

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

**DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E  
BIOLÓGICAS DA PRÓPOLIS PRODUZIDA POR *Apis mellifera* NA  
REGIÃO NORDESTE DO BRASIL**

**Fabiana Fonseca de Moura**

Engenheira de Alimentos

**Orientador: Prof. Dr. Yong Kun Park**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Fabiana Fonseca de Moura, aprovada pela Comissão Julgadora em 23 de março de 2000.

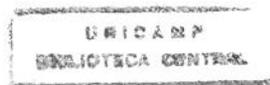
Campinas, 23 de março de 2000.

  
Prof. Dr. Yong Kun Park  
Presidente da Banca

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

CAMPINAS- SÃO PAULO

2000



UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE	BC
CHAMADA:	T/UNICAMP
	M865d
Ex.	
NUMERO BC/	41468
ROC.	278/00
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	11-07-00
CPO	

CM-00143111-9

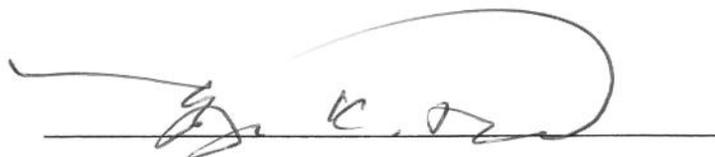
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

M865d Moura, Fabiana Fonseca de  
Determinação das propriedades físico-químicas e biológicas da própolis produzida por *Apis Mellifera* na região nordeste do Brasil / Fabiana Fonseca de Moura. – Campinas, SP: [s.n.], 2000.

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

1.Apis Mellifera – Brasil, Nordeste. 2.Própolis. I.Park, Yong Kun. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

**BANCA EXAMINADORA**



Prof. Dr. Yong Kun Park

(Orientador)



Profa. Dra. Hélia Harumi Sato

(Membro)



Profa. Dra. Hilary Castle de Menezes

(Membro)

---

Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy

(Membro)

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

Aos meus pais Walkiria e Aldo,  
Aos meus irmãos Daniel e Larissa,  
Às minhas avós Serafina e Luz

Aos meus tios  
Hélio e Yvette (*in memoriam*)

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

DEDICO

*"Formosa é a Mocidade, agradável é a Fortuna, admirável é a Liberdade, respeitável é a Inteligência, bendita é a Saúde, mas se o homem não possui Coragem para sobrepor-se aos bens e males da vida humana, a fim de aprender a consolidar-se no caminho para Deus, de pouca utilidade são os dons temporários na experiência transitória".*

Trecho extraído do Livro Jesus no Lar

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Yong Kun Park, meu agradecimento especial pela orientação, apoio e incentivo durante o decorrer deste trabalho.

À Prof. Hélia Harumi Sato pela ajuda e apoio durante todo o mestrado.

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

À CAPES, pela concessão de auxílio financeiro para a execução do presente trabalho.

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

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

À Edma, técnica do Laboratório de Nutrição.

Ao pessoal da Secretaria do Departamento de Ciências de Alimentos.

Aos amigos Alberto, Nei, Fernando, Renilson, Abdalla, Alfredo, Jean e Antenor que me ajudaram desde os meus primeiros dias em Campinas.

Às amigas Marlene Borges, Ionara Costa, Sueli Thomaziello, Márcia Castelano, Adriana Abreu, Letícia, Roberta Elen e Berenice.

Ao Narciso pelo carinho, paciência e compreensão.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	i
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	iii
<b>RESUMO</b> .....	iv
<b>ABSTRACT</b> .....	vi
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. OBJETIVO</b> .....	4
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	5
3.1. Origem Vegetal da Própolis.....	5
3.2. Composição Química da Própolis.....	9
3.3. Propriedades Biológicas da Própolis.....	13
3.3.1. Atividade Antimicrobiana da Própolis.....	13
3.3.2. Atividade Antioxidante da Própolis.....	18
3.3.3. Atividade Anticâncer da Própolis.....	19
3.3.4. Outras Atividades Biológicas da Própolis.....	21
3.4. Toxicidade da Própolis.....	22
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	24
4.1. Coleta das Amostras de Própolis.....	24
4.2. Acondicionamento das Amostras.....	24
4.3. Preparo dos Extratos Etanólicos de Própolis.....	25
4.4. Análises Físico-químicas dos Extratos Etanólicos de Própolis.....	25
4.4.1. Espectrofotometria na Região Ultravioleta Visível.....	25
4.4.2. Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência em Fase Reversa.....	26

4.4.3. Determinação de Flavonóides Totais com Base em Quercetina.....	26
4.4.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) em Fase Reversa.....	27
4.5. Análises Biológicas dos Extratos Etanólicos de Própolis.....	28
4.5.1. Teste de Antibiograma em Bactérias Patogênicas.....	28
4.5.1.1. Preparo dos discos de Extrato de Própolis.....	28
4.5.1.2. Análise da Atividade Antibacteriana.....	28
4.5.2. Análise da Atividade Antioxidante.....	29
4.5.3. Análise da Atividade Antiinflamatória.....	29
4.6. Análise Estatística.....	30
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>31</b>
5.1. Coleta das Amostras.....	31
5.2. Própolis Bruta.....	32
5.3. Extratos Etanólicos de Própolis.....	34
5.4. Análises Físico-químicas.....	37
5.4.1 Cromatografia de Camada Delgada de Alta Eficiência em Fase Reversa.....	37
5.4.2. Espectrofotometria na Região Ultravioleta-Visível.....	41
5.4.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa.....	43
5.4.4. Determinação dos Flavonóides Totais.....	45
5.5. Atividades Biológicas.....	46

5.5.1. Atividade Antibacteriana dos Extratos Etanólicos de Própolis.....	46
5.5.2. Atividade Antioxidante dos Extratos Etanólicos de Própolis.....	48
5.5.3. Atividade Antiinflamatória dos Extratos Etanólicos de Própolis.....	51
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>53</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>55</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Própolis Brutas coletadas na Região Nordeste do Brasil.....	33
FIGURA 2- Extratos Etanólicos de Própolis da Região Nordeste do Brasil (amostras CE1 a PI1).....	35
FIGURA 3- Extratos Etanólicos de Própolis da Região Nordeste do Brasil (amostras BA27 a PI2).....	36
FIGURA 4- Cromatogramas obtidos em Camada Delgada de Alta Eficiência dos Extratos Etanólicos de Própolis (amostras CE1 a PI1). Condições descritas no texto.....	38
FIGURA 5- Cromatogramas obtidos em Camada Delgada de Alta Eficiência dos Extratos Etanólicos de Própolis (amostras BA27 a PI2). Condições descritas no texto.....	39
FIGURA 6- Cromatogramas obtidos em Camada Delgada de Alta Eficiência e Espectros de Absorção dos Extratos Etanólicos das Própolis Representativas dos Grupos da Região Nordeste do Brasil.....	40

FIGURA 7 - Espectros de Absorção na Região UV-Visível dos Extratos Etanólicos das Própolis Representativas dos Grupos da Região Nordeste do Brasil.....	42
FIGURA 8 - Cromatogramas obtidos em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência dos Extratos Etanólicos das Própolis Representativas dos Grupos da Região Nordeste do Brasil.....	44
FIGURA 9 - Atividade Antioxidante dos Extratos Etanólicos das Própolis Representativas dos Grupos da Região Nordeste do Brasil.....	49
FIGURA 10- Atividade Antioxidante dos Extratos Etanólicos das Própolis Representativas dos Grupos da Região da Região Nordeste do Brasil após 3 horas de incubação.....	50
FIGURA 11- Atividade Antiinflamatória dos Extratos Etanólicos das Própolis Representativas dos Grupos da Região Nordeste do Brasil.....	52

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Local de Coleta das Amostras de Própolis.....	31
TABELA 2 - Teor de Flavonóides Totais, com base no Flavonóide Quercetina, dos Extratos Etanólicos das Própolis Representativas dos Grupos da Região Nordeste do Brasil.....	45
TABELA 3 - Atividade Antimicrobiana dos Extratos Etanólicos das Própolis.....	47

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi analisar os aspectos físico-químicos e as propriedades biológicas das própolis produzidas pelas abelhas *Apis mellifera* na Região Nordeste do Brasil. Para tanto, foram coletadas própolis diretamente em apiários nos Estados da Bahia, Pernambuco, Ceará e Piauí, em um total de 60 amostras. As própolis possuíam coloração amarronzada e consistência mole à temperatura ambiente, sendo extraídas à quente com etanol 80%.

Através da Cromatografia de Camada Delgada de Alta Eficiência em Fase Reversa e da Espectrofotometria na Região UV-visível foi possível agrupar as amostras coletadas em 6 tipos de própolis distintas, mais freqüentemente encontradas na Região Nordeste. Estes grupos foram representados pelas amostras CE3, PE3, PE5, BA8, BA11 e PI1. Na análise de Flavonóides Totais, os grupos apresentaram diferenças significativas pelo teste de Tukey. O extrato etanólico do grupo PE5 apresentou maior teor de flavonóides (46,87 mg/g), enquanto o extrato etanólico do grupo PE3 mostrou menor teor: < 1 mg/g. A diferença na composição química dos grupos foi detectada pela Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), na qual os grupos apresentaram uma distribuição dos picos no cromatograma bastante distinta entre si. Além disso, pode-se observar que a maioria dos compostos presentes na própolis do grupo BA11 apresentaram característica apolar.

Com relação às análises biológicas, foi observado que nem todas as própolis apresentaram atividade antibacteriana contra os microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*. O extrato etanólico de própolis do grupo BA11 revelou um alto potencial antibiótico. Os extratos

etanólicos de própolis dos grupos BA8, BA11 e PE5 apresentaram atividade antiinflamatória, com inibição da enzima hialuronidase em torno de 50%, sendo que os demais extratos etanólicos dos grupos variaram entre 20 e 30%. A atividade antioxidante foi detectada em todos os extratos etanólicos de própolis dos grupos, exceto no grupo PE3. Os resultados demonstraram diversidade das própolis da Região Nordeste, não somente em relação a sua composição química, mas principalmente, a sua atividade biológica.

## ABSTRACT

The aim of this study was to analyse the physico-chemical aspects and biological properties of the propolis produced by *Apis mellifera* in the Northeastern Region of Brazil. In order to achieve this, the samples were collected directly from the apiaries in Bahia, Pernambuco, Ceará and Piauí States, resulting in 60 specimens. The samples of propolis presented a brown coloration and soft consistency at room temperature and were extracted with hot 80% ethanol.

Using High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) and Ultraviolet-spectrophotometry (U.V. scanning) it was possible to group the specimens into six different types of propolis, more frequently found in the Northeastern Region of Brazil. These groups are represented by specimens CE3, PE3, PE5, BA8, BA11 and PI1. In the test for total flavonoids, the groups presented significant differences in the Tukey test. The group PE5 had the greatest flavonoid content (46.87 mg/g) whilst the group PE3 had the smallest (<1 mg/g). The differences in the chemical composition of the groups were detected by High Performance Liquid Chromatography (HPLC), in which the groups showed very different chromatographic peak distributions. Besides this, it was also possible to observe that most of the compounds presented by the propolis of the BA11 group, showed apolar characteristics. Concerning the biological analyse, it was observed that not all the propolis samples presented antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans*. The BA11 group showed a high antibiotic potential. Groups BA8, BA11 and PE5 presented antiinflammatory activity, showing hyaluronidase enzyme inhibition of about 50%. For the other groups, these values were around 20 and 30%. Antioxidant activity was detected in all

groups, except for PE3. The results demonstrated a great diversity in the propolis from the Northeastern Region, not only in their chemical composition, but especially in their biological activity.

## 1. INTRODUÇÃO

Há evidências do uso da própolis desde 300 anos A.C. No Egito antigo era usada como medicamento, antiséptico e para embalsamar os mortos (Thomson, 1990). Outros textos referem-se à própolis como “O bálsamo de Gileade” que era utilizado para curar feridas. A própolis também recebeu considerável atenção como base para vernizes usados em violinos, conferindo uma tonalidade superior a estes instrumentos (Jolly, 1978).

Apesar de se conhecer algumas atividades terapêuticas da própolis desde a Antigüidade, as primeiras pesquisas datam da segunda metade do século XX, quando notou-se um crescente interesse no estudo da composição química e farmacológica da própolis.

No Japão, o uso da própolis tomou um grande impulso a partir de 1985, após a realização do XXX Congresso Internacional da APIMONDIA na cidade de Nagóia, sendo extensivamente usada em alimentos e bebidas com intuito de melhorar a saúde. Hoje, o Japão é o principal comprador da própolis brasileira, a qual é definida internacionalmente como orgânica, devido a ausência de resíduos químicos e nucleares (Breyer, 1995).

Atualmente com o advento da Apiterapia, um ramo da medicina Alternativa, está havendo um interesse cada vez maior pelos produtos obtidos das abelhas da espécie *Apis mellifera*, como o mel, a geléia real, a apitoxina, o pólen e a própolis. Dentre os produtos apícolas, a própolis vem se destacando devido às suas diversas propriedades terapêuticas como antimicrobiana, antiinflamatória, cicatrizante, anestésica, dentre outras.

Própolis é o termo genérico dado à resina natural coletada pelas abelhas de diversas partes da planta como broto, botões florais e também de exsudatos resinosos, sendo transportados para dentro das colméias e modificados pelas abelhas, através de suas próprias secreções (Ghisalberti, 1979).

As abelhas utilizam a própolis com a finalidade de fechar as frestas ou reparar eventuais danos sofridos pela colméia, evitando assim, a entrada de vento e principalmente de insetos. Além disso, a própolis também é utilizada no preparo de locais assépticos para a postura da abelha rainha e na mumificação de insetos invasores. Devido a essa função de proteção da colméia, a resina produzida pelas abelhas foi denominada própolis, uma palavra derivada do grego, onde *pro* significa em frente de, em defesa de e *polis* cidade, designando em defesa da cidade, no caso, a colméia.

A composição química da própolis é muito complexa e variada, dependendo da ecologia botânica da região visitada pelas abelhas, podendo ainda, sofrer influência com tipo de abelha e a variedade genética das rainhas (Koo *et al.*, 1997; Soares, 1999). Em geral, a própolis é composta por 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 quantidades traços de vitaminas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, C e E (Ghisalberti, 1979). Os bálsamos e resinas contém uma quantidade enorme de compostos químicos, cerca de 200 compostos foram identificados nas própolis, dentre os quais, flavonóides, ácidos aromáticos, terpenóides, aldeídos, álcoois, ácidos alifáticos, ésteres, aminoácidos, esteróides e açúcares.

Em países de clima temperado da Europa e América do Norte, onde não há maior diversidade da vegetação, o choupo, *Populus L.*, da família *Salicaceae*, é a principal fonte vegetal. Esta espécie vegetal pode ser encontrada na Ásia e no Norte da África (Bankova *et al.*, 1989; Wollenweber *et al.*, 1987; Christov *et al.*, 1998).

Porém, constatou-se que as própolis provenientes de países de clima tropical apresentavam variação na composição química, dependendo do local de coleta. Partindo deste pressuposto, houve uma intensificação nos estudos sobre a origem, a composição química, e a atividade biológica das própolis da América do Sul ( Tomás-Barberán *et al.*, 1993; Aga *et al.*, 1994; Matsuno *et al.*, 1994). No caso específico do Brasil, onde a diversidade vegetativa é mais evidente, foram indicadas, até o momento, três espécies potencialmente produtoras de resinas para as abelhas, pertencentes às *Asteraceae* e *Myrtaceae* (Bastos, 1999), além da *Baccharis* spp. (Bankova, 1995). Koo (1996) em estudo recente verificou a variação na composição química e atividade antibacteriana das própolis provenientes das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil.

Neste trabalho foram considerados os aspectos físicos, a composição química e as propriedades biológicas para o estudo das própolis oriundas da Região Nordeste do Brasil.

## **2. OBJETIVO**

O presente trabalho teve como objetivo específico avaliar as própolis coletadas na Região Nordeste do Brasil com relação às suas características físicas, alguns aspectos físico-químicos e às atividades biológicas antibacteriana, antioxidante e antiinflamatória.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Origem Vegetal da Própolis

Papay *et al.* (1986) identificaram os compostos: ácido cafeico, ácido dimetil cafeico, ácido ferúlico e ácido isoferúlico nas árvores da espécie *Populi gemma* e nas própolis coletadas na região da Hungria.

Wollenweber *et al.* (1987) isolaram e identificaram um novo derivado do ácido cafeico,  $\gamma,\gamma$ -dimetil éster do ácido cafeico de exsudatos das árvores da espécie *Populus nigra*, o qual estava presente somente nas amostras de própolis da região Central da Europa. Esses autores estudaram então própolis coletadas numa região onde não há *Populus*, o Deserto Sonoran, no Arizona. Foram identificadas nessas própolis um flavonóide aglicona denominado xantomicrool (5,4'-dihidroxi-6,7,8-trimetoxiflavona), o qual foi encontrado em resina de folhas dos arbustos das espécies *Baccharis* e *Ambrosia deltoidea*. Além deste composto alguns flavonóides típicos dos “poplars” como crisina, tectocrisina, galangina e seus 3-,5-, e 7-metil ésteres também foram encontrados. Em 1997, Wollenweber *et al.*, continuando os estudos, descobriram uma outra planta como fonte de própolis específica desta região, denominada *Encelia farinosa*. Esta espécie ocorre em rochas ou ladeiras com pedregulhos. Os compostos encontrados são apolares, produzidos pelos ductos de resina sendo posteriormente excretados e depositados sobre folhas e troncos.

Bankova *et al.* (1989) isolaram dos botões florais das árvores *Populus nigra*, os mesmos ésteres isolados na própolis (dois ésteres do ácido cafeico e dois ésteres do ácido ferúlico com álcool pentenil isomérico), enquanto que na árvore *Populus italica* somente um éster foi encontrado e nenhum éster estava presente na árvore da espécie *Populus tremula*, confirmando a hipótese dos autores sobre a origem vegetal da própolis da região da Bulgária com relação aos botões florais da família das salináceas, principalmente *Populus nigra*. Apesar das diferentes espécies de “poplars” existentes em diversas regiões da Bulgária, não se sabe porque as abelhas preferem as secreções das árvores da espécie *Populus nigra*. Talvez seja pela sua ampla distribuição no país (Velchev citado por Bankova *et al.*, 1992).

Os constituintes das amostras de própolis da Áustria, Alemanha, Israel, Reino Unido e Estados Unidos foram característicos, qualitativamente, aos exsudatos resinosos dos botões de “poplars”, principalmente do gênero *Populus*, como *Populus nigra*, *deltadoides* e *euroamericana*. A própolis do Equador continha uma composição química bastante diferente, devido provavelmente à ausência de “poplars” nesta região (Greenaway *et al.*, 1991).

Bankova *et al.* (1992) relataram que os compostos fenólicos presentes na própolis da Mongólia são similares às secreções dos botões da árvore *Populus suaveolens*, contendo principalmente cafeatos e ácidos caféicos, que são importantes constituintes antibacterianos da própolis (Ghisalberti, 1979).

Análises feitas por Tomás-Barberán *et al.* (1993) com as própolis de *Apis mellifera* e abelhas nativas na Venezuela (região tropical) confirmaram a diferença em suas composições quando comparadas com as própolis das

regiões temperadas, onde a fonte de compostos fenólicos são árvores da espécie *Populus*. Os autores verificaram que os exsudatos das flores de *Clusia minor* e *C. major* (Guttiferae) continham benzofenonas poliprenilados encontrados na maioria das amostras de própolis desta região, sugerindo que estas plantas fossem as principais fontes para a própolis da região tropical da Venezuela.

Bonvehí & Coll (1994) identificaram 24 compostos fenólicos nas própolis oriundas da China, Brasil e do Uruguai. Dentre estes compostos os mais abundantes foram o ácido benzóico, derivados do benzaldeído e os flavonóides: acacetina e apigenina. Isoramnetina, pinocembrina, quercetina, rutina e vanilina estavam presentes em menores quantidades. A preponderância de apigenina e apigenina-4'-metil éter indica a diferença entre as própolis da Europa Central com as própolis da China e América do Sul.

Num estudo feito sobre compostos antimicrobianos na própolis brasileira, Aga *et al.* (1994) isolaram três compostos distintos: 3,5-diprenil-4-ácido hidróxicinâmico, 3-prenil-4-dihidrocinamoloxicinâmico e 2,2-dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano. A origem destes compostos ainda não está bem esclarecida; acredita-se que sejam provenientes de árvores das espécies *Baccharis* e *Flourensia*, as quais produzem os mesmos compostos prenilatados derivados de benzofenonas e ácidos cinâmicos (Bankova *et al.*, 1995).

Em geral, compostos aromáticos prenilatados são comuns em plantas tropicais. Na própolis da Venezuela são encontrados os prenilatados benzofenonas (Tomás-Barberán *et al.*, 1993), enquanto que na própolis

brasileira os principais constituintes são os *C*- e *O*- ácidos cinâmicos prenilatados.

Bankova *et al.* (1995) identificaram na própolis brasileira os compostos: prenil acetofenona, diprenil acetofenona, 2Z,6E-farnesol, um álcool sesquiterpeno, ácido dihidrocinâmico e ácido *p*-cumárico. Foram detectados traços de flavonas e flavanonas. Os autores confirmaram, com os resultados obtidos, a sugestão de que a composição química da própolis brasileira é substancialmente diferente das própolis das regiões temperadas devido a mudança na vegetação.

Uma característica distinta da própolis da Nova Zelândia foi a alta proporção (aproximadamente 70%) de dihidroflavonóides, como pinocembrina, pinobanksina e pinobanksina 3-acetato (Markham *et al.*, 1995). Estudos quantitativos dos compostos fenólicos das própolis do Brasil, Uruguai e China mostraram que os dihidroflavonóides representam 50% dos flavonóides totais da própolis brasileira e menos do que 10% nas própolis do Uruguai e da China, nos quais predominam flavona e flavonóis (Bonvehí *et al.*, 1994). Qualitativamente a fonte dos flavonóides na própolis da Nova Zelândia parece ser a mesma das própolis de outras regiões temperadas como Europa e América do Norte (Tomás-Barberán *et al.*, 1993).

Martos *et al.* (1997) analisaram a própolis da Tunísia que apresentou característica muito parecida a própolis da Europa contendo crisina, galangina, tectocrisina, pinocembrina, pinobanksina, cafeatos, diferindo apenas pela presença de miricetina 3,7,4',5'- tetrametil éter em grande quantidade e quercetina 3,7,3'-trimetil éter em menor quantidade. Nesta região onde não

existem “poplars” os autores identificaram os mesmos compostos característicos em exsudatos de folhas de *Cistus* spp.

Boudourova-Krasteva *et al.* (1997) isolaram e identificaram os principais compostos fenólicos das própolis oriundas de São Paulo (Brasil) como três flavonóides: um ácido cumárico prenilatado e dois novos benzopiranos, E e Z 2,2,-dimetil-6-carboxietenil-8-prenil-2H-benzopiranos. Nas regiões tropicais, os exsudatos de folhas da árvore da espécie *Baccharis* parece ser uma das fontes para a própolis (Marcucci *et al.*, 1998).

No Egito, onde existem “poplars”, mas de clima subtropical e tropical conectado com uma flora específica, as amostras de própolis apresentaram uma composição química complexa, sendo observada uma quantidade maior de ésteres e carboidratos quando comparadas com as amostras de própolis da Europa e uma quantidade menor de flavanonas. Tem sido encontrados compostos análogos às amostras de própolis do Brasil que nunca foram encontrados nas amostras de própolis da Europa (Christov *et al.*, 1998).

### 3.2. Composição Química da Própolis

Estudos sobre a composição química da própolis eram raros até 1969, provavelmente devido à ausência de técnicas apropriadas para o fracionamento e análise dos constituintes da própolis (Ghisalberti, 1979).

Popravko (citado por Ghisalberti, 1979), aplicando técnicas modernas de separação e identificação dos componentes da própolis, isolaram seis flavonóides: 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona (acacetina); 5-hidroxi-4',7dimetoxiflavona; 3,5,7-trihidroxi-4'-metoxiflavona (kamferide); 3,4',5-

trihidroxi-7-metoxiflavona (ramnocitrina); 5,7-dihidroxi-3,4'-dimetoxiflavona e 3,5-dihidroxi-4',7-dimetoxiflavona. Duas flavanonas: (-)-5-hidroxi-7-metoxiflavanona (- (-)- pinostrobina) e (-)-5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavanona, além de um simples composto aromático 3-hidroxi-4-metoxibenzaldeído (isovanilina). Obtiveram também evidências da presença de quercetina (3,5,7,3',4'-pentahidroxiflavona), um outro derivado de flavona.

Durante a década de 70, outros compostos químicos pertencentes ao grupo dos flavonóides foram isolados e identificados, como a galangina (3,5,7-trihidroxiflavona); pinocembrina (5,7-dihidroxiflavanona), crisina (5,7-dihidroxiflavona), tectocrisina (5-hidroxi-7-metoxiflavona) e isalpina (3,5-dihidroxi-7-metoxiflavona) Villanueva (citado por Koo, 1996).

Greenaway *et al.* (1991), através da cromatografia gasosa e espectrometria de massa, identificaram 150 compostos na própolis do Hemisfério Norte. Dentre eles os compostos voláteis 2-metilbutil acetato, isobutil isobutirato, 3-metil-3-buten-1-ol e prenil acetato.

Bankova *et al.* (1987) identificaram na própolis do sul da Bulgária os seguintes flavonóides: pinocembrina, galangina, crisina, quercetina e tectocrisina, sendo que a pinocembrina juntamente com a galangina, correspondem a mais do que 50% do total dos flavonóides presentes na própolis. O principal ácido aromático na própolis é o ácido caféico e seu  $\beta$ -preniletil éster é um dos principais representantes do grupo dos ésteres dos ácidos aromáticos (Bankova, 1992).

Chi *et al.* (1994) verificaram, através de eletroforese capilar, quantidades de 2,34, 3,84, 3,33 e 0,25 mg/g de ácido cafeico, ácido 3,4-dimetoxicinâmico, ácido isoferúlico e quercetina respectivamente em amostras de própolis comerciais. Quantidades similares destes compostos têm sido encontrados em própolis da China e da América do Sul (Bonvehí *et al.*, 1994).

Existem vários relatos na literatura científica sobre o comportamento cromatográfico dos flavonóides. Castele *et al.* (1982) relataram que os compostos inicialmente adsorveriam na fase estacionária hidrofóbica e seriam subsequentelemente eluídos com a fase móvel, dependendo do grau de formação das pontes de hidrogênio. Seu trabalho teve como base os estudos feitos por Wulf & Nagel (1976), os quais descobriram que um dos fatores que faz com que as flavonas sejam menos polares do que as flavanonas é uma grande densidade de elétrons sobre o átomo de oxigênio do grupo carbonil na posição 4 das flavonas, resultando numa estrutura de ressonância e apresentando uma carga parcial negativa. Esta grande densidade de elétrons entre o grupo 5-hidroxil e o grupo ceto da posição 4 permite a formação de uma forte ponte de hidrogênio intramolecular. Assim os grupos funcionais se apresentam menos polares para o solvente diminuindo a capacidade de interação. Os flavonóis, por apresentarem uma interação mais fraca do grupo hidroxila da posição 3 com o hidrogênio do grupo ceto da posição 4, diminui menos sua polaridade. Portanto, o grupo de pesquisa de Castele concluiu que os flavonóides, de um modo geral, que apresentarem diferenças no número de grupos OH, em posições diferentes de 3, podem ser facilmente separados.

Com relação a cromatografia de camada delgada de alta eficiência (HPTLC), Heimler (1986) relacionou o comportamento cromatográfico dos

flavonóides aglicona com o número e a posição dos grupos hidroxilas substituintes. Utilizando placas RP-18 e Sil C<sub>18</sub>-50, e tendo como eluente 1M ácido acético em 60% de metanol, observou-se que as flavanonas ficaram pouco retidas na placa comparando-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, com exceção da galangina e quercetina, que apresentavam um grupo hidroxila na posição 3, não resultando em aumento da polaridade. Observou-se também que a introdução de um grupo metoxil aumenta a retenção dos compostos.

Num estudo sobre métodos cromatográficos, Vanhaelen & Vanhaelen-Fastré (1980) observaram que a cromatoplaça RP-8 de fase ligada apresentou melhor resolução para HPTLC com um sistema solvente simples composto por etanol e água (45:55).

Os autores observaram que na identificação dos ácidos aromáticos e dos fenóis por HPLC a presença dos flavonóides no extrato bruto não interferiu, entretanto alguns fenóis interferiram na separação dos flavonóides. A cromatografia líquido-gás (GLC) apresentou algumas limitações na etapa de derivatização dos flavonóides acacetina e apigenina, além de necessitar altas temperaturas para a eluição dos flavonóides heterocíclicos. Apesar dessas restrições, os autores consideraram GLC o melhor método de separação dos compostos analisados nos extratos brutos de plantas.

Bankova *et al.* (1982) descreveram uma técnica de análise qualitativa por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) para determinar os principais flavonóides presentes na própolis, com o auxílio de padrões internos. Obteve-se

boa separação dos flavonóides utilizando a coluna de fase reversa Partisil PXS/10/25 ODS e ODS-HC-SIL-X-1 com sistema solvente água-metanol-ácido acético (60:75:5), podendo ser utilizada para outras misturas naturais de flavonóides agliconas. A fase eluente água-metanol-ácido acético (65:30:5) apresentou problema na eluição de flavonas e flavonóis, porém revelou a presença de dihidroflavonol, 2-hidroxi-flavanona e isoflavona.

Bankova *et al.* (1987) identificaram compostos fenólicos na própolis através da cromatografia capilar gasosa GC/MS. Dois novos compostos cetônicos, dihidroxiacetofenona com grupo hidroxil adjacente e hidroximetoxiacetofenona foram identificados na própolis do Sul da Bulgária. Os ésteres dos ácidos fenólicos apresentavam em maior quantidade nas própolis do Norte da Bulgária.

Ackermann (1991) descreveu um método analítico rápido para cromatografia de camada delgada (TLC) com o intuito de se fazer um controle rápido e eficiente da qualidade da própolis. Foram utilizadas placas de sílica e dois sistemas solventes, tolueno:clorofórmio:acetona (40:25:35) e hexano:etil acetato:ácido acético (60:40:3), sendo posteriormente observadas sob luz U.V. a 254 nm.

### 3.3 Propriedades Biológicas da Própolis

#### *3.3.1. Atividade Antimicrobiana da Própolis*

A atividade antimicrobiana da própolis *in vitro* foi verificada contra várias linhagens de bactérias Gram positivas (*Bacillus brevis*, *B.cereus*,

*B.cereus* var. *mycoides*, *B.megatherium*, *B.polymyxa*, *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).

Num estudo mais detalhado sobre a atividade antimicrobiana da própolis, Lindenfelser *et al.* (1967) testaram 15 amostras coletadas de diferentes partes dos Estados Unidos. Os extratos de própolis apresentaram uma alta atividade inibitória, *in vitro*, contra 25 das 39 espécies de bactérias testadas. *Bacillus larvae* mostrou maior sensibilidade ao extrato etanólico de própolis. Nas outras 24 bactérias sensíveis estão incluídas cocos gram-positivas. Das bactérias gram-negativas, 7 foram resistentes. Das 39 espécies de fungos, 20 foram inibidas. Resistência foi apresentada por 2 leveduras.

Estudos feito por Grange *et al.* (1990) verificaram um efeito inibitório preferencial da própolis sobre bactérias da forma de cocos e gram-positivas do que bactérias gram-negativas. O extrato etanólico de própolis (diluição 1:20) inibiu completamente o crescimento de *S.aureus*, *S.epidermidis*, *Enterococcus spp.*, *Corynebacterium*, *Branhella catarrhalis* e *Bacillus cereus*. Inibiu parcialmente o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* e não teve nenhum efeito sobre *Klebsiella pneumoniae*.

Schneidewind *et al.* (1979) detectaram na própolis uma mistura de 4 ésteres do ácido cafeico, dentre eles benzil cafeato e cinamil cafeato. Os autores concluíram que estes compostos eram os responsáveis pela atividade

antimicrobiana. Além desses compostos, METZNER *et al.* (1979), também atribuiu a atividade antimicrobiana aos compostos: galangina, pinocembrina, pinobanksina, pinobanksina-3-acetato. A galangina (3,5,7-trihidroxi-flavona) foi o principal composto envolvido na inibição do crescimento de *B.subtilis*.

No intuito de identificar um composto responsável pela atividade bacteriostática da própolis, Bonvehí *et al.* (1993) separaram várias frações do extrato etanólico de própolis. Apenas a galangina isoladamente, pareceu mostrar atividade bacteriostática. O potencial biológico da própolis se deve a um sinergismo que ocorre entre os muitos constituintes, dentre eles os flavonóides e os compostos fenólicos.

Porém, Aga *et al.* (1994) isolaram da própolis brasileira um composto antimicrobiano identificado como 3,5-diprenil-4-ácido hidroxicinâmico (Artepillin C), que mostrou uma atividade antimicrobiana relativamente alta contra os fungos *Microsporum gypseum* e *Arthroderma benhamiae*, além das bactérias *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium equi*, *Micrococcus lysodeikticus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium phlei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Thermoactinomyces intermedius*. Os autores compararam a atividade antimicrobiana dos compostos isolados da própolis do Brasil e parece que esta atividade é igual ou maior a atividade da própolis da Alemanha.

Bankova *et al.* (1995) também relataram que a atividade apresentada pela própolis brasileira pareceu quase idêntica à das amostras de própolis da Bulgária. A atividade antibacteriana foi encontrada numa mistura de compostos voláteis como fenóis, ésteres, terpenóides, dentre outros. Outros estudos

determinaram que os ácidos diterpênicos eram responsáveis pela atividade bacteriana (Bankova *et al.*, 1996).

Park *et al.* (1998a, 1998b) estudaram a atividade antimicrobiana das própolis de várias regiões do Brasil contra *Streptococcus mutans*, *Actinomyces naeslundii* e *Staphylococcus aureus* e observaram que todas as amostras inibiram tanto o crescimento dos microrganismos quanto a enzima glicosiltransferase produzida pelo microrganismo *S. mutans*. Uma própolis do Rio Grande do Sul (RS2) demonstrou maior inibição da atividade enzimática e crescimento da bactéria.

Os extratos etanólicos de própolis potencializam o efeito de certos antibióticos. A ação da biomicina, tetraciclina, neomicina, polimixina, penicilina e estreptomicina contra *S. aureus* e *E. coli* foi aumentada pela adição da própolis ao meio nutriente. Em alguns casos o efeito bacteriostático foi aumentado de 10 a 100 vezes (Ghisalberti, 1979).

A atividade antifúngica da própolis foi observada contra os fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceous*, *Penicillium viridicatum* e *Penicillium notatum*, os quais foram inibidos pelo extrato etanólico de própolis na concentração de 15-30g / L (Pepeljnjak citado por Ghaly *et al.*, 1998).

A própolis também apresentou um importante potencial antifúngico contra *Trichophyton* e *Microsporum* na presença de propilenoglicol, o qual interagiu sinergicamente com a própolis Millet-Clerc (citado por Marcucci, 1995).

Estudos mostraram que a própolis além de inibir o crescimento micelial do fungo *A. flavus* em 11-80% também inibiu a produção de aflatoxina B1 em 34-100%, na concentração de 1-4g / L do extrato etanólico de própolis (Ghaly *et al.*, 1998).

Amoros *et al.* (1992a, 1992b) investigaram o efeito *in vitro* da própolis sobre alguns vírus, incluindo herpes simplex tipo 1, mutante resistente a aciclovir, herpes simplex tipo 2, adenovírus tipo 2, vírus da estomatite vesicular e poliovírus tipo 2. A inibição do crescimento do poliovírus foi claramente observada. Na concentração de 30 µg/mL, a própolis reduziu o título viral da herpes simplex em 1000 vezes. Entretanto o vírus da estomatite vesicular e o adenovírus foram menos susceptíveis. Em adição a esses efeitos, a própolis exerceu uma ação viricidal sobre os vírus envelopados herpes simplex (HSV) e vírus da estomatite vesicular (VSV).

Foram feitos estudos para relacionar a atividade antiviral da própolis com seus constituintes. Um éster de ácido cinâmico substituído, isopentenil ferulato, inibiu a atividade infecciosa do vírus influenza A (linhagem Hong Kong) em 50 µg/mL (Serkedjieva *et al.*, 1992). Resultados similares foram encontrados por Amoros *et al.* (1994) em testes *in vitro* contra o vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) pelo composto 3-metilbut-2-enil cafeato, identificado na própolis.

Scheller *et al.* (1977) relataram a atividade antiprotozoária da própolis *in vitro* sobre 3 linhagens de *Trichomonas vaginalis*. As soluções dos extratos etanólicos de própolis apresentaram uma atividade letal sobre as linhagens em uma concentração de 150 mg/mL.

### 3.3.2. Atividade Antioxidante da Própolis

Krol *et al.* (1990) estudaram a atividade antioxidante da própolis e da quercetina, um flavonol presente na própolis. A própolis apresentou uma atividade antioxidante de 86%. Os autores observaram que o efeito antioxidante do extrato etanólico de própolis é de aproximadamente um terço do efeito antioxidante da quercetina.

Vinson *et al.* (1995) em estudos *in vitro* com sistemas modelos de oxidação de lipoproteína, analisaram os efeitos antioxidantes em lipoproteína de baixa densidade, responsáveis pela arterosclerose. Os flavonóides, principalmente os flavonóis, demonstraram ser potentes antioxidantes. Segundo os autores, os resultados desse estudo demonstraram uma possível ação benéfica dos flavonóides na dieta sobre os problemas cardíacos, como a arterosclerose.

Park *et al.* (1998c, 1998d) detectaram que os extratos etanólicos de própolis preparados com 70 e 80% de etanol apresentaram a maior atividade antioxidante, sendo que, nestas condições houve extração da maioria dos flavonóides.

Apesar dos flavonóides serem considerados os antioxidantes mais abundantes e efetivos da própolis, outros constituintes fenólicos contribuem para essa atividade como o composto benzil cafeato isolado da própolis (Yamauchi *et al.*, 1992).

Basnet *et al.* (1997) isolaram do extrato aquoso da própolis brasileira um novo composto, propol (3-[4-hidroxi-3-(3-oxo-but-1-enil)-fenil]-ácido acrílico), o qual apresentou uma alta atividade antioxidante quando comparado a outros antioxidantes.

### 3.3.3. Atividade Anticâncer da Própolis

Hladón *et al.* (1980) demonstraram que o extrato etanólico de própolis tinha propriedades citotóxicas contra carcinoma da epiderme oral humana (KB) e linhas de células HeLa. Baseado em ensaios de inibição das células Ltk<sup>-</sup>, Grunberger *et al.* (1988), isolaram e caracterizaram um composto biologicamente ativo, parcialmente responsável pela atividade citostática da própolis, conhecido como CAPE (phenetil éster do ácido cafeico). Os autores observaram diferentes citotoxicidades do CAPE com relação as células normais e células transformadas de melanomas de humanos e ratos. As células transformadas foram mais susceptíveis ao CAPE, apresentando 80% de inibição numa concentração de 20 µg/mL.

Rao *et al.* (1995) mostraram que dieta com pheniletil-3-metilcafeato (PEMC) inibiu a incidência e multiplicidade de adenocarcinomas invasivo, não-invasivo e total do cólon, intestino, e tumores dos canais do ouvido. Além disso foi observada uma diminuição do volume do tumor do cólon em 43% quando comparado com o controle.

Matsuno (1995) isolou da própolis brasileira um novo clerodeno diterpênico. Este composto inibiu hepatomas em concentrações em torno de 10 µg/mL, ocorrendo danos nestes hepatomas em concentrações acima de 20

$\mu\text{g/mL}$ . O composto também apresentou citotoxicidade sobre as células de carcinoma pulmonar humano HLC-2, HeLa, KB e células de ratos W3Y.

Recentemente outras substâncias citotóxicas foram isoladas da própolis brasileira, sendo caracterizadas como isômeros diterpênicos (13Z e 13E-ácido sinfioreticulico), 3,5-diprenil-4-ácido hidróxicinâmico (artepilin C) (Matsuno *et al.*, 1997a; Matsuno *et al.*, 1997b) e um novo derivado de benzopirano (Matsuno *et al.*, 1998). Estes compostos apresentaram citotoxicidade sobre carcinomas pulmonares humano HLC-2, HeLa, KB e HuH 13 (carcinoma hepatocelular humano), com valores de  $\text{ID}_{50}$  de 20-50  $\mu\text{g/mL}$ .

Foram feitos outros estudos que relatam a atividade biológica dos derivados do ácido cafeoil quínico isolados do extrato aquoso da própolis brasileira. Tatefuji *et al.* (1996) relacionaram os derivados do ácido cafeoil quínico com o aumento da mobilidade e difusão dos macrófagos. Os autores sugeriram que o aumento da mobilidade e da difusão depende da adição de grupos cafeoil na molécula do ácido cafeoil quínico.

Banskota *et al.* (1998) isolaram e identificaram alguns compostos da própolis brasileira. Dentre estes compostos o conferil aldeído, betuletol, kamferide e ermanim, apresentaram potente atividade citotóxica com valores de  $\text{ID}_{50}$  menores ou iguais a 10  $\mu\text{g/mL}$ .

Estes resultados indicam que a atividade anticancer da própolis brasileira advém principalmente dos compostos fenólicos, os quais são também responsáveis por outras atividades biológicas (Marcucci, 1995).

### 3.3.4. Outras Atividades Biológicas da Própolis

Paintz *et al.* (1979) observaram o efeito anestésico local da própolis sobre a córnea de coelho e de rato. Anestesia total foi obtida tanto com o extrato etanólico de própolis quanto com os compostos 5,7-dihidroxi-flavona (pinocembrina), 5-hidroxi-7-metoxiflavona (pinostrobin) e com uma mistura dos ésteres do ácido cafeico. Os autores também relataram que a pinocembrina e a mistura dos ésteres do ácido cafeico, quando aplicada subcutâneamente, produziram efeito anestésico próximo ao produzido pela lidocaína.

Rodríguez *et al.* (1997) relataram um efeito antiinflamatório e hepatoprotetor da própolis de Cuba sobre alterações nos hepatócitos de ratos induzidas por galactosamina. Os autores sugerem que esse efeito protetor esteja relacionado as propriedades antioxidantes do extrato de própolis, por ocorrer peroxidação lipídica durante os danos no fígado causados pela indução por galactosamina. González *et al.* (1995) estudaram o efeito hepatoprotetor da própolis em ratos com hepatotoxicidade induzida por CCl<sub>4</sub>, onde também o modelo de peroxidação lipídica é o principal mecanismo na indução de danos no fígado.

Pouco depois Basnet *et al.* (1996 a) demonstraram em experimentos *in vitro* e *in vivo* que o extrato aquoso de própolis do Brasil também possui atividade antihepatóxico. Foram isolados da própolis quatro derivados do ácido di-o-cafeoil quínico com potente atividade hepatoprotetora (Basnet *et al.*, 1996 b). Estes compostos, na concentração de 10 µg/mL, apresentaram atividade maior do que a glicirrizina. Os autores sugerem que o grupo cafeoil

desempenha um importante papel na atividade hepatoprotetora e que a presença do ácido quínico aumenta essa atividade.

Khayyal *et al.* (1993) demonstraram através de vários modelos *in vitro*, que a própolis possui propriedades antiinflamatórias, inibindo a agregação plaquetária e inibindo a síntese de eicosanóides.

A atividade antiinflamatória da própolis também foi verificada por Mirzoeva *et al.* (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 diminui a via metabólica da lipoxigenase e o metabolismo do ácido araquidônico durante a inflamação *in vivo*.

J. Cizmarik *et al.* (1998), num estudo sobre o efeito protetor da própolis contra os agentes mutagênicos nitrovin e nitrosoguanidina, observaram uma redução da mutagenicidade desses compostos sobre as linhagens de *Salmonella thyphimurium* TA 97 e TA100, em torno de 50 e 60%, respectivamente.

### 3.4. Toxicidade da Própolis

Casos de hipersensibilidade têm sido reportados na literatura (Ghisalberti, 1979). A própolis contém substâncias com propriedades potencialmente alérgicas conhecidas, como ácido cinâmico e vanilina. Outros ingredientes são ceras, óleos, pólen e bálsamo (Petersen, 1977).

Desde a primeira descrição, em 1915, de dermatite de contato em apicultor, numerosos casos têm sido observados. Há incidência

aproximadamente de 200 casos de dermatite de contato relacionados a própolis (Hausen *et al.*, 1987).

Muitos casos de alergia a própolis foram descritos em países do Leste da Europa e na Itália. Por causa do uso corrente de “produtos naturais”, como cosméticos de própolis, aumentaram os casos de dermatite de contato em países do Oeste da Europa, como a Espanha (Ratón, 1990).

A própolis possui uma baixa toxicidade oral aguda, apresentando LD<sub>50</sub> variando de 2000 a 7300 mg/Kg para ratos. Administrada oralmente em ratos em 4000mg/Kg/dia por 2 semanas não teve efeito. A administração por 90 dias para ratos em 1400 mg/Kg/dia na água foi declarado um NOEL (no-effect level), e com 60 dias demonstrou um efeito não relacionado a própolis em 2470 mg/kg/dia (Burdock, 1998).

Existe um grande número de diferentes compostos alergênicos na própolis e em exsudatos dos botões de “poplars”, dentre os quais os cafeatos desempenham importante papel. Hausen *et al.* (1992) identificaram o composto 3-metil-2-butenil cafeato como o composto de maior potencial alergênico na própolis. Outros constituintes como isoferulatos, flavonoides agliconas, ácidos aromáticos livres contribuem para o desenvolvimento da sensibilidade, porém em menor extensão. O potencial alergênico da própolis depende da presença ou ausência dos compostos alergênicos, além da quantidade, os quais variam nas amostras de própolis (Rudzki *et al.*, 1998).

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Coleta das Amostras de Própolis**

As amostras de própolis bruta, foram coletadas em apiários da Região Nordeste do Brasil, nos Estados da Bahia (BA), Pernambuco (PE), Ceará (CE) e Piauí (PI) no período de novembro a dezembro de 1998.

As própolis foram coletadas raspando-se as fendas formadas entre a parte inferior da tampa e a melgueira superior da colméia. Após a raspagem, as amostras foram acondicionadas em frascos plásticos, limpos e secos, devidamente etiquetados.

### **4.2. Acondicionamento das Amostras**

No Laboratório de Bioquímica do Departamento de Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp, as amostras foram vistoriadas para a retirada de eventuais impurezas como pedaços de madeira, insetos, abelhas mortas e cera, a fim de obter a própolis da forma mais limpa possível. Numa etapa posterior, as própolis foram acondicionadas em frascos de plásticos, limpos e secos, sendo guardado sob o abrigo da luz, a 5°C.

### **4.3. Preparo dos Extratos Etanólicos de Própolis**

O extrato etanólico de própolis foi preparado de acordo com Koo (1996). Para a extração foram pesados 2 gramas da própolis bruta e limpa em tubos de centrífuga e adicionados 15 ml de álcool etílico 80% (Merck). A extração foi feita a 70°C sob agitação por 30 minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 10000 x g por 5 minutos a 5°C, em centrífuga Beckman J2-21. O sobrenadante foi colocado em tubos de ensaio (15 x 150 mm) com tampa de rosca. Ao resíduo foram adicionados 10 ml de álcool etílico 80%, procedendo-se uma segunda extração nas mesmas condições por mais 30 minutos. Juntou-se o sobrenadante obtido ao primeiro totalizando um volume de 25 ml de Extrato Etanólico de Própolis (EEP) por amostra.

### **4.4. Análises Físico-químicas dos Extratos Etanólicos de Própolis**

#### **4.4.1. Espectrofotometria na Região Ultravioleta-Visível**

A determinação do espectro de absorção dos extratos etanólicos de própolis foi realizada segundo Koo (1996). Aliquotas de 25 µl de cada EEP obtido de acordo com o item 4.3, foram diluídas cada uma em 30 ml de álcool etílico 95% (Merck). As amostras foram submetidas a leitura em espectrofotômetro Beckman DU-70 com comprimento de onda variando entre 200 e 600 nm (“UV scanning”).

#### 4.4.2. Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência em Fase Reversa

As análises foram feitas de acordo com Koo (1996), onde alíquotas de 3 µL dos EEP foram aplicadas em cromatoplasmas do tipo RP-18 F<sub>254</sub>-S de 10x10 cm (Merck Co.). A cromatografia foi realizada com sistema solvente álcool etílico 95% : água destilada (55:45, v/v) durante aproximadamente 100 minutos. As placas cromatográficas desenvolvidas foram secas e observadas sob luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm, utilizando iluminador U.V. Cole Parmer, modelo UVP-UVGL-58.

#### 4.4.3. Determinação de Flavonóides Totais com Base em Quercetina

A determinação de flavonóides totais com base em quercetina foi realizada de acordo com a metodologia descrita no Boletim Informativo da Associação Japonesa de Saúde e Nutrição (1994) e por Park *et al.* (1995). Em tubos de ensaio contendo alíquotas de 0,5 mL do EEP, preparado de acordo com o item 4.3, previamente diluídas na proporção de 1:10, foram adicionados 4,3 ml de álcool etílico 80 %, 0,1 mL de uma solução de nitrato de alumínio 10% e 0,1 mL de acetato de potássio na concentração de 1M. No tubo controle foi adicionado 0,1 mL de água destilada ao invés de nitrato de prata. Ao final de 40 minutos de reação à temperatura ambiente, a absorvância das amostras foi medida em espectrofotômetro a 415 nm. A leitura final da absorvância foi obtida pela diferença entre as absorvâncias do tubo de reação e do tubo controle. Essa diferença expressa o teor de flavonóides totais com base na curva padrão de quercetina.

#### 4.4.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) em Fase Reversa

A análise dos flavonóides por cromatografia líquida de alta eficiência foi realizada utilizando cromatógrafo líquido Shimadzu modelo LC-10 equipado com coluna de fase reversa YMC PACK ODS-A e acoplado a um detector de arranjo de diodo com leitura em UV-visível a 254 nm. No cromatógrafo foram injetados, 20 µL de cada EEP, obtidos de acordo com o ítem 4.3. A fase móvel utilizada foi água:ácido acético (19:1) (solvente A) e metanol (solvente B) com um fluxo de 1 ml/min, temperatura de 35°C e o seguinte sistema gradiente: de 30% B para 40% B em 15 minutos, para 50% B em 30 minutos, para 60% B em 55 minutos, para 75% B em 75 minutos e para 90% B em 95 minutos, retornando a proporção inicial (30% B) em 105 minutos.

Para a identificação dos compostos foram utilizados os seguintes padrões: ácido cumárico e ácido ferrúlico; os flavonóis kanferol, kanferide, quercetina, galangina, ramnetina, isoramnetina e miricetina; o flavonol glicosilado rutina; as flavonas acacetina, apigenina, crisina e tectocrisina; as flavanonas pinocembrina, hisperidina, hisperetina e sakuranetina; e os dihidroflavonóis pinobanksina e pinobanksina-3-acetato. Todos os padrões foram obtidos da Extrasynthese A.A. Co. As amostras e os padrões foram previamente filtrados em membrana de teflon com porosidade 0,22 µm.

#### **4.5.2. Análise da Atividade Antioxidante**

A atividade antioxidante foi determinada pela oxidação acoplada do  $\beta$ -caroteno e do ácido linoleico como descrito por Hammerschmidt & Pratt (1978). Em um balão de fundo redondo foram adicionados 60 mg de ácido linoleico (Sigma), 200mg de Tween 40 e 5 mg de  $\beta$ -caroteno (Sigma), os quais foram dissolvidos em cerca de 50 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 distribuídas em tubos de ensaio, contendo 2 mL de água deionizada aerada e 0,5 mL dos EEP previamente diluídos na proporção de 1:10. Os demais tubos foram incubados a 40°C para proceder a reação de oxidação e a absorbância foi lida em intervalos de 60 minutos. A primeira leitura em espectrofotômetro a 470 nm foi feita imediatamente após a adição de todos os reagentes aos tubos de ensaio.

#### **4.5.3. Análise da Atividade Antiinflamatória**

A atividade antiinflamatória foi determinada através da atividade da enzima hialuronidase de acordo com Aronson *et al.* (1967) e Reissing *et al.* (1955). Foram adicionados 50  $\mu$ L dos EEP, obtidos de acordo com o item 4.3, nos tubos de reação. Em seguida adicionou-se 0,5 mL de ácido hialurônico (1,2 mg por mL de tampão acetato 0,1M em pH 3,6 contendo 0,15 M 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 $\mu$ L 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 ficaram incubados a 37°C por 40 minutos. A reação foi interrompida com a adição de 10 µL de NaOH 4N. A adição dos EEP nos tubos brancos foi feita após decorrido o tempo de reação. Numa segunda etapa da reação, 0,1 mL de tetraborato de potássio 0,8 M foi adicionado na mistura e colocado em ebulição por 3 minutos. Em seguida, adicionou-se 3 mL de *p*-dimetilaminobenzaldeído e a mistura foi incubada a 37°C por 20 minutos. Finalmente, a absorvância da mistura foi medida em espectrofotômetro a 585 nm, utilizando água como controle. O resultado desta análise foi obtido através da diferença entre a inibição da enzima hialuronidase dos tubos de reação e dos tubos branco.

#### **4.6. Análise Estatística**

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

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Coleta das Amostras

Foram coletadas 60 amostras de própolis, num total de 24 apiários visitados na Região Nordeste do Brasil referentes aos Estados da Bahia, Pernambuco, Ceará e Piauí (Tabela 1). A coleta foi feita diretamente nos apiários, onde foram coletadas própolis de diferentes caixas. Este tipo de coleta é de fundamental importância para o trabalho, pois proporciona uma identificação das própolis com atividades biológicas de interesse com o local exato de sua produção. Além disso, serve como base para estudos posteriores, mais aprofundados, sobre a interação do meio ambiente com a qualidade da própolis.

**Tabela 1- Local de Coleta das Amostras de Própolis**

<b>Município</b>	<b>Estado</b>	<b>Vegetação</b>	<b>Número de Amostras</b>
Crato	Ceará	Caatinga arbórea	3
Salgueiro	Pernambuco	Caatinga	3
Belo Jardim	Pernambuco	Caatinga	3
Juazeiro	Bahia	Caatinga	6
Senhor do Bonfim	Bahia	Caatinga	3
Remanso	Bahia	Caatinga	1
Salvador	Bahia	Mata Atlântica	3
Entre Rios	Bahia	Mata Atlântica	25
Barra da Choça	Bahia	Caatinga	5
Vitória da Conquista	Bahia	Caatinga arbórea	4
Anagé	Bahia	Caatinga	1
Picos	Piauí	Caatinga	2

## 5.2. Própolis Bruta

A análise da própolis bruta foi feita com base na sua coloração e consistência. A coloração da própolis é dependente de sua procedência, variando do marrom escuro, passando a uma tonalidade esverdeada até o marrom avermelhado; quanto a consistência, pode apresentar-se desde extremamente mole até rígida (Marcucci, 1996).

As características físicas das amostras de própolis da Região Nordeste variaram pouco, apresentando, de um modo geral, coloração amarronzada e consistência mole, semelhantes às própolis coletadas da Região Centro Oeste do Brasil (Koo, 1996). Porém duas amostras de própolis, uma coletada no Estado de Pernambuco (PE1) e outra coletada na Bahia (BA24) apresentaram coloração amarelada e consistência mais rígida (Figura 1).

Ainda assim essas características diferem completamente das própolis encontradas nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, sendo que, na Região Sudeste, as própolis apresentavam-se esverdeadas ou ligeiramente esverdeadas e de consistência rígida, e na Região Sul apresentavam-se com a mesma consistência, porém com colorações variando do verde-escuro até o marrom (Koo, 1996).

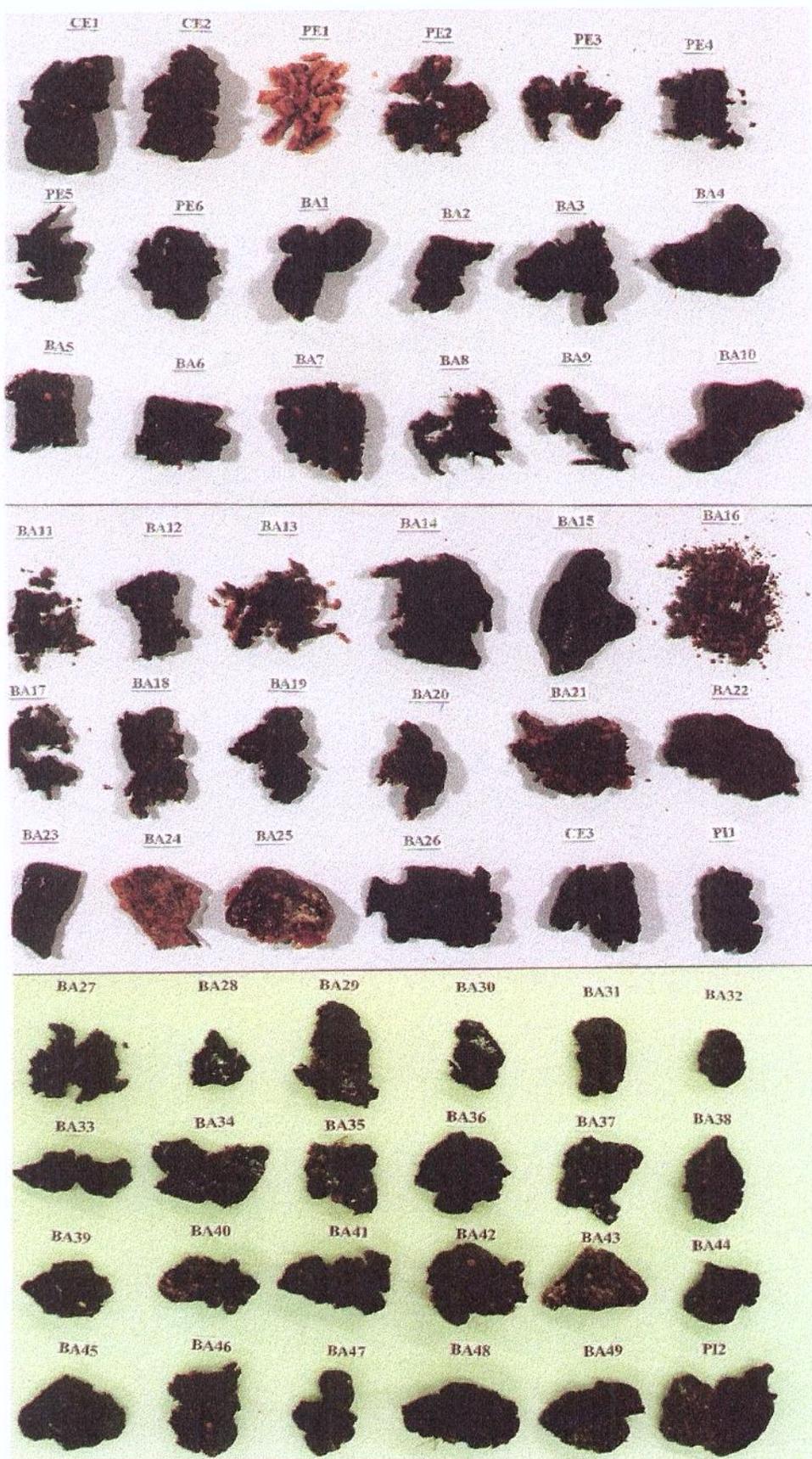


FIGURA 1- Própolis Brutas coletadas na Região Nordeste do Brasil

### 5.3. Extratos Etanólicos de Própolis

Os EEP, obtidos de acordo com o item 4.3, estão ilustrados nas Figuras 2 e 3. A maioria dos extratos possuíam coloração castanho com diferentes intensidades. Outros apresentaram coloração amarelada, e apenas 3 extratos obtidos das própolis de Pernambuco (PE4, PE5 e PE6) adquiriram coloração escura, praticamente preta (Figura 2).

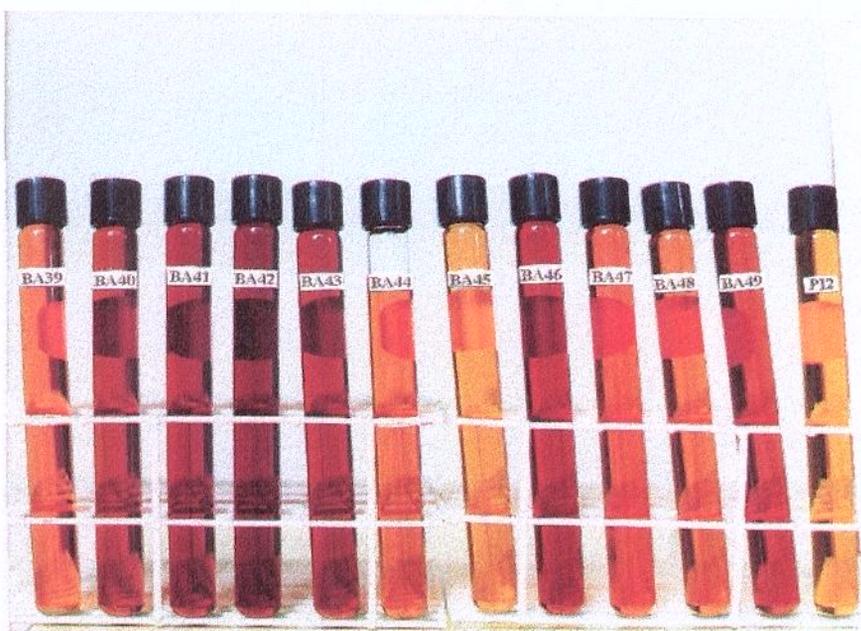
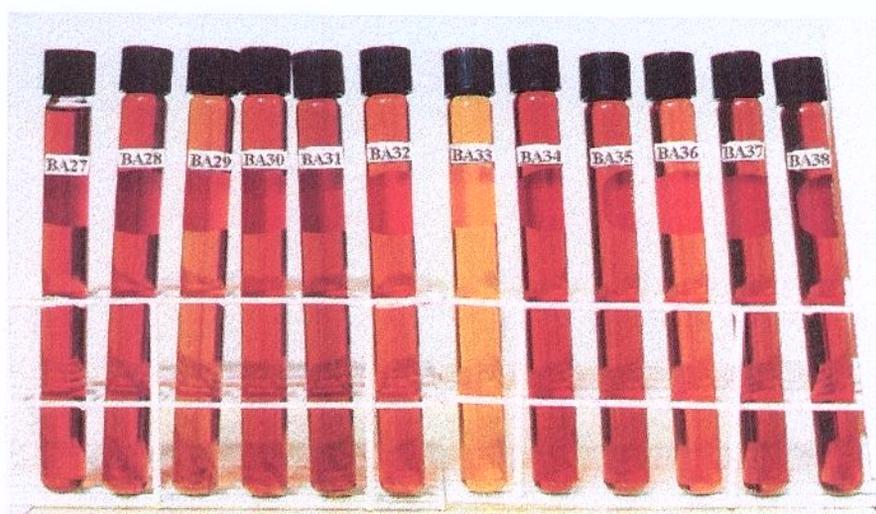
Um fato curioso foi observado nos extratos da região metropolitana de Salvador como, por exemplo, BA11 que possuía coloração marrom após a extração, e ao longo do tempo tornou-se escuro, semelhante aos extratos de Pernambuco.

A coloração do extrato foi estudada por Tomás -Barberán *et al.* (1993), que observou uma nítida correlação entre o conteúdo de compostos fenólicos nos extratos metanólicos de própolis e sua coloração. Os extratos com coloração avermelhada e escura continham grandes quantidades de fenólicos, enquanto os extratos amarelados continham estes compostos em menor quantidade.

Resultados similares foram encontrados nos extratos etanólicos analisados. Comparando-se a coloração dos extratos etanólicos com o Teste de Flavonóides Totais, pode-se observar que o extrato de coloração mais escura, PE5, obteve a maior quantidade de Flavonóides Totais (46,87 mg/g), sendo que o extrato PE3, de coloração amarelada, apresentou uma quantidade ínfima, menos de 1 mg de Flavonóides por grama de própolis.



**FIGURA 2- Extratos Etanólicos de Própolis da Região Nordeste do Brasil  
(amostras CE1 a PI1)**



**FIGURA 3- Extratos Etanólicos de Própolis da Região Nordeste do Brasil  
(amostras BA27 a PI2)**

## 5.4. Análises Físico-químicas

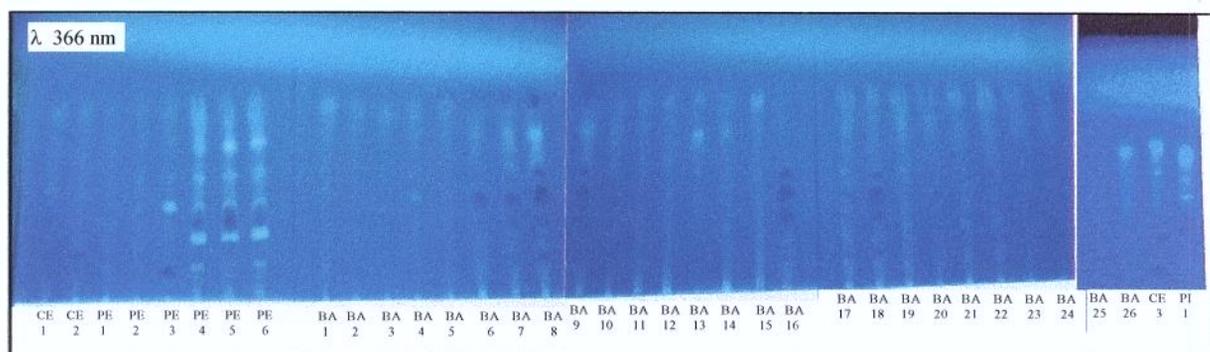
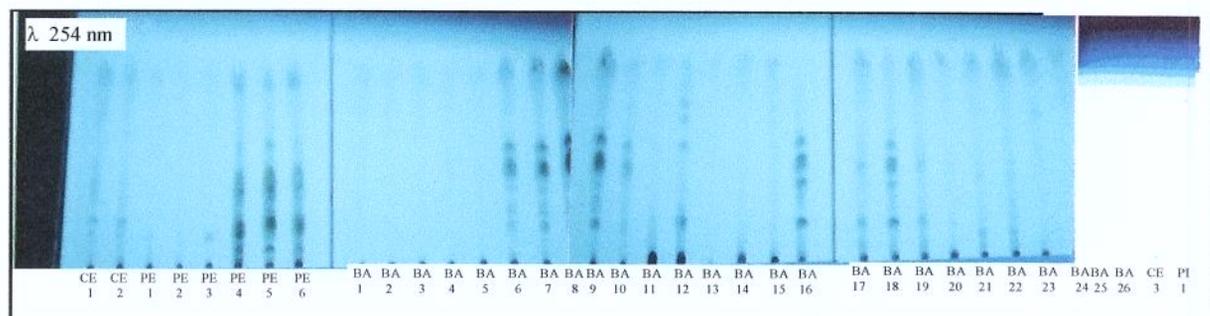
### 5.4.1. Cromatografia de Camada Delgada de Alta Eficiência em Fase Reversa

Os EEP foram analisados por Cromatografia de Camada Delgada de Alta Eficiência (CCDAE) em fase reversa, de acordo com o método descrito no item 4.4.2. A cromatografia em camada delgada permite uma visualização rápida da intensidade e número de frações dos compostos fenólicos existentes em cada amostra de própolis (Koo, 1996).

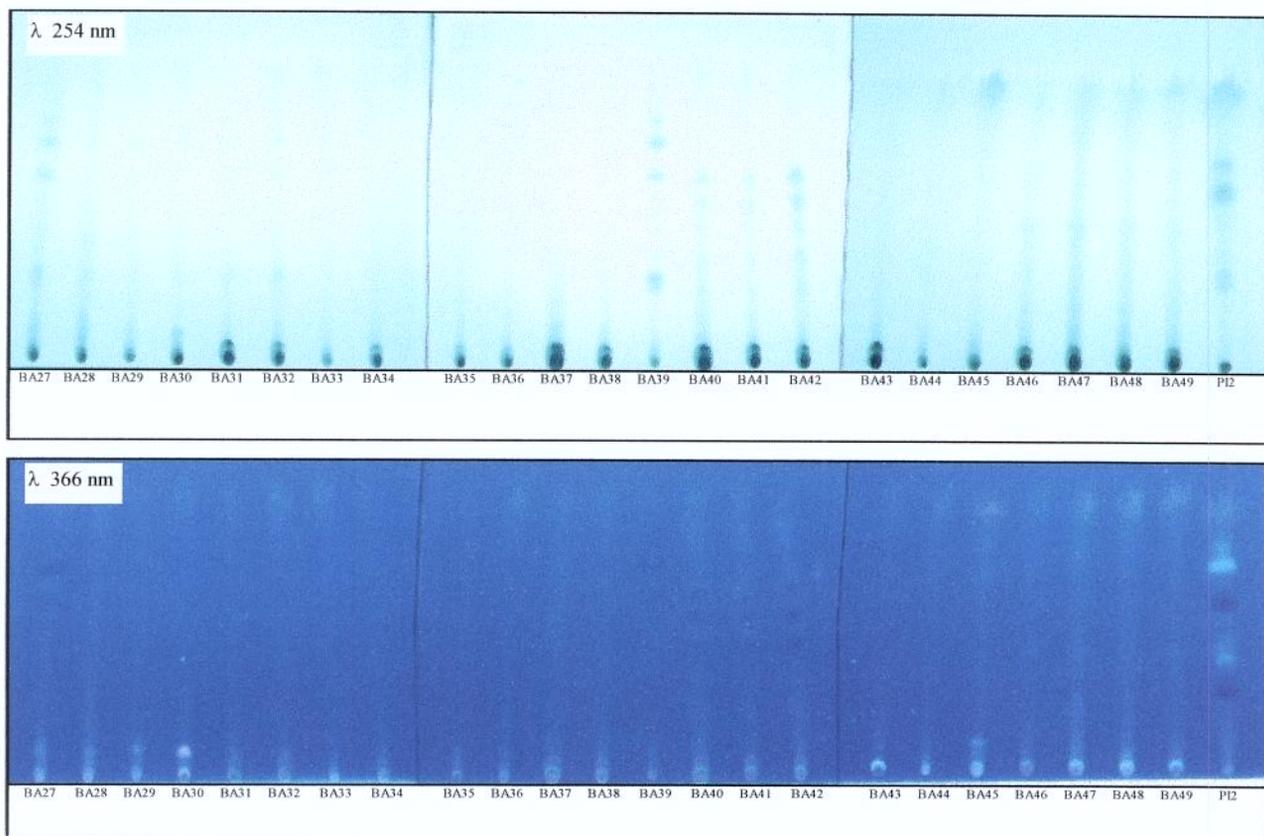
Os cromatogramas contendo todas as amostras de própolis coletadas foram visualizados com luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm, os quais estão ilustrados nas Figuras 4 e 5. Pode-se observar diferentes perfis cromatográficos apresentados pelos EEP, demonstrando uma diversidade na composição química das própolis analisadas.

Através dos perfis cromatográficos obtidos das análises de Cromatografia em Camada Delgada e Espectrofotometria na região do UV-Visível, foi possível agrupar as amostras coletadas em 6 grupos de própolis distintos mais frequentemente encontrados na Região Nordeste do Brasil. Os grupos foram representados pelas amostras CE3, PE3, PE5, BA8, BA11 e PI1.

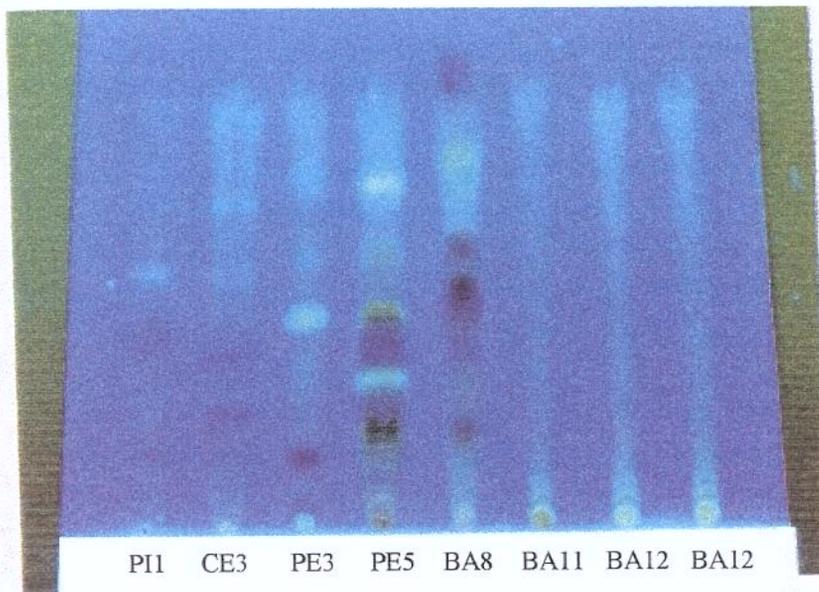
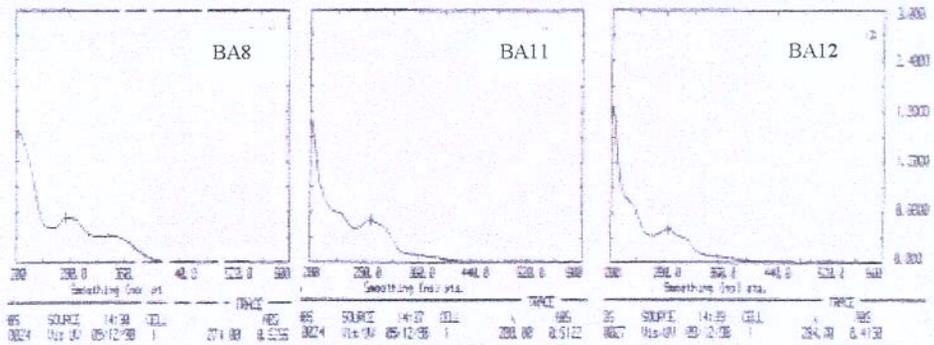
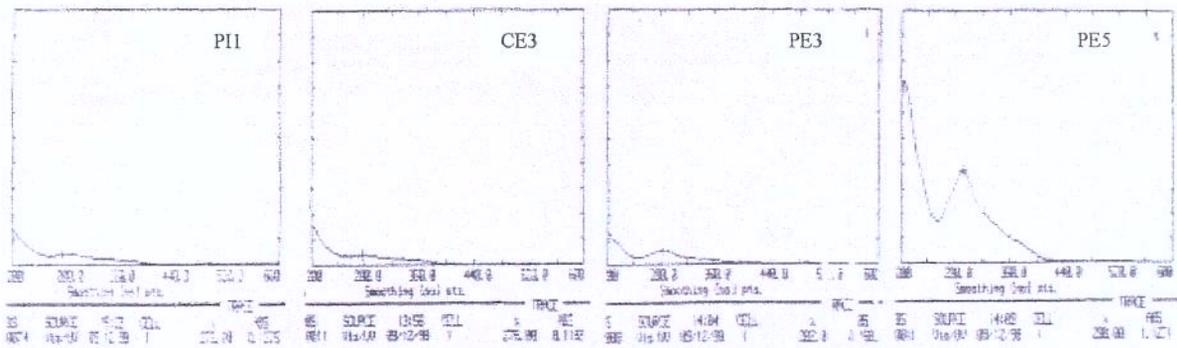
Na CCDAE constatou-se que os grupos PE5 e BA8 apresentaram maior número e intensidade das bandas no cromatograma quando visualizado a 366 nm, enquanto os grupos PE3, PI1 e CE3 apresentaram menores números de bandas, sendo qualitativamente diferentes entre si (Figura 6). Os compostos presentes no extrato etanólico do grupo BA11 não eluíram com a fase móvel água : etanol 95% (45:55), ficando adsorvido na fase estacionária.



**FIGURA 4- Cromatogramas obtidos em Camada Delgada de Alta Eficiência dos Extratos Etanólicos de Própolis (amostras CE1 a PI1). Condições descritas no texto.**



**FIGURA 5- Cromatogramas obtidos em Camada Delgada de Alta Eficiência dos Extratos Etanólicos de Própolis (amostras BA27 a PI2). Condições descritas no texto.**



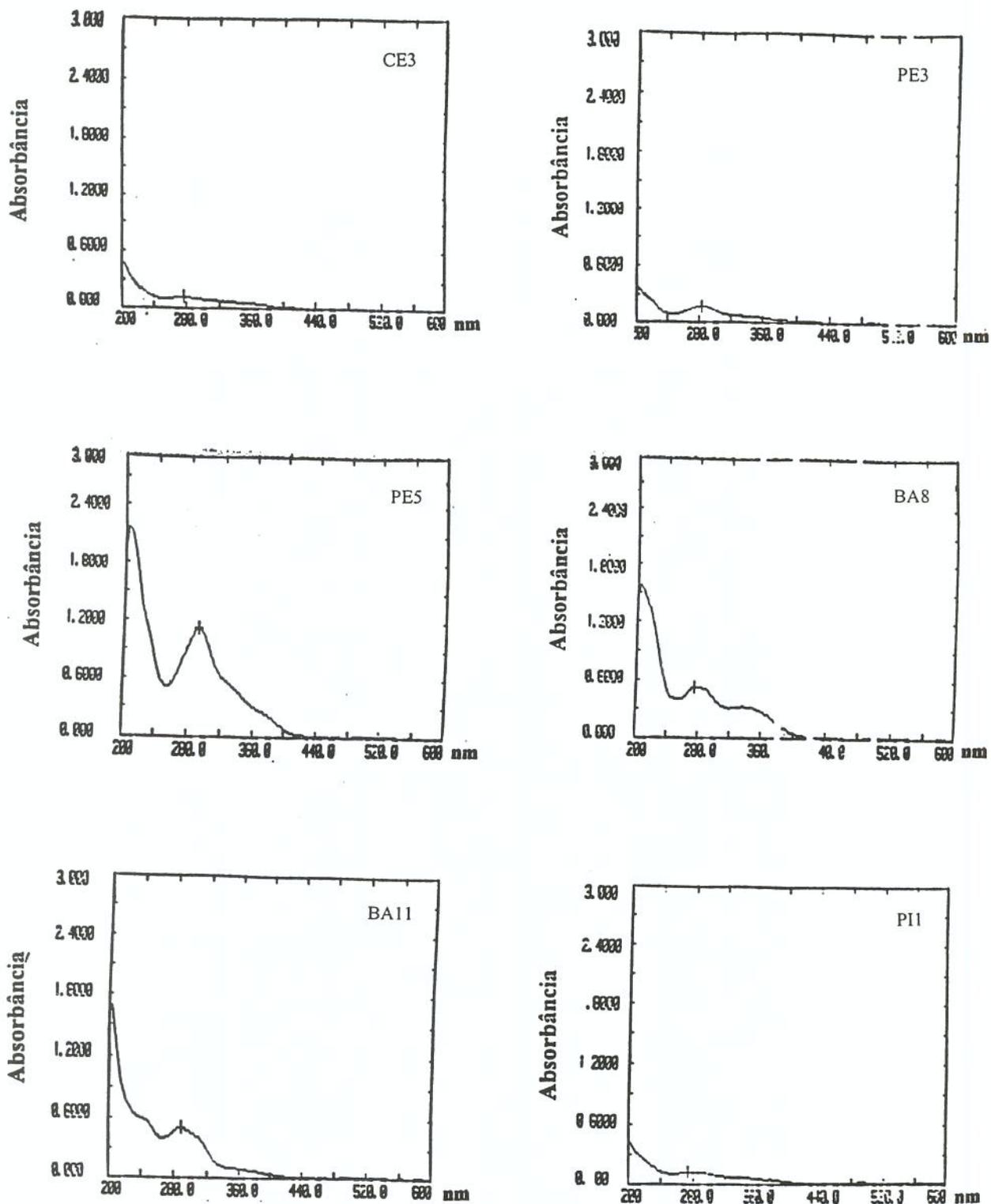
**FIGURA 6- Cromatogramas obtidos em Camada Delgada de Alta Eficiência e Espectros de Absorção dos Extratos Etanólicos das Própolis Representativas dos Grupos da Região Nordeste do Brasil**

## 5.4.2. Espectrofotometria na Região Ultravioleta-Visível

Os espectros de absorção, na região UV-visível, dos extratos etanólicos representativos dos grupos, estão ilustrados na Figura 7. Cada grupo apresentou um valor máximo de absorbância nos comprimentos de onda variando de 272 a 290 nm. O grupo PE5 apresentou absorbância máxima a 290 nm, típico das própolis encontradas na região Sul do Brasil (Park *et al.*, 1998d). Uma característica marcante do grupo BA8 foi a presença de um “ombro” a 336 nm, porém a absorbância máxima foi obtida no comprimento de onda de 274 nm. Da mesma maneira, Miyataka *et al.* (1997), estudando as própolis brasileiras, encontrou dois espectros típicos, um espectro com absorbância máxima a 283 nm, apresentando um “ombro” a 309 nm e outro com absorção máxima a 300 nm.

De um modo geral, o pico de absorção dos flavonóides está situado na faixa entre 250 e 350 nm, devido principalmente as flavonas, os flavonóis e as flavanonas (Markham, 1970). A presença de “ombro” no espectro de absorção é característico de flavonóides do tipo isoflavonas, os quais absorvem na região entre 245-270 nm, aparecendo um “ombro” entre os comprimentos de onda de 300-340 nm (Mabry *et al.*, 1970).

Porém, a análise por espectrofotometria nos fornece apenas a característica da própolis, sendo confirmado o tipo de própolis juntamente com a análise feita pela CCDAE. Observou-se uma correlação entre estas duas análises, quanto maior o número de bandas nos cromatogramas, maior a absorbância apresentada no espectro, exceto o grupo BA11 que não apresentou nenhuma banda no cromatograma devido provavelmente a sua característica apolar (Figura 6).



**FIGURA 7- Espectros de absorção na Região UV-visível dos Extratos Etanólicos das Própolis Representativas dos Grupos da Região Nordeste do Brasil**

### 5.4.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa

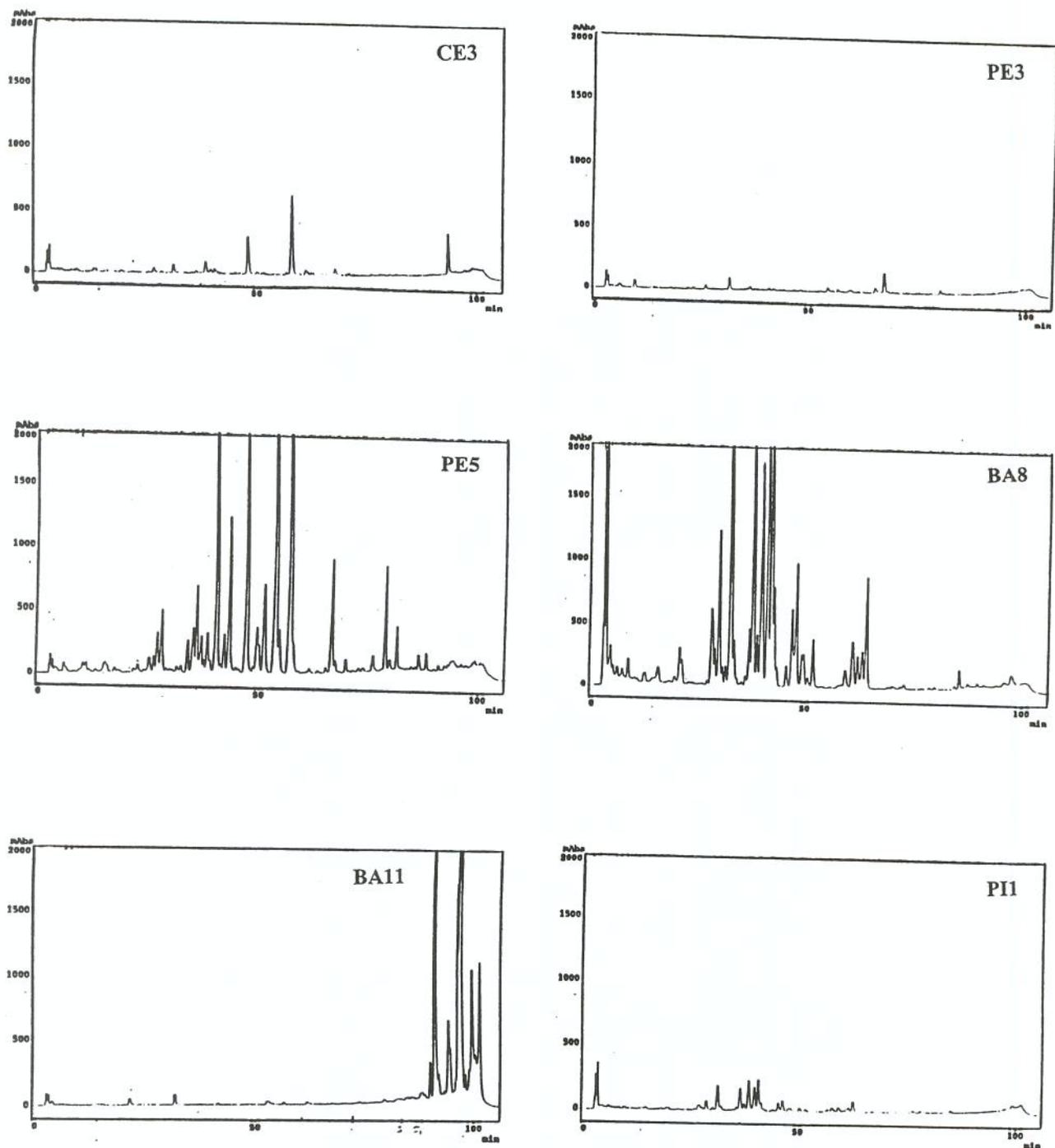
Os EEP representativos dos grupos foram analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em Fase Reversa, de acordo com o método descrito no item 4.4.4.

Através dos cromatogramas, ilustrados na Figura 8, observou-se uma distribuição dos picos bastante distinta entre os EEP representativos dos grupos oriundos da Caatinga, sendo que o maior número de picos foi detectado nos EEP dos grupos PE5 e BA8, enquanto poucos picos foram detectados nos EEP dos grupos CE3, PE3 e P11.

Foi observado ainda, no EEP do grupo BA11 – o único pertencente a vegetação da Mata Atlântica, um perfil cromatográfico não encontrado em nenhuma própolis brasileira estudada até o momento. Este grupo de própolis possui compostos com características mais apolares do que as demais própolis, os quais foram eluídos na fase móvel contendo 80% a 90% de metanol.

Os resultados obtidos pela CLAE confirmaram a diversidade na composição química das própolis coletadas na região Nordeste apresentada anteriormente pela CCDAE. De um modo geral, as própolis da região Nordeste apresentaram poucos picos no cromatograma quando comparadas as própolis de outras regiões brasileiras (Koo, 1996).

Com os padrões autênticos utilizados não foi possível identificar os compostos presentes nas própolis. No caso específico do grupo BA11, todos os padrões possuíam tempos de retenção inferiores aos dos compostos presentes neste grupo. Por isso, para a identificação dos compostos presentes nas própolis faz-se necessário o emprego de outras técnicas, tais como espectrometria de massa, espectroscopia infravermelho ou ressonância magnética nuclear.



**FIGURA 8- Cromatogramas obtidos em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência dos Extratos Etanólicos das Própolis Representativas dos Grupos da Região Nordeste do Brasil**

#### 5.4.4. Determinação dos Flavonóides Totais

A determinação dos Flavonóides Totais dos extratos etanólicos de própolis dos diferentes grupos foi realizada por método colorimétrico através da quelação do nitrato de alumínio com os flavonóides, e quantificados pela curva padrão de quercetina.

Este método é utilizado na avaliação comercial da própolis, segundo o qual, as própolis mais valorizadas são as que contém um maior teor de flavonóides.

Nesta análise, as amostras apresentaram diferenças significativas com relação ao teor de flavonóides (Tabela 2). O grupo da própolis PE3 praticamente não continha flavonóides (<1 mg/g) em sua composição, enquanto os grupos BA8 e PE5 foram os que mostraram maiores teores de flavonóides, 46,87 e 26,44 mg/g, respectivamente. Os grupos das própolis CE3 e BA11 não apresentaram diferença significativa pelo Teste de Tukey, assim como as própolis dos grupos BA11 e PI1 também não apresentaram diferença significativa. Os teores de flavonóides destas própolis variaram entre 3,66 e 4,83 mg/g.

**Tabela 2- Teor de Flavonóides Totais, com base no Flavonóide Quercetina, dos Extratos Etanólicos das Própolis Representativas dos Grupos da Região Nordeste do Brasil**

<b>Amostra</b>	<b>Local de coleta</b>	<b>Flavonóides Totais (mg/g própolis)</b>
CE3	Crato – CE	4,83 <sup>c</sup>
PE3	Salgueiro – PE	<1 <sup>e</sup>
PE5	Belo Jardim – PE	46,87 <sup>a</sup>
BA8	Senhor do Bonfim – BA	26,44 <sup>b</sup>
BA11	Entre Rios – BA	4,36 <sup>cd</sup>
PI1	Picos – PI	3,66 <sup>d</sup>

O alumínio em solução de etanol forma complexos com as flavonas ou flavonóis que contém um grupo hidroxil livre nas posições 3 ou 5, ou ainda com os grupos 3',4' dihidroxil (JURD, 1969). Como resultado da formação do complexo há um efeito batocrômico causado pelo alumínio, levando a uma alteração colorimétrica, ou seja, um aumento no comprimento de onda de absorção desses compostos. Os complexos formados absorvem próximos ao comprimento de onda de 415 nm, o qual corresponde à banda de absorção do complexo quercetina-alumínio

As flavanonas, isoflavonas e os dihidroflavonóis apresentam o espectro UV distinto devido a falta da conjugação entre os anéis A e B. Como consequência estes flavonóides exibem absorção máxima entre 270-295 nm, região inferior aos espectros das flavonas e dos flavonóis. Além disso apresentam efeito batocrômico menor, aumentando esse valor em 20 a 40 nm, não sendo, portanto, detectados por esta metodologia (Markham, 1970).

Por isso, apesar do método colorimétrico ser rápido, prático e preciso, apresentando coeficiente de variação de 3,51%, este método não é exato, porque a quantidade de flavonóides totais presentes na amostra pode estar sendo subestimada.

## **5.5. Atividades Biológicas**

### **5.5.1. Atividade Antibacteriana dos Extratos Etanólicos de Própolis**

A atividade antibacteriana dos extratos etanólicos de própolis dos grupos foi determinada sobre os microrganismos patogênicos *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Streptococcus mutans*, de acordo com o método descrito no item 5.5, e os resultados estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3- Atividade Antimicrobiana dos Extratos Etanólicos das Própolis Representativas dos Grupos da Região Nordeste do Brasil**

Amostra de Própolis	Local de coleta	Zona de inibição (mm)	
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Streptococcus mutans</i>
CE3	Crato - CE	-	-
PE3	Salgueiro - PE	-	-
PE5	Belo Jardim - PE	1,0	1,0
BA8	Senhor do Bonfim - BA	traço	traço
BA11	Entre Rios - BA	9,0	2,0
PI1	Picos - PI	-	-

Como pode-se observar nem todos os grupos de própolis demonstraram atividade antibacteriana para os microrganismos estudados, como foi o caso dos grupos PE3, CE3 e PI1. O grupo da própolis BA8 apresentou pouca atividade antibacteriana tanto para o microrganismo *S. aureus* quanto para *S. mutans*. Apenas os EEP dos grupos PE5 e BA11 demonstraram atividade antibacteriana através da formação do halo inibitório de crescimento ao redor dos discos.

Estes resultados estão de acordo com Koo (1996), o qual verificou que algumas própolis selecionadas dos Estados de Santa Catarina e Mato Grosso também não possuíam atividade antibacteriana.

Além disso pode-se notar, através da atividade antibacteriana, que o Teste do Teor de Flavonóides Totais, muito utilizado para avaliar a qualidade da própolis, não revelou o potencial antibiótico das própolis estudadas. O maior halo foi obtido com o EEP do grupo BA11, que apresentou teor de flavonóides baixo (4 mg/g), quando comparado ao grupo BA8 (26 mg/g), que não possui boa atividade antibiótica. Provavelmente isto está ocorrendo porque as própolis, principalmente brasileiras, possuem outros compostos químicos em sua composição que apresentam atividade antibacteriana, não somente os

flavonóides. Alguns compostos com atividade antibacteriana foram identificados nas própolis brasileiras como, por exemplo, o composto 3,5-diprenil-4-ácido hidroxicinâmico, proveniente da própolis do Estado de São Paulo (Aga *et al.*, 1994) e ácidos diterpênicos presentes na própolis do Paraná (Bankova, 1996).

### 5.5.2. Atividade Antioxidante dos Extratos Etanólicos de Própolis

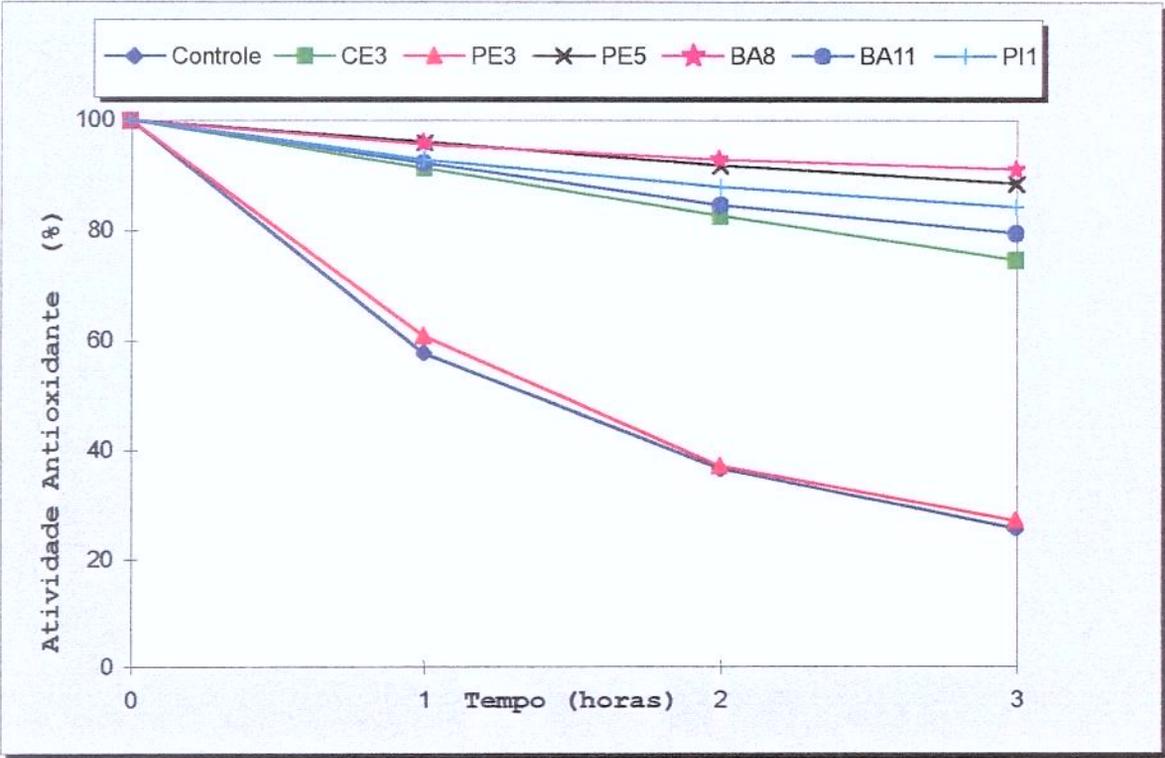
A atividade antioxidante dos extratos etanólicos dos grupos da Região Nordeste do Brasil foi determinada de acordo com o método de oxidação acoplada do  $\beta$ -caroteno e do ácido linoléico. Este método é um ensaio espectrofotométrico baseado na oxidação do  $\beta$ -caroteno induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoléico.

A maioria das própolis da Região Nordeste demonstraram um alto poder antioxidante, variando de 75 a 91% num período de 3 horas de incubação a 40°C, exceto o grupo PE3 que não demonstrou atividade antioxidante (Figuras 9 e 10).

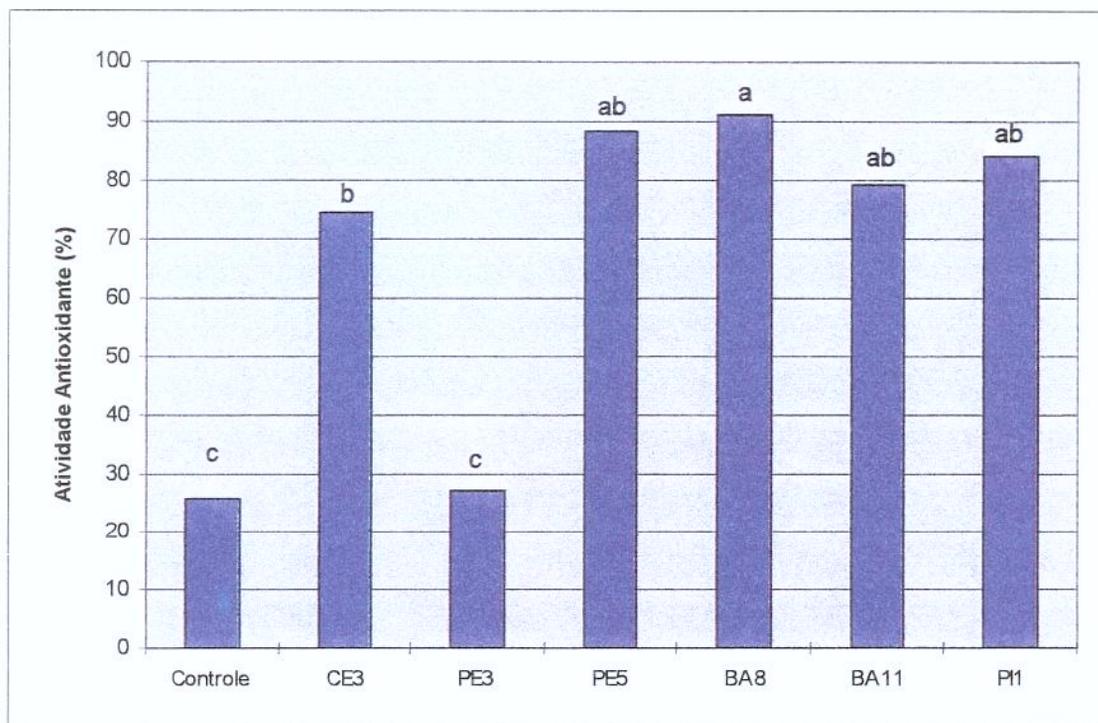
Comparando-se a atividade antioxidante dos EEP dos grupos com o teor de Flavonóides Totais, pode-se observar que mesmo os grupos que obtiveram baixos teores de flavonóides como os grupos BA11 e PI1, não diferiram significativamente dos valores antioxidantes obtidos pelos EEP dos grupos PE5 e BA8, que continham altos teores de flavonóides.

Por isso, a atividade antioxidante, assim como a atividade antibacteriana das própolis, pode estar relacionada não só aos flavonóides presentes nas amostras, mas aos compostos fenólicos de um modo geral. Pratt & Birac (1979) determinaram em produtos de soja outros compostos com poder antioxidante além dos flavonóides, como os ácidos caféico, ferrúlico e *p*-

cumárico. Recentemente foi identificado um composto presente no extrato aquoso da própolis brasileira com potente atividade antioxidante denominado propol (Basnet *et al.*, 1997).



**FIGURA 9- Atividade Antioxidante dos Extratos Etanólicos das Própolis Representativas dos Grupos da Região Nordeste do Brasil**



Teste de Tukey  $p < 0,05$

**FIGURA 10- Atividade Antioxidante dos Extratos Etanólicos das Própolis Representativas dos Grupos da Região Nordeste do Brasil após 3 horas de incubação**

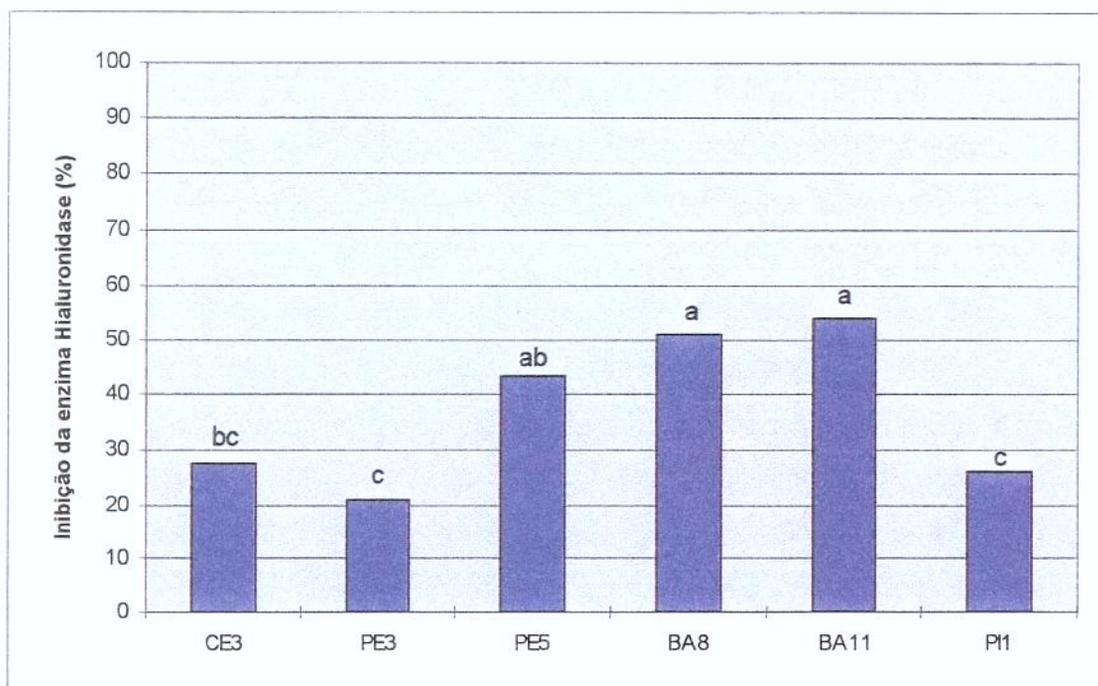
### 5.5.3. Atividade Antiinflamatória dos Extratos Etanólicos de Própolis

O efeito dos extratos etanólicos das própolis representativas dos grupos sobre a inibição da atividade da enzima hialuronidase foi verificado conforme descrito no item 4.5.3. A enzima hialuronidase atua despolimerizando o ácido hialurônico, um mucopolissacarídeo encontrado no tecido conjuntivo, com conseqüente diminuição na sua viscosidade, provocando o atrito das juntas e acarretando em problemas como artrite reumatóide e artrose, ou até mesmo a formação de edemas e sensação de dor. Portanto a inibição desta enzima caracteriza uma atividade antiinflamatória dos extratos etanólicos *in vitro*.

Como pode-se observar na Figura 11, os EEP dos grupos BA8, BA11 e PE5 apresentaram o maior poder de inibição enzimática, em torno de 50%, não diferindo significativamente entre si a nível de 5% de significância pelo teste de Tukey. Os EEP dos grupos PE3, CE3 e P11 variaram a inibição da enzima hialuronidase entre 20 e 30%, não diferindo significativamente entre si.

De acordo com os resultados obtidos por Miyataka *et al.* (1997) todos os extratos etanólicos de própolis brasileiras apresentaram atividade antiinflamatória, inibindo a atividade da enzima hialuronidase.

Um estudo feito por Kuppusamy & Das (1991) determinou que os flavonóides com uma dupla ligação no carbono C<sub>2,3</sub>, grupos hidroxilas nas posições 5,7,4' e um grupo cetona na posição 4 possuem um potente efeito sobre a hialuronidase. Os flavonóides apigenina, luteolina e kamferol inibiram a atividade enzimática da hialuronidase. Em contrapartida, a presença de substituintes glicosídeos destroem completamente a habilidade dos flavonóides em inibir a atividade enzimática.



Teste de Tukey  $p < 0,05$

**FIGURA 11- Atividade Antiinflamatória dos Extratos Etanólicos das Própolis Representativas dos Grupos da Região Nordeste do Brasil**

## 6. CONCLUSÃO

As análises de Cromatografia de Camada Delgada de Alta Eficiência e Espectrofotometria, demonstraram diversidade das própolis da região Nordeste do Brasil, não somente em relação a composição química, mas principalmente, em relação a atividade biológica. Foi identificado a existência de, no mínimo, 6 tipos distintos de própolis.

Dentre as amostras analisadas, apenas os EEP dos grupos BA11 e PE5 apresentaram atividade antibacteriana significativa contra os microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*.

Todos os EEP representativos dos grupos apresentaram atividade antiinflamatória *in vitro*, sendo que as maiores atividades foram obtidas pelos grupos BA8, BA11 e PE5. Além disso, todas as própolis analisadas, exceto o grupo PE3, apresentaram atividade antioxidante.

O EEP do grupo BA11, oriundo da Mata Atlântica, destacou-se pela alta atividade biológica e um perfil cromatográfico não encontrado em nenhuma própolis brasileira estudada até o momento. Este extrato etanólico de própolis contém em sua composição uma grande quantidade de compostos apolares.

Um aspecto importante observado foi o baixo teor de flavonóides obtido pelo EEP do grupo BA11 em relação aos demais grupos. De acordo com a análise de Flavonóides Totais, a qual é utilizada comercialmente como um indicativo da qualidade da própolis, este resultado indicaria uma própolis de baixa qualidade, não revelando o seu alto potencial biológico. A análise de

Flavonóides Totais não deve ser considerada como um parâmetro comercial de qualidade da própolis

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACKERMANN, T. Fast Chromatographic Study of Propolis Crudes. **Food Chemistry**, v.42, p.135-138, 1991.
- AGA, H.; SHIBUYA, T.; SUGIMOTO, T.; KURIMOTO, M.; NAKAJIMA, S. Isolation and Identification of Antimicrobial Compounds in Brazilian Propolis. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.58, n.5, p.945-946, 1994.
- AMOROS, M.; LURTON, E.; BOUSTIE, J.; GIRRE, L. Comparison of the Anti-Herpes Simplex Virus Activities of Propolis and 3-Methyl-But-2-Enyl Caffeate. **Journal of Natural Products**, v.57, n.5, p.644-647, 1994.
- AMOROS, M.; SAUVAGER, F.; GIRRE, L.; CORMIER, M. In vitro antiviral activity of propolis. **Apidologie**, v.23, p. 231-240, 1992 a.
- AMOROS, M.; SIMÕES, C.M.O.; GIRRE, L. Synergistic Effect of Flavones and Flavonols against Herpes Simplex Virus Type 1 in Cell Culture. Comparison with the Antiviral Activity of Propolis. **Journal of Natural Products**, v.55, n.12, p. 1732-1740, 1992 b.
- ARONSON, N.N.; DAVIDSON, E.A. Lysosomal Hyaluronidase from Rat Liver. **The Journal of Biological Chemistry**, v.242, n.3, p.437-440, 1967.

- BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; KUJUMGIEV, A.; MARCUCCI, M.C.; POPOV, S. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Brazilian Propolis. **Zeitschrift fur Naturforschung C- A Journal of Biosciences**, v.50, p.167-172, 1995.
- 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.S.; DYULGEROV, A.; POPOV, S.S.; MAREKOV, N.L. A GC-MS Study of the Propolis Phenolic Constituents. **Zeitschrift fur Naturforschung C- A Journal of Biosciences**, v.42, n.1-2, p.147-151, 1987.
- BANKOVA, V.; MARCUCCI, M.C.; SIMOVA, S.; NIKOLOVA, N.; KUJUMGIEV, A.; POPOV, S. Antibacterial Diterpenic Acids from Brazilian Propolis. **Zeitschrift fur Naturforschung C- A Journal of Biosciences**, v.51, p.277-280, 1996.
- BANKOVA, V.S.; POPOV, S.S.; MAREKOV, N.L. Isopentenyl Cinnamates from Poplar Buds and Propolis. **Phytochemistry**, v.28, n.3, p.871-873, 1989.
- BANKOVA, V.S.; POPOV, S.S.; MAREKOV, N.L. High-Performance Liquid-Chromatographic Analysis of Flavonoids from Propolis. **Journal of Chromatography**, v.242, n.1, p.135-143, 1982.

- 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.61, p.896-900, 1998.
- BASNET, P.; MATSUSHIGE, K.; HASE, K.; KADOTA, S.; NAMBA, T. Four Di-*O*-caffeoyl Quinic Acid Derivatives from Propolis. Potent Hepatoprotective Activity in Experimental Liver Injury Models. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.19, n.11, p.1479-1484, 1996.
- BASNET, P.; MATSUSHIGE, K.; HASE, K.; KADOTA, S.; NAMBA, T. Potent Antihepatotoxic Activity of Dicafeoyl Quinic Acids from Propolis. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.19, n.4, p.655-657, 1996.
- BASNET, P.; MATSUNO, T.; NEIDLEIN, R. Potent Free Radical Scavenging Activity of Propolis Isolated from Brazilian Propolis. **Zeitschrift für Naturforschung C- A Journal of Biosciences**, v.52, p.828-833, 1997.
- BASTOS, E.M.A. Caracterização dos Marcadores de Origem Botânica da Própolis. **Revista da Universidade de Franca**, n.7, p.21, 1999.
- BONVEHÍ, J.S.; COLL, F.V. Phenolic Composition of Propolis from China and from South America. **Zeitschrift für Naturforschung C- A Journal of Biosciences**, v. 49, p.712-718, 1994.

BONVEHÍ, J.S.; COLL, F.V.; JORDÀ, R.E. The Composition, Active Components and Bacteriostatic Activity of Propolis in Dietetics. **Journal of American Oil Chemical Society**, v.71, n.5, p.529-532, 1993.

BOUDOUROVA-KRASTEVA, G.; BANKOVA, V.; SFORCIN, J.M.; NIKOLOVA, N.; POPOV, S. Phenolics from Brazilian Propolis. **Zeitschrift fur Naturforschung C- A Journal of Biosciences**, v. 52, p.676-679, 1997.

BREYER, H.F.E. Aspectos da Produção, Coleta, Limpeza, Classificação e Acondicionamento de Própolis Bruta de abelhas *Apis mellifera* L. **Revista Brasileira de Apicultura**, p.6, Agosto-Setembro, 1995.

BURDOCK, G.A. Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v.36, p.347-363, 1998.

CAMPOS, R.O.P.; PAULINO, N.; SILVA, C.H.M.; SCREMIN, A.; CALIXTO, J.B. Anti-hyperalgesic Effect of an Ethanolic Extract of Propolis in Mice and Rats. **Journal Pharmacy and Pharmacology**, v.50, p.1187-1193, 1998.

CHI, H.; HSIEH, A.K.; Ng, C.L.; LEE, H.K.; LI, S.F.Y. Determination of Components in Propolis by Capillary electrophoresis and photodiode array detection. **Journal of Chromatography A**, v.680, p.593-597, 1994.

- CHRISTOV, R.; BANKOVA, V.; HEGAZI, A.; HADY, F.A.E.; POPOV, S.  
Chemical Composition of Egyptian Propolis. **Zeitschrift fur  
Naturforschung C- A Journal of Biosciences**, v. 53, p. 197-200, 1998.
- CIZMARIK, J.; LAHITOVÁ, N. Antimutagenicity of propolis. **Pharmazie**,  
v.53, n.12, p.883-884, 1998.
- GHALY, M.F.; EZZAT, S.M.; SARHAN, M.M. Use of propolis and  
Ultragriseofulvin to Inhibit Aflatoxicogenic Fungi. **Folia Microbiologica**,  
v.43, n.2, p.156-160, 1998.
- GHISALBERTI, E.L. Propolis-Review. **Bee World**, v.60, n.2, p.59-84, 1979.
- GONZÁLEZ, R.; CORCHO, I.; REMÍREZ, D.; RODRÍGUEZ, S.;  
ANCHETA, O.; MERINO, N.; GONZÁLEZ, A.; PASCUAL, C.  
Hepatoprotective Effects of Propolis Extract on Carbon Tetrachloride-  
induced Liver Injury in Rats. **Phytotherapy Research**, v.9, p.114-117,  
1995.
- GRANGE, J.M.; DAVEY, R.W. Antibacterial Properties of Propolis.  
**Journal of the Royal Society of Medicine**, v.83, p.159-160, 1990.
- GREENAWAY, W.; MAY, J.; SCAYSBROOK, T.; WHATLEY, F.R.  
Identification by Gas Chromatography-Mass Spectrometry of 150  
Compounds in Propolis. **Zeitschrift fur Naturforschung C- A Journal  
of Biosciences**, v.46, p.111-121,1991.

- GRUNBERGER, D.; BANERJEE, R.; EISINGER, K.; OLTZ, E.M.; EFROS, L.; CALDWELL, M.; ESTEVEZ, V.; NAKANISHI, K. Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. **Experientia**, v.44, 1988.
- HAMMERSCHMIDT, P.A.; PRATT, D.E. Phenolic antioxidants of dried soybeans. **Journal of Food Science**, v.43, p.556-559, 1978.
- HAUSEN, B.M.; EVERS, P.; STÜWE, H.T.; KÖNIG, W.A.; WOLLENWEBER, E. Propolis Allergy (IV): Studies with Sensitizers from Propolis and Constituents Common to Propolis, Poplar Buds and Balsam of Peru. **Contact Dermatitis**, v.26, p.34-44, 1992.
- HAUSEN, B.M.; W.A.; WOLLENWEBER; SENFF, H.; POST, B. Propolis Allergy (I): Origin, properties, usage and literature review. **Contact Dermatitis**, v.17, p.163-170, 1987.
- HEIMLER, D. High-performance Thin Layer Chromatography of selected Flavonoid Aglycones on Ready-for-use layers of silanized silica gel. **Journal of Chromatography**, v.366, p.407-411, 1986.
- HLADÓN, B.; BYLKA, W.; ELLNAIN-WOJTASZEK, M.; SKRZYPCZAK, L.; SZAFAREK P.; CHODERA, A.; KOWALEWSKI, Z. *In vitro* studies on the cytostatic activity of propolis extract. **Arzneimittel-Forschung-Drug Research**, v.30, p.1847-1848, 1980. *Apud*: **Experientia**, v.44, 1988.

JOLLY, V.G. Propolis Varnish for Violins. **Bee World**, v.59, n.4, p.158-161, 1978.

JURD, L. Aluminum complexes of phenolic flavones. Spectral and Structural Correlations. **Phytochemistry**, v.8, p. 445-462, 1969.

KANNER, J.; FRANKEL, E.; GRANIT, R.; GERMAN, B.; KINSELLA, J.E. Natural Antioxidants in Grapes and Wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.42, p.64-69, 1994.

**Kenkosyokuhin Kikaku Kijun no Koshi.** Standard of Propolis as Food, Boletim Informativo da Associação Japonesa de Saúde e Nutrição, June, p.8-10, 1994.

KHAYYAL, M.T.; EL-GHAZALY, M.A.; EL-KHATIB, A.S. Mecanismos Involved in the Antiinflammatory Effect of Propolis Extract. **Drugs under Experimental and Clinical Research**, v.19, n.5, p. 197-203, 1993.

KOO, Hyun. **Estudo dos Flavonóides da Própolis de *Apis Mellifera* Africanizada Provenientes de Diversas Regiões do Brasil.** Campinas, 1996. 67p. Tese (Mestrado em Ciências de Alimentos)- Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

- KOO, M.H.; PARK, Y.K. Investigation of Flavonoid Aglycones in Propolis Collected by Two Different Varieties of Bees in the Same Region. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.61, n.2, p.367-369, 1997.
- KROL, W.; CZUBA, Z.; SCHELLER, S.; GABRYS, J.; GRABIEC, S.; SHANI, J. Anti-oxidant Property of Ethanolic Extract of Propolis (EEP) as Evaluated by Inhibiting the Chemiluminescence Oxidation of Luminol. **Biochemistry International**, v.21, n.4, p.593-597, 1990.
- LINDENFELSER, L.A. Antimicrobial Activity of Propolis. **American Bee Journal**, v.107, n.3, p.130-131, 1967.
- MARCUCCI, M.C. Propolis: Chemical Composition, Biological Properties and Therapeutic Activity. **Apidologie**, v.26, p.83-99, 1995.
- MARCUCCI, M.C. Propriedades Biológicas e Terapêuticas dos Constituintes Químicos da Própolis. **Química Nova**, v.19, n.5, p.529-536, 1996.
- MARCUCCI, M.C.; RODRIGUEZ, J.; FERRERES, F.; BANKOVA, V.; GROTO, R.; POPOV, S. Chemical Composition of Brazilian Propolis from São Paulo State. **Zeitschrift fur Naturforschung C- A Journal of Biosciences**, v.53, p.117-119, 1998.
- MARKAM, K.R.; MITCHELL, 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, 1995.

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.

MARTOS,I.; COSENTINI, M.; FERRERES, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A. Flavonoid Composition of Tunisian Honeys and Propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 2824-2829, 1997.

MATSUNO, T. A New Clerodane Diterpenoid Isolated from Propolis. **Zeitschrift fur Naturforschung C- A Journal of Biosciences**, v.50, p.93-97, 1995.

MATSUNO, T.; CHEN, C.; BASNET, P. A Tumouricidal and Antioxidant Compound Isolated from an Aqueous Extract of Propolis. **Medical Science Research**, v.25, 583-584, 1997.

MATSUNO, T.; MATSUMOTO, Y.; SAITO, M.; MORIKAWA, J. Isolation and Characterization of Citotoxic Diterpenoid Isomers from Propolis. **Zeitschrift fur Naturforschung C- A Journal of Biosciences**, v.52, 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- A Journal of Biosciences**, v.53, p.1037-1039, 1998.

- METZNER, J.; BEKEMEIER, H.; PAINTZ, M.; SCHNEIDEWIND, E. Antimicrobial Activity of Propolis and Propolis Constituents. **Pharmazie**, v.34, n.2, p.97-102, 1979.
- MILLET-CLERC, J.; MICHEL, D.; SIMERAY, J.; CHAUMONT, J.P. Étude préliminaire des propriétés fongistatiques de la propolis comparées à celles de quelques produits commerciaux. **Plant Med. Phytother.**, v.21, p.3-7, 1987. *Apud: Apidologie*, v.26, p.83-99, 1995.
- 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.
- MITCHELL, C.J.; ROOK, A. Botanical Dermatology. **Vancouver: Greengrass**, p.187, 1979. *Apud: Contact Dermatitis*, v.16, n.1, p.49-50, 1987.
- MSTAT-C.** A microputer program for the design, management and analysis of agronomic research experiments. Norway: MSTAT Distribution, n.p., 1988.
- PAINTZ, M.; METZNER, J. Local-anesthetic action of Propolis and some of its Constituents. **Pharmazie**, v. 34, n.12, p.839-841, 1979.

- PAPAY, V.; TOTH, L.; SOLTES, M.; NAGY, E.; LITKEI, G. Isolated Compounds from Hungarian Propolis and *Populi gemma*. **Stud. Org. Chem. (Amst)**, v.23, p.233-240, 1986. *Apud: Apidologie*, v.23, n.1, p.79-85, 1992.
- 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.
- PARK, Y.K.; KOO, M.H.; IKEGAKI, M.; CURY, J.A.; ROSALEN, P.L. Effects of Propolis on *Streptococcus mutans*, *Actinomyces naeslundii* and *Staphylococcus aureus*. **Revista de Microbiologia**, v.29, p.143-148, 1998 a.
- PARK, Y.K.; KOO, M.H.; ABREU, J.A.S.; IKEGAKI, M.; CURY, J.A.; ROSALEN, P.L. Antimicrobial Activity of Propolis on Oral Microorganisms. **Current Microbiology**, v.36, p.24-28, 1998 b.
- PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ABREU, J.A.S.; ALCICI, N.M.F. Estudo da Preparação dos Extratos Etanólicos de Própolis e suas Aplicações. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, n.3, p.313-318, 1998 c.
- 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, 1998 d.

- PEPELJNJAK, S.; MAGSINGERD, D.; JALSENJAK, I. Effect of Propolis Extracts on Some Fungi. **Scientia Pharmaceutica**, v.50, p.165-167, 1982. *Apud: Folia Microbiologica*, v.43, n.2, p.156-160, 1998.
- PETERSEN, H.O. Hipersensitivity to Propolis. **Contact Dermatitis**, v.3, n.5, p.278-279, 1977.
- POPRAKVO, S.A.; GUREVICH, A.I.; KOLOSOV, M.N. Flavonoid components of propolis. **Khimiya Prirodnikh Soedineni**, v.5, p.476-482, 1969. *Apud: Bee World*, v.60, n.2, p.59-84, 1979.
- PRATT, D.E.; BIRAC, P.M. Source of antioxidant activity of soybeans and soy products. **Journal of Food Science**, v.44, p.1720-1722, 1979.
- RAO, C.V.; DESAI, D.; RIVENSON, A.; SIMI, B.; AMIN, S.; REDDY, B.S. Chemoprevention of Colon Carcinogenesis by Phenylethyl-3-methylcaffeate. **Cancer Research**, v.55, p. 2310-2315, 1995.
- REISSING, J.L.; STROMINGER, J.L.; LELOIR, L.F. A Modified Colorimetric Method for the Estimation of N-acetylamino Sugars. **Journal of Biological Chemistry**, v.217, p.959-966, 1955.
- RATÓN, J.A.; AGUIRRE, A.; DÍAZ-PÉREZ, J.L. Contact Dermatitis from Propolis. **Contact Dermatitis**, v.22, p.183, 1990.

- RODRÍGUEZ, S.; ANCHETA, O.; RAMOS, M.E.; REMÍREZ, D.; ROJAS, E.; GONZÁLEZ, R. Effects of Cuban Red Propolis on Galactosamine-induced Hepatitis in Rats. **Pharmacological Research**, v.35, n.1, p.1-4, 1997.
- RUDZKI, E.; REBANDEL, P.; JAWORSKI, E. Comparison of the Eliciting properties of 3 Different Propolis Samples. **Contact Dermatitis**, v.39, p.142, 1998.
- SCHELLER, S.; SZAFLARSKI, J.; TUSTANOWSKI, J.; NOLEWAJKA, E.; STOJKO, A. Biological Properties and Clinical Application of Propolis. I. **Arzneimittel-Forschung-Drug Research**, v.27, p.889-890, 1977.
- SERKEDJIEVA, J.; MANOLOVA, N. Anti-influenza Virus Effect of Some Propolis Constituents and their Analogues (Esters of Substituted Cinnamic Acids). **Journal of Natural Products**, v.55, n.3, p. 294-297, 1992
- SOARES, A.S.E. Melhoramento Genético para Maior Produtividade de Própolis. **Revista da Universidade de Franca**, n.7, p.21-22, 1999.
- TATEFUJI, T.; IZUMI, N.; OHTA, T.; ARAI, S.; IKEDA, M.; KURIMOTO, M. Isolation and Identification of Compounds from Brazilian Propolis which Enhance Macrophage Spreading and Mobility. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.19, n.7, p.966-970, 1996.

- THOMSON, W.M. Propolis. **The Medical Journal of Australia**, v.153, p.654, 1990.
- TOMÁS-BARBERAN, 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.
- 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, p.255-260, 1980.
- VELCHEV, V. Flora of PR Bulgaria, BAS PUBLI House, Sofia, v. 3, p.39-48, 1966. *Apud: Apidologie*, v.23, n.1, p.79-85, 1992.
- VILLANUEVA, V.R.; BARBIER, M.; GONNET, M. & LAVIE, P. Les Flavonoides de la propolis. Isolement d'une nouvelle substance bacteriostatique: la pinocembrine. **Annals Inst. Pasteur Paris** 118, p.84-87, 1970.
- VINSON, J.A.; DABBAGH, Y.A.; SERRY, M.M. & JANG, J. 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, p.2800-2802, 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- A Journal of Biosciences**, 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- A Journal of Biosciences**, v.52, p.530-535, 1997.

WULF, W.; NAGEL, C.W. Analysis of Phenolic Acids and Flavonoids by High-Pressure Liquid Chromatography. **Journal of Chromatography**, v.116, p.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, p.1321-1322, 1992.

YOUNG, E. Sensitivity to Propolis. **Contact Dermatitis**, v.16, n.1, p.49-50, 1987.