

JULIANA ADELMANN

**PRÓPOLIS: VARIABILIDADE COMPOSICIONAL, CORRELAÇÃO COM A FLORA  
E BIOATIVIDADE ANTIMICROBIANA/ANTIOXIDANTE**

Dissertação apresentada como requisito parcial  
à obtenção do grau de Mestre em Ciências  
Farmacêuticas do Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências  
da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Tit. José D. Fontana

Co-orientador: Dr. Mauricio Passos

CURITIBA

2005

# TERMO DE APROVAÇÃO

JULIANA ADELMANN

Título: "Própolis: variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana antioxidante"

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná.



Prof. Tit. José Domingos Fontana  
Orientador



Dr. Cesar Antonio Lenz  
Instituto de Tecnologia do Paraná



Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel  
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 11 de fevereiro de 2005

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. José Domingos Fontana, pelo tema desafiante, pela atenção, confiança, apoio e orientação durante todo o trabalho.

Ao professor Dr. Mauricio Passos pela paciência, amizade, co-orientação e importante colaboração para o desenvolvimento da dissertação.

Ao professor Dr. Rodrigo Rocha Latado pela orientação, colaboração e disponibilidade para a realização do segmento de Biologia Molecular, agradecimento este extensivo à Cristiane Fugita pela constante ajuda.

Aos Dr. Marco Krieger e Dr. Samuel Goldenberg do Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP) por terem cedido as instalações e infra-estrutura de seus laboratórios, e a Daniela Pavoni e demais colaboradores do IBMP durante a realização do trabalho.

Aos César Lenz e Natalício Ferreira Leite do TECPAR pelas análises em curso de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa.

Ao professor Anselmo Chaves Neto pela valiosa contribuição com as análises estatísticas.

Ao Sr. Edgar P. Wandscheer, Sr. Pedro J. Fasolo, empresa Breyer Ltda. Co., Faculdade de Odontologia de Piracicaba, professor Evandro e APA – Associação Paranaense de Apicultores através do presidente Sebastião Ramos Gonzaga pelas amostras de própolis cedidas.

Ao LACEN-Pr na pessoa de Christine K. Fontana pela provisão de meios, outros insumos e orientação para a execução dos antibiogramas de disco.

A Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC) pela doação da cepa de *Streptococcus pyogenes*.

Ao professor Carlos Henrique Montanha Vianna pelos antibióticos cedidos.

Ao CROMA - Laboratório de Cromatografia do IQSC-USP na pessoa do professor Fernando M. Lanças e Marco Barbirato pelas análises de CG-EM preliminares.

Ao CNPq, pela ajuda financeira, sem a qual não seria possível a realização deste trabalho.

Aos meus amigos e colegas de turma por todas as experiências compartilhadas e aos meus colegas Carolina Bueno Wandscheer, Jonathan Luis

Wohlke, Tânia Regina Bendlin e Sabrina Mendes Ortega Lyng do LQBB – Laboratório de Químico/Biotecnologia de Biomassa por toda a ajuda e amizade.

Aos professores e funcionários do departamento de Farmácia que de alguma maneira contribuíram para esse trabalho.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em especial ao professor Cid Aimbiré de Moraes Santos, pelo apoio, aos seus professores, pelos ensinamentos ministrados e a Regina por toda a ajuda prestada.

Em especial, a toda minha família, pela constante colaboração e incentivo nos momentos de dificuldade.



## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE TABELAS .....	xv
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS.....	xvi
RESUMO.....	xviii
ABSTRACT.....	xix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO .....	4
2.1 OBJETIVO GERAL .....	4
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1 ABELHAS .....	5
3.2 PRÓPOLIS .....	9
3.2.1 Histórico.....	11
3.2.2 Publicações .....	12
3.2.3 Patentes.....	12
3.2.4 Importância econômica .....	13
3.2.5 Composição química.....	14
3.2.5.1 Compostos fenólicos .....	18
3.2.5.1.1 Flavonóides.....	19
3.2.5.1.2 Ácidos fenólicos e seus ésteres .....	28
3.2.6 Métodos de extração.....	31
3.2.7 Atividades biológicas.....	32
3.2.7.1 Atividade antimicrobiana.....	32
3.2.7.2 Atividade antifúngica.....	36
3.2.7.3 Atividade antiviral.....	37
3.2.7.4 Atividade antimutagênica.....	39
3.2.7.5 Atividade antiprotozoário .....	40
3.2.7.6 Atividade antioxidante.....	41
3.2.7.7 Atividade antiinflamatória.....	43
3.2.7.8 Outras atividades.....	44
3.2.8 Toxicidade e alergia .....	46
3.2.9 Aplicações .....	47

3.2.10	Legislação.....	48
3.3	Pólen .....	50
3.4	Composição dos brotos de <i>Populus sp.</i> (álamo) .....	52
3.5	Reação em cadeia da polimerase (PCR) .....	54
3.6	Marcadores moleculares em plantas.....	55
<b>4.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>57</b>
4.1	MATERIAL.....	57
4.1.1	Amostras de própolis .....	57
4.1.2	Coleta de material botânico relacionado às colméias.....	59
4.1.3	Microrganismos.....	60
4.1.4	Meios de cultura.....	60
4.1.4.1	Meio para manutenção das cepas .....	60
4.1.4.2	Meios para o antibiograma de difusão em disco .....	61
4.1.4.3	Meio para a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) .....	61
4.1.4.4	Meio para germinação dos grãos de pólen .....	62
4.1.5	Antibióticos .....	62
4.1.6	Padrões .....	62
4.1.7	Reagentes para reação em cadeia da polimerase (PCR) .....	62
4.1.8	Outros materiais.....	63
4.2	MÉTODOS.....	63
4.2.1	Obtenção dos extratos de própolis.....	63
4.2.1.1	Procedimento de extração utilizando gradiente água-etanol.....	63
4.2.1.2	Procedimento de extração utilizando hexano e etanol.....	63
4.2.1.3	Procedimento de extração (24 horas) e reextração (48 horas) utilizando água ou etanol com ou sem aquecimento por agitação mecânica .....	64
4.2.2	Obtenção dos extratos do material botânico .....	64
4.2.3	Análise espectrofotométrica dos extratos de própolis .....	65
4.2.4	Determinação de fenólicos totais .....	65
4.2.5	Determinação de flavonóides totais .....	65
4.2.6	Atividade antimicrobiana .....	67
4.2.6.1	Preparo do inóculo inicial.....	67
4.2.6.2	Antibiograma de difusão em disco .....	67

4.2.6.3	Concentração inibitória mínima em meio líquido (CIM).....	68
4.2.6.4	Concentração bactericida mínima (CBM) .....	68
4.2.7	Atividade antioxidante .....	69
4.2.7.1	Avaliação da capacidade antioxidante através da formação de um complexo fosfomolibdênio .....	69
4.2.7.2	Método de reatividade contra o radical livre estável DPPH*.....	70
4.2.7.3	Ensaio de equivalência da capacidade antioxidante do Trolox C® (TEAC – Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) relativa ao DPPH* (TEAC <sub>DPPH*</sub> ).....	72
4.2.8	Cromatografia em camada delgada – CCD.....	73
4.2.9	Densitometria das cromatoplasmas de CCD.....	73
4.2.10	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	73
4.2.11	Eletroforese capilar .....	74
4.2.11.1	Eletroforese capilar de zona (ECZ).....	74
4.2.11.2	Eletroforese capilar micelar (ECM) .....	75
4.2.12	Cromatografia gasosa.....	75
4.2.13	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa.....	76
4.2.14	Extração de DNA .....	76
4.2.14.1	Extração de DNA de plantas.....	76
4.2.14.2	Extração de DNA de pólen .....	77
4.2.14.2.1	Eletroforese do DNA extraído do pólen .....	78
4.2.14.3	Extração do DNA de pólen nas amostras de própolis.....	78
4.2.14.3.1	Análise espectrofotométrica e quantificação do DNA.....	79
4.2.15	Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	80
4.2.16	Eletroforese de produtos amplificados por PCR.....	82
4.3	Análises estatísticas .....	82
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>85</b>
5.1	EFEITO DA PROPORÇÃO ÁGUA/ETANOL COMO SOLVENTE EXTRATOR. ....	85
5.2	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	86
5.2.1	Antibiograma de difusão em disco .....	87
5.2.2	Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima .....	88

5.3 AVALIAÇÃO DA METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO .....	90
5.3.1 Aspecto visual e rendimento dos extratos de própolis.....	90
5.3.2 Análise espectrofotométrica dos extratos de própolis .....	93
5.3.3 Determinação de flavonóides totais .....	96
5.3.4 Determinação de fenólicos totais .....	100
5.3.5 Atividades biológicas.....	102
5.3.5.1 Atividade antimicrobiana.....	102
5.3.5.2 Atividade antioxidante.....	106
5.3.5.2.1 Avaliação da capacidade antioxidante total através da formação de um complexo fosfomolibdênio .....	107
5.3.5.2.2 Método de reatividade das amostras de própolis com o radical livre DPPH*.....	110
5.3.5.2.2.1 Cinética da reação de consumo do DPPH*.....	110
5.3.5.2.2.2 Atividade antioxidante relativa ao consumo de DPPH* pelos extratos de própolis .....	113
5.3.5.2.3 Ensaio de equivalência da capacidade antioxidante do Trolox C <sup>®</sup> (TEAC – <i>Trolox equivalent antioxidant capacity</i> ) relativa ao DPPH* (TEAC <sub>DPPH*</sub> ) .....	118
5.3.6 Métodos analíticos .....	121
5.3.6.1 Cromatografia em camada delgada (CCD).....	121
5.3.6.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	126
5.3.6.3 Eletroforese capilar micelar (ECM) .....	131
5.4 CORRELAÇÃO COM A FLORA .....	138
5.4.1 Aspectos ecológicos .....	139
5.4.2 Cromatografia gasosa de derivados persililados das amostras PP2 e PP4.....	139
5.4.3 Determinação de flavonóides totais .....	141
5.4.4 Análises cromatográficas .....	142
5.4.5 Caracterização molecular .....	144
5.4.6 Eletroforese capilar .....	145
5.4.7 Extração de DNA do pólen.....	147
5.4.8 Escolha dos iniciadores ( <i>primers</i> ) para a amplificação das amostras...	148

5.4.9	Eletroforese dos produtos amplificados por PCR.....	149
5.4.10	Espectro de absorvância e quantificação do DNA.....	153
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>155</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>157</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 01</b> - PEQUENA AMOSTRA DA DIVERSIDADE DE ABELHAS NATIVAS DO BRASIL (2X).....	06
<b>FIGURA 02</b> - DESENHO ESQUEMÁTICO DA COLETA E UTILIZAÇÃO DA PRÓPOLIS PELAS ABELHAS.....	10
<b>FIGURA 03</b> - ESTRUTURA DO FENOL COMUM, OU ÁCIDO FÊNICO, O MAIS SIMPLES DOS COMPOSTOS FENÓLICOS.....	18
<b>FIGURA 04</b> - NÚCLEO BÁSICO DOS FLAVONÓIDES COMPOSTO POR DOIS ANÉIS AROMÁTICOS (A e B) E UM ANEL INTERMEDIÁRIO (C).....	20
<b>FIGURA 05</b> - ESTRUTURA DO BENZO- $\gamma$ -PIRONA.....	21
<b>FIGURA 06</b> - ESTRUTURA PLANAR E ESPACIAL DOS GRUPOS FLAVONA (A) E FLAVONOL (B).....	22
<b>FIGURA 07</b> - ESTRUTURA PLANAR E ESPACIAL DOS GRUPOS FLAVONONA (A) E FLAVONONOL (B).....	22
<b>FIGURA 08</b> - ESTRUTURA PLANAR E ESPACIAL DOS ISOFLAVONÓIDES.....	23
<b>FIGURA 09</b> - ESTRUTURA PLANAR E ESPACIAL DAS CHALCONAS (A) E DAS ANTOCIANIDINAS (B).....	23
<b>FIGURA 10</b> - ESTRUTURA DE ALGUNS FLAVONÓIDES COMUMENTE ENCONTRADOS EM PRÓPOLIS.....	26
<b>FIGURA 11</b> - NÚCLEO BÁSICO HIDROXIFENILPROPENÓICO DOS ÁCIDOS FENÓLICOS.....	29
<b>FIGURA 12</b> - ESTRUTURA DE ALGUNS COMPOSTOS FENÓLICOS NÃO INCLUÍDOS NO GRUPO DOS FLAVONÓIDES.....	30
<b>FIGURA 13</b> - PÓLENS DE DIFERENTES ORIGENS BOTÂNICAS.....	51
<b>FIGURA 14</b> - REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	55
<b>FIGURA 15</b> - ZONA DE REFLORESTAMENTO DA EMPRESA SWEDISH MATCH DO BRASIL SITUADA EM UNIÃO DA VITÓRIA - PR.....	58
<b>FIGURA 16</b> - MATERIAL BOTÂNICO DE <i>Populus sp.</i> A) FLORAÇÃO E GERMINAÇÃO DOS BROTOS; B) GALHO, BOTÕES VEGETATIVOS E REPRODUTIVOS; C) GERMINAÇÃO DOS BOTÕES VEGETATIVOS.....	59

<b>FIGURA 17 -</b>	PÓLEN DE ÁLAMO VISUALIZADO AO MICROSCÓPIO ÓTICO (100X) .....	60
<b>FIGURA 18 -</b>	CULTURA DAS CEPAS DE <i>Staphylococcus aureus</i> PADRÃO E <i>Staphylococcus aureus</i> METICILINA RESISTENTE (MRSA) EM TUBOS CONTENDO COMO MEIO DE CULTIVO CALDO NUTRITIVO.....	60
<b>FIGURA 19 -</b>	FORMAÇÃO DO COMPLEXO FLAVONÓIDE-ALUMÍNIO, EM SOLUÇÃO METANÓLICA DE CLORETO DE ALUMÍNIO.....	66
<b>FIGURA 20 -</b>	ESTRUTURA QUÍMICA DO TROLOX C® .....	72
<b>FIGURA 21 -</b>	TRITURAÇÃO DAS AMOSTRAS SOB NITROGÊNIO LÍQUIDO.....	78
<b>FIGURA 22 -</b>	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DOS EXTRATOS HIDROETANÓLICOS DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS PP4 E PP2..	86
<b>FIGURA 23 -</b>	ASPECTO VISUAL DOS EXTRATOS ETANÓLICOS (E) E AQUOSOS (W) DE PRÓPOLIS EXTRAÍDOS A 45 °C OU À TEMPERATURA AMBIENTE (24 HORAS) .....	91
<b>FIGURA 24 -</b>	RENDIMENTO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS (E) E AQUOSOS (W) DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS EXTRAÍDOS A 45 °C OU À TEMPERATURA AMBIENTE (EXTRAÇÃO SEQUENCIAL – 24 E 48 HORAS) .....	92
<b>FIGURA 25 -</b>	PERFIL DE VARREDURA DOS EXTRATOS ETANÓLICOS (E) E AQUOSOS (W) DA AMOSTRA DE PRÓPOLIS PP4 EXTRAÍDOS A 45 °C OU TEMPERATURA AMBIENTE (EXTRAÇÃO SEQUENCIAL – 24 E 48 HORAS) .....	94
<b>FIGURA 26 -</b>	PERFIL DE VARREDURA DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS DE <i>Apis mellifera</i> EXTRAÍDOS À TEMPERATURA AMBIENTE (24 HORAS) .....	94
<b>FIGURA 27 -</b>	PERFIL DE VARREDURA DOS EXTRATOS AQUOSOS DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS DE <i>Apis mellifera</i> EXTRAÍDOS À TEMPERATURA AMBIENTE (24 HORAS) .....	95
<b>FIGURA 28 -</b>	PERFIL DE VARREDURA DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS DE MELIPONÍNEOS EXTRAÍDOS À TEMPERATURA AMBIENTE (24 HORAS) .....	95
<b>FIGURA 29 -</b>	PERFIL DE VARREDURA DOS EXTRATOS AQUOSOS DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS DE MELIPONÍNEOS EXTRAÍDOS À TEMPERATURA AMBIENTE (24 HORAS) .....	96

<b>FIGURA 30 -</b>	TEOR DE FLAVONÓIDES TOTAIS DOS EXTRATOS ETANÓLICOS (E) E AQUOSOS (W) DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS EXTRAÍDOS A 45 °C OU À TEMPERATURA AMBIENTE (EXTRAÇÃO SEQUENCIAL – 24 E 48 HORAS) .....	98
<b>FIGURA 31 -</b>	TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS DOS EXTRATOS ETANÓLICOS (E) E AQUOSOS (W) DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS EXTRAÍDOS A 45 °C OU TEMPERATURA AMBIENTE (EXTRAÇÃO SEQUENCIAL – 24 E 48 HORAS) .....	100
<b>FIGURA 32 -</b>	ANTIBIOGRAMA DE DIFUSÃO EM DISCO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS (E) E AQUOSOS (W) DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS PP4 E Ta1 EXTRAÍDOS A 45 °C OU TEMPERATURA AMBIENTE (EXTRAÇÃO SEQUENCIAL – 24 E 48 HORAS) FRENTE ÀS CEPAS <i>S. aureus</i> E MRSA.....	105
<b>FIGURA 33 -</b>	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (CAT) DOS EXTRATOS ETANÓLICOS (E) DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS EXTRAÍDOS A 45°C OU À TEMPERATURA AMBIENTE (EXTRAÇÃO SEQUENCIAL – 24 E 48 HORAS) .....	108
<b>FIGURA 34 -</b>	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (CAT) DOS EXTRATOS AQUOSOS (W) DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS EXTRAÍDOS A 45 °C OU À TEMPERATURA AMBIENTE (EXTRAÇÃO SEQUENCIAL – 24 E 48 HORAS) .....	109
<b>FIGURA 35 -</b>	CINÉTICA DA REAÇÃO DE CONSUMO DO RADICAL LIVRE DPPH* PELOS EXTRATOS ETANÓLICOS (100 µg/mL) DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS EXTRAÍDOS À TEMPERATURA AMBIENTE (24 HORAS) .....	111
<b>FIGURA 36 -</b>	CINÉTICA DA REAÇÃO DE CONSUMO DO RADICAL LIVRE DPPH* PELOS EXTRATOS ETANÓLICOS (5000 µg/mL) DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS DE MELIPONÍNEOS EXTRAÍDOS À TEMPERATURA AMBIENTE (24 HORAS) .....	112
<b>FIGURA 37 -</b>	CINÉTICA DA REAÇÃO DE CONSUMO DO RADICAL LIVRE DPPH* PELO TROLOX C® EM VÁRIAS CONCENTRAÇÕES.....	223
<b>FIGURA 38 -</b>	CINÉTICA DA REAÇÃO DE CONSUMO DO RADICAL LIVRE DPPH* PELA QUERCETINA EM VÁRIAS CONCENTRAÇÕES.....	113



<b>FIGURA 39 -</b>	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS ETANÓLICOS (E) DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS PP2 E PP4 (100 µg/mL) EXTRAÍDOS A 45 °C OU À TEMPERATURA AMBIENTE (EXTRAÇÃO SEQUENCIAL – 24 E 48 HORAS) .....	114
<b>FIGURA 40 -</b>	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS ETANÓLICOS (E) DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS C-RJ E PS (100 µg/mL) EXTRAÍDOS A 45 °C OU À TEMPERATURA AMBIENTE (EXTRAÇÃO SEQUENCIAL – 24 E 48 HORAS) .....	115
<b>FIGURA 41 -</b>	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS ETANÓLICOS (E) DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS DE MELIPONÍNEOS (5000 µg/mL) EXTRAÍDOS A 45 °C OU TEMPERATURA AMBIENTE (EXTRAÇÃO SEQUENCIAL – 24 E 48 HORAS) .....	116
<b>FIGURA 42 -</b>	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO TROLOX C E DA QUERCETINA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.....	117
<b>FIGURA 43 -</b>	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DOS EXTRATOS ETANÓLICOS (E) E AQUOSOS (W) DE PRÓPOLIS DE <i>Apis mellifera</i> EXTRAÍDOS A 45 °C OU À TEMPERATURA AMBIENTE (EXTRAÇÃO SEQUENCIAL – 24 E 48 HORAS) .....	123
<b>FIGURA 44 -</b>	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DOS EXTRATOS ETANÓLICOS (E) E AQUOSOS (W) DE PRÓPOLIS DE MELIPONÍNEOS EXTRAÍDOS A 45 °C OU À TEMPERATURA AMBIENTE (EXTRAÇÃO SEQUENCIAL – 24 E 48 HORAS) .....	125
<b>FIGURA 45 -</b>	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA DE UMA MISTURA DE FLAVONÓIDES E ÁCIDOS FENÓLICOS.....	126
<b>FIGURA 46 -</b>	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA DOS EXTRATOS ETANÓLICOS (E) E AQUOSOS (W) DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS PP4, PP2 E C-RJ (24 HORAS) .....	127
<b>FIGURA 47 -</b>	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA DOS EXTRATOS ETANÓLICOS (E) E AQUOSOS (W) DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS PS, Pr E Sb (24 HORAS) .....	128
<b>FIGURA 48 -</b>	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA DOS EXTRATOS ETANÓLICOS (E) E AQUOSOS (W) DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS Ta1 E Ta2 (24 HORAS) .....	129

<b>FIGURA 49 -</b>	ESPECTRO DE VARREDURA DOS PADRÕES ÁCIDO p-CUMÁRICO (A) E CANFEROL (B) E DOS COMPONENTES ENCONTRADOS NOS EXTRATOS ETANÓLICOS DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS PP2 (C) E PP4 (D) .....	130
<b>FIGURA 50 -</b>	ELETOFORETOGRAMA MICELAR DE UMA MISTURA DE PADRÕES DE FLAVONÓIDES E ÁCIDOS FENÓLICOS.....	131
<b>FIGURA 51 -</b>	ELETOFORETOGRAMA MICELAR DOS EXTRATOS ETANÓLICOS (E) E AQUOSOS (W) DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS PP4 E PP2 (24 HORAS) .....	133
<b>FIGURA 52 -</b>	ELETOFORETOGRAMA MICELAR DOS EXTRATOS ETANÓLICOS (E) E AQUOSOS (W) DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS C-RJ E OS (24 HORAS) .....	134
<b>FIGURA 53 -</b>	ELETOFORETOGRAMA MICELAR DOS EXTRATOS ETANÓLICOS (E) E AQUOSOS (W) DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS Sb E Ta1 (24 HORAS) .....	135
<b>FIGURA 54 -</b>	ELETOFORETOGRAMA MICELAR DOS EXTRATOS ETANÓLICOS (E) E AQUOSOS (W) DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS Ta2 E Pr (24 HORAS) .....	136
<b>FIGURA 55 -</b>	ABELHA DO GÊNERO <i>Apis</i> sp. COLETANDO MATERIAL DO BROTO DA ESPÉCIE <i>Populus deltoides</i> NA ZONA DE REFLORESTAMENTO DA EMPRESA SWEDISH MATCH DO BRASIL.....	139
<b>FIGURA 56 -</b>	CROMATOGRAFIA GASOSA DOS DERIVADOS PERSILILADOS DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS PP4 E PP2.....	140
<b>FIGURA 57 -</b>	CROMATOGRAFIA GASOSA DOS DERIVADOS PERSILILADOS DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS PP4 E PP2.....	141
<b>FIGURA 58 -</b>	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS PP4 E PP2 E DOS BROTOS DE ÁLAMO.....	143
<b>FIGURA 59 -</b>	A FLAVANONA PINOCEMBRINA (DIHIDROCRISINA; 4H -1-BENZOPIRAN - 4 - ONA, 2,3-DIHIDRO-5,7-DIHIDROXI-2-FENIL) E O SEU ESPECTRO UV VISÍVEL EM TAMPÃO ALCALINO.....	144
<b>FIGURA 60 -</b>	COMPARAÇÃO DO CROMATOGRAMA GASOSO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DA AMOSTRA DE PRÓPOLIS PP4 E DO BROTO DE ÁLAMO.....	145

<b>FIGURA 61 -</b>	ELETROFORETOGRAMA DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DA PRÓPOLIS PP4 (A) E DO BROTO DE ÁLAMO (B) .....	146
<b>FIGURA 62 -</b>	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE A 1 % DO DNA TOTAL EXTRAÍDO DE AMOSTRAS DE PÓLEN DE <i>Populus deltoides</i> (ÁLAMO) .....	148
<b>FIGURA 63 -</b>	ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA A 6 % DO PRODUTO DO PCR DO PÓLEN DE ÁLAMO E DE FOLHAS DE ÁLAMO, EUCALIPTO, LARANJEIRA E PLÁTANO.....	150
<b>FIGURA 64 -</b>	ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA A 6 % DO PRODUTO DE PCR DO PÓLEN DE ÁLAMO E DO PÓLEN DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS PP4.....	151
<b>FIGURA 65 -</b>	ELETROFORESE EM GEL DE ACRILAMIDA A 6% DO PRODUTO DE PCR DO PÓLEN DE ÁLAMO E DO PÓLEN DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS PP4 EM ASSOCIAÇÃO OU ISOLADOS.....	152
<b>FIGURA 66 -</b>	PERFIL DE VARREDURA DA SUSPENSÃO DE DNA DO PÓLEN <i>in natura</i> (C1 E C2) E DO PÓLEN DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS (R1 e R2) .....	154

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 01 -</b>	COMPRIMENTOS DE ONDA DE ABSORÇÃO DAS PRINCIPAIS CLASSES DE FLAVONÓIDES.....	20
<b>TABELA 02 -</b>	BANDAS DE ABSORÇÃO DE FLAVONÓIDES EM SOLUÇÃO METANÓLICA E EM PRESENÇA DE CLORETO DE ALUMÍNIO (AlCl <sub>3</sub> ) .....	24
<b>TABELA 03 -</b>	RELAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS COLETADAS DE DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL POR DIFERENTES POPULAÇÕES DE ABELHAS E SUAS RESPECTIVAS DENOMINAÇÕES.....	58
<b>TABELA 04 -</b>	DESCRIÇÃO DOS PARES DOS INICIADORES UNIVERSAIS UTILIZADOS.....	81
<b>TABELA 05 -</b>	RENDIMENTO DOS SÓLIDOS TOTAIS EXTRAÍDOS DAS PRÓPOLIS EM FUNÇÃO DA PROPORÇÃO ÁGUA/ETANOL COMO SOLVENTE EXTRATOR.....	86
<b>TABELA 06 -</b>	TESTE DE INIBIÇÃO DE DIFERENTES AMOSTRAS DE PRÓPOLIS DE <i>Apis mellifera</i> FRENTE À <i>S. aureus</i> E MRSa.....	89
<b>TABELA 07 -</b>	CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE AMOSTRAS PRÓPOLIS DE <i>Apis mellifera</i> FRENTE À <i>S. aureus</i> E MRSa.....	89
<b>TABELA 08 -</b>	TESTE DE INIBIÇÃO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS (E) E AQUOSOS (W) DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS EXTRAÍDOS A 45 °C OU TEMPERATURA AMBIENTE (EXTRAÇÃO SEQUENCIAL – 24 E 48 HORAS) FRENTE À <i>S. aureus</i> E MRSa....	104
<b>TABELA 09 -</b>	VALORES DE TEAC <sub>DPPH</sub> * PARA A QUERCETINA E PARA OS EXTRATOS ETANÓLICOS (E) DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS EXTRAÍDOS A 45°C OU À TEMPERATURA AMBIENTE (EXTRAÇÃO SEQUENCIAL – 24 E 48 HORAS).....	120

## LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

$\lambda$	- comprimento de onda
$\lambda_{\max}$	- comprimento de onda máximo
°C	- graus Celsius
°GL	- graus Gay-Lussac
ABTS**	- sal diamônico do ácido 2,2'-azonobis-3-etilbenzotiazoline-6-sulfônico
a.C.	- antes de Cristo
ADD	- arranjo diferencial de diodos
AE	- acetato de etila
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOR	- água de osmose reversa
ATCC	- <i>American Type Culture Collection</i>
atm	- atmosfera
ATP	- adenosina trifosfato
BHI	- meio de cultura <i>Brain Heart Infusion</i>
BSTFA	- N,O-bis-(trimetilsilil)trifluoroacetamida
Ca <sup>2+</sup> -ATPase	- bomba de cálcio dependente de ATP
CAPE	- éster fenílico do ácido cafeico
CAT	- capacidade antioxidante total
CB(L)M	- concentração bactericida ou letal mínima
CCD	- cromatografia em camada delgada
CG/EM	- cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CIM	- concentração inibitória mínima
CIM <sub>90</sub>	- concentração inibitória mínima para 90 % da população em estudo
CLAE	- cromatografia líquida de alta eficiência
CMC	- concentração micelar crítica
COX	- ciclooxigenase
cpDNA	- DNA de cloroplasto
Da	- daltons
DL <sub>50</sub>	- dose letal para 50% da população em estudo
DMSO	- dimetilsulfóxido
DPPH	- $\alpha$ - $\alpha$ -difeníl- $\beta$ -picrilhidrazil
ECM	- eletroforese capilar micelar
ECZ	- eletroforese capilar de zona
EEP	- extrato etanólico de própolis
EM	- espectrometria de massas
EROs	- espécies reativas de oxigênio
EtOH	- etanol
EUA	- Estados Unidos da América
HC-UFPR	- Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná
Hex	- hexano
HIV	- vírus da imunodeficiência humana
HSV	- vírus Herpes simplex
IGS	- seqüência espaçadora intergênica
IL-1	- interleucina-1
ITS	- <i>internal transcribed spacer</i>
kV	- kilovolts

LACEN	- Laboratório Central do Estado
m/m	- massa/massa
mbar	- milibar
MH	- meio de cultura Mueller-Hinton
MRSa	- <i>Staphylococcus aureus</i> metilicina resistente
mtDNA	- DNA de mitocôndria
NCCLS	- <i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
nm	- nanômetros
OH <sup>•</sup>	- radical hidroxila
pb	- pares de base
PCR	- reação em cadeia da polimerase
p/v	- peso / volume
PVP	- polivinil pirrolidona
q.s.p.	- quantidade suficiente para
rDNA	- DNA de ribossoma
rpm	- rotações por minuto
SDS	- dodecil sulfato de sódio
SG 60	- sílica gel 60
SOD	- superóxido desmutase
TBE	- tampão tris-borato-EDTA
TEAC	- Ensaio de equivalência da capacidade antioxidante do Trolox C <sup>®</sup>
TEAC <sub>DPPH<sup>•</sup></sub>	- Ensaio de equivalência da capacidade antioxidante do Trolox C <sup>®</sup> relativa ao DPPH <sup>•</sup>
TMS	- trimetilsilil
Tr	- tempo de retenção
TRAP	- potencial reativo antioxidante total
UFC	- unidades formadoras de colônias
UFC/mL	- unidades formadoras de colônias por mililitro
URSS	- União das Repúblicas Socialistas Soviéticas
UV (A) (B) (C)	- raios ultra-violeta (A) (B) (C)
v	- volume
v/v	- volume / volume
valor de p	- nível de significância
VRE	- <i>Enterococcus vancomicina</i> resistente
VRSa	- <i>S. aureus</i> vancomicina resistente
VSV	- vírus da Estomatite vesicular

## RESUMO

Dentre outros produtos apícolas a própolis, apesar de sua marcada heterogeneidade química, vem se destacando pelas suas propriedades terapêuticas, como atividade antimicrobiana, antiinflamatória, cicatrizante, anestésica e anticarcinogênica. Fatores associados ao local de origem, variedade da abelha coletora e técnica de extração, têm influência sobre o maior ou menor grau de atividade biológica da própolis. Estudos comparativos entre amostras de própolis produzidas por diferentes variedades de abelhas, demonstraram uma maior atividade biológica das amostras produzidas por *Apis mellifera* do que aquelas produzidas pelas Meliponíneos (*Plebeia remota*, *Scaptotrigona bipunctata* e *Tetragonisca angustula*), conhecidas como abelhas nativas sem ferrão. Com relação à padronização da metodologia de extração demonstramos que o melhor método para a obtenção dos compostos biologicamente ativos é aquele realizado utilizando o etanol puro como solvente extrator, aquecimento a 45 °C e reextração por mais 24 horas, na mesma temperatura. Os extratos etanólicos de um modo geral apresentaram maiores rendimentos de sólidos totais, teores de flavonóides e fenólicos totais e atividades biológicas (antimicrobiana e antioxidante) quando comparados aos extratos aquosos ou mesmo hidroetanólicos. O procedimento de aquecimento, mesmo moderado, proporcionou aumentos de 8,5% no rendimento de sólidos totais e de 46% ou 10% na capacidade antioxidante total respectivamente dos extratos etanólicos e aquosos. A realização de uma segunda extração (reextração) proporcionou rendimentos em sólidos totais, teores de flavonóides e fenólicos totais e atividades biológicas tão significativas quanto aos obtidos com a primeira extração, demonstrando a importância da extração seqüencial das amostras de própolis. Para melhor avaliar a qualidade das amostras de própolis os ensaios biológicos devem estar associados a um elenco de metodologias analíticas, uma vez que as análises realizadas demonstraram que o teor de flavonóides e fenólicos, isoladamente, não reflete corretamente a eficácia biológica das amostras de própolis, pois medem simplesmente a quantidade e não a qualidade. Além disso, como o conhecimento da fonte botânica da própolis pode ser útil como uma base para a padronização química da mesma, técnicas cromatográficas, eletroforéticas e espectroscópicas, assim como técnicas de biologia molecular foram utilizadas para correlacionar a flora visitada pelas abelhas e a amostra de própolis propriamente dita dali derivada.

Palavras-chave: própolis, compostos fenólicos, atividade antimicrobiana, atividade antioxidante, *Apis mellifera*, Meliponíneos.

## ABSTRACT

Propolis, amongst other products produced by bees and despite its chemical marked heterogeneity, is experiencing increasing acceptance thanks to its therapeutical properties against microorganisms, inflammations as well as healing promoter and anesthetics, and even fighting cancer. Factors associated to the place of origin, the bee variety and the methodology for extraction exert influence on the degree of propolis biological activity. Comparative studies between propolis being produced by different bee varieties favors the concept of *Apis mellifera* being a producer of more bioactive propolis than Meliponinae (*Plebeia remota*, *Scaptotrigona bipunctata* and *Tetragonisca angustula*), the later also known as stingless bees. Concerning propolis extraction methodology standardization we had shown that pure ethanol is the best extraction solvent for bioactive components provided the temperature is raised to 45°C followed by a re-extraction step at the same temperature. Accordingly, ethanolic extracts, as compared to water or hidroethanolic extracts, display the highest yields of total solids and the best content for total flavonoids and phenolics as well as more pronounced biological activities like antioxidant and antimicrobial. The warming during the extraction, even moderate, had ensured increase in the total solids by 8.5% and in the whole antioxidant capacity by 46% and 10% respectively for the ethanolic and water extracts. The re-extraction step has guaranteed an additional yield of total solids, total flavonoid and phenolic contents, and biological activity as great as the initial extraction, thus recommending this sequential procedure for propolis as elective. In order to further improve the evaluation of propolis samples quality, the biological assays must be associated to a variable set of analytical procedures since the flavonoid and phenolic contents, alone, do not reflect correctly the biological efficiency for propolis samples because they simply measure quantity instead of quality. Furthermore, since the knowledge of the botanical source(s) may be useful when pursuing propolis chemical standardization, chromatographic, electrophoretic, and spectroscopic techniques as well as molecular biology procedures were carried out to establish the correlation between the flora visited by the bees and the propolis derived thereof.

Key words: propolis, phenolics, antimicrobial activity, antioxidant, *Apis mellifera*, Meliponinae.



## 1. INTRODUÇÃO

A prática das medicinas naturais e alternativas tem direcionado um interesse cada vez maior sobre os produtos apícolas tais como mel, geléia real, pólen, própolis, dentre outros. Particularmente a própolis, sob a forma de extratos hidroetanólicos, vem se destacando tanto pelas suas propriedades terapêuticas, tais como atividade antimicrobiana, antiinflamatória, cicatrizante, anestésica e anticariogênica, quanto pela possibilidade de aplicação na indústria farmacêutica e alimentícia, na forma de alimentos funcionais. Assim, a própolis vem se revelando uma mola impulsora da apicultura e de seus desdobramentos comerciais. Atualmente existem diversos produtos contendo própolis comercializados em todo o mundo, principalmente no Japão, tais como balas, chocolates, doces, xampus, cremes para pele, soluções anti-sépticas, pastas de dente e etc. (Ackermann, 1991; Park *et al.*, 1998).

A própolis, produto de apiários comercializado em paralelo ao mel, é um material resinoso de consistência viscosa elaborado pelas abelhas que coletam matéria-prima de diversas partes de plantas como brotos, cascas e exsudatos de árvores, transformando-as dentro da colméia pela adição de secreções salivares e cera. Dessa maneira a composição da própolis é um reflexo direto da flora vegetal da qual se servem as abelhas (Burdock, 1998; Russo *et al.*, 2002). Dentre outros, o gênero *Apis* é muito eficiente na polinização de plantas e na elaboração de mel, geléia real, cera, própolis e pólen. De cada colméia pode-se coletar entre 100 a 300 gramas de própolis por ano (Pereira *et al.*, 2003).

A própolis é conhecida e utilizada pelo homem desde os tempos mais remotos. Os sacerdotes do antigo Egito a utilizavam freqüentemente como substância medicinal e como parte integrante dos ungüentos e cremes de embalsamar. Mais tarde, persas, romanos e incas também fizeram uso da própolis para tratar infecções (Pereira *et al.*, 2002). Da prática dos gregos originou-se o termo *própolis* onde *pro* significa "em defesa de" e *polis* "cidade", isto é, em defesa da cidade ou da colméia (Marcucci, 1996; Burdock, 1998). As abelhas de fato usam esta substância para protegê-las contra insetos e microorganismos empregando-as em finas camadas nas paredes internas das colméias, para vedar buracos e rachaduras, reparar e fortalecer os favos de mel, proteger a entrada da colméia, no

preparo de locais assépticos para a postura da abelha rainha e na mumificação de insetos invasores (Bankova *et al.*, 2000). Costuma-se encontrar na colméia pequenos animais ou parte deles envoltos em própolis, em perfeito estado de conservação, já que à própolis é também atribuída ação antimicrobiana, o que impede a decomposição do cadáver (Marcucci, 1996; Park *et al.*, 1998).

A própolis é um material quebradiço quando frio e se torna dúctil e maleável quando aquecido. Seu ponto de fusão é variável entre 60 – 70 °C sendo que pode atingir em alguns casos, até 100 °C. Das propriedades adesivas derivou a designação em língua inglesa *bee glue* (cola-de-abelha). A coloração da própolis é dependente de sua procedência e pode variar do marrom escuro passando a uma tonalidade esverdeada até o marrom avermelhado, dependendo da flora de origem e idade. Possui um odor característico que pode variar de uma amostra para outra (Marcucci, 1996; Burdock, 1998).

A complexidade composicional da própolis, em termos químicos, foi pioneiramente revelada pela técnica de cromatografia gasosa acoplado a espectrometria de massa (CG/EM), o que permitiu a detecção de mais de 150 componentes (Greenaway, 1991). É considerada uma das misturas mais heterogêneas encontradas em fontes naturais, hoje mais de 300 constituintes já foram identificados e/ou caracterizados em diferentes amostras de própolis (Burdock, 1998).

Os constituintes principais são os compostos fenólicos, que se caracterizam pela presença de pelo menos um grupo hidroxila ligado diretamente a um anel aromático. 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).

A presença destes diversos compostos fenólicos, principalmente os flavonóides, explicam, em parte, a grande variedade das propriedades terapêuticas relatadas por diversos pesquisadores. A aplicação médica da própolis aumentou o interesse na sua composição química e na sua origem (Koo e Park, 1996; Banskota *et al.*, 2000). Porém essa característica de panacéia (várias atividades biológicas) atrapalha sua aceitação, já que os médicos e outros profissionais tendem a

desconfiar de sua eficácia devido a lhe serem atribuídas dezenas de atividades biológicas simultaneamente (Nothenberg, 1997; Pereira *et al.*, 2002).

Como já mencionado anteriormente, tem sido observado que a composição da própolis é variável qualitativa e quantitativamente dependendo da ecoflora de cada região onde é coletada. O gênero e/ou espécie da abelha também influi na qualidade da mesma (Park *et al.*, 1998). Além disso, fatores associados à técnica de extração, metodologia de condução de ensaios e época do ano em que foi produzida podem ter influência sobre o maior ou menor grau de atividade biológica (Bianchini, 1998).

A caracterização de todas estas atividades biológicas associados à tendência de utilização de produtos naturais tem resultado num aumento da demanda de própolis e produtos contendo própolis, como extratos, comprimidos, cápsulas, nebulizações ou pós. Dessa maneira, a expansão da indústria de própolis requer a padronização destes produtos e deve levar em conta a diversidade da vegetação regional, a atividade de colheita das diferentes variedades de abelhas e estabelecer a eficácia dos produtos (Menezes, 1997).

A grande questão é responder a uma pergunta antiga: qual própolis serve para qual ação terapêutica? E para isso é necessário definir quais parâmetros terapêuticos mínimos devem possuir as diferentes própolis, ou idealmente qual composição química mínima deveria ser exigida para que cada própolis apresente as propriedades farmacológicas desejadas (Pereira *et al.*, 2002).

## 2. OBJETIVO

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a variabilidade composicional entre amostras de própolis de diferentes regiões e coletadas por diferentes populações de abelhas, assim como sua atividade antimicrobiana, antioxidante e a correlação de sua composição com a flora circunvizinha à colméia através de métodos cromatográficos, eletroforéticos e de biologia molecular.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar o estudo comparativo de várias amostras de própolis de diferentes regiões e coletadas por diferentes populações de abelhas quanto ao teor de sólidos totais, flavonóides totais, fenólicos totais, atividade antimicrobiana e atividade antioxidante;
- Utilizar diferentes métodos analíticos, cromatografia em camada delgada (CCD), eletroforese capilar micelar (ECM), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM), para a caracterização dos compostos bioativos presentes na própolis;
- Avaliar a eficiência dos diferentes procedimentos de extração para a obtenção de extratos de própolis biologicamente ativos;
- Correlacionar a própolis (elementos figurados; pólen) com a flora circunvizinha à colméia através de técnicas de biologia molecular, técnicas cromatográficas e eletroforéticas.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 ABELHAS

As abelhas são insetos sociais que sobrevivem em nosso planeta há mais de 40 milhões de anos (Apicultura, 2004). Surgiram junto com o desenvolvimento das flores. Desde então, esses dois grupos biológicos mantêm intensa relação de dependência recíproca (simbiose), a abelha encontra nas flores o néctar e o pólen indispensáveis à sua sobrevivência; por sua vez, uma parte do pólen adere ao seu corpo e é transportada para longe, onde irá fecundar outra flor, promovendo o que se chama de polinização cruzada (Santos, 2002; Abelhas, 2004). Salvo algumas espécies vegetais que são polinizadas pelo vento, por pássaros, todas as outras são polinizadas por insetos. As abelhas são, dentre os insetos, os polinizadores mais eficientes devido a sua constância e fidelidade à coleta e também pelo seu reconhecimento de cor e sua memória de odor (Apicultura, 2004). É de vital importância a polinização das plantas pelas abelhas, não só para o meio ambiente, porque garantem a perpetuação das espécies vegetais, mas também para a agricultura, por aumentarem sensivelmente a produção de frutos e sementes (Santos, 2002; Apicultura, 2004).

As abelhas brasileiras sem ferrão são responsáveis, conforme o ecossistema, por 40 a 90% da polinização das árvores nativas. As 60 a 10% restantes são polinizadas pelas abelhas solitárias, borboletas, besouros, morcegos, aves, alguns mamíferos, água, vento, e, recentemente, pelas abelhas africanizadas (Kerr *et al.*, 1996).

As abelhas são descendentes das vespas que deixaram de se alimentar de pequenos insetos e aranhas para consumirem o pólen das flores. Durante esse processo evolutivo surgiram várias espécies de abelhas. Hoje se conhecem mais de 20 mil espécies, mas acredita-se que existam umas 40 mil espécies ainda não-descobertas (Pereira *et al.*, 2003). O Brasil, devido a suas proporções continentais e riqueza de ecossistemas, abriga cerca de um quarto destas espécies. Só no estado de São Paulo foram listadas 729 espécies e no Rio Grande do Sul mais de 500 espécies são conhecidas. Segundo levantamentos feitos em diferentes regiões do

Brasil, até hoje temos mais de duas mil espécies de abelhas catalogadas (Santos, 2002).

Uma ampla diversidade de formas, tamanhos e cores caracterizam a nossa apifauna. Existem espécies com tons verdes, azuis e roxos metálicas que geralmente são confundidas com moscas varejeiras (FIGURA 01). Algumas abelhas são bem ornamentadas com listas e manchas pelo corpo e outras possuem cores lisas ou brilhantes de várias tonalidades entre negro e amarelo. Existem abelhas que chegam a medir mais de cinco centímetros e outras muito pequenas com pouco mais de dois milímetros, que geralmente também são confundidas com outros grupos de insetos (Santos, 2002).

FIGURA 01 - PEQUENA AMOSTRA DA DIVERSIDADE DE ABELHAS NATIVAS DO BRASIL (2X)



FONTE: Santos, 2002.

Nem todas as abelhas são sociais, ou seja, nem todas vivem em colônias. Ao contrário do que se pensa, a maioria delas se compõe de abelhas solitárias, que constroem seu ninho em ocos de árvores ou embaixo da terra. Já as abelhas sociais vivem juntas em grandes colônias de indivíduos e seus ninhos são chamados colméias (Santos, 2002; Abelhas, 2004).

Só as abelhas sociais são domesticáveis e destas a *Apis mellifera* é a espécie mais utilizada na produção comercial de mel, juntamente com as subespécies *carnica* (abelha cárnica), *remipes* (abelha caucásica), *ligustica* e *aurea* (duas variedades de abelhas italianas) e *adansonii* (abelha africana) (Abelhas, 2004).

As colméias são um sistema extraordinário de organização. Em cada colméia existem cerca de 80.000 abelhas, a grande totalidade sendo operárias, uma rainha e de 0 a 400 zangões (Pereira *et al.*, 2003; Apicultura, 2004; A vida, 2004). A abelha rainha tem por função a postura dos ovos e a manutenção da ordem social na colméia, as operárias realizam todo o trabalho para a manutenção da colméia, executam atividades distintas de acordo com a idade por conta do desenvolvimento glandular e das necessidades diferenciadas da colméia e os zangões são os indivíduos machos da colônia cuja única função é fecundar a rainha durante o vôo nupcial (Pereira *et al.*, 2003; Abelhas, 2004).

As abelhas pertencem à ordem dos Himenópteros, que engloba as formigas, as vespas e as abelhas. Podem ser reunidas na superfamília Apoidea, que por sua vez é constituída por diversas famílias. A que tem hábitos sociais mais avançados, é a família Apidae, que possui quatro subfamílias: Apinae, Meliponinae, Bombinae e Euglossinae. As três primeiras famílias estão num estágio social avançado, a grande maioria das outras Apoidea são abelhas solitárias ou de hábitos sociais primitivos (Nogueira-Neto, 1994).

Entre os Apíneos, a única espécie que presentemente vive no Brasil é a *Apis mellifera*, introduzida no Brasil em 1839 pelo Padre Antonio Carneiro, em colônias vindas do Porto, em Portugal (Pereira *et al.*, 2003). A população de abelhas no Brasil era principalmente de origem européia até meados de 1956. Devido à introdução das abelhas africanas por um cientista brasileiro em 1956 com vistas à melhoria da produção de mel e um escape acidental de abelhas rainhas, ocorreu um processo de africanização das abelhas presentes no Brasil resultando numa rápida e ampla substituição das abelhas européias pelas africanizadas (Koo e Park, 1996). Hoje em dia as abelhas presentes no Brasil são um híbrido das abelhas européias (*Apis mellifera mellifera*, *Apis mellifera ligustica*, *Apis mellifera caucasica* e *Apis mellifera carnica*) com a abelha africana *Apis mellifera scutellata* (Pereira *et al.*, 2003). Atualmente a *Apis mellifera* é a mais abundante em nossos ambientes (até mesmo urbano), havendo uma predominância das características das abelhas européias no sul do país, enquanto ao norte predominam as características das abelhas africanas (Pereira *et al.*, 2003).

A abelha africanizada possui um comportamento muito semelhante ao da *Apis mellifera scutellata*, em razão da maior adaptabilidade dessa raça às condições climáticas do país. Muito agressivas, porém, menos que as africanas, a abelha do Brasil tem grande facilidade de enxamear, alta produtividade, tolerância a doenças e adapta-se a climas mais frios, continuando o trabalho em temperaturas baixas, enquanto as européias se recolhem nessas épocas (Pereira *et al.*, 2003).

As abelhas que mais se prestam para a polinização, ajudando enormemente a agricultura, produção de mel, geléia real, cera, própolis e pólen, são as abelhas pertencentes ao gênero *Apis* (Pereira *et al.*, 2003; A vida, 2004).

O habitat das abelhas *Apis mellifera* é bastante diversificado e inclui savana, florestas tropicais, deserto, regiões litorâneas e montanhosas. Essa grande variedade de clima e vegetação acabou originando diversas subespécies ou raças de abelhas, com diferentes características e adaptadas às diversas condições ambientais (Pereira *et al.*, 2003).

Dentro da subfamília Meliponinae estão os Meliponíneos, as chamadas "abelhas indígenas sem ferrão". São assim denominadas por possuírem o ferrão atrofiado sendo, portanto, incapazes de ferocar (Apiário Guiliani, 2004). São abelhas altamente sociais (ou eusociais), popularmente conhecidas como jataí, uruçú, mandaçaia, guaraipe e mirim. Estas espécies são bem conhecidas pelos índios e pessoas que vivem no campo (Santos, 2002).

Os Meliponíneos ocupam grande parte das regiões de clima tropical do planeta. Ocupam, também, algumas importantes regiões de clima temperado subtropical. Assim, essas abelhas são encontradas na maior parte do território Latino-Americano, ocorrendo na América do Sul, América Central, Ásia, Ilhas do Pacífico, Austrália, Nova Guiné e África (Nogueira-Neto, 1994).

Taxonomicamente a subfamília Meliponinae está subdividida em duas tribos: Meliponini formada apenas pelo gênero *Melipona*, e Trigonini que agrupa um grande número de gêneros, entre eles *Plebeia remota* (mirim guaçu), *Scaptotrigona bipunctata* (tubuna) e *Tetragonisca angustula* (jataí) (Nogueira-Neto, 1994).

As outras abelhas, pertencentes à família dos Apídeos, são os Bombíneos (mamangabas grandes e peludas) e os Euglossíneos (as abelhas das orquídeas) (Nogueira-Neto, 1994).



### 3.2 PRÓPOLIS

Ao longo da história, o homem apreendeu a utilizar os produtos naturais na medicina. Das várias formas de utilização destacam-se as plantas brutas (ex. ervas) além das tradicionais preparações galênicas (ex. extratos). Um dos muitos produtos naturais utilizados durante séculos pela humanidade tem sido a própolis, a qual é administrada sob diversas formas (Pereira *et al.*, 2002).

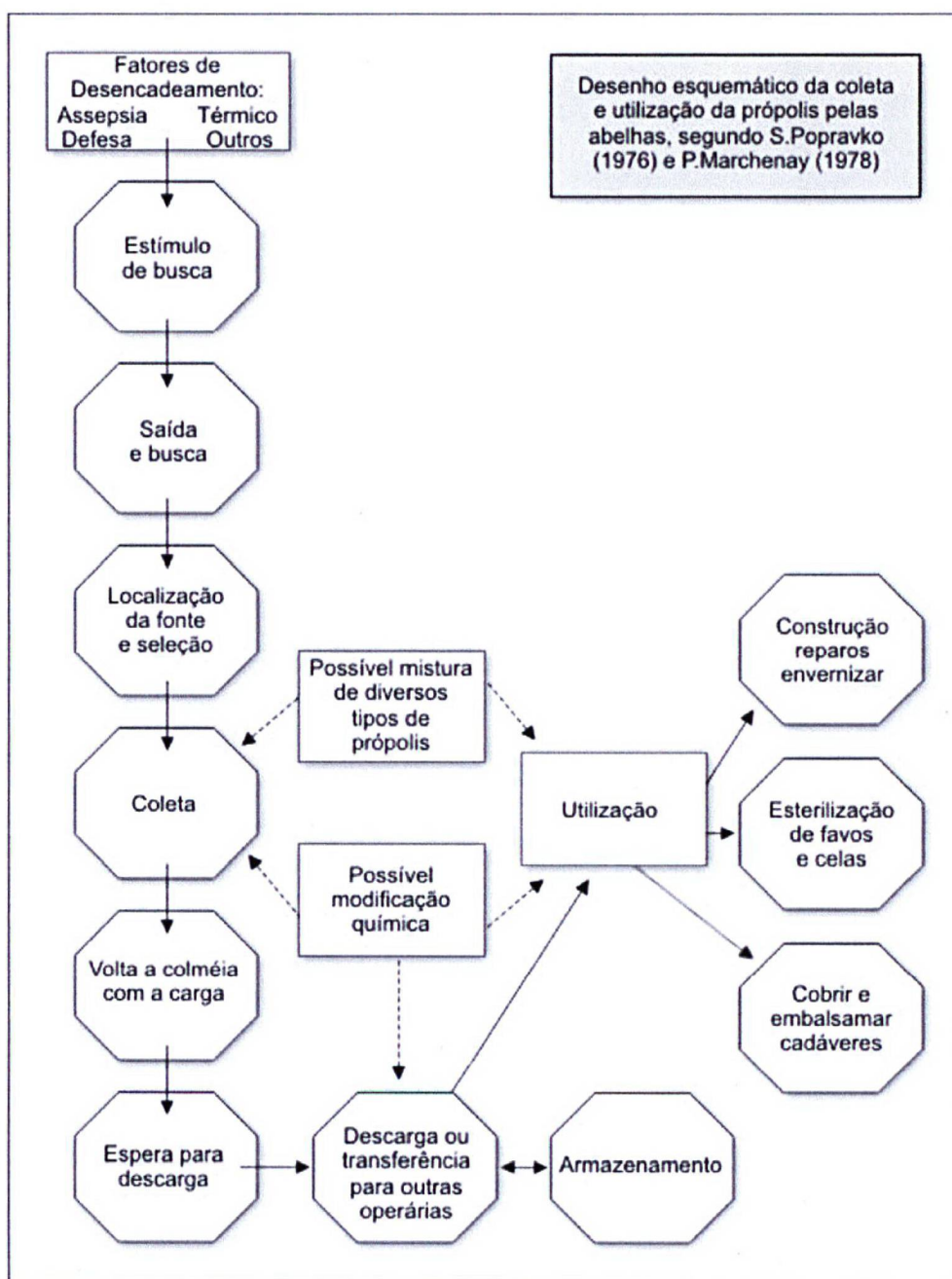
Própolis é o nome genérico para a substância resinosa de composição complexa coletada pelas abelhas a partir dos mais heterogêneos tipos de plantas. A palavra própolis é derivada do grego onde *pro* significa “em defesa de” e *polis* “cidade”, isto é, em defesa da cidade ou da colméia (Marcucci, 1996; Burdock, 1998). As abelhas de fato usam esta substância para protegê-las contra insetos e microorganismos, empregando-a no reparo de frestas ou danos à colméia (isolamento térmico e contra inimigos), no preparo de locais assépticos para a postura da abelha rainha e na mumificação de insetos invasores (FIGURA 02). Costuma-se encontrar na colméia pequenos animais ou parte deles envoltos em própolis, em perfeito estado de conservação (Marcucci, 1996), já que a própolis é também atribuída ação antimicrobiana, o que impede a decomposição do cadáver (Park *et al.*, 1998).

Nas épocas do ano em que há uma boa colheita de néctar, as abelhas dedicam-se geralmente mais à colheita do mesmo e menos à colheita de resinas (própolis), produzindo mais própolis no fim das colheitas de néctar. As abelhas coletoras de própolis de uma família dedicam-se a esta atividade nas horas quentes do dia, pois nestas horas, a própolis torna-se mais fácil para manuseio pelas abelhas (Breyer, 1980).

A coloração da própolis é dependente de sua procedência, pode variar do marrom escuro passando a uma tonalidade esverdeada até o marrom avermelhado, dependendo de seu tipo e idade. Possui um odor característico que pode variar de uma amostra para outra. O ponto de fusão é variável entre 60 – 70 °C sendo que pode atingir em alguns casos, até 100 °C (Marcucci, 1996). É uma substância rígida, mas quebradiça quando fria e que se torna dúctil e maleável quando aquecida. Sua remoção da pele humana é difícil, pois parece interagir fortemente com óleos e proteína da pele (Burdock, 1998). A própolis é coletada por abelhas a partir de

diversas partes das plantas como brotos, botões florais, casca e exsudatos resinosos. Durante a coleta as abelhas misturam a cera e a própolis coletada juntamente com a enzima 13 – glicosidase presente em sua saliva, acarretando a hidrólise dos flavonóides glicosilados até suas respectivas agliconas (Park *et al.*, 1997).

FIGURA 02 – DESENHO ESQUEMÁTICO DA COLETA E UTILIZAÇÃO DA PRÓPOLIS PELAS ABELHAS



FONTE: Apicultura, 2004.

### 3.2.1 Histórico

A própolis é conhecida e utilizada pelo homem desde os tempos mais remotos. Seu emprego já era descrito pelos assírios, gregos, romanos, incas e egípcios. No primeiro texto médico conhecido por "Livro de produção de Medicamentos para todas as partes do Corpo Humano", narrado no papiro de Ebers e escrito há cerca de 1.700 a.C., se faz menção à própolis como produto medicinal (Apicultura, 2004). No antigo Egito era utilizada como um dos materiais para embalsamar os mortos ("cera negra") (Pereira *et al.*, 2002).

Os gregos, entre os quais Hipócrates, a adotaram como cicatrizante interno e externo. Plínio, historiador romano, refere-se à própolis como medicamento capaz de reduzir inchaços e aliviar dores, enquanto a elite feminina da época utilizava esta multi-droga no alívio da síndrome pré-menstrual e de cólicas. Para médicos europeus dos séculos XVI em diante, particularmente russos e poloneses, a própolis encontrou emprego como antibacteriano, tuberculostático e agente dermatológico antieczematoso e antiacne, na odontologia era empregada no tratamento de abscessos e gengivas hemorrágicas, bem como nos casos de candidíases bucais e halitoses. A própolis também é encontrada nos receituários chineses antigos como medicamento ativo contra moléstias coronárias e hipertensão (supondo-se atividade hipolipêmica) e disfunções hematológicas (Nothenberg, 1997).

O termo própolis já era descrito no século XVI na França. Na África do Sul, na guerra ao final do século XIX, foi amplamente utilizada devido às suas propriedades cicatrizantes e na segunda guerra mundial foi empregada em várias clínicas soviéticas. Na antiga URSS, a própolis mereceu especial atenção em medicina humana e veterinária, com aplicações inclusive no tratamento da tuberculose, observando-se a regressão dos problemas pulmonares e recuperação do apetite (Pereira *et al.*, 2002).

Em 1908 surgiu o primeiro trabalho científico sobre suas propriedades químicas e "composição", indexado no *Chemical Abstracts* (referência nº 192). Em 1968 surgiu no *Chemical Abstracts* o resumo da primeira patente utilizando a própolis (Romana, para a produção de loções para banho) (Pereira *et al.*, 2002).

Anos atrás, famosos fabricantes de violinos na Itália, incluindo *Stradivarius*, usavam a própolis como um ingrediente na composição de vernizes. Foi descrita a

coloração especial de alguns violinos feitos por antigos mestres de Cremona devido ao uso de própolis nos polidores e vernizes (Marcucci, 1996; Burdock, 1998). Hoje em dia ainda é utilizada na resina de instrumentos encordados e para o reparo de acordeões (Burdock, 1998).

### 3.2.2 Publicações

Historicamente o primeiro trabalho (indexado pelo *Chemical Abstracts*) sobre a própolis foi publicado 10 anos depois que o professor Heinrich Dresser da Bayer, proclamou o surgimento de uma milagrosa droga batizada como heroína (Pereira *et al.*, 2002).

Em pouco mais de 90 anos, o número de trabalhos publicados citados no *Chemical Abstracts* totaliza 450, oriundos de 39 países (dos cinco continentes), além de 239 patentes (Pereira *et al.*, 2002).

Houve um crescimento quase exponencial do número total de publicações sobre a própolis. Os principais países em número de publicações no assunto tiveram um aumento substancial nas décadas de 80 e 90: entre 40% (Itália de cinco para sete trabalhos publicados) e 660% (Japão de cinco para trinta e oito trabalhos publicados) (Pereira *et al.*, 2002).

### 3.2.3 Patentes

Uma verdadeira "febre" de patentes sobre própolis vem sendo observada. Desde a primeira patente (romena) em 1965, até 1999 já foram depositadas cerca de 239 patentes. Até o final da década de 80 as patentes eram dominadas pela antiga URSS e seus países satélites, principalmente a Romênia. Hoje 43% de todas as patentes depositadas são japonesas, sendo que a primeira patente japonesa surgiu somente em 1987 (sobre o uso da própolis no controle de odores). Em relação ao Brasil a primeira patente surgiu somente em 1995 para o uso em tratamento odontológico, na prevenção de cáries e gengivites. Até 1999 o Brasil possuía somente três patentes (menos de 2% de todas as patentes depositadas) (Pereira *et al.*, 2002).

Quinze patentes, 6,2% do total depositado até o começo de 1999, se referem ao uso da própolis em tratamentos odontológicos. Essa é uma das aplicações da própolis mais estudada em todo mundo, tendo relatos científicos desde 1952 (Pereira *et al.*, 2002).

#### 3.2.4 Importância econômica

O mercado brasileiro de produtos apícolas está avaliado atualmente em US\$ 360 milhões anuais. As pesquisas demonstram um potencial de curto prazo para cima de US\$ 1 bilhão anual (O mercado, 2004). Estudos sobre a produção apícola no Brasil mostram dados contraditórios quanto ao número de apicultores e colméias, produção e produtividade. Quanto aos apicultores, as pesquisas apontam os extremos entre 26.315 e 300.000; esses produtores, juntos, possuem entre 1.315.790 e 2.500.000 colméias e um faturamento anual entre R\$ 84.740.000,00 e R\$ 506.250.000,00 (Pereira *et al.*, 2003).

Os dados conflitantes refletem a dificuldade em se obter informações precisas quanto à produção e comercialização no setor agropecuário, entretanto, conseguem passar a idéia da importância dessa atividade para o país (Pereira *et al.*, 2003).

De maneira similar a outros países, este mercado tem crescido principalmente pela procura por produtos naturais de alta qualidade e, principalmente, por produtos que atendam anseios específicos do consumidor, porém com formulações naturais. A nível internacional somente o Japão movimenta anualmente US\$ 300 milhões com a própolis. As estimativas de consumo de produtos apícolas para a União Européia são de US\$ 12 bilhões anuais (O mercado, 2004).

O interesse global de pesquisas em própolis tem duas justificativas: a primeira devido a suas características de panacéia (várias atividades biológicas). De certa maneira essas características também atrapalham sua aceitação, já que os médicos e outros profissionais tendem a desconfiar de sua eficácia devido a lhe serem atribuídas dezenas de atividades biológicas simultaneamente. A segunda é devida a seu alto valor agregado, com o que um frasco do extrato alcoólico é vendido no Brasil por cerca de 5 a 10 reais, mas chegando a custar 150 dólares em Tóquio (Nothenberg, 1997; Pereira *et al.*, 2002). Este alto valor agregado em Tóquio pode justificar em parte o interesse dos japoneses na própolis, principalmente a brasileira

(sendo hoje a terceira maior produção mundial, perdendo apenas para a Rússia e a China). Embora produza de 10 a 15% da produção mundial, o Brasil atende a cerca de 80% da demanda japonesa. Dados da Federação de Apicultores de Minas Gerais revelam que a própolis produzida no estado é considerada a melhor do mundo no mercado japonês, onde o quilograma do produto saltou de US\$ 5 para US\$ 200 nos últimos anos (Pereira *et al.*, 2002).

Dois pontos se destacam na preferência japonesa pela própolis brasileira (obviamente além das propriedades farmacológicas): o primeiro graças às suas características organolépticas e em segundo devido ao menor teor de metais pesados e demais poluentes ambientais (Nothenberg, 1997; Pereira *et al.*, 2002).

No Brasil a primeira publicação sobre a própolis, em 1984, apresenta um estudo comparativo do efeito da própolis e antibióticos na inibição de *Staphylococcus aureus*. A própolis brasileira estudada apresentou mais atividade do que vários antibióticos testados. Apesar da posição de destaque na produção e comércio da própolis, e de possuir a quinta maior produtividade científica no assunto (cerca de 6% do total de trabalhos publicados, 27 artigos), a atividade de pesquisa no Brasil não reflete em número, nem em conteúdo, o interesse internacional que a própolis brasileira possui, principalmente para os japoneses (Pereira *et al.*, 2002).

### 3.2.5 Composição química

A composição exata da própolis pura varia com seu tipo. Em geral é composta por 50% de resina e bálsamo vegetal, 30% de cera, 10% de óleos essenciais e aromáticos, 5% de pólen e 5% de outras substâncias variadas, incluindo restos orgânicos. É considerada uma das misturas mais heterogêneas encontradas em fontes naturais; hoje mais de 300 constituintes já foram identificados e/ou caracterizados em diferentes amostras de própolis. De longe o maior grupo de compostos isolados da própolis são os flavonóides, encontrados em todas as partes do reino vegetal, os quais junto com os ácidos carboxílicos modificados são componentes estratégicos na própolis, pois são responsáveis pela bioatividade contra vários microorganismos patogênicos (Burdock, 1998).

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).

As propriedades biológicas da própolis obviamente estão diretamente ligadas a sua composição química, e esta possivelmente é o maior problema para o uso da própolis em fitoterapia, tendo em vista que a sua composição química varia com a flora da região (brotos, cascas, galhos, exsudatos e menos importante, botões florais) e época da colheita, com a técnica empregada, assim como com a espécie da abelha (no caso brasileiro também o grau de "africanização" da *Apis mellifera* pode influenciar a sua composição) conjunto este que exerce uma enorme importância nas propriedades físicas, químicas e biológicas. Várias literaturas mostram a similaridade ou relacionam algumas substâncias naturais das plantas aos componentes encontrados na própolis. Somente no caso do Brasil são descritas propriedades biológicas e composição química distintas para diferentes amostras coletadas em diferentes partes do país. Essa variação é facilmente explicada pela grande biodiversidade brasileira, assim como, até certo ponto, a habilidade bioquímica das abelhas em alterar a composição nativa ou adicionar componentes próprios à própolis (Pereira *et al.*, 2002).

Uma menor variação da composição química da própolis é observada nas regiões temperadas do planeta, como por exemplo, na Europa, onde seus principais compostos bioativos são os flavonóides (flavonas, flavonóis e flavanonas). A principal fonte botânica das zonas temperadas é exsudato de broto de espécies de *Populus* (*poplar*) e seus híbridos (Greenaway *et al.*, 1990; Bankova *et al.*, 1995; Hegazi *et al.*, 2000; Bankova *et al.*, 2000; Pereira *et al.*, 2002). Isso é verdade para a Europa, América do Norte, e regiões não tropicais da Ásia e até na Nova Zelândia onde espécies introduzidas de álamo são fontes botânicas para as abelhas (Bankova *et al.*, 2000).

Há grande controvérsia em relação ao teor de flavonóides nas amostras brasileiras (Pereira *et al.*, 2002). Bankova *et al.* (1995) concluíram que as própolis brasileiras têm uma baixa concentração de flavonóides e ésteres de ácidos fenólicos, possuindo altas concentrações de ácido dihidroxicinâmico, acetofenonas

preniladas e alguns terpenóides específicos. Ainda Bankova *et al.* (2000) cita que em alguns casos os flavonóides são importantes componentes presentes na própolis brasileira. Alguns autores sugerem que as fontes prováveis para a própolis brasileira podem ser principalmente *Baccharis spp.* (Banskota *et al.*, 1998) e *Araucaria sp.* (Bankova *et al.*, 1998; Banskota *et al.*, 1998), mas nenhuma comparação direta entre a própolis e a fonte botânica foi realizada (Bankova *et al.*, 2000). Aga *et al.* (1994) determina os compostos prenilados como os maiores constituintes da própolis brasileira, e relata que a atividade antibacteriana destes compostos pode ser aumentada com o aumento do número de resíduos prenil na molécula, como citado por Marcucci *et al.* (2001).

Além disso, Velikova *et al.* (2000b) demonstraram que nem a espécie da abelha nem a localização geográfica determinam a composição química de própolis produzidas por Meliponíneos e a escolha da fonte botânica, respectivamente. O que pode ser explicado pelo fato de as Meliponíneos coletarem material botânico em distâncias curtas (máximo 50 metros) e assim usarem como fonte de própolis o primeiro exsudato de planta que encontram durante o vôo (Velikova *et al.*, 2000b).

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. A diminuição em alguns componentes biologicamente ativos como os fenólicos são acompanhados pelo aumento de outros, por exemplo, ácidos diterpênicos. Deste modo pode-se esperar que algumas atividades biológicas, relacionadas a estes compostos, (antibacteriana, antifúngica) sejam similares em diferentes estações do ano (Bankova, 1998). Isto foi comprovado por Sforcin *et al.* (2000) que demonstraram não existir diferença estatisticamente significativa na atividade antimicrobiana da própolis coletada nas quatro estações do ano frente às cepas *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. A subespécie da abelha também tem determinada influência na composição quantitativa da própolis, porém o critério de escolha da fonte botânica pelas abelhas permanece incerto (Bankova, 1998).



Os tipos de compostos aromáticos e terpênicos encontrados na própolis têm uma importância biológica que permite a determinação das espécies vegetais visitadas pelas abelhas (Marcucci, 1996).

A composição heterogênea da própolis engloba enquanto grupos químicos (Walker e Crane, 1987; Greenaway *et al.*, 1990; Marcucci, 1995; Fontana *et al.*, 2000; Bankova *et al.*, 2000; Pereira *et al.*, 2002):

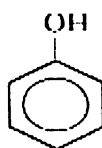
- a) hidrocarbonetos superiores (penta-, hexa-, nonacosanoshexanos);
- b) álcoois (cinâmicos, fenetílico, prenílico, isobutenol, benzílico);
- c) ácidos alifáticos (acético, angélico, butírico, fumárico, isobutírico, metilbutírico) e ésteres derivados (acetatos de isobutila, isopentila e isopentelina);
- d) ácidos aromáticos (benzóico, cafeico, cinâmico, cumáricos (-*o*, -*m*, -*p*), ferúlico, gálico, salicílico, 3-4-dimetoxicinâmico, gentísico, hidroxicinâmico, isoferúlico, vanílico) e ésteres aromáticos derivados (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; ésteres do ácido cafeico com álcoois graxos de cadeia longa - dodecanol, tetradecanol, tetradecenol, hexadecanol);
- e) ácidos graxos superiores típicos de ceras (araquídico, behênico, cerótico, lignocérico) e usuais (palmítico, oleico, láurico, mirístico) e seus ésteres (hexacosilhexadecanoato);
- f) aldeídos (benzaldeído, aldeído caprótico, vanilina, isovanilina, *p*-hidroxibenzaldeído);
- g) cetonas (acetofenona e seus derivados);
- h) flavonas e flavonóis (acacetina, apigenina, apigenina-7-metil éster, crisina, galangina, galangina-3-metil éster, quercetina, canferol, tectocrisina, canferid; 3,7,4',5'tetrametil éter da quercetina);
- i) flavanonas (naringenina, pinobanksina, pinobanksina-3-acetato, pinobanksina-3-butilato, pinobanksina-3-metil éter, pinocembrina, pinostrobinina);

- j) chalconas e diidrochalconas (de alpinetina, naringenina, pinobanksina, pinobanksina-3-acetato, pinocebrina, pinostrombina);
- l) terpenóides (farnesol, geraniol, cimeno, limoneno, estireno, naftaleno,  $\beta$ -bisabolol, 1,8-cineol, derivados de clerodane, derivados do labdane,  $\beta$ -amirin, sesquiterpenóides, ledol, spatulenol, germacren);
- m) esteróides (acetatos de estigmasterol e calinasterol);
- n) aminoácidos (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, tirosina);
- o) açúcares (*d*-ribofuranose, *d*-frutose, *d*-glucitol, *d*-glucose, talose, sacarose e xilitol, xilose, galactose, manose, ácido galacturônico, lactose, maltose, melibiose, eritritol, inositol);
- p) lignanas (sesamina, aschantina, sesartenina, dihidrobenzofuran);
- q) vitaminas (A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, C e E);
- r) minerais (sódio, potássio, magnésio, bário, estrôncio, cádmio, chumbo, cobre, manganês, ferro, cálcio, vanádio, silício, alumínio, níquel, zinco, cromo, titânio, prata, molibdênio, cobalto).

### 3.2.5.1 Compostos fenólicos

Em termos de ação farmacológica, a principal classe de constituintes da própolis é a dos compostos fenólicos. Essas substâncias caracterizam-se pela presença de pelo menos um grupo hidroxila ligado diretamente a um anel aromático (FIGURA 03) (Marcucci, 1998).

FIGURA 03 - ESTRUTURA DO FENOL COMUM, OU ÁCIDO FÊNICO, O MAIS SIMPLES DOS COMPOSTOS FENÓLICOS



FONTE: Marcucci, 1998.

Existem diversas classes de compostos fenólicos que ocorrem de maneira universal nas plantas vasculares e que podem desempenhar importantes papéis na biologia dos animais, principalmente nos fitófagos. Como exemplos, podem-se citar os ácidos fenólicos, como os ácidos benzóicos, cafeico, cumárico e ferúlico, e os flavonóides, como a apigenina, o canferol e a quercetina (Marcucci, 1998).

#### 3.2.5.1.1 Flavonóides

Os flavonóides compõem uma ampla classe de substâncias de origem natural, cuja síntese não ocorre na espécie humana. Conseqüentemente, muitas dessas propriedades atuam de forma benéfica para a saúde humana. Atualmente, já foram identificadas mais de quatro mil substâncias pertencentes ao grupo dos flavonóides (Peterson e Dwyer, 1998).

Os flavonóides absorvem radiação eletromagnética na faixa do ultravioleta (UV) e do visível e dessa maneira apresentam um papel de defesa das plantas frente à radiação UV da luz solar. Uma idéia da variedade e riqueza espectral foi sumarizada por Fontana *et al.* (2004) e está transcrita na tabela 01.

Além disso, os flavonóides podem representar uma barreira química de defesa contra microrganismos (bactérias, fungos e vírus), insetos e outros animais herbívoros. Mas os flavonóides atuam também em relacionamentos harmônicos entre plantas e insetos, atraindo e orientando esses animais até o néctar, contribuindo enormemente para a polinização (Marcucci, 1998).

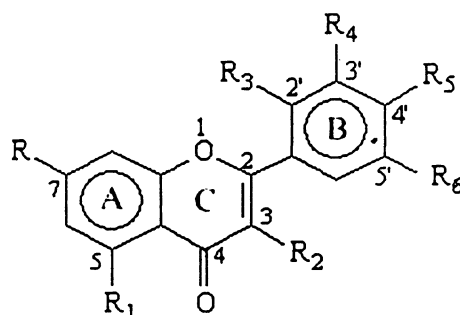
Estruturalmente, os flavonóides são substâncias aromáticas com 15 átomos de carbono ( $C_{15}$ ) no seu esqueleto básico, sendo compostos fenólicos  $C_6-C_3-C_6$ , onde os dois anéis  $C_6$  são necessariamente aromáticos (anéis A e B) e conectados por uma ponte de três carbonos que geralmente contém um átomo de oxigênio (anel C) (FIGURA 04) (Nothenberg, 1997; Lopes *et al.*, 2000). Com exceção das chalconas, todos os flavonóides possuem um anel pirânico (com heteroátomo de oxigênio). De acordo com as características químicas e biossintéticas, os flavonóides são separados em diversas classes: flavonas, flavonóis, dihidroflavonóides (flavanonas e flavanonóis), antocianidinas, isoflavonóides, auronas, neoflavonóides, biflavonóides, catequinas e seus precursores metabólicos conhecidos como

chalconas e podem ocorrerem como agliconas, glicosilados e como derivados metilados (Havsteen, 1983).

TABELA 01 – COMPRIMENTOS DE ONDA DE ABSORÇÃO DAS PRINCIPAIS CLASSES DE FLAVONÓIDES

Classe dos Flavonóides	Exemplos	Solvente	Faixa de variação da absorção (nm) para as classes de flavonóides	$\lambda_{\max}$ (nm) principal e (secundário) para o exemplo
antocianinas	cianidina-3-rutinosídeo	0.01% HCl em metanol	269-289 310-333 495-538	523 (290)
flavonas	luteolina	etanol	248-286 332-356	350 (255; 268)
flavonóis	canferol	etanol	252-268 345-379	368 (268)
flavanonas	naringenina	etanol	215-233 278-290 312-335	325 (290; 224)
isoflavonas	genistina	etanol	241-275 296-302 320-335	262 (330)
chalconas	neoplatimenina	95% etanol	235-266 320-385	393 (268; 320)
auronas	hispidol	95% etanol	234-272 254-355 388-413	388 (234; 254)
xantonas	mangiferina	95% etanol	230-245 250-265 305-330 340-400	258 (242; 316; 364)

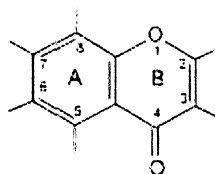
FIGURA 04 – NÚCLEO BÁSICO DOS FLAVONÓIDES COMPOSTO POR DOIS ANÉIS AROMÁTICOS (A e B) E UM ANEL INTERMEDIÁRIO (C)



O esqueleto  $C_{15}$  dos flavonóides é biogeneticamente derivado do fenilpropano ( $C_6-C_3$ ) e três unidades de acetato ( $C_6$ ). Portanto, os flavonóides são derivados do

benzo- $\gamma$ -pirona (cromona) – FIGURA 05 – de origem vegetal, podendo haver facilmente interconversão entre eles (Lopes *et al.*, 2000).

FIGURA 05 – ESTRUTURA DO BENZO- $\gamma$ -PIRONA



FONTE: Havsteen, 2002.

As classes dos flavonóides variam em sua estrutura característica ao redor do anel C (Peterson e Dwyer, 1998), e são quimicamente classificados de acordo com a presença ou não do anel central, de uma dupla ligação no anel e de um grupo hidroxila a ele ligado (Marcucci, 1998).

O anel C condensado com o anel A pode ser tanto um anel  $\gamma$ -pirano no caso das flavonas (FIGURA 06-A) e dos flavonóis (FIGURA 06-B) ou seu dihidroderivado no caso das flavanonas (FIGURA 07-A) e dos flavononóis (FIGURA 07-B). A posição do anel benzênico substituinte (B) divide a classe dos flavonóides em flavonóides (posição 2) e isoflavonóides (posição 3) (FIGURA 08). As chalconas são os precursores dos flavonóides (FIGURA 09-A) e as antocianidinas são extremamente relacionadas aos flavonóides diferindo dos mesmos por possuírem o anel C com carga positiva (FIGURA 09-B) (Havsteen, 1983).

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). Os flavonóides são freqüentemente hidroxilados nas posições 3, 5, 7, 3', 4' e 5'. Alguns desses grupos hidroxilas são freqüentemente metilados, acetilados ou sulfatados. As ligações glicosídicas ocorrem geralmente nas posições 3 ou 7, e os carboidratos monossacarídeos comuns são geralmente L-ramnose, D-glucose, galactose e arabinose e o dissacarídeo glucorarnose. As prenilações geralmente ocorrem diretamente num átomo de carbono no anel aromático, mas O-prenilação já foi encontrado (Havsteen, 2002). Os flavonóides são facilmente oxidados no anel B o que leva a abertura do mesmo no nível do átomo de oxigênio.

FIGURA 06 – ESTRUTURA PLANAR E ESPACIAL DOS GRUPOS FLAVONA (A) E FLAVONOL (B)

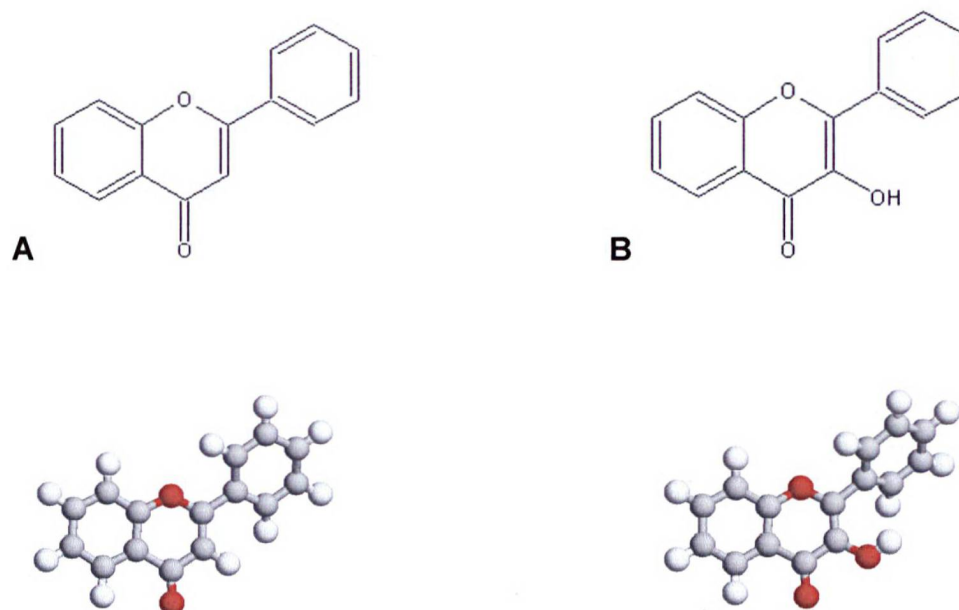


FIGURA 07 – ESTRUTURA PLANAR E ESPACIAL DOS GRUPOS FLAVONONA (A) E FLAVONONOL (B)

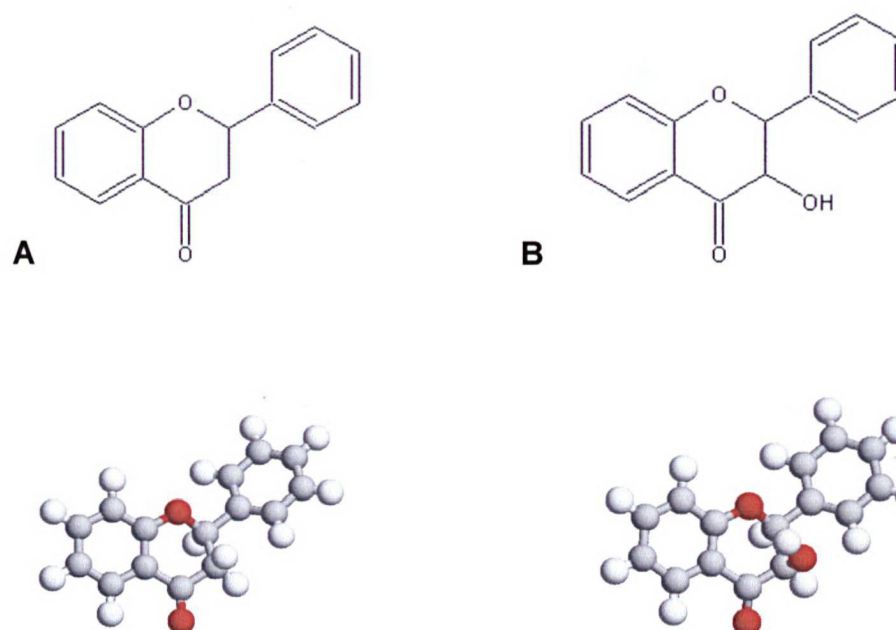


FIGURA 08 – ESTRUTURA PLANAR E ESPACIAL DOS ISOFLAVONÓIDES

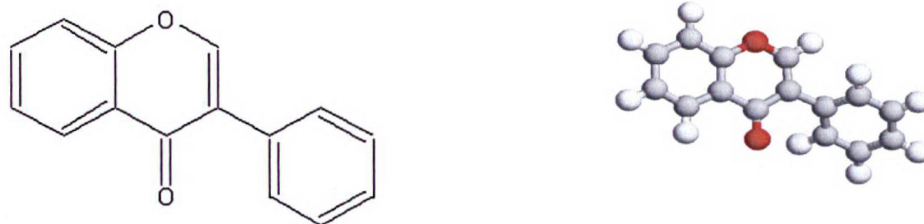
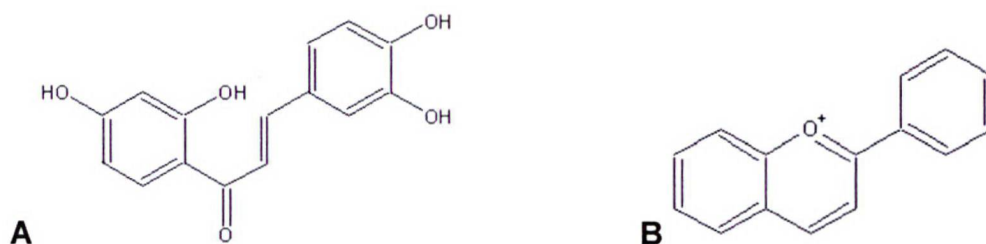


FIGURA 09 – ESTRUTURA PLANAR E ESPACIAL DAS CHALCONAS (A) E DAS ANTOCIANIDINAS (B)



Os flavonóides, por serem pigmentos presentes em todas as células fotosintetizadoras, são encontrados em ervas, legumes, frutas, mel e por conseqüência dentre outros produtos de consumo cotidiano (Havsteen, 1983; Lopes *et al.*, 2000; Havsteen, 2002). Porém as flavanonas ocorrem predominantemente em frutas cítricas, as flavonas em plantas utilizadas para condimentos, os isoflavonóides em legumes, as antocianinas e catequinas em frutas e flavonóis em todas as frutas e vegetais (Peterson e Dwyer, 1998). Os nutricionistas estimam que a ingestão média de flavonóides em uma dieta normal é de 1–2 g por dia (Havsteen, 2002) e por

serem consumidos em grandes proporções dentro de uma dieta humana regular, esses compostos desempenham um importante papel na saúde humana.

Apesar do termo flavonóide derivar do latim *flavus*, que significa amarelo, observa-se que o grupo flavanona (ex. pinocembrina) é incolor e que a classe das antocianinas possuem substâncias que variam no seu espectro de coloração do verde ao azul (Lopes *et al.*, 2000).

Os flavonóides possuem espectros de absorção característicos no ultravioleta, determinados pelo núcleo comum benzopirona, com dois máximos de absorção: um ocorrendo entre 240-285 nm (banda II) e outro entre 300-400 nm (banda I). Em geral, a banda II pode ser considerada como devido à existência do anel A e a banda I devido ao anel B. As diferentes classes dos flavonóides possuem bandas de absorção características como demonstrado na tabela 02. O aumento do grau de hidroxilação do núcleo leva ao aumento do efeito batocrômico e, conseqüentemente, os espectros deslocam-se no sentido dos maiores comprimentos de onda (Marcucci, 1998). Então, de um modo geral, apresentam uma maior absorção na faixa entre 250 e 350 nm (Park *et al.*, 1995).

TABELA 02 - BANDAS DE ABSORÇÃO DE FLAVONÓIDES EM SOLUÇÃO METANÓLICA E EM PRESENÇA DE CLORETO DE ALUMÍNIO (AlCl<sub>3</sub>)

Classe de flavonóide	Banda I (nm)	Banda II (nm)	Deslocamento provocado por complexação com AlCl <sub>3</sub> (nm)**
Flavonas	310-350	250-280	+ 35 – 55 *
Flavonóis (3-OH substituído)	330-360	250-280	+ 50 - 60 *
Flavonóis (sem 3-OH)	350-385	250-280	+ 35 - 55 *
Isoflavonas	310-330	245-275	+ 10 – 14
Isoflavonas (5-desoxi-6,7-dioxigenadas)	320 pico ombro	275-295	+ 11 – 30
Flavanonas diidroflavonóis	e 300-330 ombro	230-270	+ 20 – 26 *
Chalconas	340-390	230-270	+ 48 - 64 *
Auronas	465-560	270-280	+ 40 * + 60 - 70 *

\* Têm um desvio batocrômico (para comprimentos de onda maiores).

\*\* Em 425 nm, os ácidos fenólicos e outras substâncias fenólicas não absorvem em presença de AlCl<sub>3</sub>, por isso não há interferência destas substâncias no doseamento de flavonóides.

FONTE: Marcucci, 1998.



Como na maioria dos produtos naturais existe uma variedade de constituintes na própolis e em seus extratos que são comuns em outros alimentos, alguns dos quais também com atividades biológicas. Destas substâncias com propriedades biológicas, nenhuma contribui mais para os efeitos observados na própolis do que os flavonóides (Burdock, 1998).

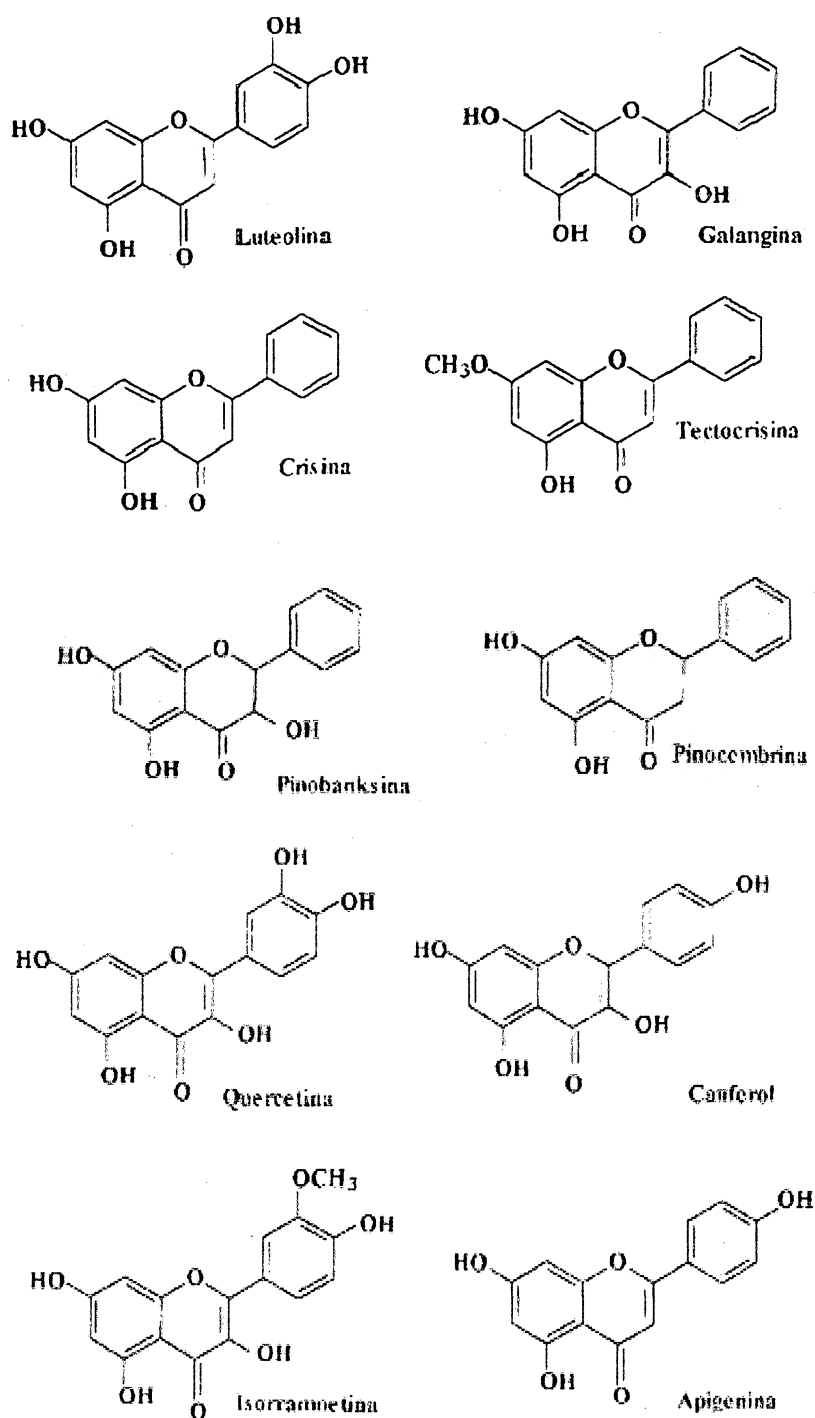
A concentração de flavonóides totais nas amostras de própolis pode ser determinada pela complexação dos flavonóides presentes na mesma com o cátion alumínio, formando complexos estáveis. Na análise espectrofotométrica este complexo fornece um desvio das bandas características dos flavonóides para maiores comprimentos de onda (efeito batocrômico) e uma intensificação da absorção (TABELA 02).

A FIGURA 10 mostra estruturas de flavonóides comumente encontrados em própolis: o canferol, a quercetina, a isorramnetina e a galangina são flavonóis; a apigenina, a luteolina, a crisina e a tectocrisina são exemplos de flavonas; a pinocembrina é uma flavanona e a pinobanksina é um diidroflavonol (Marcucci, 1998).

Na sua pesquisa em flavonóides, Havsteen (1983) divide os efeitos bioquímicos dos flavonóides no sistema animal em quatro categorias: (1) ligação por afinidade em polímeros biológicos; (2) ligação a íons de metais pesados; (3) catálise de transporte de elétrons e (4) habilidade em seqüestrar radicais livres.

Diversos ensaios *in vitro* e *in vivo* vêm comprovando e determinando as atividades biológicas dos flavonóides. Destacam-se, dentre outros, a capacidade antioxidante, antiinflamatória e de efeito vasodilatador, ação antialérgica, anti-tumoral, hepatoprotetora, antiúlcera, ações anti-plaquetária, bem como ações antimicrobianas e antivirais (Lopes *et al.*, 2000).

FIGURA 10 – ESTRUTURA DE ALGUNS FLAVONÓIDES COMUMENTE ENCONTRADOS EM PRÓPOLIS



FONTE: Marcucci, 1998.

As propriedades farmacológicas da própolis são principalmente atribuídas à presença de flavonóides (Russo *et al.*, 2002). A opinião prevalente dentro do amplo espectro de atividades biológicas dos flavonóides está relacionada, ao menos em

parte, a sua habilidade de proteção contra os danos causados pelos radicais livres. De fato, esses biopolifenóis têm demonstrado interferir não apenas na propagação da reação, mas também na formação de radicais livres, tanto quelando os metais de transição quanto pela inibição de enzimas envolvidas na inicialização da reação (Russo *et al.*, 2002). A ação antioxidante se deve ao fato de que os flavonóides minimizam a peroxidação lipídica e o efeito dos radicais livres (Marcucci, 1998). A glicosilação dos mesmos torna a molécula menos reativa frente aos radicais livres, porém mais hidrossolúvel (Rice-Evans, Miller e Paganga, 1997). O arranjo estrutural dos flavonóides que determina a atividade antioxidante é variando: duas hidroxilas nas posições *orto* 3',4' no anel B; duas hidroxilas nas posições *meta* 5,7 no anel A; uma dupla ligação em combinação com o grupo 4-ceto e grupo 3-hidroxil no anel C, assim como hidroxila na posição *orto* no anel B (ex. quercetina). Além disso, alterações no arranjo dos grupos hidroxilas e substituições destes grupos por glicosilação diminui a atividade antioxidante (Rice-Evans, Miller e Paganga, 1997).

A atividade anticâncer dos flavonóides é devido ao efeito de indução de apoptose e para isto entre os mais ativos estão a quercetina, bicalcaina, genisteína, tangeritina e soforanona (Chen, Wu e Lin, 2004).

Sabe-se que a flavanona naringenina e sua forma glicosilada naringina, quando associada a corantes alimentícios como a antocianina ou carmin, produz uma acentuada redução da hiperlipidemia induzida (Lopes *et al.*, 2000).

A pinocembrina e a galangina são responsáveis pela atividade antibacteriana da própolis, sendo que a pinocembrina também possui atividade fungicida e funciona como anestésica local (Bankova, Popov e Marekov, 1983). Devido à atividade anti-androgênica da pinocembrina, esta 5,7-dihidroxi-flavanona tem aplicações importantes também em casos de hiperplasia do tipo andrógeno – dependente da próstata, quedas de cabelo e até mesmo câncer. Outras ações inibitórias da pinocembrina foram descritas para a testosterona redutase e sistema do retículo sarcoplasmático  $Ca^{2+}$  - ATPase (Fontana *et al.*, 2004). Foi também indicada como um dos componentes da própolis responsáveis pela inibição de glucosiltransferases de *Streptococcus mutans*, um microorganismo oral envolvido em processos cariogênicos (Park *et al.*, 1998).

A quercetina, canferide e pectolinarigenina têm atividade espasmolítica; acacetina atividade antiinflamatória, a luteolina e apigenina atividade antiúlcera

(Bankova, Popov e Marekov, 1983) e a quercetina, procianidina e pelargonidina tem atividade virucida (Amoros *et al.*, 1992).

A catequina possui várias atividade biológicas, a entre elas, a diminuição do nível de triglicerídeos, inibição da síntese de prostaglandinas, atividade antiviral, antiinflamatória, antioxidante e anticoagulante. A catequina, prunina e hesperitina 5-O-glucosídeo diminuem a concentração plasmática do colesterol, enquanto a quercetina tem atividade hipolipêmica e a rutina, a metilchalcona da hesperidina diminui o nível de ácidos graxos, ácidos graxos esterificados, colesterol total,  $\beta$ -lipoproteína e lípidos totais (Choi *et al.*, 1991).

Amoros *et al.* (1992) observaram que os flavonóis são mais ativos *in vitro* contra o vírus do Herpes simplex tipo 1 do que as flavonas. A atividade dos flavonóis diminui com o aumento do número de substituintes hidroxilas, sendo a galangina mais eficaz que o canferol, que por sua vez é mais eficaz que a quercetina. Além disso, os autores comprovaram o efeito sinérgico entre vários flavonóides confirmando a possibilidade de interações sinérgicas entre dois ou mais compostos em misturas complexas como no caso da própolis (Amoros *et al.*, 1992). Os flavonóides também atuam *in vitro* inibindo a transcriptase reversa e assim inibindo a replicação do vírus da imunodeficiência humana (HIV), sendo os flavonóis mais ativos que as flavonas e flavanonas. A atividade está relacionada à presença de uma dupla ligação entre as posições 2 e 3 no anel pirona dos flavonóides, e três grupos hidroxilas nas posições 5, 6 e 7 (Vlietinck *et al.*, 1997).

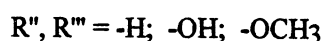
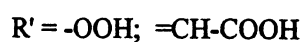
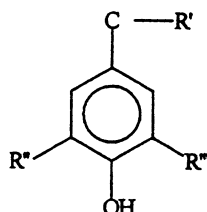
A atividade antiinflamatória da própolis se deve, aparentemente, à presença de flavonóides, em especial a galangina, que inibe a atividade da ciclooxigenase (COX) e da lipooxigenase, diminui a liberação de prostaglandina e expressão e liberação da isoforma indutível da COX (Borrelli *et al.*, 2002).

#### 3.2.5.1.2 Ácidos fenólicos e seus ésteres

Os ácidos fenólicos são derivados substituídos de ácido benzóico, constituídos por um núcleo básico hidroxifenilpropenóico conforme demonstra figura 11, tipicamente C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>, incluindo o ácido salicílico, e derivados do ácido cinâmico, com estruturas C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>, geralmente esterificados com álcool etílico ou benzílico. Entre esses últimos sobressaem os ácidos cafeicos, *p*-cumárico e ferúlico. Alguns ésteres

do ácido cafeico são alérgenos, responsabilizados pela ocorrência de dermatites em usuários mais sensíveis (Nothenberg, 1997).

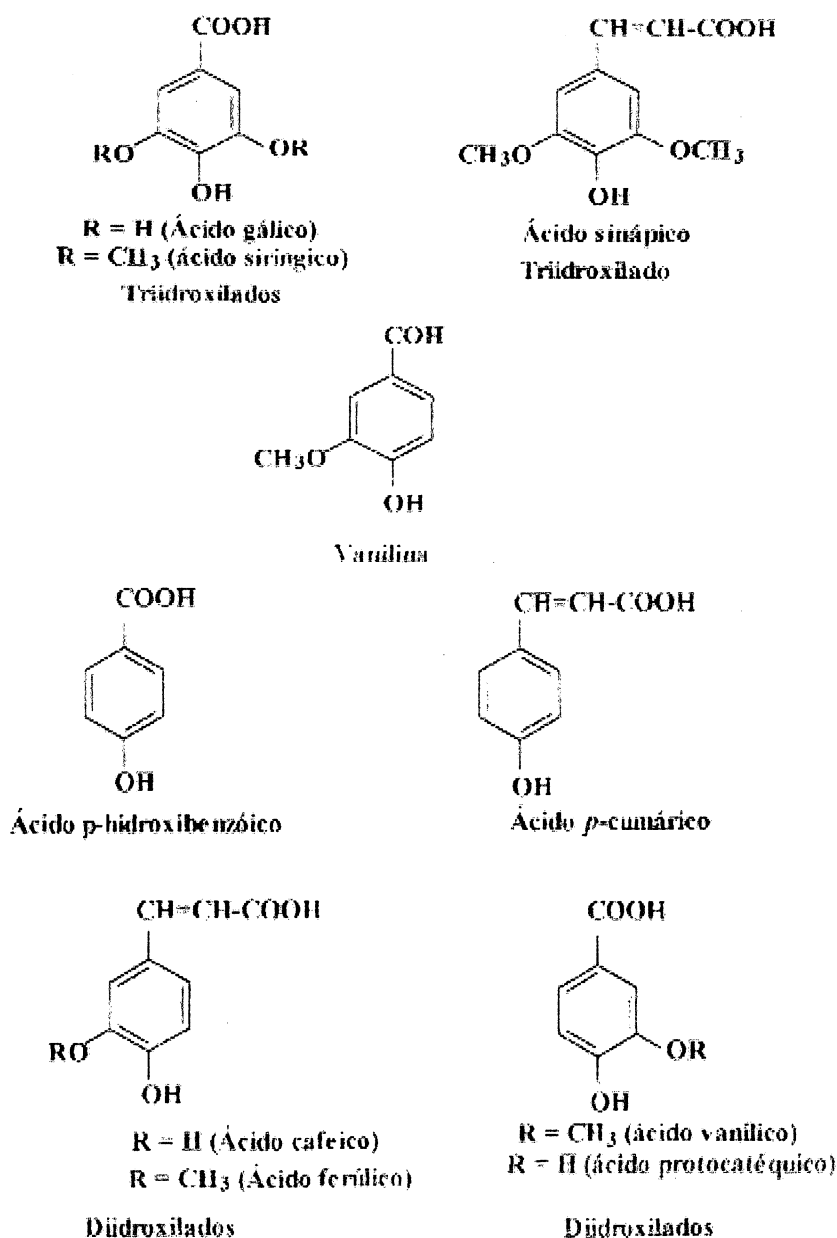
FIGURA 11 – NÚCLEO BÁSICO HIDROXIFENILPROPENÓICO DOS ÁCIDOS FENÓLICOS



A FIGURA 12 mostra exemplos de compostos fenólicos, vários deles comuns nos produtos apícolas, como o ácido gálico, p-cumárico, cafeico, ferúlico e siríngico (Marcucci, 1998).

Alguns constituintes da própolis que demonstraram grande atividade anticâncer são os derivados do ácido cafeico, flavonóides, ácido 2,2-dimetil-8-prenilcromana-6-propanóico, artepelin e ácido hidroxicleroda-3,(13Z)-dien-15-óico (Banskota *et al.*, 1998). O éster fenético do ácido cafeico (CAPE) inibe vários processos associados a carcinogênese, suprimindo o crescimento de várias linhagens de células cancerígenas humanas, inclusive o carcinoma de cólon, glioblastoma multiforme, melanona, células de fibroblasto embrionárias transformadas pelo Adenovírus, mas não têm ação sobre fibroblastos normais da pele humana. Células do carcinoma de cólon tratadas com CAPE também possuem uma inibição no aumento de síntese de DNA, RNA e proteínas (Su *et al.*, 1994). Além da atividade anticâncer o CAPE possui atividade antiinflamatória por inibir a liberação do ácido aracdônico das membranas celulares, suprimir a atividade da COX-1 e COX-2 e inativar a expressão gênica da COX-2 (Borrelli *et al.*, 2002). E também já foi demonstrada sua atividade vasorelaxante (Cicala *et al.*, 2003).

FIGURA 12 – ESTRUTURA DE ALGUNS COMPOSTOS FENÓLICOS NÃO INCLUÍDOS NO GRUPO DOS FLAVONÓIDES



FONTE: Marcucci, 1998.

Yamada e Tomita (1996) observaram que o ácido cafeico e alguns análogos como ácido cinâmico, ácido cumárico e ácido ferúlico inibem a metagênese induzida pelo 2-aminodipirido[1,2-a:3',2'-d]imidazol ativado. Os derivados do ácido cafeico e do ácido gálico são também inibidores seletivos do vírus HIV, pois se ligam irreversivelmente a proteína gp120 presente no vírus, proteína esta essencial para a capacidade de infectar do mesmo (Vlietinck *et al.*, 1997).

### 3.2.6 Métodos de extração

Várias literaturas descrevem procedimentos de extração diferenciados e utilizando diferentes solventes extratores. Pascual, Gonzalez e Torricella (1994) utilizaram para testar a atividade antioxidante 1 g de amostra triturada em etanol a 95% e repouso por 48 horas a temperatura ambiente. Fernandes Jr. *et al.* (1997) utilizaram extratos obtidos triturando 50 g de amostra em 100 mL de etanol 96 °GL. Ikeno K, Ikeno T, Miyazawa (1991) aplicaram em cáries de ratos extratos etanólicos preparados com 5 volumes de etanol 99,5% a temperatura ambiente por 1 dia. Kumazawa, Hamasaka, Nakayama (2004) também utilizaram extrato etanólico obtido em temperatura ambiente por 24 horas. Kujumgiev *et al.* (1999) testaram as atividades biológicas de extratos etanólicos de própolis obtidos com etanol 70% (1:10 p/v) por 24 horas. Bankova *et al.* (1998) e Hegazi *et al.* (2000) obtiveram os extratos também com etanol 70% mas realizaram a reextração após 24 horas.

Park *et al.* (1995), Koo e Park (1997) utilizaram para cada 2 gramas de própolis 25 mL de etanol 80%, utilizando agitação por 30 minutos e temperatura de 70 °C. Ao contrário de Moreno *et al.* (2000) que para cada grama de amostra pulverizada utilizaram 15 mL de etanol 80% e agitação contínua por 24 horas a temperatura ambiente. Sforcin *et al.* (2000) trituraram 30 g de própolis com 100 mL de álcool etílico 95°, utilizaram agitação moderada e temperatura ambiente. A mesma metodologia deixando os extratos em agitação por sete dias foi utilizada por Bosio *et al.* (2000), Fernandes Jr. *et al.* (2001) em amostras de *Apis mellifera* e Miorin *et al.* (2003). Menezes *et al.* (1997) utilizaram 100 g de amostra e 200 mL de etanol 95% em um banho com agitação por 1 semana a 25 °C.

Fernandes Jr. *et al.* (2001) para a obtenção de extratos etanólicos de própolis de Meliponíneos utilizaram 100 g de amostra para cada 100 mL de etanol 95% em temperatura ambiente por dois dias.

Alguns autores, para testar as atividades biológicas dos extratos de própolis utilizam extratos aquosos ao invés de etanólicos, Nagai *et al.* (2003) testaram as propriedades antioxidantes de extratos aquosos obtidos com 50g de amostra e 5 volumes de água destilada, agitação a 20 °C por um dia e uma reextração do resíduo por mais um dia. Bianchini e Bedendo (1998) utilizaram extrato aquoso de própolis obtido com 100 g de própolis triturada em 1 litro de água destilada por 1-2

minutos. Além disso, outros autores como Dimov *et al.* (1991) e Ivanovska *et al.* (1995) também utilizaram extrato aquoso de própolis.

Apesar de os extratos etanólicos e aquosos serem os mais utilizados alguns autores utilizaram outros solventes para a obtenção dos extratos de própolis. Higashi e Castro (1994) utilizaram extratos em dimetilsulfóxido além dos extratos etanólicos, triturando as amostras de própolis no solvente por 4 horas e filtrando. Fontana *et al.* (2000) obtiveram extratos com um grama de própolis extraído com 10 volumes de solventes de diversas polaridades (desde hexano até metanol) a 25 °C e deixado por um dia em agitador (100 rpm). Marcucci *et al.* (2001) utilizaram extratos metanólicos de própolis onde 50 g de amostra foi extraída em aparelho de *Soxhlet* com metanol à quente por 8 horas.

### 3.2.7 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). A caracterização de todas estas atividades biológicas associadas à tendência de utilização de produtos naturais tem resultado num aumento da demanda de própolis e produtos contendo própolis, como extratos, comprimidos, cápsulas, nebulizações ou pós (Menezes *et al.*, 1997).

#### 3.2.7.1 Atividade antimicrobiana

O primeiro uso clínico da penicilina para o tratamento de infecções bacterianas foi rapidamente seguida pelo aparecimento das cepas produtoras de penicilinas. Desde a introdução da penicilina, houve um aumento significativo no número de classes de antibióticos disponíveis. Infelizmente, se deu o desenvolvimento de resistência contra virtualmente qualquer classe de antibiótico (Ginzburg *et al.*, 2000), o que tem levado a uma intensa procura por novos



antibióticos, e dentre estes, atenção especial tem sido voltada para as plantas medicinais e para os produtos de origem natural, entre eles a própolis.

Durante os últimos anos tem sido relatada *in vitro* a atividade antimicrobiana da própolis que se deve aos flavonóides, ácidos aromáticos e ésteres presentes na resina natural. A galangina, pinocembrina e pinostrobina são tidos como os flavonóides mais efetivos contra bactérias. Os ácidos ferúlicos e cafeico também contribuem para a ação bactericida da própolis. O mecanismo de atividade antimicrobiana é complexo e provavelmente baseado na inibição da RNA-polimerase bacteriana (Bosio, 2000), podendo decorrer de um efeito sinérgico entre flavonóides, hidroxíácidos e sesquiterpenos (Marcucci, 1995). Todas as pesquisas realizadas em substâncias isoladas de própolis demonstraram que nenhum componente isolado tem uma atividade maior do que o extrato total inicial (Marcucci, 1996; Kujumgiev *et al.*, 2000).

A atividade antimicrobiana *in vitro* da própolis foi verificada contra várias linhagens de bactérias gram positivas: *Bacillus brevis*, *B. cereus*, *B. megatherium*, *B. polymyxa*, *B. pumilus*, *B. sphaericus*, *B. subtilis*, *Cellulomas funi*, *Nocardia globerula*, *Leuconostoe 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*. Verificou-se que de 39 linhagens de bactérias testadas, o crescimento de 25 delas foi inibido na presença de concentrações de própolis menores que 100 µg/mL (Marcucci, 1996).

Grange e Davey (1990) observaram que os extratos etanólicos de própolis - EEP (3 mg de sólidos totais/mL) inibiram completamente o crescimento de *S. aureus* (inclusive MRSA), *S. epidermidis*, *Enterococcus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Branhamella catarrhalis* e *Bacillus cereus*, inibiram parcialmente o crescimento da *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, mas não tiveram efeito sobre *Klebsiella pneumoniae*, demonstrando então uma inibição preferencial sobre cocos em detrimento de bacilos gram positivos. Além disso, evidenciaram que uma diluição 1:320 da amostra de própolis testada inibia totalmente a cepa *Mycobacterium tuberculosis*.

Meresta e Meresta (1985) examinaram a sensibilidade de 69 cepas bacterianas identificadas como *Staphylococcus spp* e *Streptococcus spp* aos

extratos de própolis, e todas apresentaram alta sensibilidade aos mesmos. A atividade antibacteriana da própolis contra *S. aureus* 209P correspondem a uma concentração inibitória mínima (CIM) e a uma concentração bactericida mínima (CBM) de 10 e 120 mg/mL, respectivamente, como citado por Marcucci (1995). Fontana *et al.* (2000) comprovaram que extratos etanólicos de própolis (3 mg/mL) inibiam o crescimento de cepas *Staphylococcus aureus*, principalmente a cepa meticilina resistente (MRSA), devido ao efeito sinérgico dos seus constituintes.

Foi demonstrado por Valdez *et al.* (1985) que os EEPs inibem o crescimento de várias bactérias incluindo cepas *Streptococcus* e *Bacillus*. Isto foi posteriormente comprovado por Fuentes e Hernandez (1990) que relataram que EEPs têm uma atividade pronunciada contra algumas bactérias, incluindo *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *S. epidermidis* e *Streptococcus sp* ( $\beta$ -hemolítico), como citado por Marcucci (1995). Menezes *et al.* (1997) também observaram que extratos etanólicos de própolis e preparações comerciais como tabletes, cápsulas e pós contendo própolis têm ação frente à cepa *S. aureus*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus*.

Hegazi *et al.* (2000) testaram a inibição das cepas *Staphylococcus aureus* e *E. coli* por conta de amostras de própolis e obtiveram uma CIM entre 1000 a 8400  $\mu$ g/mL. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Fernandes Jr. *et al.* (1997), Park *et al.* (1997) e Marcucci *et al.* (2001) que verificaram uma ação marcante da própolis sobre bactérias gram-positivas e uma atividade limitada contra as gram-negativas. Marcucci *et al.* (2001) também evidenciaram a inibição da cepa *Streptococcus fecalis* frente ao extrato metanólico de própolis.

Fernandes Jr. *et al.* (2001) comprovaram que tanto própolis coletadas por abelhas *Apis mellifera* quanto coletadas por várias espécies de Meliponíneos também apresentavam atividade frente à *S. aureus*, *Escherichia coli* e *Enterococcus sp.* Velikova *et al.* (2000b) demonstraram que 12 diferentes amostras de própolis coletadas por Meliponíneos tiveram pouca ou nenhuma atividade contra *E. coli* e algumas tiveram uma atividade pronunciada sobre *Staphylococcus aureus*, provavelmente pelo alto teor de ácidos diterpênicos.

Bankova *et al.* (1999a) observaram que o óleo essencial extraído de três amostras de própolis (0,4 mg) coletadas por Meliponíneos (*Melipona compressites*, *Tetragona clavipes* e *Melipona quadrifasciata*) possui uma fraca atividade frente à

cepa *S. aureus* 209 e são inativas frente a *Escherichia coli* WF<sup>+</sup>. Bankova *et al.* (1999b) utilizando uma amostra de própolis das Ilhas Canárias (0,4 mg) de elevado conteúdo de lignana do tipo furofurânica, relataram uma atividade fraca da amostra contra os mesmos microorganismos. Seqüencialmente Velikova *et al.* (2000a) obtiveram os mesmos resultados com amostras de própolis coletadas por abelhas da espécie *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Meliponinae).

Dobrowolski *et al.* (1991) verificaram que amostras de própolis obtidas comercialmente (10 mg) na forma de comprimidos ou grânulos possuem atividade antimicrobiana contra cepas gram-positivas: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus viridans*, *Diplococcus pneumoniae* e *Corynebacterium diphtheriae* e cepas gram negativas: *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* (-A e -B) e *Shigella*.

Ikeno K, Ikeno T e Miyazawa (1991) evidenciaram a atividade anticariogênica de amostras de própolis contra *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus cricetus* pela inibição da glucosiltransferase, responsável pela síntese de glucanas insolúveis em água a partir de sucrose, e conseqüente inibição da formação de placas. Koo *et al.* (2000) observaram os mesmos resultados para extratos etanólicos de própolis (1,25 - 5,0 mg de própolis/mL) sobre várias glucosiltransferases, incluindo uma produzida por *Streptococcus sanguis*. Porém um estudo realizado por Murray, Worthington e Blinkhorn (1997) demonstrou que formulações de enxaguatórios bucais contendo própolis não demonstraram atividade de inibição da formação de placa dentária. Park *et al.* (1998a) comprovaram os resultados obtidos por Ikeno K, Ikeno T e Miyazawa (1991) para a cepa *Streptococcus mutans* principalmente nas amostras ricas nos flavonóides pinocembrina e galangina (Park *et al.*, 1998a).

Santos *et al.* (2002) relataram que amostras de própolis tem atividade antimicrobiana contra cepas de bactérias anaeróbicas *Prevotella intermedia/Prevotella nigrescens* e *Porphyromonas gingivalis*, tanto de referência quanto isoladas de pacientes com periodontite, possuindo uma CIM entre 64 e 256 µg/mL e CBM de 256 µg/mL.

Bosio *et al.* (2000) observaram que EEPs têm atividade antimicrobiana contra 46 cepas de *Streptococcus pyogenes* com concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima de menos que 234 µg / mL.

Levy Jr. (1997) verificaram uma maior eficiência da própolis produzida por *Apis mellifera* do que aquelas produzidas por algumas abelhas nativas sem ferrão, como citado por Fernandes Jr. (2001). Porém Kujumgiev *et al.* (1999) evidenciaram não haver diferenças nas atividades antibacterianas, antifúngicas e antivirais de própolis de origens geográficas diferentes, incluindo quatro amostras brasileiras de *Apis mellifera* e duas de Meliponíneos (*Melipona compressipes* e *Melipona quadrifasciata anthidioides*). Estes resultados foram comprovados por Miorin *et al.* (2003) que não obtiveram diferenças estatisticamente significantes nos valores de CIM para as amostras de própolis testadas tanto de *Apis mellifera* quanto de *Tetragonisca angustula*.

Bianchini e Bedendo (1998) demonstraram que extratos aquosos de própolis têm efeito sobre bactérias fitopatogênicas inibindo totalmente o crescimento de *Agrobacterium tumefaciens*, *Clavibacter michiganensis* e *Xanthomonas axonopodis* e parcialmente *Erwinia chrysanthemi*, sugerindo seu uso em potencial para o controle de doenças de plantas de etiologia bacteriana.

Outras atividades relatadas para os extratos etanólicos de própolis são uso na assepsia das colméias através da inibição de *Bacillus larvae* e atividade antiúlcera por inibir a *Helicobacter pylori* (Fontana *et al.*, 2004).

Além disso, extratos de própolis têm demonstrado potencializar o efeito de determinados antibióticos, quando adicionados ao meio de cultura, prevenindo ou reduzindo qualquer tolerância aos mesmos (Marcucci, 1995). Em alguns casos, o efeito bacteriostático foi aumentado de 10 a 100 vezes (Marcucci, 1996).

#### 3.2.7.2 Atividade antifúngica

É atribuído à própolis também efeitos fungicidas e fungistáticos, sendo o efeito fungicida relacionado à ocorrência de pinocembrina na própolis (Metzner, Schneidewind, Friedrich, 1977). Age contra dermatófitos (Cizmárik, Trupl, 1976) e inibe a produção da ochratoxina A produzida por *Aspergillus sulphureus* (Burdock, 1998).

Hegazi *et al.* (2000) relataram a atividade de própolis contra *Candida albicans* obtendo uma CIM entre 1200 a 6400 µg/mL. A combinação de drogas antimicóticas com própolis aumentou ainda mais sua atividade sobre esta cepa.

Marcucci (1996) observou que alguns extratos aquosos de própolis não exibiram nenhuma atividade antifúngica sobre *C. albicans* mas os extratos etanólicos apresentaram um pequeno efeito.

Fernandes Jr. *et al.* (1994) avaliaram a atividade antifúngica de EEP contra várias leveduras, entre as espécies testadas, *Candida albicans* (CIM<sub>90</sub> de 3,8 mg/mL – 1,7 % v/v) e *Candida tropicalis* (CIM<sub>90</sub> de 2,1 mg/mL – 0,9 % v/v) apresentaram melhor sensibilidade que *Candida parapsilosis* (CIM<sub>90</sub> de 10,9 mg/mL – 4,9 % v/v) e *Candida guilliermondii* (CIM<sub>90</sub> de 9,6 mg/mL – 4,4 % v/v). Velikova *et al.* (2000b) verificaram que 12 diferentes própolis coletadas por Meliponíneos apresentaram pouca atividade contra *Candida albicans*.

Dobrowolski *et al.* (1991) informaram que própolis obtidas comercialmente (10 mg) na forma de comprimidos ou grânulos possuem atividade antifúngica contra fungos superficiais e dermatófitos (*Trichosporon cutaneum*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Piedrae hortae*, *Microsporum gypseum*, *Microsporum canis*), mas não tem atividade sobre fungos subcutâneos ou micoses sistêmicas (*Cryptococcus neoformans*, *Phialophora jeanselmei*, *Histoplasma neoformans*, *Madurella mycetomi*). A própolis apresentou um importante potencial antifúngico contra *Trichophyton* e *Microsporum* na presença de propilenoglicol, com o qual interage sinergicamente em uma concentração de 5% (Marcucci, 1995; Marcucci, 1996). Lori (1990) observou que em testes *in vitro*, própolis nas concentrações de 5 e 10% preveniram o crescimento de *Trichophyton verrucosum*, como citado por Marcucci (1995).

Murad *et al.* (2002) evidenciaram que apesar do aumento da atividade fungicida da própolis *in vivo* frente à levedura *Paracoccidioides brasiliensis* não ter sido significativa comparada com o controle, a própolis estimulou a ativação dos macrófagos que tiveram uma atividade fungicida aumentada.

### 3.2.7.3 Atividade antiviral

Existem poucos estudos da atividade antiviral da própolis. Em estudos realizados com extratos obtidos com vários solventes, alguns extratos (0,2 – 3,0 mg/mL) afetaram a reprodução dos vírus influenza A e B, vírus vaccinia, e vírus da doença de Newcastle em diferentes sistemas biológicos (Marcucci, 1995). Foi

investigado o efeito *in vitro* da própolis sobre vários vírus DNA e RNA, incluindo o vírus herpes simplex tipo 1 e tipo 2, mutante resistente a aciclovir, 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 de própolis houve uma redução do título viral em 1000 vezes. Entretanto, o vírus da estomatite vesicular e o adenovírus foram menos susceptíveis (Marcucci, 1996). Além do efeito na multiplicação viral, a própolis exerceu uma ação virucida nos vírus do herpes simplex (HSV) e vírus da estomatite vesicular (VSV) como citado por Marcucci (1995). Verificou-se que os flavonóides isolados, crisina e canferol, reduziram a replicação intracelular do vírus do herpes simplex dependente da concentração da droga. Além disso, a quercetina reduziu a replicação viral apenas em altas concentrações, enquanto a acacetina e galangina não tiveram efeito (Marcucci, 1996).

Amoros *et al.* (1994) evidenciaram que extratos de própolis (15 - 30 µg/mL) assim como o composto isolado da mesma, cafeato de 3-metil-but-2-enil (presente em pequenas quantidades na amostra de própolis) diminuem a replicação do vírus HSV-1 (vírus herpes simplex) e a síntese de DNA viral, concluindo que a atividade antiviral da própolis não ocorre apenas devido aos seus compostos principais (flavonóides) mas também a participação significativa de compostos presentes em pequenas quantidades (como o cafeato de 3-metil-but-2-enil). Os autores também sugerem que a própolis e o composto isolado exercem efeito no estágio da replicação viral após se ligar e penetrar na célula hospedeira funcionando como verdadeiros agentes antivirais.

Serkedjieva, Manolova e Bankova (1992) comprovaram que o extrato em éter etílico de própolis inibiu *in vitro* a replicação do vírus influenza A/Hong Kong/1/68 (H3N2), tendo inibição similar ao ferulato de isopentila (éster substituído do ácido cinâmico), um análogo sintético do ferulato de isopent-3-enil encontrado nesta amostra de própolis. Além disso, a própolis atua em infecções causadas pelo *Rhinovirus* devido aos flavonóides (Fontana *et al.*, 2004).

#### 3.2.7.4 Atividade antimutagênica

Testes *in vitro* têm demonstrado atividade anti-tumoral da própolis tanto como citostática quanto citotóxica. Banskota *et al.* (1998) demonstraram que o extrato metanólico de própolis possui uma citotoxicidade considerável contra células de tumor de cólon, devido ao seu conteúdo de compostos fenólicos. Mais tarde, Banskota *et al.* (2000) relataram que extratos metanólicos de própolis da China, Peru, Holanda e Brasil tiveram maior atividade citotóxica contra células de carcinoma de cólon de rato e células de fibrosarcoma humano do que os respectivos extratos aquosos.

O ácido cafeico e seus ésteres presentes na própolis são tidos como agentes ativos com várias atividades biológicas incluindo supressão de tumores. Os ésteres do ácido cafeico são potentes inibidores do crescimento das células do carcinoma de cólon humano, de alterações bioquímicas induzidas pelo carcinoma e de lesões pré-neoplásicas presentes no cólon de ratos (Rao *et al.*, 1995). Rao *et al.* (1995) observaram que a administração do cafeato de feniletíl-3-metil (substância presente na própolis), na dieta inibe significativamente a incidência e multiplicação de adenocarcinoma de cólon induzido por azoximetano, seja tumor invasivo, não invasivo e/ou total. Além disso, outros derivados do ácido cafeico, cafeato de metila, cafeato de feniletíl, cafeato de feniletíl-3-metil e dimetilcafeato de feniletíl tem atividade antimutagênica em *Salmonella typhimurium* e inibem o crescimento das células do adenocarcinoma de cólon (Rao *et al.*, 1995).

Chen, Wu e Lin (2004) seqüencialmente após terem isolado da própolis de Taiwan dois flavonóides com cadeias laterais geranil hidratadas, propolina A e B, com atividade citotóxica contra células de carcinoma humano, células de leucemia humana, células de câncer de mama humana, células de neuroblastoma e atividade antioxidante, isolaram pela primeira vez em amostras de própolis um novo composto denominado propolina C. Identificação feita por  $^1\text{H}$  NMR e  $^{13}\text{C}$  NMR demonstrou que o composto propolina C é um flavonóide com uma cadeia geranil lateral não hidratada, idêntico ao composto nimfaeol-A. O composto demonstrou ser mais efetivo na indução da apoptose em célula de melanona humano do que os anteriores, e também mais efetivo na inibição da atividade da xantino oxidase. Além disso, a propolina C é mais efetiva na indução da citotoxicidade em seis diferentes

tipos de células e na atividade de inibição da xantina oxidase que o CAPE (Chen, Wu e Lin, 2004).

Extratos etéreos de própolis exibem atividade citostática sobre células de carcinoma de nasofaringe humano e células de carcinoma cervical humano. Os flavonóides que possuem maior atividade contra as células de carcinoma cervical humano são a quercetina e ramnetina, seguidos pela galangina (Marcucci, 1995).

A própolis também tem atividade anti - tumoricida devido a artepelinina C encontrada na própolis, possui citotoxicidade seletiva no melanoma e glioblastoma devido ao CAPE (Fontana *et al.*, 2004) e tem ação no carcinoma de Ehrlich (Marcucci, 1995; Burdock, 1998).

### 3.2.7.5 Atividade antiprotozoário

A atividade antiprotozoário de própolis foi confirmada em inflamações provocadas por *Trichomonas vaginalis*. Uma solução de 150 µg/mL de EEP exibiu um efeito letal (0% de sobrevivência) sobre culturas deste protozoário, após 24 horas de crescimento. O efeito de EEP (11,6 mg/mL) *in vitro* sobre o crescimento do parasita *Giardia lamblia* foi também verificado com inibição de 98% (Marcucci, 1995; Marcucci, 1996).

Higashi e Castro (1994) evidenciaram que os extratos etanólicos e em dimetilsulfóxido de própolis (12,5 – 200 µg/mL) inibiram a proliferação *in vitro* do parasita *Trypanosoma cruzi*, sendo o primeiro mais ativo contra as formas amastigota (tanto intra quanto extracelular) e tripomastigotas. Posteriormente foi comprovado que os mesmos extratos (1,2 – 5 g de própolis/kg por dia) utilizados nos testes *in vivo* não possuíam efeito sobre a parasitemia, tempo de sobrevivência e mortalidade do parasita *Trypanosoma cruzi* quando administrados por via subcutânea em ratos infectados (Castro e Higashi, 1995). Marcucci *et al.* (2001) também demonstraram a atividade *in vitro* de extratos metanólicos de própolis (0,7 – 1,2 mg/mL) contra o mesmo protozoário. Além disso, os extratos etanólicos de própolis inibiram a proliferação do *Toxoplasma gondii* (Higashi e Castro, 1994).



### 3.2.7.6 Atividade antioxidante

Espécies reativas de oxigênio (EROs) potencialmente danosas são produzidas continuamente nas células como consequência tanto do metabolismo aeróbico normal (reações bioquímicas oxidativas) quanto por fatores externos (Russo *et al.*, 2002). Esses radicais livres (ex.  $\text{OH}^{\bullet}$ , radical hidroxil) são usualmente removidos ou inativados *in vivo* por enzimas antioxidantes endógenas, como superóxido desmutase (SOD), peroxidase e compostos de baixo peso molecular como tocoferol, ácido ascórbico e polifenóis (Nagai *et al.*, 2001). Os antioxidantes de defesa têm função de prevenção da geração de EROs, destruição de potenciais antioxidantes e degradação das EROs formadas. Dessa forma os danos do tecidos induzidos pelo estresse oxidativo são mínimos (Benzie, 1996). De qualquer forma, as EROs se tornam danosas quando são produzidas em excesso sob certas condições anormais como inflamação, isquemia e na presença de íons catalíticos (ex.  $\text{Fe}^{2+}$ ). Sob estas condições, os antioxidantes endógenos (ex. glutathion reduzido) podem ser insuficientes para conter a formação dos mesmos. Estas espécies reativas de oxigênio podem causar dano celular pela peroxidação de lipídeos da membrana, inativação de sulfidril enzimas, ligações entrecruzadas de proteínas ou quebra de DNA (Russo *et al.*, 2002). Estes danos podem estar envolvidos na etiologia de várias doenças, como doença cardíaca coronária, inflamação, doenças neurodegenerativas (Parkinson e Alzheimer), câncer e intoxicação por etanol (Benzie, 1996; Russo *et al.*, 2002). Por isso a ingestão de antioxidantes através da dieta tem uma importante função na prevenção destas doenças (Berg, 1999).

Um antioxidante biológico é definido como “qualquer substância que, presente em baixas concentrações comparado ao substrato oxidável, reduz ou previne significativamente a oxidação deste substrato” (Benzie, 1996).

Vários autores relatam que algumas propriedades biológicas, particularmente a atividade antioxidante, em extratos etanólicos de própolis, se deve em parte ao seu alto conteúdo de flavonóides (Moreno *et al.*, 2000; Nagai *et al.*, 2003). Os flavonóides afetam a atividade de uma série de sistemas, entre eles, inibem a atividade de enzimas envolvidas na conversão de ácidos graxos poliinsaturados de membrana para ativar mediadores como fosfolipase  $A_2$ , ciclooxigenase e lipooxigenase e tem uma potente atividade de combate aos

radicais livres (Nagai *et al.*, 2003). O seqüestro de radicais livres gerados pelos neutrófilos em processos inflamatórios pode ser um mecanismo importante para a atividade antiinflamatória (Moreno *et al.*, 2000).

Pascual, Gonzalez e Torricella (1994) relataram que a propriedade antioxidante da própolis (0,6 µg/mL – 9,5 µg/mL) pode ser atribuída a sua atividade anti-radical livre contra radicais alquil e em um grau menor contra o ânion superóxido. Nagai *et al.* (2001) observaram a atividade antioxidante de amostras de mel, geléia real e própolis baseando-se no sistema de peroxidação lipídica. Seqüencialmente Nagai *et al.* (2003) verificaram uma atividade antioxidante alta, utilizando-se o mesmo sistema modelo de peroxidação lipídica, para os extratos aquosos de própolis, sendo que nas concentrações de 1 e 5 mg/mL essa atividade foi maior do que a do ácido ascórbico a 5 mM. A atividade de seqüestro dos radicais livres destes extratos também foi alta, e a 50 a 100 mg/mL inibiu completamente a produção dos íons superóxidos e dos radicais hidroxila. Os radicais hidroxilas são conhecidos por serem capazes de abstrair átomos de hidrogênio de membranas e ocasionar reações de peroxidação de lipídeos. Então, era de se esperar que extratos aquosos de própolis teriam um efeito antioxidante contra a peroxidação lipídica em biomembranas e iriam seqüestrar radicais hidroxilas e ânions superóxido em estágios de iniciação e término dos radicais peróxidos (Nagai *et al.*, 2003).

Moreno *et al.* (2000) evidenciaram que vários extratos etanólicos de própolis argentina (20 µg/mL de princípios solúveis) demonstraram atividade anti-radicais livres baseados na descoloração do radical DPPH\* ( $\alpha, \alpha$ -difenil- $\beta$ -picrilhidrazil). A atividade antioxidante de extratos etanólicos de própolis de diversas regiões também foi comprovada por Kumazawa, Hamasaka, Nakayama (2004) pelas metodologias de descoloração do  $\beta$ -caroteno e do radical livre DPPH\*. Banskota *et al.* (2000) relataram a atividade anti-radical livre de extratos etanólicos e aquosos de própolis do Brasil, Holanda, Peru e China, sendo os extratos aquosos das própolis do Brasil e China mais efetivos que os metanólicos, e os extratos metanólicos das própolis da Holanda e Peru mais efetivos do que os aquosos.

A atividade antioxidante de própolis da China, Austrália, Nova Zelândia e Japão foi relacionada a presença de  $\alpha$ -tocoferol nas mesmas (Kumazawa, Hamasaka, Nakayama, 2004). Foi observado que extratos aquosos de própolis do

Brasil e da China possuem uma maior atividade de seqüestro do radical livre DPPH<sup>•</sup> do que os extratos metanólicos correspondentes.

Russo *et al.* (2002) verificaram que extratos de própolis com e sem CAPE (éster fenetílico do ácido cafeico) são capazes de inibir a formação de ânions superóxidos, produzidos durante a autoxidação do  $\beta$ -mercaptoetanol, mas os extratos de própolis com CAPE mostraram um potencial de inibição maior. O que sugere uma significativa contribuição deste composto fenólico na atividade antioxidante da própolis. Foi evidenciado também que o CAPE tem uma capacidade de degradar radicais livres maior que a galangina. A atividade anti-radicais livres deste tipo de composto também foi avaliada pela metodologia de descoloração do radical DPPH<sup>•</sup>, demonstrando uma reatividade das amostras frente a um radical livre independente de qualquer ação enzimática (Russo *et al.*, 2002).

#### 3.2.7.7 Atividade antiinflamatória

A atividade antiinflamatória da própolis já está bastante reconhecida, principalmente contra doenças do sistema muscular-articular e outros tipos de inflamações, infecções, reumatismos e torções (Marcucci, 1996). Apesar de o mecanismo exato de ação e os compostos principais responsáveis ainda não terem sido estabelecidos (Rossi *et al.*, 2002), as pesquisas têm se focado no metabolismo do ácido araquidônico, já que as prostaglandinas têm papel fundamental no processo inflamatório (Rossi *et al.*, 2002). Os metabólitos do ácido araquidônico exercem uma variedade de atividades biológicas. Vários estudos têm comprovado que os metabólitos da ciclooxigenase modulam a proliferação celular, crescimento de tumores e respostas imunes, enquanto que os metabólitos da lipooxigenase podem influenciar em várias respostas biológicas incluindo quimiotaxia, secreção de hormônios, transporte de íons, estímulo de adesão de células tumorais, desenvolvimento de tumores e regulação do potencial metastásico de células tumorais. Deste modo vários estudos estabelecem os metabólitos do ácido araquidônico como moduladores de patogênese de várias doenças imunológicas e inflamatórias (Rao *et al.*, 1995). Sud'ina *et al.* (1993) demonstraram que o CAPE, um composto ativo nos extratos de própolis, contribui para a atividade antiinflamatória da própolis *in vivo* por inibir a lipooxigenase e por agir como um antioxidante.

Seqüencialmente Rossi *et al.* (2002) relataram que os extratos etanólicos de própolis inibem também a atividade da ciclooxygenase em pulmão de ratos de forma dose-dependente, além disso, entre os compostos isolados testados apenas o CAPE e a galangina tiveram efeito, sendo o primeiro mais eficaz que o segundo. Borrelli *et al.* (2002) observaram que os extratos etanólicos de própolis com CAPE e o CAPE isolado inibem de forma dose-dependente o edema de patas em ratos, o volume de exsudato, a migração dos leucócitos e a artrite induzida por carragenina. Além disso, os extratos de própolis sem CAPE e a galangina não demonstraram efeitos antiinflamatórios, sugerindo que este efeito da própolis se deve ao seu conteúdo de CAPE. Uma explicação para a maior atividade do CAPE isolado do que a própolis que o contém é que vários flavonóides que em altas concentrações são capazes de inibir a síntese de prostaglandinas, também são capazes em baixas concentrações de estimular a enzima para a produção de prostaglandinas (Borrelli *et al.*, 2002).

#### 3.2.7.8 Outras atividades

Banskota *et al.* (2000) verificaram nos extratos metanólicos de própolis (100 – 200 µg/mL) da China, Peru, Holanda e Brasil uma maior atividade hepatoprotetora que os correspondentes extratos aquosos, com exceção de uma amostra que apresentou toxicidade frente a cultura de hepatócitos. Os resultados obtidos foram um pouco diferentes dos encontrados por Basnet *et al.* (1996) que evidenciaram nos extratos aquosos um maior efeito hepatoprotetor em lesões do fígado induzidas por tetracloreto de carbono, mas parecidos com os resultados obtidos por Sugimoto *et al.* (1999) que comprovaram que os extratos etanólicos da própolis brasileira têm uma atividade pronunciada hepatoprotetora em lesões hepáticas induzidas por D-galactosamina, como citado por Banskota *et al.* (2000). Isso pode ser explicado pela diferença no modelo experimental utilizado.

Extratos aquosos e etanólicos de própolis foram testados em preparações utilizadas como bronzeadores solares em dois grupos de sete pessoas durante 25 dias. As áreas tratadas com o produto contendo extrato aquoso de própolis se bronzearam mais rapidamente do que os tratados com produto contendo extrato etanólico de própolis. Em todos os casos um bronzeado similar foi adquirido, sem

eritema ou queimaduras, e nenhuma das pessoas submetidas ao teste sofreu irritação ou prurido de pele. Isto se deve a amostra de própolis ter uma boa absorção na área do UVB (280 – 320 nm) e UVC (200 – 280 nm) e pouca na área do UVA (320 – 400 nm) (radiação responsável pelo bronzeado). Além disso, a própolis presente nos protetores solares funcionou como conservante deixando o cosmético resistente à contaminação microbiana, promoveu a produção de melanina e deu emoliência para a pele (Hermann, Bracamonte, 1990).

Dimov *et al.* (1991) relataram que o extrato aquoso de própolis da Bulgária possui atividade imunoestimulatória no caso de infecções induzidas por *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Cândida albicans* estimulando os macrófagos a produzir interleucina (IL-1). Mais tarde, Ivanovska *et al.* (1995) observaram que a fração solúvel em água da própolis tem atividade imunomoduladora *in vivo* ativando o sistema complemento dependendo da via administrada, sendo efetiva apenas por via intravenosa e intraperitonal e não por via oral.

Marcucci *et al.* (2001) evidenciaram que o extrato metanólico da própolis induz um efeito relaxante na traquéia isolada de porcos da Índia. A própolis demonstrou também promover a regeneração de ossos, cartilagem e polpa dentária e estimular a formação de colágeno (Ackermann, 1991). É utilizada também no tratamento de reumatismo e em odontologia, onde é considerado um anestésico local cinco vezes mais efetivo do que a cocaína (Burdock, 1998) e superior a procaína o que é atribuído aos flavonóides similares a pinocembrina e derivados de ácidos fenolcarboxílicos (Fontana *et al.*, 2004). São também conhecidas as suas propriedades anti-sépticas, adstringentes, hipotensivas e espasmolítica (Burdock, 1998; Marcucci, 1996).

Muitas outras propriedades biológicas e farmacêuticas da própolis foram relatadas, dentre inúmeras outras: propriedades imunogênicas, ação desintoxicante do fígado, atividade antiúlcera *in vitro*, anticânceres em ratos, ação imunomoduladora por funcionar como adjuvante na imunização do toxóide tetânico (Marcucci, 1996), agente protetor contra radiações gama, antileishmaniose em hamster, inibidor da atividade da dihidrofolato redutase (Marcucci, 1995), efeito de cicatrização de feridas e reparo tissular agindo em dermatites devido aos ácidos alil-cafeicos e no tratamento de varicose crônica trófica (Fontana *et al.*, 2004).

### 3.2.8 Toxicidade e alergia

Apesar de a metodologia de extração da própolis ainda permanecer sem padronização, pode-se afirmar por vários estudos que extratos de própolis possuem uma baixa toxicidade inata. Estes resultados já eram esperados já que os flavonóides, principais constituintes da própolis, possuem uma relativamente baixa toxicidade. Já foram relatadas a DL<sub>50</sub> em ratos de 2050 a mais de 7340 mg/Kg e que gatos toleram a administração subcutânea de 100 mg/Kg de extrato etéreo de própolis (Burdock, 1998). Dobrowolski *et al.* (1991) evidenciaram que após 48 horas da administração oral de 700 mg/Kg de própolis não foram observadas nenhuma morte e as preparações foram bem toleradas. Pode-se inferir que 1,4 mg/Kg de peso corpóreo/dia, ou aproximadamente 70 mg/dia, é uma dosagem segura para uso humanos (Burdock, 1998).

Foram verificados que soluções de própolis até 20% em acetona não foram irritantes em porcos da Índia e extratos de própolis aplicados puros e em pomadas não foram irritantes em coelhos. Outros experimentos demonstraram que extratos alcoólicos de própolis (1875 a 2470 mg/Kg/dia) administrados na água de ratos e cobaias por 30 ou 60 dias não demonstraram alterações na aparência clínica, comportamento, peso e mortalidade (Burdock, 1998).

Como um resultado da ampla utilização de própolis, vários relatos de reações alérgicas já foram descritos, para praticamente todas as partes do corpo (Marcucci, 1995; Burdock, 1998). Foi constatado por A. W. Artomasowa, Rússia, que geralmente as pessoas alérgicas a picadas de abelhas também são alérgicas ao uso ou à aplicação de própolis, mel, geléia real e pólen. Explica-se a alergia causada pelas secreções glandulares das abelhas, que se encontram nos produtos apícolas em forma de enzimas. Constatou-se que apenas uma pessoa em cem sofre deste fenômeno (Breyer, 1980; Burdock, 1998). As partes do corpo afetadas incluem, dentre outras, as mãos, braços, rosto, pescoço, região perioral, pés, pálpebra, orelha, vulva e pênis (Burdock, 1998).

Alguns autores relataram que os constituintes dos brotos de álamo são os possíveis responsáveis pelas alergias à própolis, principalmente derivados do ácido cafeico (Burdock, 1998). A própolis pode induzir dermatites alérgicas, e segundo Hausen *et al.* o alergênico principal é o cafeato de 3-metil-but-2-enil, composto

responsável pela atividade antiviral de algumas própolis, como citado por Amoros *et al.* (1994). O flavonóide tectocrisina foi considerado um segundo alérgeno, mas com atividade muito fraca. Além disso, foram observadas as propriedades alérgicas dos ésteres fenilílicos e prenílicos do ácido cafeico (Marcucci, 1995).

Foi verificado um caso de dermatite alérgica em uma mulher de 40 anos HIV positiva ocasionado pelo uso em conjunto de própolis com drogas anti-retrovirais, porém outras oito pessoas saudáveis e dez pacientes HIV positivos não apresentaram reação alérgica positiva frente à mesma amostra de própolis testada (Bellegrandi *et al.*, 1996).

### 3.2.9 Aplicações

A longa história do homem em domesticar abelhas levou à exploração dos produtos apícolas e as várias propriedades favoráveis da própolis, tanto pura quanto refinada, tem sido exploradas para sua aplicação em vários propósitos humanos (Burdock, 1998). A própolis tem sido usada desde a antiguidade para propósitos farmacêuticos e seu uso continua hoje em dia em remédios caseiros e produtos pessoais (Burdock, 1998; Kujumgiev *et al.*, 1999). Muitos países europeus estão interessados em produtos naturais para curar doenças e a própolis é um importante produto utilizado com este propósito (Marcucci, 1995). A lista de preparações e usos da própolis é quase interminável (Burdock, 1998). Estas aplicações incluem produtos dermatológicos de venda livre que são tidos como úteis na cicatrização de feridas, regeneração de tecidos, tratamento de queimaduras, neurodermatites, psoríase, úlceras nas pernas, herpes simples e genital e atividade contra dermatófitos. Utilizada em dentifrícios e preparações bucais para o tratamento de gengivites, estomatites, quelites e na pós-extração dentária (Marcucci, 1996; Burdock, 1998). Aparece como constituintes de “bio-cosméticos” em cremes e loções para a face. Ainda que os europeus utilizem mais produtos contendo própolis do que os americanos, a própolis é vendida na América em lojas de alimentos saudáveis em cápsulas (aproximadamente 50 mg/cápsula) e é utilizada em pasta de dente e fio dental (Burdock, 1998). Além disso, a própolis também é encontrada em chocolates (Ackermann, 1991).

Soluções de própolis (5 – 10%) foram utilizadas no tratamento de otite externa, otite crônica e perfurações do tímpano, com resultados positivos. A própolis também é utilizada em otorrinolaringologia para tratar inflamações agudas de ouvido, bronquite crônica, rinofaringolaringite, faringolaringite e rinite (Marcucci, 1995).

Extratos aquosos de própolis (0,5 – 1%) foram administrados em seres humanos sob a forma de aerossóis para o tratamento de doenças respiratórias agudas e crônicas e como colírios. Uma solução alcoólica a 10% foi utilizada para desinfecção das mãos em cirurgias dentárias (Grande e Davey, 1990).

A própolis tem sido utilizada para o tratamento de lesões inflamatórias e distróficas do aparelho genital feminino causado por protozoários e fungos com bons resultados (Marcucci, 1995).

Tem sido relatado um grande número de derivados de própolis que inibem a replicação viral (tanto *in vitro* quanto *in vivo*) e aumentam a resistência contra infecções. Em virtude disso, frações solúveis em água e formas naturais da própolis para serem aplicadas tanto por via oral quanto parenteral foram desenvolvidas e por apresentarem uma boa absorção, se acredita que tenham uma eficiência aumentada (Dimov *et al.*, 1991). A própolis é também usada em aplicações externas para tratamento de infecções herpéticas cutâneo-mucosas (Amoros *et al.*, 1994).

### 3.2.10 Legislação

Os produtos apícolas, dentre eles a própolis, são comercializados em todo o País e no exterior, segundo as suas propriedades nutricionais e medicinais; todos eles, entretanto estão submetidos ao registro como alimentos ou suplementos alimentares, o que obviamente não corresponde à plena verdade de suas funções (Paulino, 2004).

Esta dupla interpretação de dados e prática comercial permite ao mercado propagar a falsa idéia de que todas as propriedades descritas na medicina popular podem ser aplicadas aos produtos apícolas, comprometendo assim o princípio básico da prescrição médica, baseado em evidências científicas. Obviamente as pessoas que procuram as propriedades terapêuticas da própolis, por exemplo, não esperam um efeito como suplemento nutricional, e sim como medicamento de origem natural (Paulino, 2004).



Deste modo, a comissão técnicocientífica de assessoramento em alimentos funcionais e novos alimentos, instituída pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) determinou em 20 de julho de 2004 que a própolis assim como associações destes com nutrientes ou não, não podem ser considerada alimento (ANVISA, 2004).

As exportações brasileiras no setor apícola a partir da década de 90 têm se tornado cada vez mais importantes, sobretudo depois que o mercado asiático, especialmente o japonês, descobriu as qualidades da própolis brasileira. O Brasil é hoje um dos principais fornecedores mundiais dessa resina medicinal e com a crescente exigência de certificados de análise de qualidade dos produtos a serem exportados, está obrigando os apicultores brasileiros a apostarem na qualificação da sua produção para continuarem competitivos neste concorrido mercado mundial (Paulino, 2004).

As exigências internacionais como *European Community Regulation CEE 2092/91* e *Japanese Agricultural Standards - JAS* para a qualidade dos produtos apícolas obrigaram o Brasil a estabelecer normas para definir padrões mínimos de comercialização dos produtos originários da colméia (Paulino, 2004). Para regulamentar o produto apícola foi criada a instrução normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001 que no anexo VI regulamenta os padrões para fixação de identidade e qualidade de própolis e no anexo VII regulamenta a identidade e qualidade de extratos de própolis, proveniente da extração dos componentes solúveis em álcool neutro (Brasil, 2001).

O anexo VI determina que a própolis será classificada quanto ao teor de flavonóides em: baixo quando o teor for até 1,0% (m/m); médio quando o teor for maior que 1,0 e até 2,0% (m/m) e alto quando o teor for maior que 2,0% (m/m). Além disso, dispõe sobre requisitos de identidade como aroma, cor, sabor, consistência, físico-químicos como teor máximo de cera (25% m/m), teor mínimo de compostos fenólico (5% m/m), teor mínimo de flavonóides (0,5% m/m), provas qualitativas como picos característicos de flavonóides entre 200 e 400 nm no espectro de absorção de radiações ultravioleta e visível, não autorização de uso de aditivos, critérios macroscópicos e microscópicos, dentre outros (Brasil, 2001).

Quanto aos requisitos para se estabelecer a identidade e qualidade de extratos de própolis o anexo VII determina características sensoriais como aroma,

cor, sabor, aspecto, físico-químicas como teor mínimo de extrato seco (11% m/v), teor máximo de cera do extrato seco (1% m/m), teor mínimo de flavonóides (0,25% m/m) teor mínimo de compostos fenólicos (0,50% m/m), provas qualitativas como picos característicos de flavonóides entre 200 e 400 nm no espectro de absorção de radiações ultravioleta e visível, não autorização de uso de aditivos, critérios macroscópicos e microscópicos, rotulagem, dentre outros (Brasil, 2001).

Esta legislação, recentemente criada, regula parâmetros químicos e físico-químicos mínimos para as amostras de produtos aptos a comercialização. Todavia para os produtos que possuem preponderantemente atividade terapêutica, estes parâmetros de qualidade, ainda que subjetivos, deveriam ser complementados com uma avaliação farmacológica para o monitoramento de suas atividades terapêuticas (Paulino, 2004).

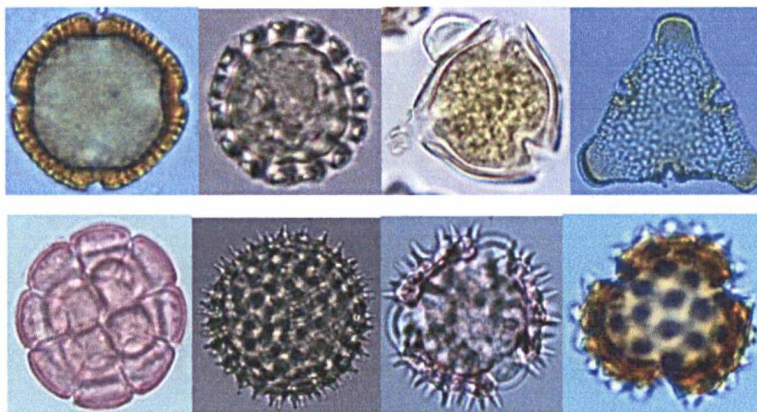
Tais procedimentos, certamente, agregariam valor ao produto apícola brasileiro e o levaria a alta competitividade internacional. Países como a China, a Austrália, e mais recentemente o nosso país vizinho Argentina, estão instalando suas redes nacionais de laboratórios para o controle de qualidade químico e biológico das suas amostras apícolas, garantindo o seu espaço no mercado mundial e assegurando a longevidade de sua inserção no comércio exterior (Paulino, 2004).

É, portanto urgente, que o Brasil, que detêm uma grande fatia desse mercado mundial, possa neste momento de transição para um novo milênio, onde a qualidade dos produtos será o grande diferencial competitivo, ter também instalada em nível nacional uma cadeia de laboratórios de referência para o estabelecimento dos padrões internacionais mínimos exigidos para a comercialização, e que possa estabelecer e disciplinar a comercialização dos nossos produtos dentro e fora do país (Paulino, 2004).

### 3.3 Pólen

O pólen, um pequeno grânulo de dimensões microscópicas (FIGURA 13), em média 50  $\mu\text{m}$ , é o elemento reprodutivo masculino das plantas mais evoluídas do sistema biológico vegetal (Apicultura, 2004).

FIGURA 13 – PÓLENS DE DIFERENTES ORIGENS BOTÂNICAS



FONTE: Apicultura, 2004.

Geralmente pode-se observar que as abelhas colhem o pólen das flores pela manhã e/ou quando estão úmidas, facilitando assim a colheita (Breyer, 1980). As abelhas transportam-no para a colméia, onde é depositado nos alvéolos dos favos, sendo comprimido pela cabeça das abelhas operárias, para obter uma massa compacta. Essa massa sofre transformações, não só pelo alto índice de umidade e temperatura interna da colméia, que gira em torno de 35°C, mas também pela ação de secreções salivares das abelhas, ricas em enzimas, e misturadas com néctar. Ao término destas transformações esta massa é denominada "pão das abelhas" (Apicultura, 2004). As abelhas colhem o pólen como alimento principal, utilizando-o como fonte de proteínas, tanto para elas como para a alimentação da procria das larvas, e ainda para reforçar as funções glandulares que produzem a geléia real, a cera, os fermentos e as enzimas (Breyer, 1980).

O pólen é mobilizado por via anemófila (vento) justaposta a outra entomófila (insetos) sendo que do ponto de vista quantitativo a segunda sempre prevalece dada a intenção e intensidade da operação de visita da abelha a determinados espécies botânicas (d'Albore, 1979). De outro lado, quando as abelhas coletam o néctar das flores, involuntariamente coletam também o pólen, sendo este regurgitado com o néctar nos alvéolos melíferos (Barth, 1989). Desta maneira o pólen aparecerá no mel, constituindo importante indicador para a sua origem botânica e geográfica (Iwama, Melhem, 1979; Barth, 1989). Geralmente a determinação das famílias vegetais a partir do pólen encontrado no mel não constitui grande obstáculo; já quanto aos gêneros, às vezes não são distinguíveis pela morfologia polínica e na

maioria dos casos não se pode determinar as espécies (Iwama, Melhem, 1979; Barth, 1989). D' Albore (1979) tentou estabelecer o país de origem da própolis comercializada a partir da análise palinológica de diversas amostras de própolis, mas obteve apenas a relação de prováveis fontes botânicas para as amostras de acordo com a origem geográfica.

Os polens de diferentes espécies vegetais têm diferentes valores nutritivos para as abelhas *Apis mellifera* (Silva e Serrão, 2000). O pólen varia muito e não se pode falar numa composição padrão do mesmo. Em análise química, em cada 100g, o pólen apresenta em média os seguintes elementos (Apicultura, 2004):

- a) Proteínas - 15,0 a 30,0%;
- b) Aminoácidos livres - 10,0 a 13,0%;
- c) Lipídeos - 1,0 a 5,0%;
- d) Carboidrato - 20,0 a 40,0%;
- e) Açúcares redutores - 24,0 a 26,0%;
- f) Açúcares não redutores - 2,0 a 4,0%;
- g) Fibras - 3,0 a 5,0%;
- h) pH - 4,7 a 5,2 e
- i) Sais minerais - 2,5 a 3,5%.

O pólen possui as vitaminas: tiamina, riboflavina, nicotinamida, ácido pantotênico, piridoxina, meso-inositol, biotina, ácido fólico, cianocobalamina, ácido ascórbico, vitamina D, tocoferol e caroteno, os aminoácidos: ácido aspártico, ácido glutâmico, alanina, arginina, cistina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptofano, tirosina e valina e os sais minerais: cálcio, cloro, magnésio, fósforo, silício, enxofre, ferro e potássio (Apicultura, 2004).

### 3.4 Composição dos brotos de *Populus sp.* (álamo)

Segundo Cronquist (1981) e Engler (1998) o gênero *Populus sp.* (poplar) pertence à família Salicaceae. Gênero amplamente distribuído no hemisfério Norte e ocorre na América, Europa, Ásia e norte da África, ocorrendo raramente no sul do Brasil.

Já foram identificados mais de 150 compostos em amostras de própolis coletadas de diversas regiões, principalmente polifenóis, que também foram identificados nos brotos de álamo. Os principais polifenóis são os flavonóides agliconas, acompanhado dos ácidos fenólicos e seus ésteres, aldeídos fenólicos, álcoois, cetonas, etc. (Bankova, Popov e Marekov, 1989).

English, Greenaway e Whatley (1992) relataram a presença de 78 compostos inclusive 58 compostos fenólicos no exsudato dos brotos de *Populus deltoides*, *P. fremontii*, *P. sargentii* e *P. wislizenii*. As quatro espécies possuem exsudatos de brotos com composição muito similares, diferindo principalmente na concentração dos vários compostos. Os componentes mais abundantes encontrados foram a pinocembrina e sua chalcona, pinobanksina e sua forma 3-metil éster, pinobanksina-3-acetato e galangina (English, Greenaway e Whatley, 1992). Outros componentes encontrados em brotos de *Populus deltoides* descritos pelos mesmos autores são ácido ferúlico, ácido isoferúlico, ácido cafeico, 3-metil-2-butenil-ferulato, 3-metil-3-butenil-cafeato, cafeato de prenil, crisina, isokauretina, cafeato de fenetil, pinobanksina-3-propanoato, pinobanksina-3-butonato, pinobanksina-3-acetato, 5,7-dihidroxi-3-metoxiflavanona, pinostrombina, cafeato de cinamil entre outros.

Bankova, Popov e Marekov (1989) isolaram tanto de brotos de poplar quanto de amostra de própolis, hidroximetoxicinamatos, como *O*-metilcafeato do álcool 3,3-dimetilalil, do álcool isopentenil e do álcool benzílico, assim como traços de  $\beta$ -feniletil e cinamil-*O*-metilcafeato. Identificaram também o ácido ferúlico, ácido isoferúlico, ferulato de 3,3-dimetilalil e ferulato de isopent-3-enil. Estudos anteriores indicaram a presença também de pentenil ésteres do ácido cafeico e ferúlico/isoferúlico nos brotos de poplar (Bankova, Popov e Marekov, 1989).

Outros compostos encontrados nos brotos de *Populus* sp. por Greenaway *et al.* (1991) são ácido málico, ácido threônico, álcool cumarílico, ácido cítrico, benzil-2-metoxibenzoato, 4-hidroxibenzilbenzoato, cinamil cinamato, salicina, 2',6'-dihidroxi-4'-4-dimetoxidihidrochalcona, 2',4',6'-trihidroxi-4-metoxidihidrochalcona, 2',6',4'-trihidroxi-4'-metoxidihidrochalcona, geranil *trans*-cafeato, pinobanksina e seus ésteres, dihidrochalconas e sesquiterpenos. Além disso, foi descrito por Greenaway *et al.* (1990) que *Populus deltoides* contém galangina, pinocembrina, pinobanksina juntamente com compostos relacionados como compostos principais, como citado por Hegazi, El Hady, Abd Allah (2000).

### 3.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação em cadeia da polimerase (PCR), desenvolvida por Kary Mullis em 1983 (Lehninger, 2000), permite que o DNA de uma região selecionada do genoma seja amplificado um bilhão de vezes em questão de horas, desde que pelo menos parte de sua seqüência nucleotídica já seja conhecida (Alberts, 1997). O método de PCR é sensível o bastante para detectar e amplificar poucas moléculas de DNA em quase todo tipo de amostra (Lehninger, 2000), como por exemplo, em pequenas quantidades de DNA no tecido ou em DNA altamente degradado (Peterson, Johansen, Seberg, 1996). O método explora as características da duplicação do DNA e consiste em desnaturar o DNA genômico, submetendo-o a uma alta temperatura e, deste modo, permitindo que as duas fitas simples originadas sejam duplicadas (Alberts, 1997).

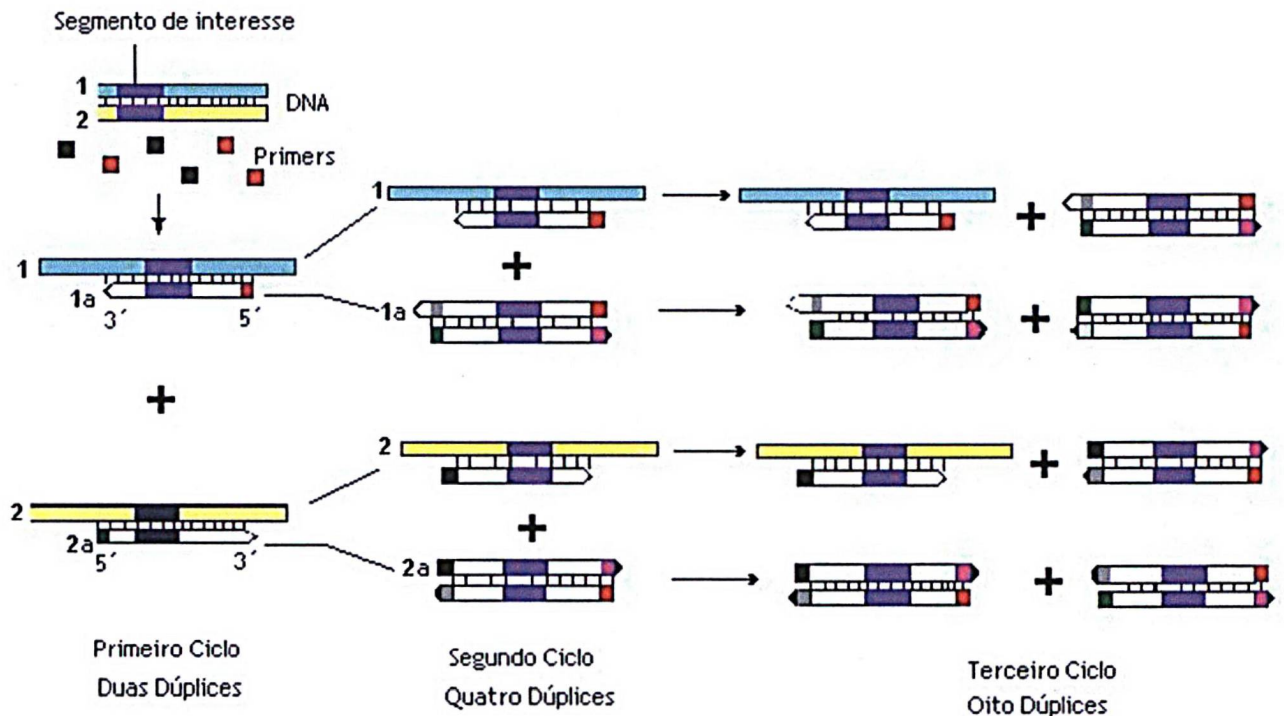
Para isto, primeiro a parte conhecida da seqüência é utilizada para projetar dois oligonucleotídeos de DNA sintéticos, cada um complementar a uma das fitas da dupla-hélice de DNA e então posicionado em lados opostos da região a ser amplificada. Esses oligonucleotídeos servem como iniciadores para a síntese de DNA *in vitro*, que é catalisada por uma DNA-polimerase, e compõem, então, as extremidades do fragmento de DNA que está sendo obtido (Alberts, 1997).

O DNA isolado, contendo o segmento a ser amplificado, é brevemente aquecido (90 – 95 °C) para desnaturar e, em seguida, esfriado (em torno de 55 °C) na presença de um grande excesso de oligonucleotídeos sintéticos iniciadores (*primers*). Os desoxinucleosídeos trifosfatos de adenina, timina, citosina e guanina são, a seguir, adicionados, e o segmento de DNA alvo é seletivamente replicado (Lehninger, 2000). Quando o ciclo de aquecimento, esfriamento e replicação é repetido, os novos fragmentos sintetizados, por sua vez, servem como moldes e, depois de poucos ciclos, o produto predominante é um fragmento de DNA de uma única espécie, cuja extensão corresponde à distância entre os dois iniciadores originais. Na prática, de 20 a 30 ciclos de reação são necessários para a efetiva amplificação do DNA (FIGURA 14). Cada ciclo dobra a quantidade de DNA sintetizada no ciclo anterior. O sucesso da técnica depende do uso de uma DNA-polimerase especial (*Taq I* polimerase) isolada de uma bactéria termofílica, *Thermus aquaticus*, encontrada em fontes termais do parque florestal de Yellowstone-USA,



que é estável a temperaturas muito mais altas do que o normal (temperatura ótima 75 °C), não sendo por isso desnaturada pelo aquecimento repetido (Alberts, 1997). A enzima permanece ativa após cada passo de aquecimento e não necessita ser reposta.

FIGURA 14 – REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)



FONTE: Reação, 2004.

### 3.6 Marcadores moleculares em plantas

A utilização de seqüência de DNA como fonte básica de variação tem sido muito utilizada na resolução de questões taxonômicas e filogenéticas. Por permitirem visualizar a variabilidade diretamente ao nível de DNA, sem que haja expressão gênica (que resulta do produto de interações intra e interalélicas influenciadas pelo ambiente), as técnicas que revelam os marcadores moleculares são ferramentas que tem despertado o interesse na comunidade científica (Demesure, 1995; Petit, 1996).

Conforme o nível taxonômico em questão, várias seqüências de genes específicos tem sido comumente utilizadas de acordo com o grau de conservadorismo da seqüência. Para isto a informação genética presente na

mitocôndria (mtDNA) e no cloroplasto (cpDNA) das plantas é de grande interesse, principalmente pelo modo não-mendeliano de herdar esses genomas. O cpDNA é circular e têm se mostrado altamente conservado na estrutura e tamanho. Isto levou ao desenvolvimento de pares de iniciadores universais (*primers*) que amplificam regiões não codificadoras que separam duas seqüências codificadoras na maioria das plantas. Tais seqüências não codificadoras podem ser avaliadas com o objetivo de detectar polimorfismos intra e interespecíficos em plantas. O genoma de mtDNA de plantas varia enormemente em tamanho e arranjo genômico, mas a taxa de substituição de nucleotídeos do mtDNA é muito menor do que do cpDNA. Iniciadores para o mtDNA de plantas que amplificam regiões não codificadoras são mais difíceis de planejar, pois estes genes geralmente não são muito conservados. De qualquer forma, existem *introns* que podem ser amplificados assim como poucos segmentos de regiões intergênicas que permaneceram conservadas durante a evolução (Demesure, 1995; Petit, 1996).

Estudos comparativos de seqüências do gene do RNA ribossomal também permitem avaliar as relações filogenéticas de vários níveis taxonômicos e descrever a estrutura genética de populações (King e Schall, 1989). O gene para a biossíntese do ribossomo (rDNA) codifica diretamente o RNA ribossomal e está presente no genoma de plantas em número maior do que 1000 cópias (Jorgensen e Cluster, 1988). O gene é transcrito como um único precursor, consistindo de 3 regiões codificantes - 18S, 5.8S, 25S - separadas por duas regiões transcritas (ITS1 e ITS2), que são descartadas durante o processamento. Cada unidade básica do gene é separada por uma região não transcrita, denominada seqüência espaçadora intergênica (IGS), considerada hipervariável (Jorgensen e Cluster, 1988). As regiões que codificam para rDNA (18S, 5.8S e 25S) geralmente não são úteis para a detecção de polimorfismos a nível intraespecífico porque evoluem muito lentamente na seqüência e quase nada em comprimento, sendo portanto, particularmente úteis para análises a nível de família e classes taxonômicas mais elevadas. Porém, as regiões ITS (ITS-1 e ITS-2) apresentam um nível intermediário de variação, o que as torna mais apropriadas para o uso ao nível de gênero e/ou de espécie (Ko *et al.*, 1993). Os dois espaçadores (ITS1 e ITS2) possuem cada um menos de 300 pares de base (ITS1 entre 187 e 298 pb; e ITS2 entre 187 e 252pb), são amplificados e seqüenciados usando primers universais.



## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Estão apresentados neste capítulo os principais materiais e equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho, bem como as metodologias experimentais empregadas.

### 4.1 MATERIAL

#### 4.1.1 Amostras de própolis

As amostras de própolis utilizadas foram coletadas de colméias de quatro espécies de abelhas, *Apis mellifera* (abelha africanizada) da subfamília Apinae, *Plebeia remota* (mirim guaçu), *Scaptotrigona bipunctata* (tubuna), *Tetragonisca angustula* (jataí) (abelhas indígenas sem ferrão) da subfamília Meliponinae e de diversas zonas geográficas distintas no Brasil conforme descrito na TABELA 03.

Todas as amostras foram coletadas de colméias próximas a floras nativas heterogêneas das respectivas regiões com exceção da amostra PP4 que foi coletada de colméias próximas a uma flora homogênea, zona de reflorestamento da empresa Swedish Match do Brasil, composta por uma espécie exótica, o álamo (*Populus* sp.) (FIGURA 15-A).

As amostras foram armazenadas em frascos de vidro protegidos da luz, em congelador a  $-18^{\circ}\text{C}$ .

TABELA 03 - RELAÇÃO DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS COLETADAS DE DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL POR DIFERENTES POPULAÇÕES DE ABELHAS E SUAS RESPECTIVAS DENOMINAÇÕES

PRÓPOLIS	REGIÃO DE COLETA	ABELHA
PS	Palmas – Pr	<i>Apis mellifera</i>
LS	Tagaçaba – Pr	<i>Apis mellifera</i>
PP4	União da Vitória – Pr	<i>Apis mellifera</i>
PP2	União da Vitória – Pr	<i>Apis mellifera</i>
LP	Porto União – SC	<i>Apis mellifera</i>
SG	Porto União – SC	<i>Apis mellifera</i>
CM	Porto União – SC	<i>Apis mellifera</i>
PPA	Canoinhas – SC	<i>Apis mellifera</i>
BC	Campos Novos - SC	<i>Apis mellifera</i>
FOP-A	Amparo – SP	<i>Apis mellifera</i>
FOP-B	Barra da Garça – MS	<i>Apis mellifera</i>
FOP-M	Monte Sião – MG	<i>Apis mellifera</i>
C-RJ	Cantagalo – RJ	<i>Apis mellifera</i>
CF-MG	Coronel Fabriciano – MG	<i>Apis mellifera</i>
Ta1	Curitiba – Pr	<i>Tetragonisca angustula</i>
Ta2	Curitiba – Pr	<i>Tetragonisca angustula</i>
Pr	Curitiba – Pr	<i>Plebeia remota</i>
Sb	Curitiba – Pr	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>

NOTA: A amostra PS foi coletada pela Propriedade Fazenda Ibiatã por Edgar P. Wandscheer e Pedro J. Fasolo; as amostras PP4, PP2, LP, SG, CM e PPA pela empresa Breyer Ltda. Co.; as amostras FOP-A, FOP-B e FOP-M pela Faculdade de Odontologia de Piracicaba; as amostras C-RJ, CF-MG pelo professor Evandro e as amostras Ta1, Ta2, Pr e Sb pela APA – Associação Paranaense de Apicultores através do presidente Sebastião Ramos Gonzaga.

FIGURA 15 - ZONA DE REFLORESTAMENTO DA EMPRESA SWEDISH MATCH DO BRASIL SITUADA EM UNIÃO DA VITÓRIA - PR



#### 4.1.2 Coleta de material botânico relacionado às colméias

O material botânico incluindo galhos, botões vegetativo (folha), reprodutivo (flor) e pólen (FIGURAS 16A-16B) foi coletado de espécies de álamo (*Populus sp.*) na zona de reflorestamento da empresa Swedish Match do Brasil, região de União da Vitória, Paraná. A coleta foi realizada com a ajuda de um podão e uma plataforma de 8 metros de altura acoplada a um trator, utilizada em reflorestamentos, para que se pudesse atingir a copa das árvores de aproximadamente 20 metros de altura (FIGURA 15-B). O material foi transportado em gelo até o laboratório para posterior processamento. Galhos de álamo contendo brotos reprodutivos e vegetativos foram colocados em um recipiente contendo água destilada para a floração e germinação dos mesmos (FIGURA 16A) sendo a água renovada diariamente. O pólen produzido foi coletado diariamente durante 15 dias (FIGURA 17), armazenado em microtubos de volume 1,5 mL com tampa e conservados no freezer. As folhas dos brotos vegetativos que germinaram também foram coletadas e congeladas (FIGURA 16C). Os brotos vegetativos e reprodutivos não germinados foram separados dos galhos, liofilizados e depois congelados. Os galhos e as flores germinadas também foram congelados.

FIGURA 16 - MATERIAL BOTÂNICO DE *Populus sp.* A) FLORAÇÃO E GERMINAÇÃO DOS BROTOS; B) GALHO, BOTÕES VEGETATIVOS E REPRODUTIVOS; C) GERMINAÇÃO DOS BOTÕES VEGETATIVOS



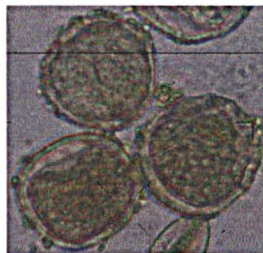
A

B

C



FIGURA 17 - PÓLEN DE ÁLAMO VISUALIZADO AO MICROSCÓPIO ÓTICO (100X)



#### 4.1.3 Microrganismos

As cepas de bactérias utilizadas foram as cepas *Staphylococcus aureus* metilina resistente (MRSa) da rotina do HC-UFPR e cepa padrão de referência *American Type Culture Collection* (ATCC) 25923 (FIGURA 18), ambas cedidas pelo LACEN – Laboratório Central do Estado e a cepa *Streptococcus pyogenes* de referência ATCC 19615 cedida pela Pontifícia Universidade Católica – PUC-PR.

FIGURA 18 - CULTURA DAS CEPAS DE *Staphylococcus aureus* PADRÃO E *Staphylococcus aureus* METICILINA RESISTENTE (MRSa) EM TUBOS CONTENDO COMO MEIO DE CULTIVO CALDO NUTRITIVO



#### 4.1.4 Meios de cultura

##### 4.1.4.1 Meio para manutenção das cepas

A manutenção das cepas *Staphylococcus aureus* e MRSa se fez em meio nutritivo universal da marca Micromed, pH = 7,0 a 25°C, com a seguinte composição:

Extrato de carne	0,3 g
Peptona de carne	0,5 g
Água destilada q.s.p.	100 mL

Para a manutenção da cepa *Streptococcus pyogenes* foi utilizado o meio BHI (*Brain Heart Infusion*), pH = 7,4 a 25 °C, com a seguinte composição:

Infusão de cérebro e coração	17,5 g
Triptose	10,0 g
Glucose	2,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Fosfato dissódico	2,5 g
Água destilada q.s.p.	100 mL

Para tornar os meios sólidos foram acrescentados 2,0 g de ágar bacteriológico em cada 100 mL de meio. A esterilização foi realizada em autoclave a 121 °C e a 1 atm de pressão durante 20 minutos.

#### 4.1.4.2 Meios para o antibiograma de difusão em disco

O meio utilizado para o antibiograma de difusão em disco foi o meio Mueller – Hinton com a seguinte composição (NCCLS, 2003):

Infusão de carne (Micromed)	19,74 g
Hidrolisado ácido de caseína (Nutritional Biochemicals Corporation NBCo)	1,15 g
Amido solúvel (Prolabo)	98,7 mg
Agar bacteriológico (Difco)	15 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

Para a cepa *Streptococcus pyogenes* o meio foi suplementado com 5% de sangue de carneiro desfibrinado (NCCLS, 2003) obtido comercialmente da empresa Newprov.

#### 4.1.4.3 Meio para a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)

Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) o meio utilizado foi o Mueller-Hinton líquido (sem a adição do ágar) e para a concentração bactericida mínima (CBM) o meio Mueller-Hinton sólido.

#### 4.1.4.4 Meio para germinação dos grãos de pólen

Para se realizar a pré-germinação dos grãos de polens foi utilizado o seguinte meio de cultura:

Solução A (3,7 g de cloreto de cálcio em 100 mL de água destilada)	1 mL
Solução B (1,0 g de ácido bórico em 100 mL de água destilada)	1 mL
Solução C (30 g de sacarose em 100 mL de água destilada)	50 mL
Água destilada	50 mL

#### 4.1.5 Antibióticos

Os antibióticos utilizados neste trabalho foram vancomicina (30  $\mu\text{g}$ ), clindamicina (2  $\mu\text{g}$ ), gentamicina (10  $\mu\text{g}$ ) obtidos comercialmente da empresa Newprov e eritromicina (15  $\mu\text{g}$ ) cedido pela empresa Laborclin.

#### 4.1.6 Padrões

Os padrões de flavonóides utilizados foram galangina obtidos da empresa Carl Roth (Alemanha), pinocembrina e pinocembrina-7-metil-eter obtidos da empresa Extrasynthese (França), crisina, naringina, canferol, quercetina e rutina obtidos da empresa Sigma Aldrich (EUA). Os ácidos fenolcarboxílicos utilizados foram ácido clorogênico, ácido gálico, ácido cafeico, ácido vanílico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico obtidos da empresa Sigma Aldrich. Outros padrões utilizados para a determinação da atividade antioxidante,  $\alpha,\alpha$ -difenil- $\beta$ -picrilhidrazila (DPPH\*) e ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromana-2-carboxílico (Trolox C<sup>®</sup>) também foram adquiridos da empresa Sigma Aldrich.

#### 4.1.7 Reagentes para reação em cadeia da polimerase (PCR)

Os nucleotídeos dATP, dTTP, dGTP e dCTP, a *Taq* polimerase incluindo o tampão da enzima e o  $\text{MgCl}_2$ , os iniciadores Nad1, Nad4, *tmM*, *rpS14*, ITS, assim

como os marcadores de peso molecular lambda e 1 Kb plus foram obtidos da empresa Invitrogen<sup>®</sup>. O óleo mineral foi obtido da empresa Sigma Chemical Co.

#### 4.1.8 Outros materiais

Todos os solventes e reagentes utilizados possuíam grau analíticos.

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Obtenção dos extratos de própolis

Foram realizadas três diferentes extrações das amostras de própolis, descritas a seguir:

#### 4.2.1.1 Procedimento de extração utilizando gradiente água-etanol

Para verificar a melhor proporção água-etanol como solvente de extração, 1 g da massa bruta das amostras PP2 e PP4 foi extraída com 4 mL dos seguintes solventes: água, etanol 25%, 50%, 75% (v/v) ou etanol absoluto. Uma única extração após aquecimento por 3 minutos foi realizada em banho-maria até o limite de ebulição. Os extratos foram deixados em repouso por 1 hora e centrifugados a 4000 rpm por 15 minutos para a obtenção dos extratos utilizados nas determinações específicas.

#### 4.2.1.2 Procedimento de extração utilizando hexano e etanol

Para verificar a melhor atividade antimicrobiana entre as amostra de própolis de *Apis mellifera* foram realizados os ensaios de antibiograma por difusão em disco, concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima dos extratos obtidos com hexano, etanol e etanol 50% (v/v). Alíquota de 1 g de própolis foi extraída com 3 mL de cada solvente e colocado em banho de areia (Termoblock) a 65 °C por 2 minutos. As amostras foram então centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante separado. Foi realizada no resíduo uma segunda

extração, sob as mesmas condições, utilizando 2 mL dos respectivos solventes. O sobrenadante foi separado após centrifugação a 2000 rpm por 5 minutos e os extratos reunidos para a obtenção do extrato bruto total, que foi utilizado para as devidas determinações.

#### 4.2.1.3 Procedimento de extração (24 horas) e reextração (48 horas) utilizando água ou etanol com ou sem aquecimento por agitação mecânica

Para a padronização da metodologia de extração e demais ensaios biológicos, foram realizadas extrações de oito amostras de própolis utilizando 8 mL de etanol absoluto ou água destilada para cada 2g de própolis. A incubação foi realizada de duas maneiras: (1) em agitador Polystat Model 1201-00 circulator da marca ColeParmer, a temperatura ambiente (21 °C) com agitação recíproca de 170 ciclos por minuto e (2) em incubadora rotatória com banho-maria, Gyrotory® Water Bath Shaker Model G76 da marca New Brunswick Scientific Co. Inc., a 45°C com agitação orbital de 200 rpm. As amostras foram incubadas por 24 horas e o sobrenadante separado por centrifugação a 2000 rpm por 5 minutos. No resíduo foi realizada uma segunda extração, sob as mesmas condições, por mais 24 horas, perfazendo 48 horas de extração total. O sobrenadante foi separado nas mesmas condições. Os extratos de 24 horas (primeira extração) e 48 horas (reextração) foram utilizados separadamente para as devidas determinações. O rendimento dos extratos foi determinado por gravimetria e expressos como porcentagem de sólidos solúveis totais presentes por grama de amostra inicial de própolis.

#### 4.2.2 Obtenção dos extratos do material botânico

Para a obtenção dos extratos do material botânico coletado na zona de reflorestamento da Swedish Match (brotos, galhos, folhas) foi feita uma extração de 2 g de material com 8 mL de etanol absoluto durante 3 minutos em banho-maria à 100°C. Os extratos foram fracionados em uma coluna cromatográfica *flash* de ácido silícico ativado (*mesh* 100-200) usando como fase móvel um gradiente de polaridade progressiva de hexano:acetato de etila (de 99:1 a 1:99), lavando, ao final, a coluna com metanol. As amostras de própolis, PP4 e PP2, correlacionadas a esta flora



também foram processadas da mesma maneira, objetivando verificar a fonte botânica utilizada pela abelha para coleta do material resinoso.

#### 4.2.3 Análise espectrofotométrica dos extratos de própolis

Para análise do perfil de varredura espectrofotométrica os extratos etanólicos e aquosos de própolis foram diluídos adequados à polaridade dos respectivos solventes nas concentrações de 0,02 a 0,2 mg/mL. As análises foram realizadas no espectrofotômetro UV/visível (UV-1650 PC, da Shimadzu) na faixa de comprimento de onda de 200 nm a 500 nm.

#### 4.2.4 Determinação de fenólicos totais

O conteúdo de polifenóis nos extratos de própolis foi determinado pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Kumazawa, 2004; Stingleton, 1999). O método baseia-se no princípio da reação de redução da mistura dos ácidos fosfotúngstico e fosfomolibdico em meio alcalino a óxidos de tungstênio e molibdênio causada pelos compostos fenólicos, formando um complexo de coloração azul, cuja absorção máxima está centrada em 760 nm.

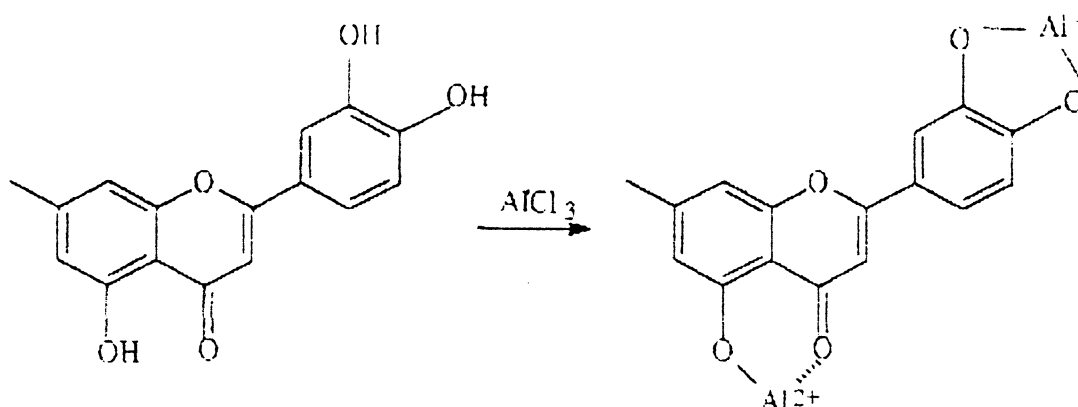
Para isto, 0,5 mL dos extratos etanólicos e aquosos das amostras (concentrações de 0,04 a 10 mg/mL) foram misturadas com 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu e 0,5 mL de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) a 10%. As amostras foram mantidas à temperatura ambiente por 1 hora para a leitura espectrofotométrica. Para elaboração da curva de concentração padrão foi utilizado o ácido gálico nas concentrações de 2,5 a 12,5  $\mu\text{g/mL}$  dissolvido em água destilada e os valores de fenólicos totais foram expressos como equivalentes de ácido gálico (mg de ácido gálico em 100 mg de sólidos totais).

#### 4.2.5 Determinação de flavonóides totais

A concentração de flavonóides totais foi determinada através do método descrito por Jurd e Geissman (1956). A metodologia baseia-se na formação de complexos estáveis entre o cátion alumínio com os flavonóides em meio metanólico

(FIGURA 19). A formação do complexo promove um desvio para maiores comprimentos de onda (efeito batocrômico) e uma intensificação da absorção na análise espectrofotométrica. Dessa maneira, é possível determinar a quantidade de flavonóides, evitando-se a interferência de outras substâncias fenólicas, principalmente os ácidos fenólicos, que invariavelmente acompanham os flavonóides nos tecidos vegetais. A leitura é feita em espectrofotômetro a 415 nm, utilizando-se cloreto de alumínio a 2% em metanol (Marcucci, 1998).

FIGURA 19 - FORMAÇÃO DO COMPLEXO FLAVONÓIDE-ALUMÍNIO, EM SOLUÇÃO METANÓLICA DE CLORETO DE ALUMÍNIO



FONTE: Marcucci, 1998.

Para quantificar o teor de flavonóides totais nas amostras, foram adicionados volumes de 15 a 1000  $\mu\text{L}$  dos extratos etanólicos e aquosos (concentrações de 5 a 100 mg/mL) a uma solução de 0,1 mL de nitrato de alumínio 10 % e 0,1 mL de acetato de potássio 1 mol/litro. O volume final foi completado para 5 mL com etanol a 80 %. As amostras foram homogeneizadas e após 40 minutos, em temperatura ambiente, a absorvância foi determinada espectrofotometricamente. Para elaboração da curva de concentração padrão foi utilizada a quercetina nas concentrações de 5 a 50  $\mu\text{g/mL}$  dissolvida em etanol e os valores de flavonóides totais foram expressos como equivalentes de quercetina (mg de quercetina em 100 mg de sólidos totais).

## 4.2.6 Atividade antimicrobiana

### 4.2.6.1 Preparo do inóculo inicial

O inóculo inicial foi preparado realizando-se uma suspensão de algumas colônias de bactérias das placas de pré-inoculação (colônias de 24 horas de cultivo) em solução salina estéril (0,9%) com turvação correspondente ao tubo 0,5 da escala de McFarland. Deste modo se obtêm uma concentração bacteriana final em torno de  $1,5 \times 10^8$  cel/mL (Baron, 1994).

### 4.2.6.2 Antibiograma de difusão em disco

Para se determinar a susceptibilidade antimicrobiana frente as amostras de própolis foi utilizado o método padrão recomendado pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* – NCCLS (2003), denominado difusão em disco.

Discos de papel Whatman nº 3 de 5 mm de diâmetro foram impregnados com 1500 µg (sólidos solúveis totais) de extratos etanólico, hexânico, aquoso ou hidroetanólicos de própolis, posteriormente liofilizados no aparelho Freeze Dryer 4.5 (Labconco) por duas horas para assegurar a eliminação total de qualquer solvente residual no disco de papel.

O inóculo é então espalhado, uniformemente, por todas as placas testes com o auxílio de *swab* de algodão estéril. Os discos impregnados com amostras de própolis e de antibióticos padrões são distribuídos sobre a placa com o auxílio de uma pinça estéril. As placas são incubadas a 35 °C por 24 horas e a zona de inibição de crescimento da bactéria (halo de inibição) ao redor de cada disco é determinada com o auxílio de uma régua apropriada e expressa como diâmetro em mm. Como antibióticos padrões se utilizam discos de vancomicina (30 µg), gentamicina (10 µg) e clindamicina (2 µg) para as cepas *Staphylococcus aureus* e MRSA e de eritromicina (15 µg) para a cepa *Streptococcus pyogenes*.

#### 4.2.6.3 Concentração inibitória mínima em meio líquido (CIM)

Para a determinação da concentração inibitória mínima foram utilizados os extratos etanólicos, hidroetanólicos (etanol a 50% v/v) e hexânico das amostras de própolis que tinham apresentado melhores resultados pelo método de difusão em disco. O solvente das amostras foi inicialmente removido por evaporação à vácuo em centrífuga Speed Vac e ressolubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO). Volumes crescentes de 1, 2 e 4  $\mu\text{L}$  (37,5, 75 e 150  $\mu\text{g}$  de sólidos totais) das soluções em DMSO foram diluídos em 1 mL meio Mueller-Hinton (MH) líquido. O inóculo inicial (item 4.2.6.1) foi diluído 100 vezes em meio MH líquido e 1 mL dessa suspensão distribuída nos tubos contendo as amostras a serem analisadas. Foram realizados 3 tipos de controles: (1) com 2 mL de DMSO (controle de solvente); (2) somente com o inóculo sem a adição de antibióticos (controle positivo) e (3) sem o inóculo (controle negativo) (Baron, 1994). As cepas utilizadas foram *Staphylococcus aureus* e MRSA.

Os tubos inoculados foram incubados por 24 horas em estufa a 35°C e a turvação resultante analisada visualmente conforme o método. A concentração inibitória mínima é tida como a primeira diluição da amostra que não demonstrou turvação.

#### 4.2.6.4 Concentração bactericida mínima (CBM)

Para a determinação da concentração bactericida mínima são transferidos 0,1 mL de inóculo dos tubos da CIM que não apresentaram turbidez após 24 horas de incubação, para placas de MH sólidas. As placas são incubadas a 35 °C por 24 horas e a quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC) determinadas por contagem e multiplicado pelo fator de diluição (10 x) obtendo-se a quantidade de UFC/mL. Comparando-se esse resultado com a quantidade de UFC/mL do inóculo original obtém-se a concentração bactericida mínima (CBM).

Para se obter a quantidade de UFC/mL do inóculo original, durante a realização do CIM são transferidos 0,5 mL do inóculo do tubo controle positivo para um outro tubo contendo 0,5 mL de MH líquido. Desta mistura são transferidos 0,001 mL de inóculo e espalhados uniformemente com o auxílio de uma alça de platina em uma placa de MH sólido. A placa é incubada a 35 °C por 24 horas e a quantidade de

colônias contadas. O resultado é multiplicada pelo fator de diluição ( $\times 2 \times 1000$ ) para se obter a quantidade de UFC/mL do inóculo original.

Entre os tubos da CIM que não demonstraram turbidez, os microorganismos podem estar viáveis ou terem sido mortos pelo agente antimicrobiano. Como mesmo drogas bactericidas não eliminam totalmente uma população bacteriana, a concentração mais baixa de agente antimicrobiano que permite menos que 0,1 % das bactérias do inóculo original sobreviverem é tida como a concentração bactericida mínima (Baron, 1994).

#### 4.2.7 Atividade antioxidante

Uma variedade de métodos está correntemente sendo utilizada para se determinar a capacidade antioxidante, por exemplo, a medida da prevenção do dano oxidativo a biomoléculas como lipídeos e DNA e métodos para avaliar a degradação de radicais. Tanto ensaios *in vivo* quanto *in vitro* são utilizados e todos têm suas próprias vantagens e limitações (Berg, 1999). Porém deve-se ter em mente que não existe um método universal simples pelo qual esta atividade possa ser medida de forma precisa e quantitativa (Niki, 2002). Ensaio simples de degradação, como o TRAP (potencial reativo antioxidante total) e o TEAC (ensaio de equivalência da capacidade antioxidante do Trolox C<sup>®</sup>), têm se difundido, pois fornecem alta sensibilidade na busca por antioxidantes em potencial. Esses métodos são utilizados para se determinar a capacidade antioxidante de matrizes biológicas, como o plasma humano, assim como compostos simples, componentes de alimentos ou extratos de alimentos (Berg, 1999).

##### 4.2.7.1 Avaliação da capacidade antioxidante através da formação de um complexo fosfomolibdênio

O método de complexação pelo fosfomolibdênio para determinação da capacidade antioxidante total (CAT), descrito por Prieto (1999), é baseado na redução do molibdênio (VI) a molibdênio (V) pela amostra analisada e subsequente formação de um complexo verde entre fosfato/molibdênio(V) em pH ácido, determinado então espectrofotometricamente a 695 nm.

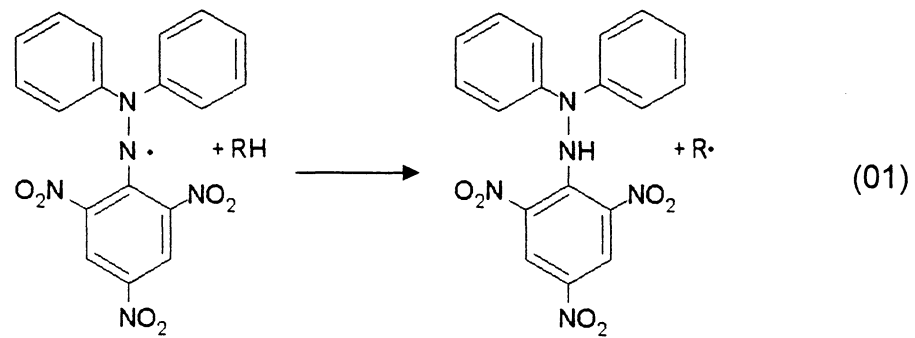
Frações de 0,1 mL das amostras em solução aquosa ou etanólica (concentrações finais de 100 µg/mL de sólidos totais) foram acrescidas de 1 mL do reagente (ácido sulfúrico a 0,6 M, fosfato de sódio a 28 mM e molibdato de amônio a 4 mM). Os tubos, hermeticamente fechados, são então aquecidas em banho-maria a 95° C por 90 min. Após as amostras terem atingido temperatura ambiente, a absorvância é determinada em espectrofotômetro contra um branco (0,1 mL do mesmo solvente utilizado para a amostra acrescido de 1 mL do reagente). Para elaboração das curvas de concentrações padrões foram utilizados o ácido ascórbico (vitamina C) e o Trolox C<sup>®</sup> (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromana-2-carboxílico) nas concentrações de 20 a 200 µM e a capacidade antioxidante total dos extratos aquosos e etanólicos são expressos em equivalentes de ácido ascórbico (mmol de ácido ascórbico por grama de própolis) ou em equivalente de Trolox C<sup>®</sup> (mmol de Trolox C<sup>®</sup> por grama de própolis) respectivamente.

#### 4.2.7.2 Método de reatividade contra o radical livre estável DPPH<sup>•</sup>

Os métodos mais comuns para se determinar a atividade antioxidante de modo prático, rápido e sensível são aqueles envolvendo um radical cromóforo que simulam as espécies reativas de oxigênio (EROs). A presença de antioxidantes leva ao desaparecimento da cor destes radicais, sendo os dois mais utilizados o ABTS<sup>•+</sup> (sal diamônico do ácido 2,2'-azonobis-3-etilbenzotiazoline-6-sulfônico) e DPPH<sup>•</sup> ( $\alpha$ - $\alpha$ -difenil- $\beta$ -picrilhidrazil) (Arnao, 2000).

Pode-se verificar pela estrutura do DPPH (equação 01), que o composto pode aceitar um elétron ou radical hidrogênio para se tornar uma molécula estável, que apenas raramente pode ser oxidada irreversivelmente (Boils, 1958). O radical livre DPPH<sup>•</sup> é um cromóforo extremamente estável que apresenta um pico de absorção no comprimento de onda de 515 nm em meio metanólico e sua solução possui uma coloração violeta intensa (Arnao, 2000; Blois, 1958).

Conforme o DPPH vai sendo reduzido por um antioxidante (equação 01), seu elétron se torna emparelhado e a absorvidade desaparece (Brand-Williams, 1995).



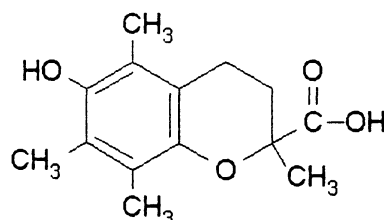
A cinética da reação de degradação do radical DPPH<sup>•</sup> foi avaliada pela metodologia descrita por Moreno *et al.* (2000) com algumas modificações. As amostras do Trolox C<sup>®</sup> e de DPPH<sup>•</sup> em solução etanólica foram conservadas em refrigerador sob atmosfera de nitrogênio. Uma solução de 0,1 mL de DPPH<sup>•</sup> 1mM foi adicionada à extratos etanólicos das própolis nas concentrações finais de 100 e 5000 µg/mL e o volume completado para 1 mL com etanol absoluto. A diminuição da absorvância do radical livre foi determinada durante 1 hora (intervalos de 2,5 segundos entre cada leitura) em espectrofotômetro no comprimento de onda de 515 nm. Como a maioria dos extratos etanólicos de própolis possuem uma coloração leve, todas as leituras foram subtraídas de seus respectivos brancos. Além disso, alguns extratos de própolis promoviam a descoloração do radical instantaneamente. Para minimizar os erros de leitura em função da cinética rápida da reação, as alíquotas das amostras foram misturadas à solução de DPPH<sup>•</sup> diretamente na cubeta, situada na posição de leitura do equipamento, homogeneizadas com pipeta automática e determinada imediatamente.

Para se verificar a capacidade antioxidante das amostras de própolis, a quantidade residual de DPPH<sup>•</sup> foi calculada para os tempos de 1, 10 e 60 minutos de reação baseando-se na curva de calibração do radical livre. A atividade antioxidante foi expressa como porcentagem de descoloração do DPPH<sup>•</sup>. Como padrões foram utilizados o Trolox C<sup>®</sup> nas concentrações de 25, 35, 50 e 100 µM e a quercetina nas concentrações de 10, 25 e 50 µM.

#### 4.2.7.3 Ensaio de equivalência da capacidade antioxidante do Trolox C<sup>®</sup> (TEAC – Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) relativa ao DPPH<sup>•</sup> (TEAC<sub>DPPH<sup>•</sup></sub>)

Dentro dos muitos métodos utilizados para se testar atividades antioxidantes, o ensaio de equivalência da capacidade antioxidante do Trolox C<sup>®</sup> é muito difundido. O Trolox C<sup>®</sup> é um análogo hidrossolúvel da vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), no qual o grupo fitil (lipofítila) é substituído por uma simples carboxila (FIGURA 20). Este método foi descrito primeiramente por Miller *et al.* (1993) para medir a capacidade antioxidante total de fluidos corpóreos e soluções de drogas e se baseia na degradação do radical azul/verde extremamente estável ABTS (ABTS<sup>•+</sup>), convertendo-o em um produto incolor. O grau de descoloração reflete a quantidade de ABTS<sup>•+</sup> que foi degradado pelo antioxidante e pode ser determinado espectrofotometricamente a 734 nm. O valor de TEAC é determinado pela comparação da capacidade de degradação de um antioxidante em relação ao Trolox C<sup>®</sup> (Arts, 2003). O valor de TEAC é então definido como a concentração do antioxidante que fornece a mesma porcentagem de inibição do Trolox C<sup>®</sup> 1 mM (Re *et al.*, 1998). Os valores de TEAC fornecem um método de comparação da atividade antioxidante entre grupos de drogas e produtos químicos (Miller *et al.*, 1993).

FIGURA 20 – ESTRUTURA QUÍMICA DO TROLOX C<sup>®</sup>



Para a determinação do valor de TEAC o método de Re *et al.* (1998) foi utilizado empregando-se o radical livre DPPH<sup>•</sup> ao invés do ABTS<sup>•+</sup>. Para o cálculo do TEAC foi considerada a concentração de DPPH<sup>•</sup> consumida por cada extrato etanólico de própolis 100  $\mu$ g/mL e os resultados comparados com a concentração de radical livre consumida pelo Trolox C<sup>®</sup> 100  $\mu$ M (equação 02). Como padrões foram



utilizados a quercetina nas concentrações de 25  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$  comparados com o Trolox C<sup>®</sup> nas concentrações 25  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

$$\text{TEAC} = \frac{\mu\text{mol de DPPH consumido obtido com a amostra (100 } \mu\text{g/mL)}}{\mu\text{mol de DPPH consumido obtido com Trolox C}^{\text{®}} \text{ (100 } \mu\text{M)}} \quad (02)$$

#### 4.2.8 Cromatografia em camada delgada – CCD

As análises através de cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizadas aplicando-se as amostras, bem como os padrões de flavonóides e ácidos fenólicos, em cromatoplas de sílica gel 60 (SG-60), obtidas comercialmente da Merck. Para a realização desta análise foi desenvolvido um sistema de fase móvel contendo a seguinte mistura de solventes: hexano / acetato de etila na proporção de 3:2 (v/v). A migração ascendente da cromatoplasca foi de 1,5 vezes. A visualização do perfil geral das amostras foi feita através da revelação com anisaldeído sulfúrico (1 g% em ácido sulfúrico:metanol 10:90 v/v) após aquecimento a 100 °C por 5 a 10 minutos sob luz natural ou sob UV a 365 nm em gabinete Chromato-Vue 70-G da UVP Inc. A visualização do perfil de flavonóides foi realizada através da revelação com reativo de NEU (éster - $\beta$ -etilamina do ácido difenilborônico a 1 % em metanol seguido de polietilenoglicol-4000 a 5% em etanol) sob luz UV a 365 nm (Wagner, 1996).

#### 4.2.9 Densitometria das cromatoplas de CCD

A quantificação das amostras e padrões cromatografados em CCD foi realizada utilizando o densitômetro de alta resolução Shimadzu CS-9301PC, adotado os parâmetros de *scanner* no modo fotométrico de reflexão no comprimento de onda de 440 nm.

#### 4.2.10 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A análise do perfil dos extratos etanólicos e aquosos de própolis feita por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi realizada em equipamento

Shimadzu LC-10AT vp, módulos SPD-M10A vp, detector de arranjo de diodos (DAD) e FCV-10AL vp, bomba quaternária com uma coluna Shim-pack CLC-ODS de 15 cm × 4,6 mm e 5 µm de diâmetro médio das partículas, associada a uma pré-coluna GODS(4) ODS B151, ambas da Shimadzu. O sistema de fase móvel foi desenvolvido em modo gradiente utilizando a mistura de ácido fórmico 0,08% em água de osmose reversa (A) e ácido fórmico 0,1% em acetonitrila (B) nas proporções de 20 - 35% B (10 min), 35 - 45 % B (50 min), 45 - 100 % B (60 min), 100 - 20% B (70 min), fluxo de 1,0 mL / min. O volume de injeção das amostras foi de 20 µL injetados manualmente com microseringa com *loop* fixo de 20 µL. O detector ADD (arranjo diferencial de diodos) foi utilizado para a análise dos extratos e padrões com geração de cromatogramas dos comprimentos de ondas de 250, 280, 300 e 350 nm. Os extratos e os padrões foram diluídos na fase móvel inicial (20 % B em B).

#### 4.2.11 Eletroforese capilar

Foram utilizadas duas variantes da eletroforese capilar, como descritas a seguir:

##### 4.2.11.1 Eletroforese capilar de zona (ECZ)

Para a comparação do perfil cromatográfico das amostras de própolis PP4 e do broto de álamo feita por eletroforese capilar de zona foi utilizado o equipamento HP<sup>3D</sup> Capillary Electrophoresis System da empresa Agilent Technologies com capilar de sílica de 65 cm de comprimento total, 56 cm de comprimento efetivo e 50 µm de diâmetro interno. O capilar foi condicionado previamente a cada corrida com NaOH 1 M (5 min), NaOH 0,1 M (5 min) e finalmente com tampão de corrida (10 min). O tampão utilizado foi tetraborato pH 8,5 (tetraborato de sódio 50 mM, fosfato de sódio 30 mM), modificado com a inclusão de 12% de metanol para incrementar a solubilidade das amostras. A temperatura do capilar foi de 25 °C. Um potencial de 20 kV foi aplicado para gerar uma corrente de 53 µA e os flavonóides foram monitorados via ADD em comprimentos de onda de 220, 250, e 320 nm como máximos de absorção para a pinocembrina. As amostras de extratos etanólicos,

previamente às corridas eletroforéticas, foram misturados ao tampão de eletroforese e filtrados por membrana Millipore de 0.22  $\mu$  para a remoção de qualquer material particulado ou insolubilizado nessa diluição e injetadas a 50 mbar por 4 segundos.

#### 4.2.11.2 Eletroforese capilar micelar (ECM)

A análise do perfil dos extratos etanólicos e aquosos de própolis por eletroforese capilar micelar foi realizada com capilar de sílica de 64,5 cm de comprimento total, 56 cm de comprimento efetivo e 50  $\mu$ m de diâmetro interno. O capilar foi condicionado antes de cada corrida com NaOH 1 M (5 min), NaOH 0,1 M (5 min) e finalmente com tampão de corrida (10 min). O tampão utilizado foi tampão borato pH 8,5 (ácido bórico 150 mM) adicionado de 50 mM de SDS (dodecil sulfato de sódio; agente micelante, concentração final para garantir CMC – concentração micelar crítica) e modificado com a inclusão de 5 % de etanol como moderador de polaridade e para incrementar a solubilidade das amostras (Rodríguez-Delgado, 2000). As amostras foram diluídas no tampão de eletroforese e injetadas a 50 mbar por 4 segundos. A temperatura do capilar foi de 25 °C. Um potencial de 28 kV foi aplicado para gerar uma corrente constante de 55  $\mu$ A. O perfil das amostras foi monitorado via ADD em comprimentos de onda de 195, 217 (gerais), 250, 320 e 360 nm (específicos) como comprimentos de onda estratégicos para a detecção de ácidos fenólicos e flavonóides.

#### 4.2.12 Cromatografia gasosa

As amostras PP4 e PP2 foram previamente obtidas como derivados siliilados (TMS) e submetidas à cromatografia gasosa numa coluna de 30 m de comprimento, CROMA – 5 (similar a uma fase estacionária HP-5), com 0,2 mm diâmetro interno e 30  $\mu$ m de espessura do filme de 5% fenil - 95% dimetilpolisiloxano no equipamento Varian CP-3800. A plataforma de gradiente foi programada entre as temperaturas de 100 °C (tempo de duração de 2 minutos) até 300 °C (tempo final de 15 minutos) através de uma variação de 10 °C por minuto e utilizando detector de ionização de chama. Estruturas fenólicas e/ou hidroxiladas (eventualmente carboxiladas;

dependendo do pH) foram derivatizadas com a mistura BSTFA : piridina (1 : 1 v/v) a 70°C por 30 min (FONTANA *et al.*, 1988).

#### 4.2.13 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

Os extratos etanólicos da amostra de própolis PP4 e dos brotos de álamo foram submetidas à cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas em uma coluna de 30 m de comprimento, Chrompack CP-Sil 8 Low Bleed com 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura do filme de 5% fenil - 95% dimetilpolisiloxano acoplado a espectrometria de massa no modo de aquisição por impacto eletrônico seguido de corridas posteriores confirmatórias no modo de ionização química com acetonitrila, no equipamento Varian CP-3800 com detector de massa *ion trap* Saturn 2000, operado isotermicamente a 250 °C.

#### 4.2.14 Extração de DNA

##### 4.2.14.1 Extração de DNA de plantas

O DNA total das folhas de álamo (*Populus deltoides*), eucalipto (*Eucalyptus globulus*), laranjeira (*Citrus sinensis*) e plátano (*Platanus occidentalis*) foi extraído de acordo com a metodologia descrita por Doyle e Doyle (1990) com algumas modificações. Porções de 200 mg de material fresco (ou pó) ou 50 mg de material liofilizado foram trituradas sob nitrogênio líquido e adicionadas de 700 µL da solução extratora. Após 25 a 30 minutos de incubação a 65 °C foram adicionados 650 µL de clorofórmio – álcool iso-amílico e a homogeneização feita por inversão. As amostras foram centrifugadas por 4 minutos a 13000 rpm, 550 µL do sobrenadante transferido para um segundo tubo e adicionado de 150 µL de solução extratora e 650 µL de clorofórmio – álcool iso-amílico. Depois de homogeneizadas e centrifugadas por 4 minutos a 13000 rpm, 550 µL do sobrenadante foi transferido para um terceiro tubo e adicionado de 550 µL de isopropanol. As amostras foram homogeneizadas levemente por inversão, deixadas no freezer por 20 minutos e centrifugadas a 13000 rpm por 4 minutos. O sobrenadante foi retirado por inversão, sobre o *pellet* foi

adicionado 400  $\mu\text{L}$  de etanol 70% e centrifugado a 13000 rpm por 4 minutos. O sobrenadante foi retirado também por inversão e as amostras deixadas secar por 30 minutos a temperatura ambiente ou 15 minutos a 97 °C. Para a amplificação por PCR as amostras foram ressuspensas em 100  $\mu\text{L}$  de tampão tris-EDTA adicionadas de RNase e deixadas em banho – maria a 37 °C por 1 hora.

A solução extratora utilizada possui a seguinte composição:

CTAB solução a 2%	2 mL
NaCl – 1,4 M	2,8 mL
EDTA 20 mM pH 8,0	0,4 mL
Tris-HCl 100 mM pH 7,5-8,0	1 mL
PVP 40	0,1 g
Água osmose reversa q.s.p.	10 mL

E o tampão tris-EDTA adicionado de RNase:

Tris-HCl 100 mM pH 7,5-8,0	10 $\mu\text{L}$
EDTA 20 mM pH 8,0	2 $\mu\text{L}$
RNase A 10 mg/mL	5 $\mu\text{L}$
Água osmose reversa q.s.p.	1000 $\mu\text{L}$

#### 4.2.14.2 Extração de DNA de pólen

O DNA do pólen de álamo *in natura* foi extraído utilizando diversas metodologias para se verificar o método mais adequado para a extração de DNA. Para cada metodologia foram utilizados 21,5 mg de pólen. As amostras P1 e P2 foram extraídas sem tratamento prévio, sendo o pólen triturado sob nitrogênio líquido e ressuspendido diretamente em 700  $\mu\text{L}$  de água de osmose reversa (AOR) (FIGURA 21). As amostras P3 e P4 foram extraídas de acordo com o protocolo utilizado para extração de DNA das plantas, porém variando-se a temperatura de extração para 95 °C por 2 minutos para a amostra P3 e por 5 minutos para a amostra P4. Os pólenes das amostras P5, P6, P7 e P8 foram pré-germinados em 100  $\mu\text{L}$  de meio de germinação a 37 °C por 3 horas e extraídos conforme protocolo utilizado para o DNA de plantas variando-se a temperatura de extração para 95 °C por 2 minutos para a amostra P7 e por 5 minutos para a P8. A amostra P9 foi

extraída seguindo o protocolo completo da extração de DNA de plantas, sem prévia germinação. Todas as amostras foram ressuspensas em 100  $\mu$ L de tampão tris-EDTA adicionado de RNase e deixadas em banho – maria a 37 °C por 1 hora para posterior amplificação por PCR.

FIGURA 21 – TRITURAÇÃO DAS AMOSTRAS SOB NITROGÊNIO LÍQUIDO



#### 4.2.14.2.1 Eletroforese do DNA extraído do pólen

Para se avaliar a qualidade e quantificar o DNA do pólen de álamo obtido através das metodologias descritas acima, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1% dissolvido em tampão TBE 1x (tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM e EDTA 2 mM pH 8,0). Para isto 2  $\mu$ L do DNA extraído foi misturado com 2  $\mu$ L de tampão de carregamento (Ficoll-tipo 400- 25 %, azul de bromofenol 0,25 % e xilenocianol FF a 0,25 %) e 2  $\mu$ L de AOR e o volume total aplicado no gel. O padrão de peso molecular utilizado foi 1 Kb plus e a eletroforese realizada com voltagem constante de 70 volts, 81 mA por 3 horas. O tampão de cuba usado foi o TBE 1X. O gel foi corado durante 20 a 30 minutos por imersão em brometo de etídio a 0,5  $\mu$ g/mL e fotografado sob luz UV.

#### 4.2.14.3 Extração do DNA de pólen nas amostras de própolis

A amostra de própolis PP4 foi submetida a dois tratamentos prévios para concentração dos grãos de pólen. O primeiro tratamento seguiu o protocolo descrito por d'Albore (1979) onde 5 gramas da amostra foram dissolvidos à quente em 20 mL da mistura etanol:acetona:clorofórmio (1:1:1) e centrifugada a 3000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado, ao resíduo adicionado 20 mL de KOH a 10% e colocado em banho-maria fervente por 2 minutos. Após centrifugar por 15

minutos a 3000 rpm o sedimento foi lavado com etanol absoluto por duas vezes, obtendo assim o sedimento final (R1) que é então separado para posterior PCR. O segundo tratamento utilizado foi uma metodologia desenvolvida no próprio laboratório utilizando organossolventes. Cinco gramas da amostra foi dissolvida à quente (50 °C) com 20 mL da mistura clorofórmio:metanol (3:1) e centrifugada a 3000 rpm por 15 minutos. O resíduo foi então extraído seqüencialmente com clorofórmio:metanol (1:1) à quente e metanol puro, centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos para obter o resíduo final (R2), que também é separado para posterior PCR. Paralelamente aos tratamentos da amostra de própolis, 21,5 mg do pólen *in natura* foram processados de acordo com os dois tratamentos, sendo adotado a terminologia C1 para o tratamento correspondente a R1 e C2 respectivamente ao R2. C1 e C2 foram realizados como um controle para verificar a integridade do DNA obtido por estas metodologias. Os resíduos obtidos tanto de própolis quanto de pólen são triturados em nitrogênio líquido, suspensos em 700 µL de água de osmose reversa (AOR) e alíquotas de 0,25 µL, 0,5 µL, 1,0 µL, 2,0 µL e 4,0 µL destas amostras aplicadas na reação de PCR. Além disso, também foram submetidos a amplificação por PCR misturas do DNA da amostra C2 com o DNA da amostra R2 nas proporções de 0,5+1; 0,5+2; 1+1; 1+2; 2+1 e 2+2 µL, respectivamente. Alíquotas de 1 e 2 µL da suspensão de 21,5 mg de pólen em 700 µL de AOR (A1 e A2) assim como 1 e 2 µL da suspensão da amostra R2 em 700 µL de AOR (Pr1 e Pr2) foram também submetidos a amplificação por PCR, sem tratamento prévio específico para a extração do DNA.

#### 4.2.14.3.1 Análise espectrofotométrica e quantificação do DNA

Para análise do perfil de varredura espectrofotométrica as amostras C1, C2, R1 e R2 foram diluídas 1:10, 1:10, 1:20 e 1:40 respectivamente, em água destilada, e analisadas por espectrofotômetro na faixa de comprimento de onda de 200 nm a 800 nm.

A quantificação espectrofotométrica de DNA foi determinada através da metodologia de Warburg e Christian (1941) que utiliza a absorvância nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. Calcula-se a relação entre as absorvâncias

( $A_{280}/A_{260}$ ) e o valor da concentração de DNA (% de nucleotídeo) é obtido de acordo com a tabela de referência para cálculo da correlação da concentração da proteína / ácido nucléico (livro *Data for Biochemical Research* p. 542) (Dawson *et al.*, 1989).

#### 4.2.15 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As reações de amplificação foram realizadas utilizando 2,5  $\mu\text{L}$  de tampão de enzima 67 mM; 1,0  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  1,5 mM; 1,0  $\mu\text{L}$  do par de iniciadores 0,3  $\mu\text{M}$ ; 2,0  $\mu\text{L}$  de uma mistura de 100  $\mu\text{M}$  de cada nucleotídeo dATP, dTTP, dGTP, dCTP; 1,0 a 4,0  $\mu\text{L}$  DNA genômico, 0,2  $\mu\text{L}$  (1 unidade) de *Taq* polimerase e o volume completado para 25  $\mu\text{L}$  com AOR. Depois de preparadas as reações foram cobertas com 10  $\mu\text{L}$  de óleo mineral.

Os iniciadores utilizados foram quatro: três para mtDNA, um para cpDNA e um para região ITS (*internal transcribed spacer*) de ribossomo, com as seqüências de nucleotídeo descritas na TABELA 04 (Demesure, Sodzi, Petit, 1995):

As amplificações foram feitas em termociclador Perkin Elmer 4700 utilizando um ciclo de 2 minutos a 94 °C para desnaturação inicial, 30 ciclos de amplificação de 45 segundos a 92 °C para desnaturação, 45 segundos a 57,5 a 59 °C (de acordo com a TABELA 04) para o anelamento dos iniciadores e 2 minutos a 72 °C (3 minutos no caso do iniciador *trnM*) para a extensão do fragmento de DNA e um ciclo final de 10 minutos a 72 °C. No caso específico do iniciador ITS a amplificação foi realizada de uma maneira diferente utilizando um ciclo de 3 minutos a 94 °C para desnaturação inicial; 35 ciclos de amplificação de 30 segundos a 94 °C para desnaturação, 1 minuto a 58 °C para o anelamento dos iniciadores e 1 minutos a 72 °C para a extensão do fragmento de DNA seguidos de um ciclo de 10 minutos a 72 °C.



**TABELA 04 - DESCRIÇÃO DOS PARES DOS INICIADORES UNIVERSAIS UTILIZADOS**

	Nome	iniciadores	Seqüência de nucleotídeos	Comprimento do fragmento amplificado em <i>Q. robur</i>	Temperatura de Anelamento
<b>Mitocôndria</b>	Nad 1	nad1 exon B	5'GCA TTA CGA TCT GCA GCT CA 3'	1550 pb	57,5 °C
		nad1 exon C	5'GGA GCT CGA TTA GTT TCT GC 3'		
	Nad 4	nad4 exon 1	5'CAG TGG GTT GGT CTG GTA TG 3'	1700 pb	57,5 °C
		nad4 exon 2	5'TCA TAT GGG CTA CTG AGG AG 3'		
	rpS14	rpS14	5'CAC GGG TCG CCC TCG TTC CG 3'	1640 pb	57,5 °C
		cob	5'GTG TGG AGG ATA TAG GTT GT 3'		
<b>Cloroplasto</b>	trnM	trnM	5'TGC TTT CAT ACG GCG GGA GT 3'	2900 pb	59,0 °C
		rbcl	5'GCT TTA GTC TCT GTT TGT GG 3'		
<b>Ribossomo</b>	ITS	ITS1-18S	5' CGT AAC AAG GTT TCC GTA GG 3'	537 – 714 pb	58 °C
		ITS 4	5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3'		

#### 4.2.16 Eletroforese de produtos amplificados por PCR

Os produtos das ampliações foram analisados em gel de acrilamida a 6% (acrilamida: bis-acrilamida, 29:1) e o tampão de corrida utilizado foi TBE (1x). Para isto, foram adicionados 5  $\mu$ L de tampão de carregamento no produtos de reação do PCR e 7  $\mu$ L dessa mistura foi aplicada no gel. A eletroforese foi realizada inicialmente com voltagem constante de 80 V por 15 minutos e 100 V por 7 horas para iniciadores Nad1, Nad4, por 6 horas para o *rpS14*, por 8 horas para o *tmM* e por 2 horas e 15 minutos para ITS. Os padrões de peso molecular utilizados foram lambda cortado com Hind III ou 1 Kb plus.

Os géis foram corados com nitrato de prata de acordo com a metodologia descrita por Sanguinetti *et al.* (1994). Para isto, o gel foi corado com solução fixadora (10% etanol e 0,5 % ácido acético) por 3 minutos, solução fixadora com 0,2% de nitrato de prata (2 g/L) por 5 minutos, lavado duas vezes com AOR, uma por 20 segundos e outra por um minuto, e finalmente com solução reveladora (3% NaOH e 0,5% formaldeído) até a revelação das bandas, com agitação constante. Depois, o gel foi lavado com solução fixadora por 5 minutos e com água por mais 10 minutos.

#### 4.3 Análises estatísticas

Os resultados foram analisados e comparados através do teste de análise de variância, ANOVA. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$  (valor-p).

A análise estatística aplicada aos dados foi feita com o ajuste do modelo geral, de acordo com a equação 03 (adaptado em cada análise conforme o número de fatores):

$$y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \delta_l + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\gamma)_{ik} + (\alpha\delta)_{il} + (\beta\gamma)_{jk} + (\beta\delta)_{jl} + (\gamma\delta)_{kl} + (\alpha\beta\gamma)_{ijk} + (\alpha\beta\delta)_{ijl} + (\alpha\gamma\delta)_{ikl} + (\beta\gamma\delta)_{jkl} + (\alpha\beta\gamma\delta)_{ijkl} + \varepsilon_{ijkl} \quad (03)$$

onde:

- $\mu$  é a média geral;
- $\alpha_i$  é o efeito do nível i do fator aquecimento (A),  $i = 1,2$  (com ou sem);

- $\beta_j$  é o efeito do nível j do fator amostra de própolis (B),  $j = 1, 8$ ;
- $\gamma_k$  é o efeito do nível k do fator solvente,  $k = 1, 2$  (etanol ou água);
- $\delta_l$  é o efeito do nível l do fator tempo,  $l = 1, 2$  (24 e 48 horas);
- $(\alpha\beta)_{ij}$  é o efeito da interação entre os níveis i do fator A e j do fator B;
- $(\alpha\gamma)_{ik}$  é o efeito da interação entre os níveis i do fator A e k do fator C;
- $(\alpha\delta)_{il}$  é o efeito da interação entre os níveis i do fator A e l do fator D;
- $(\beta\gamma)_{jk}$  é o efeito da interação entre os níveis j do fator B e k do fator C;
- $(\beta\delta)_{jl}$  é o efeito da interação entre os níveis j do fator B e l do fator D;
- $(\gamma\delta)_{kl}$  é o efeito da interação entre os níveis k do fator C e l do fator D;
- $(\alpha\beta\gamma)_{ijk}$  é o efeito da interação entre os níveis i do fator A, j do fator B e k do fator C;
- $(\alpha\beta\delta)_{ijl}$  é o efeito da interação entre os níveis i do fator A, j do fator B e l do fator D;
- $(\alpha\gamma\delta)_{ikl}$  é o efeito da interação entre os níveis i do fator A, k do fator C e l do fator D;
- $(\beta\gamma\delta)_{jkl}$  é o efeito da interação entre os níveis j do fator B, k do fator C e l do fator D;
- $(\alpha\beta\gamma\delta)_{ijkl}$  é o efeito da interação entre os níveis i do fator A, j do fator B, k do fator C e l do fator D;
- $\varepsilon_{ijkl}$  é o erro do modelo.

As hipóteses nulas testadas foram:

- $H_{01}: \alpha_i = 0 \forall i$  ou seja não existe diferença entre os níveis i do fator A;
- $H_{02}: \beta_j = 0 \forall j$  ou seja não existe diferença entre os níveis j do fator B;
- $H_{03}: \gamma_k = 0 \forall k$  ou seja não existe diferença entre os níveis k do fator C;
- $H_{04}: \delta_l = 0 \forall l$  ou seja não existe diferença entre os níveis l do fator D;
- $H_{05}: (\alpha\beta)_{ij} = 0 \forall i, j$  ou seja não existe diferença entre os níveis i do fator A e j do fator B;

- $H_{06}: (\alpha\gamma)_{ik} = 0 \quad \forall_{i,k}$  ou seja não existe diferença entre os níveis  $i$  do fator A e  $k$  do fator C;
- $H_{07}: (\alpha\delta)_{il} = 0 \quad \forall_{i,l}$  ou seja não existe diferença entre os níveis  $i$  do fator A e  $l$  do fator D;
- $H_{08}: (\beta\gamma)_{jk} = 0 \quad \forall_{j,k}$  ou seja não existe diferença entre os níveis  $j$  do fator B e  $k$  do fator C;
- $H_{09}: (\beta\delta)_{jl} = 0 \quad \forall_{j,l}$  ou seja não existe diferença entre os níveis  $j$  do fator B e  $l$  do fator D;
- $H_{10}: (\gamma\delta)_{kl} = 0 \quad \forall_{k,l}$  ou seja não existe diferença entre os níveis  $k$  do fator C e  $l$  do fator D;
- $H_{11}: (\alpha\beta\gamma)_{ijk} = 0 \quad \forall_{i,j,k}$  ou seja não existe diferença entre os níveis  $i$  do fator A,  $j$  do fator B e  $k$  do fator C;
- $H_{12}: (\alpha\beta\delta)_{ijl} = 0 \quad \forall_{i,j,l}$  ou seja não existe diferença entre os níveis  $i$  do fator A,  $j$  do fator B e  $l$  do fator D;
- $H_{13}: (\alpha\gamma\delta)_{ikl} = 0 \quad \forall_{i,k,l}$  ou seja não existe diferença entre os níveis  $i$  do fator A,  $k$  do fator C e  $l$  do fator D;
- $H_{14}: (\beta\gamma\delta)_{jkl} = 0 \quad \forall_{j,k,l}$  ou seja não existe diferença entre os níveis  $j$  do fator B,  $k$  do fator C e  $l$  do fator D;
- $H_{15}: = 0 \quad (\alpha\beta\gamma\delta)_{ijkl} \quad \forall_{i,j,k,l}$  ou seja não existe diferença entre os níveis  $i$  do fator A,  $j$  do fator B,  $k$  do fator C e  $l$  do fator D;

Para se testar estas hipóteses aplicou-se a análise da variância, ANOVA, uma vez que os resíduos (erros  $\varepsilon_{ijkl}$  estimados) se distribuem de acordo com a distribuição Gaussiana. Isto foi verificado pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Verificou-se também a hipótese de homogeneidade dos resíduos, usando os procedimentos de Cochran e Bartlett.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

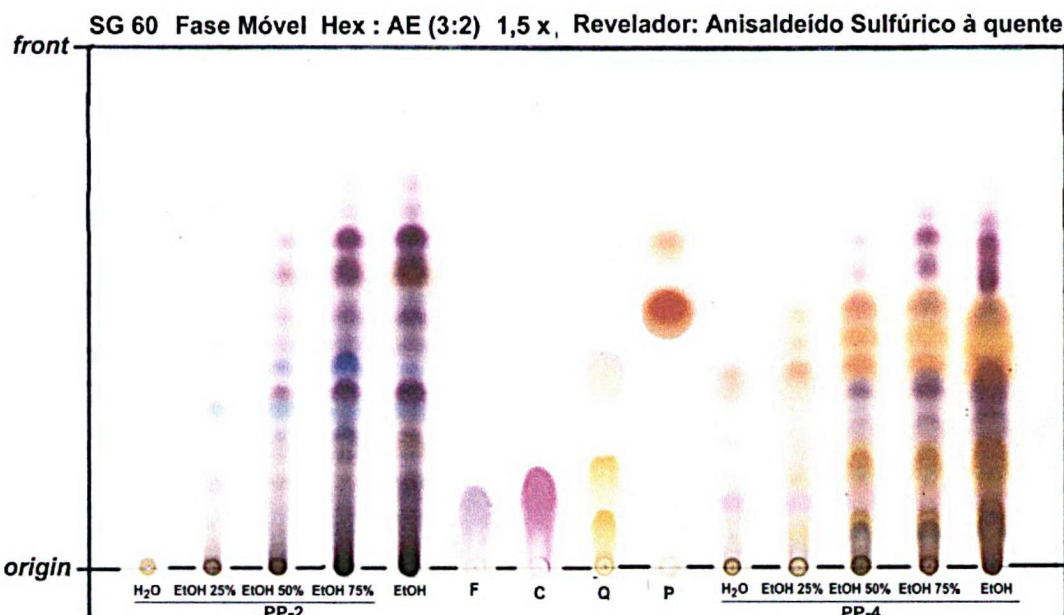
A aplicação médica da própolis aumentou o interesse na sua composição química e na sua origem (Koo e Park, 1996; Banskota *et al.*, 2000). O grande problema da própolis, assim como de outros produtos obtidos de colméias, é que fatores associados à técnica de extração, metodologia de condução de ensaios, local de origem da própolis (flora), época do ano em que foi produzida e contaminantes podem ter influência sobre o maior ou menor grau de atividade biológica (Bianchini, 1998). Como a qualidade do produto varia muito, a utilização da própolis no tratamento médico se torna difícil. Deste modo, a indústria de própolis requer a padronização destes produtos, que apesar de ser possível em princípio, testes químicos exatos ainda não foram aplicados com propósitos de controle de qualidade (Marcucci, 1995). Além disso, essa padronização deve ser simples e acessível economicamente aos produtores (Menezes, 1997).

### 5.1 EFEITO DA PROPORÇÃO ÁGUA/ETANOL COMO SOLVENTE EXTRATOR

Segundo Fontana *et al.* (2004) o etanol a 70-80% é o solvente apropriado para a maioria das preparações farmacêuticas e para o preparo de soluções de própolis densas, límpidas e de colorações que variam do amarelo ao marrom. A adição de quantidades maiores de água nestes extratos causa uma insolubilização progressiva das ceras e/ou componentes menos hidrofílicos resultando em preparações com uma turbidez leitosa ou opaca, mas estável. Essas formulações são mais convenientes para algumas aplicações onde quantidades elevadas de solventes orgânicos devem ser evitadas (e.g. nebulizações para garganta).

Os extratos das amostras PP2 e PP4 foram obtidos através do procedimento de extração utilizando gradiente água-etanol. Verificou-se que os sólidos totais do processo de extração dependem tanto da afinidade pelo solvente extrator como da proporção de etanol presente no extrato, demonstrados pela FIGURA 22 e TABELA 05.

FIGURA 22 – CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DOS EXTRATOS HIDROETANÓLICOS DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS PP4 E PP2



Cromatografia em camada delgada realizada utilizando como fase móvel a mistura hexano / acetato de etila (3:2, v/v), 1,5 x corridas ascendentes. Agente cromogênico: anisaldeído sulfúrico a quente. Legenda: ácido ferúlico (F); ácido p-cumárico (C); crisina (maior migração), quercetina (migração intermediária) e canferol (menor migração) (Q); pinocembrina-7-metil éter (maior migração) e pinocembrina (menor migração) (P).

TABELA 05 – RENDIMENTO DOS SÓLIDOS TOTAIS EXTRAÍDOS DAS PRÓPOLIS EM FUNÇÃO DA PROPORÇÃO ÁGUA/ETANOL COMO SOLVENTE EXTRATOR

Amostras de Própolis	Extratos		
	H <sub>2</sub> O	50% EtOH	EtOH absoluto
PP2	1.3 %	6.9 %	25.0 %
PP4	0.4 %	14.8 %	41.3 %

## 5.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Apesar de avanços na área médica, na epidemiologia e na descoberta de novos antibióticos, as infecções causadas por *Staphylococcus aureus* continuam apresentando uma morbidade e mortalidade consideráveis (Alcaráz *et al.*, 2000).

*Staphylococcus aureus* é um patógeno clássico que causa infecções em vários locais do corpo. Infecções de pele são freqüentes e variam desde erupções pequenas passando por úlceras infectadas até impetigos severos. É também um invasor freqüente em cirurgias e outras feridas, algumas vezes levando a sepse. O

patógeno mais comum que causa infecções de juntas e ossos em cirurgias ortopédicas é *S. aureus*. Além disto, é um dos patógenos mais comuns de endocardites e agente ocasional de meningite pós-neurocirúrgica. É um patógeno infrequente mas uma causa séria de pneumonia, principalmente em pacientes debilitados. Algumas cepas produzem uma ou mais enterotoxinas que causam diarreias severas se alimentos contaminados são ingeridos (Livermore, 2000).

Com o uso em massa e indiscriminado de antibióticos houve o desenvolvimento de resistência bacteriana contra virtualmente todas as classes de antibióticos, tanto através de mutações espontâneas, seleções de cepas ou mediação por plasmídeos. Além disto, muitas cepas se tornaram resistentes a múltiplas classes de antibióticos. O caso mais preocupante de resistência a antibióticos é o aumento da incidência de cepas *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes (MRSa) e *Enterococcus* vancomicina resistentes (VRE). A terapêutica prolongada e o uso profilático indiscriminado da vancomicina, tratamento padrão para MRSa, deu origem as VRE, e resultou na emergência da cepa *S. aureus* vancomicina resistentes (VRSa). Para se reduzir a incidência de VRE e evitar o aumento das VRSa, a vancomicina deve ter seu uso restrito e outras estratégias de antibioticoterapia devem ser utilizadas (Ginzburg, 2000).

Considerando o crescente aumento de resistência microbiana contra os antibióticos e a grande importância da atividade antibacteriana da própolis para as abelhas, a capacidade de inibição antimicrobiana dos extratos das amostras LS, BC, PP2, PP4, PPA, LP, SG, CM, FOP-A, FOP-B, FOP-M, C-RJ, CF-MG de *Apis mellifera* obtidos de acordo com o procedimento de extração utilizando hexano e etanol foram testados frente às cepas selvagem e meticilina resistente da bactéria *Staphylococcus aureus* através de três metodologias distintas.

### 5.2.1 Antibiograma de difusão em disco

Analisando comparativamente o efeito antimicrobiano dos extratos de própolis obtidos com os três solventes, observou-se que os extratos etanólico e hidroalcóolico apresentaram um efeito inibitório em um maior número de amostras do que os extratos com hexano, para ambas as cepas testadas.

Dentre os extratos hexânicos testados o único que apresentou inibição frente à cepa *S. aureus* foi o da amostra C-RJ e com relação à cepa MRSA, os extratos das amostras FOP-A, SG, FOP-M, C-RJ, CF-MG, PP2, LS e BC (TABELA 05). Entre os extratos etanólico e hidroalcoólico apenas os da amostra FOP-B não apresentaram atividade em nenhuma das cepas. Além disso, os extratos etanólicos das amostras PPA, PP2, BC e LS apresentaram inibição somente frente à cepa MRSA.

De uma maneira geral, é interessante notar que os extratos apresentaram maior inibição frente à cepa meticilina resistente do que à cepa selvagem. Esse comportamento torna as amostras de própolis ainda mais importantes como fontes de antibióticos naturais, visto que o uso da vancomicina deve ser restrito e também devido ao aparecimento de algumas cepas já resistentes a este antibiótico.

#### 5.2.2 Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima

Dentre as amostras testadas, aquelas que apresentaram maior halo de inibição no ensaio de difusão em disco foram selecionadas para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM).

A amostra de própolis PP4 apresentou a maior atividade antimicrobiana entre as amostras testadas (TABELA 06 e 07), apresentando uma CIM de 37,5 µg/mL e uma CBM de 75 µg/mL, tanto frente à cepa *S. aureus* padrão quanto frente à MRSA. O extrato etanólico da amostra SG apresentou uma CIM de 75 µg/mL e as demais apresentaram uma CIM de 150 µg/mL. Tanto a amostra SG quanto as demais própolis apresentaram uma CBM maior que 150 µg/mL. Essas variações podem ser decorrentes das diferentes origens das amostras e conseqüentes variações de suas composições.

Embora o extrato em etanol absoluto apresente o maior rendimento de sólidos totais, a atividade antimicrobiana superior do extrato etanólico a 50% pode ser explicada em função da maior quantidade relativa dos componentes biologicamente ativos em relação aos componentes totais.



TABELA 06 - TESTE DE INIBIÇÃO DE DIFERENTES AMOSTRAS DE PRÓPOLIS DE *Apis mellifera* FRENTE À *S. aureus* E MRSA

AMOSTRAS	Halo de inibição (mm)		AMOSTRAS	Halo de inibição (mm)	
	<i>S.aureus</i>	MRSA		<i>S.aureus</i>	MRSA
LP - Hexano	Ausente	Ausente	FOP-A - Hexano	Ausente	8
LP - Etanol	7	8	FOP-A - Etanol	7	9
LP - Etanol 50%	<b>9</b>	10	FOP-A - Etanol 50%	<b>9</b>	<b>13</b>
SG - Hexano	Ausente	10	FOP-B - Hexano	Ausente	Ausente
SG - Etanol	7	8	FOP-B - Etanol	Ausente	Ausente
SG - Etanol 50%	8	<b>13</b>	FOP-B - Etanol 50%	Ausente	Ausente
CM - Hexano	Ausente	Ausente	FOP-M - Hexano	Ausente	9
CM - Etanol	7	7	FOP-M - Etanol	8	8
CM - Etanol 50%	7	8	FOP-M - Etanol 50%	8	10
Vancomicina 30 µg	20	21	Vancomicina 30 µg	20	21
Clindamicina 02 µg	26	Ausente	Clindamicina 02 µg	30	Ausente
Gentamicina 10 µg	19	Ausente	Gentamicina 10 µg	20	Ausente
C-RJ - Hexano	7	10	PP4 - Hexano	Ausente	Ausente
C-RJ - Etanol	7	8	PP4 - Etanol	8	10
C-RJ - Etanol 50%	<b>9</b>	13	PP4 - Etanol 50%	<b>10</b>	<b>12</b>
CF-MG - Hexano	Ausente	9	PPA - Hexano	Ausente	Ausente
CF-MG - Etanol	7	12	PPA - Etanol	Ausente	7
CF-MG - Etanol 50%	<b>9</b>	<b>15</b>	PPA - Etanol 50%	8	9
Vancomicina 30 µg	20	22	Vancomicina 30 µg	19	20
Clindamicina 02 µg	30	Ausente	Clindamicina 02 µg	26	Ausente
Gentamicina 10 µg	20	Ausente	Gentamicina 10 µg	19	Ausente
LS - Hexano	Ausente	10	PP2 - Hexano	Ausente	<b>10</b>
LS - Etanol	Ausente	8	PP2 - Etanol	<b>8</b>	9
LS - Etanol 50%	8	9	PP2 - Etanol 50%	<b>8</b>	9
BC - Hexano	Ausente	7	Vancomicina 30 µg	19	21
BC - Etanol	Ausente	9	Clindamicina 02 µg	27	Ausente
BC - Etanol 50%	<b>9</b>	<b>12</b>	Gentamicina 10 µg	19	Ausente
Vancomicina 30 µg	19	21			
Clindamicina 02 µg	27	Ausente			
Gentamicina 10 µg	19	Ausente			

TABELA 07 - CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE AMOSTRAS PRÓPOLIS DE *Apis mellifera* FRENTE À *S. aureus* E MRSA

AMOSTRAS	CIM (µg/mL)		AMOSTRAS	CIM (µg/mL)	
	<i>S.aureus</i>	MRSA		<i>S.aureus</i>	MRSA
BC - Etanol 50 %	150	150	PP4 - Etanol 50 %	<b>37,5</b>	<b>37,5</b>
PP2 - Etanol 50 %	Nd	150	SG - Etanol 50 %	Nd	75
FOP-A - Etanol 50 %	150	150	C-RJ - Etanol 50%	150	150
CF-MG - Etanol 50 %	150	150			

NOTA: Nd = não determinado

### 5.3 AVALIAÇÃO DA METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO

Várias literaturas descrevem procedimentos de extração diferenciados e utilizando diferentes solventes extratores, sendo comumente os extratos etanólicos de própolis mais utilizados para os ensaios biológicos. As principais diferenças entre as metodologias se referem aos parâmetros como tempo de extração, concentração de etanol utilizado, temperatura e agitação.

Devido à diversidade de formas utilizadas para se preparar os extratos de própolis o procedimento de extração requer uma padronização. Desta maneira as qualidades de diferentes amostras de própolis poderiam ser comparadas e não haveriam variações nas suas propriedades biológicas devido à metodologia de extração.

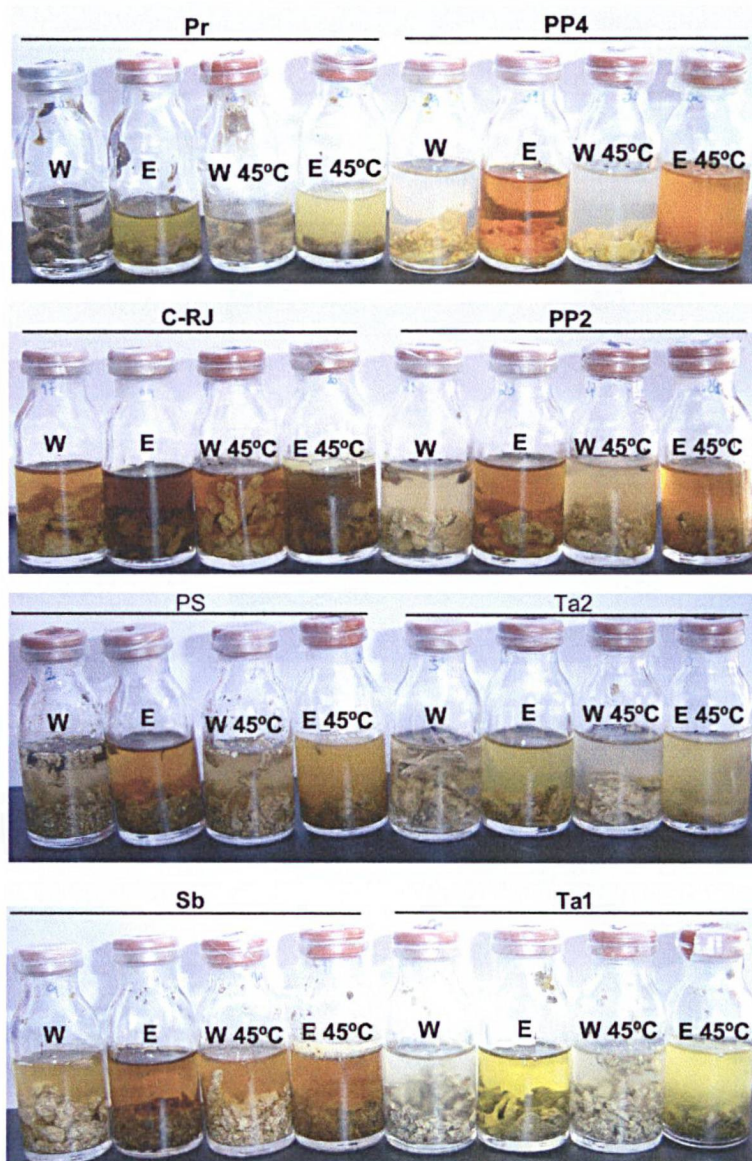
Para a padronização da metodologia foram verificados o efeito do aquecimento, do solvente extrator e de uma segunda extração (duas extrações seqüenciais de 24 horas, totalizando 48horas) no rendimento de sólidos totais, composição (fenólicos e flavonóides totais) e atividades biológicas (antimicrobiana e antioxidante). Nesses experimentos foram utilizadas oito amostras de própolis, quatro de *Apis mellifera* e quatro de Meliponíneos.

#### 5.3.1 Aspecto visual e rendimento dos extratos de própolis

Através da análise visual dos extratos obtidos, conforme mostra a FIGURA 23, pode-se observar que as amostras de própolis de diferentes origens possuem extratos com colorações diferenciadas, variando do incolor ao marrom escuro, devido a diferenças na flora da região e da metodologia utilizada.

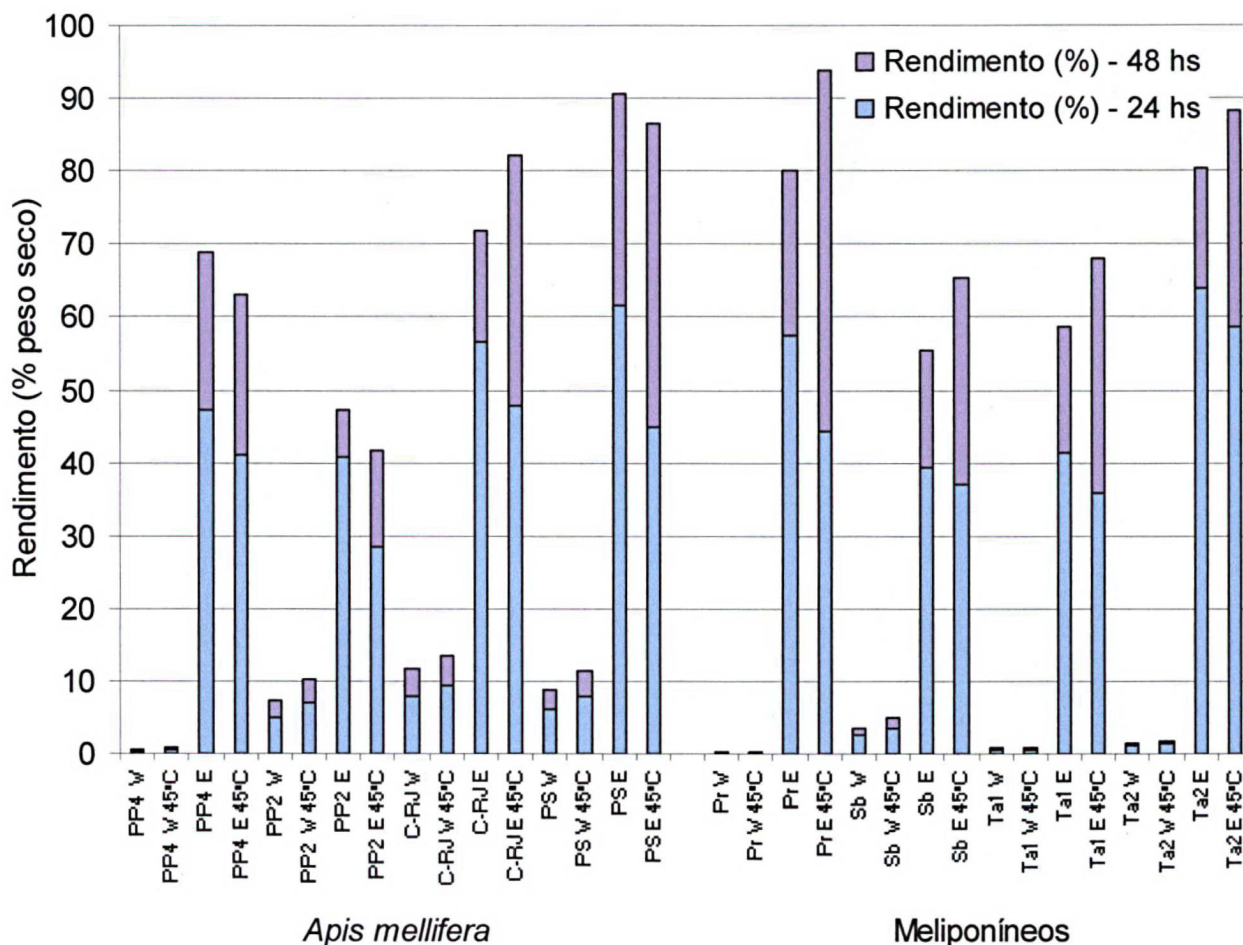
Os extratos obtidos com aquecimento se apresentaram mais turvos do que aqueles sem aquecimento. Com relação ao solvente utilizado, visualmente os extratos etanólicos das amostras possuem uma coloração mais intensa quando comparados aos extratos aquosos das respectivas amostras.

FIGURA 23 – ASPECTO VISUAL DOS EXTRATOS ETANÓLICOS (E) E AQUOSOS (W) DE PRÓPOLIS EXTRAÍDOS A 45 °C OU À TEMPERATURA AMBIENTE (24 HORAS)



A determinação de rendimento em sólidos totais, como demonstra a FIGURA 24, comprova os dados observados visualmente. Pode-se observar que há uma grande variação no rendimento de sólidos totais entre as diferentes amostras de própolis, independente da variedade da abelha coletora ( $p = 0,0000$ ). Diferenças na origem geográfica e conseqüentemente na composição das amostras podem explicar essas variações.

FIGURA 24 – RENDIMENTO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS (E) E AQUOSOS (W) DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS EXTRAÍDOS A 45 °C OU À TEMPERATURA AMBIENTE (EXTRAÇÃO SEQUENCIAL – 24 E 48 HORAS)



Analisando a eficiência do solvente extrator o etanol apresentou um rendimento médio de 1650 % superior à extração com água, sendo estes valores estatisticamente significativos (valor de  $p = 0,0000$ ). Entre os extratos etanólicos, o de maior rendimento foi obtido para a amostra PS, 88 %, e menor para a amostra PP2, 44 %. Considerando os extratos aquosos, o maior rendimento foi obtido para a amostra C-RJ, 12 % e o menor para a Pr, 0,35 %. O maior teor de sólidos totais presentes nos extratos etanólicos de própolis pode ser atribuído à presença de um maior número de compostos constituídos por anéis aromáticos que conferem uma maior lipofilicidade à própolis, como é o caso dos compostos biologicamente ativos, os fenólicos.



Através das análises estatísticas verificou-se que a extração realizada com aquecimento aumenta o rendimento em 8,5% (valor de  $p=0,0489$ ).

Com relação a reextração, pode-se verificar que esse procedimento é indispensável, pois, possibilita um acréscimo significativo (valor de  $p = 0,0000$ ), de até 50% da primeira extração, no rendimento final dos sólidos totais.

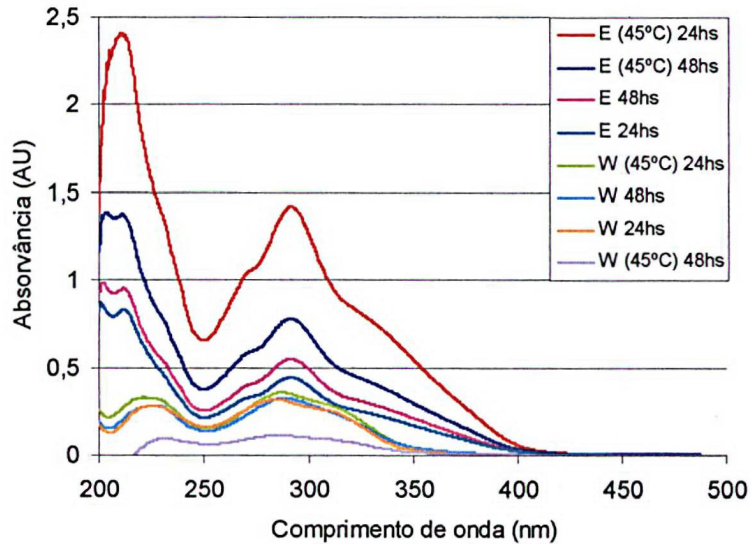
### 5.3.2 Análise espectrofotométrica dos extratos de própolis

De acordo com as análises espectrofotométricas, não foram observadas variações no perfil de varredura, apenas das intensidades dos picos, entre as extrações etanólicas assim como entre as extrações aquosas de cada amostra de própolis independente da metodologia de extração utilizada, representado pela amostra PP4 na figura 25. Porém, foram observadas variações do perfil de varredura das respectivas amostras em função do solvente utilizado.

Os extratos etanólicos assim como os extratos aquosos de própolis de *Apis mellifera* (FIGURAS 26 e 27) possuem uma maior faixa de absorção entre 250 – 350 nm, região correspondente a maior absorvidade dos flavonóides. Entre os extratos das amostras de *Apis mellifera*, os extratos etanólicos e aquosos da PP4 e C-RJ são os que apresentam uma maior absorvidade nesta faixa de absorção, seguidos da amostra PP2, com cerca de metade da absorvidade. A amostra PS possui a menor absorvidade entre estas amostras tanto no extrato etanólico quanto no aquoso.

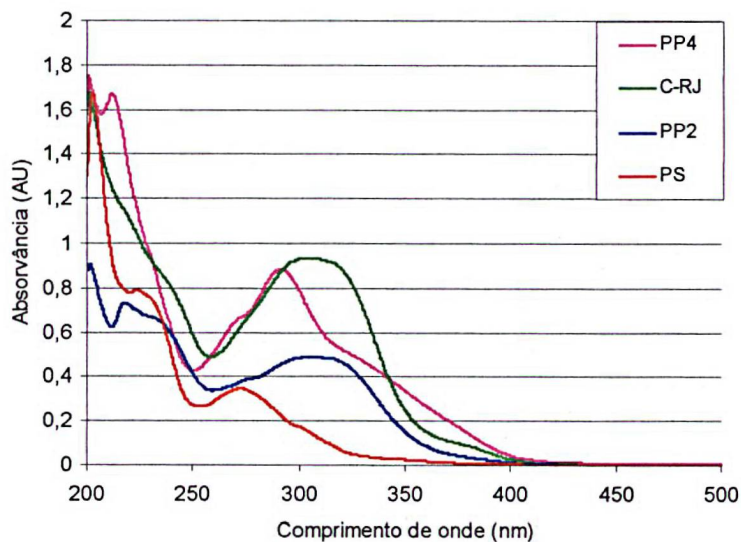
O perfil de varredura tanto dos extratos etanólicos quanto dos aquosos das própolis de Meliponíneos demonstram uma absorvidade extremamente reduzida na faixa correspondente aos flavonóides, principalmente quando comparados aos extratos das amostras de *Apis mellifera* (FIGURAS 28 e 29). Além disso, observa-se que cada amostra testada possui um perfil característico relativo a variações na sua composição, principalmente entre as amostras de *Apis mellifera*.

FIGURA 25 – PERFIL DE VARREDURA DOS EXTRATOS ETANÓLICOS (E) E AQUOSOS (W) DA AMOSTRA DE PRÓPOLIS PP4 EXTRAÍDOS A 45 °C OU TEMPERATURA AMBIENTE (EXTRAÇÃO SEQUENCIAL – 24 E 48 HORAS)



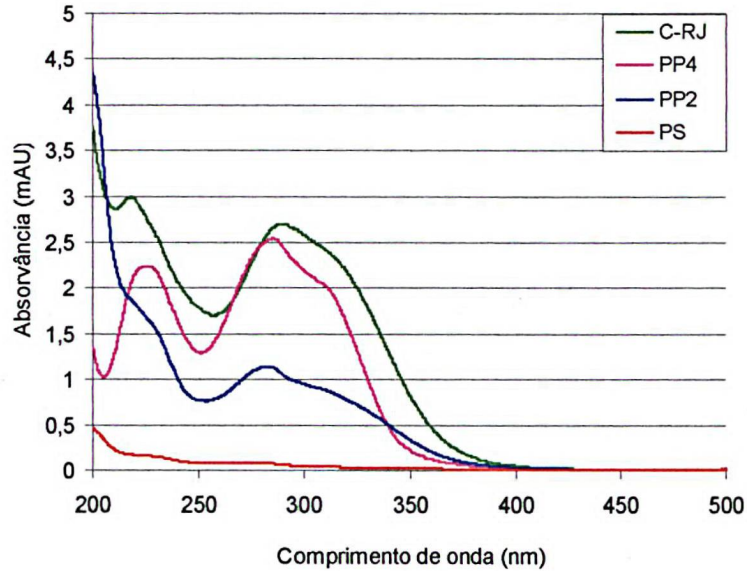
NOTA: Todos os extratos estão na concentração 0,02 mg/mL.

FIGURA 26 – PERFIL DE VARREDURA DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS DE *Apis mellifera* EXTRAÍDOS À TEMPERATURA AMBIENTE (24 HORAS)



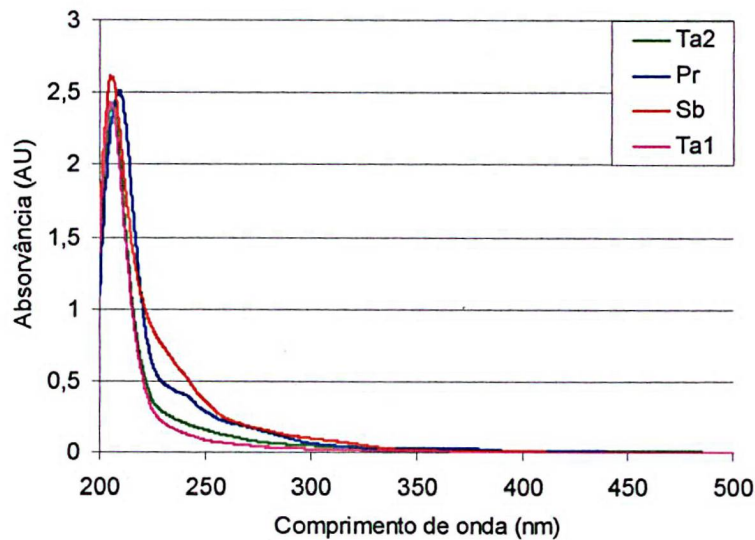
Nota: Todos os extratos estão na concentração de 0,05 mg/mL.

FIGURA 27 – PERFIL DE VARREDURA DOS EXTRATOS AQUOSOS DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS DE *Apis mellifera* EXTRAÍDOS À TEMPERATURA AMBIENTE (24 HORAS)



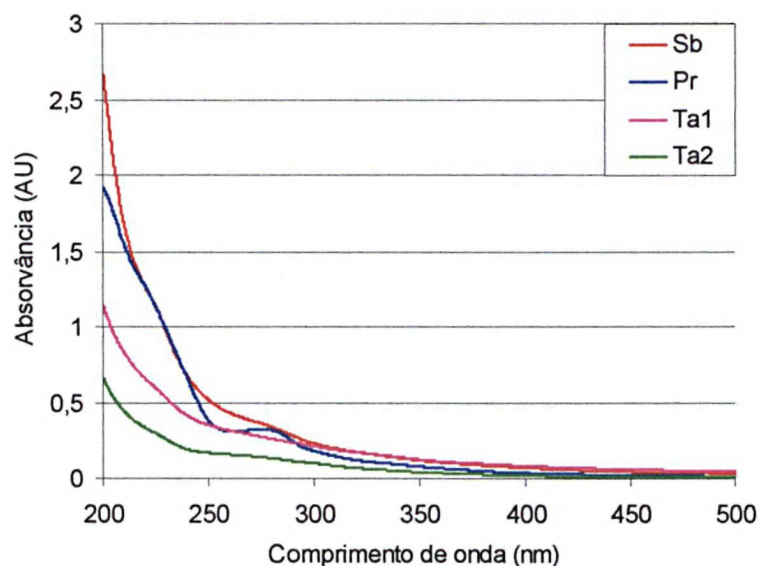
Nota: Todos os extratos estão na concentração de 0,2 mg/mL.

FIGURA 28 – PERFIL DE VARREDURA DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS DE MELIPONÍNEOS EXTRAÍDOS À TEMPERATURA AMBIENTE (24 HORAS)



Nota: Todos os extratos estão na concentração de 0,2 mg/mL.

FIGURA 29 – PERFIL DE VARREDURA DOS EXTRATOS AQUOSOS DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS DE MELIPONÍNEOS EXTRAÍDOS À TEMPERATURA AMBIENTE (24 HORAS)



Nota: Todos os extratos estão na concentração de 0,2 mg/mL.

Em termos de legislação brasileira para os extratos etanólicos de própolis, apenas as amostras de *Apis mellifera* estão de acordo com a instrução normativa nº 3 (Brasil, 2001) apresentando picos de absorção característicos das principais classes de flavonóides conforme descrito na tabela 02.

### 5.3.3 Determinação de flavonóides totais

A maneira mais precisa e exata de se identificar e quantificar flavonóides em produtos naturais é a análise por cromatografia líquida de alta eficiência. Entretanto, quando se pensa em controle de qualidade, é conveniente a introdução de alternativas analíticas mais simples e baratas, pois nesses casos se requer procedimentos que permitam a análise rápida de amostras numerosas e em laboratórios geralmente modestos no que se refere ao instrumental instalado e utilizado por analistas na maioria das vezes sem formação superior. Uma das técnicas que se enquadram bem nesse contexto é a determinação de flavonóides totais por espectrofotometria no UV/Vis através do uso de cloreto de alumínio (Marcucci, 1998).



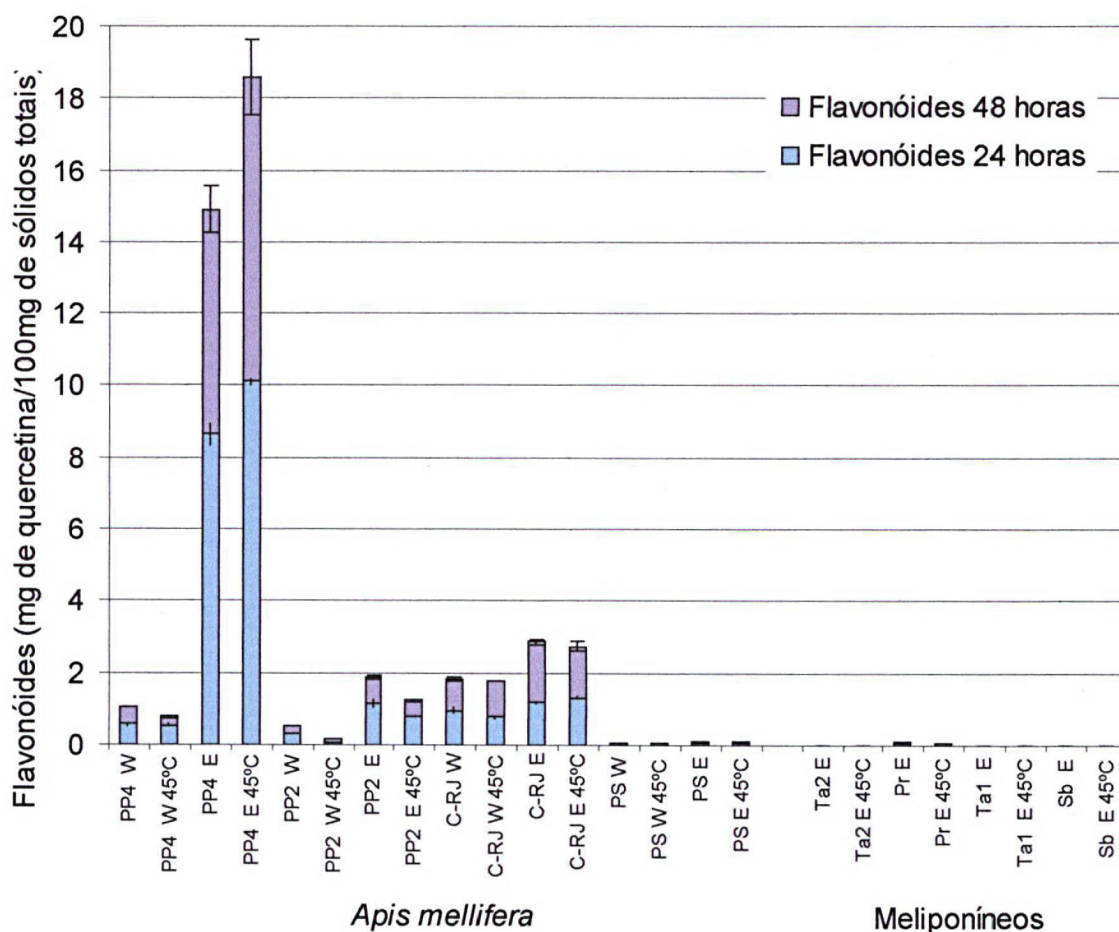
Esse é um método preciso, isto é, reprodutível, fornecendo desvios muito pequenos ou nulos entre um ensaio e outro com a mesma amostra. No entanto, ele pode ser pouco exato, ou seja, o valor que ele fornece pode ser diferente (geralmente inferior) em relação à quantidade de flavonóides totais realmente presente na amostra analisada. O valor medido e o valor real são tanto mais próximos entre si quanto maior a proporção de flavonóis (ex. quercetina) na amostra, e tanto mais distantes quanto maior a proporção de flavonas (ex. crisina). Isso se deve ao fato de que o comprimento de onda selecionado (425 nm) corresponde à banda de absorção do complexo quercetina-alumínio. A utilização da quercetina como padrão se justifica, pois este flavonol é certamente o mais comum dos flavonóides encontrado nas plantas. Os complexos dos outros flavonóis com alumínio absorvem bem próximo de 425 nm, mas os complexos derivados de flavonas absorvem em comprimentos de onda inferiores, o que causa uma subestimativa nas determinações de misturas muito ricas em flavonas (Marcucci, 1998).

No entanto, essa limitação não reduz a validade do método para propósitos de controle de qualidade. Nesse contexto, é mais importante precisão do que exatidão, pois no controle de qualidade o que normalmente se faz é estabelecer limites inferiores e superiores, dentro dos quais os valores encontrados devem se situar nas condições prescritas pelo método. No caso de amostras de própolis, espera-se que o material de uma certa região, produzido por uma certa linhagem de abelhas, apresente boa uniformidade, caracterizada por determinados parâmetros quantitativos que devem variar muito pouco entre uma partida e outra. É a existência dessa uniformidade que o controle de qualidade procura verificar. Desvios muito grandes em relação aos limites estabelecidos podem significar adulterações, manipulações inadequadas, armazenamento por períodos inaceitavelmente longos, esgotamento dos princípios ativos da amostra etc. A determinação do conteúdo real de flavonóides nas amostras analisadas é menos importante, embora a exatidão seja uma característica desejável nos procedimentos para o controle de qualidade (Marcucci, 1998).

Quando observamos o teor de flavonóides das amostras analisadas utilizando a metodologia de complexação com alumínio, verificamos que as amostras coletadas por abelhas da espécie *Apis mellifera* são mais concentradas em

flavonóides do que as amostras coletadas por Meliponíneos (FIGURA 30), o que foi corroborado através da determinação espectrofotométrica de varredura.

FIGURA 30 – TEOR DE FLAVONÓIDES TOTAIS DOS EXTRATOS ETANÓLICOS (E) E AQUOSOS (W) DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS EXTRAÍDOS A 45 °C OU À TEMPERATURA AMBIENTE (EXTRAÇÃO SEQUENCIAL – 24 E 48 HORAS)



O teor de flavonóides nos extratos etanólicos das amostras de *Apis mellifera* PP4, C-RJ, PP2 e PS foram de 16, 3, 1,5 e 0,1 % m/m respectivamente. Pode-se observar que o extrato da amostra PP4 possui um teor de flavonóides 5 vezes superior ao da amostra C-RJ. Essa diferença na concentração de flavonóides não foi observada na metodologia de absorvidade a 290 nm. Isto indica que a metodologia de absorvidade é um método muito inespecífico para a determinação do teor de flavonóides totais, não se correlacionando necessariamente com a metodologia de complexação dos flavonóides com o cátion alumínio.

Estes resultados são diferentes dos obtidos por Park *et al.* (1997) que sugere que o método de determinação do teor de flavonóides totais para os extratos etanólicos de própolis se correlaciona com o grau de absorvidade a 290 nm e, portanto, a determinação da absorvidade a 290 nm representa a concentração de flavonóides totais nestas amostras (Park *et al.*, 1997; Nothenberg, 1997).

No extrato aquoso o teor de flavonóides totais para as amostras de *Apis mellifera* PP4, C-RJ, PP2 e PS foram de 0,9, 1,8, 0,3 e 0,04 % m/m respectivamente. Neste caso, a amostra com maior teor de flavonóides totais foi à amostra C-RJ com o dobro do teor da amostra PP4, porém bem inferiores aos obtidos com os extratos etanólicos, sendo estes valores estatisticamente significativos ( $p=0,0000$ ).

Os extratos etanólicos e aquosos das amostras de própolis de Meliponíneos apresentaram teores de flavonóides menores que 0,02 % m/m em média.

Os extratos etanólicos de própolis PP4, PP2 e C-RJ estão de acordo com a instrução normativa nº 3 (Brasil, 2001) no que se refere ao teor de flavonóides (mínimo de 0,25% m/m) sendo que as amostras PS e as coletadas por Meliponíneos não atingem o teor mínimo exigido por esta legislação.

Essa diversidade de resultados obtidos para as diferentes amostras está de acordo com vários autores que sugerem que a composição química dos flavonóides principais nos extratos etanólicos de própolis são qualitativamente e quantitativamente variados dependendo das diferenças regionais e que a quantidade e a qualidade dos flavonóides presentes nas própolis também variam dependendo da variedade da abelha que coleta a própolis, mesmo na mesma região (Koo e Park, 1996).

Através das análises estatísticas dos resultados dos teores de flavonóides verificou-se que o procedimento de extração utilizando aquecimento não proporcionou aumento nos teores de flavonóides (valor de  $p=0,5596$ ), independentemente do solvente utilizado.

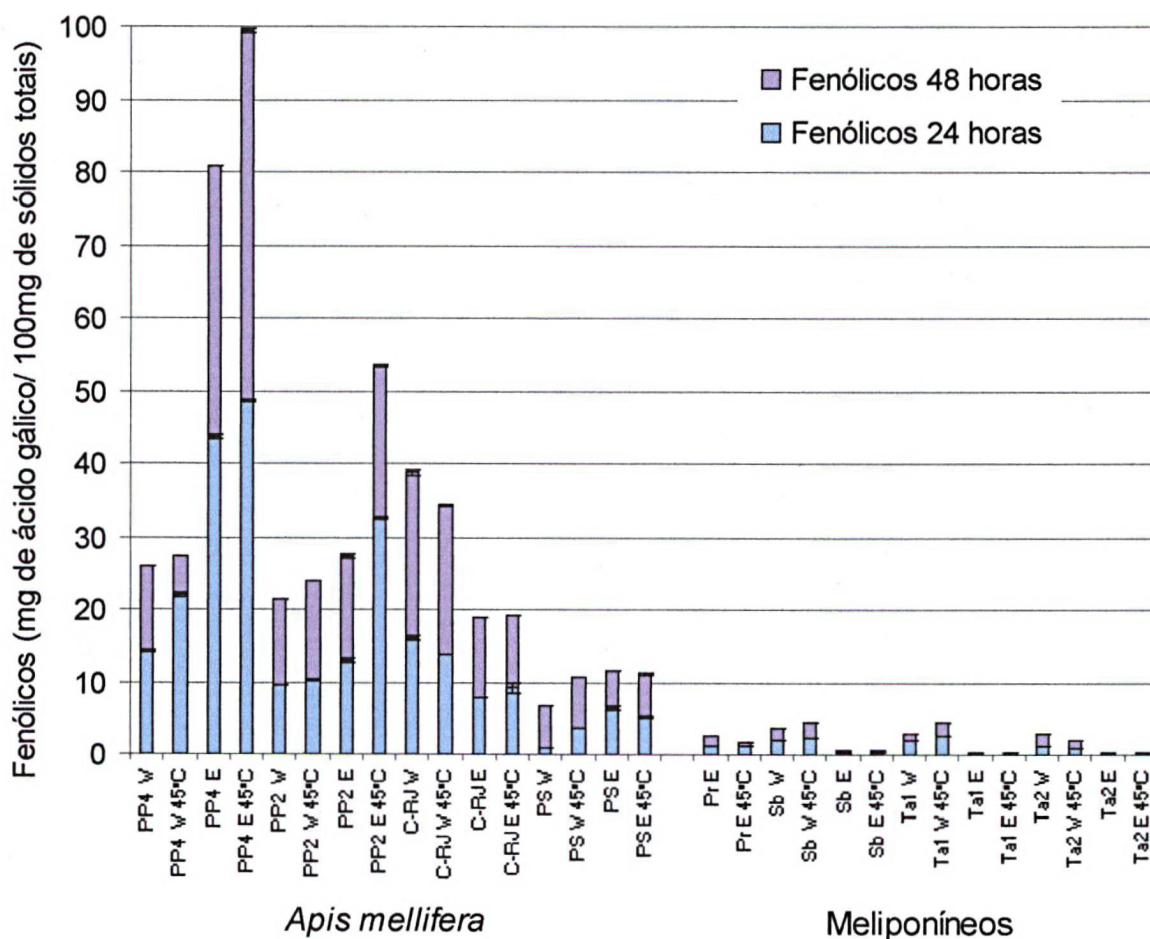
O procedimento de reextração possibilita obter uma quantidade de flavonóides tão alta quanto aquela obtida na primeira extração (valor de  $p = 0,5722$ ), proporcionando um acréscimo de aproximadamente 100% de flavonóides no extrato final. Os resultados demonstram então, que este procedimento é indispensável para a extração destes princípios ativos. Desta forma, alguns autores que utilizam apenas uma extração de 24 horas para a obtenção dos extratos ativos, estão subestimando

as quantidades de flavonóides dos mesmos, com a ressalva de que excesso de álcool na primeira extração seria de menor praticidade e/ou economicidade.

#### 5.3.4 Determinação de fenólicos totais

Quando observamos os resultados da determinação do teor de fenólicos totais nas amostras de própolis verificamos que as amostras coletadas por abelhas da espécie *Apis mellifera* são mais concentradas em fenólicos do que as amostra coletadas por Meliponíneos (FIGURA 31). Perfil também observado para o teor de flavonóides totais.

FIGURA 31 – TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS DOS EXTRATOS ETANÓLICOS (E) E AQUOSOS (W) DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS EXTRAÍDOS A 45 °C OU TEMPERATURA AMBIENTE (EXTRAÇÃO SEQUENCIAL – 24 E 48 HORAS)



O teor de fenólicos nos extratos etanólicos das amostras de *Apis mellifera* PP4, C-RJ, PP2 e PS foram de 90, 19, 40 e 11 % m/m respectivamente. A amostra que apresenta o maior teor de fenólicos totais é a PP4, sendo a amostra PS aquela com menor teor, perfil este também observado na determinação de flavonóides totais. Há, porém, para as amostras C-RJ e PP2 uma inversão entre os teores de fenólicos totais quando comparados aos teores de flavonóides totais. Neste caso, a amostra C-RJ se apresentou mais concentrada em flavonóides e menos em fenólicos quando comparado à amostra PP2.

Embora o extrato etanólico da amostra PS apresente o maior rendimento em sólidos totais entre as própolis de *Apis mellifera* analisadas, 88 %, esta amostra foi a que apresentou o menor rendimento tanto nos teores de flavonóides, 0,04 % m/m, quanto no teor de fenólicos, 11 % m/m. Isto indica que o rendimento em sólidos totais não tem relação com os teores de flavonóides e fenólicos totais.

Nos extratos aquosos o teor de fenólicos totais para as amostras de *Apis mellifera* PP4, C-RJ, PP2 e PS foram de 26, 36, 22 e 8,6 % m/m respectivamente. Neste caso, a amostra com maior teor de fenólicos foi a C-RJ, sendo o perfil do teor de fenólicos similar ao de flavonóides. Porém, o teor de fenólicos nos extratos aquoso das própolis de *Apis mellifera* foi inferior ao obtido com os respectivos extratos etanólicos, com exceção da amostra C-RJ. O etanol apresentou uma eficiência de extração destes compostos biologicamente ativos cerca de 67 % maior quando comparado com a água ( $p=0,0027$ ).

Os extratos etanólicos das amostras Pr, Sb, Ta1 e Ta2 de Meliponíneos apresentam teores de fenólicos de 2, 0,5, 0,2, 0,3 % m/m respectivamente. Sendo o teor de fenólicos na amostra Pr pelo menos 4 vezes maior em comparação com as outras de Meliponíneos. O teor de fenólicos nos extratos aquosos foram de 4,1, 3,7, 2,4 % m/m para as amostras Sb, Ta1 e Ta2 respectivamente.

Quando analisamos os teores de fenólicos das amostras de própolis de Meliponíneos verificamos que, ao contrário do obtido para as amostras de *Apis mellifera*, os extratos aquosos apresentam teores de fenólicos totais maiores que os extratos etanólicos. Neste caso, a água é o solvente mais eficiente na extração destes compostos. Apesar disto, a quantidade de fenólicos das amostras de Meliponíneos é muito pequena quando comparada à concentração de fenólicos nos extratos de própolis de *Apis mellifera*.

Como a instrução normativa nº 3 (Brasil, 2001) determina que o teor mínimo de fenólicos nos extratos etanólicos de própolis deve ser de 0,5% (m/m), apenas as amostras de *Apis mellifera* e as amostras Pr e Sb de Meliponíneos estão de acordo com a legislação vigente.

Da mesma forma como na determinação de flavonóides totais, a análise estatística dos resultados dos teores de fenólicos demonstrou não haver diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,2066$ ) entre os extratos obtidos com e sem aquecimento.

Além disso, o procedimento de reextração possibilita obter quantidades de fenólicos tão altas quanto aquelas obtidas na primeira extração ( $p = 0,8799$ ). Esse acréscimo de aproximadamente 100% no teor de fenólicos também foi observado para o teor de flavonóides totais, comprovando a importância de se realizar a extração seqüencial nas amostras de própolis. Desta forma, quando não se realiza uma segunda extração nas amostras de própolis o teor de fenólicos totais está subestimando na própolis original.

### 5.3.5 Atividades biológicas

As própolis de várias regiões abrangendo desde a zona temperada até os trópicos exibem uma atividade biológica similar, apesar das diferenças na composição química. Banskota *et al.* (2000) e Bankova *et al.* (2000) sugerem então que para propósitos de controle de qualidade, testes químicos devem ser combinados com testes biológicos, especialmente antimicrobianos, para a avaliação de própolis de diferentes origens botânicas. Além disso, características como pureza, porcentagem de cera e resíduos insolúveis também devem ser relacionados (Bankova *et al.*, 2000). Deste modo ensaios para se determinar a atividade antimicrobiana e a atividade antioxidante foram selecionados para testar a qualidade das oito diferentes amostras de própolis.

#### 5.3.5.1 Atividade antimicrobiana

Como descrito anteriormente as cepas de *Staphylococcus aureus* e sua variante resistente MRSA (cepas gram positivas) são freqüentes causas de vários



tipos de infecções hospitalares. Outra cepa gram positiva de grande importância é *Streptococcus pyogenes*, um patógeno responsável por várias doenças, em particular a faringotonsilite em crianças. Durante os últimos anos, estes microorganismos também têm demonstrado um aumento de resistência aos macrolídeos, drogas de escolha no tratamento destas doenças (Bosio *et al.*, 2000). Devido ao aumento de resistência destes patógenos comuns frente à antibioticoterapia, estas cepas foram selecionadas para se verificar a atividade antimicrobiana dos diferentes extratos de própolis.

Conforme Fontana *et al.* (2004) a atividade bactericida e bacteriostática é mais precisamente testada em meio líquido e então expressa em concentração inibitória mínima (MIC). Esta metodologia se aplica apenas a bioensaios individuais. Já a metodologia de difusão em disco em meio sólido, apesar de limitada pela solubilidade dos compostos testados, permite a detecção de várias amostras simultaneamente em uma mesma placa de Petri. Pela simplicidade desta metodologia, a atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos e aquosos de própolis foram testados através do método de difusão em disco.

Analisando os resultados da antibiose em difusão de disco dos extratos etanólicos e aquosos das amostras de própolis (TABELA 08), observou-se que os extratos etanólicos apresentaram um efeito inibitório mais pronunciado do que os extratos aquosos, tanto para a cepa *Staphylococcus aureus* padrão quanto para a MRSA.

Dentre os extratos aquosos testados apenas aqueles obtidos com aquecimento da amostra PP4, tanto 24 quanto 48 horas, apresentaram inibição frente à cepa MRSA. Este efeito inibitório foi observado apesar de estes extratos não possuírem o maior teor de flavonóides e fenólicos quando comparados às outras amostras analisadas. Além disso, nenhum extrato aquoso apresentou inibição frente à cepa selvagem *Staphylococcus aureus*. Obviamente, o aquecimento permite uma solubilização diferenciada de componentes bioativos.

Dentre os extratos etanólicos analisados, verificamos que novamente, apenas os extratos etanólicos das amostras PP4 e PP2 com aquecimento (FIGURA 32) apresentaram inibição frente à cepa *Staphylococcus aureus*. Em relação à cepa metilina resistente, MRSA, os extratos etanólicos com e sem aquecimento das amostras PP4, C-RJ, PP2 e Pr possuem inibição similar sobre esta cepa.

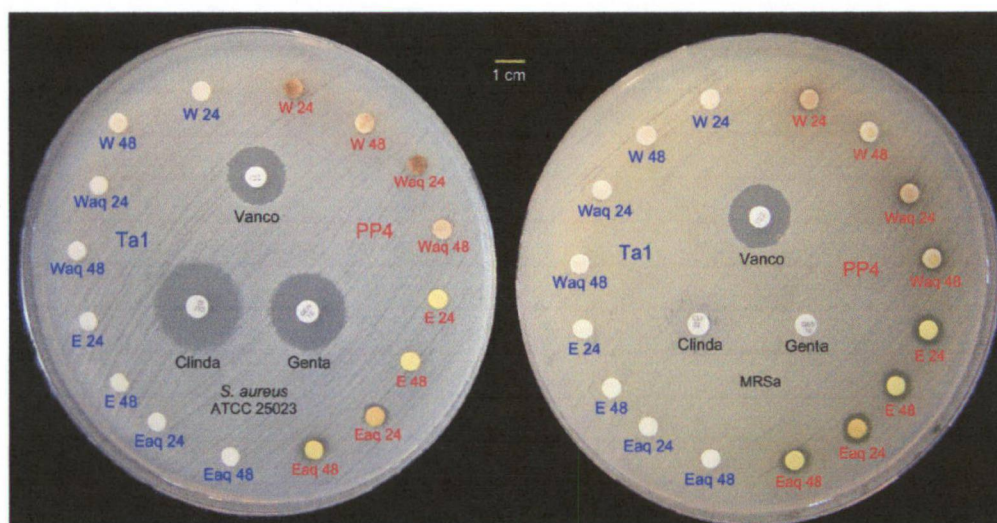
TABELA 08 – TESTE DE INIBIÇÃO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS (E) E AQUOSOS (W) DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS EXTRAÍDOS A 45 °C OU TEMPERATURA AMBIENTE (EXTRAÇÃO SEQUENCIAL – 24 E 48 HORAS) FRENTE À *S. aureus* E MRSA

PRÓPOLIS		Halo de inibição (mm)		AMOSTRAS		Halo de inibição (mm)	
		<i>S.aureus</i>	MRSA			<i>S.aureus</i>	MRSA
PP4	W 24 hs	Ausente	Ausente	C-RJ	W 24 hs	Ausente	Ausente
	W 48 hs	Ausente	Ausente		W 48 hs	Ausente	Ausente
	W (45°C) 24 hs	Ausente	8		W (45°C) 24 hs	Ausente	Ausente
	W (45°C) 48 hs	Ausente	8		W (45°C) 48 hs	Ausente	Ausente
	E 24 hs	Ausente	12		E 24 hs	Ausente	10
	E 48 hs	Ausente	12		E 48 hs	Ausente	10
	E (45°C) 24 hs	10	12		E (45°C) 24 hs	Ausente	12
	E (45°C) 48 hs	10	12		E (45°C) 48 hs	Ausente	12
Ta1	W 24 hs	Ausente	Ausente	SD	W 24 hs	Ausente	Ausente
	W 48 hs	Ausente	Ausente		W 48 hs	Ausente	Ausente
	W (45°C) 24 hs	Ausente	Ausente		W (45°C) 24 hs	Ausente	Ausente
	W (45°C) 48 hs	Ausente	Ausente		W (45°C) 48 hs	Ausente	Ausente
	E 24 hs	Ausente	Ausente		E 24 hs	Ausente	Ausente
	E 48 hs	Ausente	Ausente		E 48 hs	Ausente	Ausente
	E (45°C) 24 hs	Ausente	Ausente		E (45°C) 24 hs	Ausente	Ausente
	E (45°C) 48 hs	Ausente	Ausente		E (45°C) 48 hs	Ausente	Ausente
Vancomicina 30 µg		18	19	Vancomicina 30 µg		18	20
Clindamicina 02 µg		26	Ausente	Clindamicina 02 µg		26	Ausente
Gentamicina 10 µg		24	Ausente	Gentamicina 10 µg		22	Ausente
PRÓPOLIS		Halo de inibição (mm)		PRÓPOLIS		Halo de inibição (mm)	
		<i>S.aureus</i>	MRSA			<i>S.aureus</i>	MRSA
PS	W 24 hs	Ausente	Ausente	PP2	W 24 hs	Ausente	Ausente
	W 48 hs	Ausente	Ausente		W 48 hs	Ausente	Ausente
	W (45°C) 24 hs	Ausente	Ausente		W (45°C) 24 hs	Ausente	Ausente
	W (45°C) 48 hs	Ausente	Ausente		W (45°C) 48 hs	Ausente	Ausente
	E 24 hs	Ausente	Ausente		E 24 hs	Ausente	9
	E 48 hs	Ausente	Ausente		E 48 hs	Ausente	9
	E (45°C) 24 hs	Ausente	Ausente		E (45°C) 24 hs	9	10
	E (45°C) 48 hs	Ausente	Ausente		E (45°C) 48 hs	9	10
Ta2	W 24 hs	Ausente	Ausente	PT	W 24 hs	Nd	Ausente
	W 48 hs	Ausente	Ausente		W 48 hs	Nd	Ausente
	W (45°C) 24 hs	Ausente	Ausente		W (45°C) 24 hs	Nd	Ausente
	W (45°C) 48 hs	Ausente	Ausente		W (45°C) 48 hs	Nd	Nd
	E 24 hs	Ausente	Ausente		E 24 hs	Ausente	9
	E 48 hs	Ausente	Ausente		E 48 hs	Ausente	9
	E (45°C) 24 hs	Ausente	Ausente		E (45°C) 24 hs	Ausente	10
	E (45°C) 48 hs	Ausente	Ausente		E (45°C) 48 hs	Ausente	10
Vancomicina 30 µg		19	20	Vancomicina 30 µg		18	20
Clindamicina 02 µg		28	Ausente	Clindamicina 02 µg		22	Ausente
Gentamicina 10 µg		24	Ausente	Gentamicina 10 µg		22	Ausente

NOTA: Nd – não determinado



FIGURA 32 – ANTIBIOGRAMA DE DIFUSÃO EM DISCO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS (E) E AQUOSOS (W) DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS PP4 E Ta1 EXTRAÍDOS A 45 °C OU TEMPERATURA AMBIENTE (EXTRAÇÃO SEQUENCIAL – 24 E 48 HORAS) FRENTE ÀS CEPAS *S. aureus* E MRSa



As amostras de própolis de *Apis mellifera* que apresentaram atividade antimicrobiana frente à cepa *Staphylococcus aureus* e MRSa são as que apresentam maiores teores de flavonóides e fenólicos totais. Entre as própolis de Meliponíneos o extrato etanólico da amostra Pr, apesar de possuir um teor muito baixo de flavonóides, possui um teor mais elevado de fenólicos totais. Esta circunstância explica a maior atividade desta amostra frente à cepa MRSa quando comparada às demais amostras de Meliponíneos.

De uma maneira geral, é interessante observar que os extratos apresentaram maior inibição frente à cepa meticilina resistente do que frente à cepa selvagem. Como foi demonstrado por Alcaráz *et al.* (2000) a atividade anti-MRSa dos flavonóides varia de acordo com suas estruturas moleculares, sendo as chalconas mais efetivas do que as flavonas que por sua vez tem atividade similar as flavanonas. A região carbonílica da molécula é de maior importância, pois está mais diretamente correlacionada à atividade anti-MRSa dos flavonóides. Além disto, de um modo geral, a introdução de grupos OH na posição 2' das chalconas e 5 das flavanonas (ou flavonas) aumenta a atividade inibitória do flavonóide, enquanto que a introdução de grupos OCH<sub>3</sub> produz o efeito contrário (Alcaráz *et al.*, 2000). Diferenças quantitativas e principalmente qualitativas no teor de flavonóides das

amostras de própolis em função da flora presente na região, explicam em parte a ação acentuada de algumas amostras de própolis frente a esta cepa antibiótico resistente.

Ao contrário do esperado, nenhum extrato de própolis testado apresentou inibição frente à cepa *Streptococcus pyogenes*, nem mesmo aqueles com maiores teores de flavonóides e ácidos fenólicos. O halo de inibição apresentado pelo antibiótico padrão eritromicina foi de 19 mm.

#### 5.3.5.2 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante (capacidade ou potencial antioxidante) é um parâmetro utilizado vastamente (em conjunto com outros) para caracterizar diferentes materiais biológicos. Esta atividade está relacionada com compostos capazes de proteger um sistema biológico contra os efeitos danosos de processos ou reações que causam oxidação excessiva, envolvendo espécies reativas de (nitrogênio) oxigênio (Arnao, 2000).

Durante a medida da atividade antioxidante dois fatores devem ser levados em consideração. O primeiro é que a eficiência do seqüestro do radical é determinada não apenas pela reatividade do antioxidante contra o radical, mas também pela sua concentração. O segundo fator está relacionado com o espectro de ação do antioxidante por sua vez modulado pela solubilidade (aquoso ou organossolvente); por exemplo, a vitamina C (ácido ascórbico) é um potente seqüestrador de radicais hidrofílicos, mas não de radicais lipofílicos (Niki, 2002).

A atividade antioxidante *in vivo* é determinada por vários fatores, tais como sua reatividade frente ao radical, o número de radicais que consegue seqüestrar, a destruição do radical gerado pelo antioxidante, a concentração e a mobilidade, a interação com outros antioxidantes e o sítio de geração e reatividade do radical (Niki, 2002).

#### 5.3.5.2.1 Avaliação da capacidade antioxidante total através da formação de um complexo fosfomolibdênio

O método de complexação pelo fosfomolibdênio é uma maneira simples e barata de se avaliar a capacidade antioxidante total (CAT) de uma mistura complexa de compostos, como o caso da própolis. Possui a grande vantagem de avaliar a capacidade antioxidante tanto de componentes lipofílicos quanto de hidrofílicos.

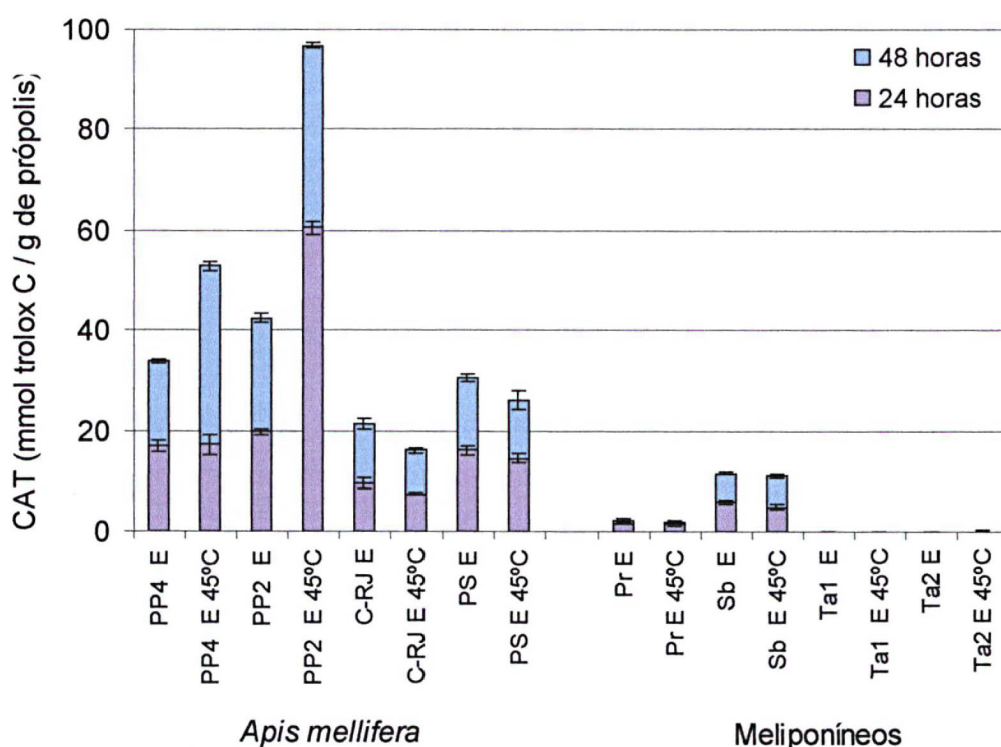
A CAT tanto dos extratos etanólicos quanto dos extratos aquosos de própolis variou enormemente de acordo com a amostra testada ( $p=0,0000$ ), como demonstrado pelas figuras 33 e 34. De uma maneira geral, as amostras de *Apis mellifera* possuem uma maior atividade quando comparadas às amostras de Meliponíneos.

Quando analisamos os extratos etanólicos das própolis de *Apis mellifera*, verificamos que a amostra PP2, apesar de não possuir o maior teor de flavonóides e fenólicos entre as amostras testadas, foi a que apresentou maior capacidade antioxidante total, 68 mmol de Trolox C<sup>®</sup> / g de própolis. Quando comparada com a CAT da amostra PP4, a amostra PP2 se apresenta 59% superior. Além disso, a amostra de própolis PS, apesar de não possuir teores de flavonóides e fenólicos em quantidades significativas quando comparada as demais amostras, apresentou uma CAT (27 mmol de Trolox C<sup>®</sup> / g de própolis) maior que a amostra C-RJ (17,5 mmol de Trolox C<sup>®</sup> / g de própolis), rica nesses compostos.

A atividade antioxidante das amostras de Meliponíneos é relativamente pequena, em média 6 mmol de Trolox C<sup>®</sup> / g de própolis, e, além disso, duas das quatro amostras analisadas, Ta1 e Ta2 não demonstraram atividade antioxidante por esta metodologia. A amostra que apresentou maior atividade entre as Meliponíneas foi à amostra Sb, 10 mmol de Trolox C<sup>®</sup> / g de própolis, que apesar de não possuir o maior teor de flavonóides possui um alto teor de fenólicos em relação às outras amostras coletadas por Meliponíneos. Além disso, a amostra Pr apesar de ser a amostra de Meliponíneos com maior teor de flavonóides não apresentou uma ação antioxidante pronunciada por esta metodologia, 2 mmol de Trolox C<sup>®</sup> / g de própolis.

Estas observações indicam claramente que deve haver um sinergismo diferenciado seja entre os dois tipos de fenólicos seja com outros componentes não elucidados.

FIGURA 33 – AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (CAT) DOS EXTRATOS ETANÓLICOS (E) DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS EXTRAÍDOS A 45°C OU À TEMPERATURA AMBIENTE (EXTRAÇÃO SEQUENCIAL – 24 E 48 HORAS)



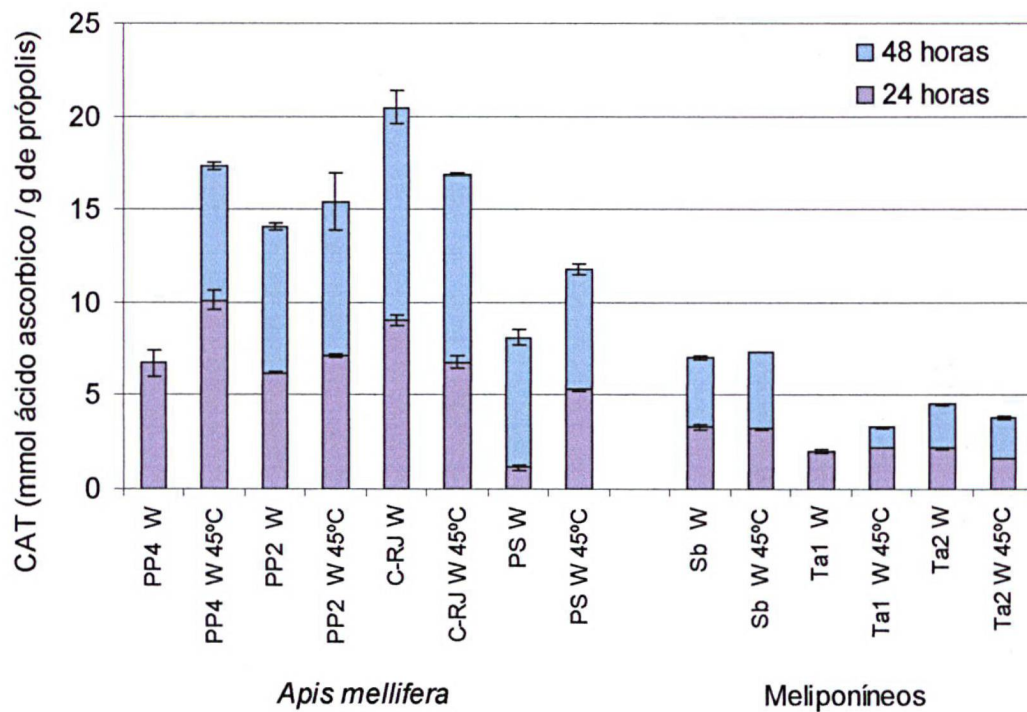
Dentre os extratos aquosos de *Apis mellifera* a amostra C-RJ, que possui os maiores teores de flavonóides e fenólicos entre as amostras testadas, foi a que apresentou maior CAT, 18 mmol de ácido ascórbico / g de própolis. Quando comparada com a amostra PP2, a amostra C-RJ apresenta uma CAT 28% superior. Apesar da CAT do extrato etanólico da própolis PS ter sido relativamente elevada, o extrato aquoso possui o menor valor entre as amostras testadas, 9,5 mmol de ácido ascórbico / g de própolis.

Quando analisamos a capacidade antioxidante das própolis de Meliponíneos, observamos que o extrato aquoso da amostra Sb, assim como o extrato etanólico,



apresentou a maior atividade dentre as amostras destas abelhas desprovidas de ferrão, 6,5 mmol de ácido ascórbico / g de própolis. Os extratos aquosos das amostras Ta1 e Ta2, ao contrário dos extratos etanólicos, apresentaram uma CAT de em média 3 mmol de ácido ascórbico / g de própolis por esta metodologia.

FIGURA 34 – AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (CAT) DOS EXTRATOS AQUOSOS (W) DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS EXTRAÍDOS A 45 °C OU À TEMPERATURA AMBIENTE (EXTRAÇÃO SEQUENCIAL – 24 E 48 HORAS)



NOTA: A amostra PP4 W 48 horas não foi determinada

Através das análises estatísticas verificou-se que a extração realizada com aquecimento aumenta a capacidade antioxidante total (CAT) dos extratos etanólicos em 45,76% ( $p=0,0000$ ) e dos extratos aquosos em 10% ( $p=0,0253$ ).

A análise estatística demonstra também que os extratos etanólicos obtidos com a reextração possuem uma atividade tão pronunciada ( $p=0,1709$ ) quanto àqueles obtidos na primeira extração. Quando avaliamos a CAT dos extratos aquosos essa atividade é ainda mais pronunciada nos extratos obtidos com a reextração, possuindo uma atividade 13% maior quando comparados aos extratos obtidos na primeira extração ( $p=0,0017$ ). Desta forma, quando não se realiza uma

segunda extração nas amostras de própolis, além dos teores de flavonóides e fenólicos serem subestimados, a atividade biológica também o será, o que comprometerá a qualidade das amostras analisadas.

#### 5.3.5.2.2 Método de reatividade das amostras de própolis com o radical livre DPPH<sup>•</sup>

O sistema modelo de seqüestro do radical livre DPPH<sup>•</sup> é um método simples para se avaliar a atividade anti-radical livre de compostos antioxidantes (Kumazawa, 2004). Essa metodologia tem uma importante limitação quando se interpreta a ação antioxidante de compostos hidrofílicos já que o DPPH<sup>•</sup> pode ser dissolvido apenas em meio orgânico (especialmente etanol) e não em meio aquoso (Arnao, 2000).

##### 5.3.5.2.2.1 Cinética da reação de consumo do DPPH<sup>•</sup>

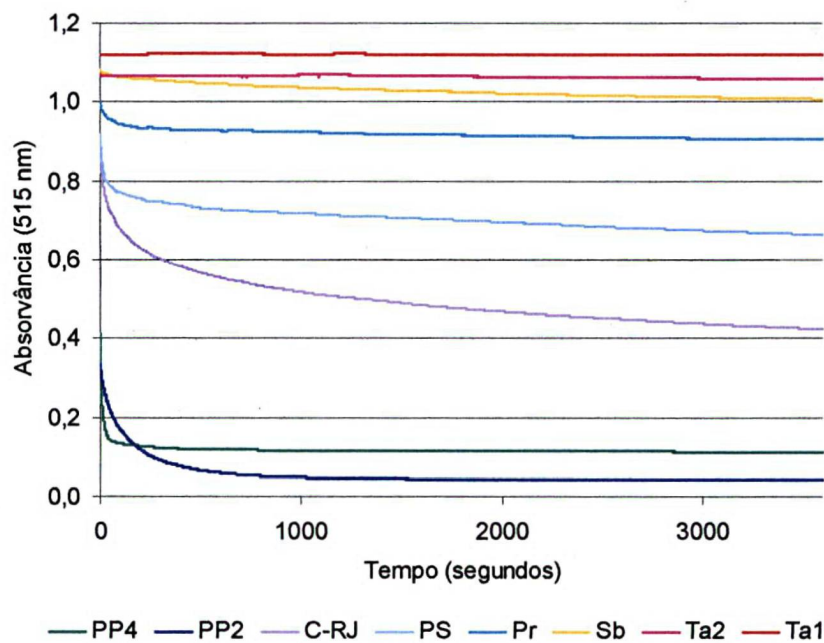
A evolução de diferentes reações cinéticas depende da natureza do antioxidante testado. Podem ocorrer três tipos de comportamentos cinéticos entre as amostras: cinética rápida, quando reagem rapidamente com o DPPH<sup>•</sup>, atingindo o final da reação em menos de 1 minuto; cinética intermediária quando o final da reação é atingido em até 30 minutos e cinética lenta quando a reação demora mais de uma hora para terminar (Brand-Williams, Cuvelier, Berst, 1995).

Não foram observadas variações no perfil cinético das reações de consumo do DPPH<sup>•</sup> entre as extrações etanólicas de cada amostra de própolis independentemente da metodologia de extração utilizada. Deste modo, apenas os extratos com 24 horas de extração sem aquecimento são apresentados nesta dissertação.

Entre os extratos etanólicos de própolis testados a 100 µg/ml (FIGURA 35), pode-se observar que apenas o extrato etanólico da amostra PP4 possui uma cinética rápida de reação com o radical livre DPPH<sup>•</sup>. Desta forma esta amostra foi a mais ativa contra este radical livre. O extrato etanólico da amostra PP2 possui uma cinética intermediária enquanto as demais amostras analisadas apresentam uma cinética de reação lenta frente ao radical livre DPPH<sup>•</sup>. Quando analisamos a cinética

de reação das amostras de Meliponíneos em uma concentração 50 vezes maior (5000  $\mu\text{g/mL}$ ) (FIGURA 36), verificamos que a amostra Pr nesta concentração passa a ter uma cinética de reação rápida, sendo todo o DPPH<sup>\*</sup> consumido em menos de um minuto. Não foram observadas diferenças para melhor na cinética de reação das outras amostras analisadas nem com este notável incremento de sólidos totais.

FIGURA 35 – CINÉTICA DA REAÇÃO DE CONSUMO DO RADICAL LIVRE DPPH<sup>\*</sup> PELOS EXTRATOS ETANÓLICOS (100  $\mu\text{g/mL}$ ) DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS EXTRAÍDOS À TEMPERATURA AMBIENTE (24 HORAS)



Podemos verificar que o padrão Trolox C<sup>®</sup> possui uma cinética de reação rápida apenas na concentração de 100  $\mu\text{M}$  (FIGURA 37). Em concentrações menores a cinética de reação passa a ser intermediária. Da mesma forma, uma cinética de reação intermediária pode ser observada para o padrão quercetina (FIGURA 38). O Trolox C<sup>®</sup> a 50  $\mu\text{M}$  é suficiente para degradar todo o radical livre presente no meio reacional, embora a reação demore um pouco mais para atingir o final quando comparado a 100  $\mu\text{M}$ . O mesmo pode ser observado com a quercetina a 25  $\mu\text{M}$  quando comparado a quercetina a 50  $\mu\text{M}$ . Além disso, observa-se também que a atividade antioxidante da quercetina em baixas concentrações é mais pronunciada do que a do Trolox C<sup>®</sup>.

FIGURA 36 – CINÉTICA DA REAÇÃO DE CONSUMO DO RADICAL LIVRE DPPH<sup>•</sup> PELOS EXTRATOS ETANÓLICOS (5000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS DE MELIPONÍNEOS EXTRAÍDOS À TEMPERATURA AMBIENTE (24 HORAS)

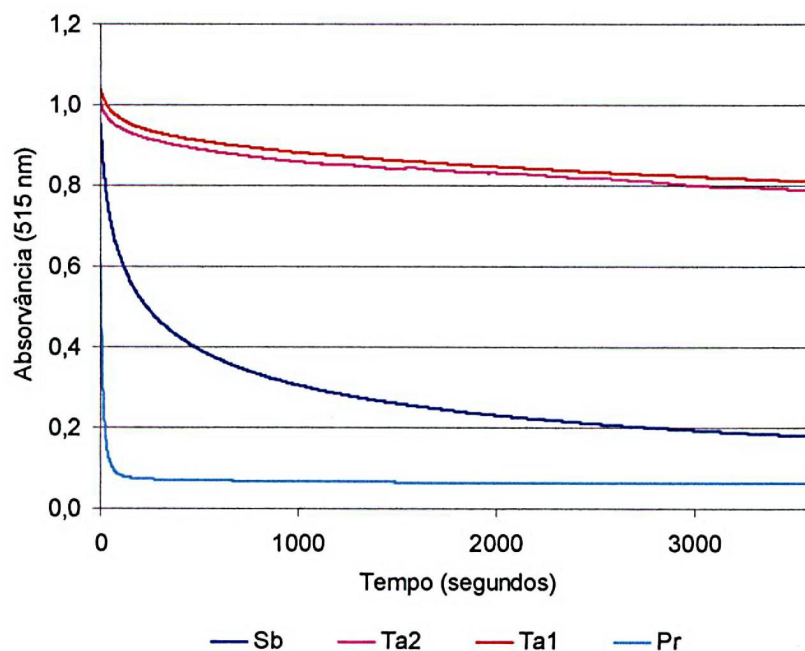


FIGURA 37 – CINÉTICA DA REAÇÃO DE CONSUMO DO RADICAL LIVRE DPPH<sup>•</sup> PELO TROLOX C<sup>®</sup> EM VÁRIAS CONCENTRAÇÕES

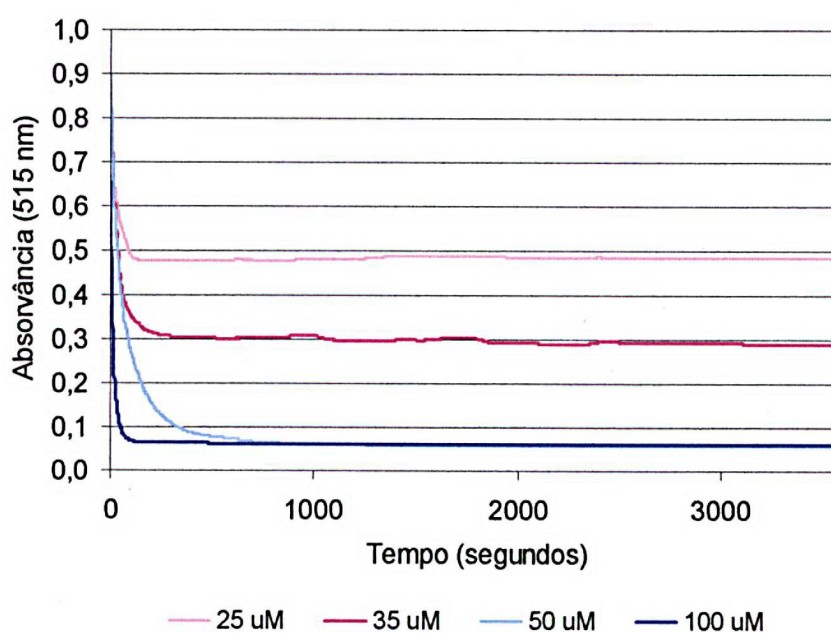
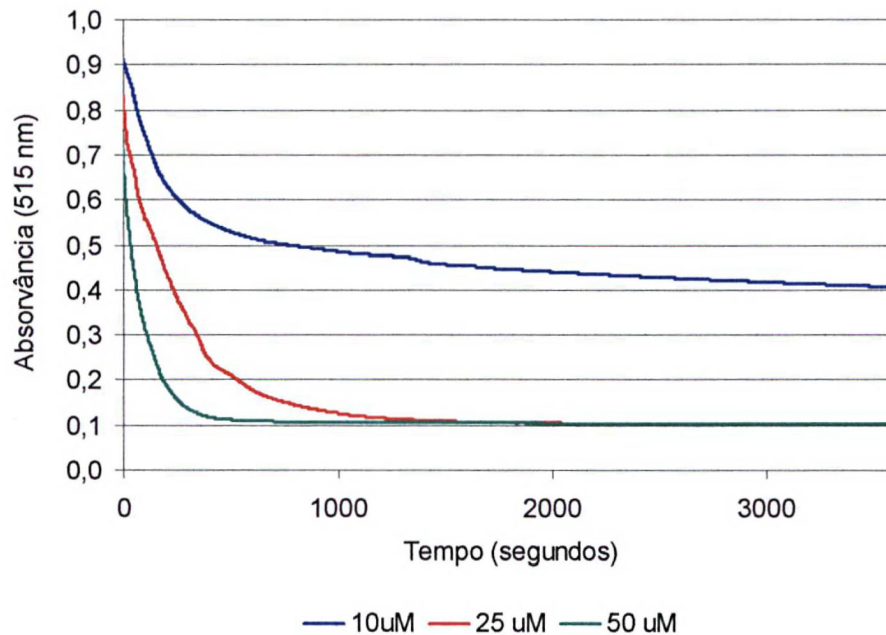




FIGURA 38 – CINÉTICA DA REAÇÃO DE CONSUMO DO RADICAL LIVRE DPPH\* PELA QUERCETINA EM VÁRIAS CONCENTRAÇÕES



É importante notar que nenhuma das amostras analisadas, assim como os padrões utilizados, anulam totalmente a absorvância do radical livre testado. Este fato ocorre, pois alguns dos produtos intermediários formados durante a reação de degradação do radical livre podem possuir uma leve absorvância no comprimento de onda do ensaio.

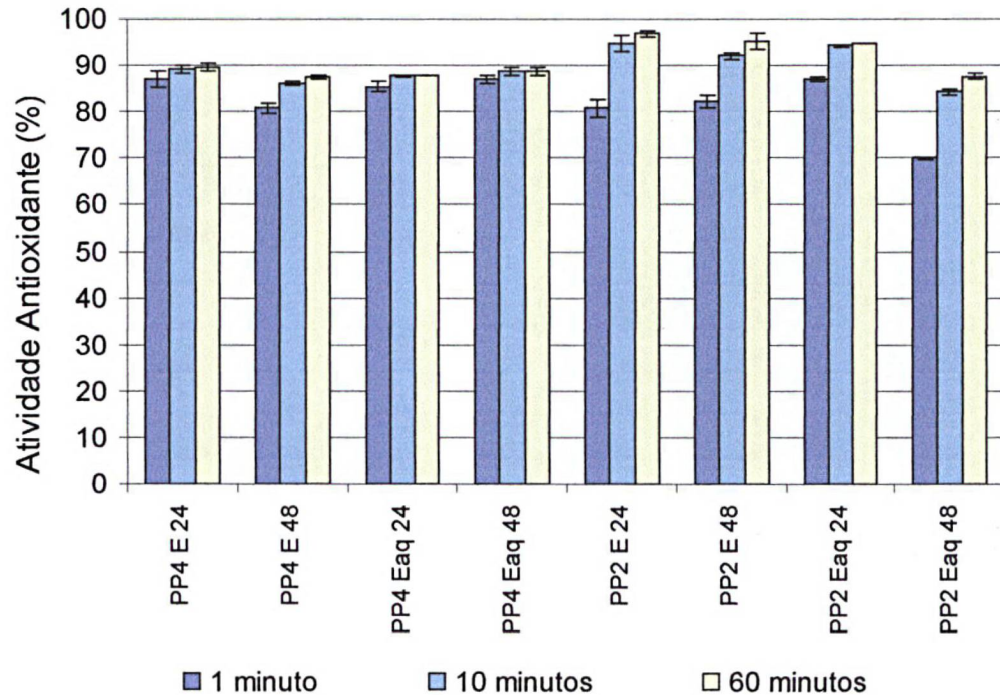
#### 5.3.5.2.2.2 Atividade antioxidante relativa ao consumo de DPPH\* pelos extratos de própolis

Outra maneira para analisar a capacidade antioxidante das amostras de própolis frente ao radical livre DPPH\* é avaliar a porcentagem de degradação deste radical livre (FIGURAS 39, 40 e 41), fixando a concentração de própolis e avaliando a cinética de tempo reacional.

Os extratos etanólicos das amostras PP4, C-RJ, PP2 e PS de *Apis mellifera* (100 µg/ensaio) apresentaram capacidade antioxidante de em média 87, 45, 88 e 23 % respectivamente (FIGURAS 39 e 40). As amostras PP4 e PP2 apresentam praticamente o dobro da atividade da amostra C-RJ, que por sua vez apresenta praticamente o dobro da atividade da amostra PS. Como o teor de flavonóides da

amostra PS é praticamente nulo, o teor de fenólicos pode ser o responsável pela reduzida atividade nesta última amostra.

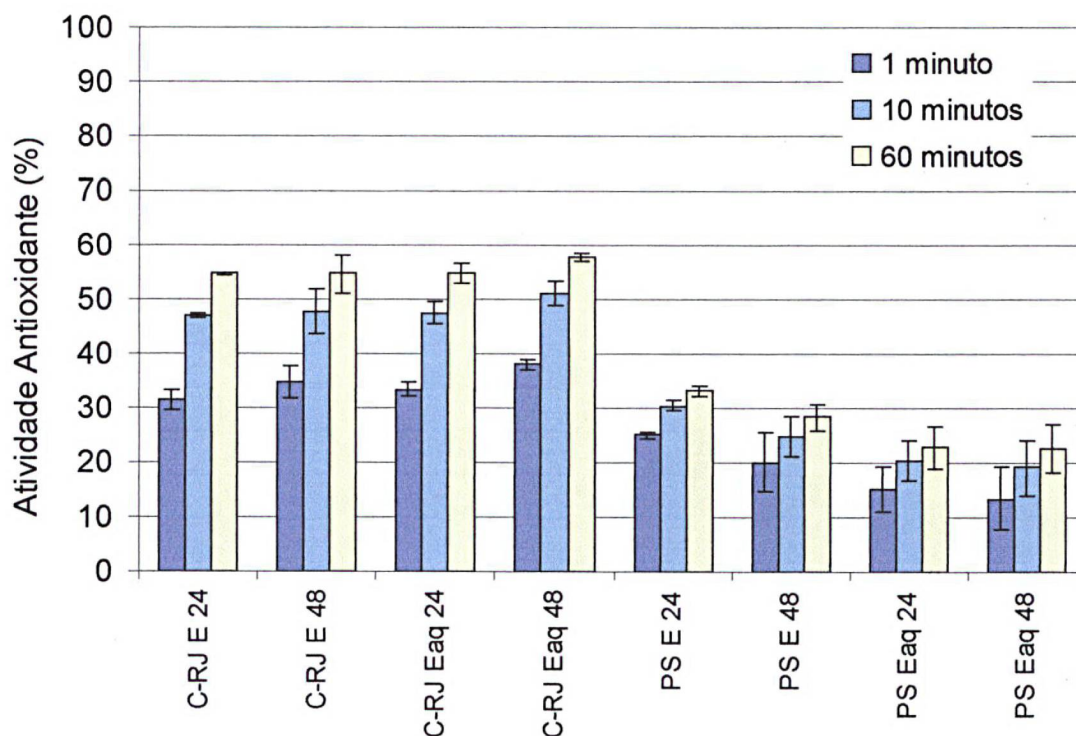
FIGURA 39 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS ETANÓLICOS (E) DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS PP2 E PP4 (100 µg/mL) EXTRAÍDOS A 45 °C OU À TEMPERATURA AMBIENTE (EXTRAÇÃO SEQUENCIAL – 24 E 48 HORAS)



As amostras de própolis coletadas por Meliponíneos possuem uma atividade antioxidante muito reduzida quando comparadas com a das amostras de *Apis mellifera*. Quando analisamos a atividade antioxidante destas amostras em uma concentração cinquenta vezes maior que as amostras de *Apis mellifera* podemos observar um aumento na ação anti-radical livres das amostras Pr e Sb mas nenhum aumento significativo nas amostras Ta1 e Ta2 (FIGURA 41).

Os dados de atividade antioxidante tanto para os extratos de própolis quanto para os padrões utilizados, estão de acordo com Niki (2002) que afirma que a atividade antioxidante é determinada não apenas pela reatividade do antioxidante contra o radical livre, mas também pela concentração do antioxidante utilizado.

FIGURA 40 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS ETANÓLICOS (E) DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS C-RJ E PS (100 µg/mL) EXTRAÍDOS A 45 °C OU À TEMPERATURA AMBIENTE (EXTRAÇÃO SEQUENCIAL – 24 E 48 HORAS)



Entre as amostras coletadas tanto de colméias de *Apis mellifera* quanto de Meliponíneos, as que apresentaram maior atividade foram aquelas com maiores teores de flavonóides e fenólicos totais, sugerindo uma grande influência destes compostos na atividade anti-radical livre das amostras.

Entre os padrões testados a quercetina possui uma atividade antioxidante maior em concentrações menores que o Trolox C<sup>®</sup>. Porém, os dois padrões testados possuem uma atividade antioxidante elevada, 90% (FIGURA 42).



FIGURA 41 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS ETANÓLICOS (E) DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS DE MELIPONÍNEOS (5000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) EXTRAÍDOS A 45 °C OU TEMPERATURA AMBIENTE (EXTRAÇÃO SEQUENCIAL – 24 E 48 HORAS)

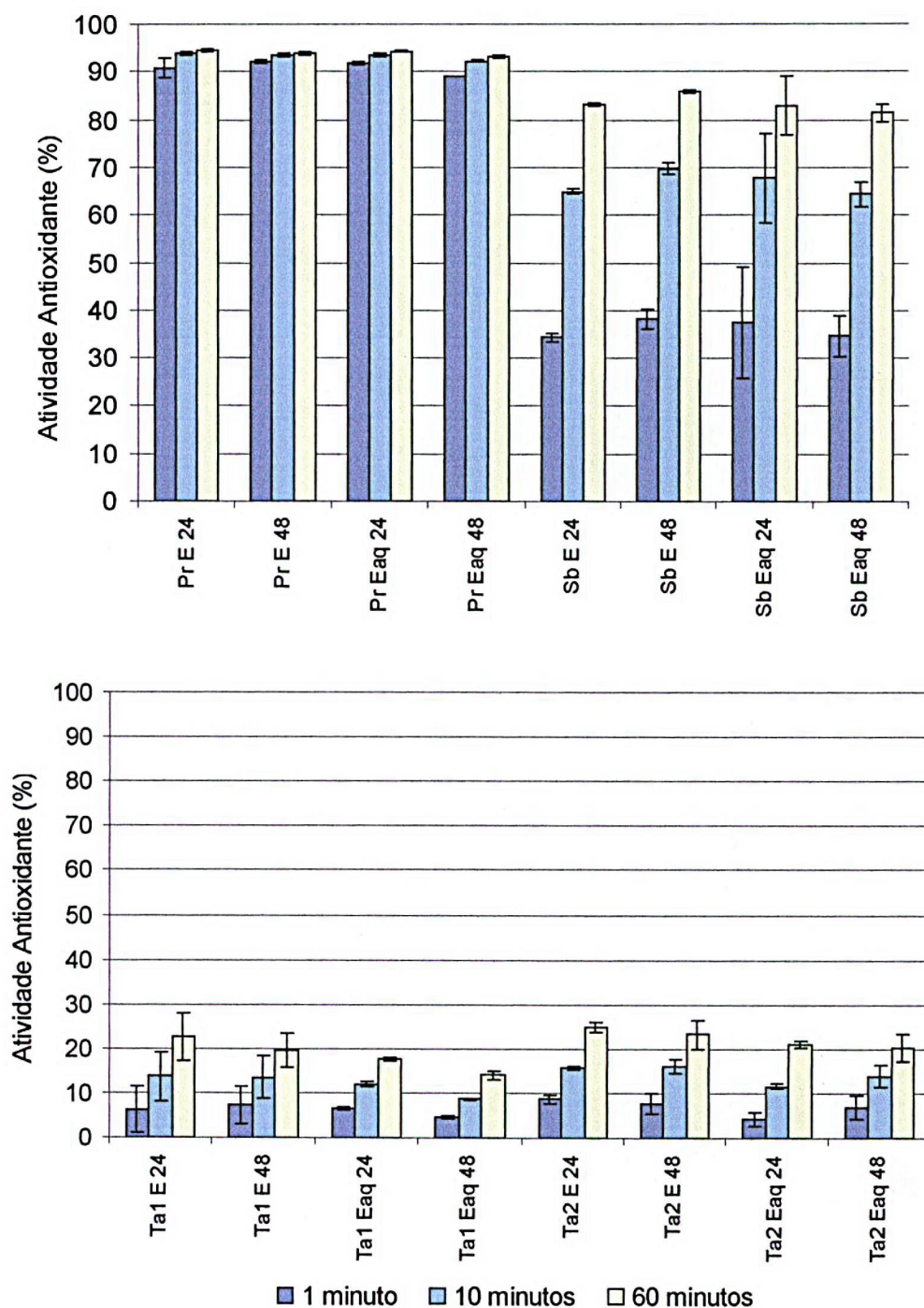
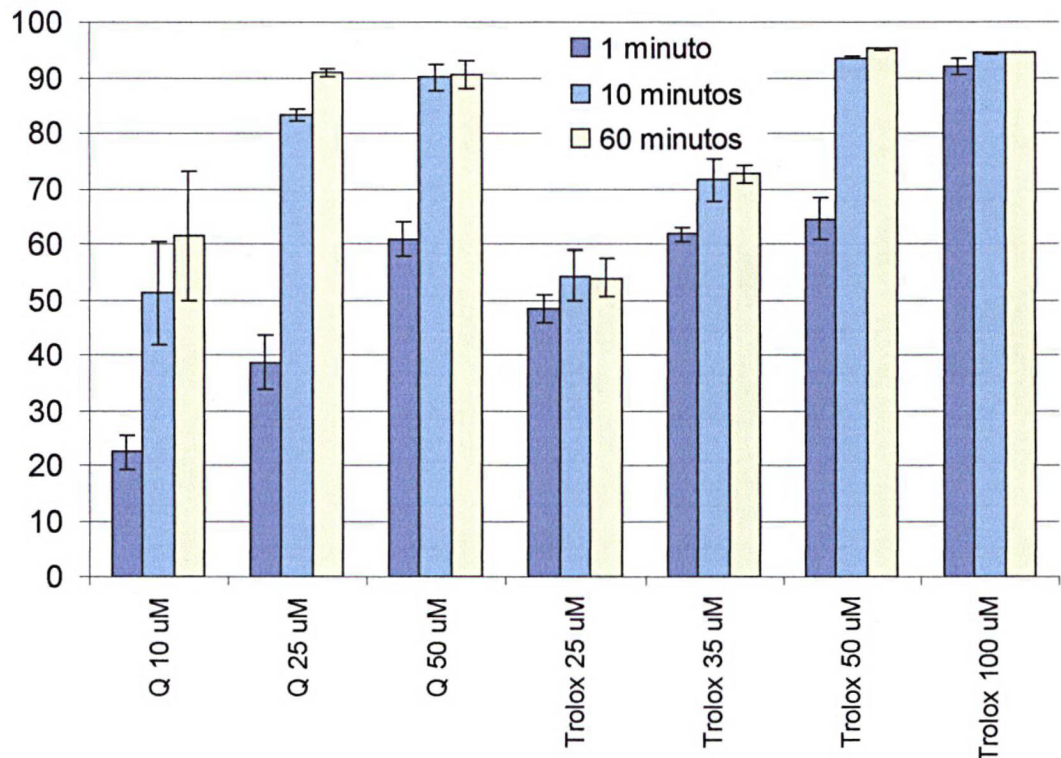


FIGURA 42 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO TROLOX C<sup>®</sup> E DA QUERCETINA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES



Quando analisamos a capacidade antioxidante das amostras que possuem uma cinética de reação rápida, como é o caso da amostra PP4 100 µg/mL, Pr 5000 µg/mL e Trolox C<sup>®</sup> 100 µM, não observamos diferenças entre a capacidade antioxidante das amostras nos tempos de reação 1, 10 e 60 minutos. Nas amostras de cinética de reação intermediária, por exemplo, amostra PP2, existe uma pequena diferença na capacidade antioxidante principalmente entre 1 e 10 minutos. Esta diferença se torna mais pronunciada quando a amostra apresenta uma cinética de reação lenta, apresentando diferenças de até 50% nestas atividades entre os tempos de 1 e 10 minutos.

Através das análises estatísticas verificou-se que a extração realizada sem aquecimento aumenta a capacidade antioxidante dos extratos de própolis de *Apis mellifera* em 3,25% ( $p=0,0000$ ) e dos extratos de Meliponíneos em 4,34% ( $p=0,0000$ ).

Os extratos obtidos na primeira extração apresentam uma atividade maior em 3,25% ( $p=0,0000$ ) nos extratos de *Apis mellifera* e em 2,36% ( $p=0,0000$ ) nos extratos de Meliponíneos. Desta forma, como observado nas análises anteriores, o

extrato obtido utilizando o procedimento de reextração contribui de forma significativa para a atividade da amostra final.

Ao comparar a atividade antioxidante dos extratos etanólicos das amostras de própolis medida pela reatividade frente ao radical livre DPPH<sup>•</sup> com a CAT medida através da formação do complexo fosfomolibdênio podemos observar que as amostras PP2 e PP4 apresentaram maior atividade antioxidante em ambas metodologias utilizadas. Além disso, duas amostras de Meliponíneos, Ta1 e Ta2, não apresentaram atividade em nenhuma das duas metodologias utilizadas. Há, porém, uma inversão entre a capacidade antioxidante entre as amostras PS e C-RJ e entre as amostras Pr e Sb. Neste caso tanto a amostra PS quanto à amostra Sb demonstraram uma capacidade antioxidante maior que as amostras C-RJ e Pr respectivamente, na metodologia de formação de complexo fosfomolibdênio e menor na metodologia de reatividade frente ao radical DPPH<sup>•</sup>. Essa inversão na atividade antioxidante destas amostras se justifica, pois as duas metodologias utilizadas avaliam parâmetros de atividade antioxidante diferentes. A metodologia de formação de complexo fosfomolibdênio mede a capacidade antioxidante total das amostras enquanto a metodologia de reatividade frente ao radical livre DPPH<sup>•</sup> mede a capacidade anti-radical livre frente a este radical livre específico.

Além disso, como demonstrado por Brand-Williams, Cuvelier e Berst (1995), a interação de antioxidantes em potencial com o DPPH<sup>•</sup> dependem da sua estrutura conformacional, e por isso, variando-se a composição das amostras varia também a interação dos compostos com o radical livre e conseqüentemente a atividade anti-radical livre das amostras varia.

#### 5.3.5.2.3 Ensaio de equivalência da capacidade antioxidante do Trolox C<sup>®</sup> (TEAC – *Trolox equivalent antioxidant capacity*) relativa ao DPPH<sup>•</sup> (TEAC<sub>DPPH<sup>•</sup></sub>)

Quando avaliamos a capacidade antioxidante das amostras de própolis de *Apis mellifera* nas concentrações de 100 µg/mL pela metodologia do TEAC<sub>DPPH<sup>•</sup></sub>, podemos observar que as amostras PP4 e PP2 possuem uma atividade maior que as outras amostras (TABELA 09). Os valores de TEAC<sub>DPPH<sup>•</sup></sub> para a amostra PP4 são

iguais para os quatro tempos de reação, pois a amostra possui uma cinética da reação rápida. Os valores de  $TEAC_{DPPH^{\bullet}}$  da amostra PP2 se tornam iguais apenas com 30 minutos de reação, pois a amostra possui uma cinética de reação intermediária. As outras amostras, por possuírem uma cinética de reação lenta, apresentam valores crescentes de  $TEAC_{DPPH^{\bullet}}$  para os tempos de reação.

As amostras de própolis de Meliponíneos nas concentrações de 100  $\mu\text{g/mL}$ , apresentaram valores de  $TEAC_{DPPH^{\bullet}}$  nulos. Isto foi observado mesmo para as amostras Pr e Sb que demonstraram através da metodologia de formação de complexo fosfomolibdênio uma baixa atividade antioxidante. Como descrito por Arts *et al.* (2003) aparentemente, o valor de  $TEAC_{DPPH^{\bullet}}$  não precisa estar correlacionado com a atividade antioxidante da amostra. Uma explicação para esta discrepância é que o ensaio do  $TEAC_{DPPH^{\bullet}}$  mede a quantidade total de radicais livres consumidos durante um período de tempo. Tanto o composto principal quanto os produtos de reação podem contribuir. A maioria dos ensaios de atividade antioxidante, de qualquer forma, determinam a taxa que um radical é consumido por um antioxidante, isto é, medem a atividade do composto principal.

O maior valor de  $TEAC_{DPPH^{\bullet}}$  para a quercetina 25  $\mu\text{M}$  ocorre porque este flavonóide tem uma atividade antioxidante maior do que o Trolox C<sup>®</sup> nesta mesma concentração. O que não é observado quando a quercetina é analisada a 50  $\mu\text{M}$ , pois nesta concentração tanto a quercetina quanto o Trolox C<sup>®</sup> possuem a mesma atividade antioxidante.

As análises estatísticas demonstram que há um aumento de 3,8% ( $p=0,0000$ ) no valor do  $TEAC_{DPPH^{\bullet}}$  nos extratos obtidos sem aquecimento. Além disso, os extratos obtidos na primeira extração possuem um  $TEAC_{DPPH^{\bullet}}$  2,97% maior ( $p=0,0001$ ) que aqueles obtidos com a reextração. Porém, da mesma maneira, os extratos obtidos pela metodologia de reextração contribuem significativamente para a atividade antioxidante da amostra final.

TABELA 09 – VALORES DE TEAC<sub>DPPH</sub>\* PARA A QUERCETINA E PARA OS EXTRATOS ETANÓLICOS (E) DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS EXTRAÍDOS A 45°C OU À TEMPERATURA AMBIENTE (EXTRAÇÃO SEQUENCIAL – 24 E 48 HORAS)

Amostras	TEAC 1 min	TEAC 6 min	TEAC 30 min	TEAC 60 min
[Trolox C <sup>®</sup>	1,00	1,00	1,00	1,00]
Quercetina 25 uM	0,80 ± 0,10	1,38 ± 0,04	1,68 ± 0,01	1,68 ± 0,01
Quercetina 50 uM	0,94 ± 0,05	0,97 ± 0,02	0,95 ± 0,02	0,95 ± 0,03
PP4	E 24 hs	0,95 ± 0,02	0,94 ± 0,01	0,95 ± 0,01
	E 48 hs	0,88 ± 0,01	0,91 ± 0,01	0,92 ± 0,00
	E (45°C) 24 hs	0,93 ± 0,01	0,93 ± 0,00	0,93 ± 0,00
	E (45°C) 48 hs	0,95 ± 0,01	0,94 ± 0,01	0,94 ± 0,01
PP2	E 24 hs	0,88 ± 0,02	0,98 ± 0,02	1,02 ± 0,01
	E 48 hs	0,89 ± 0,02	0,95 ± 0,01	1,01 ± 0,00
	E (45°C) 24 hs	0,95 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00
	E (45°C) 48 hs	0,76 ± 0,00	0,86 ± 0,00	0,93 ± 0,00
PS	E 24 hs	0,27 ± 0,01	0,31 ± 0,02	0,35 ± 0,01
	E 48 hs	0,22 ± 0,06	0,25 ± 0,03	0,30 ± 0,03
	E (45°C) 24 hs	0,16 ± 0,04	0,20 ± 0,04	0,24 ± 0,04
	E (45°C) 48 hs	0,15 ± 0,06	0,19 ± 0,06	0,24 ± 0,05
C-RJ	E 24 hs	0,34 ± 0,02	0,46 ± 0,01	0,58 ± 0,00
	E 48 hs	0,38 ± 0,03	0,48 ± 0,04	0,58 ± 0,04
	E (45°C) 24 hs	0,36 ± 0,01	0,47 ± 0,02	0,58 ± 0,02
	E (45°C) 48 hs	0,46 ± 0,07	0,50 ± 0,01	0,61 ± 0,01
Ta2	E 24 hs	0,00	0,00	0,00
	E 48 hs	0,00	0,02	0,01
	E (45°C) 24 hs	0,00	0,00	0,00
	E (45°C) 48 hs	0,02	0,03	0,02
Pr	E 24 hs	0,10	0,12	0,13
	E 48 hs	0,08	0,12	0,15
	E (45°C) 24 hs	0,10	0,12	0,12
	E (45°C) 48 hs	0,09	0,11	0,14
Ta1	E 24 hs	0,00	0,00	0,00
	E 48 hs	0,00	0,00	0,00
	E (45°C) 24 hs	0,00	0,00	0,00
	E (45°C) 48 hs	0,00	0,00	0,00
Sb	E 24 hs	0,00	0,00	0,02
	E 48 hs	0,00	0,00	0,02
	E (45°C) 24 hs	0,01	0,04	0,06
	E (45°C) 48 hs	0,00	0,01	0,06



### 5.3.6 Métodos analíticos

#### 5.3.6.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Um método cromatográfico analítico rápido para verificar o perfil dos componentes de um extrato de própolis se tornou imprescindível conforme o uso desta substância aumentou. Como a cromatografia em camada delgada requer apenas cromatoplasmas, esta metodologia se demonstrou útil para testar estas amostras. Como a composição da própolis varia de acordo com a região onde foi coletada, a CCD parece ser uma metodologia útil no rápido controle de qualidade da própolis (Ackermann, 1991).

Deste modo os extratos etanólicos e aquosos obtidos das amostras de própolis foram submetidos à cromatografia em camada delgada e seu perfil analisado através da utilização de dois reveladores, um geral (anisaldeído sulfúrico à quente) e um específico para flavonóides (reativo de NEU). Ademais, se pode analisar mais que uma dezena de amostras por vez.

De acordo com as análises em cromatografia em camada delgada (FIGURAS 43 e 44), não foram observadas variações no perfil cromatográfico entre as extrações etanólicas assim como entre as extrações aquosas de uma mesma amostra de própolis independente da metodologia de extração utilizada. Porém, foram observadas variações no perfil cromatográfico de uma mesma amostra em função do solvente utilizado.

Quando analisamos o perfil cromatográfico das amostras de *Apis mellifera*, podemos observar que as amostras PP4 e PP2 apesar de coletadas na mesma região geográfica (não distantes uma da outra mais que 30 Km), apresentam um perfil cromatográfico muito diferenciado (FIGURA 43). No entanto, as amostras PP2 e PS coletadas de regiões geográficas distintas apresentam um perfil muito similar.

As amostras apresentam uma grande quantidade de compostos reativos ao anisalaldeído sulfúrico à quente com coloração característica de flavonóides e fenólicos que migram na mesma região dos padrões. Além disso, os extratos aquosos das amostras possuem um menor teor de componentes reativos ao anisalaldeído sulfúrico à quente quando comparado aos extratos etanólicos.

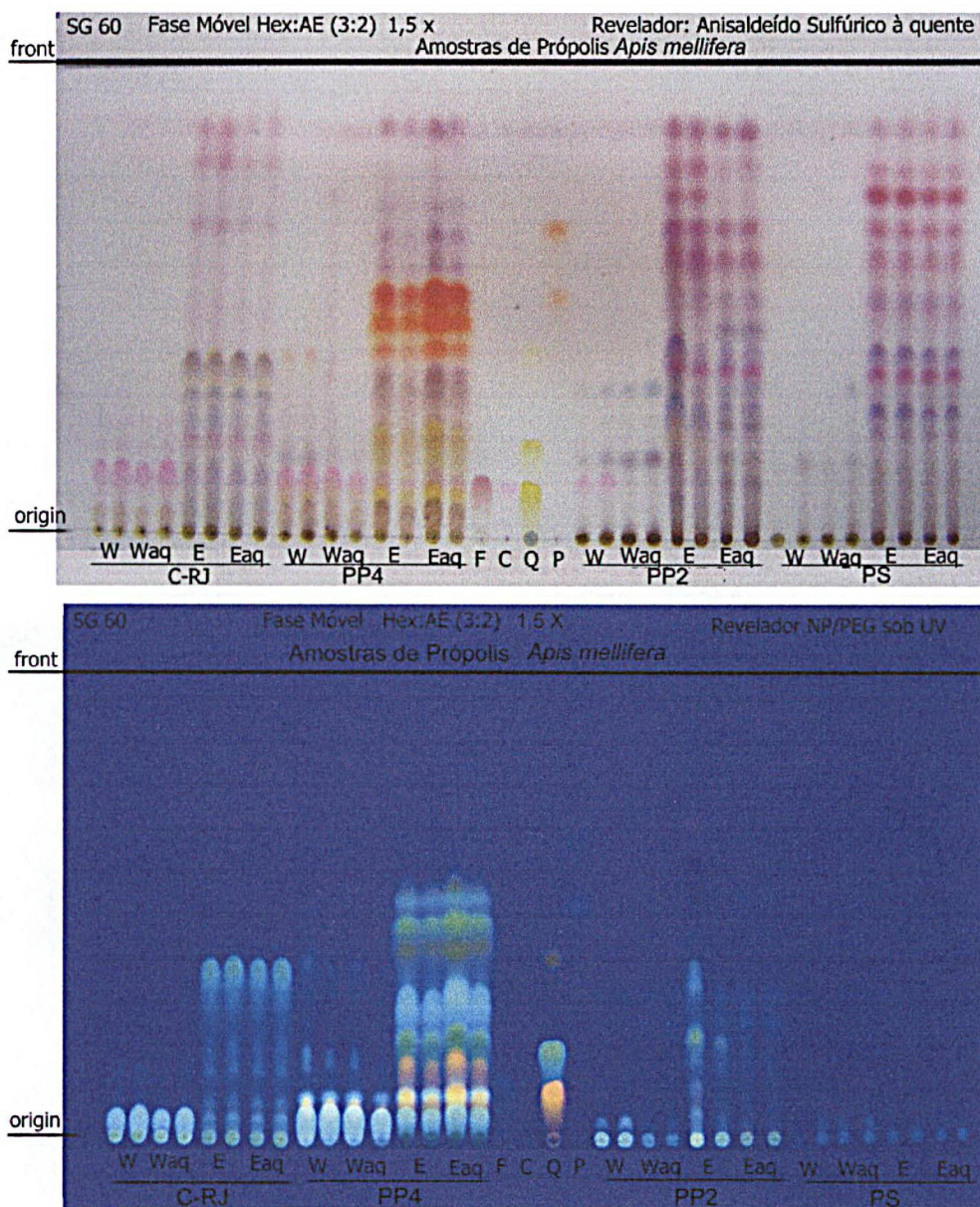
Comprova-se novamente que os sólidos totais para cada processo de extração dependem da afinidade pelo solvente extrator e é maior nos extratos etanólicos.

A utilização do revelador específico para a determinação de flavonóides demonstra que apesar das amostras PP2 e PS possuírem um perfil cromatográfico similar, a amostra PP2 possui um teor maior de flavonóides totais. Este revelador indica que a amostra com maior teor de flavonóides totais quando comparado às outras é a PP4. Pode-se observar que a intensidade das bandas dos extratos etanólicos da PP4 revelados com o reativo de NEU é pelo menos 10 vezes superior a intensidade dos extratos etanólicos das outras própolis analisadas. Estes dados sugerem que a quantidade de flavonóides totais tenha sido subestimada na amostra PP4, pois o teor de flavonóides totais da amostra PP4 obtido através da metodologia de complexação com o cátion alumínio não se revelou tão superior ao das outras amostras.

O extrato etanólico da amostra PP4 apresenta três bandas fortemente reativas tanto ao anisaldeído sulfúrico quanto ao reativo de NEU (migração relativa à frente de solvente de 0,5; FIGURA 43), uma delas comigrando com um padrão de flavonóide em particular, a pinocembrina. Este flavonóide é encontrado freqüentemente em própolis de origem européia e responsável por grande parte das atividades presentes nestas amostras. Se comprovada a presença deste composto na amostra de própolis PP4, a suspeita de que o teor de flavonóides nestas amostras foi subestimado é confirmada. Isto ocorre, pois a pinocembrina é um flavonóide da classe das flavanonas e conforme Marcucci (1998) quanto maior a proporção destes compostos na amostra, mais distante será o valor medido do valor real de teor de flavonóides. Porém, como citado anteriormente, isso não reduz a validade do método para os propósitos do controle de qualidade. Estes dados foram comprovados posteriormente por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa e densitometria das amostras.

A cromatoplaça de CCD revelada com o reativo de NEU demonstra que os extratos etanólicos das amostras são mais concentrados em flavonóides do que os respectivos extratos aquosos.

FIGURA 43 – CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DOS EXTRATOS ETANÓLICOS (E) E AQUOSOS (W) DE PRÓPOLIS DE *Apis mellifera* EXTRAÍDOS A 45 °C OU À TEMPERATURA AMBIENTE (EXTRAÇÃO SEQUENCIAL – 24 E 48 HORAS)



CCD realizada utilizando como fase móvel a mistura hexano / acetato de etila (3:2, v/v), 1,5 x corridas ascendentes. Agente cromogênico na placa superior anisaldeído sulfúrico a quente e na inferior reativo de NEU. Para cada amostra foram realizadas duas aplicações, a primeira corresponde a extração de 24 horas e a segunda correspondente a reextração.

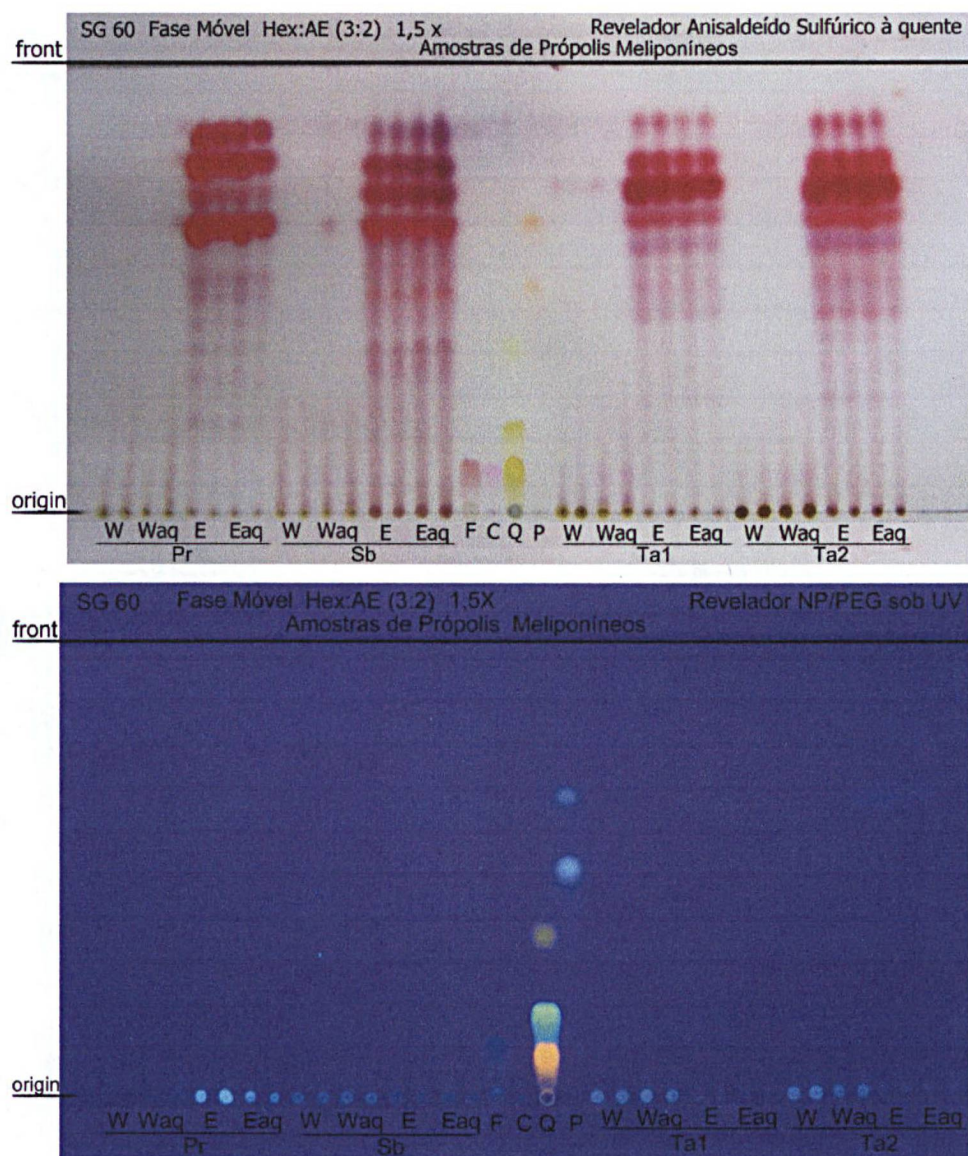
Legenda: ácido ferúlico (F); ácido p-cumárico (C); crisina (maior migração), quercetina (migração intermediária) e canferol (menor migração) (Q); pinocembrina-7-metil éter (maior migração) e pinocembrina (menor migração) (P).

Quando observamos o perfil cromatográfico das amostras de própolis de Meliponíneos (FIGURA 44) verificamos que as amostras apresentam um perfil muito diferente das amostras de *Apis mellifera*, porém, muito similares entre si. Ao contrário do observado nas amostras de *Apis mellifera*, as amostras de Meliponíneos não apresentam bandas reativas ao anisaldeído sulfúrico à quente com coloração característica de flavonóides e fenólicos na região de migração destes padrões. Todos os extratos etanólicos das amostras de Meliponíneos apresentam um grupo de substâncias muito similares com a mesma reatividade frente ao anisaldeído sulfúrico à quente. Assim como para as amostras de *Apis mellifera*, os extratos etanólicos apresentam uma maior quantidade de sólidos totais quando comparados aos respectivos extratos aquosos.

Quando o reativo de NEU é utilizado o teor de flavonóides totais relativamente baixo demonstrado através da metodologia de complexação com alumínio é confirmado, pois as amostras de Meliponíneos não apresentam reatividade frente a este revelador específico para flavonóides. Ademais, a inspeção sob UV (365 nm) é enfática em diferenciar os dois grupos de própolis; *Apis mellifera* e Meliponíneos.



FIGURA 44 – CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DOS EXTRATOS ETANÓLICOS (E) E AQUOSOS (W) DE PRÓPOLIS DE MELIPONÍNEOS EXTRAÍDOS A 45 °C OU À TEMPERATURA AMBIENTE (EXTRAÇÃO SEQUENCIAL – 24 E 48 HORAS)



CCD realizada utilizando como fase móvel a mistura hexano / acetato de etila (3:2, v/v), 1,5 x corridas ascendentes. Agente cromogênico na placa superior anisaldeído sulfúrico a quente e na inferior reativo de NEU. Para cada amostra foram realizadas duas aplicações, a primeira corresponde a extração de 24 horas e a segunda correspondente a reextração.

Legenda: ácido ferúlico (F); ácido p-cumárico (C); crisina (maior migração), quercetina (migração intermediária) e canferol (menor migração) (Q); pinocembrina-7-metil éter (maior migração) e pinocembrina (menor migração) (P).

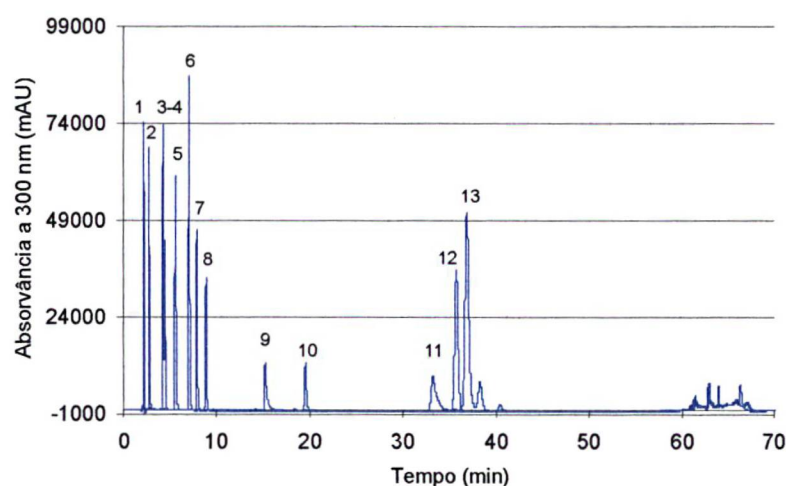
### 5.3.6.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Cita PG, Garfam e Cita AM (2002) sugerem que a técnica de CLAE no modo gradiente e acoplado a detector de fotiodo é o método de escolha para se determinar os compostos mais relevantes na própolis.

As amostras de própolis então foram submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência utilizando gradiente de acetonitrila em água para verificar o perfil cromatográfico das amostras. Como não foram observadas variações no perfil cromatográfico por CCD (FIGURAS 43 e 44) entre as extrações etanólicas assim como entre as extrações aquosas de cada amostra de própolis independente da metodologia utilizada, foi selecionado apenas um extrato de cada amostra para ser submetido a CLAE.

O perfil de flavonóides e ácidos fenólicos presentes nas amostras de própolis pode ser caracterizado pela metodologia de CLAE utilizada, já que a mesma nos permitiu a separação de uma mistura de pelo menos 13 padrões, como demonstra a figura 45.

FIGURA 45 – CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA DE UMA MISTURA DE FLAVONÓIDES E ÁCIDOS FENÓLICOS



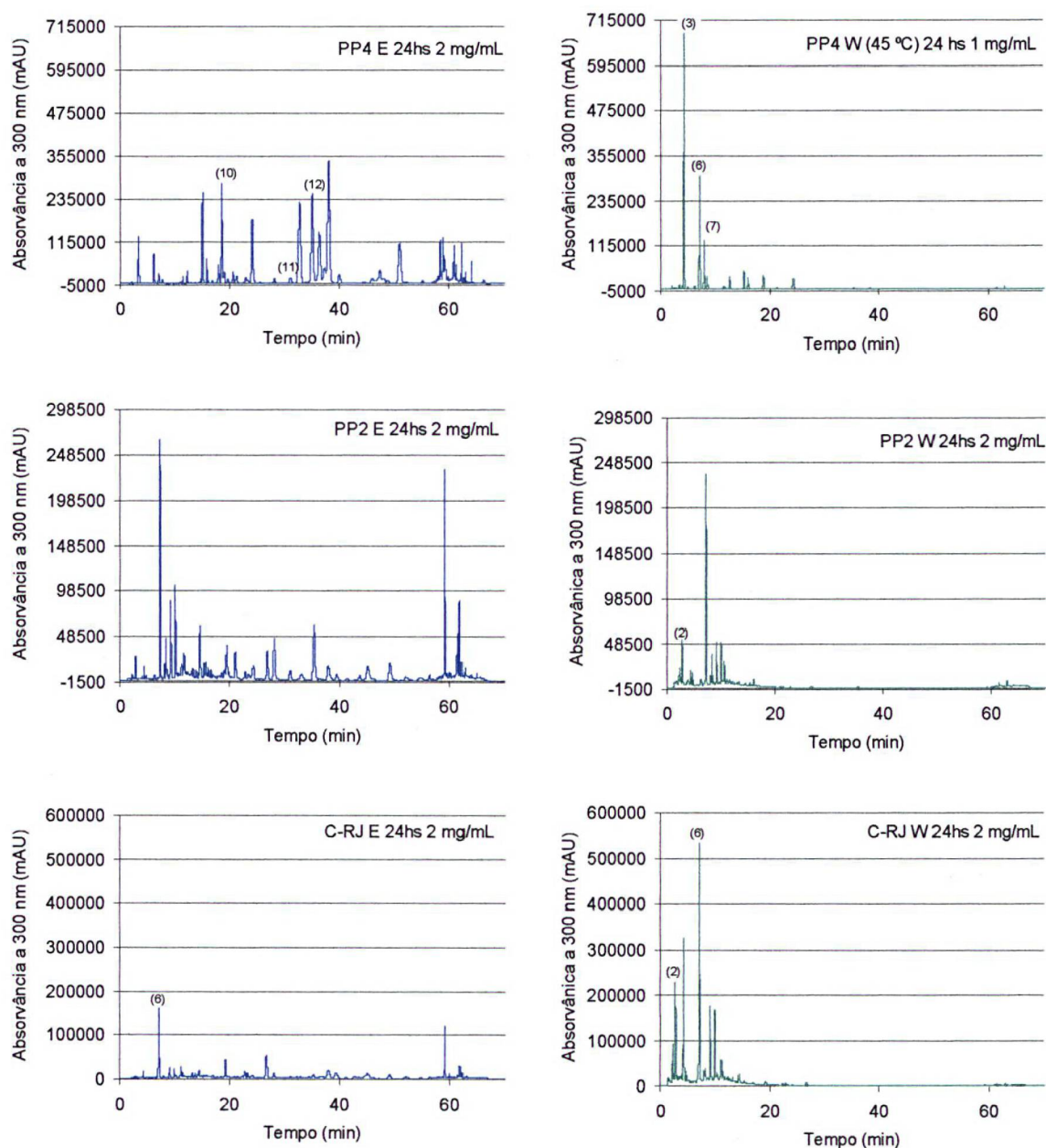
Cromatografia líquida de alta eficiência realizada utilizando como fase móvel um gradiente de dois sistemas de solventes: ácido fórmico a 0,08 % em água e ácido fórmico a 0,1 % em acetonitrila, fluxo de 1,0 mL/min. Coluna Shim-pack CLC-ODS de 15 cm X 4,6 mm.

Legenda: 1 – ácido gálico (0,01 mg/mL); 2 – ácido clorogênico (0,01 mg/mL); 3 – ácido cafeico (0,01 mg/mL); 4 – ácido vanílico (0,01 mg/mL); 5 – rutina (0,05 mg/mL); 6 – ácido p-cumárico (0,01 mg/mL); 7 – ácido ferúlico (0,01mg/mL); 8 – naringina (0,02 mg/mL); 9 – quercetina (0,5 mg/mL); 10 – canferol (0,5 mg/mL); 11 – crisina (0,5 mg/mL); 12 – pinocembrina (0,16mg/mL); 13 – galangina (0,5 mg/mL).



As figuras 46, 47 e 48 mostram os cromatogramas de CLAE tanto dos extratos etanólicos quanto dos extratos aquosos das amostras de própolis.

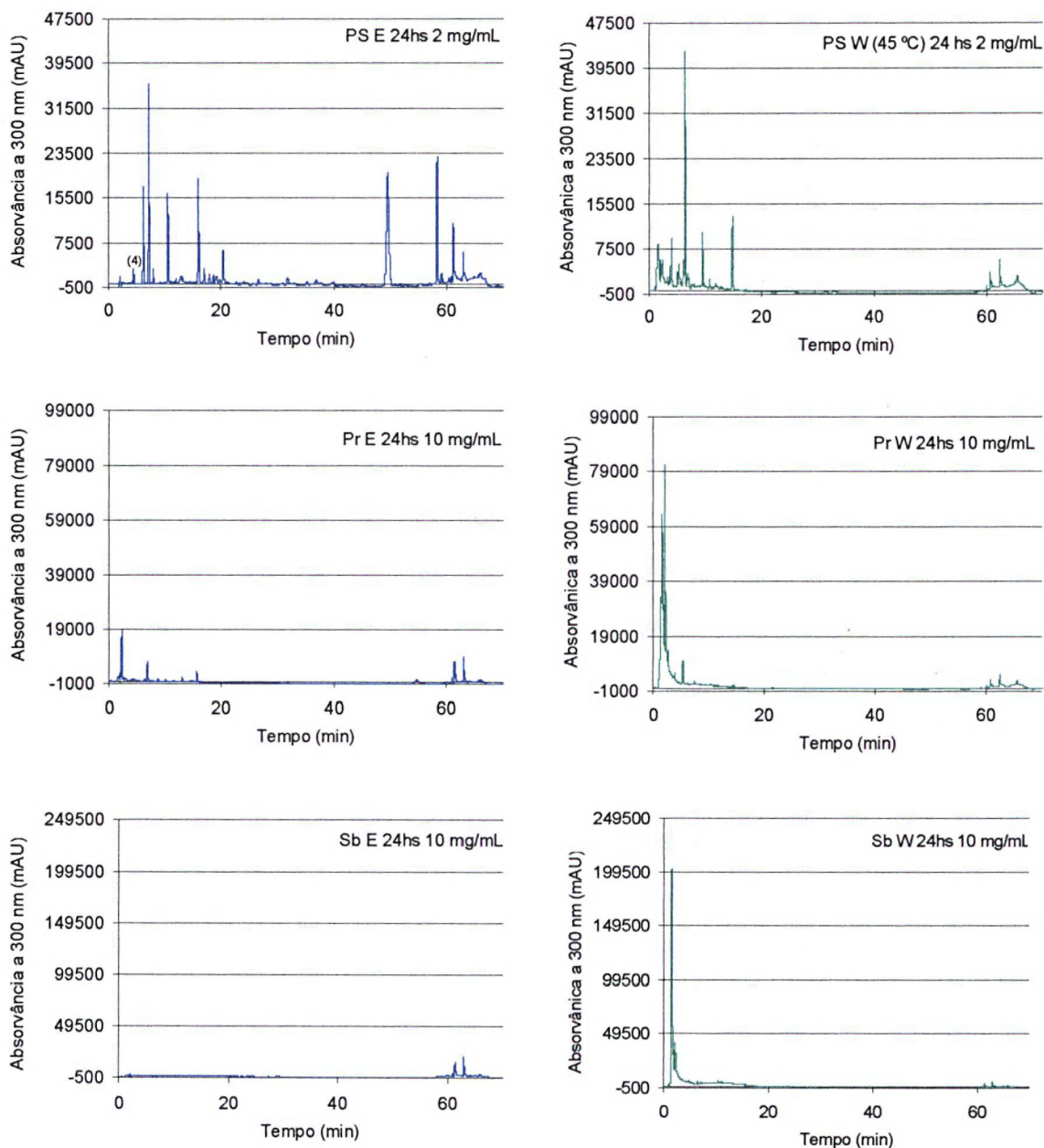
FIGURA 46 – CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA DOS EXTRATOS ETANÓLICOS (E) E AQUOSOS (W) DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS PP4, PP2 E C-RJ (24 HORAS)



Cromatografia líquida de alta eficiência realizada utilizando como fase móvel um gradiente de dois sistemas de solventes: ácido fórmico a 0,08 % em água e ácido fórmico a 0,1 % em acetonitrila, fluxo de 1,0 mL/min. Coluna Shim-pack CLC-ODS de 15 cm X 4,6 mm.

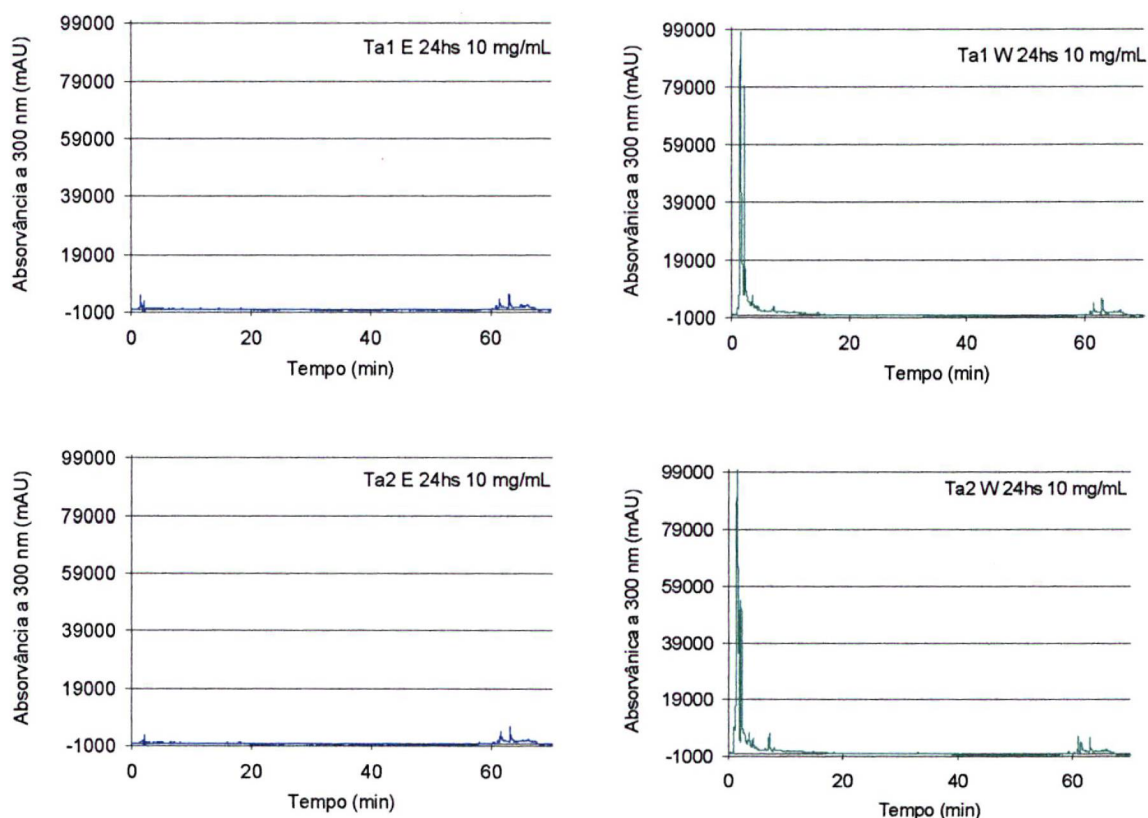


FIGURA 47 – CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA DOS EXTRATOS ETANÓLICOS (E) E AQUOSOS (W) DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS PS, Pr E Sb (24 HORAS)



Cromatografia líquida de alta eficiência realizada utilizando como fase móvel um gradiente de dois sistemas de solventes: ácido fórmico a 0,08 % em água e ácido fórmico a 0,1 % em acetonitrila, fluxo de 1,0 mL/min. Coluna Shim-pack CLC-ODS de 15 cm X 4,6 mm.

FIGURA 48 – CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA DOS EXTRATOS ETANÓLICOS (E) E AQUOSOS (W) DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS Ta1 E Ta2 (24 HORAS)



Cromatografia líquida de alta eficiência realizada utilizando como fase móvel um gradiente de dois sistemas de solventes: ácido fórmico a 0,08 % em água e ácido fórmico a 0,1 % em acetonitrila, fluxo de 1,0 mL/min. Coluna Shim-pack CLC-ODS de 15 cm X 4,6 mm.

Pela análise dos cromatogramas das amostras PP4, C-RJ, PP2 e PS de *Apis mellifera* (FIGURA 46) podemos observar que os extratos etanólicos apresentam uma diversidade maior de componentes na zona de eluição correspondentes aos padrões de flavonóides e ácidos fenólicos quando comparados aos respectivos extratos aquosos. Além disso, a amostra PP4 possui um composto com o mesmo tempo de retenção do padrão pinocembrina, confirmando o observado na CCD.

Quando analisamos os cromatogramas das amostras Sb, Ta1 e Ta2 de Meliponíneos (FIGURAS 47 e 48) verificamos que nem os extratos etanólicos nem os extratos aquosos das amostras apresentam compostos presentes na região de migração dos flavonóides e dos ácidos fenólicos. O perfil cromatográfico observado se mostrou completamente diferente daqueles obtidos para as amostras de *Apis*

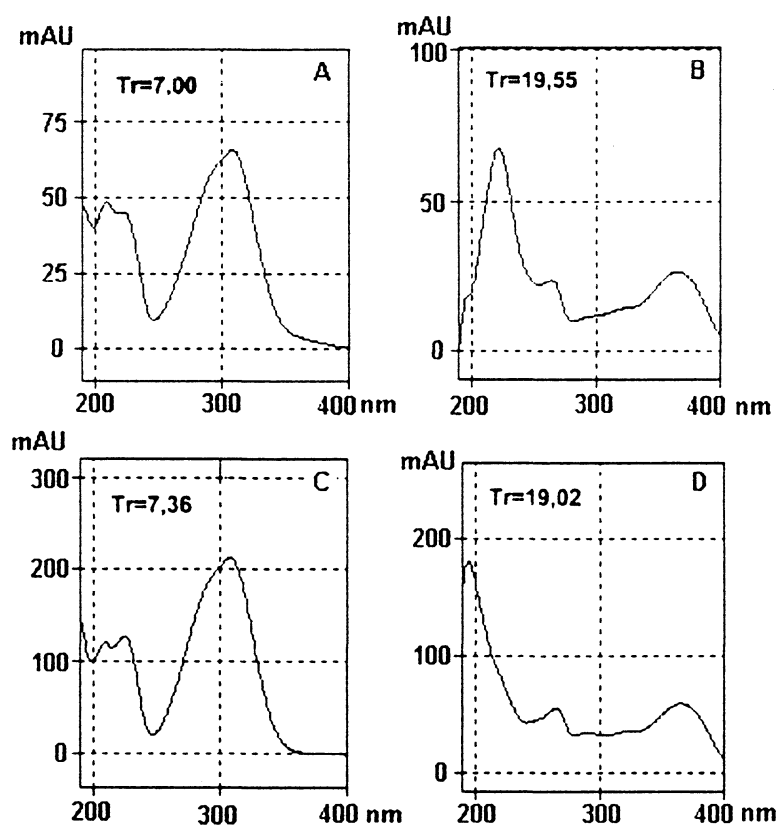
*mellifera*. O extrato etanólico da amostra Pr, ao contrário, apresentou uma pequena variedade de componentes na região de migração dos padrões.

Os extratos aquosos das amostras de Meliponíneos apresentam um perfil muito similar entre as amostras, com a presença de vários compostos sobrepostos no início dos cromatogramas. Esta sobreposição de compostos no início do cromatograma indica que as substâncias presentes nestas amostras de própolis possuem uma composição química muito similar.

O perfil cromatográfico das amostras de própolis confirma os resultados obtidos pela cromatografia em camada delgada e quantificação dos teores de flavonóides e fenólicos totais nestas amostras.

A validade e utilidade do método cromatográfico líquido de alta eficiência podem ser facilmente corroboradas pela análise espectral acoplada e dirigida para picos de eluição de maior interesse, conforme demonstra figura 49.

FIGURA 49 – ESPECTRO DE VARREDURA DOS PADRÕES ÁCIDO p-CUMÁRICO (A) E CANFEROL (B) E DOS COMPONENTES ENCONTRADOS NOS EXTRATOS ETANÓLICOS DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS PP2 (C) E PP4 (D)

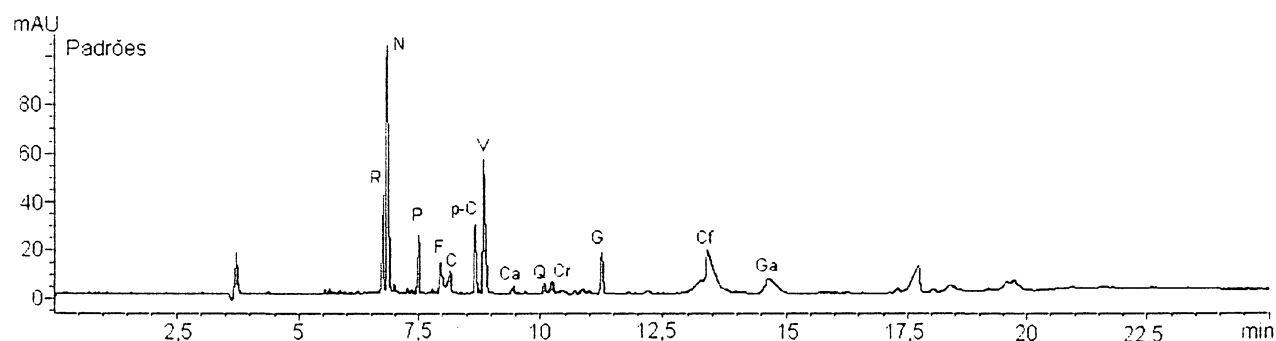


### 5.3.6.3 Eletroforese capilar micelar (ECM)

O perfil de flavonóides e fenólicos presentes nas amostras de própolis pode ser observado também utilizando a eletroforese capilar de zona, ou mais especificamente, a variante micelar. Como os grupos fenólicos flavonóides requerem uma alcalinização severa para completa dissociação e geração de ânions, essa limitação pode ser minimizada através da complexação com detergentes aniônicos como o dodecil sulfato de sódio (SDS), usando um pH levemente alcalino como, por exemplo, um tampão de pH 8,0. Os flavonóides irão gerar micelas de diferentes tamanhos moleculares e comportamentos eletroforéticos permitindo então uma resolução melhorada para a população presente na amostra. Além disto, a adição de 10% de metanol no sistema tampão pode incrementar a solubilização de alguns compostos presentes nas amostras.

A figura 50 demonstra a separação lograda com uma mistura de 13 padrões de ácidos fenólicos e flavonóides que podem ser encontrados nas amostras de própolis. Podemos verificar que a região de tempos de retenção entre 6 e 16 minutos do eletroforetograma é a região de migração destes padrões.

FIGURA 50 – ELETROFORETOGRAMA MICELAR DE UMA MISTURA DE PADRÕES DE FLAVONÓIDES E ÁCIDOS FENÓLICOS



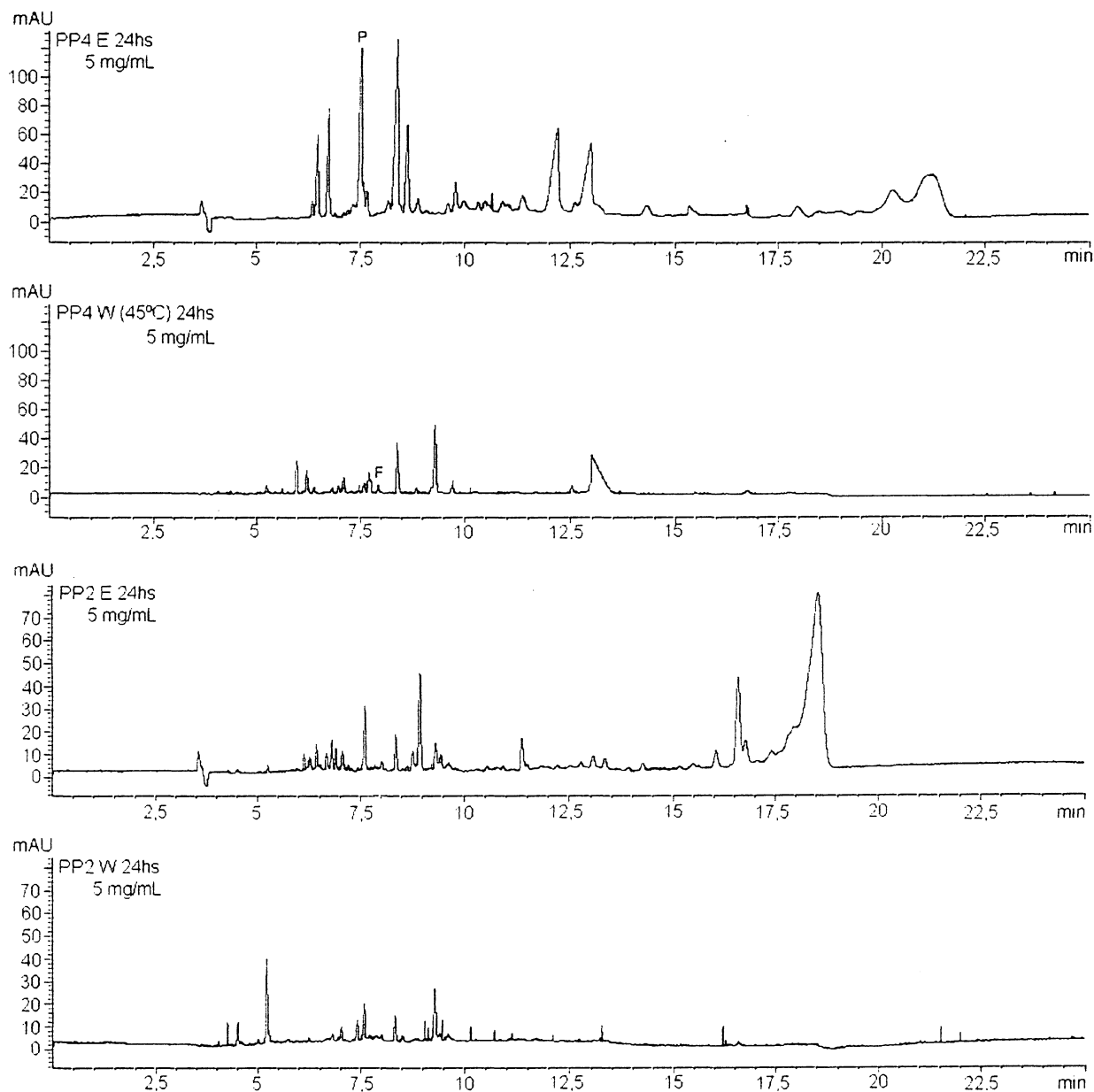
Eletroforese capilar micelar utilizando tampão borato pH 8,5 (ácido bórico 150 mM, SDS 50 mM, 5% etanol). Condições: capilar de sílica (64,5 cm X 56 cm, 50 mm de diâmetro interno), temperatura de 25 °C, voltagem de 28 kV, 55  $\mu$ A, detecção em 195 nm, injeção da amostra 50 mbar por 4 segundos. Legenda: R – rutina (0,25 mg/mL); N – naringina (0,5 mg/mL); P – pinocembrina (0,1 mg/mL); F – ácido ferúlico (0,05 mg/mL); C – ácido clorogênico (0,1 mg/mL); p-C – ácido p-cumárico (0,1 mg/mL); V – ácido vanílico (0,1 mg/mL); Ca – canferol (0,5 mg/mL); Q – quercetina (0,12 mg/mL); Cr – crisina (0,5 mg/mL); G – galangina (0,25 mg/mL); Cf – ácido cafeico (0,1 mg/mL); Ga – ácido gálico (0,1 mg/mL).

Os eletroforetogramas das amostras PP4, PP2 e PS de *Apis mellifera* representados pelas figuras 51 e 52, demonstram uma maior diversidade de componentes na zona de migração dos flavonóides e fenólicos nos extratos etanólicos quando comparados aos respectivos extratos aquosos. Porém este perfil não foi observado para a amostra C-RJ, pois esta apresentou uma maior diversidade de componentes no extrato aquoso quando comparado ao respectivo extrato etanólico. Este comportamento foi também observado na determinação do teor de fenólicos totais para esta amostra. O extrato etanólico da amostra PP4 possui um pico principal no tempo de retenção de 7,5 minutos, mesmo tempo de migração do padrão pinocembrina. Além disto, o espectro de varredura na zona do UV dos dois compostos foi exatamente o mesmo, tal qual na análise anterior por CLAE, comprovando a existência deste flavonóide na amostra eletroforetizada.

Quando analisamos os eletroforetogramas das amostras de própolis Pr, Sb, Ta1 e Ta2 de Meliponíneos (FIGURAS 53 e 54) verificamos que tanto os extratos etanólicos quanto aquosos não apresentam ocorrência significativa de componentes na região de migração dos flavonóides e ácidos fenólicos (entre 6 e 16 minutos). A presença nos extratos etanólicos de um composto principal com o mesmo tempo de retenção nas quatro amostras analisadas, demonstra um perfil muito similar entre estes extratos, embora este dito componente apresente perfil espectral pobre (pico centrado em 190 nm e ausência de absorção entre 250 – 350 nm).

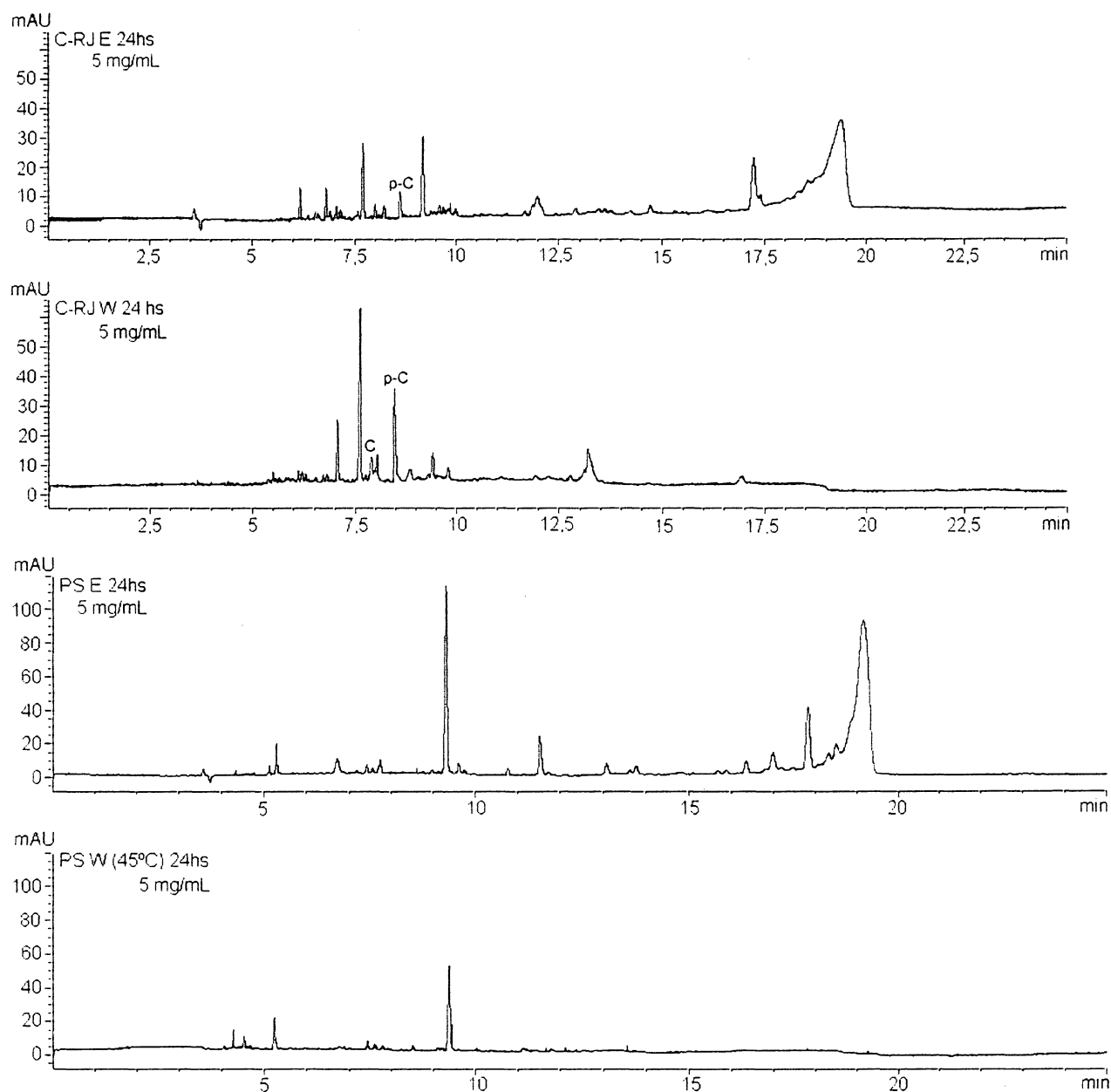
O perfil dos extratos obtido por eletroforese capilar micelar demonstra que as amostras de própolis obtidas de colméias de *Apis mellifera* são amostras com maiores teores de flavonóides e fenólicos que aquelas obtidas de Meliponíneos. Estes dados confirmam os resultados obtidos através de outros métodos analíticos como CCD e CLAE.

FIGURA 51 – ELETROFORETOGRAMA MICELAR DOS EXTRATOS ETANÓLICOS (E) E AQUOSOS (W) DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS PP4 E PP2 (24 HORAS)



Eletroforese capilar micelar utilizando tampão borato pH 8,5 (ácido bórico 150 mM, SDS 50 mM, 5% etanol). Condições: capilar de sílica (64,5 cm X 56 cm, 50 mm de diâmetro interno), temperatura de 25 °C, voltagem de 28 kV, 55  $\mu$ A, detecção em 195 nm, injeção da amostra 50 mbar por 4 segundos.

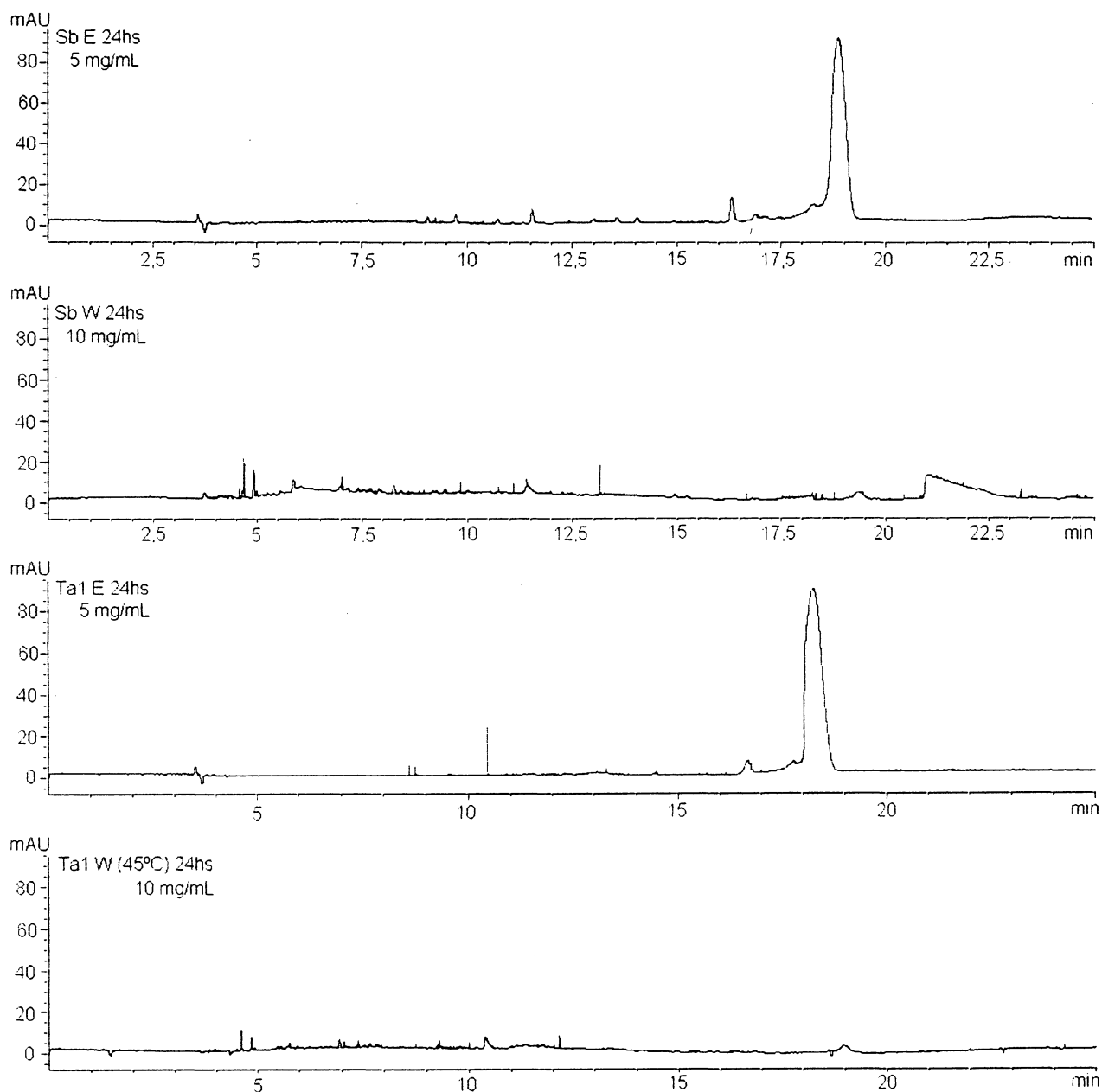
FIGURA 52 – ELETROFORETOGRAMA MICELAR DOS EXTRATOS ETANÓLICOS (E) E AQUOSOS (W) DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS C-RJ E PS (24 HORAS)



Eletroforese capilar micelar utilizando tampão borato pH 8,5 (ácido bórico 150 mM, SDS 50 mM, 5% etanol). Condições: capilar de sílica (64,5 cm X 56 cm, 50 mm de diâmetro interno), temperatura de 25 °C, voltagem de 28 kV, 55  $\mu$ A, detecção em 195 nm, injeção da amostra 50 mbar por 4 segundos.

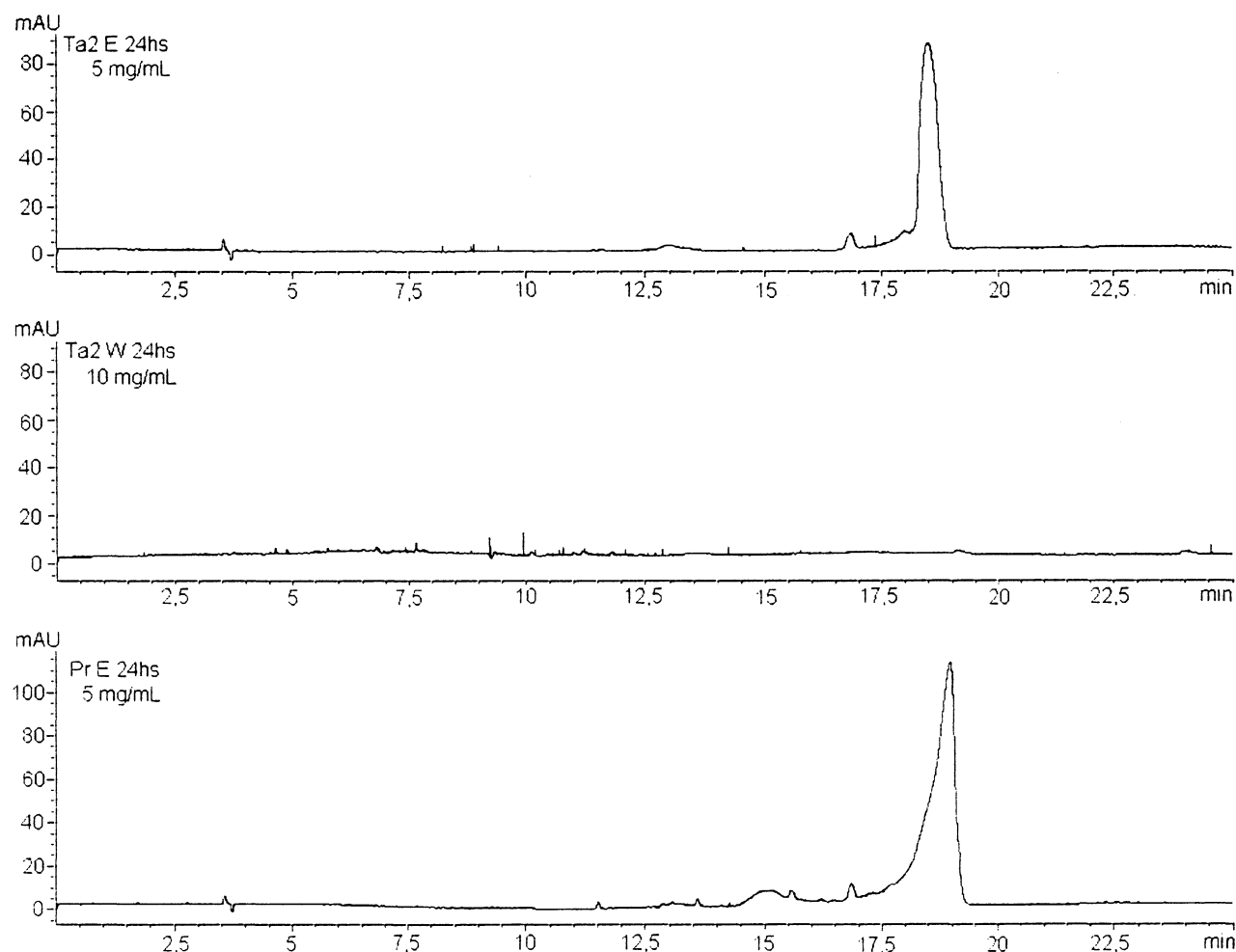


FIGURA 53 – ELETROFORETOGRAMA MICELAR DOS EXTRATOS ETANÓLICOS (E) E AQUOSOS (W) DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS Sb E Ta1 (24 HORAS)



Eletroforese capilar micelar utilizando tampão borato pH 8,5 (ácido bórico 150 mM, SDS 50 mM, 5% etanol). Condições: capilar de sílica (64,5 cm X 56 cm, 50 mm de diâmetro interno), temperatura de 25 °C, voltagem de 28 kV, 55  $\mu$ A, detecção em 195 nm, injeção da amostra 50 mbar por 4 segundos.

FIGURA 54 – ELETROFORETOGRAMA MICELAR DOS EXTRATOS ETANÓLICOS (E) E AQUOSOS (W) DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS Ta2 E Pr (24 HORAS)



Eletroforese capilar micelar utilizando tampão borato pH 8,5 (ácido bórico 150 mM, SDS 50 mM, 5% etanol). Condições: capilar de sílica (64,5 cm X 56 cm, 50 mm de diâmetro interno), temperatura de 25 °C, voltagem de 28 kV, 55  $\mu$ A, detecção em 195 nm, injeção da amostra 50 mbar por 4 segundos. NOTA: O extrato aquoso da amostra de própolis Pr não foi determinado.

Observando todos os procedimentos analíticos empregados e os resultados obtidos, podemos sugerir que a melhor metodologia para a extração dos compostos biologicamente ativos da própolis é aquela realizada utilizando o etanol como solvente extrator, aquecimento a 45 °C e reextração por mais 24 horas, totalizando 48 horas de extração final.

Os extratos etanólicos de um modo geral apresentaram maiores rendimentos de sólidos totais, teores de flavonóides e fenólicos totais e atividades biológicas (antimicrobiana e antioxidante) quando comparados aos extratos aquosos.

Com relação ao procedimento de aquecimento, embora este ocasione um decréscimo de cerca de 4% na atividade anti-radical livre dos extratos de própolis, esses valores se tornam desprezíveis quando considerados os aumentos proporcionados de 8,5% no rendimento de sólidos totais, de 10% na capacidade antioxidante total dos extratos aquosos e principalmente de 46% na CAT dos extratos etanólicos.

A realização de uma segunda extração (reextração) proporciona rendimentos em sólidos totais, teores de flavonóides e fenólicos totais e atividades biológicas tão significativas quanto aos obtidos com a primeira extração. Estes resultados demonstram a importância da extração seqüencial das amostras de própolis, invalidando muitos dados obtidos por vários autores que utilizam para o preparo das amostras de própolis apenas uma única extração de 24 horas.

Apesar de os teores de flavonóides e fenólicos totais variar muito entre as amostras de própolis, nem sempre as que possuem maiores teores desses compostos apresentam as maiores atividades biológicas (antimicrobiana e antioxidante). Comprova-se que não só a quantidade de flavonóides presentes na própolis, mas principalmente a qualidade desses compostos exerce uma grande influencia nas atividades biológicas destas amostras.

Como descrito por Marcucci (1995), a pinocembrina é um dos flavonóides mais efetivos contra bactérias. A presença deste composto na amostra PP4 pode ser o responsável pela atividade antimicrobiana da própolis frente à cepa *Staphylococcus aureus* e MRSA (Marcucci, 1995). Deve-se considerar que nenhum componente isoladamente tem uma atividade biológica maior que o extrato bruto inicial (Marcucci, 1996; Kujumgiev *et al.*, 2000) sendo as atividades demonstradas pelas amostras um resultado do efeito sinérgico de vários compostos presentes nas mesmas. Estes dados estão de acordo com vários autores que determinam que a composição química dos flavonóides principais nos extratos etanólicos de própolis são qualitativamente e quantitativamente variados dependendo das diferenças regionais (Koo e Park, 1996).

Como a quantidade de flavonóides e fenólicos não refletem corretamente a eficácia biológica das amostras de própolis, pois não reflete a qualidade dos mesmos, podemos sugerir que as metodologias analíticas devem estar obrigatoriamente associadas a ensaios biológicos no controle de qualidade de

amostras de própolis como sugerido por Banskota *et al.* (2000) e Bankova *et al.* (2000). Deste modo, para propósitos de controle de qualidade dos extratos etanólicos de própolis, a legislação brasileira em vigor deve sofrer reformulações, já que a exigência de teores mínimos de flavonóides totais e fenólicos totais nos extratos de própolis nem sempre condizem com as atividades biológicas destas amostras. Isto pode ser observado para os extratos etanólicos da amostra PS e Pr que apesar de não possuírem o teor mínimo exigido pela legislação em relação ao teor de flavonóides totais possuem capacidade antioxidante total elevada e atividade antimicrobiana frente à cepa MRSA respectivamente.

Também comprovamos os resultados obtidos por Koo e Park (1996) que demonstram que a variedade da abelha que coleta a própolis exerce uma grande influência na qualidade e quantidade dos flavonóides presentes na amostra. Dentre as amostras de própolis analisadas aquelas produzidas pelas abelhas Meliponíneas se mostraram menos ativas biologicamente.

Todas as metodologias utilizadas, desde aquelas mais simples como a determinação do teor de flavonóides totais pela complexação com o cátion alumínio ou cromatografia em camada delgada até metodologias de maior sofisticação como eletroforese capilar ou cromatografia líquida de alta eficiência, apesar de possuírem algumas limitações demonstraram-se eficientes para o controle de qualidade de diferentes amostras de própolis. Portanto, todas as metodologias podem ser utilizadas na caracterização destas amostras. Se usadas em conjunto, como foi o presente caso, há enriquecimento do cabedal de informações colhidas.

#### 5.4 CORRELAÇÃO COM A FLORA

O prévio conhecimento da fonte botânica da própolis pode ser útil como uma base para a padronização química da mesma. Com isto, uma amostra de própolis poderia ser facilmente caracterizada comparativamente à fonte botânica potencialmente doadora da resina nativa e utilizando para isto análises paralelas via CCD, CLAE e CG. Quando a composição do exsudato da planta correspondente for determinada, fornecerá informações sobre a composição qualitativa da amostra. Por exemplo, quando se sabe que a própolis tem origem dos exsudatos de álamo, sabe-se que o produto é uma mistura de flavonóides agliconas, ácidos hidroxicinâmicos e

seus ésteres. É o que foi estabelecido nesta dissertação como primeiro trabalho brasileiro correlacionando flora exótica homogênea (reflorestamento) e sua própolis derivada.

#### 5.4.1 Aspectos ecológicos

Uma foto da abelha do gênero *Apis sp.* coletando material do broto da espécie *Populus deltoides* na zona de reflorestamento da empresa Swedish Match do Brasil foi obtida (FIGURA 55). Indicando que esta espécie botânica é utilizada como fonte de resina para a produção de própolis por estas abelhas nesta região.

FIGURA 55 – ABELHA DO GÊNERO *Apis sp.* COLETANDO MATERIAL DO BROTO DA ESPÉCIE *Populus deltoides* NA ZONA DE REFLORESTAMENTO DA EMPRESA SWEDISH MATCH DO BRASIL



FONTE: Daniel Breyer, 2001.

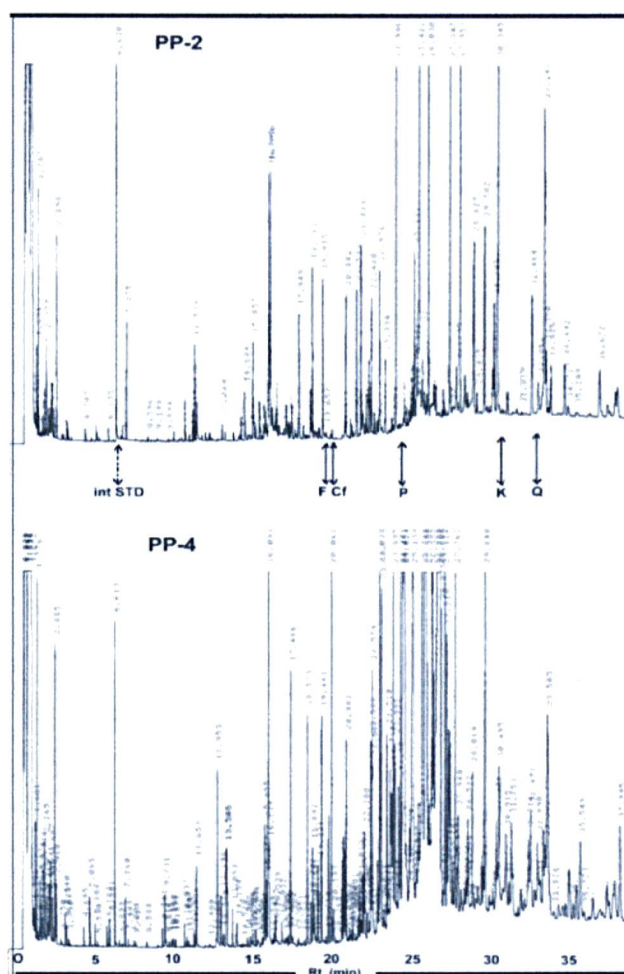
#### 5.4.2 Cromatografia gasosa de derivados persililados das amostras PP2 e PP4

Entre os vários métodos utilizados para a separação de misturas complexas de fenólicos naturais, como a própolis, a cromatografia gasosa é o mais importante devido a sua sensibilidade e resolução (Christov e Bankova, 1992).

Deste modo, os extratos etanólicos das amostras de própolis PP2 e PP4, obtidos de acordo com o procedimento de extração 4.2.1.2, foram submetidos à cromatografia gasosa.

As duas amostras de própolis apesar de coletadas na mesma região geográfica, apresentaram perfis químicos distintos quando analisadas como derivados persililados (FIGURA 56).

FIGURA 56 – CROMATOGRAFIA GASOSA DOS DERIVADOS PERSILILADOS DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS PP4 E PP2



Cromatografia gasosa utilizando uma coluna CROMA – 5 (similar a um fase estacionária HP-5) de 30 metros de comprimento, com 0,2 mm de diâmetro interno e 30  $\mu$ m de espessura do filme de 5% fenil – 95% dimetilpolisiloxano. Programando a plataforma de 100  $^{\circ}$ C até 300  $^{\circ}$ C através de uma programação de 10  $^{\circ}$ C por minuto acoplado a um detector ionização de chama. Tempo de retenção para o padrão interno de ácido benzóico, ferúlico (f) e cafeico (Cf), pinocembrina (P; tempo de retenção = 23,7 minutos), canferol (K) e quercetina (Q) são apontados pelas setas.

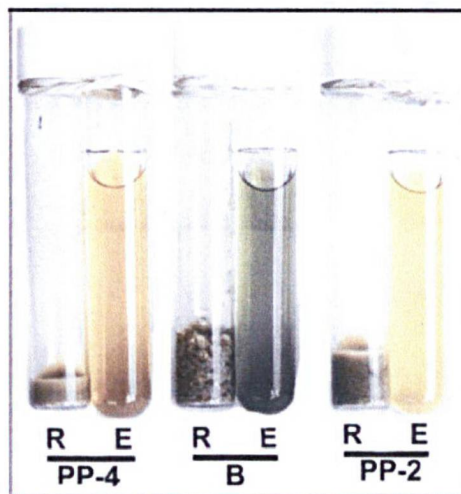
No cromatograma da amostra de própolis PP4 pelo menos cem compostos foram detectados na zona densa de compostos eluídos entre 25 e 30 min, incluindo a pinocembrina (Tr = 23.7 min), contra o padrão (não mostrado). Comprovando novamente a existência deste flavonóide nas amostras de própolis PP4, que já havia sido detectado anteriormente por CCD, CLAE e ECM. Pode-se observar que o



extrato da amostra PP4 apresenta uma maior quantidade de compostos na região entre 25 e 30 minutos quando comparada a amostra PP2.

Estes resultados químicos estão de acordo com o aspecto físico diferenciado das amostras. A própolis PP2 apresenta uma coloração usual cinza-esverdeada, odor floral agradável e aspecto quebradiço e a PP4 apresenta coloração ocre intensa, odor suave e aspecto dúctil – maleável. Diferenças nas colorações dos seus respectivos extratos etanólicos também são observadas, sendo o da amostra PP2 amarelo claro e da amostra PP4 ocre (FIGURA 57). A quantidade de sólidos totais para os extratos etanólicos obtidos também foi diferente, sendo 0,331 e 0,718 mg / g para a PP2 e PP4 respectivamente. Os brotos secos, ao contrário, apresentaram 10% de resíduos sólidos, apesar de serem amostras mais ricas em pinocembrina e nos seus flavonóides relacionados (FIGURA 58-A).

FIGURA 57 – ASPECTO FÍSICO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS (PP4; PP2) E DOS BROTOS DE ÁLAMO (B). R = RESÍDUOS APÓS A EXTRAÇÃO E = EXTRATOS



#### 5.4.3 Determinação de flavonóides totais

O teor de flavonóides totais para os extratos etanólicos das amostras PP2, dos brotos de álamo e da amostra PP4 foram de 0,8, 4,9 e 10,4 % respectivamente, como medido pela técnica de complexação com alumínio. Nenhuma quantidade apreciável de flavonóides foi encontrada em outras partes botânicas do álamo, como



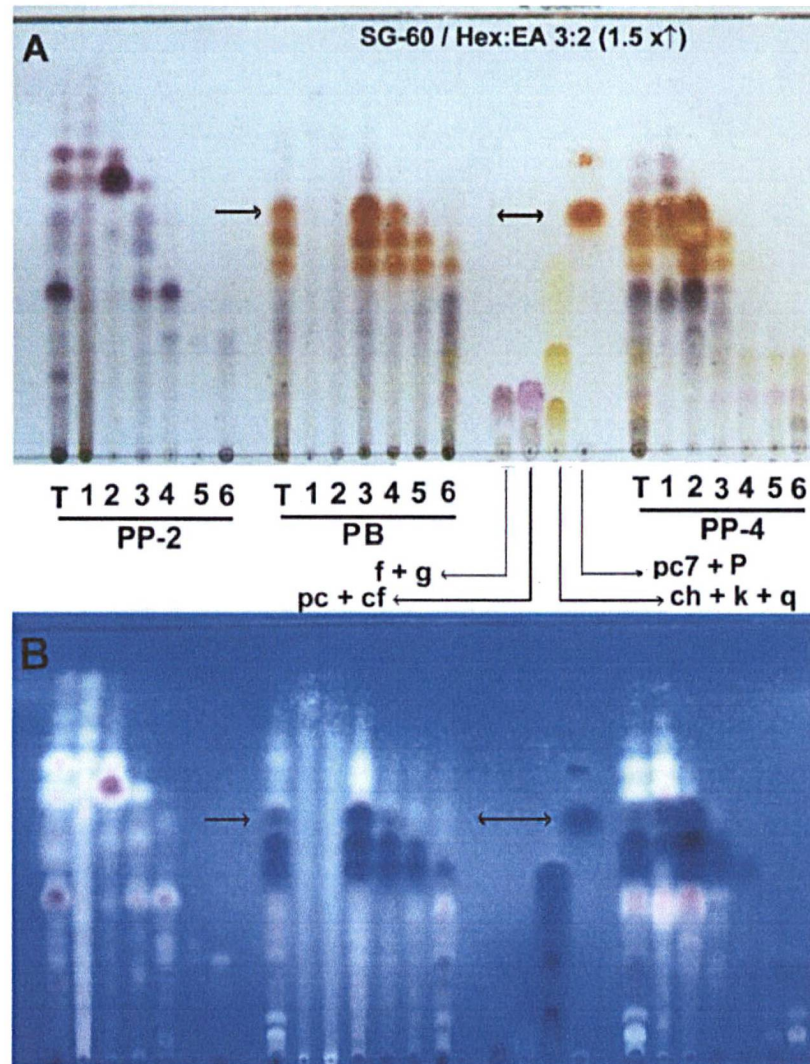
folhas, galhos, casca, e tronco. Como a estrutura química dos flavonóides determina a intensidade da cor como um resultado da complexação com  $Al^{3+}$ , o teor de flavonóides pode ser subestimado em amostras ricas em flavanonas. Além do mais, a pinocembrina enquanto uma simples di-hidroxi-flavanona, naturalmente incolor, é também fortemente reativa ao anisaldeído sulfúrico no procedimento de cromatografia em camada delgada. Porém, sua cromogenia alaranjada apesar de intensa não é estável (embora possa ser reavivada por novo aquecimento). Devido a estas duas observações, métodos alternativos foram adotados para a quantificação específica da pinocembrina nestas amostras.

#### 5.4.4 Análises cromatográficas

As amostras de própolis PP4 e PP2 assim como os brotos de álamo foram obtidas e fracionadas de acordo com o procedimento de obtenção dos extratos de material botânico relacionado às colméias. O refinamento das análises cromatográficas através da comparação das frações obtidas na coluna de ácido silícico ativado mostrou diferenças significativas entre as amostras de própolis confirmando o demonstrado pelas CCD analíticas, mas também indicou uma similaridade marcante entre as amostras de própolis PP4 e os brotos de álamo (FIGURA 58). Esta correlação não é observada quando comparamos a PP4 com outras partes aéreas do álamo como as folhas, galhos, casca e tronco (resultados não mostrados).

Tanto o extrato bruto dos brotos de álamo (PB; I) quanto suas frações derivadas 3, 4 e 5, assim como o extrato bruto da própolis PP4 (I) e suas frações derivadas 1, 2 e principalmente a 3, possuem bandas coincidentes intensamente reativas ao anisaldeído sulfúrico (manchas de coloração alaranjada intensa; FIGURA 58-A). A banda de maior migração cromatográfica coincide com o padrão de pinocembrina (mancha de coloração alaranjada mais intenso da linha de aplicação pc7 / P). A pinocembrina é uma forma hidrogenada da crisina no anel piranona [FIGURA 59; (HARBORNE, 1967)], porém a crisina apresenta apenas uma fraca reatividade (amarela) frente ao anisaldeído (a mancha de maior migração da coluna ch / k / q).

FIGURA 58 – CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS PP4 E PP2 E DOS BROTOS DE ÁLAMO



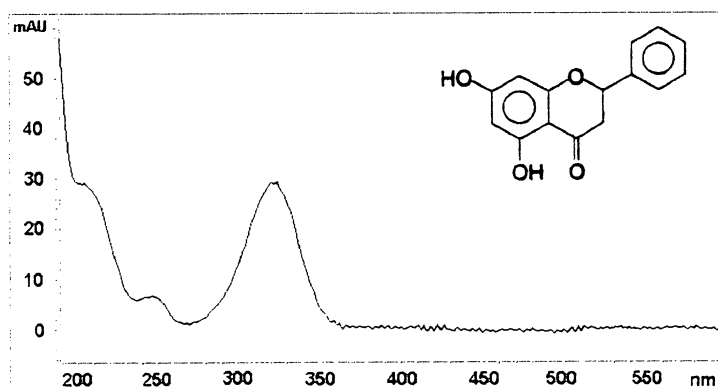
Cromatografia em camada delgada em placas cromatográficas de sílica gel G – 60 utilizando como fase móvel a mistura hexano / acetato de etila (3:2, v/v), 1,5 x corridas ascendentes. Agente cromogênico: anisaldeído sulfúrico a quente. Fotos coloridas tiradas logo após aquecimento, com luz natural (A) e sob UV-365 nm (B). T se referem aos extratos brutos das amostras de própolis (PP-2, PP-4), e brotos do álamo (PB), respectivamente. Os números se referem às frações seqüenciais das colunas de ácido silícico. Setas laterais se referem aos padrões de ácidos ferúlico (f) e gálico (g); ácidos p-cumárico (pc) e cafeico (cf); pinocembrina - 7 -metil éter (pc7) e pinocembrina (P; também apontada por setas horizontais); crisina (ch), canferol (k) e quercitina (q).

Apesar dos flavonóides apresentarem coloração pouco específica sob UV-365nm (todos apresentam uma fluorescência azul intensa depois de borrifadas com o anisaldeído), a visualização destas placas sob UV (FIGURA 58-B) confirma a similaridade entre os compostos comuns da própolis PP4 e dos brotos de álamo, incluindo o padrão de pinocembrina. A verificação no UV também confirmou a

ausência da pinocembrina-7-metil éter tanto na própolis quanto no broto de álamo (padrão de maior migração na linha pc-7 / P).

A densitometria em 440 nm da foto da placa de CCD (FIGURA 58-B), após uma calibração acurada do aparelho com concentrações crescentes de padrão de pinocembrina em uma placa separada, mostrou que a quantidade desta flavanona na amostra da própolis PP4 foi de 12,6%, partindo-se de um extrato bruto etanólico contendo 72% de sólidos totais. Como a pinocembrina, componente principal da amostra PP4, é fortemente reativa ao anisaldeído sulfúrico a quente e é um flavonóide da classe das flavanonas estes dados são mais confiáveis do que os obtidos através da metodologia de complexação com o cátion alumínio, pois, como discutido anteriormente, esta metodologia subestima o teor total de flavonóides em amostras enriquecidas neste grupo particular que é hidrogenado ao nível do anel C.

FIGURA 59 – A FLAVANONA PINOCEMBRINA (DIHIDROCRISINA; 4H -1-BENZOPIRAN - 4 - ONA, 2,3-DIHIDRO-5,7-DIHIDROXI-2-FENIL) E O SEU ESPECTRO UV VISÍVEL EM TAMPÃO ALCALINO

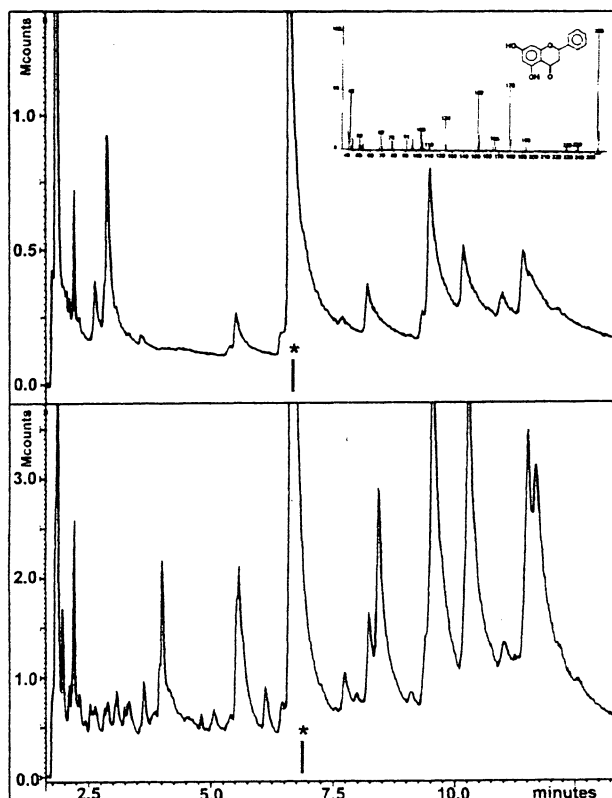


#### 5.4.5 Caracterização molecular

A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa das amostras não derivatizadas possibilitou uma confirmação final da ocorrência de quantidades não usuais de pinocembrina tanto na amostra de própolis PP4 quanto nos brotos de álamo (FIGURA 60). O espectro de massa para o pico de tempo de retenção 6,87 minutos, incluindo o íon molecular ( $C_{15}H_{12}O_4$ ; 256 Da), indicaram os fragmentos esperados de 179, 152, e 124 daltons. Também indispensável citar a similaridade dos perfis cromatográficos obtidos da amostra PP4 com o do broto de álamo. Pode-

se notar em ambos cromatogramas a dominância da pinocembrina sobre vários outros compostos voláteis. Também foi identificada, em ambas as amostras, um flavonóide relacionado a pinocembrina, a crisina (Tr = 10,20 minutos).

FIGURA 60 – COMPARAÇÃO DO CROMATOGRAMA GASOSO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DA AMOSTRA DE PRÓPOLIS PP4 E DO BROTO DE ÁLAMO



Cromatografia gasosa acoplado a espectrometria de massa utilizando uma coluna CHrompack CP-SIL 8 de 30 metros de comprimento, com 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25  $\mu\text{m}$  de espessura do filme de 5% fenil – 95% dimetilpolisiloxano operado isotermicamente a 250  $^{\circ}\text{C}$ .

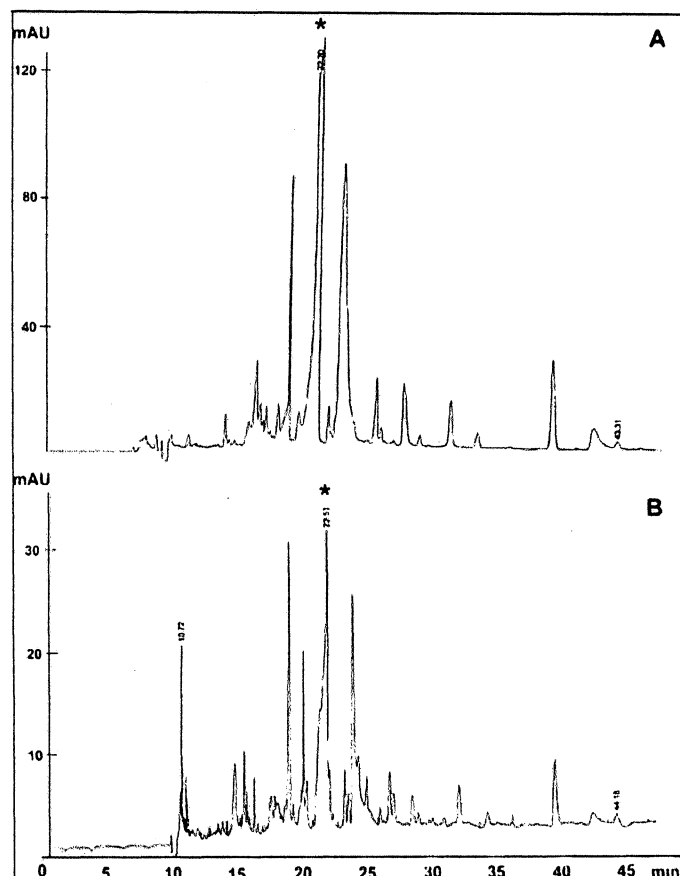
Cromatograma dos extratos etanólicos dos brotos de álamo (superior) e da própolis PP4 (inferior) e identificação da pinocembrina (tempo de retenção de 6,87 minutos) e seu espectro de massa.

#### 5.4.6 Eletroforese capilar

A eletroforese capilar de zona (ECZ) dos extratos etanólicos da própolis PP4 e do broto de álamo, monitorado no comprimento de onda máximo para flavanonas, mostrou a detecção de mais de 25 picos na própolis PP4 (FIGURA 61-A) e de mais de 30 picos nos brotos de álamo (FIGURA 61-B). A pinocembrina (pico ao redor de 22,4 min) é o componente mais abundante em ambas as amostras com 130 e 35 mAU de sensibilidade, respectivamente, e o trio de picos dominantes entre 19 e 25

minutos coincide com o perfil dos flavonóides previamente detectados pela CCD (tempo de migração de 0,5 em relação ao *front* de solvente).

FIGURA 61 – ELETROFORETOGRAMA DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DA PRÓPOLIS PP4 (A) E DO BROTO DE ÁLAMO (B)



Eletroforese capilar de zona realizada utilizando tampão tetraborato de sódio pH 8,5 (tetraborato de sódio 50 mM, fosfato de sódio 30 mM, 12% metanol). Condições: capilar de sílica (65 cm, 50  $\mu$ m de diâmetro interno), temperatura de 25  $^{\circ}$ C, voltagem de 20 kV, 53  $\mu$ A, detecção em 320 nm, injeção da amostra 50 mbar por 4 segundos.

(\*) Pontos das posições migratórias em relação ao padrão de pinocembrina ( $T_r$  = 22.42 min)

Observando todos os procedimentos analíticos empregados e os resultados obtidos, podemos afirmar que a fonte botânica utilizada pelas abelhas da espécie *Apis mellifera* para a produção da própolis PP4 são os brotos de álamo presentes na zona de reflorestamento da empresa Swedish Match do Brasil. Possivelmente compostos comumente encontrados nos brotos de álamo, como misturas de flavonóides agliconas, ácidos hidroxicinâmicos e seus ésteres (Bankova, Popov e Marekov, 1989; Greenaway *et al.*, 1991; English, Greenaway e Whatley, 1992;

Bankova *et al.*, 2000) estão presentes também nos extratos etanólicos da própolis PP4.

Como os exsudatos dos brotos de álamo são uma fonte potencial de antioxidantes naturais, a atividade antioxidante pronunciada dos extratos etanólicos de própolis PP4 deve estar relacionada à similaridade na composição da própolis com o broto de álamo que lhe dá origem.

#### 5.4.7 Extração de DNA do pólen

Alguns autores como Iwama, Melhem (1979) e Barth (1989) utilizam o pólen presente nas amostras de mel como indicador de sua origem botânica e geográfica. D'Albore (1979) por outro lado, tentou estabelecer o país de origem da própolis comercializada a partir da análise palinológica. Do ponto de vista teórico dessa dissertação essa análise pareceria pretenciosa demais, pois a análise da amostra PP4 refletiria erroneamente a origem desta própolis como sendo de regiões temperadas já que exsudatos de broto de espécies de *Populus* (poplar) e seus híbridos são geralmente a fonte botânica utilizada pelas abelhas para a produção de própolis na Europa, América do Norte, e regiões não tropicais da Ásia e até na Nova Zelândia (Bankova *et al.*, 2000). Todavia, sabendo-se da existência de um reflorestamento exótico, a consideração acima, invalidar-se-ia.

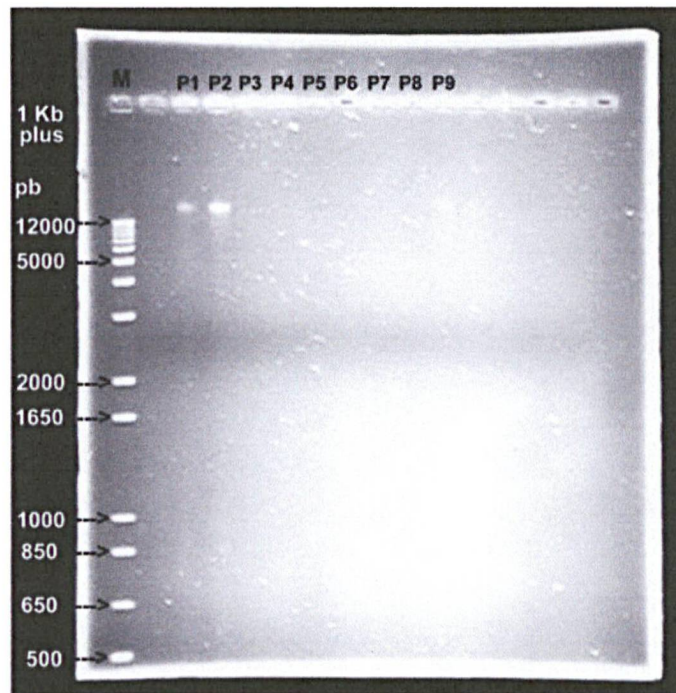
Como descrito por Iwama, Melhem (1979) e Barth (1989) a morfologia polínica permite a distinção apenas das famílias vegetais e em alguns casos dos gêneros, mas na maioria das vezes não permitem a distinção entre as espécies. Além disso, sabe-se que os grãos de pólen contêm quantidades relativamente altas de DNA (subestruturas celulares ou organelas) quando comparadas ao tamanho da célula (Peterson, Johansen e Seberg, 1996). Deste modo, procuramos relacionar os grãos de pólen presentes nas amostras de própolis com a origem botânica da mesma, através de análises por biologia molecular, deste modo obtendo a distinção a nível gênero e espécie.

Para se determinar a melhor maneira para a extração do DNA de pólen foi realizada uma eletroforese em gel de agarose do material genômico obtido das amostras de pólen tratadas de acordo com a metodologia de extração de DNA de pólen, como demonstra a figura 62. Analisando comparativamente as metodologias



utilizadas, observou-se que a maior quantidade de DNA extraído das amostras foi obtida utilizando-se o método de trituração direta do pólen *in natura* sob nitrogênio líquido, como demonstrado pelas amostras P1 e P2 na figura 62.

FIGURA 62 – ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE A 1 % DO DNA TOTAL EXTRAÍDO DE AMOSTRAS DE PÓLEN DE *Populus deltoides* (ÁLAMO)



Eletroforese em gel de agarose a 1 % com voltagem constante de 70 volts, 81 mA por 3 horas. Tampão de corrida TBE 1x. Marcador de peso molecular (M) - 1 Kb plus. Coloração com brometo de etídio. P1 e P2 amostras de pólen trituradas diretamente sob nitrogênio líquido; P3 e P4 extraídas de acordo com a metodologia de extração de DNA de plantas, porém com banho a 95 °C por 2 e 5 minutos respectivamente; P5, P6, P7 e P8 foram pré-germinados e extraídas conforme a metodologia de extração de DNA de plantas alterando-se a temperatura do banho para 95 °C por 2 minutos para P7 e por 5 minutos para P8; P9 foi extraída de acordo com a metodologia de extração de DNA de plantas sem prévia germinação.

#### 5.4.8 Escolha dos iniciadores (*primers*) para a amplificação das amostras

O DNA das folhas de álamo, eucalipto, laranjeira e plátano foram extraídos de acordo com a metodologia de extração de DNA de plantas e submetidas à reação em cadeia da polimerase (PCR) juntamente com a amostra de pólen P1 utilizando os quatro iniciadores selecionados, três para mtDNA, um para cpDNA e um para região ITS (*internal transcribed spacer*) de ribossomo.



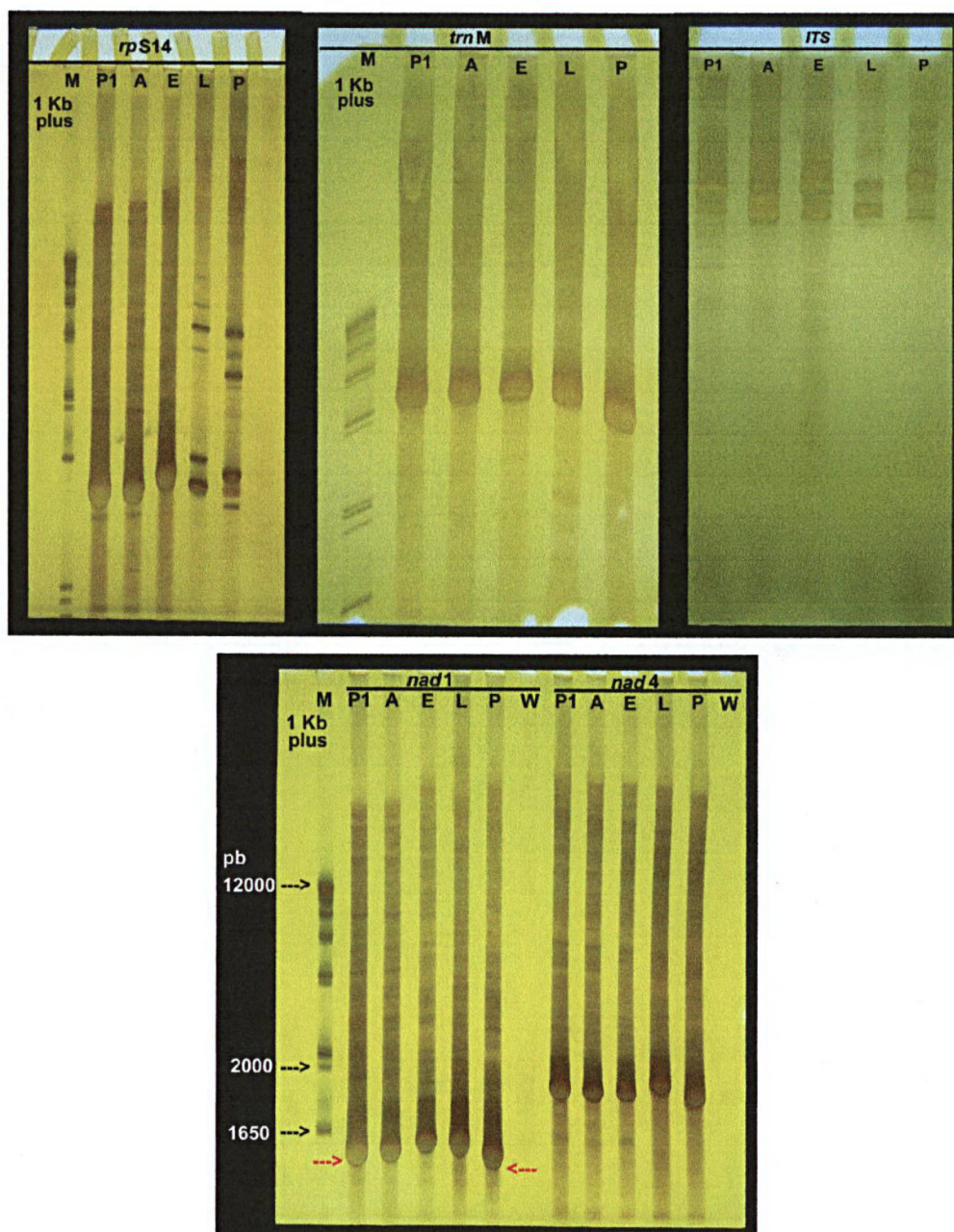
Podemos observar pela eletroforese dos produtos amplificados por PCR que apesar dos quatro iniciadores terem sido efetivos na amplificação do material genômico (FIGURA 63), o polimorfismo entre todas as espécies de plantas testadas é evidente apenas quando se utiliza o iniciador *nad1*. As bandas de DNA do pólen e da folha de álamo migram na mesma posição, mas em posição diferente do DNA extraído das outras amostras, sendo este o iniciador escolhido para amplificar o DNA do pólen extraído das amostras de própolis. Quando se utiliza o iniciador *rpS14* para a amplificação do material genômico se observam várias bandas de amplificação não específicas para as amostras de folha de laranjeira e plátano. Além disso, apesar do iniciador ITS indicar a variação entre o genoma haplóide do pólen e genoma diplóide da folha de álamo, também fornece várias bandas inespecíficas nas amostras testadas. O iniciador *tmM*, assim como o *nad4*, não fornece polimorfismo entre as espécies testadas, demonstrando que estes iniciadores não são os mais adequados para se verificar o polimorfismo entre as espécies de plantas testadas.

#### 5.4.9 Eletroforese dos produtos amplificados por PCR

As amostras R1, R2, C1 e C2 obtidas de acordo com o procedimento de extração do DNA de pólen das amostras de própolis foram submetidas a PCR e os produtos amplificados aplicados em géis de poliacrilamida a 6%.

Como se pode observar pela figura 64 não houve amplificação do DNA do pólen extraído das amostras de própolis por nenhuma das duas metodologias testadas (R1 e R2). O DNA extraído das amostras de pólen *in natura* utilizadas como controle (C1 e C2) foram amplificados apresentando bandas nítidas, indicando que os procedimentos utilizados para a extração do DNA não danificam o material genômico. Como descrito por Peterson, Johansen, Seberg (1996) a metodologia de PCR é capaz, dependendo do iniciador utilizado, de amplificar genes de apenas um a cinco grãos de pólen intactos (sem extração prévia). O que indica a presença de alguma substância na amostra de própolis que inibe a reação de PCR.

FIGURA 63 – ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA A 6 % DO PRODUTO DO PCR DO PÓLEN DE ÁLAMO E DE FOLHAS DE ÁLAMO, EUCALIPTO, LARANJEIRA E PLÁTANO.

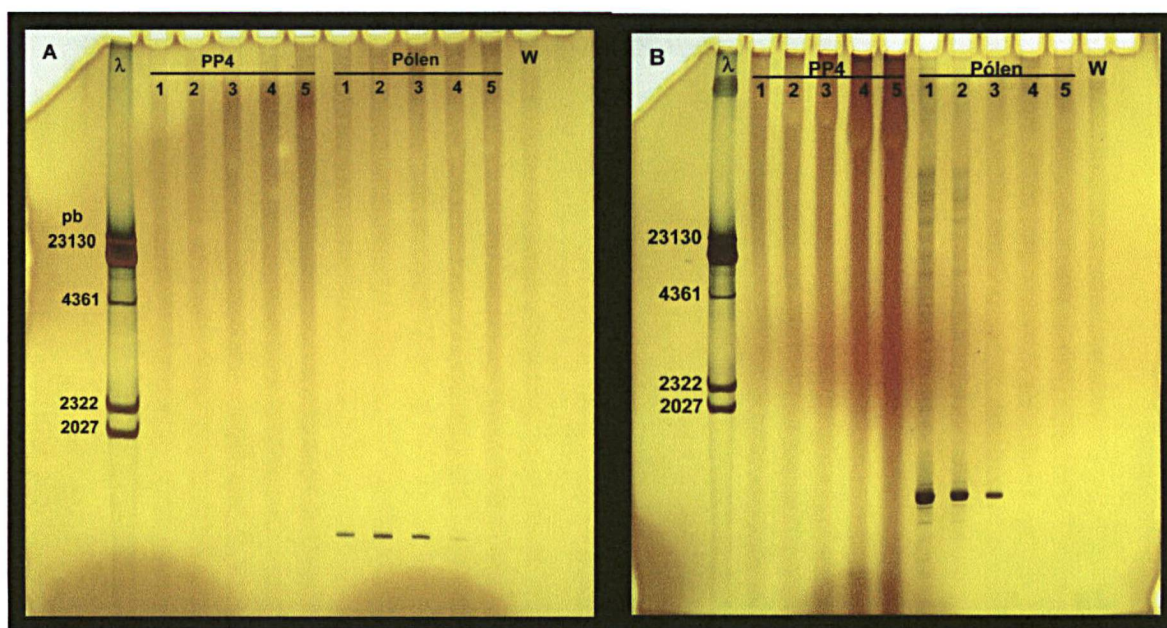


Eletroforese em gel de acrilamida a 6 % com voltagem constante de 80 volts por 15 minutos para todos os géis e 100 V por 7 horas para os iniciadores Nad1 e Nad4, por 6 horas para o *rpS14*, por 8 horas para o *trnM* e por 2 horas e 15 minutos para o ITS. Tampão de corrida TBE 1x. Marcador de peso molecular: 1 Kb plus. Coloração com nitrato de prata.

Legenda: P1 – pólen de álamo, A – folha de álamo, E – folha de Eucalipto, L – folha de Laranjeira, P – folha de plátano e W – branco.



FIGURA 64 – ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA A 6 % DO PRODUTO DE PCR DO PÓLEN DE ÁLAMO E DO PÓLEN DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS PP4



Eletroforese em gel de acrilamida a 6 % com voltagem constante de 80 volts por 15 minutos e 100 V por 7 horas. Tratamento com KOH (A) e organossolvente (B). Tampão de corrida TBE 1x. Marcador de peso molecular: lambda ( $\lambda$ ). Coloração com nitrato de prata.

Legenda: 1, 2, 3, 4 e 5 se referem aos volumes de 0,25; 0,5; 1, 2 e 4  $\mu$ L de DNA aplicados na reação de PCR, respectivamente; W = branco.

Além disso, podemos observar que quando somente 0,5  $\mu$ L de solução contendo DNA é utilizado, a banda amplificada é mais intensa do que quando utilizamos 1  $\mu$ l de DNA, ou seja, quanto maior a quantidade de solução contendo DNA é utilizada na reação de PCR, menor a amplificação do material genético. O que ratifica a suspeita de inibição da reação de PCR, agravada se usando uma maior quantidade de DNA.

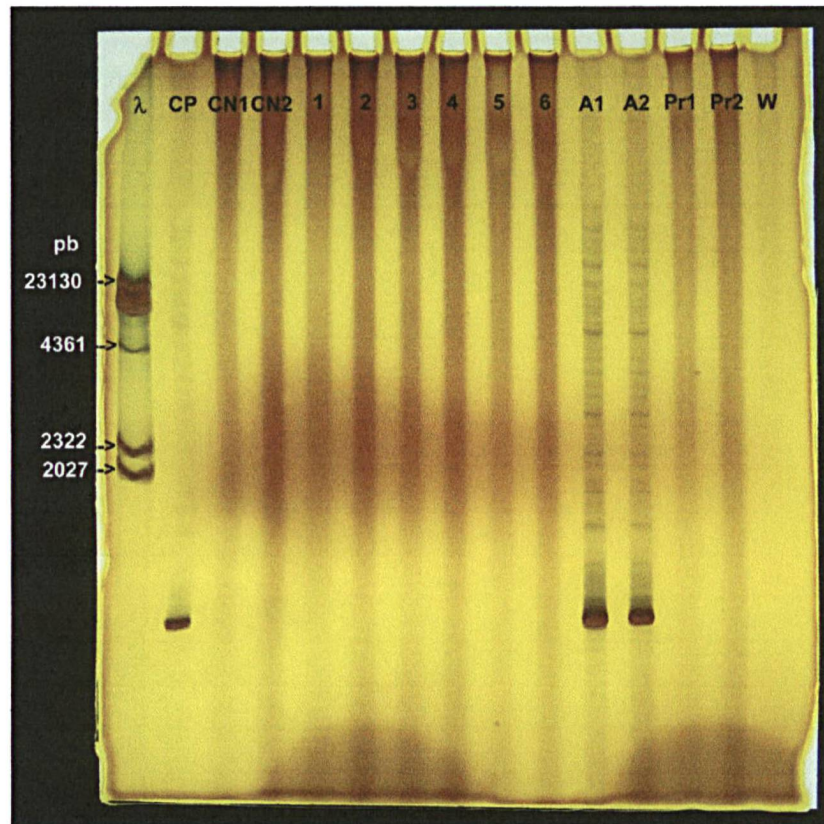
Analisando comparativamente os dois tratamentos utilizados para a obtenção do DNA das amostras de própolis, observamos que o tratamento utilizando organossolventes é um tratamento menos agressivo para o material genômico, fornecendo bandas de maior intensidade do que as obtidas quando tratamos as amostras com hidróxido de potássio (KOH).

Para comprovar se existiam na própolis substâncias inibidoras da reação de PCR, as misturas do DNA das amostras C2 (controle) e R2 (DNA de pólen de



própolis) foram submetidas à reação em cadeia da polimerase e os produtos amplificados foram aplicados em um gel de poliácridamida a 6 % (FIGURA 65).

FIGURA 65 – ELETROFORESE EM GEL DE ACRILAMIDA A 6% DO PRODUTO DE PCR DO PÓLEN DE ÁLAMO E DO PÓLEN DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS PP4 EM ASSOCIAÇÃO OU ISOLADOS



Eletroforese em gel de acrilamida a 6 % com voltagem constante de 80 volts por 15 minutos e 100 V por 7 horas. Tratamento com organossolvente. Tampão de corrida TBE 1x. Marcador de peso molecular: lambda ( $\lambda$ ). Coloração com nitrato de prata.

Legenda: 1, 2, 3, 4, 5 e 6 se referem as misturas de DNA das amostras C2 e R2 nas proporções de 0,5:1; 0,5:2; 1:1; 1:2; 2:1 e 2:2  $\mu$ L; CP – 1  $\mu$ L do DNA da amostra C2; CN1 e CN2 – 1 e 2  $\mu$ L respectivamente do DNA da amostra R2; A1 e A2 – 1 e 2  $\mu$ L respectivamente do DNA do pólen sem extração; Pr1 e Pr2 – 1 e 2  $\mu$ L respectivamente do DNA da amostra R2 sem extração; W – branco

As bandas de amplificação do DNA do pólen obtido por extração sob nitrogênio líquido (CP) e do DNA do pólen utilizado diretamente *in natura* na reação de PCR (A1 e A2) demonstram não haver nenhum problema tanto com a metodologia de extração do DNA do pólen quanto de reação de PCR. Porém, quando as misturas do DNA do pólen *in natura* com o DNA de pólen obtido das amostras de própolis são submetidos à reação de PCR, nenhuma banda de

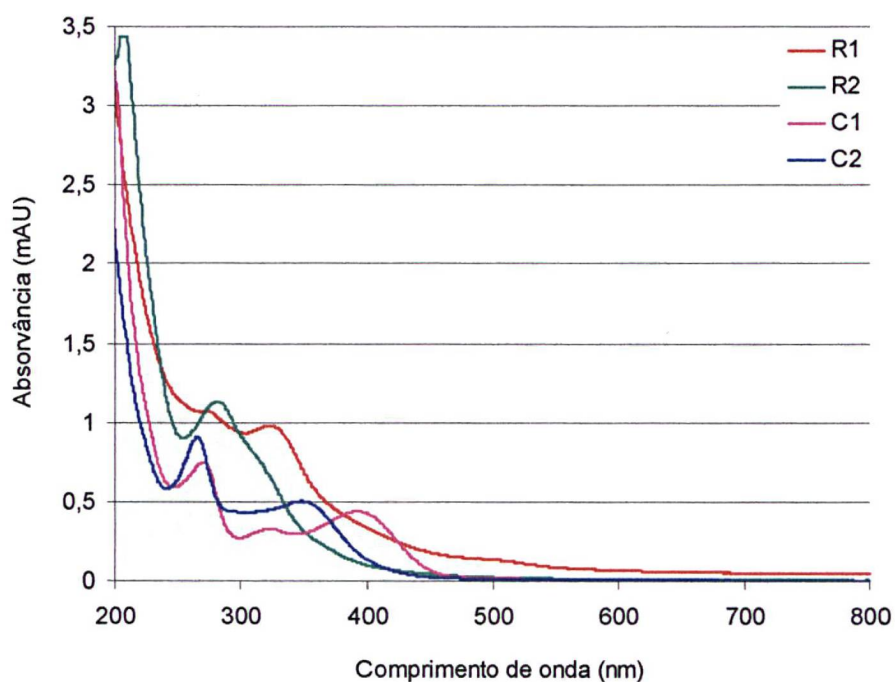
amplificação do material genômico é observada, comprovando a existência de alguma substância inibitória nas amostras de própolis atuando negativamente sobre a reação de PCR.

#### 5.4.10 Espectro de absorvância e quantificação do DNA

A análise das soluções contendo DNA das amostras C1, C2, R1 e R2 submetidas à reação de PCR, foi realizada através da determinação espectrofotométrica de varredura e da quantificação do conteúdo de DNA através do método de Warburg e Christian (1941).

Observamos uma grande variação no perfil de varredura destas soluções tanto para as amostras de pólen controle (C1 e C2) quanto para o pólen das amostras de própolis (R1 e R2) (FIGURA 66). Todas as amostras apresentam absorvância entre 260 e 280 nm, apresentando conteúdos de 6,35; 16,6; 3,7 e 3,3 % de ácidos nucléicos respectivamente para as amostras C1, C2, R1 e R2. O maior conteúdo de ácidos nucléicos ocorreu no controle de pólen pré-tratado com organossolvente. Esta última desestrutura a membrana lipoprotéica, precipita *in situ* o material genômico que é posteriormente de forma mais fácil solubilizado pelo solvente aquoso de extração propriamente dita. Não obstante as amostras de própolis, por conta do componente pólen(s), disporem de suficiente DNA para sustentar um procedimento amplificatório, tal não se deu por conta dos putativos inibitórios ali presentes; sejam eles de natureza nucleotídica ou não.

FIGURA 66 – PERFIL DE VARREDURA DA SUSPENSÃO DE DNA DO PÓLEN *in natura* (C1 E C2) E DO PÓLEN DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS (R1 e R2)



Legenda: P1 e P2 se referem às suspensões de DNA obtidas após tratamento do pólen *in natura* com KOH e organossolvente respectivamente; R1 e R2 as suspensões de DNA obtidas após tratamento do pólen das amostras de própolis com KOH e organossolvente respectivamente.

## 6. CONCLUSÃO

Após a análise dos resultados obtidos neste trabalho com própolis, pode-se chegar às seguintes conclusões:

1. Há uma grande variação no rendimento de sólidos totais, flavonóides totais, fenólicos totais, atividade antimicrobiana, atividade antioxidante, assim como no perfil cromatográfico, eletroforético e espectrofotométrico entre as diferentes amostras de própolis, mesmo fixando-se a variedade da abelha coletora, devido a diferenças na origem geográfica e conseqüentemente na composição das mesmas. Estes achados fortalecem a tese central da pesquisa ora abordada, ou seja, a correlação química entre a flora visitada pelas abelhas e a própolis como produto final.
2. De uma maneira geral, os extratos de própolis proporcionam maior inibição frente à cepa meticilina resistente do que à cepa selvagem de *Staphylococcus aureus*. Esse comportamento torna as amostras de própolis ainda mais importantes como fontes de antibióticos naturais, visto que o uso da vancomicina deve ser restrito e também devido ao aparecimento de cepas já resistentes a este antibiótico.
3. A metodologia de extração mais eficiente na obtenção de extratos de própolis biologicamente ativos foi aquela realizada utilizando o etanol puro como solvente extrator, aquecimento a 45 °C e reextração por mais 24 horas, na mesma temperatura.
4. As amostras de própolis que possuem maiores teores de flavonóides e fenólicos totais nem sempre apresentam as maiores atividades biológicas (antimicrobiana e antioxidante), comprovando que não só a quantidade destes compostos presentes na própolis, mas principalmente a qualidade dos mesmos exerce uma grande influencia nas atividades biológicas destas amostras. Portanto as metodologias analíticas deveriam estar obrigatoriamente associadas a ensaios biológicos no controle de qualidade de amostras de própolis.
5. A legislação brasileira em vigor, portanto, poderia comportar reformulações, já que a exigência de teores mínimos de flavonóides totais e fenólicos totais nos extratos de própolis nem sempre é garantia de eficácia.
6. A variedade da abelha que coleta a própolis exerce uma grande influência na qualidade e quantidade dos flavonóides presentes na amostra. As própolis de



abelhas Meliponíneos analisadas apresentaram baixos rendimentos em compostos biologicamente ativos e menores atividades biológicas quando comparadas às amostras de abelhas do gênero *Apis*.

7. Todas as metodologias utilizadas, desde as mais simples como a determinação do teor de flavonóides totais pela complexação com o cátion alumínio ou cromatografia em camada delgada até metodologias de maior sofisticação como eletroforese capilar ou cromatografia líquida de alta eficiência, apesar de possuírem algumas limitações, enquanto conjunto de arsenal analítico, se mostraram eficientes para o controle de qualidade de diferentes amostras de própolis.

8. Pode-se afirmar que a fonte botânica majoritária utilizada pelas abelhas da espécie *Apis mellifera* para a produção da própolis PP4 são os brotos de álamo presentes na zona de reflorestamento da empresa Swedish Match do Brasil, já que o conjunto analítico endossou a hipótese de trabalho baseada no inicialmente apenas indício geográfico.

9. A melhor metodologia para a extração do DNA de amostras de pólen foi à trituração direta do pólen *in natura* sob nitrogênio líquido.

10. O polimorfismo entre as espécies de plantas testadas, álamo (*Populus deltoides*), eucalipto (*Eucalyptus globulus*), laranjeira (*Citrus sinensis*) e plátano (*Platanus occidentalis*) é evidente apenas quando se utiliza o iniciador *nad1* para a amplificação do material genômico por PCR.

11. Quanto maior a quantidade de solução contendo DNA utilizada na reação de PCR, menor foi à amplificação do material genético, sugerindo a co-ocorrência de níveis críticos de inibidores no pólen e/ou na própolis propriamente dita.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A VIDA das abelhas. Disponível em: <<http://www.angelfire.com/wy/shangrila/vida.html>> Acesso em: 14 jun. 2004.

AS ABELHAS. Disponível em: <<http://www.portugalfarm.com/Bees.htm>> Acesso em: 12 jun. 2004.

ABELHAS. Disponível em: <<http://geocities.yahoo.com.br/guipichonelli/abelhas.html>> Acesso em: 12 jun. 2004.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. e Watson, J. D. **Tecnologia do DNA recombinante**. Porto Alegre: Artes médicas, 1997. p. 1294.

Alcaráz, L. E., Blanco, S. E., Puig, O. N., Tomás, F. e Ferretti, F. H. **Antibacterial activity of flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains**. Journal of Theoretical Biology, v. 205, p. 231-240, 2000.

Amoros, M., Lurton, E., Boustie, J., Girre, L., Sauvager, F. e Cormier, M. **Comparison of the anti-herpes simplex virus activities of propolis and 3-methyl-but-2-enyl caffeate**. Journal of Natural Products, v. 57 (5), p. 644-647, 1994.

Amoros, M., Simões, C. M. O., Girre, L., Sauvager, F. e Cormier, M. **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, p. 1732-1740, 1992.

Apiário Guiliani. Disponível em: <<http://apiarioguiliani.cjb.net/>> Acesso em: 13 out. 2004.

APICULTURA. Disponível em: <<http://www.breyer.ind.br/apicultura/apicultura.htm>> Acesso em: 14 jun. 2004.

Arnao, M. B. **Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case**. Trends in Food Science & Technology, v. 11, p. 419-421, 2000.

Arts, M. J. T. J., Dallinga, J. S., Voss, H.-P., Haenen, G. R. M. M. e Bast, A. **A critical appraisal of the use of the antioxidant capacity (TEAC) assay in defining optimal antioxidant structures**. Food Chemistry, v. 80, p. 409-414, 2003.

Bankova, V., Boudourova-Krasteva, G., Popov, S., Sforcin, J. M. e Funari, S. R. C. **Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis**. Apidologie, v. 29, p. 361-367, 1998.

Bankova, V., Christov, R., Kujumgiev, A., Marcucci, M. C. e Popov, S. **Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis**. Zeitschrift Fur Naturforschung, v. 1995, p. 167-172, 1995.

Bankova, V., Christov, R., Popov, S., Marcucci, M. C., Tsvetkova, I. e Kujumgiev, A. **Antibacterial activity of essential oils from Brazilian propolis.** *Fitoterapia*, v. 70, p. 190-193, 1999.

Bankova, V. S., Castro, S. L. d. e Marcucci, M. C. **Propolis: recent advances in chemistry and plant origin.** *Apidologie*, v. 31, p. 3-15, 2000.

Bankova, V. S., Popov, S. S. e Marekov, N. L. **A study on flavonoids of propolis.** *Journal of Natural Products*, v. 46, p. 471-474, 1983.

Bankova, V. S., Popov, S. S. e Marekov, N. L. **Isopentenyl cinnamates from poplar buds and propolis.** *Phytochemistry*, v. 28, p. 871-873, 1989.

Banskota, A. H., Tezuka, Y., Adnyana, I. K., Midorikawa, K., Matsushige, K., Message, D., Huertas, A. A. G. e Kadota, S. **Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 72, p. 239-246, 2000.

Banskota, A. H., Tezuka, Y., Prasain, J. K., Matsushige, K., Saiki, I. e Kadota, S. **Chemical constituents of Brazilian propolis and their citotoxic activities.** *Journal of Natural Products*, v. 29, p. 896-900, 1998.

Baron, E. J., Peterson, L. R. e Finegold, S. M. **Methods for testing antimicrobial effectiveness.** St. Louis: Mosby, 1994. p. 168-188.

Barth, O. M. **O pólen no mel brasileiro.** Rio de Janeiro: Gráfica Luxor, 1989. 150 p.

Basnet, P., Matsuno, T. e Neidlein, R. **Potent free radical scavenging activity of propolis isolated from Brazilian propolis.** *Zeitschrift für Naturforschung C*, v. 52 (11/12), p. 828-833, 1997.

Bellegrandi, S., d'Offizi, G., Ansotegui, I. J., Ferrara, R., Scala, E. e Paganelli, R. **Propolis allergy in an HIV-positive patient.** *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 35 (4), p. 644, 1996.

Benzie, I. F. F. e Strain, J. J. **The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": the FRAP assay.** *Analytical Biochemistry*, v. 239, p. 70-76, 1996.

Berg, R. v. d., Haenen, G. R. M. M., Berg, H. v. d. e Bast, A. **Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures.** *Food Chemistry*, v. 66, p. 511-517, 1999.

Bianchini, L. e Bedendo, I. P. **Efeito antibiótico do própolis sobre bactérias fitopatogênicas.** *Sci agric Piracicaba*, v. 55, p. 149-152, 1998.

Blois, M. S. **Antioxidant determinations by the use of a stable free radical.** *Nature*, v. 181, p. 1199-1200, 1958.

Borrelli, F., Maffia, P., Pinto, L., Ianaro, A., Russo, A., Capasso, F. e Ialenti, A. **Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract.** *Fitoterapia*, v. 73, p. S53-S63, 2002.

Bosio, K., Avanzini, C., D'Avolio, A., Ozino, O. e Savoia, D. **In vitro activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*.** *Letters in applied Microbiology*, v. 31, p. 174-177, 2000.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. e Berst, C. **Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity.** *Lebensmittel Wissenschaft Und Technologie*, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa nº3, de 19 de janeiro de 2001. Aprova os regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis, conforme consta dos Anexos desta Instrução Normativa.

Breyer, E. U. **Abelhas e saúde.** União da Vitória: UniportoGráfica e Editora Ltda., 1980. 40 p.

Burdock, G. A. **Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis).** *Food and Chemical Toxicology*, v. 36, p. 347-363, 1998.

Castro, S. L. d. e Higashi, K. O. **Effect of diferent formulations of propolis on mice infected with *Trypanosoma cruzi*.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 46, p. 55-58, 1995.

Chen, C. N., Wu, C. L. e Lin, J. K. **Propolin C from propolis induces apoptosis through activating caspases, Bid and cytochrome c release in human melanoma cells.** *Biochemical Pharmacology*, v. 67, p. 53-66, 2004.

Choi, J. S., Yokozawa, T. e Oura, H. **Antihyperlipidemic effect of flavonoids from *Prunus davidiana*.** *Journal of Natural Products*, v. 54 (1), p. 218-224, 1991.

Christov, R. e Bankova, V. **Gas chromatographic analysis of underivatized phenolic constituents from propolis using an electron-capture detector.** *Journal of Chromatography*, v. 623, p. 182-185, 1992.

Christov, R., Bankova, V., Tsvetkova, I., Kujumgiev, A. e Tejera, A. D. **Antibacterial furofuran lignans from Canary Islands propolis.** *Fitoterapia*, v. 70, p. 89-92, 1999.

Cicala, C., Morello, S., Iorio, C., Capasso, R., Borrelli, F. e Mascolo, N. **Vascular effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on isolated rat thoracic aorta.** *Life Science*, v. 9357, p. 1-8, 2003.

Cizmárik, J. e Trupl, J. **Effects of propolis on dermatophytic fungi.** *Pharmazie*, v. 31 (1), p. 55, 1976.

Cronquist, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York, Columbia University Press, 1981.

d'Albore, G. R. **L'origine géographique de la propolis**. *Apidologie*, v. 10 (3), p. 241-267, 1979.

Dawson, R. M. C., Elliott, D. C., Elliott, W. H. e Jones, K. M. **Biochemical procedures**. Oxford: Clarendon Press, 1989. p. 541-542.

Demesure, B., Sodzi, N. e Petit, R. J. **A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants**. *Molecular Ecology*, v. 4, p. 129-131, 1995.

Dimov, V., Ivanovska, N., Manolova, N., Bankova, V., Nikolov, N. e Popov, S. **Immunomodulatory action of propolis - Influence on antiinfectious protection and macrophage function**. *Apidologie*, v. 22 (2), p. 155-162, 1991.

Dobrowolski, J. W., Vohora, S. B., Sharma, K., Shah, S. A., Naqvi, S. A. H. e Dandiya, P. C. **Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products**. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 35, p. 77-82, 1991.

Doyle, J. J. e Doyle, J. L. **Isolation of plant DNA from fresh tissue**. *Focus*, v. 12, p. 13-15, 1990.

English, S., Greenaway, W. e Whatley, F. R. **Analysis of phenolics in the bud exudates of *Populus deltoides*, *P. fremontii*, *P. sargentii* and *P. wislizenii* by GC-MS**. *Phytochemistry*, v. 31 (4), p. 1255-1260, 1992.

Fernandes Jr, A., Leomil, L., Fernandes, A. A. H. e Sforcin, J. M. **The antibacterial activity of propolis produced by *Apis mellifera* L. and Brazilian stingless bees**. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, v. 7 (2), p. 1-9, 2001.

Fernandes Jr, A., Lopes, C. A. M., Sforcin, J. M. e Funari, S. R. C. **Population analysis of susceptibility to propolis in reference strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli***. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, v. 3 (2), p. 1997.

Fernandes Jr, A., Sugizaki, M. F., Fogo, M. L., Funari, S. R. C. e Lopes, C. A. M. **In vitro activity of propolis against bacterial and yeast pathogens isolated from human infections**. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, v. 1 (2), p. 1995.

Fontana, J. D., Adelman, J., Passos, M., Maraschin, M., Lacerda, C. A. de e Lanças, F. M. **Propolis: chemical micro-heterogeneity and bioactivity**. In: New Jersey: Humana press, 2004. p. 203-218.

Fontana, J. D., Gebara, M., Blumel, M., Schneider, H., Mackenzie, C. R. e Johnson, K. G. **Alpha-4-o-methyl-d-glucuronidase component of xylanolytic complexes**. In: San Diego: 1988. p. 560-574.

Fontana, J. D., Passos, M., Santos, M. H. R. d., Fontana, C. K., Oliveira, B. H., Schause, L., Pontarolo, R., Barbirato, M. A., Ruggiero, M. A. e Lanças, F. M. **Profiling propolis flavonoids by means of micellar electrokinetic capillary chromatography, capillary gas chromatography and bactericidal action.** *Chromatographia*, v. 52 (3/4), p. 147-151, 2000.

Ginzburg, E., Namias, N., Brown, M., Ball, S., Hameed, S. M. e Cohn, S. M. **Gram positive infection in trauma patients: new strategies to decrease emerging Gram-positive resistance and vancomycin toxicity.** *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 16, p. S39-S42, 2000.

Grange, J. M. e Davey, R. W. **Antibacterial properties of propolis (bee glue).** *Journal of the Royal Society of Medicine*, v. 83 (3), p. 159-160, 1990.

Greenaway, W., May, J., Scaysbrook, T. e Whatley, F. R. **Identification by Gas-Chromatography Mass-Spectrometry of 150 compounds in propolis.** *Zeitschrift Fur Naturforschung C*, v. 46 c, p. 111-121, 1991.

Harborne, J. B. **Comparative Biochemistry of the Flavonoids.** New York, Academic Press Inc., 1967. 382 p.

Havsteen, B. **Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency.** *Biochemical Pharmacology*, v. 32, p. 1141-1148, 1983.

Havsteen, B. H. **The biochemistry and medical significance of the flavonoids.** *Pharmacology & Therapeutics*, v. 96, p. 67-202, 2002.

Hegazi, A. G., Hady, F. K. A. E. e Allah, F. A. M. A. **Chemical composition and antimicrobial activity of European propolis.** *Zeitschrift Fur Naturforschung*, v. 55C, p. 70-75, 2000.

Hermann, G. R. e Bracamonte, J. A. **Propolis extract as a sunscreen agent.** *Drug & Cosmetic Industry*, v. 147 (4), p. 38, 1990.

Higashi, K. O. e Castro, S. L. D. **Propolis extracts are effective against *Trypanosoma cruzi* and have an impact on its interaction with host cells.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 43, p. 149-155, 1994.

Ikeno, K., Ikeno, T. e Miyazawa, C. **Effects of propolis on dental-caries in rats.** *Caries Research*, v. 25 (5), p. 347-351, 1991.

Ivanovska, N. D., Dimov, V. B., Bankova, V. S. e Popov, S. S. **Immunomodulatory action of propolis. VI. Influence of a water soluble derivative on complement activity *in vivo*.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 47, p. 145-147, 1995.

Iwama, S. e Melhem, T. S. **The pollen spectrum of the honey of *Tetragonisca angustula angustula* Latreille (*Apidae, Meliponinae*).** *Apidologie*, v. 10 (3), p. 275-295, 1979.



Jorgensen, R. A. e Cluster, P. D. **Modes and tempos in the evolution of nuclear ribosomal DNA: new characters for evolutionary studies and new markers for genetic and populations studies.** *Annals of The Missouri Botanical Garden*, v. 75, p. 1238-1247, 1988.

Jurd, L. e Geissman, T. A. **Absorption spectra of metal complexes of flavonoid compounds.** *Journal of Organic Chemistry*, v. 21 (12), p. 1395-1401, 1956.

Kerr, W. E., Carvalho, G. A. e Nascimento, V. A. **Abelha Uruçu - biologia, manejo e conservação.** *Manejo da vida silvestre*, v. 2, p. 144, 1996.

King, L. M. e Schaal, B. A. **Ribosomal-DNA variation and distribution in *Rudbeckia missouriensis*.** *Evolution*, v. 43, p. 1989.

Ko, S. C., O'Kane, S. L. e Schaal, B. A. **Intraspecific taxonomy and comparisons of nrDNA ITS-2 sequences of *Arisaema ringens* (Araceae).** *Rhodora*, v. 95, p. 254-260, 1993.

Koo, H., Cury, J. A., Rosalen, P. L., Park, Y. K. e Bowen, W. H. **Effects of *Apis mellifera* propolis on glucosyltransferases.** *Journal of Dental Research*, v. 79 (5), p. 1130-1136, 2000.

Koo, M. H. e 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, p. 367-369, 1997.

Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Christov, R. e Popov, S. **Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 64, p. 235-240, 1999.

Kumazawa, S., Hamasaka, T. e Nakayama, T. **Antioxidant activity of propolis of various geographic origins.** *Food Chemistry*, v. 84, p. 329-339, 2004.

Lehninger, A. L., Nelson, D. L. e Cox, M. M. **Tecnologia do DNA recombinante.** In: São Paulo: Sarvier, 2000. p.

Livermore, D. M. **Antibiotic resistance in staphylococci.** *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 16, p. S3-S10, 2000.

Lopes, R. M., Oliveira, T. T. de, Nagem, T. J. e Pinto, A. de S. **Flavonóides.** *Biotechnology Ciência & Desenvolvimento*, v. 17, p. 18-22, 2000.

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 (5), p. 529-535, 1996.

Marcucci, M. C., Ferreres, F., García-Viguera, C., Bankova, V. S., Castro, S. L. d., Dantas, A. P., Valente, P. H. M. e Paulino, N. **Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 74, p. 105-112, 2001.

Marcucci, M. C., Woisky, R. G. e Salatino, A. **Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis.** *Mensagem doce*, v. 46, p. 1998.

Menezes, H., jr, M. B., Olioveira, S. D. e Pagnocca, F. C. **Antibacterial properties of propolis and products containing propolis from Brazil.** *Apidologie*, v. 28 (2), p. 71-76, 1997.

Metzner, J., Schneidewind, E. M. e Friederich, E. **Effect of propolis and pinocembrin on fungi.** *Pharmazie*, v. 32 (11), p. 730-732, 1977.

Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V. e Milner, A. **A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates.** *Clinical Science*, v. 84, p. 407-412, 1993.

Miorin, P. L., Junior, N. C. L., Custodio, A. R., Bretz, W. A. e Marcucci, M. C. **Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*.** *Journal of Applied Microbiology*, v. 95, p. 913-920, 2003.

Moreno, M. I. N., Isla, M. I., Sampietro, A. R. e Vattuone, M. A. **Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 71, p. 109-114, 2000.

Murad, J. M., Calvi, S. A., Soares, A. M. V. C., Bankova, V. e Sforcin, J. M. **Effects of propolis from Brazil and Bulgaria on fungicidal activity of macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis*.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 79, p. 331-334, 2002.

Murray, M. C., Worthington, H. V. e Blinkhorn, A. S. **A study to investigate the effect of an propolis containing mouthrinse on the inhibition of the novo plaque formation.** *Journal of Clinical Periodontology*, v. 24 (11), p. 796-798, 1997.

Nagai, T., Inoue, R., Inoue, H. e Suzuki, N. **Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis.** *Food Chemistry*, v. 80, p. 29-33, 2003.

Nagai, T., Sakai, M., Inoue, R., Inoue, H. e Suzuki, N. **Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly, and propolis.** *Food Chemistry*, v. 75, p. 237-240, 2001.

NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Workshop Internacional de Microbiologia do NCCLS.

Niki, E. **Antioxidant Activity: are we measuring it correctly?** Nutrition, v. 18, p. 524-525, 2002.

Nogueira-Neto, P. **Vida e Criação de Abelhas Indígenas Sem Ferrão.** São Paulo, Nogueirapis, 1997. 445 p.

Nothenberg, M. **Própolis enfrenta bem o desafio das pesquisas.** Química e Derivados, v. 348, p. 24-28, 1997.

O Mercado. Disponível em: <<http://www.uniflora.ind.br/conteudo/omercado.asp>>  
Acesso em: 19 jun. 2004.

Park, Y. K., Abreu, J. A. S., Ikegabi, M., Cury, J. A. e Rosalen, P. L. **Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms.** Current Microbiology, v. 36 (1), p. 24-29, 1998a.

Park, Y. K., Koo, M. H., Ikegaki, M. e Contado, J. L. **Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil.** Arquivos de biologia e tecnologia, v. 40, p. 97-106, 1997.

Park, Y. K., Koo, M. H., Sato, H. H. e Contado, J. L. **Estudo de alguns componentes da própolis coletada por *Apis mellifera* no Brasil.** Arquivos de biologia e tecnologia, v. 38, p. 1253-1259, 1995.

Park, Y. P., Ikegaki, M., Abreu, J. A. d. S. e Alcici, N. M. F. **Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 18 (3), p. 1998b.

Pascual, C., Gonzalez, R. e Torricella, R. G. **Scavenging action of propolis extract against oxygen radicals.** Journal of Ethnopharmacology, v. 41, p. 9-13, 1994.

Paulino, N. Disponível em: <[http://www.prodapys.com.br/br/pdp\\_pesq\\_51.htm](http://www.prodapys.com.br/br/pdp_pesq_51.htm)>  
Acesso em: 22 out. 2004.

Pereira, A. d. S., Seixas, F. R. M. S. e Neto, F. R. d. A. **Propolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras.** Química Nova, v. 25, p. 321-326, 2002.

Pereira, F. d. M., Lopes, M. T. d. R., Camargo, R. C. R. d. e Vilela, S. L. de O. **Produção de mel.** Embrapa Meio-Norte - Sistema de Produção, v. 3, p. 2003.

Peterson, G., Johansen, B. e Seberg, O. **PCR and sequencing from a single pollen grain.** Plant Molecular Biology, v. 31, p. 189-191, 1996.

Peterson, J. e Dwyer, J. **Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity.** Nutrition Research, v. 18 (12), p. 1995-2018, 1998.

Petit, R. J., Demasure, B. e Dumolin-Lapègue, S. **cpDNA and plant mtDNA primers.** In: Chapman & Hall, 1996. p.

Philipov, I. A., Cherkasova, A. I., Dudov, I. A. e Rodionova, V. V. **A clinical study on the therapeutic effect of bee products on trophic chronic varicose ulceration of the inferior limbs.** *Apiacta*, v. 3, p. 81-82, 1987.

Pietta, P. G., Gardana, C. e Pietta, A. M. **Analytical methods for quality control of propolis.** *Fitoterapia*, v. 73, p. S7-S20, 2002.

Prieto, P., Pineda, M. e Aguilar, M. **Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E.** *Analytical Biochemistry*, v. 269, p. 337-341, 1999.

Rao, C. V., Desai, D., Rivenson, A., Simi, B., Amin, S. e Reddy, B. S. **Chemoprevention of colon carcinogenesis by phenylethyl-3-methylcaffeate.** *Cancer Research*, v. 55 (11), p. 2310-2315, 1995.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. e Rice-Evans, C. **Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay.** *Free Radical Biology & Medicine*, v. 26 (9/10), p. 1231-1237, 1999.

REAÇÃO de polimerização em cadeia. Disponível em: <<http://www.biologianaweb.com/Livro2/C11/pcr.html>> Acesso em: 03 nov. 2004.

Ackermann, T. **Fast Chromatographic study of propolis crudes.** *Food Chemistry*, v. 42, p. 135-138, 1991.

Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. e Paganga, G. **Antioxidant properties of phenolic compounds.** *Trends in Plant Science*, v. 2 (4), p. 152-159, 1997.

RISCO do ataque de abelhas. Disponível em: <<http://www.ufrj.br/institutos/it/de/acidentes/abelha.htm>> Acesso em: 12 jun. 2004.

Rodríguez-Delgado, M. A., Pérez, M. L., Corbella, R., González, G. e Montelongo, F. J. G. **Optimization of the separation of phenolic compounds by micellar electrokinetic capillary chromatography.** *Journal of Chromatography A*, v. 871, p. 427-438, 2000.

Rossi, A., Longo, R., Russo, A., Borrelli, F. e Sautebin, L. **The role of the phenethyl ester of caffeic acid (CAPE) in the inhibition of rat lung cyclooxygenase activity by propolis.** *Fitoterapia*, v. 73, p. S30-S37, 2002.

Russo, A., Longo, R. e Vanella, A. **Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin.** *Fitoterapia*, v. 73, p. S21-S29, 2002.

Sanguinetti, C. J., Neto, E. D. e Simpson, A. J. G. **Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels.** *Biotechniques*, v. 17, p. 915-919, 1994.

Santos, F. A., Bastos, E. M. A., Rodrigues, P. H., Uzeda, M., Carvalho, M. A. R., Farias, L. d. M. e Moreira, E. S. A. **Susceptibility of *Prevotella***

***intermedia/Prevotella nigrescens* (and *Porphyromonas gingivalis*) to propolis (bee glue) and other antimicrobial agents.** Anaerobe, v. 8, p. 9-15, 2002.

Santos, I. A. de. **A vida de uma abelha solitária.** Ciência Hoje, v. 179, p. 2002.

Serkedjieva, J. e Manolova, N. **Antiinfluenza virus effect of some propolis constituents and their analogs (esters of substituents cinnamic-acids).** Journal of Natural Products, v. 55 (3), p. 294-302, 1992.

Sforcin, J. M., Jr., A. F., Lopes, C. A. M., Bankova, V. e Funari, S. R. C. **Seasonal effect on brazilian propolis antibacterial activity.** Journal of Ethnopharmacology, v. 73, p. 243-249, 2000.

Silva, P. G. F. d. e Serrão, J. E. **Nutritive value and apparent digestibility of bee-collected and bee-stored pollen in the stingless bee, *Scaptotrigona postica* Latr. (Hymenoptera, Apidae, Meliponini).** Apidologie, v. 31, p. 39-45, 2000.

Singleton, V. L., Orthofer, R. e Lamuela-Raventós, R. M. **Analysis of total phenols and others oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent.** In: London: 1999. p. 152-178.

Su, Z. Z., Lin, J., Grunberger, D. e Fisher, P. B. **Growth suppression and toxicity induced by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in type-5 adenovirus-transformed rat embryo cells correlate directly with transformation progression.** Cancer Research, v. 54 (7), p. 1865-1870, 1994.

Sud'ina, G. F., Mirzoeva, O. K., Pushkareva, M. A., Korshunova, G. A., Sumbatyan, N. V. e Varfolomeev, S. D. **Caffeic acid phenethyl ester as a lipoxygenase inhibitor with antioxidant properties.** FEBS Letters, v. 329 (1/2), p. 21-24, 1993.

Velikova, M., Bankova, V., Marcucci, M. C., Tsvetkova, I. e Kujumgiev, A. **Chemical composition and biological activity of propolis from Brazilian meliponinae.** Zeitschrift Fur Naturforschung C, v. 55, p. 785-789, 2000b.

Velikova, M., Bankova, V., Tsvetkova, I., Kujumgiev, A. e Marcucci, M. C. **Antibacterial *ent*-kaurene from Brazilian propolis of native stingless bees.** Fitoterapia, v. 71, p. 693-696, 2000a.

Vlietinck, A. J., Bruyne, T. d., Apers, S. e Pieters, L. A. **Plant-derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection.** Planta Medica, v. 64 (2), p. 97-109, 1998.

Wagner, H. e Bladt, S. **Plant Drug Analysis: a thin layer chromatography atlas.** 2 ed. Munich: Springer, 1996. 384 p.

Walker, P. e Crane, E. **Constituents of Propolis.** Apidologie, v. 18, p. 327-334, 1987.

Yamada, J. e Tomita, Y. **Antimutagenic activity of caffeic acid and related compounds**. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, v. 60 (2), p. 328-329, 1996.