

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia de Alimentos

**ESTUDO DOS FLAVONÓIDES DA PRÓPOLIS DE *Apis mellifera*
AFRICANIZADA PROVENIENTES DE DIVERSAS
REGIÕES DO BRASIL**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por HYUN KOO e aprovada pela Comissão Julgadora em 18.10.96.

Campinas, 18 de outubro de 1996


Prof. Dr. YONG KUN PARK

Presidente da Banca

Hyun Koo

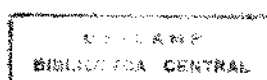
Cirurgião Dentista

Prof. Dr. Yong Kun Park

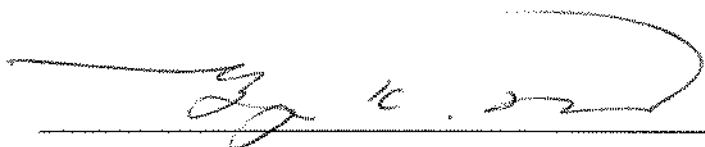
Orientador

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Mestre em Ciência de Alimentos.

1996

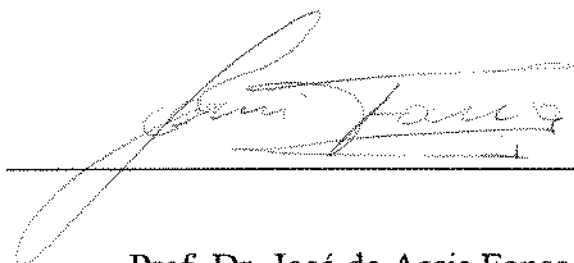


BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Yong Kun Park

(Orientador)



Prof. Dr. José de Assis Fonseca Faria

(Membro)



Profa. Dra. Maria do Carmo Guedes

(Membro)

Profa. Dra. Hélia Harumi Sato

(Membro)

Campinas, de outubro de 1996.

À DEUS que sempre iluminou o meu caminho
Aos meus pais, por tudo que fizeram por mim,
À minha querida irmã Simone

Ao meu irmão e companheiro em
todos os momentos, Daniel

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Yong Kun Park, pela orientação deste trabalho e exemplo de dedicação científica.

À Profa. Dra. Hélia Harumi Sato, pela paciência, amizade e colaboração durante todo o desenvolvimento da pesquisa.

À Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore, pela alegria e incentivo.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa concedida.

Aos colegas Dong Koo, Contado, Ila Maria, Marcolino, Masaharu, Vinícius I e II, Érica, Leila, Heinz, Enilene, Maricy, Márcia, Cristine e Jussara pela amizade, companheirismo e colaboração.

Aos técnicos Paulo, Dora e Beatriz pela paciência e auxílios prestados.

Aos colegas da secretaria Jardette, Marquinhos, Marcão, Franceli e Ricardo pela amizade, paciência e colaboração.

Às colegas da secretaria de Pós-Graduação, Margareth e Cris.

Aos colegas do Centro de Computação, Fátima, Miro, Andressa e Paulo Roberto.

Aos senhores Alberico B. de Carvalho Jr., José A. Munhoz, Ingo Weinfürter, Adayr Domingos Cherubin, Olegario Balbo, Joaquim de Oliveira, José Rude Erthal e Arony Sattler, pela inestimável contribuição na coleta das amostras de própolis

A todos que, de uma forma ou de outra, colaboraram no desenvolvimento desta pesquisa.

ÍNDICE GERAL

	páginas
ÍNDICE.....	i
ÍNDICE DE TABELAS.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
RESUMO.....	v
SUMMARY.....	vi

ÍNDICE

1 - INTRODUÇÃO.....	1
2 - OBJETIVO.....	3
3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
4 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
4.1 - Coleta das Amostras de Própolis de <i>Apis mellifera</i> Africanizadas.....	27
4.1.1 - Método de coleta das amostras de própolis bruta.....	27
4.1.2 - Tratamento das amostras de própolis bruta.....	27
4.1.3 - Obtenção do extrato etanólico da própolis (EEP).....	29
4.2 - Análise Quantitativa e Qualitativa dos Flavonóides do EEP.....	29
4.2.1 - Determinação de flavonóides totais.....	30
4.2.1.1 - Preparo do EEP para determinação dos flavonóides totais.....	30

4.2.1.2 - Análise dos flavonóides totais do EEP.....	30
4.2.2 - Espectrofotometria na região ultravioleta do EEP.....	31
4.2.3 - Cromatografia em camada delgada de alta performance em fase reversa do EEP (HPTLC).....	31
4.2.4 - Determinação quantitativa dos flavonóides dos EEP por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em fase reversa.....	32
4.3 - Teste de Antibiograma dos EEPs em Bactérias Patogênicas.....	33
4.3.1 - Preparo dos discos de EEP.....	33
4.3.2 - Análise da atividade antibacteriana dos EEPs.....	33
4.4 - Análise Estatística.....	34
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1 - Coleta das Amostras de Própolis Bruta.....	35
5.1.1 - Características físicas da própolis bruta.....	35
5.1.2 - O extrato etanólico da própolis (EEP).....	38
5.2 - Determinação de Flavonóides Totais dos Extratos Etanólicos da Própolis.....	38
5.3 - Espectrofotometria na Região U.V. dos Extratos Etanólicos da Própolis.....	41
5.4 - Análise por Cromatografia em Camada Delgada de Alta Performance.....	45
5.5 - Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	51
5.6 - Análise da Atividade Antibacteriana dos Extratos Etanólicos da Própolis.....	54
6 - CONCLUSÃO.....	56
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Principais Flavonóides Encontrados na Própolis de <i>Apis mellifera</i>	25
Tabela 2 - Coleção das Amostras de Própolis.....	28
Tabela 3 - Ecologia Vegetal das Regiões de Coleta das Amostras de Própolis.....	36
Tabela 4 - Características Físicas das Amostras de Própolis.....	39
Tabela 5 - Teor de Flavonóides Totais e Absorção em Ultravioleta a 290 nm.....	44
Tabela 6 - Análise de Flavonóides das Amostras de Própolis por HPLC em Fase Reversa dos Estados de GO, MS, MG, SP, PR e RS....	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Configuração Geral de um Flavonóide.....	3
Figura 2 - Extratos Etanólicos das Amostras de Própolis(EEP).....	40
Figura 3 - Espectrofotometria na região U. V. dos Extratos Etanólicos das Amostras de Própolis Seleccionadas.....	42
Figura 4 - Cromatografia em Camada Delgada de Alta Performance dos EEPs com detecção a 254 nm.....	46
Figura 5 - Cromatografia em Camada Delgada de Alta Performance dos EEPs com detecção a 366 nm.....	48
Figura 6 - Cromatografia em Camada Delgada de Alta Performance dos Padrões de Flavonóides com detecção a 366 nm.....	49
Figura 7 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência dos Extratos Etanólicos das Amostras de Própolis dos Estados de MG, SP, GO, MS, PR e RS.....	52
Figura 8 - Teste de Antibiógrama dos EEPs em Bactéria Patogênica <i>Staphylococcus aureus</i> coagulase positiva.....	55

RESUMO:

Foram coletadas 83 amostras de própolis de *Apis mellifera* africanizadas provenientes de diversas regiões do Brasil, sendo extraídas com etanol 80%. A concentração de flavonóides totais foi analisada através dos métodos químico (determinação de flavonóides totais) e espectrofotometria na região ultravioleta-U.V. ("U. V. scanning"). Os resultados da concentração de flavonóides totais dos extratos de própolis obtido pelo método químico correlacionaram com os dados do "U.V. scanning". Os espectros de absorção em U.V. mostraram o pico de absorção máxima a 290nm. A análise qualitativa dos flavonóides nas amostras de própolis foram determinadas por Cromatografia em Camada Delgada de Alta Performance (HPTLC) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Através da análise por HPTLC dos extratos etanólicos da própolis, foram observadas frações de flavonóides quando irradiados com luz U.V. a 254 e 366 nm, porém a análise a 366 nm permitiu uma melhor avaliação qualitativa das frações de flavonóides. Assim, foram observadas diferenças significativas entre as amostras dos Estados de São Paulo (SP), Minas Gerais (MG), Goiás (GO), Mato Grosso do Sul (MS) com as do Paraná (PR) e Rio Grande do Sul (RS). As análises quantitativas das frações de flavonóides foram determinados em HPLC. Os picos dos cromatogramas do HPLC demonstraram também um perfil diferente entre as amostras de SP, MG, GO, MS com as do PR e RS, correlacionando com os dados do HPTLC. A própolis da Região Sul (PR e RS), apresentaram maiores concentrações de quercetina, galangina e crisina em relação as amostras de SP, MG, GO, MS, porém, apresentaram menor concentração de acacetina, além da ausência de isoramnetina. Os resultados demonstraram que as concentrações dos flavonóides totais foram variáveis, dependendo da região de coleta e da sua ecologia vegetal.

SUMMARY:

Eighty-three specimens of propolis which were collected by africanized *Apis mellifera* in various regions of Brazil were extracted by 80% ethanol and examined for concentrations of total flavonoids in ethanol extract of propolis by methods of both chemical analysis, and Ultraviolet-spectrophotometer (U.V scanning). The results of concentrations of total flavonoids in propolis which were determined by chemical analysis correlated with the results obtained by U. V. scanning. The U. V. scanning showed a maximum absorption spectra of flavonoids at 290 nm. The qualitative analysis of flavonoids in propolis was determined by High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) and Reversed phase High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The results of HPTLC analysis of ethanol extracts of propolis demonstrated patterns of fractions of flavonoids when irradiated by U.V. at 254 and 366 nm, respectively, but at 366 nm showed more distincts patterns of flavonoids. These results demonstrated different patterns among propolis from the States of São Paulo (SP), Minas Gerais (MG), Goiás (GO), Mato Grosso do Sul (MS) as compared to those from Paraná (PR) and Rio Grande do Sul (RS). Quantitative concentration of flavonoid fractions were determined by HPLC. The profiles of HPLC also demonstrated different patterns among samples from SP, MG, GO, MS and PR, RS. Furthermore, propolis from RS and PR contained more quercetin, galangin, chrysin as compared to those from SP, MG, GO, MS, but propolis from RS and PR contained less acacetin and no isorhamnetin. These results demonstrated that the concentrations of total flavonoids were variable depending on the geographic location and plant ecology.

1. INTRODUÇÃO

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

Dentre os produtos apícolas, a própolis vem se destacando devido às suas diversas propriedades terapêuticas, como atividade antimicrobiana, antiinflamatória, cicatrizante e anestésica (GHISALBERTI et alii, 1977) como pelas suas possibilidades de aplicação nas indústrias de alimentos (como alimentos complementares) e farmacêutica. Atualmente existem diversos produtos comerciais à base de própolis no mundo inteiro, principalmente no Japão, tais como: balas, chocolates, doces, xampus, cremes para pele, soluções antissépticas, pastas de dentes, spray bucal etc (ACKERMANN, 1991).

Própolis é o nome genérico dado para uma resina, de coloração e consistência variada, coletada pelas abelhas da espécie *Apis mellifera* de diversas partes da planta como broto, botões florais e também dos exsudatos resinosos, sendo transportados para dentro das colméias e modificados pelas abelhas, através da adição de secreções próprias (GHISALBERTI, 1979).

Etimologicamente, a palavra própolis deriva do grego em que *pro* significa em frente de, em defesa de e *polis* cidade, assim em defesa da cidade (no caso a colméia). Então a abelha utiliza a própolis na entrada da colméia, fechando frestas, para redução da entrada de vento, frio e principalmente dos inimigos

naturais, além de ser utilizada para embalsamar pequenos insetos mortos pelas abelhas, que não puderam ser retirados, evitando assim a putrefação. A própolis também é utilizada como material de construção no interior da colméia, soldando favos, quadros e envernizando o interior dos alvéolos (NICOLAS, 1947 citado por GHISALBERTI, 1979).

A composição química da própolis é muito complexa e variada, estando intimamente relacionada com a ecologia vegetal de cada região visitada pelas abelhas. De modo geral, contém 50-60% de resinas e bálsamos, 30-40% de ceras, 5-10% de óleos essenciais, 5% de grãos de pólen, além de microelementos como alumínio, cálcio, estrôncio, ferro, cobre, manganês e quantidades traços de vitaminas B₁, B₂, B₆, C e E (GHISALBERTI, 1979). Atualmente, cerca de 160 componentes já foram identificados, principalmente compostos fenólicos. A maioria dos compostos fenólicos isolados pertencem a 3 grupos principais: 1) flavonóides agliconas, 2) ácidos fenólicos e 3) ésteres fenólicos, cujas concentrações variam dependendo da ecoflora da região da coleta (BANKOVA et alii, 1992).

A presença destes diversos compostos fenólicos, principalmente os flavonóides, explicam em parte, a grande diversidade de propriedades terapêuticas relatadas na literatura (BANKOVA et alii, 1983). Os flavonóides são compostos por 15 carbonos dispostos numa configuração C₆-C₃-C₆, formando 2 anéis aromáticos unidos por uma unidade de 3 carbonos que pode ou não formar um terceiro anel (Figura 1). Os flavonóides são encontrados na natureza em duas formas: glicosídicas, quando um ou mais grupos hidroxila estão ligados a um açúcar, e agliconas.

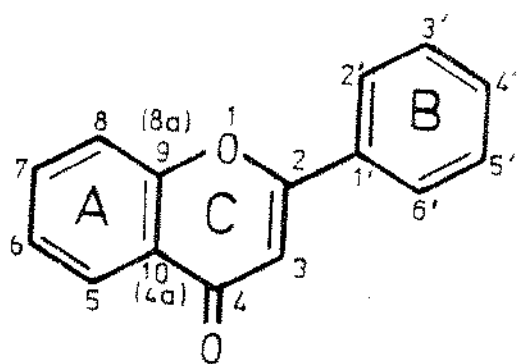


Figura 1. Configuração geral de um flavonóide

Na própolis são encontradas basicamente flavonóides agliconas, devido a ação da β -glucosidase, secretada pelas abelhas, que hidrolisa a parte glicosídica dos flavonóides (BONVEHI et alii, 1994). Nas plantas e vegetais, como cebola, brócolis e repolho, são encontrados basicamente flavonóides na forma glicosídica (HERTOG et alii, 1992)

No Brasil, ainda não existe uma padronização quanto ao controle de qualidade da própolis, e os métodos de análise atualmente utilizados além de não serem adequados, são muitas vezes empíricos.

2. OBJETIVO

O presente estudo teve como objetivo : 1) Analisar o teor de flavonóides totais, quantificar e identificar as frações de flavonóides, presentes nas amostras de própolis provenientes de diversas Regiões do Brasil, 2) Avaliar qualitativamente os flavonóides com relação a Região de coleta das amostras de própolis e 3) Determinar métodos de análise adequados para avaliar a qualidade da própolis em termos de teor de flavonóides.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os artigos científicos sobre a própolis são escassos, pois as pesquisas foram intensificadas apenas nos últimos 30 anos, principalmente com relação a sua composição química e propriedades terapêuticas. Além disso, muito dos trabalhos de pesquisa são de difícil acesso, uma vez que foram publicados em revistas dos países do Leste Europeu, como Bulgária, Polônia, Romênia e na antiga União Soviética.

HAYDAK (1950) (citado por GHISALBERTI, 1979) relatou evidências do uso da própolis desde 300 anos antes de Cristo.

VILLANUEVA et alii (1964) isolaram da própolis a galangina (3,5,7-trihidroxiflavone), um composto químico pertencente ao grupo dos flavonóides. Os autores relataram que a atividade bacteriostática da própolis poderia ser atribuído, parcialmente, a este composto isolado.

Num amplo estudo realizado por LINDENFELSER (1967), demonstrou-se a atividade antimicrobiana “in vitro” da própolis em 70 linhagens diferentes de microrganismos, sendo 39 bactérias, 39 fungos e 2 leveduras. O autor demonstrou que 25 das 39 linhagens de bactérias, dentre elas *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*, e 20 dos 39 fungos apresentaram inibição do crescimento em concentração menor que 100 µg/ml de própolis. As atividades demonstradas eram de modo geral bacteriostáticas ou fungistáticas, sendo que na maioria dos casos, em concentrações ligeiramente maiores que 100 µg/ml, apresentaram atividades bactericidas (ou fungicidas). Entre as bactérias testadas, as mais sensíveis foram dos grupos gram positivos e ácido-tolerante (“acid fast”).

Entretanto, a própolis não apresentou efeito antimicrobiano contra as leveduras testadas, *Candida albicans* e *Saccharomyces pastorianus*.

SHELLER et alii (1969) (citado por GHISALBERTI, 1979) analisaram a atividade antimicrobiana “in vitro” da própolis e observaram que *Corynebacterium sp*, *Klebsiella ozaenae*, *Mycobacterium sp* e *Candida sp* eram sensíveis aos extratos etanólicos da própolis.

KIVALINA & GORSHUNOVA (1969) e CHERNYAK (1973) (citado por GHISALBERTI, 1979) verificaram que extratos de própolis potencializavam o efeito de alguns antibióticos. A ação da biomicina, tetraciclina, neomicina, polimixina, penicilina, estreptomicina e furangina, contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* era potencializada com a adição de própolis no meio nutritivo. A combinação de furangina e própolis foi a mais efetiva contra *Escherichia coli*.

Os estudos sobre a composição química da própolis eram raros até 1969, provavelmente devido à ausência de técnicas apropriadas para o fracionamento e análise dos constituintes da própolis (GHISALBERTI, 1979). Porém, PROPAVKO et alii (1969) utilizando técnicas modernas de separação e identificação, como ressonância magnética nuclear (NMR), na análise da composição química da própolis, isolaram os seguintes compostos: acacetina (5, 7-dihidroxi-4'-metoxiflavone); 5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavone; kaempferide (3,5,7-trihidroxi-4'-metoxiflavone); ramnocitrina (3,4',5-trihidroxi-7-metoxiflavone); 5,7-dihidroxi-3,4'-dimetoxiflavone; 3,5-dihidroxi-4',7-dimetoxiflavone, pinostrobin ((-)-5-hidroxi-7-metoxiflavanone) e (-)-5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavanone, além de evidências da presença da quercetina (3,5,7,3',4'-pentahidroxiflavone). Estes compostos fenólicos pertencem ao grupo

dos flavonóides. Também foi isolado e identificado um derivado aldeídico, a isovanilina.

VILLANUEVA et alii (1970) isolaram outros flavonóides identificados como: pinocembrina (5,7-dihidroxi-flavanone), crisina (5,7-dihidroxi-flavone), tectocrisina (5-hidroxi-7-metoxi-flavone) e isalpinina (3,5-dihidroxi-7-metoxi-flavone). Os autores também relataram que a pinocembrina apresentava atividade bacteriostática similar à galangina.

CIZMARIK & MATEL (1970) isolaram e identificaram o ácido caféico (3,4 - ácido dihidroxicinâmico) e, posteriormente, os mesmos autores, em 1973, isolaram o ácido ferúlico (ácido 4-hidroxi-3-metoxicinâmico) das amostras de própolis provenientes do Leste Europeu. Os autores identificaram os compostos através de espectrofotometria na região U.V., infravermelho e ressonância magnética nuclear.

MABRY & MARKHAM (1970) descreveram a absorção em U.V. de uma grande variedade dos compostos pertencentes ao grupo dos flavonóides. Os autores determinaram que, de modo geral, os flavonóides possuem um espectro de absorção em U.V. variando de 200 a 400 nm, consistindo de 2 regiões de absorção máxima, a banda II de 240-285nm e a banda I de 300-550nm. Sendo que de modo geral o pico de absorção está situado na faixa entre 250 e 350 nm, principalmente as flavonas, os flavonols e as flavanonas.

JANES & BUMBA (1974) analisaram a presença de compostos voláteis nas amostras de própolis. Os autores identificaram os seguintes compostos: álcool benzílico, vanilina e eugenol. Além disso, foram identificados fenil vinil éter, anisil vinil éter, ciclohexilbenzoato, ácido benzóico e ácido sórbico.

SCHNEIDWEIND et alli (1975) isolaram e identificaram da própolis 14 flavonóides, sendo 9 previamente descritos: crisina, tectocrisina, 5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavone, ramnocitrina, galangina, isalpinina, pinostrobina, 5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavanone, pinocembrina, e 5 novos: pectolinarigenina (5,7-dihidroxi-4',6-dimetoxiflavone), quercetina-3,3'-dimetil éter (4',5,7-trihidroxi-3,3'-dimetoxiflavone), sakuranetina (4',5-dihidroxi-7-metoxiflavanone), pinobanksina (3,5,7-trihidroxiflavanone), pinobanksina-3-acetato (5,7-dihidroxi-3-acetilflavanone).

METZNER et alli (1975) observaram que pinobanksina-3-acetato, pinocembrina, benzil éster do ácido p-coumárico e o éster do ácido caféico apresentaram atividade antimicótica contra *Candida albicans*.

WULF & NAGEL (1976) analisaram ácidos fenólicos e flavonóides através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Foi utilizado a coluna μ Bondapak/C₁₈ e detector para U.V. operando a 254 e 280 nm e sistema solvente H₂O:ácido acético:metanol (65:5:30, v/v), para o estudo de flavonóides. Os autores estudaram a influência do grupo carbonil na posição 4, sobre a polaridade dos flavonóides, e observaram que os grupos hidroxilas na posição 3 e 5 interagem com o ceto grupo da posição 4, diminuindo assim a sua polaridade. Também foi relatado as vantagens do HPLC, em relação à cromatografia gasosa nas análises de própolis, pois a técnica de cromatografia gasosa apresenta problemas de degradação térmica e necessita de uma etapa adicional de derivatização.

GHISALBERTI et alli (1977) analisaram, através da espectrometria de massa e ressonância magnética nuclear, os constituintes da própolis proveniente da Região Sudeste da parte ocidental da Austrália e identificaram os seguintes

flavonóides: pinostrobina, sakuranetina, isosakuranetina (5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavanone), 5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavanone e quantidades traços de crisina. Também foram identificados outros compostos como o derivado de naftaleno, denominado xantorrhoeol e traços de 3,5-dimetoxibenzil álcool, além do composto pterostilbene (4' hidroxi-5,7-dimetoxistilbene).

SCHELLER et alii (1977) relataram a atividade antiprotozoária *in vitro* da própolis sobre 3 linhagens de *Trichomonas vaginalis*. Os autores observaram que os extratos etanólicos da própolis na concentração de 150mg/ml apresentaram atividade letal contra o protozoário.

GHISALBERTI et alii (1978) isolaram e estudaram os principais constituintes da própolis coletado da parte ocidental da Austrália. Foram identificados os compostos pterostilbene, xantorrhoeol, sakuranetina e pinostrobina. Segundo os autores, o xantorrhoeol e sakuranetina, também foram isolados nas plantas *Xanthorrhoea*, que são endêmicas na parte ocidental da Austrália.

Na revisão realizada por GHISALBERTI (1979) os principais componentes encontrados na própolis pertenciam ao grupo dos flavonóides, que são onipresentes no reino das plantas. O autor descreveu que os flavonóides isolados da própolis correlacionavam razoavelmente com os presentes nas plantas das quais as abelhas coletavam a própolis. Também foi descrito que o xantorrhoeol e sakuranetina presentes na própolis da parte ocidental da Austrália eram encontrados nas plantas da espécie *Xanthorrhoea pressii* e a isosakuranetina nas espécies *Xanthorrhoea australis*, demonstrando a origem vegetal da própolis.

HLADON et alii (1980) (citado por MARCUCCI, 1995) estudaram a atividade citostática dos extratos de própolis sobre as células de carcinoma hepático KB e HeLa de humanos. Segundo os autores, a fração etanólica da própolis exibiu uma atividade citostática acentuada.

VANHAELEN & VANHAELEN-FASTRÉ (1980) descreveram a separação de compostos fenólicos, dentre eles os flavonóides, por 3 métodos cromatográficos: cromatografia em camada delgada de alta performance, cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia gás-líquido (GLC). Os autores destacaram a utilização de placas prontas RP-8, utilizando um sistema solvente simples composto de H₂O e etanol (na proporção 45:55, v/v), que apresentou melhor resolução dentre os outros sistemas solventes testados. Salientaram também a boa separação dos compostos fenólicos pelo GLC, apesar das limitações como a necessidade de derivatização e da degradação térmica, além de problemas de eluição dos flavonóides acacetina e apigenina e da separação dos flavonóides heterocíclicos.

CASTEELE et alii (1982) analisaram a separação de flavonóides através de cromatografia líquida de alta performance, utilizando a coluna LiChrosorb RP-18, com detector U.V. a 280 nm. Verificou-se o tempo de retenção de 141 flavonóides. Segundo os autores, a sequência de eluição dos compostos pode ser interpretada do seguinte modo: os compostos inicialmente adsorveriam na fase estacionária hidrofóbica e seriam subsequentemente eluídos com a fase móvel, dependendo do grau de formação das pontes de hidrogênio. Os autores explicaram que nas flavonas (e flavonols) e isoflavonas o grupo carbonil na posição C₄, devido a ressonância, apresentariam carga parcial negativa, sendo assim o principal responsável pela formação de pontes de hidrogênio com o solvente. A presença do grupo OH na posição 5, permite a formação de uma forte

ponte de hidrogênio intramolecular, diminuindo assim a capacidade de interação com o solvente e aumentando o seu tempo de retenção. O mesmo ocorre com a presença do grupo OH na posição 3, sendo a interação mais fraca, interferindo menos no seu tempo de retenção. Assim os autores observaram que os flavonóides, de modo geral, que apresentarem diferença no número de grupos OH, em posições diferentes de 3, podem ser facilmente separados.

BANKOVA et alii (1982) descreveram um método de análise dos flavonóides da própolis utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os autores determinaram que a melhor fase eluente foi água:metanol:ácido acético (65:75:5, v/v) e as colunas de fase reversa utilizadas neste estudo foram ODS-HC-SIL-X-1 e Partisil PXS/10/25 ODS. A fase eluente, água:metanol:ácido acético, na proporção 65:30:5 (v/v) apresentaram problemas na eluição de flavonas e flavonols. Também foi observado uma boa separação dos flavonóides das amostras de própolis (em ambas as colunas), permitindo assim a possibilidade da determinação dos flavonóides através do HPLC com auxílio de padrões internos. Através deste método foram identificados os flavonóides: pinocembrina, galangina, crisina, quercetina e tectocrisina das amostras de própolis.

BANKOVA et alii (1983) analisaram amostras de própolis da Bulgária através de HPLC/espectrometria de massa e detectaram a presença de pinocembrina, galangina, crisina, tectocrisina, quercetina, isoramnetina (3,5,7,4'-tetrahidroxi-3'-metoxiflavone), pequena quantidade de kaempferol (3,5,7,4'-tetrahidroxiflavone). Os autores também relataram a detecção de três novos flavonóides, sendo dois deles identificados como 3,7-dihidroxi-5-metoxiflavanone e 2,5-dihidroxi-7-metoxiflavanone.

KATO et alii (1983) analisaram o efeito da quercetina nos lipídios séricos em ratos. Os autores observaram que ao acrescentarem a quercetina na dieta dos ratos, resultou numa diminuição significativa dos níveis séricos dos triglicerídios em ratos, sem alterar o seu crescimento (ganho de peso) e o nível do colesterol sérico.

DEBUYSER (1983) (citado por MARCUCCI, 1995) relatou que a atividade antibacteriana da própolis era devido a presença de flavonóides, ésteres e ácidos aromáticos, como ácido caféico e ferúlico.

Os flavonóides foram estudados na possível atuação da prevenção à cárie dental por IIO et alii (1984). Os autores analisaram o efeito da quercetina e naringenina (5,7,4'-trihidroxiflavanone) na atividade de glicosiltransferase, responsável tanto pela formação de glucanos solúveis (GF-S) como de insolúveis (GF-I), além do efeito de alguns flavonóides, como quercetina, naringenina, crisina e hesperetina (5,7,3'-trihidroxi-4'-metoxiflavanone) na formação de glucanos pelo *Streptococcus mutans* e placa dental. Tanto a quercetina como a naringenina inibiram a GF-I em maior grau que a GF-S, sendo que a quercetina apresentou-se como um inibidor mais potente, devido a supressão da atividade de GF-I mesmo em baixas concentrações (15 µg/ml da reação de mistura). A quercetina inibiu fortemente a formação de glucano, tanto por *Streptococcus mutans* como pela placa dental, e em menor grau a naringenina, hesperetina e crisina.

MERESTA & MERESTA (1985) (citado por MARCUCCI, 1995), analisaram a sensibilidade de 75 cepas bacterianas ao extrato etanólico da própolis. Os autores observaram que todas as cepas apresentaram sensibilidade

ao extrato de própolis. Entre 75 cepas bacterianas testadas, 69 foram identificadas como *Staphylococcus sp* e *Streptococcus sp*.

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

PÁPAY et alii (1985) isolaram e identificaram 4 flavonas, 9 flavonols, 5 flavononas, 4 ácidos carboxílicos aromáticos e um éster de ácido carboxílico da própolis da Hungria, sendo que destes, 6 flavonols (galangina, galangina-3-metil éter (5,7-dihidroxi-3-metoxiflavone), isalpinina, kaempferol, ramnetina (3,5,3',4'-tetrahidroxi-7-metoxiflavone), isoramnetina), 4 flavonas (crisina, tectocrisina, acacetina, apigenina (5,7,4'-trihidroxiflavone)), 5 flavononas (pinocembrina, pinostrobina, pinobanksina, pinobanksina-3-acetato, 2,5-dihidroxi-7-metoxiflavanone), 4 ácidos carboxílicos e o éster fenil etil do ácido caféico também estavam presentes nas árvores da espécie *Populi gemma*. Os autores concluíram que as árvores da espécie *Populus nigra*, muito comuns na Europa, não são apenas as únicas fontes de própolis, mas também as espécies *Populi gemma*.

KÖNIG (1985) relatou as fontes vegetais da própolis de diversas regiões. Segundo o autor, na Europa a principal fonte vegetal para própolis são as árvores da família das Salicáceas, particularmente do gênero *Populus* (conhecidas popularmente como "poplars") e nos Estados Unidos, além dos "poplars", os pinheiros de modo geral são importantes fontes para própolis. Na Austrália, os

eucaliptos são fontes vegetais importantes, sendo que na região Ocidental, as plantas da espécie *Xanthorrhoea pressii* e *X. australis* são as fontes vegetais predominantes da própolis. O autor também descreveu que praticamente não existe na literatura, relatos sobre as possíveis fontes vegetais da própolis na região da América do Sul e devido a ausência de “poplars” nesta região (pois são vegetação de zona temperada), outras fontes vegetais devem ser utilizadas pelas abelhas na coleta de própolis.

HEIMLER (1986) descreveu um método para analisar flavonóides agliconas através da cromatografia em camada delgada de alta performance (HPTLC) em placas prontas RP-18 (Merck) e SilC₁₈-50 (Macherey and Nagel). Foram utilizados como eluente: ácido acético 1 M em 60% de metanol, ácido acético 1 M em 50% de metanol, ácido acético:metanol:água (3:3:4, v/v), amônia 0.1 M em 55% de metanol ou hexano:acetato de etila:ácido acético (72:27:1). Após a eluição os flavonóides foram visualizados sob luz U.V. a 254 e 366 nm. Foi observado a relação do comportamento cromatográfico dos flavonóides agliconas, com o número e a posição dos seus grupos hidroxilas. Os flavonóides com maior número de hidroxilas apresentaram maiores R_fs, com exceção da galangina e quercetina que apresentavam pequena diferença nas R_fs, quando comparado com outros flavonóides de mesmo número de grupos hidroxilas. Segundo a autora, a presença de um grupo hidroxila na posição 3, como na galangina e quercetina, não resulta em aumento da polaridade da molécula, devido a interação deste grupo hidroxila com o grupo carbonil na posição C₄.

NISHINO et alii (1987) observaram que (-)epigallocatequina, isolado da planta medicinal *Elaeagnus glabra*, possuía atividade antibacteriana sobre *Staphylococcus epidermidis* (responsável pela acne vulgaris), *Proteus vulgaris* e *Staphylococcus aureus* e também citotoxicidade sobre as células tumorais HeLa.

Também foi estudada a atividade de outros flavonóides selecionados sobre *Staphylococcus epidermidis*. A concentração mínima inibitória (MIC) de (-)epigallocatequina contra *P. vulgaris* e *S. aureus* foi de 100 µg/ml e 50 µg/ml para *S. epidermidis*. A atividade citotóxica sobre células HeLa foi observada na concentração 18.6 µg/ml (IC₅₀). Dentre os outros flavonóides testados contra *Staphylococcus epidermidis* a galangina se destacou pela forte atividade antibacteriana 6.3 µg/ml (MIC). Também foi observado atividade antibacteriana significativa a 50-100µg/ml (MIC) em algumas flavonas, como 6,7 dihidroxiflavona, e flavonols, como kaempferol, entretanto nenhum dos flavononas e flavononols apresentaram atividade contra *S. epidermidis*.

SU et alii (1987) analisaram o efeito antioxidante de flavonóides isolados da planta medicinal *Osbeckia chinensis* L. Foram isolados kaempferol, quercetina, quercetina-3-gentibiose, quercetina-3-O-β-D-glucopiranosideo, kaempferol-3-O-β-D-glucopiranosideo. Segundo os autores, a quercetina-3-gentibiose apresentou maior atividade antioxidante, sendo que os demais apresentaram baixa atividade.

GRUNBERGER et alii (1988) demonstraram que o composto fenil etil éster do ácido caféico (CAPE) isolado da própolis possuía atividade citotóxica em células tumorais do melanoma e do carcinoma do seio. Os autores estudaram o efeito do CAPE em células tumorais, pela análise da incorporação de [³H] timidina no DNA das linhagens de células de carcinoma do seio e melanoma, e observaram que a 10 µg de CAPE/ml inibia completamente a incorporação de [³H] timidina pelo DNA das células tumorais.

SOKOLOV & TORGOV (1989) isolaram e identificaram nas amostras de própolis 3 novos compostos: ferulato, p-coumarato e p-hidroxibenzoato do álcool

trans-coniferil, através da ressonância magnética nuclear e espectrometria de massa. Estes compostos também foram isolados nos exsudatos de botões de *Populus tremula*.

BOGDANOV (1989) analisou a composição de flavonóides de 4 amostras de mel e 2 amostras de própolis da Suíça. O principal flavonóide identificado tanto no mel como nas amostras de própolis foi a pinocembrina, além de pequenas quantidades de crisina e galangina. O autor também relatou que o perfil dos flavonóides tanto na cromatografia em camada delgada como no HPLC foram semelhantes entre as amostras do mel e própolis.

BANKOVA et alii (1989) isolaram dos botões florais das árvores *Populus nigra*, *Populus italica* e da própolis, dois ésteres do ácido caféico e dois ésteres do ácido ferúlico com álcool pentenil isomérico. Os autores também confirmaram a hipótese da origem vegetal da própolis da região da Bulgária e sua relação com os botões da família das salicáceas, principalmente *Populus nigra*.

GREENAWAY et alii (1990) relataram um estudo sobre a composição química da própolis e a sua origem vegetal. Os autores utilizaram cromatografia gasosa e espectrometria de massa para analisar os constituintes da própolis e dos exsudatos resinosos das plantas, principalmente “poplars” (da família das Salicáceas), muito comuns na Europa. Os autores analisaram amostras de própolis da Áustria, Equador, Alemanha, Israel, Reino Unido e Estados Unidos e demonstraram que, com exceção das amostras do Equador, os constituintes da própolis eram característicos de exsudatos resinosos dos botões de “poplars”, principalmente do gênero *Populus*, como *Populus nigra*, *deltadoides* e *euroamericana*. A própolis do Equador continha uma composição química bastante diferente, devido provavelmente à ausência de “poplars” nesta região.

Também foi relatado que, apesar da composição química da própolis ser qualitativamente semelhante aos exsudatos dos “poplars”, quantitativamente apresentaram diferenças significativas.

GRANGE & DAVEY (1990) analisaram as propriedades antibacterianas da própolis em cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus spp.*, *Branhamella catarrhalis*, *Corynebacterium sp*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Klebsiella pneumoniae*. Os autores verificaram que a própolis, na concentração de 3 mg/ml, inibiu completamente o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus spp.*, *Branhamella catarrhalis*, *Corynebacterium sp*, *Bacillus cereus*, e inibiu parcialmente o crescimento de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, porém não apresentou efeito contra *Klebsiella pneumoniae*. Os autores concluíram que a própolis apresentou atividade antibacteriana, principalmente em gram positivos, porém foi limitada nos gram negativos.

SOKOLOV & TORGOV (1990) determinaram as agliconas de flavonóides por espectrometria de massa em própolis coletadas nas regiões com “poplars” *Populus tremulus* e observaram que os flavonóides isolados pertenciam a 2 grupos : flavonas, como apigenina e acacetina e flavonols, como kaempferide.

KEDZIA et alii (1990) (citado por MARCUCCI, 1995) relataram que o mecanismo da atividade antimicrobiana da própolis poderia ser atribuído a ação sinérgica de flavonóides, hidroxiácidos e sesquiterpenos.

TORRES et alii (1990) observaram que o extrato etanólico da própolis na concentração de 11.6mg/ml inibiu em cerca de 98% o crescimento “in vitro” do parasita protozoário *Giardia lamblia*.

FUENTES & HERNANDEZ (1990) (citado por MARCUCCI, 1995) demonstraram que o extrato etanólico da própolis apresentava alta atividade antibacteriana sobre as bactérias gram positivas, como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus sp.*

ACKERMANN (1991) descreveu um método analítico rápido através da cromatografia de camada delgada (TLC) para estudar os diversos componentes da própolis. Foram utilizados 2 sistemas de solventes, tolueno:clorofórmio:acetona (40:25:35, v/v) e hexano:acetato de etila:ácido acético (60:40:3), cujas placas foram observadas sob luz U.V. a 254 nm. Os autores concluíram que através deste método poderiam ter uma avaliação rápida dos diversos componentes mobilizados na placa de TLC. Também foi observado diferenças na distribuição dos componentes das própolis provenientes de regiões geográficas diferentes.

IKENO et alii (1991) analisaram o efeito “in vitro” dos extratos etanólicos da própolis no crescimento e atividade da glicosiltransferase de *Streptococcus sobrinus* 6715, *Streptococcus mutans* PS14, *Streptococcus cricetus* OMZ 61 e sobre cáries dentais em ratos infectados com *S. sobrinus* 6715. A própolis demonstrou ter atividade antimicrobiana (formação do halo inibitório) contra as 3 linhagens testadas e inibiu tanto a síntese de glucanos insolúveis em água como a atividade de glicosiltransferase. Em ratos inoculados com *S. sobrinus*, cerca da metade das fissuras dentais estariam cariadas, sendo que os ratos tratados com própolis apresentaram significativamente menor incidência de cáries dentais. Os

autores sugeriram que devido ao sinergismo dos efeitos antimicrobianos, inibição da síntese de glucanos e da atividade da glicosiltransferase, a própolis pode controlar a cárie dental em ratos.

AMOROS et alii (1992) analisaram “in vitro” a atividade antiviral contra herpes simplex vírus tipo 1 (HSV-1), dos principais flavonóides isolados da própolis. Os autores demonstraram que os ácidos caféico e ferúlico e as flavanonas pinocembrina e isosakuranetina apresentaram pouca ou nenhuma atividade contra HSV-1. Por outro lado, os flavonols apresentaram atividade significativas contra HSV-1 sendo a galangina com maior atividade seguida de kaempferol e quercetina. Dentre as flavonas estudadas apenas a luteolina (5,7,3',4'-tetrahidroxiflavone) demonstrou atividade anti HSV-1. Estudou-se também o possível sinergismo pela combinação de 2 ou mais flavonóides, contra o vírus HSV-1. Foi observado que todas as combinações entre flavonol e flavonas demonstraram sinergismo contra o HSV-1, sendo as melhores combinações: kaempferol+luteolina, quercetina+crisina, galangina+apigenina, kaempferol+apigenina e quercetina+apigenina. Segundo os autores, este sinergismo pode explicar a melhor atividade anti HSV-1 dos extratos etanólicos da própolis, que os seus constituintes flavonóides individuais.

SERDJIEVA & MANOLOVA (1992) estudaram a atividade anti-influenza “in vitro” de seis compostos sintéticos (ésteres do ácido cinâmico substituído), idênticos ou análogos aos encontrados nos extratos etanólicos da própolis. Os autores verificaram que um dos compostos, isopentil ferulato, inibiu significativamente a atividade infecciosa do vírus influenza A/Hong Kong (H3N2). Observou-se também que a atividade anti-influenza do composto isopentil ferulato e do extrato etanólico da própolis foram semelhantes para esta cepa do vírus.

BANKOVA et alii (1992) determinaram os compostos fenólicos da própolis através da cromatografia capilar gasosa. Os autores detectaram os flavonóides agliconas pinocembrina e galangina, o ácido caféico e seu β -fenil-etil éster das amostras de própolis da Bulgária.

GARCÍA-VIGUEIRA et alii (1992) analisaram amostras de própolis provenientes de duas regiões diferentes da Espanha, através de cromatografia gasosa/Espectrometria de massa. Foram identificados como compostos principais, o ácido caféico e ácido isoferúlico e seus ésteres, além de flavonóides como pinocembrina, pinobanksina, crisina e galangina e eram similares aos dos exsudatos das árvores da espécie *Populus nigra*. Os autores observaram que a composição das amostras de diferentes regiões eram qualitativamente semelhantes, porém apresentavam variação quantitativa significativa dentre as amostras analisadas. Segundo os autores, a fonte vegetal de ambas as amostras de própolis foram os “poplars”, porém diferentes espécies de “poplars” apresentam diferenças quantitativas na sua composição, apesar de serem qualitativamente semelhantes. Isto poderia explicar a variação quantitativa das amostras das duas regiões da Espanha.

SABATIER et alii (1992) analisaram os flavonóides de mel de girassol por diferentes métodos: cromatografia em camada delgada de alta performance em fase reversa através de placas RP18 F₂₅₄S (Merck), cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa em coluna RP18 Lichrosorb (C₁₈) e cromatografia gasosa/espectrometria de massa. Os autores identificaram pinocembrina, pinobanksina, crisina, galangina e quercetina, além de quantidades menores de tectocrisina e kaempferol, e observaram que estes flavonóides também foram

isolados da própolis. Segundo os autores o mel pode ser considerado uma importante fonte de flavonóides na dieta humana.

BANKOVA et alii (1992), analisaram a composição dos constituintes fenólicos das amostras de própolis provenientes da Bulgária e Mongólia e as possíveis fontes vegetais (exsudatos resinosos de diferentes botões de árvores), através de cromatografia capilar gasosa/espectrometria de massa. Verificou-se que a proporção dos constituintes da própolis variava dependendo da região e época da coleta, estando relacionado com a origem vegetal da própolis. Os autores demonstraram que em ambos os países a composição da própolis era bastante similar a dos exsudatos dos botões das árvores da família das Salicáceas (“poplars”), sendo que na Bulgária a principal espécie foi o *Populus nigra* e em menor extensão a *Populus italica* e na Mongólia, a *Populus suaveolens*.

DIMOV et alii (1992) relataram que galangina, pinocembrina e pinostrobina eram os flavonóides reconhecidos como mais eficazes com relação à atividade antibacteriana.

YAMAUCHI et alii (1992) demonstraram que o composto benzil cafeato isolado da própolis apresentou atividade antioxidante (inibição da auto-oxidação do metil linoleato). Os autores concluíram que apesar dos flavonóides serem considerados os antioxidantes mais abundantes e efetivos da própolis, outros constituintes fenólicos como o benzil cafeato demonstraram contribuir na atividade antioxidante da própolis.

MATSUNO (1992) verificou a atividade citotóxica “in vitro” dos extratos de própolis brasileira sobre as células do carcinoma hepatocelular, KB e HeLa de

humanos. Segundo o autor a atividade citotóxica era causada por quercetina, ácido caféico e os constituintes fenil éster da própolis.

TOMÁS-BARBERÁN et alii (1993) realizaram um estudo sobre a composição de compostos fenólicos em amostras de própolis de *Apis mellifera* e de abelhas nativas e as evidências fitoquímicas para analisar a origem vegetal da própolis da região tropical de Venezuela. Os autores concluíram que os exsudatos das flores de *Clusia minor* e *Clusia major* (Guttiferae) continham os benzofenonas poliprenilados encontrados na maioria das amostras de própolis estudados, sugerindo que estas plantas eram as principais fontes da própolis da região tropical da Venezuela. Os autores também verificaram que somente poucas amostras de própolis apresentavam flavonóides, principalmente do grupo das flavonas 6-oxigenados metilados.

BONHEVI et alii (1994) analisaram a composição química e a atividade bacteriostática das amostras de própolis provenientes de diferentes regiões geográficas e botânicas, principalmente Uruguai e China. Os autores demonstraram que os compostos fenólicos, principalmente flavonóides, apresentavam variabilidade dependendo da região, porém, de modo geral, a apigenina e acacetina apresentavam-se em maiores concentrações, e quantidades consideráveis de pinocembrina e quercetina, além dos derivados de ácido benzóico, cinâmico, benzaldeídos e da vanilina. A atividade bacteriostática dos extratos etanólicos das amostras de própolis foram maiores contra *Staphylococcus aureus* do que contra *Bacillus subtilis*, porém foram muito menores sobre a *Escherichia coli*. De modo geral, a concentração mínima inibitória (MIC) das amostras de própolis foi 53 vezes maior que o relatado para tetraciclina sobre o *B. subtilis* e *S. aureus* e 400 vezes maior sobre o *E. coli*.

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

AGA et alii (1994) isolaram e identificaram três compostos antimicrobianos das amostras de própolis provenientes do Brasil. Estes compostos foram identificados como: ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (1), ácido 3-prenil-4-dihidrocinâmoloxicinâmico (2) e 2,2-dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano (3). Os autores descreveram que a atividade antimicrobiana, expressa em concentração mínima inibitória-MIC ($\mu\text{g/ml}$), foi de 15.6, 31.3 e 125 sobre *Bacillus cereus* e de 31.3, 62.5 e 125 sobre *Enterobacter aerogenes*, respectivamente para os compostos 1, 2 e 3. Os autores concluíram que o ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico foi o principal componente antimicrobiano nas amostras de própolis brasileira.

BANKOVA et alii (1995) analisaram 4 amostras de própolis provenientes do Brasil, através de cromatografia gasosa e espectrofotometria de massa. Os autores observaram que a composição da fração polar da própolis apresentava características diferentes quando comparada com a própolis provenientes da zona temperada (como Europa), com baixas concentrações de flavonóides e altas concentrações de hidroquinona, ácidos hidroxibenzóico e principalmente ácido dihidrocinâmico. A composição dos constituintes voláteis também apresentou diferenças significativas com as das regiões temperadas. As amostras de própolis brasileira não apresentavam β -eudesmol e benzil benzoato, característicos da

zona temperada, porém apresentavam altas concentrações de ácido dihidrocinâmico. Observou-se também a presença de altas concentrações de acetofenona prenilados e pequenas quantidades de alguns terpenóides como sesquiterpenóides, α -terpinol. Estes compostos foram apenas encontrados nas amostras de própolis brasileira. Os autores concluíram que a composição química da própolis brasileira foi significativamente diferente da própolis da região temperada, devido à diferença da fonte vegetal.

Os flavonóides, principalmente flavonols, demonstraram ser potentes antioxidantes, em estudo “in vitro” em sistemas modelos de oxidação de lipoproteína (VINSON et alii, 1995). Neste estudo analisou os efeitos antioxidantes em lipoproteínas de baixa densidade, responsáveis pela arterosclerose. Os flavonols e os polifenóis da epicatequina apresentaram-se como melhores antioxidantes, principalmente o galato de epigaloepicatequina. Segundo os autores, os resultados deste estudo demonstraram uma possível ação benéfica dos flavonóides na dieta sobre os problemas cardíacos, como a arterosclerose.

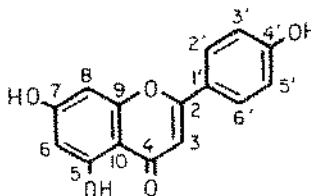
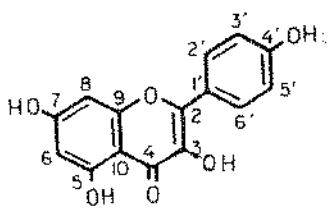
NAKAGAMI et alii (1995) analisaram a atividade anti-complemento “in vitro” de 19 compostos fenólicos. Dois flavonóides, galato de epigalotequina e miricetina, apresentaram marcante atividade anti-complemento a 4.2 e 5.2 $\mu\text{g/ml}$ (IC_{50}), respectivamente. Segundo os autores, o sistema complemento consiste em uma série de componentes que atuam em cascata causando danos aos microrganismos, reações inflamatórias, porém em sistemas complemento hipereativos podem levar a doenças auto imunes, como artrite reumatóide. Com a atividade anti-complemento, os flavonóides poderiam atuar como moduladores da resposta biológica, assim como no sistema autoimune (imunomoduladores).

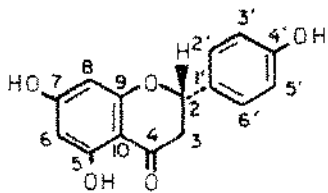
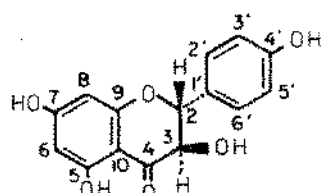
MARCUCCI (1995) realizou uma revisão bibliográfica sobre a própolis e relatou diversas propriedades biológicas da própolis descritas por vários autores, entre elas: regeneração do tecido cartilaginoso (SCHELLER et alii, 1977) e do tecido ósseo (STOJKO, 1978), ação imunomodulatória (BANKOVA et alii, 1989), atividade antioxidante (YANISHLIEVA & MARINOVA, 1986), atividade antitripanossoma (HIGASHI et alii, 1991), atividade anti-inflamatória (MIHAIL et alii, 1984) e ação anestésica local (PAINTZ & METZNER, 1979).

PARK et alii (1995) estudaram amostras de própolis provenientes de diferentes regiões do Brasil através da espectrofotometria em U.V., cromatografia em camada delgada de alta performance e cromatografia líquida de alta eficiência. Os autores verificaram que as concentrações de flavonóides totais e de flavonóides agliconas como a galangina, crisina e quercetina variavam dependendo da região da coleta.

✻

Tabela 1 - . Principais Flavonóides Encontrados na Própolis de *Apis mellifera*

Flavonas			
Nome comum	Nome científico	Estrutura química	Referência*
Acacetina	5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavone		a, h, i, l, o
Apigenina	5,7,4'-trihidroxiflavone		h, i, k, l, o
Crisina	5,7-dihidroxiflavone		b, c, d, f, g, h, i, j, k, n, o
Pectolinarigenina	5,7-dihidroxi-4',6'-dimetoxiflavone		c, h
Quercetina 3,3'-dimetil éter	4',5,7-trihidroxi-3,3'-dimetoxiflavone		c,i
Tectocrisina	5-hidroxi-7-metoxiflavone		b, c, f, g,h, i, k, o
-	5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavone		a, b
Flavonol			
Galangina	3,5,7-trihidroxiflavone		b, f, g, h, i, k, m, n, o
Galangina-3-metil éter	5,7-dihidroxi-3-metoxiflavone		i, n
Isalpinina	3,5-dihidroxi-7-metoxiflavone		b, c, h, i
Isoramnetina	3,5,7,4'-tetrahidroxi -3'-metoxiflavone		g, h, i
Kaempferide	3,5,7-trihidroxi-4'-metoxiflavone		a, g, i, l
Kaempferol	3,5,7,4'-tetrahidroxiflavone		g, i, k, o
Quercetina	3,5,7,3',4'-pentahidroxiflavone		a, f, g, i, k, o
Ramnetina	3,5,3',4'-tetrahidroxi-7-metoxiflavone		h, i, k, o
Ramnocitrina	3,5,4'-trihidroxi-7-metoxiflavone		a, b, h, i

Flavanonas			
Nome comum	Nome científico	Estrutura química	Referência
Isosakuranetina	5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavanone		d
Naringenina	5,7,4'-trihidroxiflavanone		h, k
Pinocembrina	5,7-dihidroxiflavanone		b, c, f, g, h, i, j, k, m, n, o
Pinostrobrina	5-hidroxi-7-metoxiflavanone		a, c, d, e, i, k, n, o
Sakuranetina	4',5-dihidroxi-7-metoxiflavanone		c, d, e, h, k
-	2,5-dihidroxi-7-metoxiflavanone		g, i, m
-	5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavanone	a, c, d	
Dihidroflavonol			
Pinobanksina	3,5,7-trihidroxiflavanone		c, i, k, m, n, o
Pinobanksina-3-acetato	5,7-dihidroxi-3-acetilflavanone		c, h, i, m, n
-	3,7-dihidroxi-5-metoxiflavanone		g, i, m

Propavko et al (1969)^a, Villanueva et al (1970)^b, Schneidweind et al (1975)^c, Ghisalberti et al (1977)^d, Ghisalberti et al (1978)^e, Bankova et al (1982)^f, Bankova et al (1983)^g, Nagy et al (1985)^h, Papay et al (1985)ⁱ, Bogdanov (1989)^j, Greenaway et al (1990)^k, Sokolov & Torgov (1990)^l, Bankova et al (1992)^m, García-Viguera et al (1992)ⁿ, Bonhevi et al (1994)^o.

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - COLETA DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS DE *Apis mellifera* AFRICANIZADAS

As amostras foram obtidas de colméias domésticas de abelhas *Apis mellifera* africanizadas. A própolis de meliponídeos não foi coletada.

4.1.1 - Método de coleta das amostras de própolis bruta

Aproximadamente 80 amostras de própolis bruta foram obtidas dos seguintes Estados do Brasil: Mato Grosso (MT), Goiás (GO), Mato Grosso do Sul (MS), Minas Gerais (MG), São Paulo (SP), Santa Catarina (SC), Paraná (PR) e Rio Grande do Sul (RS), conforme Tabela 2. As amostras de própolis foram coletadas por raspagem, com auxílio de uma espátula, das partes internas e bordas da melgueira, ninho e tampa das colméias de abelhas da espécie *Apis mellifera*. O material coletado foi previamente separado das raspas de madeira e excesso de cera, e acondicionado em pequenos sacos plásticos limpos, inertes e secos, sendo guardados sob abrigo da luz, a 5°C.

4.1.2 - Tratamento das amostras de própolis bruta

As amostras de própolis brutas foram limpas retirando-se poeira, pedaços de madeira, abelhas mortas, traças e qualquer tipo de material estranho. Posteriormente, foram pesados cerca de 20 gramas de própolis bruta, em balança semi-analítica (Acatec BEC1000). As amostras de própolis que se apresentavam rígidas e secas foram trituradas, peneiradas, homogeneizadas e armazenadas na

Tabela 2 - Coleção das Amostras de Própolis

Amostra de própolis	Região	Localização Geográfica
Mato Grosso (MT)	Cuiabá, Chapada dos Guimarães, Cáceres (Pantanal), Sto. Antônio do Leverger	Localizado geograficamente entre 14° e 16° latitude sul
Goiás (GO)	Senador Canedo, Piracanjuba, Bonfinópolis, Nerópolis, Goiânia, Bonsucesso	Localizado geograficamente entre 16° e 18° latitude sul
Mato Grosso do Sul (MS)	Campo Grande, Jaraguari, Dourados	Localizado geograficamente entre 20° e 23° latitude sul
Minas Gerais (MG)	Extrema, Santa Luzia, Belo Horizonte, Itamarandiba	Localizado geograficamente entre 18° e 23° latitude sul
São Paulo (SP)	Santo Antônio da Posse, Bragança Paulista e Mogi das Cruzes	Localizado geograficamente entre 22° e 24° latitude sul
Santa Catarina (SC)	Joinville, Campo Alegre, Orleans, Florianópolis	Localizado geograficamente entre 26° e 28° latitude sul
Paraná (PR)	Santa Gema, Almirante Tamandaré, Betaras, Curitiba	Localizado geograficamente entre 25° e 26° latitude sul
Rio Grande do Sul (RS)	Porto Alegre, Nova Petrópolis	Localizado geograficamente entre 29° e 31° latitude sul

As amostras de própolis bruta foram coletadas no período entre janeiro de 1995 a agosto de 1995.

forma de pó. As amostras de própolis bruta em pó foram guardadas em recipientes plásticos limpos, inertes e sob abrigo da luz a 5°C. As amostras com excesso de umidade foram secadas em dessecador com sílica à temperatura ambiente, antes de serem trituradas e homogeneizadas.

4.1.3 - Obtenção do extrato etanólico da própolis (EEP)

Amostras de 2 gramas de própolis bruta em pó, foram pesadas em balança analítica (Mettler H10) e transferidas para tubos de ensaio (25 x 180 mm). Em seguida, foram pipetados 25 ml de etanol 80% (Merck), recém preparados, e feita a extração em banho-maria (Fanem Unitemp) a 70°C durante 30 minutos, sob agitação. Posteriormente, as amostras de própolis foram centrifugadas a 8800x g em centrífuga Beckman J2-21, por 10 minutos a 5°C. O sobrenadante obtido, denominado extrato etanólico da própolis (EEP) foi armazenado em tubos de vidro (15 x 150 mm) com tampa de rosca e vedados com “parafilm”. O EEP obtido foi utilizado nas análises descritas a seguir.

4.2 - ANÁLISE QUANTITATIVA E QUALITATIVA DOS FLAVONÓIDES DO EEP.

A análise quantitativa e qualitativa dos flavonóides do EEP foram realizadas por: Determinação de Flavonóides Totais, Espectrofotometria na Região Ultravioleta (“U.V.scanning”), Cromatografia em Camada Delgada de Alta Performance e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

4.2.1 - Determinação de Flavonóides Totais

4.2.1.1 - Preparo do EEP para determinação dos flavonóides totais

O extrato etanólico da própolis, obtido de acordo com item 4.1.3, foi diluído em etanol 80% na proporção de 1:10(v/v).

4.2.1.2 - Análise dos flavonóides totais do EEP.

As análises dos flavonóides totais dos extratos etanólicos de própolis foram feitas de acordo com o método descrito por PARK et alii (1995) e pelo Boletim Informativo da Associação Japonesa de Saúde e Nutrição (1994). O princípio desta reação se baseia na formação de quelatos entre o metal Alumínio e os flavonóides, principalmente os flavonols (3-hidroxi flavones) como quercetina, em soluções alcoólicas, levando a um efeito batocrômico do espectro de absorção dos flavonóides, com alteração da coloração (JURD & GEISSMAN, 1956; URBACH & TIMMICK, 1968 e JURD, 1969). Foi realizada uma reação colorimétrica pela mistura de 0.5 ml do extrato etanólico da própolis, preparados de acordo com o item 4.1.3: 4.3 ml de etanol 80%, 0.1 ml de nitrato de alumínio 10% e 0.1 ml de acetato de potássio 1 M. Como controle para cada amostra, foi utilizado 0.1 ml de água em substituição ao nitrato de alumínio. Após 40 minutos, mediu-se a absorbância das amostras em espectrofotometro (Coleman-II) a 415 nm. A leitura final de absorbância, foi obtida pela diferença entre a absorbância da reação e o controle. A absorbância obtida significa o teor de flavonóides totais, com base no padrão quercetina.

4.2.2 - Espectrofotometria na Região Ultravioleta do EEP.

Uma alíquota de 25 µl do extrato etanólico da própolis, obtido de acordo com o item 4.1.3, foi diluída em 30 ml de etanol p.a.(Merck) e o espectro de absorção na região U.V. da amostra foi determinado na faixa de comprimento de onda entre 200 e 400 nm (“U. V. scanning”) através do espectrofotômetro Beckman DU-70. Também foi medido no espectro de absorção obtido, a absorbância a 290 nm das amostras dos extratos etanólicos da própolis analisadas (PARK et alii, 1995).

4.2.3 - Cromatografia em Camada Delgada de Alta Performance em Fase Reversa do EEP (HPTLC).

A cromatografia em camada delgada de alta performance do EEP foi realizada de acordo com a modificação do método descrito por SABATIER et alii (1992) e VANHALEN & VANHALEN-FASTRÉ (1980). Alíquotas de 10 µl dos EEP, obtidos de acordo com o item 4.1.3, foram aplicados em placas 100x100mm RP-18 F₂₅₄-S (Merck-Art. 13724). O tempo de desenvolvimento do cromatograma foi de 1 hora e 50 minutos, utilizando-se como sistema solvente etanol:água destilada (55:45, v/v). Foram utilizados como padrões os flavonóides: crisina, acacetina, galangina, apigenina, kaempferol e quercetina. Todos os padrões foram obtidos da Extrasynthese A.A. Co, França. As placas desenvolvidas foram observadas sob luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm, utilizando-se iluminador U.V. Cole Parmer, modelo UVP UVGL-58.

Após análise dos resultados obtidos quanto aos flavonóides totais, os espectros de absorção na região ultravioleta e cromatografia em camada delgada,

de acordo com os métodos descritos nos itens 4.2.1, 4.2.2 e 4.2.3, respectivamente, foram selecionadas as amostras de própolis com altos teores de flavonóides para serem analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).

4.2.4 - Determinação Quantitativa dos Flavonóides dos EEP por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) em Fase Reversa.

Vinte µl do EEP obtido de acordo com o item 4.1.3 foram injetados em um cromatógrafo líquido (CG-480C) acoplado com um detector U.V. (CG-435) operando a 254 nm e equipado com coluna YMC-PACK ODS-A (250x4.6 mm, S-5 µm, 120A) nas seguintes condições: fluxo a 1ml/min, temperatura a 35°C e sistema eluente água:metanol:ácido acético na proporção 60:75:5 (v/v) (BANKOVA et alli, 1982). Os flavonóides das amostras foram identificados através do tempo de retenção (por comparação com padrões conhecidos) e uso de padrões internos. Os padrões de flavonóides utilizados foram: quercetina, kaempferol, apigenina, isoramnetina, ramnetina, sakuranetina, isosakuranetina, crisina, acacetina, galangina e kaempferide, em ordem de eluição. Todos os padrões foram obtidos da Extrasynthese A.A. Co. As amostras do EEP e os padrões foram previamente filtrados em membrana de éster de celulose com porosidade 0.45 µm.

4.3 - TESTE DE ANTIBIOGRAMA DOS EEPs EM BACTÉRIAS PATOGÊNICAS.

Foram selecionados os EEPs com maiores teores de flavonóides de cada região de coleta, para análise da atividade antibacteriana através do teste de antibiograma (BLAIR et alli, 1958).

4.3.1 - Preparo dos discos de EEP.

Os discos de papel de filtro Whatman nº3 (com 5x1 mm de diâmetro) foram inicialmente submersos nos extratos etanólicos de própolis obtidos de acordo com o item 4.1.3, durante 1 hora. Os discos foram então transferidos para placas de petri estéreis e secas no dessecador com sílica à temperatura ambiente por 24 horas. Posteriormente, foram mantidos na estufa a 60°C por 4 horas para eliminação de qualquer resíduo etanólico.

4.3.2 - Análise da atividade antibacteriana dos EEPs.

A análise da atividade antibacteriana dos EEPs em bactérias Gram positiva *Staphylococcus aureus* coagulase positiva e Gram negativa *Escherichia coli* foram realizadas de acordo com o método descrito por BLAIR et alii (1958). Culturas ativas do *S. aureus* e *E. coli* foram inoculadas por espalhamento com “swabs” estéreis em placas de ágar nutriente. Os discos de EEP, preparados de acordo com o item 4.3.1, foram colocados sobre as placas inoculadas e incubadas a 37°C por 24 horas. A atividade antibacteriana foi determinada pela formação do halo inibitório ao redor dos discos de EEP.

4.4. - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos da determinação dos flavonóides totais e da absorbância a 290 nm, realizadas conforme os itens 4.2.1 e 4.2.2, respectivamente, foram analisados estatisticamente através da Análise de Variância-ANOVA (COCKRAN & COX, 1957). A significância estatística ($p \leq 0.05$) das diferenças entre as médias foi determinada através do teste de Tukey (BOX & HUNTER, 1978 e VIEIRA & HOFFMAN, 1988). Também foi realizada a análise de Correlação Linear entre as variáveis: determinação de flavonóides totais e absorbância a 290 nm., através do método de Pearson. (NETER et alii, 1989).

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - COLETA DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS BRUTA

Foram coletadas 83 amostras de própolis bruta de diversas Regiões do Brasil, cuja ecologia vegetal de algumas espécies de árvores e plantas de cada região de coleta da própolis estão apresentadas na Tabela 3. Os nomes populares das árvores e plantas de cada região, fornecida pelos apicultores, serviram de base para identificação dos nomes científicos de acordo com LORENZI (1982 e 1992).

5.1.1 - Características físicas da própolis bruta.

As características físicas das amostras de própolis foram bastante variáveis, dependendo da região de coleta, apresentando consistências desde extremamente amolecidas até rígidas e com colorações variando de preto a verde-claro, como descritas na Tabela 4. Na Região Centro Oeste a própolis se apresentava, de modo geral, com coloração amarronzada e de consistência ligeiramente mole, porém própolis esverdeadas com características mais rígidas foram encontradas em Goiás e Mato Grosso do Sul. A própolis da Região do Pantanal (Cáceres - MT), apresentava-se com coloração preta e extremamente moles. Na Região Sudeste, nos estados de São Paulo e Minas Gerais, a própolis apresentava-se esverdeada ou ligeiramente esverdeada e de consistência mais rígida, porém na região de Itamarandiba - MG, zona de reflorestamento com Eucaliptos, a própolis era de coloração marrom e amolecida. As própolis da Região Sul apresentavam-se com colorações que variavam do verde escuro com

Tabela 3 - Ecologia Vegetal das Regiões de Coleta das Amostras de Própolis

Região	Ecologia Vegetal
Minas Gerais	Áreas de vegetação virgem e densa com árvores da espécie <i>Anadenanthera macrocarpa</i> (angico), <i>Luehea divaricata</i> (açoita cavalo), <i>Acacia polyphylla</i> (monjoleiro), <i>Inga sp</i> , <i>Tabebuia sp</i> (ipê), <i>Holocalyx sp</i> (alecrim), <i>Jacaranda cuspidifolia</i> (mulher pobre), <i>Chorisia speciosa</i> (paineira), <i>Eucaliptus sp</i> , <i>Cariniana sp</i> (jequitibá), <i>Machaerium sp</i> , <i>Tibouchina granulosa</i> (quaresmeira), <i>Psidium guajava</i> (goiabeira), <i>Piptadenia gonoacantha</i> (jacaré), <i>Campomanesia xanthocarpa</i> (guabiroba), <i>Securinega guaraniva</i> (goiabeira do mato), <i>Campomanesia guazumaefolia</i> (sete casaca) e matas com <i>Vernonia sp</i> (assa-peixe), <i>Baccharis intermixta</i> (vassourinha), <i>Solanum lycocarpum</i> (jurubeba do campo), <i>Taraxacum sp</i> , <i>Mimosa sp</i> , <i>Peschiera fuchsiaefolia</i> (leiteira), <i>Hyptis suaveolens</i> (mata pasto), <i>Baccharis genistelloides</i> (carqueja), <i>Eupatorium sp</i> , <i>Mikania cordifolia</i> , <i>Commelina virginica</i> , <i>Vitex sp</i> , <i>Euphorbia prostrata</i> (quebra pedra)
São Paulo	Áreas de vegetação virgem e densa com árvores da espécie <i>Anadenanthera macrocarpa</i> , <i>Luehea divaricata</i> , <i>Acacia polyphylla</i> , <i>Inga sp</i> , <i>Tabebuia sp</i> , <i>Holocalyx sp</i> , <i>Jacaranda cuspidifolia</i> , <i>Alchornea sp</i> , <i>Chorisia speciosa</i> , <i>Eucaliptus sp</i> , <i>Cariniana sp</i> , <i>Machaerium sp</i> , <i>Tibouchina granulosa</i> , <i>Coffea arabica</i> , <i>Ficus sp</i> e matas com <i>Vernonia sp</i> , <i>Baccharis intermixta</i> , <i>Solanum lycocarpum</i> , <i>Taraxacum sp</i> , <i>Mimosa sp</i> , <i>Peschiera fuchsiaefolia</i> , <i>Hyptis suaveolens</i> , <i>Baccharis genistelloides</i> , <i>Commelina virginica</i> .
Goiás	Áreas de vegetação típico de cerrado, e algumas regiões de vegetação densa e virgem com árvores da espécie <i>Anadenanthera falcata</i> (angico do cerrado), <i>Myracrodruon urundeuva</i> (aroeira), <i>Curatella americana</i> (lixreira), <i>Dipteryx alata</i> (baru), <i>Caryocar brasiliense</i> (pequi), <i>Dimorphandra mollis</i> , <i>Myrcia tomentosa</i> , <i>Dalbergia miscolobium</i> (jacarandá), <i>Hymenaea stigonocarpa</i> (Jatobá), <i>Pterodon pubescens</i> (sucupira), <i>Byrsonima basiloba</i> (murici), <i>Serjania sp</i> (cipó uva), <i>Sclerolobium paniculatum</i> (carvoeiro do cerrado), <i>Eucaliptus sp</i> , <i>Anadenanthera macrocarpa</i> , <i>Luehea divaricata</i> , <i>Acacia polyphylla</i> , <i>Inga sp</i> , <i>Tabebuia sp</i> , <i>Holocalyx sp</i> , <i>Jacaranda cuspidifolia</i> , <i>Chorisia speciosa</i> , e mata capoeira com <i>Vernonia sp</i> , <i>Baccharis intermixta</i> , <i>Solanum lycocarpum</i> , <i>Hyptis suaveolens</i> , <i>Commelina virginica</i> , <i>Eupatorium sp</i> , <i>Mikania cordifolia</i> , <i>Cupania vernalis</i> (camboatá), <i>Matayba guianensis</i> , <i>Clibadium armanii</i> , <i>Echinochloa sp</i>
Mato Grosso do Sul	Áreas de vegetação típico de cerrado, e algumas regiões de vegetação densa e virgem com árvores da espécie <i>Anadenanthera falcata</i> , <i>Curatella americana</i> , <i>Dipteryx alata</i> , <i>Caryocar brasiliense</i> , <i>Dimorphandra mollis</i> , <i>Myracrodruon urundeuva</i> , <i>Dalbergia miscolobium</i> , <i>Hymenaea stigonocarpa</i> , <i>Pterodon pubescens</i> , <i>Eugenia jambus</i> (jambo), <i>Cassia ferruginea</i> (canafistula), <i>Gochmatia polymorpha</i> (cambará), <i>Byrsonima basiloba</i> , <i>Serjania sp</i> , <i>Sclerolobium paniculatum</i> , <i>Erythrina falcata</i> (bico de papagaio), <i>Austroplenkia populnea</i> (marmeleiro), <i>Croton urucarana</i> (capixingui), <i>Eucaliptus sp</i> , <i>Anadenanthera macrocarpa</i> , <i>Luehea divaricata</i> , <i>Acacia polyphylla</i> , <i>Inga sp</i> , <i>Tabebuia sp</i> , <i>Holocalyx sp</i> , <i>Jacaranda cuspidifolia</i> , <i>Chorisia speciosa</i> , e mata capoeira com <i>Vernonia sp</i> , <i>Baccharis intermixta</i> , <i>Baccharis punctula</i> , <i>Bidens pilosa</i> , <i>Solanum</i>

	<i>Iycocarpum</i> , <i>Hyptis suaveolens</i> , <i>Commelina virginica</i> , <i>Eupatorium sp</i> , <i>Mikania cordifolia</i> , <i>Cupania vernalis</i> , <i>Matayba guianensis</i> , <i>Clibadium armanii</i> , <i>Taraxacum sp</i> , <i>Vitex sp</i> , <i>Echinocloa sp</i>
Mato Grosso	Áreas de vegetação típico de cerrado, e algumas regiões de vegetação densa e virgem com árvores da espécie <i>Anadenanthera falcata</i> , <i>Pterodon pubescens</i> , <i>Pterodon emarginatus</i> , <i>Myrcia tomentosa</i> , <i>Sclerolobium paniculatum</i> , <i>Dimorphandra mollis</i> , <i>Caryocar brasiliense</i> , <i>Xylopia aromatica</i> (pimenta de macaco), <i>Sapindus saponaria</i> (fruta sabão), <i>Tabebuia sp.</i> , <i>Orbignya speciosa</i> (babaçú), <i>Scheelea phalerata</i> (bacuri), <i>Hymenaea stigonocarpa</i> , <i>Dalbergia miscolobium</i> , <i>Jacaranda cuspidifolia</i> , <i>Dipterix alata</i> , <i>Serjania sp</i> , e mata capoeira com <i>Vernonia sp</i> , <i>Baccharis intermixta</i> , <i>Cupania vernalis</i> , <i>Hyptis suaveolens</i> , <i>Matayba guianensis</i> , <i>Mikania cordifolia</i> , <i>Eupatorium sp</i>
Paraná	Vegetação densa e mata virgem com árvores da espécie <i>Eucaliptus sp</i> , <i>Mimosa scabrella</i> (bracatinga), <i>Vitex montevidensis</i> (tarumã), <i>Lithraea molleoides</i> (aroeira), <i>Schinus molle</i> (aroeira salsa), <i>Eugenia sp</i> , <i>Acacia polyphylla</i> , <i>Chorisia speciosa</i> , e mata capoeira com <i>Baccharis intermixta</i> , <i>Baccharis genistelloides</i> , <i>Eryngium panniculatum</i> (caraguata), <i>Raphanus raphanistrum</i> (nabiça), <i>Richardia brasiliensis</i> (poaia branca), <i>Wedelia paludosa</i> (margaridão)
Rio Grande do Sul	Vegetação densa e mata virgem com árvores da espécie <i>Eucaliptus sp</i> , <i>Mimosa scabrella</i> , <i>Vitex montevidensis</i> , <i>Lithraea molleoides</i> , <i>Schinus molle</i> , <i>Eugenia sp</i> , <i>Acacia polyphylla</i> , <i>Chorisia speciosa</i> , <i>Alchornea sp</i> , <i>Ligustrum vulgare</i> (ligustro), <i>Dombeya wallichu</i> (astrapéia), <i>Ateleia glazioviana</i> , <i>Butia eriospatha</i> (butiazeiro), <i>Apeiba tibourbou</i> (pente de macaco), <i>Anadenanthera sp</i> e mata com <i>Baccharis intermixta</i> , <i>Baccharis genistelloides</i> , <i>Eryngium panniculatum</i> , <i>Raphanus raphanistrum</i> , <i>Richardia brasiliensis</i> , <i>Desmodium adscendens</i> , <i>Achyrocline satureoides</i> , <i>Wedelia paludosa</i> , <i>Mikania cordifolia</i>
Santa Catarina	Vegetação densa e virgem com árvores <i>Parapiptadenia rigida</i> (angico branco), <i>Butia sp</i> , <i>Peltophorum dubium</i> , <i>Nectandra sp</i> , <i>Campomanesia xanthocarpa</i> , <i>Vitex megapotamica</i> , <i>Ligustrum vulgare</i> , <i>Ocotea catharinensis</i> (canela preta), <i>Cassia fistula</i> (cassia imperial), <i>Mimosa scabrella</i> , <i>Schinus mole</i> , <i>Gochmatia polymorpha</i> , <i>Talauma ovata</i> (bagaçu), <i>Trema micrantha</i> (guandiúva), <i>Eucaliptus sp</i> , <i>Inga marginata</i> , <i>Eugenia sp</i> , <i>Schinus terebinthifolius</i> (aroeira vermelha), <i>Llex brevisuspis</i> , <i>Llex paraguariensis</i> (erva mate) e mata capoeira com <i>Vernonia sp</i> , <i>Baccharis intermixta</i> , <i>Baccharis genistelloide</i> , <i>Eryngium panniculatum</i> , <i>Raphanus raphanistrum</i> , <i>Richardia brasiliensis</i>

traços marrons a pretos e de consistência endurecida, e enquanto que as amostras de própolis de Santa Catarina apresentavam-se geralmente de coloração marrom e textura mole (Tabela 4).

5.1.2 - O Extrato Etanólico da Própolis (EEP)

Os extratos etanólicos da própolis, obtidos de acordo com o item 4.1.3, também apresentavam-se com coloração variada como observado na Figura 2. A tonalidade ligeiramente esverdeada dos EEPs são característicos da Região de SP e MG.

5.2 - DETERMINAÇÃO DE FLAVONÓIDES TOTAIS DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DA PRÓPOLIS.

A determinação de flavonóides totais das amostras de EEPs foram realizados de acordo com o item 4.2.1. Os resultados demonstraram que o teor de flavonóides totais (obtidos pela formação de quelatos com nitrato de alumínio) foram muito variados, com valores de absorbância (415 nm) com base em quercetina na faixa de 0.01 a 0.61. O teor de flavonóides totais das amostras coletadas da Região de MT e SC foram baixas, ao contrário das amostras de SP, MG, RS e algumas amostras de PR, MS e GO, que apresentaram altos teores de flavonóides totais. Foram selecionadas as amostras de própolis que apresentaram os EEPs com maiores teores de flavonóides de cada região e os resultados estão apresentados na Tabela 5. A análise estatística dos resultados dos teores de flavonóides totais, das amostras de própolis selecionadas, indicaram que os valores obtidos apresentaram diferença altamente significativa entre si ($p < 0.0001$) através da Análise de Variância (ANOVA). O teste de Tukey a nível de significância de 5% ($p \leq 0.05$) dos dados obtidos estão ilustrados na Tabela 5.

Tabela 4 - Características Físicas das Amostras de Própolis

Amostras de Própolis	Características Físicas
Mato Grosso (MT)	Coloração marrom castanho a marrom escuro, com consistência variando de mole e elástica a dura. Amostras da região do Pantanal (Cáceres) apresentaram-se de coloração preta e extremamente moles.
Goiás (GO)	Coloração marrom castanho a marrom escuro, com consistência variando de mole e elástica a ligeiramente endurecidas. Amostras da região de Nerópolis apresentaram-se com coloração verde escura com consistência dura e quebradiça.
Mato Grosso do Sul (MS)	Coloração marrom castanho a marrom escuro com consistência mole e elástica. Algumas amostras apresentaram-se com ligeiro tom esverdeado com consistência dura, porém uma amostra de Campo Grande tinha coloração verde claro com consistência mole.
Minas Gerais (MG)	Coloração verde claro a verde escuro, com consistência variando de dura e quebradiça a ligeiramente mole. Amostras proveniente da região de Itamarandiba (área de reflorestamento de eucaliptos) apresentavam-se com coloração marrom escura a marrom claro e consistência mole.
São Paulo (SP)	Coloração verde a ligeiramente esverdeados, com consistência dura e quebradiça. Algumas amostras apresentaram-se de coloração marrom com consistência mole e elástica.
Santa Catarina (SC)	Coloração marrom escuro a preto, de consistência mole e elástica. Uma amostra de Campo Alegre apresentou-se com coloração ligeiramente esverdeada com consistência dura e quebradiça.
Paraná (PR)	Coloração verde a verde escuro com traços marrons escuros e preto com consistência dura e quebradiça.
Rio Grande do Sul (RS)	Coloração verde escura com traços marrons escuros com consistência variando de dura e quebradiça a ligeiramente mole. Algumas amostras de Nova Petrópolis apresentavam-se escuras.

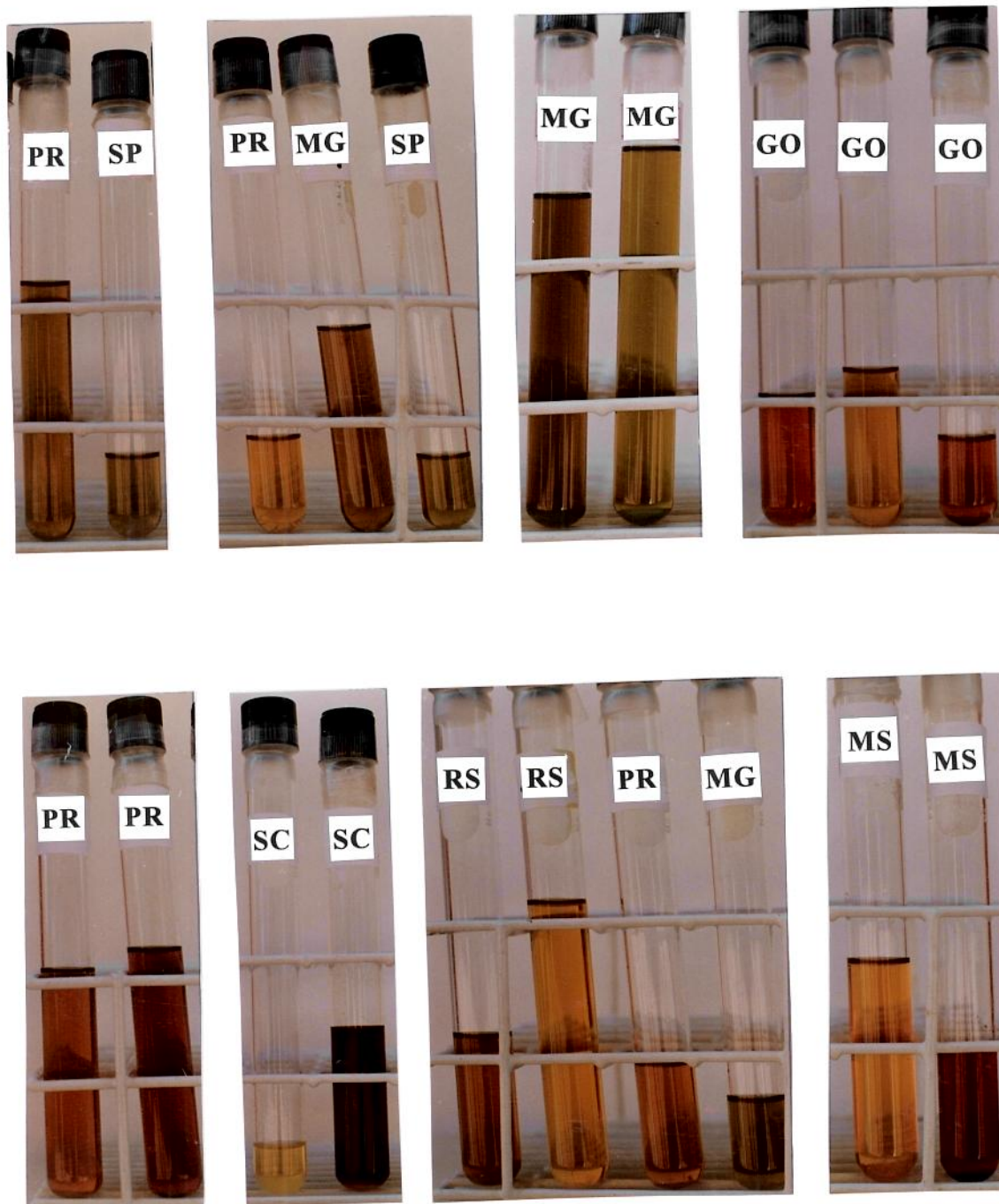


FIGURA 2 - Extratos Etanólicos das Amostras de Própolis (EEP)

Vale salientar que, apesar do método colorimétrico, através do nitrato de alumínio, para determinação de flavonóides totais ser rápido e facilmente realizado, não é preciso, pois o efeito batocrômico da absorção em U.V. causado pelo alumínio não é uniforme para todos os flavonóides. Isto porque a formação de quelatos entre alumínio e os flavonóides ocorre de forma diferente, dependendo do flavonóide, levando a uma alteração colorimétrica que pode ser mais ou menos quantificada a 415 nm. Esta formação de quelatos são mais favoráveis para flavonols (3-hidroxi flavones), como a quercetina. Por esta razão há necessidade de realizar a análise por espectrofotometria em U.V., entre 200 e 400 nm, para confirmar os dados obtidos da determinação de flavonóides totais.

5.3 - ESPECTROFOTOMETRIA NA REGIÃO U.V. DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DA PRÓPOLIS

Os EEPs das amostras brutas foram analisados através da espectrofotometria na região U.V., na faixa de comprimento de onda entre 200 e 400 nm, como descrito no item 4.2.2. Os espectros de absorção demonstraram que os teores de flavonóides foram bastante variáveis dentre as amostras analisadas, correlacionando de modo geral com os dados obtidos da determinação de flavonóides totais. Na Figura 3 estão ilustrados os espectros de absorção das amostras de altos teores de flavonóides de cada região. O espectro de absorção apresentou 2 picos de absorção, sendo um a 220nm e outro a 290 nm. Os flavonóides, de modo geral, apresentam o pico de absorção da luz ultravioleta na faixa de 250 e 350 nm (MABRY & MARKHAM, 1970; MARKHAM, 1982; BANKOVA et alii, 1982; PARK et alii, 1995), assim as

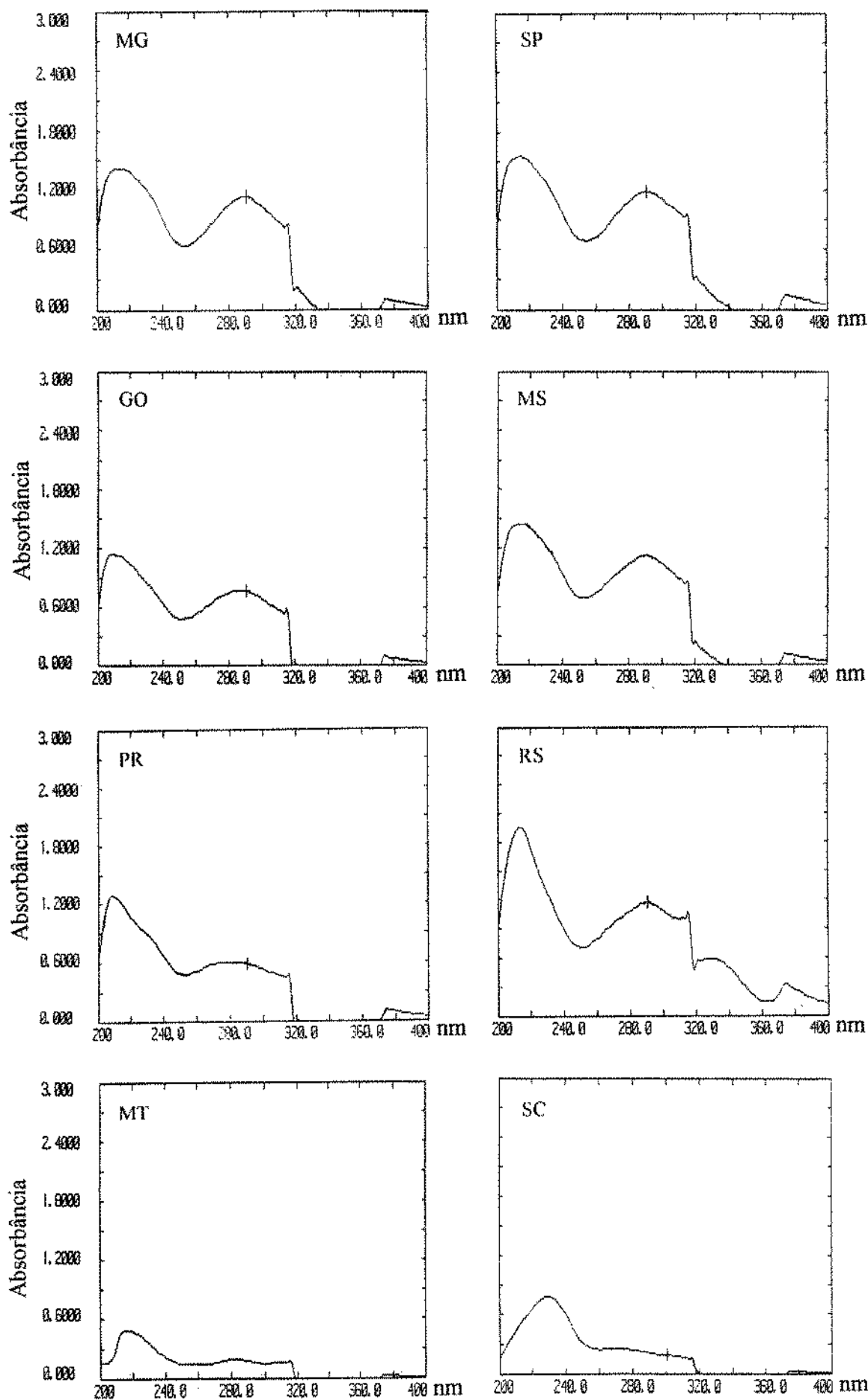


FIGURA 3 - Espectrofotometria na região U.V. dos Extratos Etanólicos das Amostras de Própolis Seleccionadas.

amostras de própolis apresentaram o pico máximo de absorção dos flavonóides a 290 nm e os valores de absorbância estão na Tabela 5. As amostras de MT e SC demonstraram um espectro de absorção na região U.V. com características ligeiramente distintas das demais amostras, porém os valores de absorbância a 290 nm foram baixos indicando menor teor de flavonóides. A análise estatística dos resultados dos valores de absorbância a 290 nm, das amostras selecionadas, através da ANOVA demonstraram que os dados obtidos apresentaram diferença altamente significativa entre si ($p \leq 0.0001$). O teste de Tukey a nível de significância de 5% ($p \leq 0.05$) dos valores de absorbância obtidos estão ilustrados na Tabela 5.

A análise de Correlação Linear pelo método de Pearson entre os dados obtidos da determinação de flavonóides totais e absorbância a 290 nm, demonstraram a existência de correlação linear significativa ($r=0.9768$, $p < 0.0001$), ou seja, as amostras que demonstraram altos valores pela determinação de flavonóides totais apresentaram maiores absorbâncias a 290 nm, bem como as amostras de MT e SC com baixos valores de flavonóides totais, também apresentaram baixas absorbâncias a 290 nm. Assim, a determinação quantitativa dos flavonóides totais pode ser realizada com estes 2 métodos de análise, porém, devemos salientar que variações das frações de flavonóides podem existir de uma amostra para outra, sendo necessário se avaliar qualitativamente os flavonóides através do HPTLC e HPLC.

O teor de flavonóides é um fator muito importante na análise da própolis, pois são os principais compostos fenólicos responsáveis pelas suas diversas atividades biológicas, como as propriedades antimicrobianas, antiinflamatórias, cicatrizantes, antitumorais, etc. (GHISALBERTI et alii, 1977; BANKOVA et alii, 1983; GRANGE & DAVEY, 1990; BONHEVI et alii, 1994).

Tabela 5 - Teor de Flavonóides Totais e Absorção em Ultravioleta a 290 nm.

Amostra de Própolis	Teor de Flavonóides Totais* (Absorbância a 415 nm)	Absorbância em U.V.* a 290 nm
Rio Grande do Sul (RS)	0.61± 0.02 ^a	1.209± 0.03 ^a
São Paulo (SP)	0.58± 0.03 ^a	1.207± 0.01 ^a
Minas Gerais (MG)	0.49± 0.01 ^b	1.156± 0.04 ^{ab}
Mato Grosso do Sul (MS)	0.44± 0.02 ^c	1.100± 0.02 ^b
Goiás (GO)	0.40± 0.02 ^c	0.760± 0.03 ^c
Paraná (PR)	0.32± 0.01 ^d	0.603± 0.02 ^d
Santa Catarina (SC)	0.08± 0.01 ^e	0.190± 0.01 ^e
Mato Grosso (MT)	0.06± 0.01 ^e	0.160± 0.01 ^e

*Valor médio de 3 repetições (média± desvio padrão)

Médias com a mesma letra não apresentam diferença estatisticamente significante entre si (p≤0.05) pelo teste de Tukey.

5.4 - ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DE ALTA PERFORMANCE

Os EEPs foram analisados por Cromatografia em Camada Delgada de Alta Performance em fase reversa, de acordo com o método descrito no item 4.2.3. A Figura 4 ilustra o cromatograma observado a 254 nm, os flavonóides aparecem como mancha escuras contra um fundo azul fluorescente. A cromatografia em camada delgada permite uma visualização rápida da intensidade e número de frações de flavonóides existentes em cada amostra de própolis. Como podemos observar, as amostras que apresentaram altos teores de flavonóides através das análises de flavonóides totais e absorção na região U.V., demonstraram ter maior número e principalmente maior intensidade das manchas no cromatograma, quando comparadas com amostras de baixo teor de flavonóides. Nas amostras de MT e SC foram observadas poucas frações e baixa intensidade das manchas nos cromatogramas observados a 254 nm, demonstrando baixo teor de flavonóides, por outro lado as amostras de SP, MG, GO, MS, PR e RS apresentaram maior número e intensidade das manchas no cromatograma, quando comparado com MT e SC, demonstrando ter maior teor de flavonóides. A amostra de RS apresentou nitidamente maior intensidade nas manchas, ou seja maior teor de flavonóides. Os dados obtidos por visualização da intensidade das frações de flavonóides dos cromatogramas a 254 nm correlacionou com os dados obtidos da absorbância em U.V. a 290 nm e determinação de flavonóides totais (Tabela 5). Assim, podemos determinar a qualidade da própolis em termos de teor de flavonóides, através destes três métodos de análise: Determinação de Flavonóides Totais, Absorbância a 290 nm por Espectrofotometria em U.V. e Cromatografia em Camada Delgada com detecção a 254 nm, porém para uma determinação quantitativa das frações de flavonóides é necessário utilizar o HPLC.

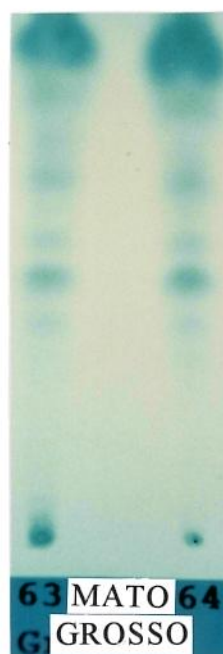
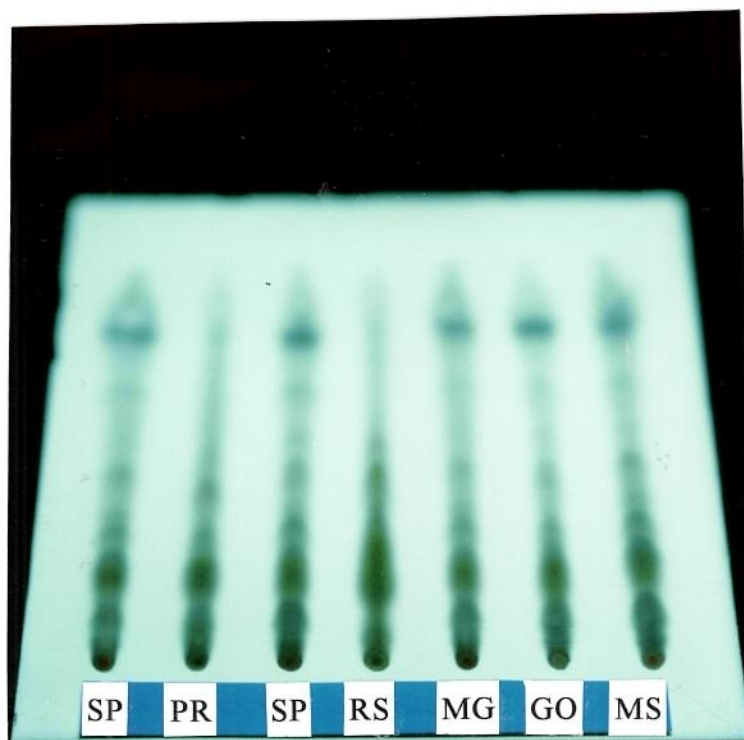


FIGURA 4 - Cromatografia em Camada Delgada de Alta Performance dos EEPs com detecção a 254 nm

Por outro lado, na Figura 5 o cromatograma foi observado a 366 nm e demonstrou uma grande variedade quanto à cor e à distribuição das frações de flavonóides das amostras analisadas. Assim, mesmo as amostras de altos teores de flavonóides apresentaram diferenças qualitativas das frações de flavonóides. Os dados obtidos demonstraram que as amostras de própolis de altos teores de flavonóides dos estados de SP, MG, GO e MS apresentaram frações de flavonóides com características semelhantes, porém significativamente diferente das amostras da Região Sul do país, como os Estados de RS e PR. Mesmo as amostras de baixo teor de flavonóides como o MT e SC apresentaram frações de flavonóides com características diferentes. A visualização dos cromatogramas a 366 nm demonstraram que as amostras apresentaram grande variabilidade em termos qualitativos das frações de flavonóides, mas, de modo geral, observou-se uma nítida diferença entre as amostras da Região Sudeste, principalmente SP e MG e algumas amostras dos Estados da Região Centro Oeste, como MS e GO, quando comparado com as amostras da Região Sul, no caso os Estados de PR e RS.

A Figura 6 ilustra o desenvolvimento de 6 padrões: crisina(5,7-dihidroxi-flavone), acacetina(5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavone), galangina(3,5,7-trihidroxi-flavone), apigenina(4',5,7- trihidroxi-flavone), kaempferol(3,4',5,7-tetrahidroxi-flavone) e quercetina(3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavone), com as Rfs: 0.22, 0.21, 0.22, 0.43, 0.44 e 0.60, respectivamente. Como se percebe, o aumento do número dos grupos hidroxilas resultou numa menor retenção e, conseqüentemente, maior Rf devido a interação dos grupos hidroxilas com o sistema solvente, com exceção da galangina, principalmente se compararmos com a crisina (dihidroxilada) e apigenina (trihidroxilada). A galangina apresenta um grupo hidroxila na posição 3, que devido a ressonância do grupo carbonila na

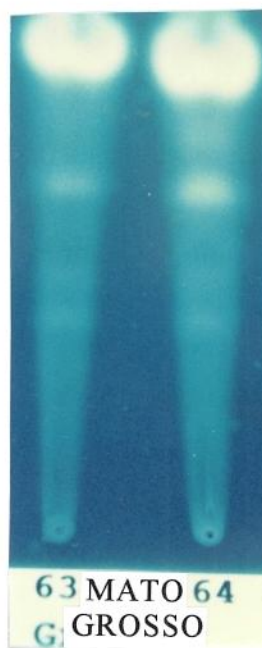
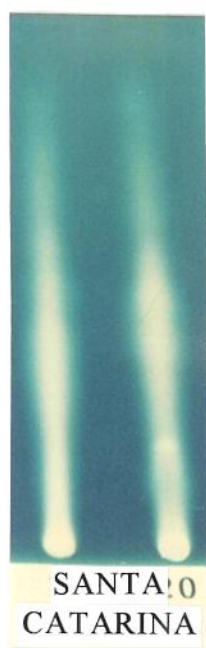
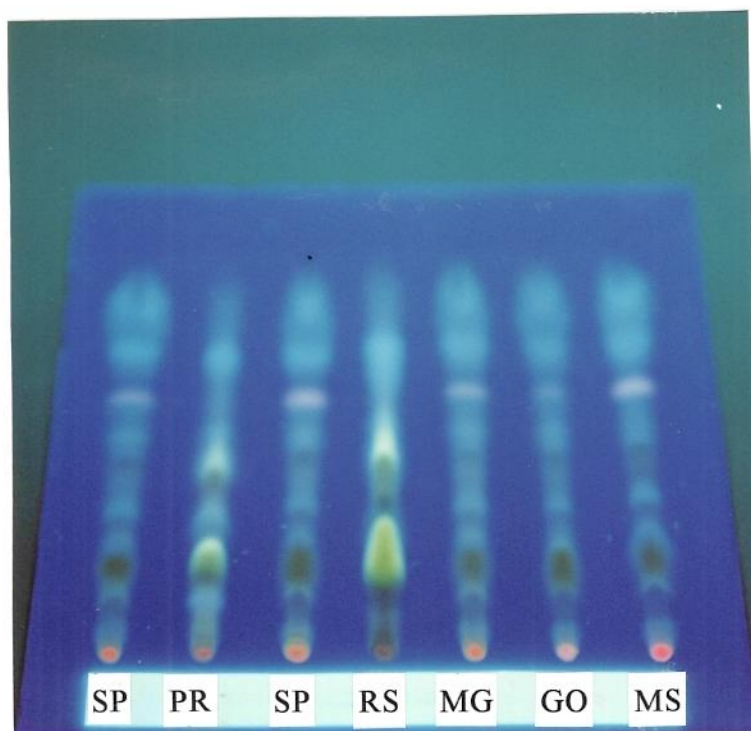
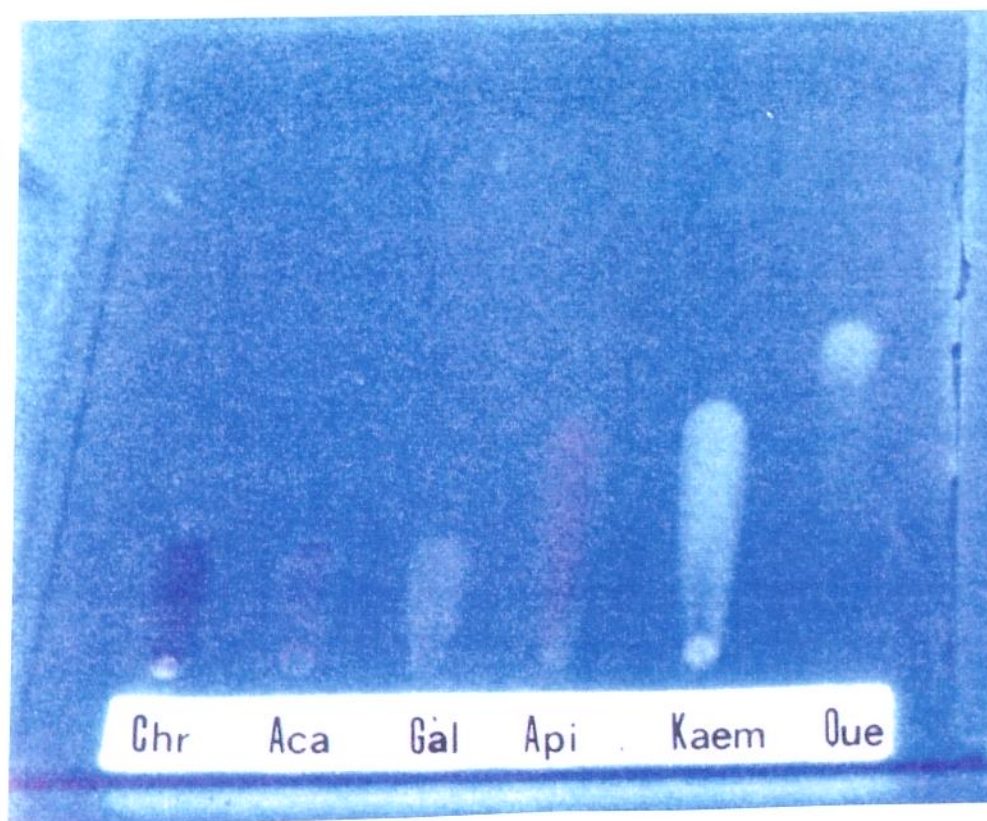


FIGURA 5 - Cromatografia em Camada Delgada de Alta Performance dos EEPs com detecção a 366 nm



Chr: Crisina

Aca: Acacetina

Gal: Galangina

Api: Apigenina

Kaem: Kaempferol

Que: Quercetina

Figura 6 - Cromatografia em Camada Delgada de Alta Performance dos Padrões de Flavonóides com detecção a 366 nm

posição C₄, resulta em uma carga parcial negativa, forma uma ponte de hidrogênio interno entre o grupo hidroxila na posição 3 e o grupo carbonila, diminuindo a capacidade de interação deste grupo hidroxila com o solvente (HEIMLER, 1986), aumentando o tempo de retenção. A acacetina, devido à presença dos grupos metoxila, apresentou um R_f menor, pelo aumento da retenção com a fase estacionária. Não foi possível a identificação exata das frações de flavonóides das amostras analisadas com os seus respectivos padrões, porém, pode-se observar a presença de várias frações de flavonóides com polaridades diferentes.

Os estudos de GREENAWAY et alii (1990) e BANKOVA et alii (1992) têm demonstrado a relação dos compostos fenólicos, principalmente flavonóides, da própolis com a ecologia vegetal de uma determinada região de coleta das abelhas. Estes estudos descreveram que os flavonóides encontrados na própolis são também encontrados nas diversas fontes vegetais, como os exsudatos resinosos dos botões de “poplars” (*Populus sp*), comumente encontrada no continente europeu. Segundo KÖNIG (1985), devido a ausência de “poplars” na região da América do Sul, outras fontes vegetais devem ser utilizadas pelas abelhas na coleta da própolis. Portanto, esta variabilidade qualitativa das frações de flavonóides encontrados nas amostras de própolis analisadas, possivelmente estariam relacionadas com as diferentes fontes vegetais existentes nas diversas regiões de coleta da própolis do Brasil.

5.5 - ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Foram selecionadas amostras de SP, MG, GO, MS, PR e RS, que apresentaram altos teores de flavonóides para serem analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa, de acordo com o método descrito no item 4.2.4. Segundo dados da literatura (STRACK & KRAUSE, 1978; CASTEELE et alii, 1982), para substâncias polares, como flavonóides presentes nas própolis, a separação de substâncias através de cromatografia líquida em fase reversa é superior a fase normal, uma vez que o risco de algum composto altamente polar se ligar irreversivelmente à fase estacionária é menor. Os cromatogramas ilustrados na Figura 7, demonstraram que os EEPs das amostras de PR e RS apresentaram perfil dos picos similares, sendo identificados 7 flavonóides agliconas: quercetina, kaempferol, apigenina, ramnetina, sakuranetina, crisina e galangina, em ordem de eluição. Na amostra do PR também foi identificado pequena quantidade de acacetina. Por outro lado, os cromatogramas de SP, MG, GO e MS apresentaram o perfil dos picos totalmente diferente, das amostras dos Estados da Região Sul, PR e RS. Entretanto, apesar do perfil dos picos das amostras dos Estados de SP, MG, GO e MS serem semelhantes, apresentaram pequenas diferenças com relação aos flavonóides agliconas identificados. As amostras de própolis dos Estados de SP e MG apresentaram 9 flavonóides agliconas: quercetina, kaempferol, apigenina, isoramnetina, ramnetina, sakuranetina, crisina, acacetina e galangina. A amostra de própolis do estado de GO apresentou os flavonóides citados, com exceção de ramnetina e galangina, enquanto que a amostra do estado de MS não apresentou os flavonóides crisina e acacetina. De modo geral, as amostras de PR

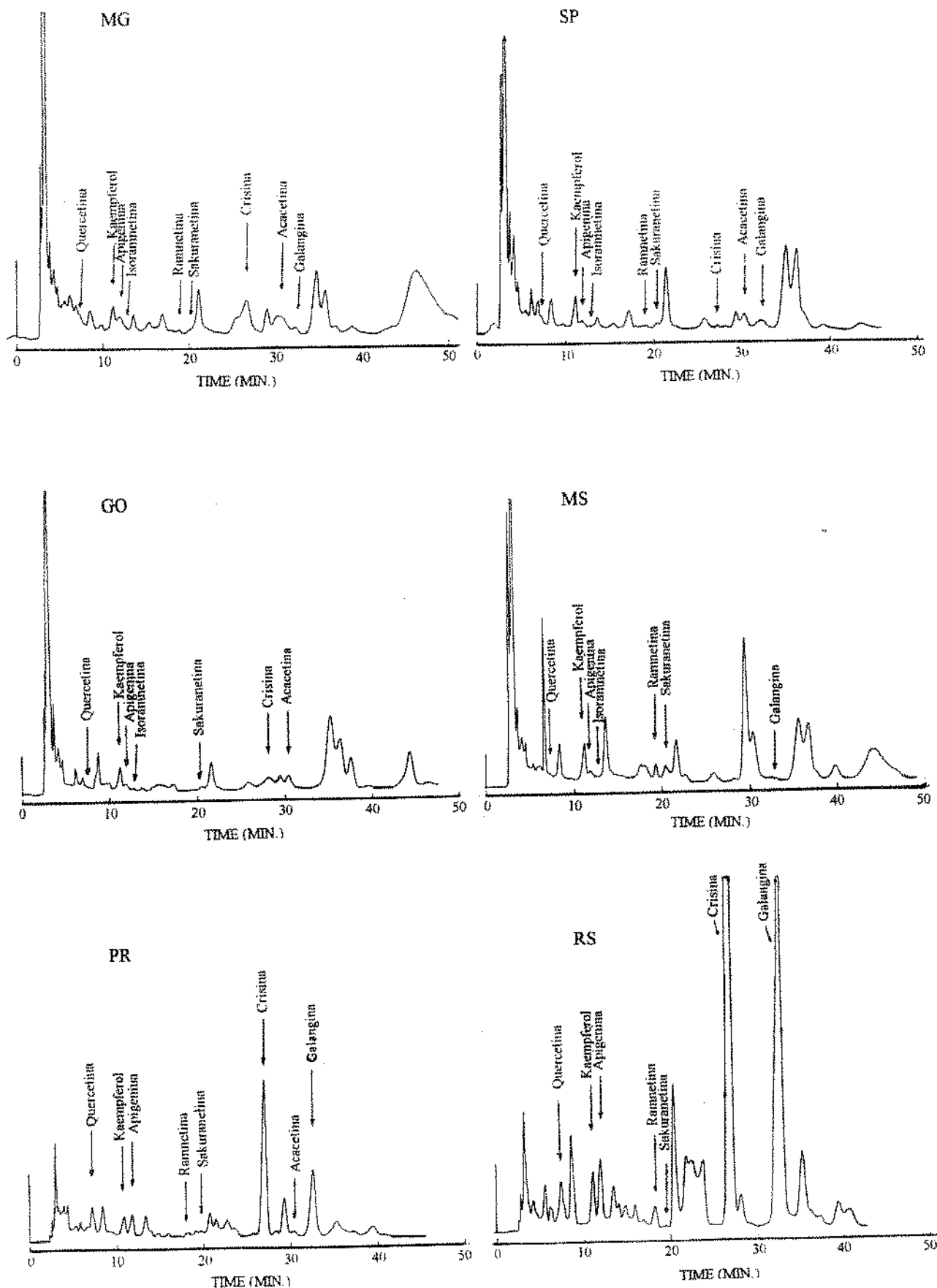


FIGURA 7- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência dos Extratos Etanólicos das Amostras de Própolis dos Estados de MG, SP, GO, MS, PR e RS.

e RS apresentaram, respectivamente, maiores teores de quercetina (3.51 mg/g e 3.92 mg/g), e principalmente galangina (7.39 mg/g e 21.15 mg/g) e crisina (8.68 mg/g e 23.44 mg/g), sendo que nas amostras de SP, MG, GO e MS foi identificada a isoramnetina (0.45 mg/g, 0.60 mg/g, 0.37 mg/g e 0.63 mg/g, respectivamente), que não está presente nas amostras dos Estados da Região Sul. Além disso, apresentaram maiores teores de acacetina (2.75 mg/g-SP, 3.92 mg/g-MG e 2.28 mg/g-GO), com exceção das amostras de própolis do MS. O teor do kaempferol foi de modo geral uniforme nas EEPs das amostras de todos os estados, variando de 1.84 mg/g-PR até 2.98 mg/g-RS (Tabela 6).

Tabela - 6. Análise de Flavonóides das Amostras de Própolis por HPLC em Fase Reversa dos Estados de GO, MS, MG, SP, PR e RS.

Amostra de Própolis	Teor de Flavonóide em mg/g de Própolis					
	Goiás (GO)	Mato Grosso do Sul (MS)	Minas Gerais (MG)	São Paulo (SP)	Paraná (PR)	Rio Grande do Sul (RS)
Quercetina	1.01	1.54	2.05	1.98	3.51	3.92
Kaempferol	2.04	2.89	2.08	2.71	1.84	2.98
Apigenina	1.68	3.10	3.01	2.80	3.39	5.80
Isoramnetina	0.37	0.63	0.60	0.45	-	-
Ramnetina	-	1.63	0.26	0.67	0.93	1.67
Sakuranetina	2.10	6.90	1.83	3.75	3.39	0.67
Isosakuranetina	-	-	-	-	-	-
Crisina	1.60	-	2.37	0.63	8.68	23.44
Acacetina	2.28	-	3.92	2.75	1.17	-
Galangina	-	1.16	0.89	1.88	7.39	21.15
Kaempferide	-	-	-	-	-	-

Os resultados demonstraram que apesar das 6 amostras selecionadas apresentarem altos teores de flavonóides, diferenças qualitativas entre as amostras dos Estados de PR e RS e das amostras dos Estados de SP, MG, GO e MS foram observadas, correlacionando com os dados obtidos da cromatografia em camada delgada de alta performance a 366 nm. Os resultados obtidos da análise dos flavonóides dos EEPs das amostras selecionadas demonstraram que existe uma nítida diferença entre as amostras dos Estados da Região Sul, PR e RS com as amostras da Região de SP, MG, MS e GO, devido provavelmente à diferença na ecologia vegetal e climática de cada região. Esta relação dos flavonóides da própolis com a ecologia vegetal deve ser estudada com mais detalhes, para analisar a influência das plantas na composição da própolis.

5.6 - ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DA PRÓPOLIS

Os resultados da análise da atividade antibacteriana dos extratos etanólicos das amostras de própolis (EEP) selecionadas dos Estados de SP, MG, MS, GO, MT, PR, SC e RS estão ilustrados na Figura 8. As amostras de própolis selecionadas demonstraram ter atividade antibacteriana sobre o *Staphylococcus aureus* coagulase positiva (bactéria gram positiva), pela formação do halo inibitório de crescimento ao redor dos discos dos EEPs, com exceção das amostras de SC e MT. Porém, nenhum dos EEPs apresentaram atividade antibacteriana sobre a *Escherichia coli* (bactéria gram negativa). Segundo dados da literatura (LINDENFELSER, 1967; MERESTA & MERESTA, 1985; GRANGE & DAVEY, 1990; FUENTES & HERNANDEZ, 1990; BONHEVI et alii, 1994), a própolis apresenta atividade antibacteriana mais significativa em

bactérias Gram positivas, principalmente *S. aureus*, do que em bactérias Gram negativas, como *E coli*.

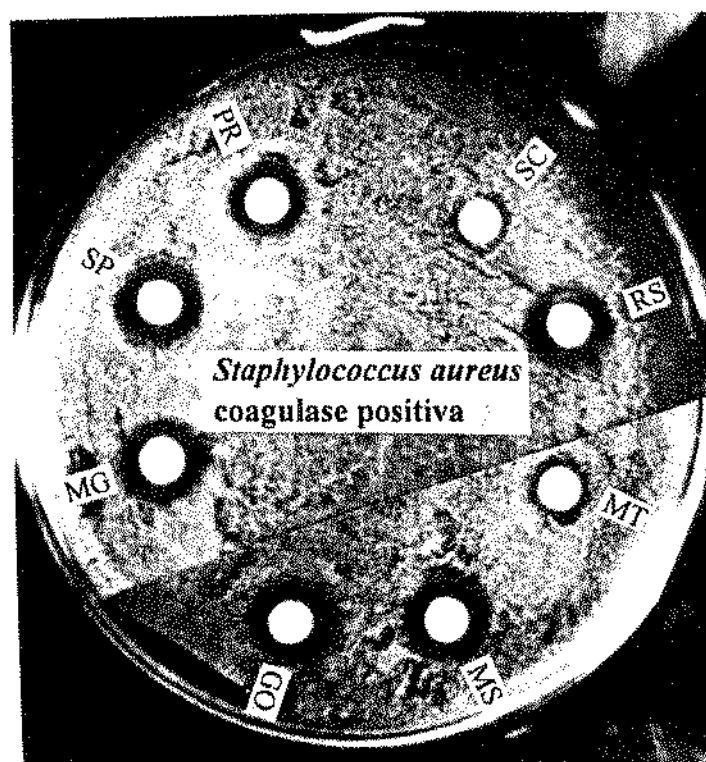


Figura 8 - Teste de Antibiograma dos EEPs em Bactéria Patogênica *Staphylococcus aureus* coagulase positiva.

6 - CONCLUSÃO

A própolis coletada das diversas Regiões do Brasil apresentou grande variabilidade tanto quantitativa como qualitativa dos flavonóides. As amostras de própolis do RS, SP e MG apresentaram os maiores teores de flavonóides e as amostras de MT e SC, de modo geral, demonstraram baixos teores de flavonóides.

Uma nítida diferença foi observada, em termos qualitativos das frações de flavonóides, nas amostras de própolis dos estados da Região Sudeste, SP e MG, e Centro Oeste, em algumas regiões de MS e GO, com relação as amostras da Região Sul, PR e RS, através do HPTLC com detecção a 366 nm e HPLC. Esta diferença está provavelmente associado a diferença da ecologia vegetal das regiões de coleta.

A determinação de flavonóides totais, espectrofotometria na região U.V. na faixa de 200 a 400 nm e HPTLC com detecção a 254 nm, foram métodos de análise adequados para determinar a qualidade da própolis em termos de teor de flavonóides. Porém, para uma análise quantitativa mais precisa das frações dos flavonóides é necessário a utilização do HPLC.

As amostras de PR e RS apresentaram maiores teores de quercetina, galangina e crisina e as amostras de SP, MG, GO e MS apresentaram maiores teores de acacetina (com exceção do MS), além da presença de isoramnetina (ausente nas amostras da Região Sul). A concentração de kaempferol foi, de modo geral, uniforme nas amostras de própolis selecionadas.

As amostras selecionadas de SP, MG, GO, MS, RS, PR apresentaram atividades antibacterianas sobre *Staphylococcus aureus* coagulase positiva, sendo que nenhuma das amostras de própolis apresentaram atividade sobre *Escherichia coli*.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACKERMANN, T. Fast chromatographic study of propolis crudes. **Food Chemistry** **42**: 135-138, 1991.
- AGA, H.; SHIBUYA, T.; SUGIMOTO, T.; KURIMOTO, M. & NAKAJIMA, S. Isolation and identification of antimicrobial compounds in brazilian propolis. **Biosci. Biotech. Biochem.** **58** (5): 945-946, 1994.
- AMOROS, M.; SIMÕES, C. M. O. & GIRRE, L. Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. **J. Nat. Prod.** **55** (12): 1732-1740, 1992.
- AMOROS, M.; LURTON, E.; BOUSTIE, J. & GIRRE, L. Comparison of the anti-herpes simplex virus activities of propolis and 3-methyl-but-2-enyl caffeate. **J. Nat. Prod.** **57** (5): 644-647, 1994.
- BANKOVA, V.; POPOV, S. & MAREKOV, N. L. High performance liquid chromatographic analysis of flavonoids from propolis. **J. Chromatogr.** **242**: 135-143, 1982.
- BANKOVA, V.; POPOV, S. & MAREKOV, N. L. A study on flavonoids of propolis. **J. Nat. Prod.** **46** (4): 471-474, 1983.
- BANKOVA, V.; POPOV, S. & MAREKOV, N. L. Isopentenyl cinnamates from poplar buds and propolis. **Phytochemistry** **28** (3): 871-873, 1989.

- BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; STOEV, G. & POPOV, S. Determination of phenolics from propolis by capillary gas chromatography. **J. Chromatogr.** **607**: 150-153, 1992.
- BANKOVA, V.; DYULGEROV, A.; POPOV, S.; EVSTATIEVA, L.; KULEVA, L.; PUREB, O. & ZAMJANSAN, Z. Propolis produced in Bulgaria and Mongolia: phenolic compounds and plant origin. **Apidologie** **23**: 79-85, 1992.
- BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; KUJUMGIEV, A.; MARCUCCI, M. C. & POPOV, S. Chemical composition and antibacterial activity of brazilian propolis. **Z. Naturforsch.** **50c**: 167-172, 1995.
- BLAIR, J. E., BORMAN, E. K., BYNOE, E. T., UPDYKE, E. L. & WILLIAMS, R. E. O. Hospital acquired staphylococcal disease, recommended procedures for laboratory investigation, Atlanta, Ga., United States, Department of Health, Education and Welfare, Public Health Service.
- BOGDANOV, S. Determination of pinocembrin in honey using HPLC. **J. Apic. Res.** **28** (1): 55-57, 1989.
- BONHEVI, J. S.; COLL F. V. & JORDÀ, R. E. The composition, active components and bacteriostatic activity of propolis in dietetics. **JAOCs** **71** (5): 529-532, 1994.
- BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G. & HUNTER, J. S. **IN: Statistics for experimenters.** Wiley, New York, 1978.

- CASTEELE, K. V.; GEIGER, H. & SUMERE, C. F. V. Separation of flavonoids by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.** **240**: 81-94, 1982.
- CIZMARIK, L. & MATEL, I. Examination of the chemical composition of propolis I. Isolation and identification of the 3, 4-dihydroxycinnamic acid (caffeic acid) from propolis. **Experientia** **26** (4): 713, 1970.
- CIZMARIK, L. & MATEL, I. Examination of the chemical composition of propolis 2. Isolation and identification of the 4-hydroxy-3-methoxy-cinnamic acid (ferulic acid) from propolis. **J. Apic. Res.** **12** (1): 52-54, 1973.
- COCKRAN, W. G. & COX, G. M. IN: **Experimental designs**. 2ed. , Wiley, New York, ,1957.
- DIMOV, V.; IVANOVSKA, N.; BANKOVA, V.; NIKOLOV, N. & POPOV, S. Immunomodulatory action of propolis: IV. Prophylatic activity against Gram-negative infections and adjuvant effect of water-soluble derivative. **Vaccine** **10**: 817-823, 1992.
- GARCÍA-VIGUERA, C.; GREENAWAY, W. & WHATLEY, F. R. Composition of propolis from two different spanish regions. **Z. Naturforsch.** **47c**: 634-637, 1992.
- GHISALBERTI, E. L.; JEFFERIES, P. R. & LANTERI, R. Potencial drugs from propolis. IN: **Mass spectrometry in drug metabolism**. eds. Frigerio, A. & Ghisalberti, E. L. New York, Plenum Press, pp. 111-130, 1977.

GHISALBERTI, E. L.; JEFFERIES, P. R.; LANTERI, R. & MATISONS, J.
Constituents of propolis. **Experientia** 34: 157-158, 1978.

GHISALBERTI, E. L. Propolis: A review. **Bee World** 60: 59-84, 1979.

GRANGE, J. M. & DAVEY, R., W. Antibacterial properties of propolis (bee glue). **J. R. Soc. Med.** 83: 159-160, 1990.

GREENAWAY, W.; SCAYSBROOK, T. & WHATLEY, F. R. The composition and plant origins of propolis: a report of work at Oxford. **Bee World** 71: 107-118, 1990.

GRUNBERGER, D.; BANERJEE, R.; EISINGER, K.; OLTZ, E. M.; EFROS, L.; CALSWELL, M.; ESTEVEZ, V. & NAKANISHI, K. Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenetyl ester isolated from propolis. **Experientia** 44: 230-232, 1988.

HEIMLER, D. High performance thin layer chromatography of selected flavonoid aglycones on ready-for-use layers of silinazed silica gel. **J. Chromatogr.** 366: 407-411, 1986.

HERTOG, M. G. L., HOLLMAN, P. C. H. & KATAN, M. B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. **J. Agric. Food. Chem.** 40: 2379-2383, 1992

- IIO, M.; UYEDA, M.; IWANAMI, T. & NAKAGAWA, Y. Flavonoids as a possible preventive of dental caries. **Agric. Biol. Chem.** **48** (8): 2143-2145, 1984.
- IKENO, K.; IKENO, T. & MIYAZAWA, C. Effects of propolis on dental caries in rats. **Caries. Res.** **25**: 347-351, 1991.
- JANES, K. & BUMBA, V. Beitrag zur Zusammensetzung des Bienenharzes (Propolis). **Pharmazie** **29** (8): 544-545, 1974.
- JURD, L. & GEISSMAN, T. A. Absorption spectra of metal complexes of flavonoid compounds. **J. Org. Chem.** **21**: 1395-1401, 1956.
- JURD, L. Aluminum complexes of phenolic flavones. Spectral and structural correlations. **Phytochemistry** **8**: 445-462, 1969.
- KATO, N.; TOSA, N.; DOUDOU, T. & IMAMURA, T. Effects of dietary quercetin on serum lipids. **Agric. Biol. Chem.** **47** (9): 2119-2120, 1983.
- Kenkoshyokuhin Kikaku Kijun no Koshi.** Standard of Propolis as Food, Boletim Informativo da Associação Japonesa de Saúde e Nutrição, June, pp. 8-10, 1994.
- KÖNIG, B. Plant sources of propolis. **Bee World** **66**: 136-139, 1985.
- LINDENFELSER, L. A. Antimicrobial activity of propolis. **Am. Bee J.** **107** (3): 90-92; 130-131, 1967.

- LORENZI, H. **IN: Plantas Daninhas do Brasil-Terrestres, Aquáticas, Parasitas, Tóxicas e Medicinais**, Nova Odessa, SP, Editora Plantarum, 1982.
- LORENZI, H. **IN: Árvores Brasileiras-Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**, Nova Odessa, SP, Editora Plantarum, 1992.
- MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R. & THOMAS, M. B. “ **The systematic identification of flavonoids**”, Springer Verlag, Berlin, 1970.
- MARCUCCI, M. C. Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie** 26: 83-99, 1995.
- MARKHAM, K. R. Ultraviolet-visible absorption spectroscopy. **IN: Techniques of flavonoid identification**. ed. Markham, K. R. London, Academic Press, pp. 36-51, 1982.
- MATSUNO, T. Isolation and characterization of the tumoricidal substances from Brazilian propolis. **Honeybee Sci.** 13: 49-54, 1992.
- METZNER, J.; BEKEMEIER, H.; SCHNEIDWEIND, e. & SCHWAIBERGER, R. Bioautographische Erfassung der antimikrobiell wirksamen Inhaltstoffe von Propolis. **Pharmazie** 30 (12): 799-800, 1975.
- NAGY, E.; PÁPAY, V.; LITKEY, Gy. & DINYA, Z. Investigation of the chemical constituents, particularly the flavonoid components, of propolis and *Populi gemma* by the GC/MS method. **IN: Flavonoids and**

bioflavonoids. eds. Farkas, L.; Gábor, M. & Kallay, F., Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 233-240, 1985.

NAKAGAMI, T.; NANAMURA-TAMURA, N., TOYOMURA, K., NAKAMURA, T. & SHIGEHISA, T. Dietary flavonoids as potential natural biological response modifiers affecting the autoimmune system. **J. Food. Sci.** **60** (4): 653-656, 1995.

NETER, J.; WASSERMAN, W. & KUTNER, M. H. **IN: Applied linear regression models.** 2 ed., Irwin, Boston, MA, 1989.

NISHINO, C.; NOBUYASU, E.; TAWATA, S.; MORI, A.; KOBAYASHI, K. & FUKUSHIMA, M. Antibacterial activity of flavonoids against *Staphylococcus epidermidis*, a skin bacterium. **Agric. Biol. Chem.** **51** (1): 139-143, 1987.

PÁPAY, V.; TÓTH, L.; SOLTÉSZ, M.; NAGY, E. & LITKEY, Gy. Isolated compounds from hungarian propolis and *Populi gemma*. **IN: Flavonoids and bioflavonoids.** eds. Farkas, L.; Gábor, M. & Kallay, F., Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 233-240, 1985.

PARK, Y. K.; KOO, M. K.; SATO, H. H. & CONTADO, J. L. Estudo de alguns componentes da própolis coletada por *Apis mellifera* no Brasil. **Arq. Biol. Tecnol.** **38** (4): 1253-1259, 1995.

POPRAVKO, S. A.; GUREVICH, A. I. & KOLOSOV, M. N. Flavonoid components of propolis. **Khimiya Prir. Soedin.** **5**: 476-482, 1969.

- SABATIER, S.; AMIOT, M. J.; TACCHINI, M. & AUBERT, S.
Identification of flavonoids in sunflower honey. **J. Food. Sci.** **57** (3): 773-774, 1992.
- SHELLER, S.; SZAFLARSKI, J.; TUSTANOWSKI, J.; NOLEWAJKA, E. & STOJKO, A. Biological properties and clinical application of propolis I. **Arzneim-Forsch. Drug Res.** **27**, 889-890, 1977.
- SCHNEIDWEIND, E. M.; KALA, H.; LINZER, B. & METZNER, J. Zur Kenntnis der Inhaltsstoffe von Propolis. **Pharmazie** **30** (12): 803, 1975.
- SERKEDJIEVA, J & MANOLOVA, N. Anti-influenza virus effect of some propolis constituents and their analogues (esters of substituted cinnamic acids). **J. Nat. Prod.** **55** (3): 294-297, 1992.
- SOKOLOV, I. V. & TORGOV, I. V. Conjugates of trans-coniferyl alcohol in propolis and its sources. **Khimiya. Prir. Soedin.** **3**: 319-324, 1989.
- SOKOLOV, I. V. & TORGOV, I. V. Flavonoid aglycons in propolis and its sources. **Khimiya. Prir. Soedin.** **4**: 550-551, 1990.
- SU, J.; OSAWA, T.; KAWAKISHI, S. & NAMIKI, M. Antioxidative flavonoids isolated from *Osbeckia chinensis* L. **Agric. Biol. Chem.** **51** (10): 1801-2803, 1987.
- TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; GARCÍA-VIGUERA, C.; VIT-OLIVIER, P.; FERRERES, F. & TOMÁS-LORENTE, F. Phytochemical evidence for

the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. **Phytochemistry**, **34** (1): 191-196, 1993.

TORRES, D.; HOLLANDS, I. & PALACIOS, E. Effeto de un extracto alcohólico de propóleos sobre el crecimiento de *Giardia lamblia* "in vitro". **Rev. Cubana Cienc. Vet.** **21**, 15-19, 1990.

URBACH, F. L. & TIMMICK, A. Spectrophotometric and spectrofluorometric study of flavonol-aluminum chelates in absolute ethyl alcohol. **Analytical Chem.** **40** (8): 1269-1272, 1968.

VANHAELLEN, M. & VANHAELLEN-FASTRÉ, R. High performance-liquid, gas-liquid and thin-layer chromatography of naturally occurring flavonoids, phenolic and related compounds. **J. Chromatogr.** **187**: 255-260, 1980.

VIEIRA, S. & HOFFMANN, R. **IN: Estatística experimental.**, São Paulo, Editora Atlas, 1988.

VILLANUEVA, V. R.; BOGDANOVSKY, D.; BARBIER, M.; GONNET, M. & LAVIE, P. Sur l'identification de la 3,5,7-trihydroxy flavone (galangine) à partir de la propolis. **Annals Inst. Pasteur Paris** **106**: 292-302, 1964.

VILLANUEVA, V. R.; BARBIER, M.; GONNET, M. & LAVIE, P. Les flavonoides de la propolis. Isolement d'une nouvelle substance bacteriostatique: la pinocembrine. **Annals Inst. Pasteur Paris** **118**: 84-87, 1970.

- VINSON, J. A.; DABBAGH, Y. A.; SERRY, M. M. & JANG, J. Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an *in vitro* oxidation model for heart disease. **J. Agric. Food Chem.** **43**: 2800-2802, 1995.
- WULF, L. W. & NAGEL, C. W. Analysis of phenolic acids and flavonoids by high-pressure liquid chromatography. **J. Chromatogr.** **116**: 271-279, 1976.
- YAMAUCHI, R.; KATO, K.; OIDA, S.; KANAEDA, J. & UENO, Y. Benzyl caffeate, an antioxidative compound isolated from propolis. **Biosci. Biotech. Biochem.** **56** (8): 1321-1322, 1992.