfil cromatográfico, pela técnica de Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência, totalmente diferente das amostras de própolis da mesma colméia. Nas amostras de mel unifloral de laranja, eucalipto e alecrim do campo da região da região Sudeste ficou constatado que as abelhas utilizaram fontes vegetais diferentes para elaboração destes, e uma única fonte vegetal para a produção das própolis oriundas da mesma colméia.

A diversidade química das amostras de mel unifloral de laranja, eucalipto, alecrim do campo, assa-peixe, rubim e capixingui foi confirmada pelas técnicas de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massas. O mel de alecrim foi o que apresentou um maior número de flavonóides, principalmente quercetina.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACKERMANN, T. Fast chromatographic study of propolis crudes. **Food Chemistry**, v.42, n.2, p.135-138, 1991.
- AGA, H.; SHIBUYA, T.; SUGIMOTO, K.; NAKAJIMA, S. Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**. v.58, n.5, p.945-946, 1994.
- ALENCAR, S. M.; IKEGAKI, M.; PACHECO, T. A. R. C.; PARK, Y. K. Caracterização das própolis brasileiras: Comparação da composição química entre as própolis produzidas no Brasil e em outros países. **XVII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.2 p. 5.92, 2000.
- AMIOT, M. J.; AUBERT, S.; GONNET, M.; TACCHINI, M. Les composés phénoliques des miels: étude préliminaire sur l'identification et la quantification par familles. **Apidologie**, v.20, p.115-125, 1989.
- ANDRADE, P.; FERRERES, F.; AMARAL, M. T. Analysis of honey phenolic acids by HPLC, its application to honey botanical characterization. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.20, n.14, p.2281-2288, 1997.
- ANKLAM, E. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. **Food Chemistry**, v. 63, n.4, p.549-562, 1998.
- ARKINS, E.; SHEEHAN, J. Structure of hyaluronic acid. **Nature New Biology**, v.235, p.253-260, 1972.
- ARONSON, N. N.; DAVIDSON, E. A. Lysosomal hyaluronidase from rat liver. **Journal of Biology Chemistry**, v.242, n.3, p. 437-440, 1967.
- 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, n.4, p.361-367, 1998.
- BANKOVA, V.; BOUDOUROVA-KRASTEVA, G.; SFORCIN, J. M.; FRETE, X.; KUJUMGIEV, A.; MAIMONI-RODELLA, R.; POPOV, S. Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from São Paulo state. **Zeitschrift fur Naturforschung C**, v.54, n.5-6, p.401-405, 1999.

- BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; KUJUMGIEV, A.; MARCUCCI, M. C; POPOV, A.S.
Chemical composition and antibacterial activity of brazilian propolis. **Zeitschrift fur Naturforschung C**, v.50, n.3-4, p.167-172, 1995.
- BANKOVA, V.; DYULGEROV, A.; POPOV, S.; EVSTATIEVA, L.; KULEVA, L.; PUREB, O.; ZAMJANSAN, Z. Propolis produced in bulgaria and mongolia – phenolic compounds and plant origin. **Apidologie**, v.23, n.1, p.79-85, 1992.
- BANKOVA, V.; DYULGEROV, A.; POPOV, S.; MAREKOV, N. A GC-MS Study of the propolis phenolic constituents. **Zeitschrift fur Naturforschung C**, v. 42, n.1-2, p. 147-151, 1987.
- BANKOVA, V.; POPOV, S.; MAREKOV, N. L. A study on flavonoids of propolis. **Journal of Natural Products**, v.46, n.4, p.471-474, 1983.
- BANKOVA, V.; POPOV, S.; MAREKOV, N. L. Isopentenyl cinnamates from poplar buds and propolis. **Phytochemistry**, v.28, n.3, p.871-873, 1989.
- BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; MIDORIKAWA, K.; MATSUSHIGE, K.; KADOTA, S. Two novel cytotoxic benzofuran derivatives from Brazilian propolis. **Journal of Natural Products**, v.63, n.9, p.1277-1279, 2000.
- BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; PRASAIN, J. K.; MATSUSHIGE, K.; SAIKI, I.; KADOTA, S. Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities. **Journal of Natural Products**, v.53, n.5-6, p. 896-900, 1998.
- BASTOS, E. M.; DAYRELL, I. O.; SAMPAIO, I. B.; JOLK, L. Correlation between pollen spectrum and physico-chemical properties of honeys produced in the Minas Gerais state (Brazil). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.16, n.2, p.146-152, 1996.
- BERAHIA, T.; CERRATI, C.; SABATIER, S.; AMIOT, M. J. Gas chromatography-mass spectrometry analysis of flavonoids in honey. **Sciences Des Aliments**, v.13, n.1, p.15-24, 1993.
- BLAIR, J. E.; BORMAN, E. K.; BYNOE, E. T.; UPDYKE, E. L.; WILLIAMS, R. E. O. Hospital acquired satphylococcal disease, recommended procedures for laboratory investigation. Atlanta,G.A: United States Department of Health, education and Welfare, Public Health Service, 1958.
- BOGDANOV, S. Determination of pinocembrin in honey using HPLC. **Journal of Apicultural Research**, v.28, n..1, p.55-57, 1989.

- BONVEHI, J. S.; COLL, F. V. Phenolic composition of propolis from China and from South-America. **Zeitschrift fur Naturforschung C**, v.49, n11-12, p.712-718, 1994.
- CABRAS, P.; ANGIONI, A.; TUBEROSO, C.; FLORIS, I.; RENIERO, F.; GUILLOU, C.; GHELLI, S. Homogentisic acid: A phenolic acid as a marker of strawberry-tree (*Arbutus unedo*) honey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, n.10, p.4064-4067, 1999.
- CASTEELE, K. V.; GEIGER, H.; SUMERE, C. F. V. Separation of flavonoids by reverse-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v.240, n.1, p.81-94, 1982.
- CIZMARIK, J.; LAHITOVA, N. Antimutagenicity of propolis. **Pharmazie**, v.53, n.12, p. 883-884, 1998.
- CIZMARIK, J.; MATEL, I. Examination of the chemical composition of propolis I. Isolation and identification of the 3,4-dihydroxycinnamic acid (caffeic acid) from propolis. **Experientia**, v.26, n.4, p.713-&, 1970.
- COBOS, M. I.; RODRÍGUEZ, J. L.; OLIVA, M. D.; DEMO, M.; FAILLACI, S. M.; ZYGADLO, J. A. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Baccharis notoserghila*. **Planta Medica**, v.67, n.1, p.84-86, 2001.
- CONTE, L. S.; MIORINI, M.; GIOMO, A.; BERTACCO, G.; ZIRONI, R. Evaluation of some fixed components for unifloral honey characterization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, n.5, p.1844-1849, 1998.
- COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.7, n.2, p. 66-76, 1996.
- COSTA, T. R.; FERNANDES, O. F. L.; SANTOS, S. C.; OLIVEIRA, C. M. A.; LIAO, L. M.; FERRI, P. H.; PAULA, J. R.; FERREIRA, H. D.; SALES, B. H. N.; SILVA, M. D. R. Antifungal activity of volatile constituents of *Eugenia dysenterica* leaf oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.72, n.1-2, p.111-117, 2000.
- DIMOV, V.; IVANOVSKA, N.; BANKOVA, V.; POPOV, S. Immunomodulatory action of propolis .4. prophylactic activity against gram-negative infections and adjuvant effect of the water-soluble derivative. **Vaccine**, v.10, n.12, p. 817-823, 1992.
- DONER, L. W. The sugars of honey – a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. V.28, n.5, p.443-456, 1977.

- FERRERES, F.; GARCÍA-VIGUERA, C.; TOMÁS-LORENTE, F.; TOMÁS-BARBERAN, F. A. Hesperetin: a marker of the floral origin of citrus honey. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.61, n.1, 121-123, 1993.
- FERRERES, F.; GINER, J. M.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. A comparative-study of hesperetin and methyl anthranilate as markers of the floral origin of citrus honey. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.65, n.3, 371-372, 1994.
- FERRERES, F.; JUAN, T.; PEREZ-ARQUILLUE, C.; HERRERA-MARTEACHE, A.; GARCIA-VIGUERA, C.; TOMAS-BARBERAN, F. A. Evaluation of pollen as a source of Kaempferol in rosemary honey. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.77, n.4, p.506-510, 1998.
- FERRERES, F.; ORTIZ, A.; GARCÍA-VIGUERA, C.; TOMAS-BARBERAN, F. A.; TOMAS-LORENTE, F. Flavonoids of la alcarria-honey - A study of their botanical origin. **Zeitschrift fur Lebensmittel**.v.194, n.2, p.139-143, 1992.
- FERRERES, F.; TOMAS-BARBERAN, F. A.; GIL, M. I.; TOMAS-LORENTE, F. An HPLC technique for flavonoid analysis in honey. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.56, n.1, p.49-56, 1991.
- FRAGOSO-SERRANO, M.; GONZALEZ-CHIMEO, E.; PEREDA-MIRANDA, R. Novel labdane diterpenes from the insecticidal plant *Hyptis spicigera*. **Journal of Natural Products**, v.62, n.1, p. 45-50, 1999.
- GARCIA-VIGUERA, C., GREENAWAY, W., WHATLEY, F.R. Composition of propolis from 2 different Spanish regions. **Zeitschrift fur Naturforschung C**, v.47, n.7-8, p.634-637, 1992.
- GHISALBERTI, E. L. Propolis: A review. **Bee World**, v.60, n.2, p.59-84, 1979.
- GHISALBERTI, E. L.; JEFFERIES, P. R.; LANTERI, R. Potencial drugs from propolis. IN: **Mass spectrometry in drug metabolism**. eds. Frigerio, A. & Ghisalberti, E. L., Plenum Press, p. 111-130, 1977.
- GHISALBERTI, E. L.; JEFFERIES, P. R.; LANTERI, R.; MATISONS, J. Constituents of propolis. **Experimentia**, v.34, n2, p.157-158, 1978.
- GIL, M. I.; FERRERES, F.; ORTIZ, A.; SUBRA, E.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Plant phenolic metabolites and floral origin of rosemary honey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.43, n.11, p.2833-2838, 1995.

- GRANGE, J. M.; DAVEY, R. W. Antibacterial properties of propolis (bee glue). **Journal of the Royal Society of Medicine**, v.83, n.3, 159-160, 1990.
- GREENAWAY, W. SCAYSBROOK, T.; WHATLEY, F. R. The analysis of bud exudate of populus x euramericana, and of propolis, by gas-chromatography mass-spectrometry. **Proceedings of the Royal Society of London Series B**. v. 232, n.1268, p.249-272, 1987.
- GREENAWAY, W., SCAYSBROOK, T., WHATLEY, F.R. The composition and plant origins of propolis. **Bee World**, v.71, n.3, p.107-118, 1990.
- GROSS, G. G. The biochemistry of plants. **Secondary plant products**, Academic press, v.7, 1981.
- GRUNBERGER, D.; BANERJEE, R.; EISINGER, K.; OLTZ, E. M.; EFROS, L.; CALDWELL, M.; ESTEVEZ, V. NAKANISHI, K. Preferential cyto-toxicity on tumor-cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. **Experientia**, v.44, n.3, p.230-232, 1988.
- GUYOT, C.; BOUSETA, A.; SCHEIRMAN, V.; COLLIN, S. Floral origin markers of chestnut and lime tree honeys. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, n.2, p.625-633, 1998.
- HAMMERSCHMIDT, P.A.; PRATT, D. E. Phenolic antioxidants of dried soybeans. **Journal of Food. Science**, v.43, n.2, p.556-559, 1978.
- HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v.55, n.6, p.481-504, 2000.
- HAYASHI, K.; KOMURA, S.; ISAJI, N. OHISHI, N.; YAGI, K. Isolation of antioxidative compounds from Brazilian propolis: 3,4-dihidroxy-5-prenylcinnamic acid, a novel potent antioxidant. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.47, n.11, p.1521-1524, 1999.
- HERRMANN, K. Ocurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. **Critical Reviews In Food Science And Nutrition**, v.28, n.4, p.315-347, 1989.
- HIROTA, M.; MATSUNO, T.; FUJIWARA, T.; SUGIYAMA, H.; MINESHITA, S. Enhanced cytotoxicity in a Z-photoisomer of a benzopyran derivative of propolis. **Journal of Natural Products**, v.63, n.3, p.366-370, 2000.

- IKEGAKI, Masaharu. **Determinação de qualidade de propolis de *Apis mellifera* africanizada da região sul do Brasil: avaliação de algumas propriedades físico-químicas e biológicas da própolis.** Campinas, 2001, 74p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- IKENO, K.; IKENO, T.; MIYAZAWA, C. Effects of propolis on dental-caries in rats. **Caries Research**, v.25, n.5, p.347-351, 1991.
- ISLA, M.I.; MORENO, M.I.N.; SAMPIETRO, A.R.; VATTUONE, M.A. Antioxidant activity of Argentine propolis extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v.76, n.2, p.165-170, 2001.
- JANES, K.; BUMBA, V. Beitrag zur Zusammensetzung des Bienenharzes (propolis). **Pharmazie**, v.29, n.8, p.544-545, 1974.
- KAKEGAWA, H.; MITSUO N.; MATSUMOTO, H.; SATOH, T.; AKAGI, M.; TASAKA, K. Hyaluronidase-inhibitory and anti-allergic activity of the photo-irradiated products of tranilast. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.33, n.9, p.3738-3744, 1985.
- KIMOTO, T.; ARAI, S.; KOHGUCHI, M.; AGA, M.; NOMURA, Y.; MICALLEF, M. J. KURIMOTO, M.; MITO, K. Apoptosis and suppression of tumor growth by artepillin C extracted from Brazilian propolis. **Cancer Detection and Prevention**, v.22, n.6, p.506-515, 1998.
- KÖNIG, B. Plant sources of propolis. **Bee World**, v. 66, n.4, p.136-139, 1994.
- 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, n.2, 141-148, 2000a.
- KOO, H.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; AMBROSANO, G. M. B.; MURATA, R. M.; YATSUDA, R.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M.; PARK, Y. K. Effect of a new variety of *Apis mellifera* propolis on mutans streptococci. **Current Microbiology**, v.41, n.3, p. 192-196, 2000b.

- KOO, Hyun. **Estudo dos flavonóides da própolis de *Apis mellifera* africanizada provenientes de diversas regiões do Brasil**. Campinas, 1996. 67p. Tese (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- KOO, M. H.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; SATTTLER, A. Effect of *Apis mellifera* propolis from two Brazilian propolis regions on caries development in desalivated rats. **Caries Research**, v.33, n.5, p.393-400, 1999.
- KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, Y.; BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**, v.64, n.3, p.235-240, 1999.
- KUPPUSAMY, U. R.; KHOO, H. E.; DAS, N. P. Structure-activity studies of flavonoids as inhibitors of hyaluronidase. **Biochemical Pharmacology**, v.40, n.2, p. 397-401, 1990.
- LINDENFELSER, L. A. Antimicrobial activity of própolis. **American Bee Journal**, v.107, n.3, p.130-131, 1967.
- MACIEJEWICZ, W. Isolation of flavonoid aglycones from propolis by a column chromatography method and their identification by GC-MS and TLC methods. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.24, n.8, p.1171-1179, 2001.
- 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.
- MOURA, Fabiana Fonseca de. **Determinação das propriedades físico-químicas e biológicas da própolis produzida por *Apis mellifera* na região nordeste do Brasil**. Campinas, 2000, 69p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- MARCUCCI, M. C. Biological and therapeutic properties of chemical propolis constituents. **Química Nova**, v.19, n.5, p.529-536, 1996.
- MARCUCCI, M. C. Propolis-chemical-composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v.26, n.2, p.83-99 1995

- 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**, v.55, n.1-2, p.76-81, 2000.
- MARCUCCI, M. C.; FERRERES, F.; GARCIA-VIGUERA, C.; BANKOVA, V. S.; DE CASTRO, S. L.; DANTAS, A. P.; VALENTE, P. H. M.; PAULINO, N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v.74, n.2, p.105-112, 2001.
- 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.
- MARKHAM, R. K.; 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.
- MARTOS, I.; COSSENTINI, M.; FERRERES, F.; TOMAS-BARBERAN, F. A. Flavonoid composition of Tunisian honeys and propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, n.8, p.2824-2829, 1997.
- MARTOS, I.; FERRERES, F.; TOMAS-BARBERAN, F. A. Identification of flavonoid markers for the botanical origin of Eucalyptus honey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, n.5, p.1498-1502, 2000a.
- MARTOS, I.; FERRERES, F.; YAO, L. H.; D'ARCY, B.; CAFFIN, N.; TOMAS-BARBERAN, F. A. Flavonoids in monospecific Eucalyptus honeys from Australia. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, n.10, p. 4744-4748, 2000b.
- MATSUNO, T. A new clerodane diterpenoid isolated from propolis. **Zeitschrift fur Naturforschung C**, v.50, n.1-2, p.93-97, 1995.
- MATSUNO, T.; MATSUMOTO, Y.; SAITO, M.; MORIKAWA, J. Isolation and characterization of cytotoxic diterpenoid isomers from propolis. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v.52, n.9-10, p.702-704, 1997.
- MATSUNO, T.; SAITO, M.; MATSUMOTO, Y. MORIKAWA, J. A new benzo-gamma-pyran derivative isolated from propolis. **Zeitschrift fur Naturforschung C**, v.53, n.11-12, p.1037-1039, 1998.

- MATSUSHIGE, K.; BASNET, P.; HASE, K.; KADOTA, S.; TANAKA, K.; NAMBA, T.
Propolis protects pancreatic beta-cells against the toxicity of streptozotocin (STZ).
Phytomedicine, v.3, n.2, p.203-209, 1996.
- MENGHINELLO, P.; CUCCHIARINI, L.; PALMA, F.; AGOSTINI, D.; DACHA, M.;
STOCCHI, V. Simultaneous analysis of flavonoid aglycones in natural products using
an RP-HPLC method. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**,
v.22, n.19, p.3007-3018, 1999.
- MIRZOEVA, O.K.; CALDER, P. C. The effect of propolis and its components on
eicosanoid production during the inflammatory response. **Prostaglandins
Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.55, n.6, p.441-449, 1996.
- MIYATAKA, H.; NISHIKI, M.; MATSUMOTO, H.; FUJIMOTO, T.; MATSUKA, M.;
SATO, T. Evaluation of propolis. I: Evaluation of brazilian and chinese propolis by
enzymatic and physico-chemical methods. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**,
v.20, n.5, p.496-501, 1997.
- MONACHE, F. D.; MONACHE, G. D.; GÁCS-BAITZ. Two polyisoprenylated ketones
from *Clusia nemorosa*. **Phytochemistry**, v.32, n.2, p.703-705, 1991.
- MSTAT-C. A microcomputer program for the design, management and analysis of
agronomic research experiments. **Norway: MSTAT Distribution**, n.p., 1988.
- MUNOZ, O.; PENA, R. C.; URETA, E.; MONTENEGRO, G.; TIMMERMAN, B. N.
Propolis from Chilean matorral hives. **Zeitschrift fur Naturforschung C**, v.56, n.3-
4, p.269-272, 2001.
- NAGY, E.; PÁPAY, V.; LITKEY, Gy.; DINYA, Z. Investigation of the chemical
constituents, particularly the flavonoid components, of propolis and *Populi gemma* by
the GC/MS method. IN: **Flavonoids and bioflavonoids**. eds. Farkas, L. Gábor, M &
Kallay, F., Elsevier, Amsterdam, p.233-240, 1985.
- NOVOTNY, L.; VACHALKOVA, A.; AL-NAKIB, T.; MOHANNA, N.; VESELA, D.;
SUCHY, V. Separation of structurally related flavonoids by GC/MS technique and
determination of their polarographic parameters and potential carcinogenicity.
Neoplasma, v.46, n.4, p.231-236, 1999.
- PAINTZ, M.; METZNER, J. Local-anesthetic action of propolis and some of its
constituents. **Pharmazie**, v.34, n.12, p.839-841, 1979.

- PARK, Y. K.; KOO, M. H. IKEGAKI, M.; CONTADO, J. L. Comparison of the Flavonoid Aglycone Contents of *Apis Mellifera* Propolis from Various Regions of Brazil. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v.40, n.1, p.97-106, 1997.
- 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, 1998a
- PARK, Y.K.; IKEGAKI, M. Estudo da preparação dos extratos etanólicos de própolis e suas aplicações. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, n.3, p.313-318, 1998c.
- PARK, Y.K.; IKEGAKI, M. Preparation of water and ethanolic extracts of propolis and evaluation of the preparations. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.62, n.11, p. 2230-2232, 1998d.
- PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M.; MOURA, F.F. Evaluation of brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. **Honeybee Science**, v.21, n.2, p.85-90, 2000.
- PARK, Y.K.; KOO, M.H.; ABREU, J.A.S.; IKEGAKI, M.; CURY, J.A.; ROSALEN, P.L. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganism. **Current Microbiology**, v.34, n.1, p.24-28, 1998b.
- PARK, Y.K.; KOO, M.H.; SATO, H.H.; CONTADO, J. L. Estudo de alguns componentes da própolis coletada por *Apis mellifera* no Brasil. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v.38, n.4, p.1253-1259, 1995.
- PEREDAMIRANDA, R.; GASCONFIGUEROA, M. Chemical studies on mexican hyptis species .1. chemistry of hyptis-mutabilis – new pentacyclic triterpenoids. **Journal of Natural Products**, v.51, n.5, p. 996-998, 1988.
- PEREIRA, A. D.; PINTO, A. C.; CARDOSO, J. N.; NETO, F. R. D.; RAMOS, H. F. D.; DELLAMORA-ORTIZ, G. M.; dos SANTOS E. P. Application of high resolution gas chromatography to crude extracts of propolis. **HRC-Journal of High Resolution Chromatography**, v.21, n.7, p.396-400, 1998.
- PEREIRA, A.D.; DA SILVA, J. F. M.; KILTZKE, R.; CARDOSO, J. N.; NETO, F. R. D. Pentacyclic triterpenoid alkanoates in propolis. **Zeitschrift fur Naturforschung C**, v.54, n.2, p.1115-1118, 1999.

- PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v.63, n.7, p. 1035-1042, 2000.
- PRATT, D. E.; BIRAC, P. M. Source of antioxidant activity of soybeans and soy products, **Journal of Food Science**, v.44, n.6, p.1720-1722, 1979.
- PROPAVKO, S. A.; GUREVICH, A. I.; KOLOSOV, M. N. Flavonoid components of propolis. **Khimiya Prir Soedin**, v.5, p.476-482, 1969.
- RAO, K. V. R.; RAO, L. J. M.; RAO, N. S. P. An a-ring contracted triterpenoid from *hyptis suaveolens*. **Phytochemistry**, v.29, n.4, p.1326-1329, 1990.
- REISSIG, J. L.; STROMINGER, J. L., LELOIR, L. F. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. **Journal of Biology Chemistry**, v.217, p. 959-966, 1955.
- RIBEIRO-CAMPOS, M. G.; SABATIER, S.; AMIOT, M. J.; AUBERT, S. Characterization of flavonoids in three hiveproducts: bee pollen, propolis and honey. **Planta Medica**, v.56, p.580-581, 1990.
- RIOJA, A.; PIZZEY, A.R.; MARSON, C.M.; THOMAS, N.S.B. Preferential induction of apoptosis of leukaemic cells by farnesol. **Febs Letters**, v.467, n.2-3, p.291-295, 2000.
- RUBINSTEIN, L. V.; SHOEMAKER, R. H.; PAUL, K. D.; SIMON, R. M.; TOSINI, S.; SHEKAN, P.; SCUDIERO, D. A. MONKS, A.; BOYD, M. R. Comparison of *in vitro* anticancer-drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor-cell lines. **Journal of the National Cancer Institute**, v.82, n.13, p.1113-1118, 1990.
- RUBIO, O. C.; CUELLAR, A. C.; ROJAS, N.; CASTRO, H. V.; RASTRELLI, L.; AQUINO, R. A polyisoprenylated benzophenone from Cuban propolis. **Journal of Natural Products**, v.62, n.7, p.1013-1015, 1999.
- SABATIER, S.; AMIOT, M. J.; AUBERT, S.; TACCHINI, M.; GONNET, M. Importance des flavonoides dans les miels de tournesol. **Bulletin Technical Apiculture**, v.15, p.171-178, 1988.
- SABATIER, S.; AMIOT, M. J.; TACCHINI, M.; AUBERT, S. Identification of flavonoids in sunflower honey. **Journal of Food Science**, v.57, n.3, p.773-777, 1992.
- SCHNEIDWEIND, E. M.; KALA, H.; LINZER, B.; METZNER, J. Zur Kenntnis der Inhaltsstoffe von propolis. **Pharmazie**, v.30, n.12, p.803-817, 1975.

- SIDDIQUI, I. R. The sugars of the honey. **Advanced Carbohydrate Chemical Biochemical**, v.25, p.285, 1970.
- SIESS, M. H.; LEBON, A. M.; CANIVENCLAVIER, M. C.; AMIOT, M. J.; SABATIER, S.; AUBERT, S. Y.; SUSCHETET, M. Flavonoids of honey and propolis: Characterization and effects on hepatic drug-metabolizing enzymes and benzo[a]pyrene-DNA binding in rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.44, n.8, p.2297-2301, 1996.
- SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v.82, n.13, p.1107-1112, 1990.
- SOKOLOV, I. V.; TORGOV, I. V. Conjugates of trans-coniferyl alcohol in propolis and its sources. **Khimiya Prirodnikh Soedinenii**, n., p.319-324, 1989.
- SOKOLOV, I. V.; TORGOV, I. V. Flavonoid aglycons in propolis and its sources. **Khimiya Prirodnikh Soedinenii**, n.4, p.550-551, 1990.
- STEEG, E.; MONTAG, A. Minor ingredients of honey with flavor relevancy .2. Sensorially active decomposition products of carboxylic-acids and glycosidically bonded aromates. **Deutsche Lebensmittel-Rundschau**, v.84, n.5, p.147-150, 1988.
- TAZAWA, S.; WARASHINA, T.; NORO, T. Studies on the constituents of Brazilian propolis II. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.47, n.10, p.1388-1392, 1999.
- 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.
- TOMAS-BARBERAN, F. A.; MARTOS, I.; FERRERES, F.; RADOVIC, B. S.; ANKLAM, E. HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.81, n.5, p.485-496, 2001.
- URONES, J. G.; MARCOS, I. S.; DIEZ, D.; CUBILLA, L. Tricyclic diterpenes from *Hyptys dilatata*. **Phytochemistry**, v.48, n.6, p.1035-1038, 1998.

- VANHAELEN, M.; VANHAELEN-FASTRÉ, R. High performance-liquid, gas-liquid and thin-layer chromatography of naturally occurring flavonoids, phenolic and related compounds. **Journal of Chromatography**, v.187, n.1, p.225-260, 1980.
- VELIKOVA, M.; BANKOVA, V.; SORKUN, K.; HOUCINE, S.; TSVETKOVA, I.; KUJUMGIEV, A. Propolis from the mediterranean region: Chemical composition and antimicrobial activity. **Zeitschrift fur Naturforschung C**, v.55, n.9-10, p.790-793, 2000.
- VILLANUEVA, V. R.; BOGDANOVSKY, D.; BARBIER, M.; GONNET, M.; LAVIE, P. Sur l'identification de la 3,5,7-trihydroxy flavone (galangine) à partir de la propolis. **Annals Institute Pasteur Paris**, v.106, p.292-302, 1964.
- VINSON, J. A.; DABBAGH, Y. A.; SERRY, M. M.; JANG, J. H. Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an in-vitro oxidation model for heart-disease. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.43, n.11, p.2800-2802, 1995.
- VIT, P.; SOLER, C.; TOMAS-BARBERAN, F. A. Profiles of phenolic compounds of *Apis mellifera* and *Melipona* sps. Honeys from Venezuela. **Food Research and Technology**, v.204, n.1, p.43-47, 1997.
- VOZIYAN, P.A.; HAUG, J.S.; MELNYKOVYCH, G. Mechanism of farnesol cytotoxicity- further evidence for the role of pkc-dependent signal-transduction in farnesol-induced apoptotic cell-death. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 212, n.2, p.479-486, 1995.
- WESTON, R. J.; MITCHELL, K. R.; ALLEN, K. L. Antibacterial phenolic components of New Zealand manuka honey. **Food Chemistry**, v.64, n.3, p.295-301, 1999.
- WHITE, J. W. Jr. Composition of honey. In: "*Honey: A comprehensive Survey*". (Ed.) E. Crane, p.157-182, Heinmann, London, 1975.
- WHITE, J. W. Jr. Honey. **Advanced Food Research**. v.24:287-290, 1978.
- WILKINS, A. L.; LU, Y. R.; TAN, S. T. Extractives from New Zealand honeys. 5. aliphatic dicarboxylic acids in New Zealand Rewarewa honey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.43, n.12, 3021-3025, 1995.

- WOLLENWEBER, E.; ASAKAWA, Y.; SCHILLO, D.; LEHMANN, U.; WEIGEL, H. A novel caffeic acid-derivative and other constituents of populus bud excretion and propolis (bee-glue). **Zeitschrift fur Naturforschung C**, v.42, n.9-10, p.1030-1034, 1987.
- WOLLENWEBER, E.; BUCHMANN, S.L. Feral honey bees in the Sonoran Desert: propolis sources other than poplars (*Populus* spp.) **Zeitschrift fur Naturforschung C**, v. 52, n.7-8, p.530-535, 1997.
- WOLLENWEBER, E.; DIETZ, V. H. Occurrence and distribution of free flavonoid aglycones in plants. **Phytochemistry**, v.20, n.5, p. 869-932, 1981.
- WRIGHT, M.M.; HENNEBERRY, A.L.; LAGACE, T.A.; RIDGWAY, N.D.; MCMASTER, C.R. Uncoupling farnesol-induced apoptosis from its inhibition of phosphatidylcholine synthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v.276, n.27, p.25254-25261, 2001.
- WULF, L. W.; NAGEL, C. W. Analysis of phenolic acids and flavonoids by high-pressure liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v.116, n.2, 271-279, 1976.
- YAMAUCHI, R.; KATO, K.; OIDA, S.; KANAEDA, J.; UENO, Y. Benzyl caffeate, an antioxidative compound isolated from propolis. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.56, n.8, p.1321-1322, 1992.