

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**Faculdade de Farmácia**  
**Disciplina de Estágio Curricular em Farmácia**

**PRÓPOLIS: MATÉRIA-PRIMA DE POTENCIAL APLICAÇÃO  
FARMACÊUTICA**

**Izabela Netto Pereira**

**Porto Alegre, novembro de 2011.**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**Faculdade de Farmácia**  
**Disciplina de Estágio Curricular em Farmácia**

**PRÓPOLIS: MATÉRIA-PRIMA DE POTENCIAL APLICAÇÃO  
FARMACÊUTICA**

**Izabela Netto Pereira**

**Trabalho de Conclusão da Disciplina de Estágio Curricular em Farmácia**

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Gilsane von Poser**

**Orientadora**

**Porto Alegre, novembro de 2011.**

*Aos meus pais, por toda força e incentivo  
necessários para concluir esta etapa.  
Ao Marcelo, meu padrasto, pelo grande  
apoio e ajuda no desenvolvimento deste trabalho.*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais por toda a força, apoio e incentivo em todos esses anos de graduação.

Ao meu padrasto, pelos conselhos e por dividir seu conhecimento, o que foi fundamental para elaboração deste trabalho.

À minha família, toda, obrigada pela torcida.

À minha orientadora, agradeço a oportunidade e pela confiança que em mim foi depositada.

Ao pessoal do laboratório, principalmente à Gabriela Meirelles, por sua dedicação e auxílio em todos os momentos.

## RESUMO

A própolis é uma resina de origem vegetal que sofre agregação de enzimas mandibulares das abelhas coletoras, sendo considerado um produto complexo e que vem sendo amplamente estudado. É o produto derivado das abelhas que mais possui propriedades biológicas. Dentre elas, se destacam as ações antibacterianas, antifúngica, antiviral, cicatrizantes, anestésica e antitumoral. A composição da própolis é complexa e varia com a sazonalidade, o tipo de abelha e a vegetação local. Muitos estudos tentam padronizar extratos de própolis, mas esta, no entanto, difere muito seus constituintes conforme a região de coleta. Os principais constituintes já descritos como tendo ação significativa, em estudos com própolis, são compostos fenólicos, como ácidos fenólicos e flavonóides. O objetivo do presente trabalho foi realizar uma revisão bibliográfica e comparar duas amostras de própolis obtidas de diferentes regiões do Rio Grande do Sul, uma da região da serra e outra da campanha gaúcha, analisando através de cromatografias em camada delgada e realizando doseamento de compostos fenólicos por espectrofotometria, para verificar se realmente a flora da região influencia na composição das amostras coletadas. Os resultados encontrados estão de acordo com os da literatura, visto que as amostras de própolis possuem diferença em sua composição, sendo a própolis originária da serra gaúcha a mais rica em compostos fenólicos.

Palavras-chave: própolis, atividades biológicas, componentes químicos, compostos fenólicos.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVO .....</b>	<b>4</b>
2.1. OBJETIVO GERAL.....	4
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	4
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>5</b>
3.1. AS ABELHAS.....	5
3.2. A PRÓPOLIS E SEUS TIPOS .....	7
3.3. CONSTITUIÇÃO QUÍMICA .....	10
3.3.1. Compostos fenólicos .....	12
3.3.1.1. Ácidos fenólicos e seus ésteres.....	14
3.3.1.2. Flavonóides.....	15
3.4. ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	18
3.5. CLASSIFICAÇÃO SEGUNDO A LEGISLAÇÃO BRASILEIRA.....	21
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>23</b>
4.1. COLETA DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS .....	23
4.2. EXTRAÇÃO COM GRADIENTE DE POLARIDADE.....	23
4.3. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA.....	24
4.3.1. Reagentes utilizados para Cromatografia em Camada Delgada:.....	25
4.4. DOSEAMENTO DE COMPOSTOS FENÓLICOS .....	25
4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	27
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>28</b>
5.1. ANÁLISES ORGANOLÉPTICAS .....	28
5.2. ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS .....	29
5.3. DOSEAMENTO DE COMPOSTOS FENÓLICOS .....	32
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>36</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>37</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O interesse despertado em todo o mundo pelo uso de fontes naturais para a obtenção de alimentos e medicamentos tem estimulado o estudo dos produtos apícolas, por ser a colméia um tesouro incomparável para a nutrição e saúde dos homens e dos animais (Asís, 1991).

Própolis é uma resina escura obtida através das abelhas a partir de brotos de folhas, galhos, feridas no tronco de árvores. As abelhas costumam fixar a resina às suas patas traseiras e levá-la à sua colméia (Shorkun *et al.*, 2001). Ao coletarem a própolis, acabam adicionando à resina original algumas substâncias como ceras e saliva. O material resultante é utilizado pelas abelhas para selar orifícios, proteger contra invasores externos e mumificar carcaças dentro da colméia (Pietta *et al.*, 2002).

A própolis tem sido utilizada na medicina popular desde os tempos antigos (Burdock *et al.*, 1998; Galvão *et al.*, 2007). Por muitos séculos é utilizada como um remédio popular em diversas regiões do mundo, principalmente devido às suas propriedades antimicrobianas (Marcucci *et al.*, 2000). Seu emprego já era descrito pelos assírios, gregos, romanos, incas e egípcios. No antigo Egito (1700 a. C.) era utilizada como material para embalsamar os mortos (Guerra e Méndez, 1997; Pereira *et al.*, 2002). Etimologicamente, a palavra própolis, de origem grega, significa em “defesa da cidade”, evidenciando a sua importância para a colônia com suas inúmeras aplicações (Kosonoka, 1990).

A própolis brasileira é utilizada em alimentos e bebidas com o objetivo de manter e melhorar a saúde (Aga *et al.*, 1994; Marcucci *et al.*, 1996) e também como um remédio popular, encontrando-a no mercado em estado puro ou combinado com outros produtos naturais e também em cosméticos. Diversas pesquisas têm demonstrado interesse na investigação de seus constituintes e propriedades biológicas nas últimas décadas (Ghisalberti, 1979).

Os constituintes encontrados na própolis são dependentes de sua localização geográfica e de sua origem botânica (Burdock *et al.*, 1998). Sua composição química é

complexa e qualitativamente e quantitativamente variável dependendo da região de coleta. Parte dos seus constituintes tem origem animal, como a cera de abelhas, e outros obtidos das plantas. Geralmente a atividade biológica da própolis é atribuída a estas substâncias derivadas de plantas (Greenaway e Whatley, 1990; Salatino *et al.*, 2005).

A própolis contém mais de 300 constituintes diferentes e mesmo que as atividades fisiológicas observadas sejam freqüentemente atribuídas a substâncias específicas, é mais comum a utilização da mistura complexa da própolis (Mishima *et al.*, 2005). Os polifenóis principais são os flavonóides, também ácidos, ésteres e aldeídos fenólicos (Castaldo e Capasso, 2002). A presença de terpenóides, esteróides, aminoácidos e compostos inorgânicos também têm sido alvo de diversos estudos (Kartal *et al.*, 2003).

A composição química da própolis é dependente de sua região geográfica, como resultado, sua atividade biológica está intimamente relacionada com a vegetação nativa do local de coleta (Park *et al.*, 2002).

A sazonalidade possui grande influência na atividade de coleta de própolis pelas abelhas. Os padrões sazonais observados têm sido explicados, principalmente, pelas variações da temperatura, insolação, intensidade luminosa, umidade relativa e precipitação (Kerr *et al.*, 1970). O gênero e/ou a espécie da abelha também influencia na qualidade da própolis, bem como a ecoflora da região de coleta (Park *et al.*, 1998).

O clima tropical brasileiro é muito propício a uma diversidade biológica de flora e aliando a isto a presença da abelha africanizada, permite uma grande atividade apícola (Bontempo, 2008). A produção da própolis brasileira representa 10-15% da produção mundial, indicando que o Brasil é o terceiro maior fornecedor, atrás apenas da Rússia e da China (Pereira *et al.*, 2002).

As pesquisas científicas com própolis vêm crescendo a cada ano. Em buscas recentes nas bases de dados Science Direct foram encontrados 2451 artigos e 1142 artigos no PubMed até o outubro de 2011.

As características da própolis brasileira tornaram esta a principal fonte de sustentação do mercado japonês, representando 80% da demanda deste país. O consumo mundial é estimado em torno de 700-800 toneladas por ano. Além das propriedades farmacológicas, existem duas razões pelas quais os japoneses têm preferência pela própolis brasileira: a primeira é devido às suas características organolépticas e a segunda é por seu menor teor de metais pesados e demais poluentes ambientais (Nothenberg, 1997; Pereira *et al.*, 2002).

No Brasil, a própolis segue um padrão não-específico para cada localização e não considera a vegetação e suas características. A legislação determina que no doseamento de compostos fenólicos haja no mínimo 5% (m/m) e de flavonóides no mínimo 0,5% (m/m) (Ministério da Agricultura, 2001).

## **2. OBJETIVO**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Tendo em vista a variedade de própolis existente e sabendo-se que a região, o clima, o solo, o tipo de abelha e a origem vegetal têm influência na composição da própolis, o objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão da literatura sobre as características desse produto e fazer uma análise preliminar da variabilidade da composição de duas amostras de própolis coletadas em diferentes localidades no estado do Rio Grande do Sul.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Avaliar e comparar os compostos característicos da própolis nas duas amostras através de Cromatografia em Camada Delgada;

Realizar doseamento de compostos fenólicos por espectrofotometria;

Discutir os dados encontrados nos experimentos com estudos da literatura.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. AS ABELHAS

Pesquisas arqueológicas apontam que as abelhas existem há pelo menos 42 milhões de anos (Bontempo, 2008). Algum tempo depois, de 20 a 30 milhões de anos atrás, as abelhas sociais produziam e armazenavam mel, muito antes do surgimento do homem que parece ter ocorrido há 10 milhões de anos (Crane, 1985).

O interesse do homem pelas colméias é plurimilenar. Há testemunhos de pinturas em rochas onde as colméias eram exploradas para a retirada de mel em períodos remotos, há 9000 anos (Asís, 1991).

As abelhas são insetos sociais que vivem em grandes colônias. Cada colméia abriga uma colônia constituída por uma única rainha, algumas centenas de machos (zangões) e dezenas de milhares de operárias (cerca de 100.000 e às vezes mais). A rainha é quase duas vezes maior e 2,8 vezes mais pesada do que uma operária e sua função biológica reside exclusivamente na reprodução, visto que esta põe nos alvéolos mil a dois mil ovos fecundados. Além disso, quando a rainha põe ovos não-fecundados, nascem apenas machos (Ioirich, 1986).

A principal abelha produtora de mel, *Apis mellifera*, tem aptidões individuais, mas também vivem em colméias onde se cria uma unidade social integrada (Crane, 1985). A maioria das abelhas é operárias, fêmeas e não-reprodutoras. Os principais fatores que determinam as suas ações individuais são a necessidade da colônia e sua própria idade fisiológica. Em diferentes etapas de seu desenvolvimento secretam geléia real para nutrir ovos e a abelha rainha, produzem cera, toxina, coletam néctar, própolis e outras substâncias e produzem mel (Crane, 1985).

Em certas condições, como em caso de morte da rainha ou ausência de larvas, as próprias operárias põem ovos, que dão origem a zangões. Quando uma colônia fica privada de sua rainha, as abelhas escolhem então um de seus vários ovos postos e iniciam a criação de uma nova rainha e quando esta larva surge, ela é alimentada com geléia real. Uma colônia sem rainha não é viável já que só machos nascerão em número cada vez maior (Ioirich, 1986).

As abelhas chamadas operárias coletoras são responsáveis pela coleta e preparação da própolis. Estas abelhas são incomuns, porque somente elas nesta fase, também trabalham na colméia, onde usam a própolis para torná-la impermeável e, algumas vezes, para reduzir o tamanho do orifício de entrada da mesma (Crane, 1985).

Segundo Asís (1996) as abelhas encontram própolis e o desprende utilizando suas mandíbulas com auxílio de seu primeiro par de patas. Este trabalho é difícil, porém a secreção de suas glândulas mandibulares permite o amolecimento da resina. Logo após sua retirada do vegetal, a resina é triturada pelas mandíbulas da abelha e é transferido para suas patas traseiras para locomoção até a colméia. As abelhas operárias possuem corbículas, estruturas especiais das patas traseiras, próprias para a coleta de materiais fora da colméia, como a própolis (Crane, 1985).

A quantidade de própolis produzida por colméia por ano oscila entre 150 e 300 gramas (Guerra e Méndez, 1997). Para colher cerca de um quilo de néctar, uma abelha, sozinha, voa uma distância equivalente a uma volta ao redor da Terra. Em cada viagem, percorre uma distância de quinhentos metros de distância da colméia, podendo visitar quase duzentas flores por viagem (Bontempo, 2008).

As plantas e as abelhas possuem uma relação estreita. A polinização, que nada mais é do que a transferência do pólen da antera para o estigma, e pode ser feita através do vento, por autopolinização, porém a maioria das plantas necessita de auxílio de um agente animal. Pássaros são agentes polinizadores, entretanto as plantas normalmente sofrem polinização por insetos e dentre estes a abelha é o mais eficiente. Essa atividade das abelhas de pousar em várias flores e coletar o néctar permite a polinização, uma fecundação cruzada que aprimora as espécies vegetais. Portanto as plantas e as abelhas têm uma relação simbiótica, talvez a mais significativa de toda a natureza (Bontempo, 2008).

Os materiais disponíveis para as abelhas coletarem a própolis são produzidos por uma enorme variedade de processos botânicos em diferentes partes de plantas. Podem ser substâncias ativamente secretadas e substâncias encontradas no exsudato de cortes das plantas, materiais lipofílicos das folhas e dos brotos foliares, mucilagens, gomas, resinas e látex (Bankova *et al.*, 2000). Além disso, podem ser encontrados na própolis materiais que são introduzidos durante a elaboração da mesma na colméia (Marcucci, 1995). Asís (1991) descreveu que a própolis contém em sua composição secreções das glândulas mandibulares das abelhas operárias, compostas principalmente por ácido 10-hidroxi-2-decenóico e ácido 9-oxo-2-decenóico.

### 3.2. A PRÓPOLIS E SEUS TIPOS

A composição da própolis varia conforme seu tipo (Burdock, 1998). Uma menor variação da composição química da própolis é observada nas regiões temperadas do planeta, como por exemplo, na Europa e América do Norte, onde seus principais compostos bioativos são os flavonóides (Greenaway *et al.*, 1990; Bankova *et al.*, 1995; Bankova *et al.*, 2000; Pereira *et al.*, 2002). Nestas regiões o tipo mais comum de própolis é o “Poplar”, também conhecido como álamo ou choupo, originado de *Populus* spp, principalmente da espécie *Populus nigra* L (Bankova *et al.*, 2000) onde estão presentes, além dos flavonóides, os ácidos cinâmicos e seus ésteres. Na Rússia, existe outro tipo de própolis chamada “Birch”, originária da espécie *Betula verrucosa* e a resina é constituída por flavonas diferentes da própolis encontrada no resto da Europa (Sforcin e Bankova, 2011).

Dentre os tipos mais difundidos também está a própolis do mediterrâneo, onde *Cupressaceae* é a fonte vegetal da resina e seus constituintes principais já identificados são diterpenos (Sforcin e Bankova, 2011). Outro tipo de resina em que foram identificados compostos fenilprenilados diferentes dos já isolados é encontrado no Japão e conhecida como própolis do Pacífico. Kumazawa *et al.* (2008) estudaram sobre a origem da vegetal da própolis do Pacífico, avaliando comportamento das abelhas e a composição da planta de origem hipotética e da resina foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência

(HPLC). Com estas análises confirmou-se que *Macaranga tanarius* é a principal fonte vegetal utilizada.

As fontes vegetais da própolis na América do Sul, especialmente no Brasil, são completamente diferentes das fontes de outras partes do mundo e é constatado que sua composição química também é diferente (Marcucci, 2001). Segundo Belmiro *et al.* (2011) só no Brasil existem mais de dez subtipos, incluindo própolis verde, própolis vermelha, própolis marrom, própolis preta, própolis amarela e o geoprópolis. Esses são diferenciados pela cor, pelo odor e pela consistência. As características da própolis estão associadas à planta de origem e à espécie de abelha produtora.

Na América do Sul o clima tropical favorece a existência de espécies de abelhas sem ferrão (Meliponinae) que coletam material resinoso das plantas e misturam-no com cera de abelhas e materiais do solo para formar a chamada geoprópolis (Kerr, 1987). A geoprópolis possui benzofenonas preniladas como substâncias características (Tomas-Barberan, 1993). Outra própolis que possui benzofenonas preniladas em sua composição é a própolis característica da região de Cuba e Venezuela, chamada de própolis “Clusia”, assim denominada por sua fonte botânica ser *Clusia spp* (Tusheva *et al.*, 2004). O gênero *Clusia* compreende mais de 150 espécies (Bennet e Lee, 1989) e suas benzofenonas preniladas isoladas já apresentaram inibição do vírus da imunodeficiência adquirida *in vitro* (Piccinelli *et al.*, 2005) e também atividade antitumoral (Ito *et al.*, 2003).

A própolis verde brasileira tem como fonte vegetal espécies de *Baccharis*, especialmente *B. dracunculifolia* (Bankova *et al.*, 2000) e seus constituintes majoritários são os ácidos diterpênicos e ácidos p-cumáricos prenilados (Salatino *et al.*, 2005). A atividade antibacteriana destas classes de compostos pode ser aumentada pelo número crescente de resíduos prenilados anexados à estrutura (Aga, *et al.*, 1994). Um dos ácidos p-cumáricos prenilados, conhecido como Artepelina C, apresentou atividade importante contra fibrossarcoma tumoral humano (Banksota *et al.*, 1998) e impediu a peroxidação lipídica e o desenvolvimento de câncer de pulmão em ratos (Kimoto, *et al.*, 2001). Análises do extrato de própolis verde por HPLC permitiram a identificação dos principais compostos fenólicos: ácido caféico, ácido p-cumárico, ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico (Drupanina) e ácido 3,5-

diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepelina C) e alguns flavonóides em menor proporção (Barros, 2007).

A própolis vermelha é característica do nordeste brasileiro. A principal origem são os exsudatos de *Dalbergia ecastophyllum* e os principais compostos são os isoflavonóides (Trusheva *et al.*, 2006). Sua coloração vermelha é característica, já que possui compostos rutusapurpurina A e rutusapurpurina B, que também estão presentes na planta de origem (Piccinelli *et al.*, 2011). Segundo Alencar *et al.* (2007) a própolis vermelha possui constituintes jamais encontrados em outros tipos de própolis e extratos desta mostraram atividades antitumorais e antioxidantes *in vitro*.

A riqueza de compostos da própolis brasileira, principalmente as mais conhecidas e estudadas como as do sudeste e nordeste, fazem com que as exportações cresçam cada vez mais. Em 2008, o SEBRAE juntamente com a APEX (Associação Brasileira de Promoção de Exportação e Investimentos) elaborou uma pesquisa sobre este crescimento (SEBRAE, 2008):

Tabela 1. Maiores destinos das importações brasileiras em 2007.

<i>País</i>	<i>Importações</i>	<i>Crescimento das importações</i>	<i>Exportações brasileiras no mercado alvo</i>	<i>Crescimento das exportações</i>	<i>Market share</i>
Alemanha	192.073.797	23,0%	29.435	-99,3%	0,02%
EUA	162.805.709	- 5,8%	19.058.335	10,0%	11,71%
Reino Unido	84.832.829	19,2%	215	-100,0%	0,00%
Japão	67.274.736	8,5%	62.481	671,6%	0,09%
Países Baixos	27.299.068	31,2%	-	-	-
França	63.793.505	22,9%	-	-	-
Itália	24.882.439	- 12,0%	-	-	-
Espanha	22.624.864	- 21,9%	18	-100,0%	0,00%

Suíça	21.836.292	17,8%	-	-	-
Bélgica	20.250.045	- 2,1%	-	-	-
<b>Mundo</b>	<b>848.667.524</b>	<b>12,0%</b>	<b>21.194.121</b>	<b>-9,3%</b>	<b>2,50%</b>

Fonte: GTIS, Elaboração: UIC – APEX Brasil

### 3.3. CONSTITUIÇÃO QUÍMICA

Na própolis existem numerosos compostos fenólicos especialmente ácidos fenólicos e flavonóides. Segundo Marcucci *et al.* (1998) na própolis Européia os flavonóides predominam entre as substâncias fenólicas. Por outro lado, as pesquisas recentes sugerem que na própolis brasileira os ácidos fenólicos são bem mais abundantes que os flavonóides. Talvez essa particularidade seja um dos fatores responsáveis pela enorme preferência do mercado internacional em relação à própolis produzida no Brasil. Embora a concentração de flavonóides na própolis brasileira seja relativamente pequena, é possível quantificá-los e utilizar os valores obtidos como parâmetro para o controle de qualidade químico.

Nas zonas temperadas do hemisfério norte as abelhas coletam a própolis apenas no verão (incluindo final da primavera e começo do outono - cerca de quatro meses) e por isso as variações sazonais na composição da própolis são insignificantes. No Brasil, entretanto, a coleta de própolis se dá durante todo o ano, deste modo existe uma variação sazonal na sua composição (Bankova, 1998).

Várias literaturas demonstram a similaridade ou relacionam algumas substâncias naturais das plantas aos componentes encontrados na própolis. Somente no caso do Brasil são descritas propriedades biológicas e variações na composição química para amostras coletadas em diferentes partes do país. Essa variação é facilmente explicada pela grande biodiversidade brasileira, assim como, a habilidade bioquímica das abelhas em alterar a composição nativa ou adicionar componentes próprios à própolis (Pereira *et al.*, 2002).

Alguns estudos sugerem que não só a vegetação local influencia na composição da própolis. Koo e Park, (1997) encontraram diferenças na química dos flavonóides de duas própolis coletadas por dois tipos diferentes de abelhas *Apis mellifera* na mesma região. Segundo os mesmos autores as abelhas africanizadas possuem um comportamento diferente da abelha europeia no que diz respeito à escolha de espécies visitadas.

Os compostos gerais encontrados na própolis estão descritos na tabela abaixo:

Tabela 2. Compostos encontrados na própolis.

<i>Classe</i>	<i>Tipos</i>
<b>Ácidos alifáticos e seus ésteres</b>	Butírico, isobutírico, fumárico, angélico, esteárico, cítrico, glutárico, linoléico, málico, mirístico, salicílico, sórbico, succínico, acetato de isobutila, acetato de isopentila e de isopentenila,
<b>Ácidos aromáticos e seus ésteres</b>	<b>Ácidos:</b> Benzóico, caféico, cumárico, ferúlico, cinâmico, hidroxicinâmico, ácido 3,4-dimetoxicinâmico, vanílico.  <b>Ésteres:</b> acetato de benzila, benzoato de benzila, cafeato de benzila, cumarato de benzila, cafeato de fenil etila, ferulato de prenila, salicilato de benzila, cafeato de butenila, cafeato de butila, cafeato de cinamila, cafeato de butila, benzoato de etila, benzoato de metila, salicilato de metila.
<b>Álcoois</b>	Cinamílico, fenetílico, prenílico, eugenol, isobutenol, benzílico.
<b>Flavonóides</b>	<b>Flavononas:</b> pinobanksina, naringenina, pinocembrina, pinostrobina  <b>Flavonas e flavonóis:</b> apigenina, galangina, kampferol, quercetina.
<b>Chalconas</b>	Chalcona de alpinetina, naringenina, pinobanksina e pinocembrina.
<b>Terpenóides</b>	Cimeno, 1,8-cineol, sesquiterpenóides, estireno, hexanolactona, limoneno, naftaleno,

<b>Cetonas</b>	Acetofenonas e seus derivados.
<b>Aldeídos</b>	Aldeído caprótico, anetol, benzaldeído, haxanal, p-hidroxibenzaldeído, vanilina.
<b>Esteróides</b>	acetatos de estigmasterol e calinasterol.
<b>Aminoácidos</b>	alanina, $\beta$ -alanina, ácido $\alpha$ -aminobutírico, ácido- $\delta$ -aminobutírico, arginina, asparagina, ácido aspártico, cistina, cisteína, ácido glutâmico, glicina, histidina, hidroxiprolina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, ornitina, fenilalanina, prolina, ácido piroglutâmico, sarcosina, triptofano, valina, serina, treonina e tirosina.
<b>Açúcares</b>	<i>d</i> -ribofuranose, <i>d</i> -frutose, <i>d</i> -glucitol, <i>d</i> -glucose, talose, sacarose e xilitol, xilose, galactose, manose, ácido galacturônico, lactose, maltose, melibiose, eritritol e inositol.
<b>Lignanas</b>	sesamina, aschantina, sesartenina, dihidrobenzofurano.
<b>Vitaminas</b>	A, B1, B2, B6, C, E, ácido nicotínico e ácido pantotênico.
<b>Minerais</b>	Alumínio, bário, bismuto, cálcio, cobalto, cobre, cromo, estrôncio, ferro, magnésio, manganês, níquel, prata, silício, vanádio e zinco.

(Bankova et al., 2000; Guerra e Méndez, 1997; Marcucci, 1995; Asís, 1991; Greenaway, 1990)

### 3.3.1. Compostos fenólicos

Em relação à ação farmacológica a principal classe de constituintes da própolis são os compostos fenólicos (Marcucci, 1998). Os compostos fenólicos pertencem a uma classe de compostos que inclui uma grande diversidade de estruturas, simples e complexas, que possuem pelo menos um anel aromático no qual, ao menos, um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila (Carvalho, Gosmann e Schrenkel, 2001). São compostos facilmente oxidáveis, tanto por influência de enzimas vegetais específicas quanto pela presença de

metais, luz, calor, meio alcalino, ocasionando o escurecimento de soluções ou compostos isolados (Simões *et al.*, 2001). Os compostos fenólicos possuem diversas classes de acordo com sua estrutura química, como mostra a tabela.

Tabela 3. Classificação dos compostos fenólicos

<b>Esqueleto básico</b>	<b>Classe de compostos fenólicos</b>
C6	Fenóis simples, benzoquinonas
C6 – C1	Ácidos fenólicos
C6 – C2	Acetofenonas e ácidos fenilacéticos
C6 – C3	Fenilpropanóides: ácidos cinâmicos e compostos análogos, fenilpropenos, cumarinas, isocumarinas e cromonas
C6 – C4	Naftoquinonas
C6 – C1 – C6	Xantonas
C6 – C2 – C6	Etilbenzenos, antraquinonas
C6 – C3 – C6	Flavonóides e isoflavonóides
(C6 – C3) <sub>2</sub>	Ligninas
(C6 – C3 – C6) <sub>2</sub>	Diflavonóides
(C6) <sub>n</sub>	Melaninas vegetais
(C6 – C3) <sub>n</sub>	Ligninas
(C6 – C1) <sub>n</sub>	Taninos hidrolisáveis
(C6 – C3 – C6) <sub>n</sub>	Taninos condensados

Fonte: CARVALHO, GOSMANN e SCHENKEL (2001)

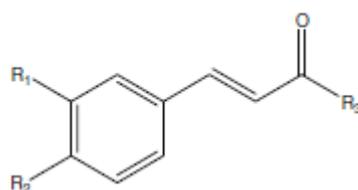
Existe outra classificação para os compostos fenólicos relacionando sua ocorrência no reino vegetal, sendo compostos amplamente distribuídos ou de distribuição restrita. Na família dos compostos largamente distribuídos na natureza encontram-se os flavonóides, ácidos fenólicos, cumarinas e derivados de polimerização, como os taninos e as ligninas (Carvalho, Gosmann e Schenkel, 2001).

Os compostos fenólicos são encontrados tanto em plantas comestíveis quanto nas não comestíveis e a eles têm sido atribuído diversas atividades biológicas (Roginski e Lissi, 2005). Estas substâncias na própolis são representadas pelas agliconas de flavonóides, ácidos fenólicos e seus ésteres, os quais são responsáveis pela bioatividade contra vários microorganismos patogênicos (Banskota *et al.*, 1998; Burdock, 1998).

Dentre as propriedades biológicas apresentadas por estes compostos pode se destacar as atividades antialergênicas, antiinflamatória, antimicrobiana, antitrombótica, cardioprotetora e vasodilatadora, entretanto sua principal atividade tem sido relacionada com o potencial antioxidante (Andreo e Jorge, 2006).

### 3.3.1.1. Ácidos fenólicos e seus ésteres

Os principais ácidos fenólicos são os derivados de ácido benzóico (C6-C1) e derivados de ácido cinâmico (C6-C3), constituídos por núcleo básico hidroxifenilpropenóico:



Phenolic acids	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Caffeic acid (1)	OH	OH	OH
<i>p</i> -Coumaric acid (3)	H	OH	OH
Ferulic acid (4)	OH	OCH <sub>3</sub>	OH
Isoferulic acid (5)	OCH <sub>3</sub>	OH	OH
3,4-Dimethyl-caffeic acid (6)	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH
<i>p</i> -Coumaric acid methyl ester (8)	H	OH	OCH <sub>3</sub>
<i>p</i> -Coumaric acid isoprenyl ester (23)	H	OH	
Caffeic acid isoprenyl ester (15)	OH	OH	
Caffeic acid benzyl ester (16)	OH	OH	
Caffeic acid phenylethyl ester, CAPE (21)	OH	OH	
Caffeic acid cinnamyl ester (24)	OH	OH	

Figura 1. Núcleo básico hidroxifenilpropenóico e seus radicais.

Dentre os polifenóis da própolis, uma série de ésteres de cafeato dotados de espectros de bioatividade foram identificados; o fenetil cafeato (CAPE) e prenil cafeato representam os os ésteres com ação anti-inflamatória/anticâncer e estes são considerados os principais

constituintes alergênicos na própolis da zona temperada (Grunberger *et al.*, 1988; Walgrave *et al.*, 2005). Os ésteres de ácidos fenólicos, especialmente cafeatos e ferulatos foram identificados por possuírem ação antibacteriana, antifúngica e antiviral (Serkedjieva *et al.*, 1992; Kujumgiev *et al.*, 1993).

Diversos tipos de própolis contêm derivados do núcleo hidroxifenilpropenóico. Análises do extrato de própolis verde por HPLC permitiram a identificação de compostos fenólicos como ácido caféico, ácido p-cumárico, ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico (Drupanina) e ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepelina C) e alguns flavonóides em menor proporção (Barros *et al.*, 2007).

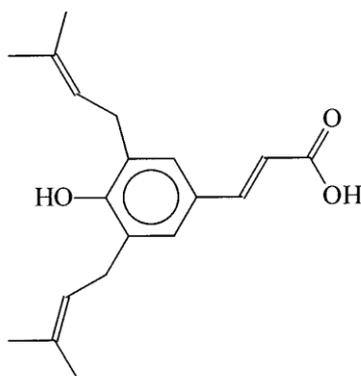


Figura 2. Estrutura química do ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepelina C).

Aga *et al.* (1994), avaliaram a atividade de compostos isolados da própolis e verificaram que é provável que o ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico seja um dos compostos da própolis brasileira com maior atividade antibacteriana.

### 3.3.1.2. Flavonóides

Os flavonóides, biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides, constituem uma importante classe dos polifenóis, presentes em relativa abundância entre os metabólitos

secundários vegetais (Zuanazzi, 2001). Constituem uma classe muito extensa de compostos naturais distribuídos no reino vegetal. São substâncias aromáticas que contêm 15 átomos de carbono em seu esqueleto básico, possuindo estrutura C6-C3-C6, onde os dois anéis C6 são necessariamente aromáticos, conectados por uma ponte de três carbonos, que geralmente contém um átomo de oxigênio (Manach, 2004).

Flavonóides estão presentes em todas as partes das plantas, desde as raízes até folhas e frutos, sendo encontrados nos vacúolos das células, podendo ser encontrados na formas livre (agliconas) ou ligados a açúcares (glicosídeos) (Markham, 1982). Absorvem radiação eletromagnética na faixa do ultravioleta (UV) e do visível, e dessa maneira apresentam papel de defesa nas plantas contra raios UV solares. Apresentam normalmente duas bandas de absorção no UV, sendo uma compreendida entre 220-395 nm e outra entre 300-390 nm (Robards et al., 1999). A estrutura geral dos flavonóides está representada na Figura 3:

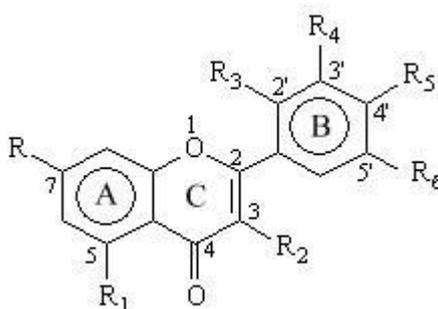


Figura 3: Núcleo básico dos flavonóides

Diversas funções são atribuídas aos flavonóides nas plantas. Dentre elas pode-se citar a proteção dos vegetais contra a incidência de raios ultravioleta e visível, além de proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias, também possuem função de atrair insetos para polinização, funcionam como antioxidantes, controlam ação de hormônios, são agentes alelopáticos e inibem algumas enzimas (Zuanazzi, 2001).

A explicação para a existência de uma grande diversidade estrutural dos flavonóides se dá pelas modificações que tais compostos podem sofrer, tais como: hidroxilação, metilação, acilação, glicosilação, entre outras (Lopes *et al.*, 2000).

Flavonóides (Figura 4) são reconhecidos por suas atividades antibacterianas, antifúngicas e antivirais e com isso, caracterizados por serem responsáveis por grande parte dos efeitos benéficos da própolis (Ghisalberti, 1979; Marcucci, 1995). Indivíduos que ingerem maiores quantidades de flavonóides, os quais são encontrados em alimentos de origem vegetal (verduras, frutas, chá, mel etc.) apresentam uma diminuição considerável do risco de morte por acidentes cardiovasculares (Kinsella *et al.*, 1993).

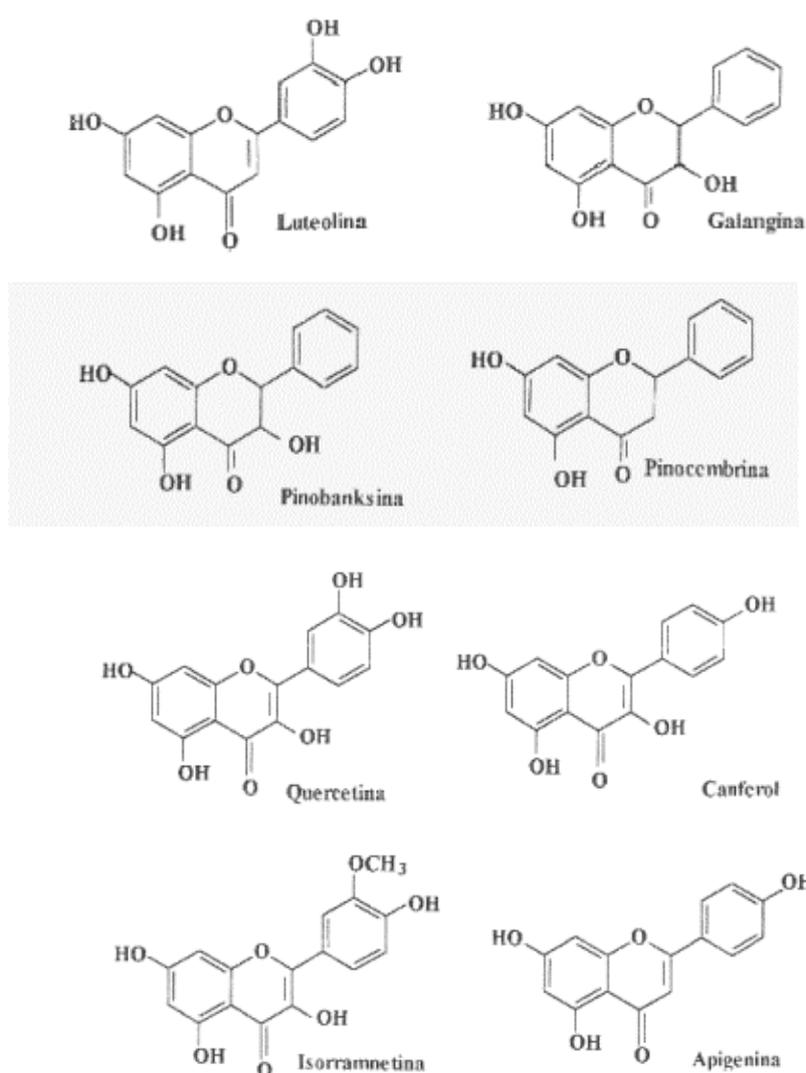


Figura 4. Compostos flavonóides comumente encontrados na própolis.

Há diversas atividades biológicas associadas ao consumo de flavonóides. Sabe-se que a flavanona naringenina e sua forma glicosilada naringina, quando associada a corantes alimentícios como a antocianina ou carmin, produzem uma acentuada redução da hiperlipidemia induzida (Lopes *et al.*, 2000).

Os efeitos imunoregulatórios da quercetina mostram contribuir, tanto em testes *in vitro* como *in vivo*, com o efeito antiaterosclerótico dos flavonóides (Nickel *et al.*, 2010). Em estudos mais recentes a quercetina exibiu propriedade células tumorais da próstata, modulando a expressão de fatores de crescimento relacionados à insulina e com isso sinalizando moléculas à indução de apoptose de células cancerosas (Senthilkumar *et al.*, 2010).

A quercetina possui importante papel na inibição de grupo II da fosfolipase A2, impedindo formação de mediadores da inflamação (Lindhal e Tageson, 1993). Juntamente com a quercetina, a galangina desempenha importante papel antiinflamatório já que inibe a atividade da ciclooxigenase (COX) e da lipooxigenase, diminuindo a liberação de prostaglandinas e expressão e liberação da isoforma indutível da COX (Borelli *et al.*, 2002).

A própolis possui várias atividades que são devidas à existência de flavonóides em sua composição. A ação antimicrobiana é descrita por Lindenfelser (1967) especialmente contra bactérias Gram positivas. Esta atividade é relatada devido a flavonóides e ácidos aromáticos e seus ésteres presentes na resina (Burdock, 1998).

### **3.4. ATIVIDADES BIOLÓGICAS**

Nos últimos anos a literatura científica vem relatando as propriedades farmacológicas da própolis de interesse médico-farmacêutico tais como atividades bacteriostática e bactericida, fungistática e fungicida, virustática e virucida, antioxidante, anti-tumoral, cicatrizante, reparadora tissular, anestésica, contra parasitas intestinais e sanguíneos, antimutagênica e contra doenças cardiovasculares e respiratórias (Fontana *et al.*, 2004).

Independentemente da sua origem, a própolis sempre apresenta atividade antimicrobiana, uma vez que seu efeito bactericida e fungicida é indispensável para preservar a vida na colméia. Acredita-se que a atividade antimicrobiana da própolis se deve a efeitos sinérgicos complexos entre flavonóides, ácidos aromáticos fenólicos e seus derivados que estão presentes majoritariamente na própolis (Kedzia, 1990; Krol et al., 1993; Marcucci, 1995; Bankova *et al.*, 1998; Burdock, 1998).

Em estudos de Tyler (1987), diversos flavonóides foram isolados da própolis e houve relação destes com a atividade antibacteriana e antifúngica da mesma. Os flavonóides pinocembrina e galangina, além de éster do ácido benzil p-cumárico e éster do ácido fenetil caféico demonstraram atividade antibacteriana. Também foi relatada a ação antifúngica e anestésica da flavonona pinocembrina. O interesse nos flavonóides da própolis é devido a sua contribuição relevante para a atividade desta resina. Bactérias Gram-positivas são inibidas com baixas concentrações de própolis (0,4%) e Gram-negativas são menos suscetíveis (de 4,5 a 8,0 %) (Sforcin *et al.*, 2000).

A avaliação antifúngica do extrato de própolis “Poplar” em etanol 70% mostrou importante atividade contra isolados de peles e unhas. Foi determinada a concentração mínima inibitória por microdiluição de acordo com o Comitê Nacional para Padrões de Laboratórios Clínicos (NCCLS) e comparou-se a amostra de própolis com os fármacos antifúngicos fluconazol, cetoconazol, itraconazol e terbinafina. A CIM da própolis foi de 0,1 µg/mL, sendo considerada uma boa inibição e um potente agente para tratamento de dermatofitoses (Koc, 2005). Em outro estudo a atividade antibacteriana e antifúngica de própolis do tipo “Poplar” é justificada pela presença de compostos fenólicos, principalmente flavonóides, ácidos fenólicos e seus ésteres (Ghisalberti, 1979).

Extratos etanólicos a 70% obtidos com própolis de diversos países foram avaliados em relação a sua atividade antibacteriana. Todos os extratos realizaram significativa inibição bacteriana contra *Staphylococcus aureus* e nenhum foi ativo contra *Escherichia coli*, como já relatado por Marcucci (1995). A maioria das amostras também demonstrou atividade antifúngica e antiviral (Kujumgiev *et al.*, 1999).

Em outras análises foi verificado que alterações nas atividades antimicrobianas não ocorreram com a coleta da própolis em diferentes estações (Santos *et al.*, 2003; Sforcin *et al.*, 2000). Relatos de Bankova *et al.* (1998) refletem o efeito da sazonalidade nas características da própolis. Porém não necessariamente a alteração química de constituintes levaria a uma alteração de atividade biológica.

O tipo de abelha influencia na qualidade da própolis. Silici *et al.* (2005) comprovou este fato analisando própolis coletadas por diferentes tipos de abelhas localizadas no mesmo apiário, ou seja o risco de a vegetação influenciar foi mínimo. Os tipos avaliados foram *Apis mellifera caucasica*, *Apis mellifera anatolica* e *Apis mellifera carnica*. A atividade antifúngica de todas foi avaliada e a *Apis mellifera caucasica* foi a que possui maior efeito.

Além das atividades antimicrobianas e antifúngicas, já foram relatadas diversas aplicações para própolis, como efeito imunomodulador (Park *et al.* 2004; Orsatti *et al.*, 2010) e aumentando a resistência à infecções (Tyler, 1987), antiinflamatório (Borrelli *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2005), antioxidante (Korkina, 2007), antiviral (Burdock, 1998), antibacteriano (Boukraa e Sulaiman, 2009) e inibição de divisão celular (Ishihara *et al.*, 2009).

A atividade antiinflamatória da própolis foi comprovada em testes onde extratos aquosos de própolis a 13% foram testados em doses orais de um, cinco e dez miligramas por quilo em modelo de edema de pata de rato e em ratos com artrite induzida. Houve resposta positiva e dose dependente na inflamação comparando o extrato com diclofenaco (Khayyal, 1993).

Ações contra Leishmaniose estão entre as propriedades da própolis. A morfologia e a viabilidade de promastigotas de *Leishmania infantum* e *Leishmania tropica* após incubação com própolis em diferentes concentrações foram avaliadas e o crescimento foi significativamente suprimido por concentrações de 500, 750 e 1000 µg/mL de própolis de origem turca (Duran, 2011).

Dentre todos os produtos derivados da abelha, a própolis é a que possui maior efeito antioxidante. Ensaio *in vitro* com extratos de própolis mostraram que os mais efetivos antioxidantes presentes são os derivados de ácido cafeolínicos no extrato aquoso e os

derivados do ácido cinâmico (artepelina C, bacarina, ácido p-cumárico e drupanina) no extrato etanólico. O ácido cafeoiquínico possui atividade semelhante ao antioxidante trolox e ácido ascórbico. A geléia real e o produto glandular ácido 10-hidroxi-2-decenóico não possuíram efeitos antioxidantes (Nakajima *et al.*, 2009).

Em estudos mais recentes Butnariu e Giuchici (2011) apontam a própolis como um ativo na formulação de nanoemulsões com proteção contra raios UVA. Sua associação com licopeno faz desta formulação um potente produto que tem como características modular o estresse oxidativo, principalmente pela redução dos processos pró-oxidantes e pelo aumento dos antioxidantes. Estas substâncias participam da síntese de prostaglandinas e fosfolípídeos que compõem a membrana celular, reforçando assim os mecanismos de proteção da pele.

Em ensaio *in vitro* de Umthong *et al.* (2011), extratos de própolis da Tailândia obtidos por gradiente de polaridade foram utilizados para avaliação de atividade antiproliferativa em células tumorais e normais. A fração de própolis extraída com hexano foi a que apresentou maior ação antiproliferativa nas células cancerosas, sem afetar as saudáveis. Com estes resultados a própolis tailandesa está no alvo de estudos para desenvolvimento de medicamentos. Em vista disso sabe-se que a própolis apresenta propriedades antitumorais e anticancerígenas potenciais, porém os mecanismos envolvidos na quimioprevenção ainda são obscuros (Sforcin, 2007).

Ainda há necessidade de maiores análises sobre algumas propriedades da própolis. Ensaio *in vitro* e *in vivo* nem sempre incluem extratos quimicamente caracterizados, devendo-se esperar uma variabilidade farmacológica nas preparações (Henrich, 2008).

### **3.5. CLASSIFICAÇÃO SEGUNDO A LEGISLAÇÃO BRASILEIRA**

A própolis é um produto natural, de características físicas resinosas e composição variável, coletada de várias espécies vegetais e que sofre adição de secreções da abelha, sendo classificada de acordo com a ANVISA como um medicamento específico dentro da classe de opoterápicos. Opoterápico é conceituado como uma preparação obtida a partir de glândulas outros órgãos, tecidos e secreções de animais.

Medicamentos específicos são soluções de grande e de pequeno volume, parenterais ou não, tais como água para injeção, soluções de glicose, cloreto de sódio, demais compostos eletrolíticos ou açúcares; os medicamentos obtidos a partir de glândulas, outros órgãos, tecidos e secreções animais, como a própolis (ANVISA).

Segundo a ANVISA para produtos de uso tópico com as seguintes indicações de uso: para usos como antiinflamatório, anti-séptico e cicatrizante não serão exigidos estudos de comprovação de eficácia. Para outras indicações não derivadas de uso tradicional e para associações que envolvam própolis e extratos vegetais (ativos), deverá ser apresentado um dos itens seguintes:

- 1) Comprovação clínica (Fase III) do efeito terapêutico e da segurança de uso para a própolis específica que é utilizada no produto ou na associação.
- 2) A comprovação da eficácia e da segurança de uso também poderá ser apresentada por meio de literatura científica indexada em bases de dados com estudos realizados com a própolis específica objeto do produto a ser registrado. Serão necessários, no mínimo, oito estudos, englobando ensaios clínicos e de segurança de uso do produto.

A própolis pode ser classificada em teor de flavonóides, como baixo teor (até 1,0% m/m), médio teor (> 1,0% - 2,0% m/m) ou alto teor (> 2,0% m/m) (Brasil, 2001).

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. COLETA DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS**

As amostras de própolis foram obtidas através de dois apiários localizados em diferentes regiões do Rio Grande do Sul. As amostras tinham procedência de áreas de vegetação heterogênea, uma delas da região da serra gaúcha, mais precisamente em Cambará do Sul (Amostra 1) e a outra da campanha gaúcha, região entre Caçapava do Sul e Lavras do Sul (Amostra 2). Após a realização da coleta as amostras foram armazenadas em recipiente de vidro enquanto aguardavam as análises.

### **4.2. EXTRAÇÃO COM GRADIENTE DE POLARIDADE**

Após trituração das amostras foram realizadas extrações com solventes de polaridade crescente, visando esgotar o material e obter a maior quantidade possível de compostos para análise. Utilizou-se primeiramente hexano a fim de extrair nesta fração compostos mais apolares, sendo diclorometano, acetato de etila e metanol a sequência das extrações. Foram pesados 0,6 g de amostra de própolis em vidro de relógio e transferidos para tubo de ensaio com tampa onde foram adicionados 5 mL dos solventes, para obter a maior proximidade com o esgotamento do material.

Após a adição dos 5 mL do solvente, realizou-se maceração estática por dois dias. Ao fim dos dois dias, o solvente foi evaporado em temperatura ambiente e ao sólido restante adicionou-se nova quantidade do mesmo solvente, permanecendo em contato com o material por mais dois dias. Passado este período, o solvente foi transferido e evaporado à temperatura ambiente em capela. Ao material residual adicionou-se próximo solvente da sequência. Este procedimento de duas extrações e evaporações foi realizado com todos os solventes, obtendo-se assim quatro extratos de cada amostra.

### 4.3. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

Realizaram-se cromatografias em camada delgada dos quatro extratos das duas amostras para verificar, diante de sua complexidade de substâncias, se estas qualitativamente apresentavam componentes distintos.

O extrato hexano das duas amostras foram ressuspensos em 0,5 mL de diclorometano e aplicados em placa de sílica-gel. O mesmo procedimento foi feito com o extrato diclorometano das amostras 1 e 2 utilizando-se 0,5 mL de uma mistura diclorometano/metanol e aplicou-se também à mesma placa de sílica. O solvente utilizado para eluição foi o diclorometano, visto que possui uma polaridade média e com isso foi escolhido para realizar a análise preliminar (Cromatografia A).

Os extratos preparados foram aplicados à cromatofolhas de alumínio de gel de sílica GF 254 (Merck). Após a eluição os cromatogramas foram observados à luz visível, em seguida sobre luz ultravioleta (254 e 365 nm) e após revelação com o reagente cromogênico anisaldeído sulfúrico seguido por aquecimento a 100°C.

Nas cromatografias B e C foram aplicadas as amostras acetato de etila e metanol ressuspensos em 0,5 mL de metanol. O eluente utilizado na cromatografia B foi acetato de etila puro e na cromatografia C foram acetato de etila: metanol: água (100:13,5:10). O revelador utilizado foi difenilborato de aminoetanol e observou-se a migração dos compostos através de luz UV.

#### 4.3.1. Reagentes utilizados para Cromatografia em Camada Delgada:

Revelador Anisaldeído

- 0,3 mL de anisaldeído
- 5 mL de ácido sulfúrico concentrado
- 10 mL de ácido acético glacial
- 65 mL de metanol

Reagente Natural (Difenilborato de aminoetanol)

- 1 g de difenilborato de aminoetanol em 100 mL de metanol

#### 4.4. DOSEAMENTO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

O doseamento de compostos fenólicos foi realizado por espectrofotometria com uma curva de padrão de quercetina de acordo com o método proposto por Singleton e Rossi (1965). A curva padrão foi feita com seis pontos em concentrações crescentes de quercetina. A partir de uma solução estoque, os pontos da curva foram preparados por diluição em balões volumétricos de 100 mL.

Preparou-se uma solução estoque diluindo-se 125 mg de quercetina em balão volumétrico de 50ml (2,5 mg/mL) e a partir desta solução foi pipetado os seguintes volumes em balão volumétrico de 100 mL:

Tabela 4. Concentrações da curva de quercetina.

	V sol. estoque (2,5 mg/mL)	Concentração final
<b>Ponto 1</b>	0 mL	0,00 mg/ mL
<b>Ponto 2</b>	2 mL	0,050 mg/ mL
<b>Ponto 3</b>	4 mL	0,100 mg/ mL
<b>Ponto 4</b>	6 mL	0,150 mg/ mL

<b>Ponto 5</b>	10 mL	0,250 mg/ mL
<b>Ponto 6</b>	20 mL	0,500 mg/ mL

Os reagentes utilizados para a técnica foram:

#### Folin-Ciocalteu 0,2N

Preparado a partir da diluição de reagente Folin-Ciocalteu 2N com água destilada. Para o experimento, foram utilizados 5 mL da solução diluída. O volume final do reagente foi calculado de acordo com o número de amostras ( $n^\circ \times 5$  mL), prevendo-se uma pequena quantidade a mais para ambientação da vidraria de medição e eventuais perdas. A diluição foi feita em balão volumétrico momentos antes do experimento em recipiente protegido de luz (embrulhado em papel alumínio).

#### Carbonato de Sódio 7,5%

Preparado a partir da pesagem e diluição de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  anidro. No experimento, foram utilizados aproximadamente 5 mL da solução por amostra. O volume final do reagente foi calculado de acordo com o número de amostras, prevendo-se uma pequena quantidade a mais. A diluição foi feita em proveta.

A ressuspensão dos extratos secos foi feita em metanol momentos antes do doseamento, pesando uma massa de extrato e adicionando o metanol até uma concentração de 10 mg/mL. Após realizou-se a pipetagem em série, adicionando:

#### Pipetagem da curva

- 130  $\mu\text{L}$  do ponto
- 5 mL de folin 0,2N
- 4,870 mL de carbonato de sódio 7,5% (5 minutos depois da adição do folin)

### Pipetagem das amostras

- 30  $\mu$ L da amostra (60  $\mu$ L para os extratos de hexano)
- 5 mL de folin 0,2N
- 4,970 mL de carbonato de sódio 7,5% 5 minutos depois da adição do folin (4,940 mL nas amostras extraídas com hexano)

A reação foi realizada em triplicata em frascos âmbar e após uma hora de reação total ao abrigo de luz, foi efetuada a leitura das amostras em comprimento de onda de 765 nm, que deveriam apresentar absorbâncias entre 0,2 e 0,8.

### **4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados relacionados aos compostos fenólicos (expressos em equivalente de quercetina por grama de resina) foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP). A comparação entre as médias foi feita por ANOVA de uma via, seguida do Teste de Tukey. Um valor de p menor que 0,05 foi considerado significativo. Todas as análises foram realizadas através do programa SPSS (“Statistical Package for the Social Sciences”) em um computador PC compatível.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. ANÁLISES ORGANOLÉPTICAS

A própolis quando coletada nas colméias ou caixas de abelhas encontra-se na forma de resina, visto que acima de 15° C sempre se encontram solidificados (Asís, 1996). As amostras 1 e 2 apresentaram solidificação, porém com características físicas diferentes, o que pode ser um indicativo de suas composições químicas distintas.

Após a coleta e armazenamento do material resinoso, realizaram-se análises das características organolépticas deste, como aparência, cor, odor e consistência. Houve grande diferença nestes aspectos entre as duas amostras, como verificado na tabela abaixo:

Tabela 5. Características organolépticas das amostras de própolis.

	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>
<b>Cor</b>	Marrom – amarelo esverdeado	Marrom escuro
<b>Odor</b>	Fraco e característico	Forte e marcante
<b>Sabor</b>	Característico	Característico com adormecimento
<b>Consistência</b>	Quebradiço	Pegajoso

A coloração da amostra 1 foi identificada como sendo de marrom a amarelo esverdeada e o odor percebido foi característico e suave. Na análise de consistência a amostra apresentou características quebradiças e houve facilidade na trituração para a elaboração dos extratos. A amostra 2 apresentou coloração marrom escura, seu odor foi perceptivelmente distinto da amostra 1 visto que era forte e marcante. A amostra 2 possuía consistência bem diferenciada da amostra 1.

Algumas própolis possuem características chamadas de vitrificadas (Park *et al.*, 1998) que ocorre quando estas têm aparência brilhosa e são rígidas, e apesar da amostra 2 ser pegajosa, ela possuía pontos aparentemente cristalizados por toda sua extensão, o que caracteriza esse tipo de própolis. Outra característica da amostra 2 que foi descrita pelo

apicultor que coletou esta amostra e comprovada após análise sensorial, foi a de “adormecimento” da boca quando realizada a verificação de seu sabor.

Após as análises organolépticas foram realizadas extrações divididas em etapas de acordo com Simões et al. (1999), explorando uma troca de solventes em cada extração de acordo com a polaridade de cada solvente. A seqüência de solventes proposta se baseia em uma polaridade crescente dos mesmos. A realização da primeira extração com um solvente apolar, como hexano, para retirada de óleos, gorduras, esteróis, pigmentos e outros compostos lipofílicos facilita a extração posterior de flavonóides. A próxima extração sendo realizada com um solvente mais polar (diclorometano) consegue-se extrair compostos pouco polares como flavonas, flavonóis, flavanonas e outras agliconas com alto grau de metilação. Na terceira extração sugere-se utilizar um solvente mais polar como acetato de etila ou acetona para extração de flavonas e flavonóis mais polares, ou seja agliconas polihidroxiladas. Por último é feita extração com metanol para obtenção dos compostos mais polares como poliglicosídeos.

Ao término de todas as extrações a aparência dos extratos foi avaliada. Os extratos da amostra 1 apresentaram colorações em tons de marrom escuro e turvos, enquanto que a amostra 2 originou extratos límpidos e amarelos claros, indicando possibilidade de qualidades diferentes de substâncias presentes.

## **5.2. ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS**

Ao finalizar as quatro extrações foram elaboradas cromatografias em camada delgada com o objetivo de analisar as visualmente as composições dos dois tipos de própolis, da região da serra e da região da campanha rio grandense, a fim de apontar evidências de sua distinção. A diferença de polaridade dos extratos foi idealizada para conseguir extrair os mais diversos componentes da própolis. A cromatografia em camada delgada é considerada um método de análise de compostos versátil, veloz e sensível (Harborne, 1998).

Na primeira análise, cromatografia A, o objetivo foi observar o perfil dos compostos extraídos com hexano e com diclorometano, utilizando-se o diclorometano como eluente.

Obteve-se uma boa migração dos compostos extraídos com hexano, porém houve uma grande concentração de compostos na região próxima ao ponto de aplicação, indicando a presença de compostos mais polares nos extratos de diclorometano nas amostras 1 e 2. Notou-se diferença de composição entre as amostras, tanto na aplicação do extrato de hexano quanto de diclorometano, principalmente em relação a uma provável existência de terpenóides na amostra 1, pois foram obtidas bandas de cor rosa nestas e na amostra 2 isso não ocorreu. As principais fontes de terpenóides são os óleos essenciais, que são amplamente distribuídos na natureza, principalmente no reino vegetal (Ikan, 1991), e que já foram encontrados na própolis (Kartal *et al.*, 2003; Bankova *et al.*, 1998).

Outra diferença importante verificou-se após a revelação com anisaldeído seguida de aquecimento, onde foi visualizada a presença de uma banda vermelha na amostra 1 que não está presente na amostra 2 conforme pode ser observado na Figura 5.



Figura 5. Cromatografia em camada delgada: extração das frações hexano 1, diclorometano1, hexano 2 e diclorometano 2, respectivamente.

Nas frações de própolis extraídas com acetato de etila e metanol, encontram-se compostos mais polares. Nas cromatografias B e C o objetivo foi verificar a presença de agliconas livres e flavonóides glicosídicos, respectivamente. As substâncias flavonóides nos vegetais normalmente encontram-se na forma glicosilada e na própolis isto não ocorre, sendo mais rara a presença de glicosídeos. A explicação para tal afirmativa está na participação ativa

da abelha na formação da própolis, visto que as substâncias que secreta causam a conversão dos glicosídeos à agliconas (Guerra e Méndez, 1997).

Na cromatografia B (Figura 6) adicionou-se acetato de etila à cuba cromatográfica, houve boa resolução no perfil de análise, percebendo-se a presença de agliconas livres. Foi verificada a aparição de bandas verdes intensas observadas na luz UV, após a aplicação do reagente natural, indicando a possível presença de derivados de apigenina em ambas as amostras. Visualmente a intensidade de coloração foi muito superior na amostra 1. A identificação de bandas laranjas intensas na luz UV foram observadas em ambas amostras e são características de derivados de quercetina (Brasseur e Angenot, 1986).



Figura 6. Cromatografia em camada delgada observada na luz UV (365 nm). A eluição foi realizada com acetato de etila. As amostras representadas, da esquerda para direita, são acetato de etila 1, metanol 1, acetato de etila 2, metanol 2.

Na cromatografia C (Figura 7), investigou-se a presença de flavonóides glicosilados, e por isso utilizou-se o eluente contendo acetato de etila: metanol: água para análise, que é um dos recomendados para identificação de compostos glicosilados. Foi observado na luz UV, após a revelação com reagente natural, que os flavonóides glicosilados estavam presentes em pequenas concentrações e possivelmente são derivados de apigenina, uma vez que desenvolveram coloração verde característica deste composto. (Brasseur e Angenot, 1986).

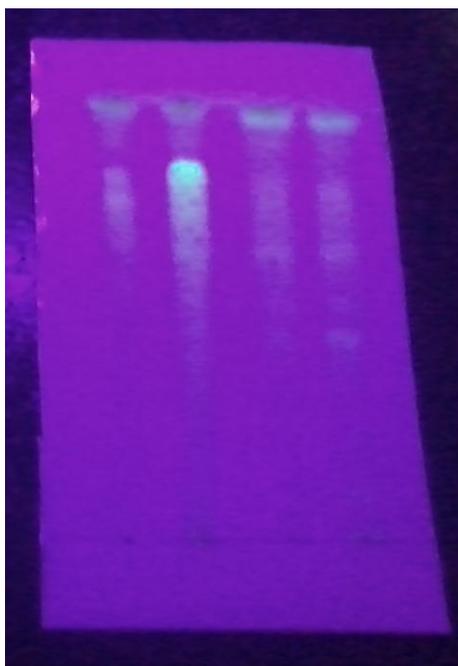


Figura 7. Cromatografia em camada delgada observada na luz UV (365 nm). A eluição foi realizada com acetato de etila: metanol: água. As amostras representadas, da esquerda para direita, são acetato de etila 1, metanol 1, acetato de etila 2, metanol 2.

### 5.3. DOSEAMENTO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

As amostras 1 e 2 apresentaram diferentes quantidades visuais de compostos nas cromatografias em camada delgada e para verificar se realmente há maior concentração de compostos fenólicos na amostra 1, realizou-se análise espectrofotométrica destes compostos. A tabela 6 indica as absorvâncias encontradas em cada fração extraída e a quantidade de compostos fenólicos foi calculada expressa em quercetina.

Tabela 6. Concentrações de compostos fenólicos nas amostras 1 e 2 de própolis.

<b>Amostra</b>	<b>Absorbância (A)</b>	<b>Quantidade compostos fenólicos expressos em quercetina</b>
<b>Hexano 1</b>	0,302	5,87
<b>Diclorometano 1</b>	0,459	19,63

<b>Acetato de etila 1</b>	0,581	23,53
<b>Metanol 1</b>	0,712	29,78
<b>TOTAL</b>		<b>78,81</b> Eq. quercetina/g resina
<b>Hexano 2</b>	0,150	1,83
<b>Diclorometano 2</b>	0,429	13,35
<b>Acetato de etila 2</b>	0,589	23,59
<b>Metanol 2</b>	0,725	30,01
<b>TOTAL:</b>		<b>68,78</b> Eq. quercetina/g resina

No doseamento encontrou-se maior quantidade de compostos fenólicos na amostra 1. Já havia sido observada esta hipótese quando foram analisadas as cores dos extratos e as intensidades de colorações das bandas nas cromatografias em camada delgada e isso se confirmou na dosagem de compostos fenólicos, visto que há uma maior riqueza de compostos fenólicos na amostra 1 em relação à amostra 2.

Realizou-se análise estatística para verificar se houberam diferenças nas quantidades de compostos fenólicos entre os extratos da mesma amostra. Todos os extratos tiveram significativas diferenças nas quantidades de compostos.

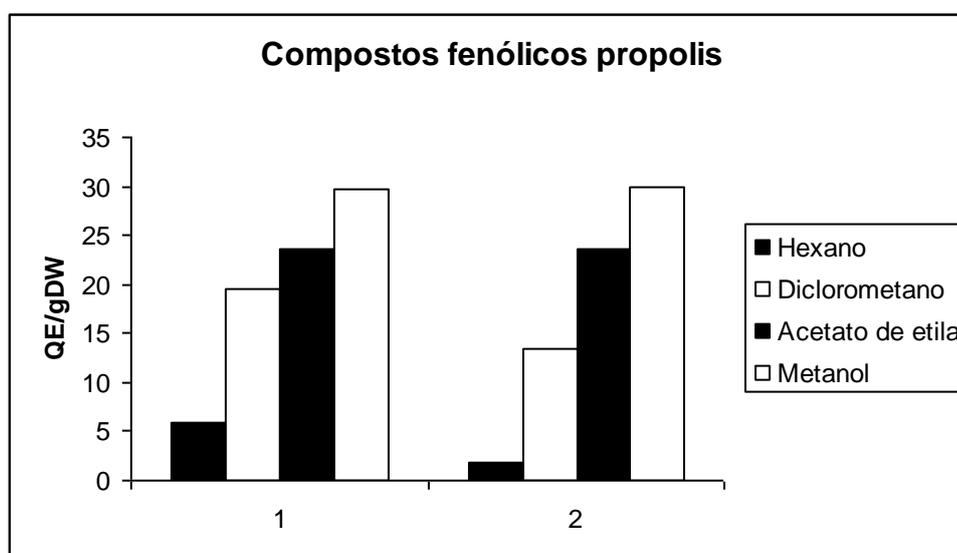


Figura 8. Quantidade de compostos fenólicos nas extrações de hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol das amostras 1 e 2,

respectivamente. A medida foi calculada em equivalentes de quercetina por grama de resina. Os resultados são expressos em média  $\pm$  desvio padrão. \* $p < 0,05$  foi considerado significativo (ANOVA de uma via seguido de Tukey).

A menor quantidade de compostos fenólicos da amostra 2 não quer dizer que esta tenha menor atividade, já que neste caso há outros compostos que contribuem para a atividade biológica. Todas as amostras brasileiras não contêm ou contêm muito pouco éster de ácido fenólico e contêm apenas pequenos traços de flavonóides não-heterosídeos. Entretanto as suas atividades biológicas são semelhantes à própolis européia. As altas quantidades encontradas de ácidos aromáticos (ácidos cumáricos prenilados) e diterpênicos devem contribuir para a atividade antibacteriana destas amostras (Kujumgiev, 1999).

As frações que apresentaram maiores teores de compostos fenólicos foram as metanólicas. O que se imaginava seria um maior conteúdo de compostos fenólicos na fração acetato de etila, já que é neste extrato que são extraídos grande parte dos flavonóides e ácidos polares. Porém o que realmente ocorreu foi que as amostras metanólicas obtiveram mais riqueza em compostos fenólicos do que todas as outras, indicando uma possível presença majoritária de ácidos polares, como por exemplo, ácidos p-cumáricos. Medana *et al.* (2008) descreveram que os principais compostos bioativos encontrados na resina da própolis são solúveis em soluções alcoólicas (Medana *et al.*, 2008). A obtenção de extratos de própolis com etanol puro já foi descrita por ter o melhor perfil químico fundamentado nos teores de polifenóis e flavonóides totais, e segundo Cunha *et al.* (2009) deve ser utilizado como parâmetro para padronização na obtenção de extratos do material em estudo, contribuindo no padrão de qualidade. Adelman (2007), em estudos de padronização de metodologia de extração de própolis de *Apis mellifera*, demonstrou que o melhor método de extração para a obtenção dos compostos biologicamente ativos é a maceração com etanol puro como solvente extrator, a 45 °C por 24 horas e reextração por mais 24 horas, na mesma temperatura. Estes estudos mostram o que realmente aconteceu no doseamento realizado, onde ocorreu maior quantidade de compostos nas frações mais polares.

A descoberta da origem botânica facilita a análise da constituição química da própolis. Se existem estudos com a fonte vegetal, pode-se considerar que grande parte dos constituintes

desta encontram-se na própolis. As propriedades da própolis dependem de sua origem botânica, implicando maior ou menor valorização comercial. No entanto a origem botânica não é tão fácil de ser identificada. Uma das maneiras de descobrir a flora de onde o material é originário de acordo com Maciejewicz *et al.* (2000) é realizar a análise microscópica do pólen isolado da própolis. Seu aparecimento neste composto tem diversas origens, podendo ser trazido pelo vento, aderindo à resina das exsudações vegetais ou também entrar na confecção da própolis como contaminante colhido em separado pelas abelhas para armazenamento dentro da colméia. Outra origem seria aderência ao corpo das abelhas durante os seus trabalhos de campo e nas colméias (Barth, 1999).

A constituição das própolis analisadas neste estudo é complexa. Isto ocorre em todos os tipos de própolis tendo em vista que a abelha voa, em média, 500 metros de distância da colméia, podendo visitar quase que 200 flores por viagem, segundo Bontempo (2008). Os enxames de abelhas chegam a recolher néctar e resinas em um raio de até dez quilômetros. Isso mostra o quanto pode variar a composição das resinas e que deve existir predomínio de certas vegetações em algumas regiões, porém é difícil definir uma planta que origine aquele certo tipo de própolis. Também existe outro fator que são casos em que a fonte vegetal principal de certo tipo de própolis sofrer escassez, então as abelhas coletam material resinoso de outras plantas, ocorrendo assim maior variabilidade ainda (Daugusch *et al.*, 2007).

Vários estudos vêm sendo conduzidos de forma a se identificar a fonte de própolis, podendo realizar observações da coleta no campo ou também analisar e identificar componentes comuns à planta e à resina. No caso do presente estudo a vegetação local é muito variada não havendo uma predominância de fonte vegetal, o que diminui as chances deste ser um fator de análise da constituição química da própolis. Uma análise de campo poderia ser realizada, observando os enxames para, talvez, identificar uma ou mais possíveis origens vegetais da própolis em questão.

## 6. CONCLUSÃO

O objetivo deste estudo não foi identificar a composição das amostras de própolis, nem analisar com exatidão os compostos comuns às amostras, mas sim verificar a hipótese de que amostras originadas de plantas de localizações não muito distantes podem ter perfil cromatográfico distinto. As amostras analisadas possuem diferenças em sua constituição que podem levar a atividades biológicas específicas e distintas.

Podemos concluir que há evidências de que a vegetação, solo, clima, entre outros fatores devem influenciar na composição de amostras de própolis, que por serem obtidas de fontes vegetais, sofrem com variações ambientais. As cromatografias em camada delgada indicam que as amostras possuem alguns constituintes distintos e que possuem teores de compostos fenólicos diferentes, sendo a amostra originária da serra gaúcha mais rica.

Para ter maior precisão de quais constituintes as amostras diferem, serão necessários mais estudos, analisando melhor a região da coleta das amostras e trabalhando com análises mais sensíveis. Em amostras de países tropicais é comum os resultados serem não-conclusivos e necessitarem de mais estudos já que há uma diversidade na flora presente, podendo as abelhas ser atraídas por mais de uma fonte vegetal em uma mesma localidade.

## 7. REFERÊNCIAS

AGA, H.; SHIBUYA, T.; SUGIMOTO, T.; KURIMOTO, M.; NAKAJIMA, S. H. Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, v.58, p. 945–946, 1994.

ALDERMANN, J.; PASSOS, M.; BREYER, D. H.; SANTOS, M. H. R.; LENZ, C.; LEITE, N. F.; FONTANA, J. D. Exotic flora dependence of an unusual Brazilian propolis: The pinocembrin biomarker by capillary techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 43, p. 174–178, 2007.

ALENCAR, S. M.; OLDONI, T. L. C.; CASTRO, M. L.; CABRAL, I. S. R.; COSTA-NETO, C. M.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; IKEGAKI, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 113, p. 278–283, 2007.

ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*. Curitiba, v.24, n.2, p. 319-336, 2006.

ANVISA, Nota técnica sobre registro de produtos contendo própolis. Disponível em: [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)

ASÍS, Moisés. Apiterapia para todos: como usar los siete productos de la colmena para curar. Instituto Cubano del Libro, Ciudad de la Habana: Editorial Científico-tecnica, 1996, 194 p.

ASÍS, Moisés. Propoleo: El oro púrpura de las abejas. Cuba: Centro de Información y Documentación Agropecuario (CIDA), 1991, 255 p.

BAKANA, P.; CLAEYS, M.; TOTTE, J.; PIETERS, L. A.; VAN-HOOF, L.; TAMBAVEMBA, L.; BERGHE, D. A.; VLIETINCK, A. J. Structure and chemotherapeutical activity of a polyisoprenylated benzophenone from the stem bark of *Garcinia huillensis*. *Journal of Ethnopharmacol*, v. 21, p.75-84, 1987.

BANKOVA, V.S.; DE CASTRO, S.L.; MARCUCCI, M.C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, v. 3, p. 3–15, 2000.

BANKOVA, V.; KRASKEVA, G. B.; POPOV, S.; SFORCIN, J. M.; FUNARI, S. R. C.; Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. *Apidologie*, v. 29, 1998.

BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; STOEV, G.; POPOV, S. Determination of phenolics from propolis by gas chromatography. *Journal of Chromatography*, v. 607, p. 150–153, 1992.

BANKOVA, V.; POPOV, S. S.; MAREKOV, L. N. A study on flavonoids of propolis. *Journal of natural products*, v.46, p. 471–474, 1983.

BANKSOTA, 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. 29, p. 896-900, 1998.

BARROS, M. P.; SOUSA, J. P. B.; BASTOS, J. K.; ANDRADE, S. F. Effect of Brazilian green propolis on experimental gastric ulcers in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 110, p. 567–571, 2007.

BARTH, O. M.; DUTRA, V. M. L.; JUSTO, R. L. Análise polínica de algumas amostras de própolis no Brasil meridional. *Ciência Rural*, v. 29, n. 4, p. 663-667, 1999.

BELMIRO, M. S.; OKI, Y.; FERNANDES, G.W. Própolis: Nosso tesouro. *Mensagem doce*, v. 112, 2011.

BENNET, G. T.; LEE, H. H. Xanthonenes from Guttiferae, *Phytochemistry*, v.28, n. 4, p. 967-998, 1989.

BONTEMPO, M. *Mel: Uma vida doce e saudável*. São Paulo: Alaúde Editorial, 2008, 152 p.

BORELLI, F.; MAFFIA, P.; PINTO, L.; IANARO, A.; RUSSO, A.; CAPASSO, F.; IALENTI, A. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. *Fitoterapia*, v. 73, n. 1 p. 53–63, 2002.

BOUKRAA, L.; SULAIMAN, S.A. Rediscovering the antibiotics of the hive. *Antiinfection Drug Discovery*, v. 4, p. 206–213, 2009.

BRASSEUR, T.; ANGENOT, L. Le mélange diphénylborate d'aminoéthanol – PEG 400: unintéressant réactif de revelation des flavonoides. *Journal of Chromatography*, p. 351-355, 1986.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa nº3, de 19 de janeiro de 2001. Diário Oficial da União, Seção 1, p. 18, Brasília, DF, 23 jan 2001.

BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food and Chemical Toxicology*, v. 36, n. 4, p. 347–363, 1998.

BUCHTA, V.; CERNY, J.; OPLETALOVÁ, V. In vitro antifungal activity of propolis samples of Czech and Slovak origin. *Central European Journal of Biology*, v.6, n.2, p. 160-166, 2010.

BUTNARIU, M. V.; GIUCHICI, C. V. The use of some nanoemulsions based on aqueous propolis and lycopene extract in the skin's protective mechanisms against UVA radiation. *Journal of Nanobiotechnology*, v. 9, n.3, 2011.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: Simões, C. M. O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 2.ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul/ Universidade Federal de Santa Catarina, cap.20, p 433-449, 2001.

CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia* v. 73, 1–6, 2002.

CASTRO, M. L.; VILELA, W. R.; ZAULI, R. C.; IKEGAKI, M.; REHDER, V. L. G.; FOGLIO, M. A.; ALENCAR, S. M.; ROSALEN, P. L. Bioassay guided purification of the antimicrobial fraction of a Brazilian propolis from Bahia state. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 9, 2009.

CRANE, E. O livro do mel. Revisão e tradução: Astrid Giovannini e Vera Lúcia Fonseca, São Paulo: Editora Nobel, 1985, 226 p.

CUNHA, M. S.; DUTRAS, R. P.; BATISTA, M. C. A.; ABREU, B. V. B.; SANTOS, J. R.; NEIVA, V. A.; AMARAL, F. M. M., RIBEIRO, M. N. S. Padronização de extrativos de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith (TIÚBA). *Caderno de Pesquisa*, São Luis, v. 16, n. 3, ago./dez. 2009.

DAUGSCH, A.; MORAES, C.; FORT, P.; PARK, Y. K. Brazilian Red Propolis—Chemical Composition and Botanical Origin. *eCAM*; v. 5, n. 4, p. 435–441, 2008.

DERMARDEROSIAN, A. The review of natural products – the most complete source of natural products information. *Walters Kluwer Health*, 2002.

DURAN, N.; MUZ, M.; CULHA, G.; DURAN, G; OZER, B. GC-MS analysis and antileishmanial activities of two Turkish propolis types. *Parasitology Research*, v. 108, p. 95–105, 2011.

FONTANA, J. D.; ADELMANN, J.; PASSOS, M.; MARASCHIN, M.; LACERDA, C. A.; LANÇAS, F. M. *Propolis: chemical micro-heterogeneity and bioactivity*. New Jersey: Humana press, p. 203-218, 2004.

GALVÃO, J.; ABREU, J. A.; CRUZ, T.; MACHADO, G. A. S.; NIRALDO, P.; DAUGASCH, A.; MORAES, C.S.; FORT, P.; PARK, Y.K. Biological therapy using propolis as nutritional supplement in cancer treatment. *International Journal of Cancer Research*, v. 3, p. 43–53, 2007.

GREENAWAY, W.; WHATLEY, F.R. Analysis of phenolics of bud exudates of *Populus*

angustifolia by GC-MS. *Phytochemistry*, v. 29, p. 2551–2554, 1990.

GHISALBETI, E.L. Propolis: A review. *Bee World*, v. 60, p. 59–84, 1979.

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, p. 230–232, 1988.

GUERRA, A. G.; MÉNDEZ, R. B. Propoleos: un camino hacia la salud. Cuba: Pablo de la Torriente Editorial, 1997.

HARBORNE, J. B. *Phytochemical Methods*. 3.ed. London: Chapman and Hall, 1998, 302 p.

HEINRICH, M.; MODARAI, M.; KORTENKAMP, A. Herbal extracts used for upper respiratory tract infections: are there clinically relevant interactions with the cytochrome P450 enzyme system? *Planta Medica*, v. 74, p. 657–660, 2008.

HERNÁNDEZ, I. M.; FERNANDEZ, M. C.; CUESTA-RUBIO, O.; PICCINELLI, A. L.; RASTRELLI, L. J. Polyprenylated benzophenone derivatives from Cuban propolis. *Journal of Natural Products*, v. 68, p. 931–934, 2005.

HU, F.; HEPBURN, H. R.; LI, Y.; CHEN, M.; RADLOFF, S. E.; DAYA, S. Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 100, p. 276–283, 2005.

IKAN, R. *Natural products: a laboratory guide*. 2.ed. London: Academic Press, 1991, 360 p.

IOIRICH, N.P. *As abelhas: farmacêuticas com asas*. 2.ed. Rússia: Editora Mir, 1986.

ISHIARA, M.; Naoi, K.; Hashita, M.; Itoh, Y.; Suzui, M. Growth inhibitory activity of ethanol extracts of Chinese and Brazilian propolis in four human colon carcinoma cell lines. *Oncology Reports*, v. 22, p. 349–354, 2009.

ITO, C.; ITOIGAWA, M.; MIYAMOTO, Y.; ONODA, S.; RAO, K. S.; MUKAINAKA, T.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; FUTUKAWA, H. Polyprenylated benzophenones from *Garcinia assigu* and their potencial cancer chemopreventive activities. *Journal of Natural Products*, v. 66, n. 2, p. 206-209, 2003.

JASPRICA, I.; MORNAR, A.; DEBELJAK, Z.; SMOLCIC-BUBALO, A.; MEDIC-SARIC, M.; MAYER, L.; ROMIC, Z.; BUCAN, K.; BALOG, T.; SOBOCANEC, S.; SVERKO, V. In vivo study of propolis supplementation effects on antioxidative status and red blood cell. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 110, p. 548–554, 2007.

KARTAL, M.; YILDIZ, S.; KAYA, S. Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 86, p. 69-73, 2003.

KEDZIA, A. Sensitivity of anaerobic bacteria to the ethanol extract of propolis. *Phytotherapie*. v. 6, p. 4–6, 1990.

KERR, W.E., GONÇALVES, L.S., BLOTTA, L.F.. Biologia comparada entre as abelhas italianas (*Apis mellifera ligustica*), africanizadas (*Apis mellifera adonsonii*) e suas híbridas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA. Florianópolis. Anais...Florianópolis, p.151-851, 1970.

KHAYYAL, M. T.; EL-GHAZALY, M. A.; EL-KHATIB, A. S. Mechanisms involved in the antiinflammatory effect of propolis extract. *Drugs Experimental Clinical Research*, v. 19, n. 5, p. 197-203, 1993.

KIMOTO, T.S., KOYA-MIYATA, S., HINO, K., MICALLEF, M.J., HANAYA, T., ARAI, S., IKEDA, M. and KURIMOTO, M. Pulmonary carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in mice and protection from it by Brazilian propolis and artemisinin. *Virchows Archiv*, v. 438, p. 259–270, 2001.

KINSELLA, J.E.; FRANKEL, E.; GERMAN, B.; KANNER, J. Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. *Food Technology*, v. 47, p. 85-89, 1993.

KOC, A. N.; SILICI, S.; AYANGIL, D.; FERRAHBAS, A.; CANKAYA, S. C. Comparison of in vitro activities of antifungal drugs and ethanolic extract of propolis against *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes* by using a microdilution assay. *Blackwell Publishing Ltd. Mycoses*, v. 48, p. 205–210, 2005.

KÖNIG, B., DUSTMANN, J.H. Baumharze, Bienen und antivirale Chemotherapie. *Naturwissenschaftliche Rundschau*, Alemanha, v. 41, p. 43-53, 1988.

KOO, M.H., PARK, Y. K. Investigation of flavonoid aglycones in propolis collected by two different varieties of bees on the same region. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 61, n. 12, p. 367-369, 1997.

KORKINA, L.G. Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: from plant defense to human health. *Cell and Molecular Biology (Noisy-le-grand)*, v. 53, p. 15–25, 2007.

KOSONOKA, L. Propolis – snake oil or legitimate medicine? *American Bee Journal*, v. 130, 1990.

KROL, W.; SCHELLER, S.; SHANI, J.; PIETZS, G.; CZUBA, Z. Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on the growth of *Staphylococcus aureus*. *Arzneimittel-Forschung Drug Research*, v.43, p. 607–609, 1993.

KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, Y.; BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 64, p. 235–240, 1999.

KUJUMGIEV, A.; BANKOVA, V.; IGNATOVA, A.; Popov, S. Antibacterial activity of propolis: some of its components and their analogs. *Pharmazie*, v. 48, p. 785–786, 1993.

KUMAZAWA, S.; NAKAMURA, J.; MURASE, M.; MIYAGAWA, M.; AHN, M.; FUKUMOTO, S. Plant origin of Okinawan propolis: honeybee behavior observation and phytochemical analysis. *Naturwissenschaften*, v. 95, p. 781–786, 2008.

LINDHAL, M.; TAGESSON, C. Selective Inhibition of group II Phospholipase A2 by quercetin. *Inflammation*, v. 17, n. 5, 1993.

LINDENFELSER, L. A. Antimicrobial activity of propolis. *American Bee Journal*, v.107, n.3, p. 90-92, 1967.

LOPES, J. Triterpenóides com atividade anti-cancerígena. Cadeia de documentação e informação. Química Aplicada, Faculdade de Ciência e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, 2007.

LOPES, R. M., OLIVEIRA, T. T. de, NAGEM, T. J.; Pinto, A. de S. Flavonóides. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, v. 17, p. 18-22, 2000.

MACIEJEWICZ, W.; DANIEWSKI, M.; BAL, M.; MARKOWSKI, W. GC-MS identification of the flavonoid aglycones isolated from propolis. *Chromatographia*, v. 53, n. 5-6, p. 343-346, 2000.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda, v.79, p. 127-147, 2004.

MANI, F.; DAMASCENO H.C.R.; NOVELLI, E.L.B. MARTINS, E. A. M.; SFORCIN, J.M. Propolis: Effect of different concentrations, extracts and intake period on seric biochemical variables. *Journal of Ethnopharmacology* v. 105, p. 95–98, 2006.

MARCUCCI, M. C., FERRERES, F., GARCIA-VIGUERA, C.; BANKOVA, V.S.; DE CASTRO, S.L; DANTAS, A.P.; VALENTE, P.H.M.; PAULINO, N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology* v. 74, p.105–112, 2001.

MARCUCCI, M.C., FERRERES, F., CUSTODIO, A.R., FERREIRA, M.M., BANKOVA, V. S., GARCIA-VIGUERA, C., BRETZ, W.A. Evaluation of phenolic compounds in Brazilian

propolis from different geographic regions. *Zeitschrift fur Naturforschung* v. 55, p. 76–81, 2000.

MARCUCCI, M. C., WOISKY, R. G.; SALANTINO, A. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis. *Mensagem doce*, v. 46, 1998.

MARCUCCI, M.C., DE CAMARGO, F.A., LOPES, C.M.A. Identification of amino acids in Brazilian propolis. *Zeitschrift fur Naturforschung* v. 51, p. 11–14, 1996.

MARCUCCI, M. C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, 26-83, 1995.

MARKHAM, K. R. Techniques of flavonoid identification. *Academic Press*, New York, 1982, 183 p.

MEDANA, C.; CARBONE, F.; AIGOTTI, R.; APPENDINO, G.; BAIOCCHI, C. Selective analysis of phenolic compounds in propolis by HPLC-MS/MS. *Phytochemical Analysis*, v. 19, p. 32–39, 2008.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO. Secretaria de Defesa Agropecuária. ANEXO VII: Regulamento de identidade e qualidade de extrato de própolis. Instrução Normativa nº3 de 19 de janeiro de 2001.

MISHIMA, S.; NARITA, Y.; CHIKAMATSU, S.; INOH, Y.; OHTA, S.; YOSHIDA, C.; ARAKI, Y.; AKAO, Y.; SUZUKI, K.; NOZAWA, Y. Effects of propolis on cell growth and gene expression in HL-60 cells. *Journal of Ethnopharmacology*, v.99, p. 5-11, 1995.

NAKAJIMA, T.; TSURUMA, K.; SHIMAZAWA, M.; MISHIMA, S.; HARA, H. Comparison of bee products based on assays of antioxidant capacities. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 9, n.4, 2009.

NICKEL, T.; HANSEN, H.; SISIC, Z.; PFEILER, S.; SUMMO, C.; SCHMAUSS, D.; HOSTER, E.; WEIS, M. Immunoregulatory effects of flavonol quercetin in vitro and in vivo. *European Journal of nutrition*. v. 50, n. 3, p. 163-172, 2010.

NOTHEMBERG, M.. Propolis overcomes the challenge of researchers. *Quimical Derivatives*, 1997.

ORSATTI, C. L.; MISSIMA, F.; PAGLIARONE, A. C.; BACHIEGA, T. F.; BUFALO, M. C.; ARAUJO, J. P.; SFORCIN, J. M. Propolis immunomodulatory action in vivo on Toll-like receptors 2 and 4 expression and on pro-inflammatory cytokines production in mice. *Phytotherapy Research*, v. 24, p. 1141–1146, 2010.

PARK, J. H.; LEE, J. K.; KIM, H. S.; CHUNG, S. T.; EOM, J. H.; KIM, K. A.; CHUNG, S. J.; PAIK, S. Y.; OH, H. Y. Immunomodulatory effect of caffeic acid phenethyl ester in Balb/c mice. *International Immunopharmacology*, v. 4, p. 429–436, 2004.

PARK, Y. K., ALRNCAR, S. M., AGUIAR, C. L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, p. 2502–2506, 2002.

PARK, Y. K.; ABREU, J. A. S.; IKEGAKI, M.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. *Current Microbiology*, v. 36, p. 24-29, 1998a.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ABREU, J. A. de S.; ALCICI, N. M. F. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.18, 1998b.

PEREIRA, A.D.S.; SEIXAS, F.R.M.S.; NETO, F.R.D.A. Propolis: 100 Anos de pesquisas e suas perspectivas futuras. *Química Nova* v. 25, p. 321–326, 2002.

PICCINELLI, A. L.; CAMPONE, L.; DAL PIAZ, F.; CUESTA-RUBIO, O.; RASTRELLIA, L. Fragmentation pathways of polycyclic polyisoprenylated benzophenones and degradation profile of nemorosone by multiple-stage tandem mass spectrometry. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, v. 20, p. 1688–1698, 2009.

PICCINELLI, A. L.; CUESTA-RUBIO, O.; CHICA, M. B.; MAHMOOD, N.; PAGANO, B.; PAVONE, N.; BARONEE, V.; RASTRELLI, L. Estructural revision of clusianone and 7-

epiclusianone and anti-HIV activity of polyisoprenylated benzophenones. *Tetrahedron*, v. 61, p. 8206-8211, 2005.

PIETTA, P. G.; GARDANA, C.; PIETTA, A. M. Analytical methods for quality control of propolis. *Fitoterapia*, v.73 p. 7–20, 2002.

ROBARDS, K.; PRENZLER, P. D.; TUCKER, G.; SWATSITANG, P.; GLOVER, W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruit. *Food Chemistry*, v. 66, n. 4, p 401-436, 1999.

ROGINSKI, V.; LISSI, E.A.; Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, v.92, n. 2, p. 235 – 254, 2005.

SALANTINO, A.; TEIXEIRA, E. W.; NEGRI, G. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. *eCAM* v. 2, p. 33–38, 2005.

SANTOS, F. A.; BASTOS, E. M. A. F.; MAIA, A. B. R. A.; UZEDA, M.; CARVALHO, M. A. R.; FARIAS, L. M.; MOREIRA, E. S. A. Brazilian Propolis: Physicochemical Properties, Plant Origin and Antibacterial Activity on Periodontopathogens. *Phytotherapy Research*, v. 17, p. 285–289, 2003.

SEBRAE. Estudo sobre Mel, Cera e Própolis. Elaborado pela Unidade de Inteligência Comercial APEX-Brasil, 2008. ([http://www.sebrae.com.br/setor/apicultura/acesse/biblioteca-on-line/estudo\\_mel\\_cera\\_propolis.pdf](http://www.sebrae.com.br/setor/apicultura/acesse/biblioteca-on-line/estudo_mel_cera_propolis.pdf))

SENTHILKUMAR, K.; ELUMALAI, P.; ARUNKUMAR, R.; BANUDEVI, S.; GUNADHARINI, N. D.; SHARMILA, G.; SELVAKUMAR, K.; ARUNAKARAN, J. Quercetin regulates insulin like growth factor signaling and induces intrinsic and extrinsic pathway mediated apoptosis in androgen independent prostate cancer cells (PC-3). *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 344, n. 1-2, p. 173-184, 2010.

SERKEDJIEVA, J., MANOLOVA, N., BANKOVA, V. Anti-influenza virus effect of some propolis constituents and their analogues (esters of substituted cinnamic acids). *Journal of Natural Products* v.55, p. 294–297, 1992.

SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? *Journal of Ethnopharmacology*, v. 133, p. 253–260, 2011.

SFORCIN, J. M. Propolis and the immune system: a review. *Journal of Ethnopharmacology* v. 113, p. 1–14, 2007.

SFORCIN, J. M.; FERNANDES, A.; LOPES, C. A. M.; BANKOVA, V.; FUNARI, S. R. C. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 73 243–249, 2000.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre, Florianópolis. Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Editora da Universidade Federal de Santa Catarina, 2001, 821 p.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J, J. A. Colorimetry of total phenolics with hosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 16, p. 144–153, 1965.

SORKUN, K.; SUER, B.; SALIH, B. Determination of chemical composition of Turkish propolis. *Zeitschrift fur Naturforschung*, v. 56, p. 666-668, 2001.

TOMAS-BARBERAN, F.A.; GARCIA-VIGUERA, C.; VIT-OLIVIER, P.; FERRERES, F.; TOMAS-LORENTE, F.; Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela, *Phytochemistry*, v. 34, p. 191–196, 1993.

TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; BANKOVA, V.; SIMOVA, S.; MARCUCCI, M. C.; MIORIN, P. L.; PASIN, F. R.; TSWETKOVA, I. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. *eCAM*, v. 3, p. 249-254, 2006.

TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; NAYDENSKY, H.; TSVETKOVA, I.; RODRIGUEZ, J. G.; BANKOVA, V. New polyisoprenylated benzophenones from Venezuelan propolis. *Fitoterapia* v. 75, p. 683–689, 2004.

TYLER, V. E. The new honest herbal: A sensible guide to the use of herbs and related remedies. 2. Ed., *G. F. Stickley Co.*, Philadelphia, 1987, 254p.

UMTHONG, S.; PHUWAPRAISIRISAN, P.; SONGCHAN, P.; CHANCHAO, C. In vitro antiproliferative activity of partially purified *Trigona laeviceps* propolis from Thailand on human cancer cell lines. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v.11, n.37, 2011.

WALGRAVE, S.E.; WARSHAW, E.M.; GLESNE, L.A. Allergic contact dermatitis from propolis. *Dermatitis*, v. 16, p. 209–215, 2005.

ZUANAZZI, J. A. S. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O. et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 2.ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul/ Universidade Federal de Santa Catarina, cap.23: p 489-516, 2001.