



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS



Viviane Cristina Toreti

Nutricionista

Yong Kun Park

Orientador

ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA SAZONALIDADE SOBRE ALGUMAS
PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DA PRÓPOLIS DE DOIS
APIÁRIOS DO ESTADO DE SÃO PAULO.

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

Campinas

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

T631e Toreti, Viviane Cristina
Estudo da influência da sazonalidade sobre algumas propriedades físico - químicas e biológicas da própolis de dois apiários do estado de São Paulo / Viviane Cristina Toreti. -- Campinas, SP: [s.n], 2011.

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

1. Própolis. 2. Sazonalidade. 3. Atividade biológica. 4. Composição química. 5. Flavonóides. I. Park, Yong Kun. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Título em inglês: Study of the influence of seasonality on some physical properties of chemical and biological propolis from two apiaries in the state of São Paulo

Palavras-chave em inglês (Keywords): Propolis, Seasonals, Biological activity, Chemical composition, Flavonoids

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Yong Kun Park

Hélia Harumi Sato

Masaharu Ikegaki

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

Este exemplar corresponde à redação final da dissertação **Estudo da Influência da sazonalidade sobre algumas propriedades físico-químicas e biológicas da própolis de dois apiários do Estado de São Paulo** defendida em ___/___/___ por Viviane Cristina Toreti aprovado pela comissão julgadora em ___/___/___.

Prof. Dr. Yong Kun Park
(Orientador)

Dra. Hélia Harumi Sato
(Membro – DCA/FEA/UNICAMP)

Dr. Masaharu Ikegaki
(Membro – UNIFAL/MG)

Dra. Juliana Alves Macedo
(Suplente – DCA/FEA/UNICAMP)

Dr. Severino Matias de Alencar
(Suplente – ESALQ/USP)

A DEUS por ter iluminado os meus dias,
À minha família por estar sempre presente nos momentos que mais precisei
DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Yong Kun Park, pela orientação, demonstração de dedicação à pesquisa e por todos os ensinamentos técnicos e de vida.

A professora Hélia Harumi Sato em especial pela colaboração, paciência, incentivo e amizade.

Aos membros da banca e aos suplentes pela correção, dicas e sugestões.

Aos docentes Gláucia Maria Pastore, Gabriela Alves Macedo, Helena Godoy, Claudio Aguiar, Marcelo Prado pela colaboração, paciência, incentivo e amizade.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica de Alimentos: Cleber, Ana Luiza, Fabiano, Priscila, Márcio, Camilo, Paula, Daniele, Zé, Roberta, Ruann, Andreas em especial aos amigos Evandro, Joelise, Haroldo, Patrícia Schons, Fabíola, Patrícia Castro.

Aos amigos Marcela Pavan Bagagli e Flávio Satomi por toda ajuda na estatística e amizade durante toda a execução do trabalho.

Aos meus primos Vitor e Renato por estarem presentes em todos os momentos da minha vida.

As técnicas Bia, Priscila e Val pela ajuda, paciência e amizade.

A ex-aluna de iniciação científica Viviane Atauri pela ajuda e amizade.

Aos apicultores Yasutaka Sakamoto e Pércio por conceder amostras para execução deste trabalho.

As terapeutas Romilda e Pérola que me ajudaram a perseverar na busca dos meus sonhos.

A todos os funcionários que trabalham na FEA que indiretamente me ajudaram.

“Toda glória deriva da ousadia de começar”

Eugene F. Ware

ÍNDICE

ÍNDICE	vii
ÍNDICE DE TABELAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
NOMENCLATURA/ ABREVIACÕES.....	xvii
RESUMO.....	xix
SUMMARY	xxi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Abelhas	3
2.2 Própolis	4
2.3 Composição química da Própolis.....	6
2.4 Classificação das Própolis brasileiras	9
2.5 Origem vegetal da Própolis.....	10
2.6 Sazonalidade	11
2.7 Métodos de Extração da Própolis	15
2.8 Efeitos Terapêuticos da Própolis.....	15
2.9 Importância Econômica da Própolis.....	18
2.10 Legislação	19
3. OBJETIVOS	21
Objetivo Geral	21
Objetivos Específicos.....	21
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1 Própolis	22

4.1.1 Coleta das amostras da própolis	22
4.1.2 Tratamento das amostras da própolis Bruta.....	23
4.1.3 Preparo dos Extratos Etanólicos da própolis (EEP).....	23
4.2 Determinações Qualitativas dos Compostos Fenólicos presentes nos Extratos Etanólicos da própolis	24
4.2.1 Determinação do Espectro de Absorção dos Extratos Etanólicos da própolis (UV – Scanning).....	24
4.2.2 Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência em Fase Reversa dos Extratos Etanólicos da própolis	24
4.3 Determinações Quantitativas dos Compostos Fenólicos presentes nos Extratos Etanólicos da própolis	25
4.3.1 Determinação de Compostos Fenólicos Totais	25
4.3.2 Determinação de Flavonóides Totais	26
4.3.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reserva (CLAE-FR) dos Extratos Etanólicos da própolis.....	28
4.4 Determinação da Atividade Antimicrobiana dos Extratos Etanólicos da própolis sobre Bactéria Patogênica.....	29
4.4.1 Preparo dos Discos com Extrato Etanólico da própolis	29
4.4.2 Análise da Atividade Antimicrobiana dos Extratos Etanólicos da própolis	30
4.5 Determinação da Capacidade Antioxidante dos Extratos Etanólicos da própolis	30
4.6 Análises Estatísticas	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
5.1 Própolis	32

5.2 Determinações Qualitativas dos Compostos Fenólicos dos Extratos Etanólicos da Própolis.....	40
5.3 Determinações Quantitativas dos Compostos Fenólicos da Própolis	52
5.3.1 Compostos Fenólicos Totais.....	52
5.3.2 Flavonóides Totais.....	56
5.3.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (CLAE-FR).....	60
5.4 Determinação da Atividade Antimicrobiana.....	70
5.4 Determinação da Capacidade Antioxidante	79
5.5 Análises Estatísticas de Correlação entre Compostos encontrados nas Própolis, Capacidade Antioxidante e da Atividade Antimicrobiana	83
6. CONCLUSÃO.....	86
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	87
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
ANEXOS	100
ANEXO 1 - Curva Padrão para Quantificação de Fenólicos Totais	100
ANEXO 2 - Curva Padrão para Quantificação de Flavonóides Totais	100
ANEXO 3 - Curva Padrão para Determinação da Capacidade Antioxidante ..	101
ANEXO 4 - Resultados apresentados em Tabelas	102

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Funções executadas pelas operárias de acordo com idade.....	3
Tabela 2. Compostos identificados em própolis coletadas na região sudeste do Brasil.	7
Tabela 3. Classificação das própolis brasileira, de acordo com suas características físico - químicas e localização.....	9
Tabela 4. Exportação de cera de abelha bruta (cera de abelha; própolis) – Janeiro a Dezembro de 2008 a 2010 *NCM 1521.90.11.....	19
Tabela 5. Bandas de absorção de flavonóides e ácidos fenólicos em solução metanólica em presença de cloreto de alumínio (AlCl ₃).	28
Tabela 6. Comprimento de onda (λ) de absorção máxima, no espectro UV-Visível (200 a 800 nm) dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas em dois apiários do Estado de São Paulo no período de Setembro de 2009 a Agosto de 2010.....	46
Tabela 7. Teor de compostos fenólicos determinados por CLAE-FR de Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas no apiário da cidade de Mogi Mirim no período de Setembro de 2009 a Agosto de 2010	67
Tabela 8. Teor de compostos fenólicos determinados por CLAE-FR de Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas no apiário da cidade de Águas de São Pedro no período de Setembro de 2009 a Agosto de 2010	68
Tabela 9. Atividade Antimicrobiana dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas nas cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro no período de Setembro de 2009 a Agosto de 2010	78
Tabela 10. Análise Estatística de correlação entre os parâmetros avaliados de fenólicos totais, flavonóides totais, artepelin C, capacidade antioxidante e atividade antimicrobiana.....	84

Tabela 11. Conteúdo de composto fenólicos totais (mg EAG /g própolis) de Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas em apiários das cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro no período de Setembro de 2009 a Agosto de 2010	102
Tabela 12. Conteúdo de flavonóides totais (mg quercetina/g própolis) de Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas em apiários das cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro no período de Setembro de 2009 a Agosto de 2010	102
Tabela 13. Capacidade Antioxidante (% Inibição) de Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas em apiários das cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro no período de Setembro de 2009 a Agosto de 2010	103
Tabela 14 Capacidade antioxidante (μ M equivalente Trolox/g própolis) de Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas em apiários das cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro no período de Setembro de 2009 a Agosto de 2010	103

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Coleta da resina de <i>B. dracunculifolia</i> por <i>Apis mellifera</i> para produção da própolis.....	5
Figura 2. Estruturas químicas dos principais flavonóides encontrados na própolis.	8
Figura 3. Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários em plantas.....	12
Figura 4. Etapas básicas para obtenção de princípios ativos de plantas.	17
Figura 5. Localização das cidades de coleta de amostras da própolis no Estado de São Paulo.....	23
Figura 6. Formação do complexo flavonóide - alumínio, em solução metanólica de cloreto de alumínio.	26
Figura 7. Aparência dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas em apiários das cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro nos meses de Setembro de 2009 a Outubro de 2009	33
Figura 8. Aparência dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas em apiários das cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro nos meses de Novembro de 2009 a Janeiro de 2010	34
Figura 9. Aparência dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas em apiários das cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro nos meses de Fevereiro de 2010 a Março 2010.....	35
Figura 10. Aparência dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas em apiários das cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro nos meses de Abril de 2010 a Maio de 2010	36
Figura 11. Aparência dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas coletados nas cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro nos meses de Junho de 2010 a Julho de 2010	37

Figura 12. Aparência dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas em apiários das cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro no mês de Agosto de 2010	38
Figura 13. Espectro de Absorção dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas em apiários das cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro nos meses de Setembro de 2009 a Novembro de 2009.....	41
Figura 14. Espectro de Absorção dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas em apiários das cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro nos meses de Janeiro de 2010 a Março de 2010.....	42
Figura 15. Espectro de Absorção dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas em apiários das cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro nos meses de Abril de 2010 a Junho de 2010.....	43
Figura 16. Espectro de Absorção dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas em apiários das cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro nos meses de Julho de 2010 e Agosto de 2010.....	44
Figura 17. Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência em Fase Reversa dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas das cidades de Mogi Mirim no mês de Setembro de 2009.....	47
Figura 18. Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência em Fase Reversa dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas das cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro nos meses de Outubro de 2009 e Novembro de 2009.....	48
Figura 19. Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência em Fase Reversa dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas das cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro nos meses de Janeiro de 2010 a Abril de 2010	49
Figura 20. Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência em Fase Reversa dos Extratos Etanólicos da própolis de amostras coletadas	

	das cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro nos meses de Maio de 2010 a Agosto de 2010	50
Figura 21.	Compostos Fenólicos Totais (mg EAG /g própolis) dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas da cidade de Mogi Mirim no período de Setembro de 2009 a Agosto de 2010	52
Figura 22.	Compostos Fenólicos Totais (mg EAG /g própolis) dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras da própolis coletadas da cidade de Águas de São Pedro no período de Setembro 2009 a Agosto de 2010	53
Figura 23.	Flavonóides Totais (mg quercetina/g própolis) dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras da própolis coletadas da cidade de Mogi Mirim no período de Setembro 2009 a Agosto de 2010	56
Figura 24.	Flavonóides Totais (mg quercetina/g própolis) dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras da própolis coletadas da cidade de Águas de São Pedro no período de Setembro de 2009 a Agosto de 2010.	57
Figura 25.	Cromatogramas dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas nos apiários das cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro nos meses de Setembro a Outubro de 2009 analisadas por CLAE – FR	61
Figura 26.	Cromatogramas dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas nos apiários das cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro nos meses de Novembro de 2009 a Fevereiro de 2010 analisadas por CLAE – FR	62
Figura 27.	Cromatogramas dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas nos apiários das cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro nos meses de Março de 2010 a Maio de 2010 analisadas por CLAE - FR	63
Figura 28.	Cromatogramas dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas nos apiários das cidades de Mogi Mirim e Águas de São	

	Pedro nos meses de Junho de 2010 a Agosto de 2010 por CLAE – FR	64
Figura 29.	Atividade Antimicrobiana dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas das cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro utilizando-se a linhagem de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, nos meses de Setembro de 2009 e Outubro de 2009.....	72
Figura 30.	Atividade Antimicrobiana dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas das cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro utilizando-se a linhagem de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, nos meses de Novembro de 2009 e Janeiro de 2010	73
Figura 31.	Atividade antimicrobiana dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas das cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro utilizando-se a linhagem de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, nos meses de Fevereiro de 2010 e Março de 2010	74
Figura 32.	Atividade Antimicrobiana dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas das cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro utilizando-se a linhagem de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, nos meses de Abril de 2010 e Maio de 2010	75
Figura 33	Atividade Antimicrobiana dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas das cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro utilizando-se a linhagem de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 nos meses de Junho de 2010 e Julho de 2010.....	76
Figura 34	Atividade Antimicrobiana dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas das cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro utilizando-se a linhagem de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 no mês de Agosto de 2010	77
Figura 35.	Capacidade Antioxidante (% Inibição) dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas da cidade de Mogi Mirim no período de Setembro de 2009 a Agosto de 2010.....	79

Figura 36. Capacidade Antioxidante (% Inibição) dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas da cidade de Águas de São Pedro no período de Setembro de 2009 a Agosto de 2010.....	80
Figura 37. Capacidade Antioxidante (μM equivalente Trolox/g própolis) dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas da cidade de Mogi Mirim no período de Setembro de 2009 a Agosto de 2010	81
Figura 38. Capacidade Antioxidante (μM equivalente Trolox/g própolis) dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas da cidade de Águas de São Pedro no período de Setembro de 2009 a Agosto de 2010	82

NOMENCLATURA/ ABREVIACES

%	=	Porcentagem
°GL	=	Grau Gay Lussac
°C	=	Grau Celsius
A	=	Artepin C
A.C.	=	Antes de Cristo
AC	=	cido cumárico
AF	=	cido ferúlico
AlCl ₃	=	Cloreto de alumínio
APACAME	=	Associa Paulista de Apicultores Criadores de Abelhas Melficas Européia
ATCC	=	American Type Culture Collection
B	=	Bacarina
BHI	=	Brain Heart Infusion
CCDAE-FR	=	Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência em Fase Reversa
CLAE-FR	=	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa
CPI	=	Coletor Própolis Inteligente
D	=	Drupanina
DPPH	=	1,1-difenil-2- picrilidrazil
EAG	=	Equivalente de cido Gálico
EEP	=	Extrato Etanólico da Própolis
g	=	Grama
G12	=	Grupo 12
G13	=	Grupo 13
G6	=	Grupo 6
G9	=	Grupo 9
Km	=	Quilmetro
m	=	Metro
m/m	=	Massa/massa

μg	=	Micrograma
mg	=	Miligrama
MG	=	Minas Gerais
mL	=	Mililitro
mol/L	=	Mol/litro
Nm	=	Nanômetro
<i>P</i>	=	Para
P.A	=	Para Análise
SP	=	São Paulo
Trolox	=	6-hidroxi-2, 5, 7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico
UV	=	Ultravioleta
v/v	=	Volume/volume
β	=	Beta
Λ	=	Lambda
μL	=	Microlitro
μM	=	Micromolar

RESUMO

Própolis é o nome genérico dado ao produto vindo de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas que são coletadas pelas abelhas de flores, brotos e exsudatos de plantas, as quais são transformadas dentro da colméia com adição de cera e pólen (PARK et al., 1998). A própolis é usada pelas abelhas para vedar frestas na colméia, protegê-la e impedir a entrada de insetos invasores. Tem sido alvo de estudo de muitos pesquisadores devido aos seus efeitos antioxidantes, antiinflamatório e antimicrobiano. Essas propriedades biológicas estão ligadas a sua composição química, mais precisamente aos compostos fenólicos que variam em relação a sua estrutura e concentração dependendo da região de produção, disponibilidade de fontes vegetais para coleta de resinas, variabilidade genética da abelha rainha, técnica empregada para produção e época do ano. O Brasil é muito bem visto no mercado externo como produtor da própolis orgânica com características organolépticas de elevado padrão. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a composição química e algumas propriedades biológicas da própolis verde relacionando-as com a influência sazonal. Neste trabalho, as própolis de dois apiários distintos no Estado de São Paulo foram classificadas e avaliadas quanto ao teor de fenólicos totais, flavonóides totais e composição química por meio de CLAE-FR. Além disso, foi avaliada a atividade antimicrobiana e antioxidante em diferentes meses. O conteúdo de fenólicos totais variou de 82 a 155 mg/g da própolis para o apiário localizado em Mogi Mirim, e de 66 a 115 mg/g da própolis para o apiário localizado em Águas de São Pedro. O teor de flavonóides totais variou de 11 a 31 mg/g da própolis para o apiário localizado em Mogi Mirim e de 8 a 18 /g própolis para o apiário localizado em Águas de São Pedro. A maior atividade antibacteriana foi notada com os extratos etanólicos da própolis coletados em Janeiro de 2010, independente do apiário. Sobre a atividade antioxidante, as amostras de Mogi Mirim mostraram melhor capacidade de seqüestrar radicais livres quando comparadas com amostras coletadas em Águas de São Pedro. Foi observada a influência da sazonalidade sobre a composição química quantitativa e atividade biológica da própolis dos dois apiários diferentes localizados no Estado de São Paulo, sendo que a atividade antimicrobiana e

antioxidante variou em função do período de coleta e da sazonalidade local. Como o melhor período de coleta da própolis é durante o verão, isso provavelmente influencia as alterações na concentração de compostos bioativos oriundos das fontes vegetais destas própolis.

Palavras – chave: própolis, sazonalidade, atividade biológica, composição química, flavonóides.

SUMMARY

Propolis is the generic name given to the product obtained from resinous substances, which is gummy and balsamic, and which is collected by bees from flowers, buds and exudates of plants. These substances are transformed by the addition of wax and pollen when into the hive (PARK et al., 1998). Propolis is used by bees to seal cracks in the hive in order to protect and prevent the entry of invasive insects. This substance has been studied by many researchers due to its antioxidant and antimicrobial properties. These biological properties are related to its chemical composition and more specifically to the phenolic compounds that vary in their structure and concentration depending on the region of production, availability of sources to collect plant resins, genetic variability of the queen bee, the technique used for production and the season in which propolis is produced. Brazil is well regarded in the international market as a producer of propolis with organic sensory characteristics of high standard. Therefore, the aim of this study was to evaluate the chemical composition and some biological properties of green propolis relating it to seasonal influence. In this research, the propolis from two different apiaries in the state of São Paulo were classified and evaluated for total phenolic content, total flavonoids and chemical composition by RP-HPLC. In addition, we evaluated the antimicrobial and antioxidant activities in different months. The total phenolic content ranged from 82 to 115 mg/g of propolis at the apiary in Mogi Mirim; and from 66 to 115 mg/g of propolis at the apiary in Águas de São Pedro. The total flavonoid content ranged from 11 to 31 mg/g of propolis at the apiary in Mogi Mirim and from 8 to 18 mg/g of propolis at the apiary in Águas de São Pedro. The highest antibacterial activity was noticed with the ethanol extracts of propolis collected in January 2010 regardless the apiary. Regarding the antioxidant activity, the samples from Mogi Mirim showed better ability to scavenge free radicals when compared to samples collected in Águas de São Pedro. The influence of seasonality on quantitative chemical composition and biological activity propolis from two different apiaries located in the State of São Paulo was observed, so that the antimicrobial and antioxidant activities varied depending on the sampling period and the local seasonality. Finally, since the best period for

collection of propolis is during the summer, this will probably change the concentration of bioactive compounds from these plant sources of propolis.

Keywords: propolis, seasonal, biological activities, chemical composition, flavonoids.

1. INTRODUÇÃO

Com as modificações no estilo de vida, tem-se observado o aumento do número de casos de pessoas com doenças crônicas não-transmissíveis, doenças crônico-degenerativas, assim como, sintomas de cansaço, depressão e irritação que são caracterizados como estresse, decorrentes de fatores dietéticos (qualidade e quantidade de alimentos ingerida inadequadamente), fatores psicológicos e ambientais (ANGELIS, 2001; PADILHA, PINHEIRO, 2004).

Na década de 80 foi lançado no Japão, uma nova concepção sobre alimentos, com o objetivo de desenvolvimento de alimentos saudáveis para uma população que apresentava uma grande expectativa de vida. Surgiu então o conceito de alimentos funcionais, que devem apresentar além das propriedades nutricionais básicas, propriedades benéficas à saúde por conter moléculas biologicamente ativas que desempenham um papel fisiológico no organismo promovendo benefícios específicos à saúde dos indivíduos que os consomem com regularidade (MORAES, COLLA, 2006).

Nesse contexto, os produtos apícolas surgem como uma alternativa na área alimentícia por demonstrarem propriedades terapêuticas (GHISALBERTI, 1979). Esses produtos são conhecidos na medicina tradicional, e de fato apresentam um longo histórico quanto ao seu uso terapêutico (NAKAJIMA et al., 2009).

Própolis é o nome genérico dado à resina, de coloração e consistência variada, coletada pelas abelhas da espécie *Apis mellifera* de diferentes partes das plantas como broto, botões florais e também exsudados resinosos, sendo transportados para dentro das colméias (GHISALBERTI, 1979). No Brasil, as própolis foram classificadas em 12 grupos distintos, de acordo com suas características físico-químicas (PARK, et al., 2000). Atualmente foi descoberto um novo grupo, classificado como grupo 13 (G13), encontrado na região Nordeste do Brasil (DAUGSCH et al., 2008).

Entre os tipos da própolis produzida no Brasil, a própolis verde classificada como grupo 12 (G12) tem conquistado a preferência no mercado mundial por apresentar facilidade ao ser triturada (SALATINO et al., 2005), e também por suas propriedades terapêuticas. Sua composição química é complexa e variada, estando intimamente relacionada com a ecologia da flora de cada região visitada pelas abelhas.

Considerando a biodiversidade de diferentes regiões geográficas do Brasil e que fatores como chuva e variações de temperatura afetam a composição química, investigações sobre a variação sazonal são importantes não só para interesse acadêmico, mas também para padronização química e biológica de um determinado tipo da própolis (SIMÕES-AMBROSIO et al., 2010).

Os efeitos terapêuticos da própolis são atribuídos aos diversos compostos fenólicos encontrados em resinas e exsudatos de vegetais. Destes, os flavonóides podem ser considerados os principais compostos, encontrando-se ainda, alguns ácidos fenólicos e seus ésteres, aldeídos fenólicos, alcoóis e cetonas (PARK et al., 2000).

Considerando-se que a procura pela própolis tem crescido nos últimos anos, principalmente pelo interesse da população para os chamados produtos naturais, o levantamento de dados que contribuam para o conhecimento de fatores que possam interferir na qualidade do produto, são de suma importância.

Diante do exposto, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da sazonalidade sobre a composição química e algumas propriedades biológicas da própolis do grupo 12, de dois apiários no Estado de São Paulo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Abelhas

As abelhas são insetos sociais, vivem em colônias organizadas sendo que cada membro da colméia desempenha uma função. A colméia é composta por uma abelha rainha, 5.000 a 100.000 abelhas operárias, 0 a 400 zangões (PEREIRA et al., 2003).

A Tabela 1 ilustra as funções das abelhas operárias na colméia de acordo com a idade, sugeridas por PEREIRA et al.(2003).

Tabela 1. Funções executadas pelas operárias de acordo com idade.

Período	Função
1° ao 5° dia	Limpeza dos alvéolos
5° ao 10° dia	Nutrizes – alimentação das larvas em desenvolvimento
11° ao 20° dia	Produção de favo e mel
18° ao 21° dia	Defesa da colméia e controle da temperatura
22° até morte	Campeira – coleta pólen, néctar, resinas e água

A área de vôo de uma abelha *Apis mellifera* pode abranger um raio de 4 - 5 Quilômetros (Km) em torno da colméia sendo que as abelhas campeiras coletam pólen e néctar para alimentação assim como resina para a própolis. Não se conhece os fatores que direcionam a preferência das abelhas coletoras de resina por uma determinada fonte vegetal, sabe-se apenas que elas são seletivas nesta coleta (MENEZES, 2005).

2.2 Própolis

Ao longo da história, o homem tem domesticado as abelhas e feito o uso de seus produtos por apresentarem propriedades aplicáveis à saúde humana (BURDOCK, 1998). O uso da própolis apresenta relatos de uso há pelo menos 300 A.C. quando suas qualidades resinosas e gomosas foram utilizadas (GHISALBERTI, 1979). Seu emprego já era descrito pelos assírios, gregos, romanos, incas e egípcios. No antigo Egito (1700 A.C., “cera negra”) era utilizada como um dos materiais para embalsamar os mortos (PEREIRA et al., 2002). No início do século passado quando os estudos começaram, os trabalhos concentraram-se sobre composição química, propriedades farmacológicas e preparações comerciais.

Própolis é o nome genérico dado ao produto vindo de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas, coletadas pelas abelhas de brotos, flores e exsudados de plantas e misturados com cera e pólen (PARK et al., 1998).

A própolis é usada pelas abelhas para selar as colméias, proteger contra invasores externos e mumificação da carcaça de outras abelhas ou outros pequenos animais que tenham morrido dentro da colméia (MENEZES, 2005; XU et al., 2009).

A Figura 1 ilustra a coleta de exsudatos de brotos de *Baccharis dracunculifolia* pela abelha *Apis mellifera*, transporte de material para a colméia para a produção da própolis.

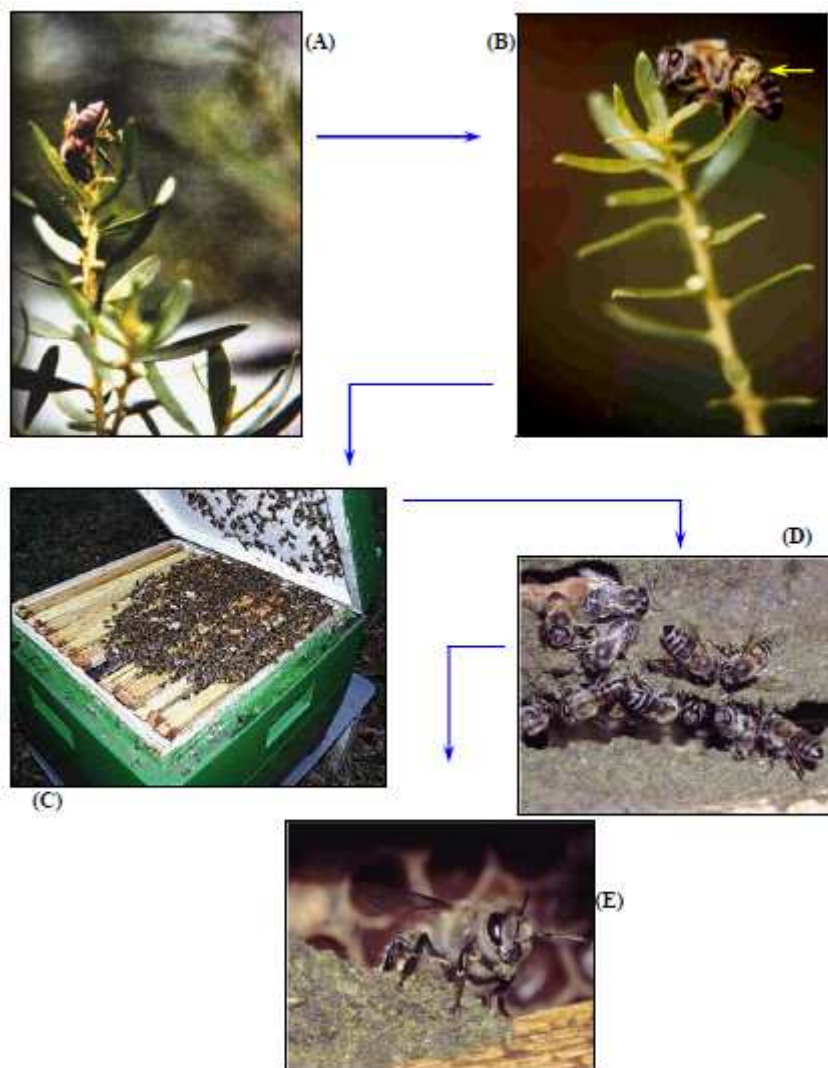


Figura 1. Coleta da resina de *B. dracunculifolia* por *Apis mellifera* para produção da própolis.

(A) *Apis mellifera* coletando ápices foliares de *B. dracunculifolia*; (B) abelha guardando o material coletado dentro de suas corbículas, nas patas; (C) em seguida o material será transportado para a colméia; (D) na colméia o material é misturado com a secreção salivar para a formação da própolis (E) deposição da própolis verde nas frestas da colméia.

(Fonte: SOUZA, 2007)

2.3 Composição química da Própolis

Alguns compostos fenólicos estão presentes em todas as amostras, enquanto outros ocorrem somente em própolis coletadas de espécies particulares de plantas. Pelo menos 200 componentes diferentes já foram identificados em amostras da própolis de origens diversas, dentre esses, ácidos graxos e fenólicos, ésteres, ésteres fenólicos, flavonóides (flavonas, flavononas, flavonóis, dihidroflavonóis, etc.), terpenos, β -esteróides, aldeídos e alcoóis aromáticos, sesquiterpenos e naftaleno (VARGAS et al., 2004).

Os compostos fenólicos são originados do metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução, além disso, são formados em condições de estresse como infecções, ferimento, radiações UV, dentre outras (ANGELO, JORGE, 2007).

Os compostos fenólicos são definidos quimicamente como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. Dentre os compostos fenólicos existentes destacam-se os flavonóides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis (ANGELO, JORGE, 2007).

Alguns dos flavonóides e ácidos fenólicos encontrados na própolis são: flavonóis entre eles camferol, quercetina, isorramnetina e galangina; as flavonas apigenina, luteolina, crisina e tectocrisina; flavanona pinocembrina e diidroflavonol pinobancsina. Já os ácidos fenólicos mais comuns são ácido ferúlico, ácido cafeíco, ácido gálico, ácido cumárico (MARCUCCI, WOISKY, SALATINO, 1998).

A Tabela 2 mostra alguns compostos que foram identificados em própolis coletadas na região sudeste do Brasil.

Tabela 2. Compostos identificados em própolis coletadas na região sudeste do Brasil.

Autor/Ano	Região	Compostos
MARCUCCI et al.(2000)	Sudeste	Ácido caféico Ácido – p – cumárico Ácido ferúlico Pinobanksina Derivado kaempferol Cinco outros compostos fenólicos
TAZAWA et al. (1998)	Minas Gerais	Isosakuranetina Pinocembrina Dihidrokamferide Kamferide Betuletol
PEREIRA et al. (1998)	Rio de Janeiro	Ácido cinâmico, benzóico Kamferide Betuletol
BOURDOROVA – KRASTEVA et al.(1997) BANKOVA et al. (1998)	São Paulo	Kamferide 2 derivados do ácido cinâmico Ácido cumárico Aromadendrina – 4'-metileter 5,6,7-triidroxi-3,4'-dimetoxiflavona Ácido ferúlico

A Figura 2 ilustra as principais estruturas químicas de alguns compostos fenólicos encontrados na própolis.

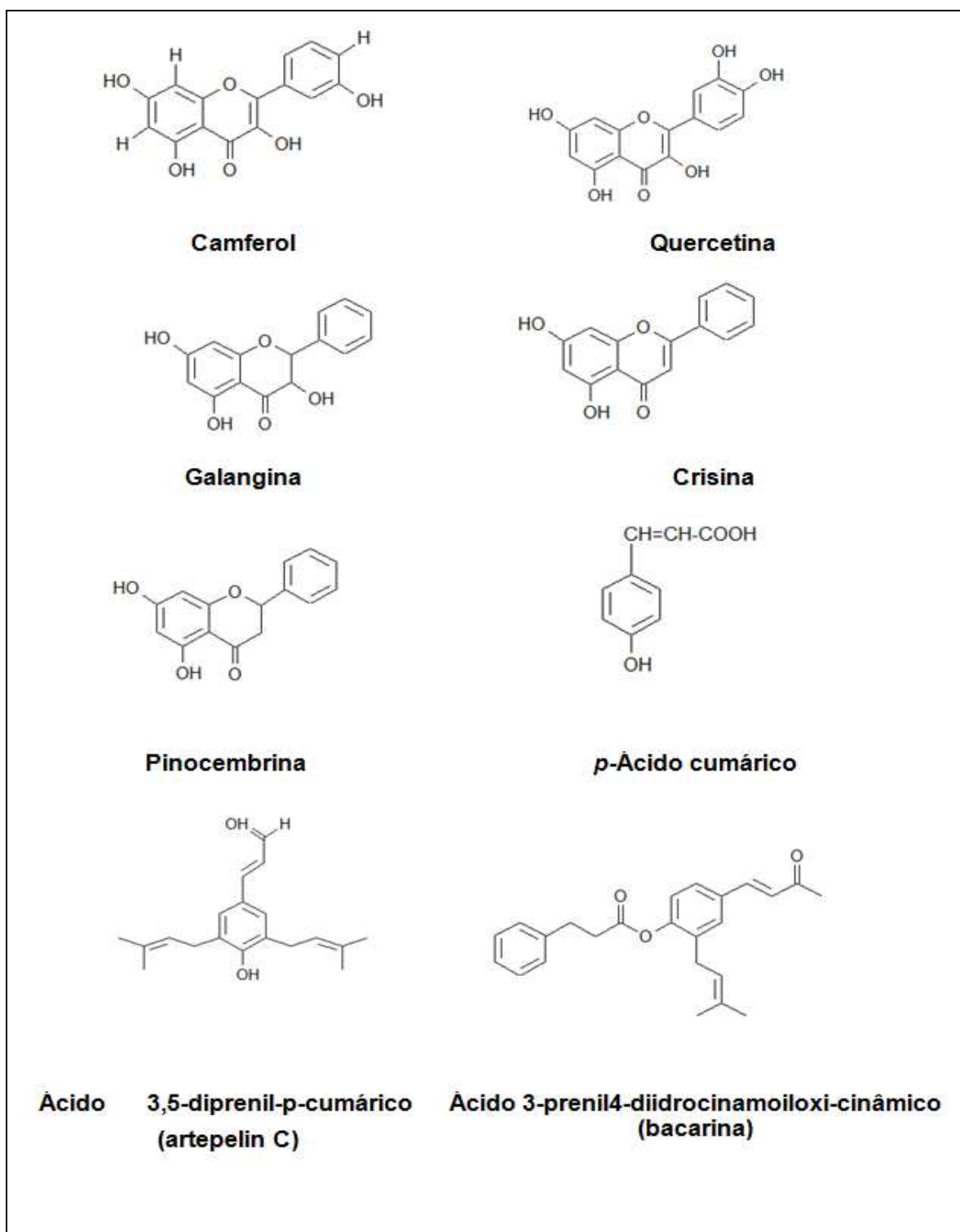


Figura 2. Estruturas químicas dos principais flavonóides encontrados na própolis.

2.4 Classificação das Própolis brasileiras

PARK et al. (2000) e DAUGSCH et al. (2008) relataram que cerca de 500 amostras da própolis foram coletadas em todo o território brasileiro exceto na região Norte, para a classificação das própolis brasileiras de acordo com as características físico-químicas e localização. Até o momento foram classificados 13 grupos da própolis e pesquisas devem ser realizadas em busca da própolis com novas características, já que o Brasil é um país com vasto território e com uma rica biodiversidade.

Na Tabela 3 encontra-se a classificação das própolis brasileiras, de acordo com suas características físico-químicas e localização.

Tabela 3. Classificação das própolis brasileira, de acordo com suas características físico - químicas e localização.

Grupos	Extrato Etanólico da Própolis		
	Cor	Substâncias Solúveis (%)	Origem da Própolis
Grupo 1 (RS5)	Amarelo	63,0	Região Sul
Grupo 2 (RS1)	Castanho Claro	57,5	Região Sul
Grupo 3 (PR7)	Castanho Escuro	65,0	Região Sul
Grupo 4 (PR8)	Castanho Claro	54,5	Região Sul
Grupo 5 (PR9)	Marrom Esverdeado	58,7	Região Sul
Grupo 6 (BA11)	Marrom Avermelhado	45,9	Região Nordeste
Grupo 7 (BA51)	Marrom Esverdeado	43,8	Região Nordeste
Grupo 8 (PE5)	Castanho Escuro	41,3	Região Nordeste
Grupo 9 (PE3)	Amarelo	46,7	Região Nordeste
Grupo 10 (CE3)	Amarelo Escuro	24,1	Região Nordeste
Grupo 11 (PI11)	Amarelo	23,1	Região Nordeste
Grupo 12 (SP12)	Verde ou Marrom Esverdeado	61,0	Região Sudeste

(Fonte: PARK et al., 2000)

PARK et al. (2000), observaram que fatores como a ecologia vegetal da região onde a própolis foi coletada, a variabilidade genética das rainhas, locais e época de coleta e a técnica empregada para produção (tipos de coletores), influenciam nas propriedades físicas, químicas e biológicas da própolis.

2.5 Origem vegetal da Própolis

No Brasil, existem diversas espécies vegetais para a retirada de resina. No entanto, poucas foram às espécies identificadas até o momento. As plantas assa-peixe, aroeira, alecrim e eucalipto são alguns exemplos de vegetais onde as abelhas buscam a matéria-prima para produção da própolis (PARK et al., 2000). O melhor indicador da origem botânica da própolis é a análise da sua composição química comparada com a provável fonte vegetal. A determinação da origem geográfica aliada à fenologia da planta hospedeira é um aspecto importante no controle de qualidade e até mesmo na padronização das amostras da própolis para uma efetiva aplicação terapêutica (PARK et al., 2002).

PARK et al. (2004) realizaram um estudo onde foi possível determinar quantitativamente e qualitativamente a origem botânica da própolis do G12 através da comparação dos compostos separados por CLAE-FR com padrões autênticos de compostos fenólicos e flavonóides. Os autores concluíram que *Baccharis dracunculifolia* é a origem botânica para a própolis do G12 sendo assim a principal fonte natural da própolis verde. A espécie é conhecida popularmente como “vassorinha-campo” podendo ser encontrada nas regiões Sul e Sudeste do Brasil sendo também encontrada no cerrado Mato-Grossense. Germinam mais eficientemente em regiões com presença de luz, o que indica que a planta necessita de luminosidade (PEGORINI et al., 2008). Algumas folhas contêm secreções voláteis e óleos voláteis, conferindo aroma típico da própolis verde. Os óleos voláteis presentes nas folhas da espécie *Baccharis dracunculifolia* é extraído e vendido com o nome de óleo de vassoura (SALANTINO, et al., 2005).

2.6 Sazonalidade

As variações sazonais devem ser consideradas para a escolha da melhor época de coleta da própolis para obtenção de um produto com maior concentração de compostos bioativos. A variação sazonal também fornece informações sobre as fontes vegetais da própolis possibilitando a alteração da vegetação ao redor das colméias para otimização da produção e obtenção de maior concentração de compostos bioativos da própolis (BANKOVA et al., 1998).

O estudo da influência da sazonalidade sobre a composição química e sobre as atividades biológicas da própolis ainda é uma questão em aberto para a comunidade científica já que são poucos os trabalhos realizados nessa área.

As abelhas oriundas do hemisfério Norte coletam própolis somente no verão incluindo o final da primavera e início do outono totalizando aproximadamente quatro meses. Considerando que nos meses de frio intenso as abelhas não saem das colméias para coletar material para a produção da própolis, não é relevante a investigação sobre a variação sazonal em relação à composição química nestas regiões (BANKOVA et al., 1998).

Entretanto no Brasil, a coleta da própolis é realizada durante todo ano, devido ao clima tropical, sendo que a oscilação de temperatura (baixa e alta) não é extrema, possibilitando que as abelhas saiam da colméia para coleta de material para produção da própolis.

Os fatores responsáveis pelo acúmulo de metabólitos secundários que alteram a composição química da própolis podem ser visualizados na Figura 3. Dentre eles se destacam índice pluviométrico, radiação UV, ritmo circadiano, composição atmosférica, herbivoria e ataque de patógenos, idade da planta, temperatura e altitude.

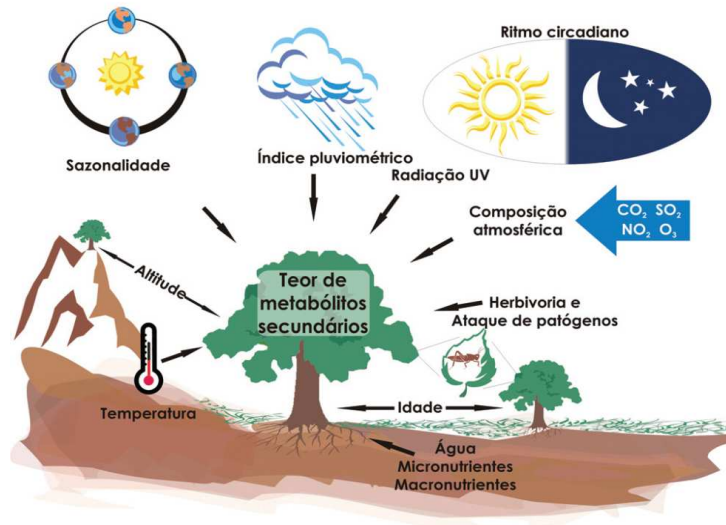


Figura 3. Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários em plantas.

(Fonte: GOBBO-NETO, LOPES, 2007)

BANKOVA et al. (1998) estudaram os efeitos das variações sazonais na composição química da própolis brasileira, de duas subespécies de abelhas, a *Apis mellifera* africanizada e a *Apis mellifera ligustica* européia. Os principais componentes das amostras das própolis foram os compostos fenólicos, especialmente os derivados do ácido cinâmico, em que houve predominância dos diterpenos na amostra obtida no outono, produzida da subespécie de *Apis mellifera ligustica*. Nas própolis produzidas pelas duas subespécies de abelhas os diterpenos foram identificados atingindo seu percentual máximo no outono e estavam ausentes durante as outras estações. Os autores concluíram que as duas subespécies coletavam resinas do mesmo grupo de plantas para a produção da própolis e que essas fontes deveriam ser identificadas para melhor correlação.

SFORCIN et al. (2000) estudaram o efeito da sazonalidade na atividade antibacteriana da própolis brasileira. Observaram *in vitro* a atividade antimicrobiana das própolis coletadas nas quatro estações, sobre microorganismos isolados de infecções humanas. Verificaram que o crescimento de

bactérias Gram - positivas é inibido em baixas concentrações da própolis enquanto bactérias Gram – negativas são menos susceptíveis. Não houve diferença estatística significativa em relação ao efeito sazonal na própolis e na curva de sobrevivência de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, e observaram apenas a ação antimicrobiana eficaz contra as bactérias Gram – positivas.

SANTOS et al. (2003) analisaram amostras da própolis brasileira, os autores estudaram as propriedades físico-químicas, origem vegetal e atividade antibacteriana em periodontopatógenos. As amostras foram coletadas em estação seca e estação chuvosa em um apiário localizado no cerrado brasileiro. Não foram observadas diferenças significativas no perfil de compostos fenólicos e nas concentrações de flavonóides totais nas amostras coletadas em diferentes estações. No teste de atividade antibacteriana, as 16 cepas de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* testadas foram inibidas pela própolis nas concentrações de 0,1% a 0,25%. Os autores concluíram que não houve efeito da sazonalidade sobre a atividade inibitória da própolis.

CASTRO et al. (2007) estudaram a influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica da própolis da região sudeste e nordeste do Brasil. Concluíram que, ao longo dos períodos de safra apícola estudados, a sazonalidade influenciou a atividade antibacteriana das própolis da região sudeste e nordeste, devido à alteração na concentração de compostos bioativos oriundos das fontes vegetais destas própolis demonstrando assim que a atividade antibacteriana pode variar em função do período de coleta e da sazonalidade local.

TEIXEIRA et al. (2010) estudaram a variação sazonal, composição química e atividade antioxidante de amostras das própolis brasileiras de três localidades do Estado de Minas Gerais. Foram encontrados altos teores de compostos fenólicos e alta atividade antioxidante nas amostras do município de Itapeçerica e Paula Cândido. Na amostra coletada no município de Virgíópolis não foi detectada a presença de compostos fenólicos e não foi exibida nenhuma atividade

antioxidante. Foi observada uma variação considerável no total de substâncias fenólicas e atividade antioxidante nas amostras coletadas mensalmente, em Itapeçerica no período de um ano. Não houve correlação entre a atividade antioxidante e o conteúdo de fenólicos totais, e entre a atividade antioxidante e teor de artepelin C.

SIMÕES – AMBROSIO et al. (2010) avaliaram o papel da sazonalidade na produção de alguns compostos bioativos e o efeito dessas própolis sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos a partir de amostras coletadas mensalmente, no período de Novembro de 2001 a Outubro de 2002 na cidade de Cajuru - MG. Os perfis apresentados por CLAE dos extratos das amostras da própolis foram bastante semelhantes, mas houve uma grande variação em termos de perfil quantitativo. Observaram a possibilidade da aromadendrina 4'-metil-éter e da bacarina desempenharem um papel essencial na atividade antioxidante, enquanto que o artepelin C não seria muito importante para este efeito. Os extratos que apresentaram maior atividade antioxidante foram produzidos em Maio, Junho e Agosto, e não apresentaram citotoxicidade em 25 µg/mL. A quercetina foi utilizada como controle e não foi tóxica para os neutrófilos na concentração de 8,5 µg/mL.

SOUZA et al. (2010) avaliaram o efeito da sazonalidade sobre algumas características físico-químicas dos extratos alcoólicos da própolis obtida mensalmente, durante um ano, por diferentes técnicas em colméias de abelhas *Apis mellifera* africanizada. De acordo com os resultados obtidos os autores concluíram que as propriedades físico-químicas analisadas não foram influenciadas pelo tipo de coletor utilizado para produção da própolis e pela sazonalidade.

Nos estudos realizados por BANKOVA et al. (1998); SFORCIN et al. (2000); SANTOS et al. (2003); SOUZA et al. (2010) a sazonalidade foi avaliada por estação climática e não mensalmente. Dessa forma não foi possível observar a influência da sazonalidade sobre as propriedades físico-químicas, composição química e atividade antibacteriana das própolis.

Nos estudos realizados por CASTRO et al. (2007); TEIXEIRA et al. (2010); SIMÕES-AMBROSIO et al. (2010) a influência da sazonalidade foi avaliada

mensalmente sendo possível verificar a variação que ocorre quanto ao teor de compostos fenólicos, atividade antibacteriana e atividade antioxidante das própolis.

A variação sazonal pode levar a diminuição de alguns componentes biologicamente ativos, como no caso dos compostos fenólicos, e ao aumento de outros, por exemplo, ácidos diterpênicos. Assim pode-se estimar que algumas atividades biológicas, relacionadas a estes compostos (antibacteriana e antifúngica) sejam similares em diferentes estações do ano (NUNES et al., 2009). Até o momento não foi esclarecido à razão pela qual a sazonalidade tem influência sobre a composição química da própolis (XU et al., 2009).

2.7 Métodos de Extração da Própolis

O método de extração e o solvente utilizado é outro fator que pode alterar a composição química final. Muitos produtos comerciais, como, comprimidos, cápsulas, ampolas e xaropes são confeccionados a partir da extração da própolis com álcool etílico. O metanol é apenas utilizado para fins de pesquisa. Algumas variedades da própolis apresentam solubilidade em água, dessa forma a extração em água também deve ser considerada para estudo (XU et al., 2009).

MELLO (2008) estudou uma técnica de concentração do extrato da própolis utilizando nanofiltração já que o uso da solução alcoólica apresenta o inconveniente de deixar sabor residual. Os resultados obtidos foram positivos, já que houve grande retenção de flavonóides sendo de aproximadamente 100% para solução aquosa e 94% para solução alcoólica, tornando o processo viável e promissor para uso industrial.

2.8 Efeitos Terapêuticos da Própolis

Os efeitos terapêuticos têm sido atribuídos aos diversos compostos fenólicos que compõem a própolis e que estão largamente distribuídos no reino vegetal, sendo os responsáveis pela atividade biológica e farmacológica (PARK et

al., 2000; CHAILLOU, NAZARENO, 2009). Os compostos químicos mais conhecidos e suas respectivas atividades biológicas são: quercetina que apresenta atividade imunomodulatória e antitumoral (ORSOLÍC et al., 2004); canferide que mostra atividade antioxidante (SALATINO et al., 2005); pinobancsina; ácido cumárico; apigenina; pinocembrina; crisina; galangina; ácido ferúlico; ácido caféico (CA) que apresentam atividade imunomodulatória e antitumoral (ORSOLÍC et al., 2004).

O artepelin C é o ácido 3,5 – diprenil – p – cumárico, o maior constituinte (> 5%) da própolis brasileira (NAKANISHI et al., 2003) que tem como fonte de compostos de origem vegetal a planta *Baccharis dracunculifolia* (MARCUCCI et al., 2001; PARK et al., 2004). Esse composto apresenta atividade antimicrobiana (SALOMÃO et al., 2004), antitumoral (KIMOTO et al., 1996, 2000, 2001 a, b; SHIMUZI et al., 2005; ORSOLIC et al., 2006), indutor de apoptose (MATSUNO et al., 1997; PAREDES-GUZMÁN et al., 2003), imunomodulador (KIMOTO et al., 1998; GEKKER et al., 2005) e antioxidante (HAYASHI et al., 1999; NAKANISHI et al., 2003; SIMÕES et al., 2004).

As propriedades terapêuticas abrem possibilidade de aplicação da própolis tanto na indústria farmacêutica quanto alimentícia (PARK et al., 2000). Diversos produtos contendo própolis vêm sendo comercializados em todo o mundo, principalmente no Japão, tais como balas, chocolates, doces, xampus, cremes para pele, soluções anti-sépticas, pastas de dente, entre outras como um ingrediente funcional (PARK et al., 2000; SOUZA et al., 2007).

O isolamento de compostos abre a possibilidade do desenvolvimento de produtos farmacêuticos sofisticados. Exemplo disso é o Artepelin C que já foi citado anteriormente em relação as suas propriedades biológicas (SALATINO et al., 2005). No entanto, os compostos presentes na própolis apresentam-se em quantidades e formas diferentes dificultando, assim, sua padronização. Alguns compostos não se mostram eficientes em relação a sua atividade biológica, devendo assim visar à separação e purificação dos compostos que possam apresentar algum tipo de atividade biológica eficaz. Além dos efeitos individuais

dos constituintes, pode existir efeito sinérgico entre os compostos, conferindo assim diferentes atividades farmacológicas sendo necessário mais estudos detalhados (XU et al., 2009).

Apenas os compostos presentes em maior concentração são geralmente isolados e estudados. A análise de substâncias ativas é muito mais complexa e longa, já que geralmente os compostos presentes em menor proporção na planta são os que apresentam melhores efeitos biológicos (CECHINEL FILHO, YUNES, 1998). Na Figura 4 observam-se as etapas básicas que podem ser seguidas quando se procura obter princípios ativos de plantas.

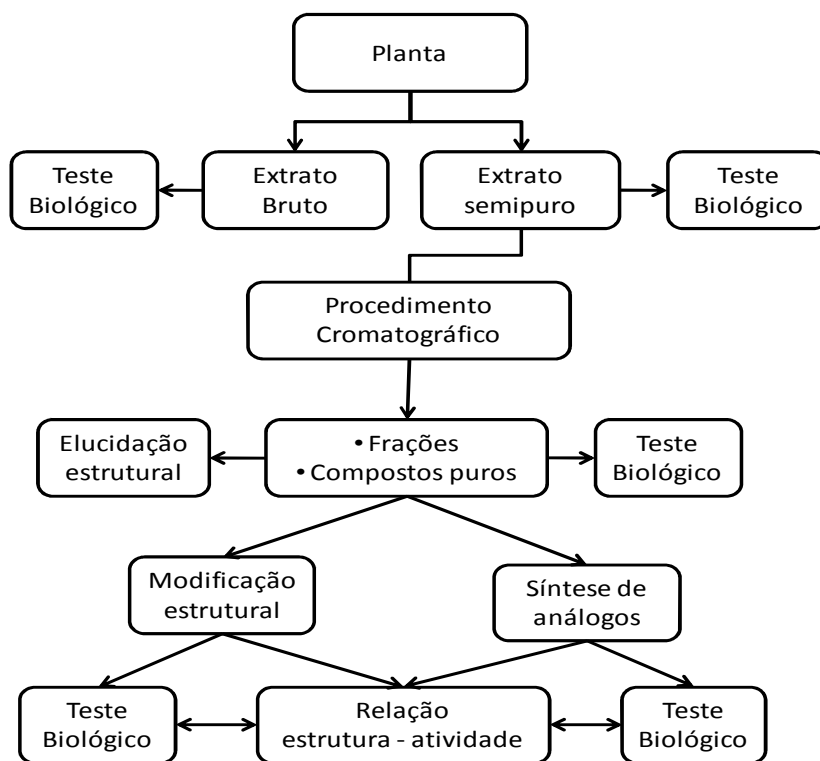


Figura 4. Etapas básicas para obtenção de princípios ativos de plantas.

(Fonte: CECHINEL FILHO, YUNES, 1998)

2.9 Importância Econômica da Própolis

Grande parte da população, residente em países orientais reconhece a própolis como uma alternativa natural tendo como significado nutrição e cuidado com a saúde, manifestando grande interesse na importação da própolis brasileira.

Estudos sobre a produção apícola no Brasil mostram dados contraditórios quanto ao número de apicultores e colméias, produção e produtividade (PEREIRA et al., 2003).

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

Segundo dados de exportação (Tabela 4), observam - se que o Estado de Minas Gerais seguido do Estado de São Paulo são os principais Estados exportadores de cera de abelha bruta na qual a própolis é contabilizada. Vale lembrar que esses dados não possibilitam uma análise mais precisa do mercado de cera de abelha e da própolis, por, muitas vezes, comportarem produtos distintos sob a mesma classificação.

Tabela 4. Exportação de cera de abelha bruta (cera de abelha; própolis) – Janeiro a Dezembro de 2008 a 2010 *NCM 1521.90.11.

Estado	2008		2009		2010	
	US\$	Peso (Kg)	US\$	Peso (Kg)	US\$	Peso (Kg)
Minas Gerais	85.047	1.400	99.687	1.612	185.200	2.475
Paraná					12.000	100
Piauí	6.614	1.000	3.203	500		
Rio Grande do Sul	1.958	98	1.302	6		
São Paulo			34.237	330	45.104	283
Não Declarada	20.779					
Total	114.398	376	138.429	2.448	242.304	2.858
Total – Brasil US\$/Kg	39,80		56,55		84,78	

(Fonte: SEBRAE, 2010)

Em todo o mundo, principalmente o Brasil e Japão registra-se um aumento significativo no consumo de extrato da própolis, devido às suas características funcionais (DIAS, 2007). O consumo está estimado em cerca de 700 - 800 toneladas por ano (SILVA et al., 2006).

2.10 Legislação

O grande potencial do uso da própolis tem aumentado o interesse no controle de qualidade e padronização das preparações (ALMEIDA - MURADIAN, 2008).

No Brasil, os produtos apícolas são registrados no Ministério da Agricultura e apresentam legislações específicas. É utilizado o (Instrução Normativa nº3 de 19 de janeiro de 2001).

A própolis é classificada quanto ao seu teor de flavonóides: baixo teor (até 1,0% m/m), médio teor (entre 1,0 e 2,0%) e alto teor (acima de 2,0%). Deve possuir aroma característico (balsâmico e resinoso); cor variando entre amarelada,

parda, esverdeada, marrom e outras; sabor característico variando de suave balsâmico a forte picante; e sua consistência à temperatura ambiente deve estar entre maleável e rígida.

As variações em suas características se devem à dependência da origem botânica. Deve apresentar granulometria heterogênea e os seguintes requisitos físico-químicos:

- Perda por dessecação: máximo 8,0% (m/m);
- Cinzas: máximo 5,0% (m/m);
- Cera: máximo 25% (m/m);
- Compostos fenólicos: mínimo 5,0% (m/m);
- Flavonóides: mínimo 0,5% (m/m);
- Atividade de oxidação: máximo de 22 segundos;
- Massa mecânica: máximo 40% (m/m);
- Solúveis em etanol: mínimo 35% (m/m).

No teste de espectro de absorção de radiações ultravioleta e visível, a própolis deverá apresentar picos característicos das principais classes de flavonóides entre 200 e 400 nm.

A própolis por ser um produto natural e apresentar variação na sua composição decorrente de fatores ambientais e apresenta resistência quanto a sua utilização.

Nem todos os países têm legislação própria. No Brasil, onde há legislação específica, são estabelecidos os limites, porém os métodos de análise não são definidos (ALMEIDA - MURADIAN, 2008).

O controle de qualidade deve garantir que o extrato etanólico da própolis tenha a quantidade suficiente de compostos bioativos para promover um efeito fisiológico positivo sobre a saúde dos indivíduos que os consome.

3. OBJETIVOS

Objetivo Geral

O objetivo geral do trabalho foi o estudo da própolis verde de dois apiários do Estado de São Paulo, com o intuito de se verificar a influência da sazonalidade sobre a composição química e algumas propriedades biológicas.

Objetivos Específicos

- Classificar as amostras de acordo com sua origem botânica e suas características físico-químicas;
- Identificar e quantificar as frações de flavonóides presentes nas amostras da própolis provenientes de dois apiários do Estado de São Paulo, mensalmente, durante um ano;
- Avaliar a atividade antimicrobiana e a capacidade antioxidante;
- Verificar a influência da sazonalidade sobre a composição química e atividade biológica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Própolis

4.1.1 Coleta das amostras da própolis

Para a escolha dos locais de coleta das amostras, foi realizado um levantamento dos apiários existentes no Estado de São Paulo por meio do site de busca online Google utilizando como palavras-chave: apiários, Estado de São Paulo. A Associação Paulista de Apicultores Criadores de Abelhas Melífica Européias (APACAME) não possui um mapeamento dos apiários existentes no Estado de São Paulo, porém constam 7.410 apicultores registrados na associação.

Dos apiários encontrados através do site de busca online, foi feito contato com dez apicultores, dos quais apenas dois mostraram interesse e aceitaram participar da pesquisa.

O material foi coletado diretamente nos apiários (mensalmente, totalizando um ano de coleta), raspando-se a própolis produzida nas fendas entre a parte inferior da tampa e a melgueira superior da colméia. Após a raspagem, o material coletado foi acondicionado em sacos plásticos devidamente etiquetados e armazenado em refrigerador (4°C) até o momento da sua utilização como descrito por IKEGAKI, 2001.

Foram coletadas 66 amostras da própolis bruta de duas regiões do Estado de São Paulo localizadas na cidade de Mogi Mirim (referente à coordenada UTM - 202492E, 7495838N; altitude 632m) e Águas de São Pedro (referente à coordenada UTM - 305448E, 7515862N; altitude 470m), sendo que as cidades encontram-se distantes - 150 Km uma da outra como se pode observar na Figura 5.

O total de caixas com colméias presentes nos locais de coleta foram dezoito em Mogi Mirim e dez em Águas de São Pedro. Foram escolhidas três caixas de forma aleatória para o estudo. A coleta foi realizada diretamente nos

apiários, onde foi feita a identificação de cada caixa, de modo que fosse possível o retorno em cada colméia durante o período de coleta.



Figura 5. Localização das cidades de coleta de amostras da própolis no Estado de São Paulo.

4.1.2 Tratamento das amostras da própolis Bruta

Antes do manuseio, as amostras foram examinadas para a retirada de eventuais impurezas como pedaços de madeira, abelhas mortas e cera para a obtenção de amostras mais puras como sugerido por KOO, 1996.

4.1.3 Preparo dos Extratos Etanólicos da própolis (EEP)

Segundo metodologia descrita por PARK et al. (1998) as amostras da própolis bruta foram trituradas em almofariz. Amostras de um grama foram transferidas para tubos de centrifuga com tampa contendo 12,5 mL de etanol 80% (Etanol, P.A., 99,5°GL - Ecibra Cetus Ltda – São Paulo - Brasil). A extração foi realizada em banho-maria (Polyscience – Estados Unidos da América) à 70°C por 30 minutos com agitação a cada 5 minutos. Após a extração as amostras foram

centrifugadas (Beckman Coulter Allegra X-22R – Estados Unidos da América) a $7.100 \times g$ por 10 minutos a 5°C . Os sobrenadantes obtidos foram armazenados em tubos de ensaio com tampa de rosca, em refrigerador (4°C).

4.2 Determinações Qualitativas dos Compostos Fenólicos presentes nos Extratos Etanólicos da própolis

4.2.1 Determinação do Espectro de Absorção dos Extratos Etanólicos da própolis (UV – Scanning)

A metodologia utilizada foi de acordo com PARK et al. (1998) onde os Espectros de Máxima Absorção dos Extratos Etanólicos da Própolis (EEP) foram determinados na faixa de 200 a 800 nm (Beckman Coulter modelo DU 640 – Estados Unidos da América). Misturas de $6 \mu\text{L}$ do EEP preparados conforme item 4.1.3 com 15 mL de etanol 80% (Etanol, P.A., $99,5^{\circ}\text{GL}$ - Ecibra Cetus Ltda – São Paulo - Brasil) foi preparado para posterior medição.

4.2.2 Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência em Fase Reversa dos Extratos Etanólicos da própolis

De acordo com PARK et al. (2002) alíquotas de $3 \mu\text{L}$ dos EEP preparados conforme item 4.1.3 foram aplicadas em placas de RP18F₂₅₄S (Merck - Alemanha) de 0,2 mm de espessura (10X10cm). Como fase móvel foi empregada etanol/água (55:45, v/v) (Etanol, P.A., $99,5^{\circ}\text{GL}$ - Ecibra Cetus Ltda – São Paulo - Brasil). A fase móvel foi deixada na cuba por 10 minutos para saturação da mesma e posteriormente iniciou-se a corrida cromatográfica. O tempo de corrida foi de 100 minutos. Após a corrida a placa foi seca com o auxílio de um secador e então exposta à luz ultravioleta em uma lâmpada UV Cole Parmer (UVP-UVGL – 58 – CA – Estados Unidos da América) no comprimento de onda de 366 nm para observação das bandas e fotografia das placas. O perfil de compostos separados por Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência foi utilizado para auxiliar

a classificação das amostras das própolis quanto ao grupo como proposto por PARK et al. (2000).

4.3 Determinações Quantitativas dos Compostos Fenólicos presentes nos Extratos Etanólicos da própolis

4.3.1 Determinação de Compostos Fenólicos Totais

A determinação de compostos fenólicos totais foi feita conforme descrito por WOISKY, SALATINO (1998) através do método espectrofotométrico utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu e ácido gálico como padrão (ANEXO 1). Os compostos fenólicos totais foram expressos como equivalente de ácido gálico (mg EAG/g própolis. Os EEP foram diluídos 1:10 e uma alíquota de 0,1 mL foi transferida para um tubo. Em seguida foram adicionados 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu concentrado (EEL – São Paulo - Brasil). Após 5 minutos de repouso foram adicionados 1,5 mL de solução 20% de carbonato de sódio (Merck - Alemanha) e o volume final completado para 10 mL com 7,9 mL de água destilada. Os tubos foram deixados em repouso por 2 horas no escuro total. No tubo branco foi adicionado etanol 99,5% (Ecibra Cetus Ltda – São Paulo - Brasil) no lugar do EEP e no tubo controle o reagente de Folin-Ciocalteu foi substituído por etanol P.A., 99,5° GL (Ecibra Cetus Ltda – São Paulo - Brasil). A absorbância das amostras foi medida a 740 nm utilizando-se espectrofotômetro Hitachi U – 2900 – Tóquio – Japão.

O método quantificação de compostos fenólicos totais utilizando o reagente de Folin - Ciocalteu baseia-se na redução do ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico pelas hidroxilas fenólicas, produzindo um complexo de coloração azul que absorve entre 620-740 nm. A reação ocorre em meio alcalino e a solução saturada de carbonato de sódio é a base mais indicada (ANGELO, JORGE, 2007).

Não é um método específico, pois determina todos os fenólicos presentes, além de substâncias redutoras adicionadas aos alimentos ou naturalmente presentes que podem interferir nos resultados (ANGELO, JORGE, 2007).

4.3.2 Determinação de Flavonóides Totais

A determinação de flavonóides (flavonas, isoflavonas e flavonóis) foi realizada por método colorimétrico utilizando-se cloreto de alumínio (CHANG et al., 2002) e quercetina como padrão (ANEXO 2). Os flavonóides totais foram expressos em equivalentes de quercetina (mg quercetina/g própolis). Amostras de 0,5 mL do EEP (1:20, v/v) foram misturadas com 1,5 mL de etanol, P.A., 99,5°GL (Ecibra Cetus Ltda – São Paulo - Brasil), 0,1 mL de cloreto de alumínio (10%) (Labsynth – São Paulo - Brasil), 0,1 mL de acetato de potássio 1 mol/L (Riedel-de Haën – reembalado por VETEC – São Paulo - Brasil) e 2,8 mL de água destilada.

No tubo branco foi adicionado etanol 99,5% no lugar do EEP e no tubo controle a solução de cloreto de alumínio foi substituído por etanol P.A., 99,5°GL. Após 30 minutos, a absorbância das amostras foi medida a 434 nm utilizando-se espectrofotômetro Hitachi U-2900 – Tóquio - Japão.

O princípio do método colorimétrico de determinação de flavonóides totais com cloreto de alumínio (AlCl_3) baseia-se na formação de complexos ácidos estáveis com o grupo ceto do C-4 e o grupo hidroxil do C-3 ou C-5 de flavonas e flavonóis. O alumínio forma complexos sensíveis com grupos ortohidroxil no anel B, C-3' e C-4' dos flavonóides (MARBY et al., 1970; MARKHAM, 1982).

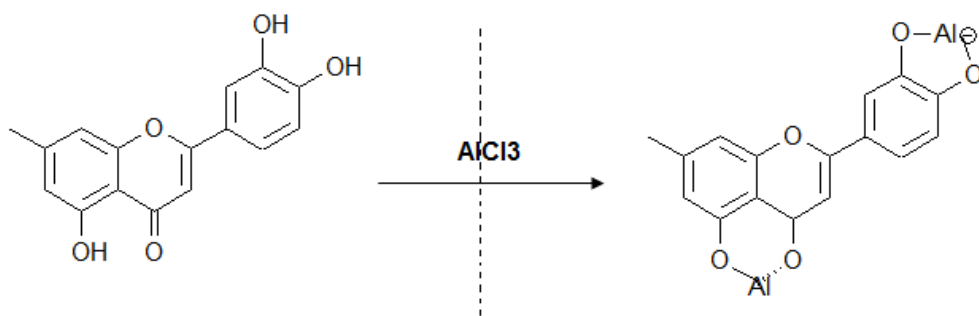


Figura 6. Formação do complexo flavonóide - alumínio, em solução metanólica de cloreto de alumínio.

(Fonte: MARKHAM, 1982)

Após a formação dos complexos, ocorre um desvio no comprimento de onda para maiores valores e uma intensificação da absorção durante a análise espectrofotométrica. É possível assim determinar a quantidade de flavonóides, evitando a interferência de outras substâncias fenólicas, principalmente os ácidos fenólicos, que invariavelmente acompanham os flavonóides nos tecidos vegetais e nos extratos da própolis. A leitura é feita em espectrofotômetro a 425 nm, utilizando-se AlCl_3 a 5% em metanol (WOISKY, SALATINO, 1998). Nessas condições, o complexo flavonóide - alumínio (Figura 6) absorve em comprimento de onda bem maior do que o flavonóide sem a presença do agente complexante (Tabela 5). Os ácidos fenólicos, mesmo os que formam complexos com AlCl_3 , absorvem em comprimentos de onda muito inferiores, evitando-se dessa maneira interferências nas medidas de absorbância (MARCUCCI et al., 1998).

Tabela 5. Bandas de absorção de flavonóides e ácidos fenólicos em solução metanólica em presença de cloreto de alumínio (AlCl₃).

Tipo de Flavonóide	Banda I (nm)	Banda II (nm)	Deslocamento provocado por complexação com AlCl₃ (nm) **
Flavonas	310-350	250-280	+35-55*
Flavonois (3-OH substituído)	330-360	250-580	+50-60*
Flavonois (sem 3-OH)	350-385	250-280	+35-55*
Isoflavonas	310-330 (ombro)	245-275	+10-14
Isoflavonas (5-desoxi- 6,7-dioxigenadas)	320 (pico)	275-295	+11-30
Flavonas e diidroflavonois	300-330 (ombro)	230-270	+20-26*
Chalconas	340-390	230-270	+48-64*
Auronas	465-560	270-280	+40* +60-70*

(Fonte: MARKHAM, 1982)

4.3.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reserva (CLAE-FR) dos Extratos Etanólicos da própolis

A análise por CLAE-FR foi feita de acordo com o método de PARK et al. (2002). Uma alíquota 20 µL do EEP foi injetada em uma coluna YMC-Pack ODS-A (RP-18, 250 X 4,6 mm; tamanho da partícula 5 µm) instalada em um sistema de cromatografia líquida (Shimadzu Co. - Japão) composto por duas bombas (LCD-10AD - Japão) degaseificado por hélio (DGU-2A - Japão) e forno de colunas (CTO-10AS - Japão) com temperatura de 30°C. A fase móvel utilizada foi água/ácido acético (19:1 v/v) (Chemco – São Paulo - Brasil) (solvente A) e metanol grau CLAE (solvente B) (J.P. Baker - México). A vazão foi de 1,0 mL/min. O gradiente aplicado foi 30% do solvente B até 40% em 15 minutos, 50% do

solvente B em 30 minutos, 60% do solvente B em 45 minutos, 75% do solvente B em 65 minutos, 90% do solvente B em 95 minutos e 30% do solvente B em 105 minutos. O tempo de corrida total foi de 120 minutos. Os compostos foram identificados pelo espectro de absorção na região ultravioleta, utilizando os recursos do detector de arranjo de fotodiodos, pela comparação do tempo de retenção e cromatografia de padrões.

Os padrões utilizados na tentativa de identificar alguns compostos (flavonóides e ácidos fenólicos) (Extrasynthese Co. - França) foram: 4-ácido cumárico, rutina, quercetina, caemferol, apigenina, pinocembrina, crisina, galangina, caemferide, artepelin C, bacarina, drupanina, ácido ferúlico, acacetina e isosacuranetina.

A quantificação dos compostos identificados foi feita utilizando-se o método da padronização externa. A padronização externa compara a área da substância a ser quantificada na amostra com as áreas obtidas desta mesma substância em soluções padrão de concentrações conhecidas (COLLINS et al., 1997).

4.4 Determinação da Atividade Antimicrobiana dos Extratos Etanólicos da própolis sobre Bactéria Patogênica

4.4.1 Preparo dos Discos com Extrato Etanólico da própolis

Discos de papel de filtro Whatman nº 3 (5 X 1mm de diâmetro), foram impregnados com 30 µL dos EEP previamente extraídos como descritos anteriormente no item 4.1.3. E em seguida os discos foram colocados em dessecador com sílica à temperatura ambiente por 24 horas para eliminação de qualquer resíduo etanólico (BLAIR et al., 1958; KOO, 1996).

4.4.2 Análise da Atividade Antimicrobiana dos Extratos Etanólicos da própolis

A atividade antimicrobiana dos Extratos Etanólicos da Própolis foi realizada conforme metodologia descrita por BLAIR et al. (1958) e KOO (1996). Culturas ativas do micro - organismo *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foram inoculadas por espalhamento com “swabs” estéreis em placas de Petri contendo Ágar *Brain Heart Infusion* (BHI) (Merck - Alemanha). Os discos com os extratos foram colocados sobre as placas inoculadas e foram incubadas a 37°C por 24 horas. A atividade antimicrobiana foi determinada pela medida (mm) do halo inibitório ao redor dos discos através do uso de uma régua comum.

O micro - organismo *S. aureus* (patogênico, Gram - positivo), foi escolhido por ser o agente responsável pela maioria das infecções do trato respiratório e septicemia além de ser o micro - organismo mais apontado na literatura científica por ser susceptível a baixa concentração da própolis para sua inibição (SFORCIN et al., 2000).

4.5 Determinação da Capacidade Antioxidante dos Extratos Etanólicos da própolis

A capacidade antioxidante foi determinada utilizando um radical livre estável 1,1 – difenil-2-picrilidrazil (DPPH) (Aldrich - Alemanha) como descrita por YEN, WU (1999) e CHEN et al. (2003).

Foram adicionados 20 µL do EEP diluído 1:10 em metanol 99,5% (Merck - Alemanha) em um tubo devidamente recoberto com papel escuro. Foram misturados 980 µL de metanol 80% (Merck - Alemanha) e posteriormente 2 mL de solução metanólica do radical DPPH (0,1 mmol/L). A redução do radical DPPH foi medida através do monitoramento contínuo do declínio da absorbância a 517 nm até valores estáveis de absorção, ou seja, o intervalo de medição foi: 0 minuto, 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 60 minutos, 90 minutos e 120 minutos ao abrigo da luz.

A capacidade antioxidante foi determinada em porcentagem de inibição utilizando medidas de absorvância no tempo de 30 minutos. A equação utilizada para calculo da capacidade antioxidante foi:

$$\text{Capacidade Antioxidante (\% Inibição)} = 100 \times \left(1 - \frac{\text{absorbância amostra}}{\text{absorbância branco}} \right)$$

A capacidade antioxidante pode ser medida e expressa de diversas formas. Assim além de expressar os resultados em % de Inibição os resultados também foram expressos em μM Trolox equivalente/ g própolis.

Foi construída uma curva padrão para determinação da capacidade antioxidante em equivalente de Trolox (ANEXO 3) a partir de uma solução padrão de Trolox 2.000 μM (RUFINO et al., 2007).

Para construção da curva padrão foram adicionados 20 μL de solução de Trolox (Acros Organics - Bélgica) nas seguintes concentrações: 2.000 μL , 1.500 μL , 1.000 μL , 500 μL e 100 μL em tubo devidamente recoberto com papel escuro. Foram misturados 980 μL metanol 80% (Merck - Alemanha) e 2 ml de solução metanólica do radical DPPH (0,1 mmol/L). No tempo de 30 minutos a absorvância foi medida a 517 nm e então construída a curva padrão para expressar os resultados em μM Trolox equivalente/ g própolis.

4.6 Análises Estatísticas

Os valores médios e o desvio padrão foram calculados a partir dos dados obtidos dos ensaios em triplicata.

Os dados foram analisados pelo programa MiniTab 14 para determinação da análise de variância. A comparação entre as médias dos tratamentos foi realizada usando-se o teste de Tukey com nível de confiança de 95%.

Os valores médios foram então submetidos ao teste de correlação de Pearson com 95% de confiança.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Própolis

As caixas com colméias localizadas na cidade de Mogi Mirim encontravam-se em local afastado da circulação de pessoas. No decorrer das coletas, notou-se que a vegetação ao redor das caixas era de mata e ao redor da mata foi observada a presença de *B. dracunculifolia* “alecrim-do-campo” na região durante o ano de coleta e também plantações de milho e girassol.

As caixas com colméias localizada na cidade de Águas de São Pedro encontravam-se em local de fácil acesso para circulação de pessoas. No decorrer das coletas, notou-se que a vegetação ao redor do apiário apresentava a presença de pinheiros e eucaliptos. Durante o período de coleta foi observado à presença de *B. dracunculifolia* nas redondezas do apiário. Para relacionar de forma confiável a vegetação existente em cada região mais estudos detalhados sobre a vegetação devem ser conduzidos.

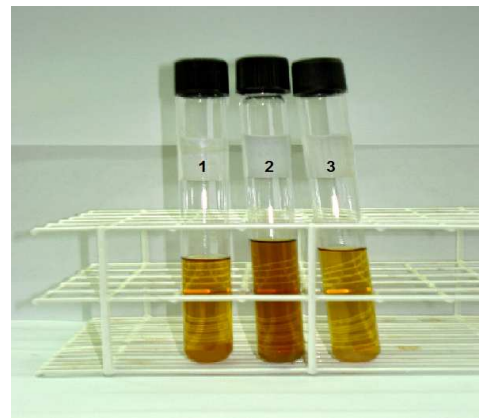
As amostras da própolis *in natura* coletadas apresentaram variação em relação à coloração e textura. A coloração variou de amarelo-castanho a verde amarronzado. A textura variou de dura - seca (Mogi Mirim) a pegajosa (Águas de São Pedro) sendo que nos meses de Julho e Agosto 2010 as amostras de Mogi Mirim também apresentaram - se pegajosas. Quanto ao aroma apresentaram odor característico da própolis. A aparência dos Extratos Etanólicos da Própolis pode ser visualizada nas Figuras de 7 a 12.



Aparência dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas da cidade de Mogi Mirim em Setembro de 2009.

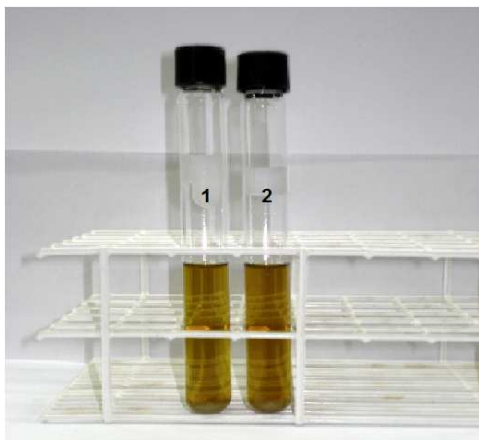


Aparência dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas da cidade de Mogi Mirim em Outubro de 2009.

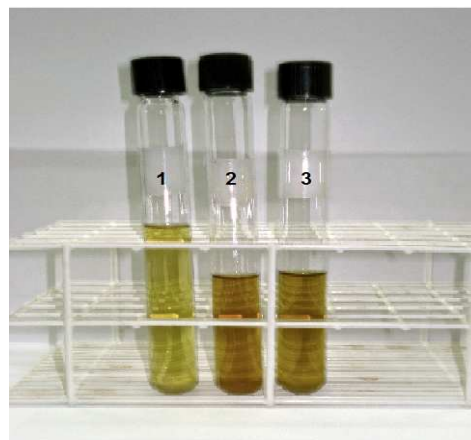


Aparência dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas da cidade de Águas de São Pedro em Outubro de 2009.

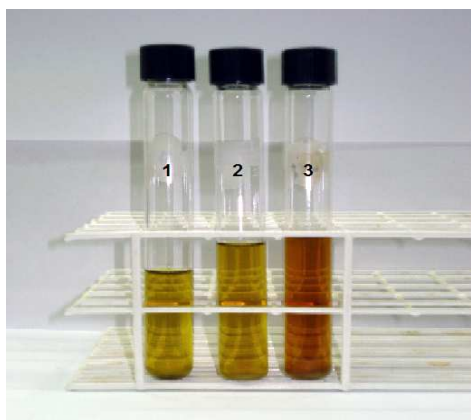
Figura 7. Aparência dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas em apiários das cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro nos meses de Setembro de 2009 a Outubro de 2009. A numeração nos tubos foi utilizada para identificação das colméias.



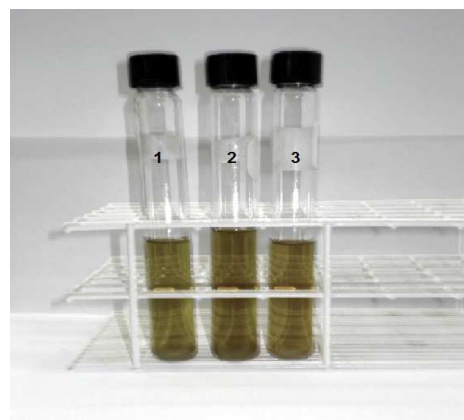
Aparência dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas da cidade de Mogi Mirim em Novembro de 2009.



Aparência dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas da cidade de Águas de São Pedro em Novembro de 2009.

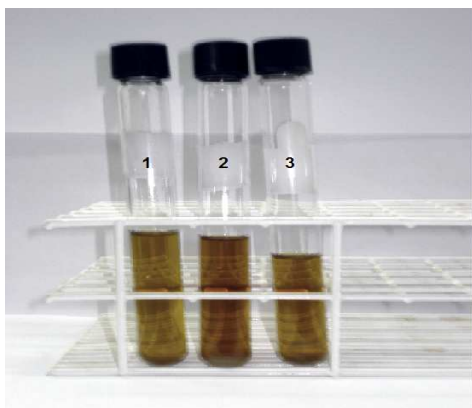


Aparência dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas da cidade de Mogi Mirim em Janeiro de 2010.

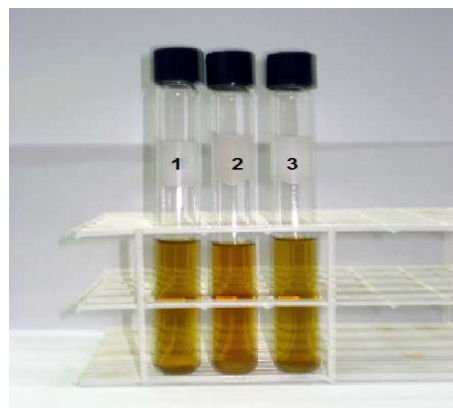


Aparência dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas da cidade de Águas de São Pedro em Janeiro de 2010.

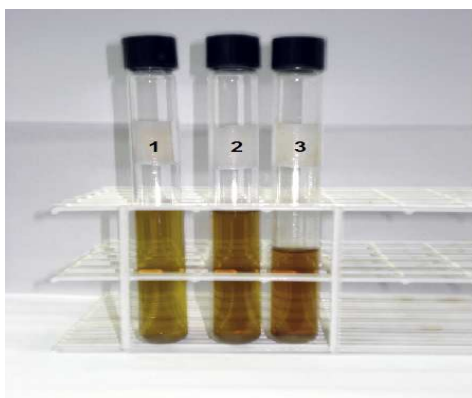
Figura 8. Aparência dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas em apiários das cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro nos meses de Novembro de 2009 a Janeiro de 2010. A numeração nos tubos foi utilizada para identificação das colméias.



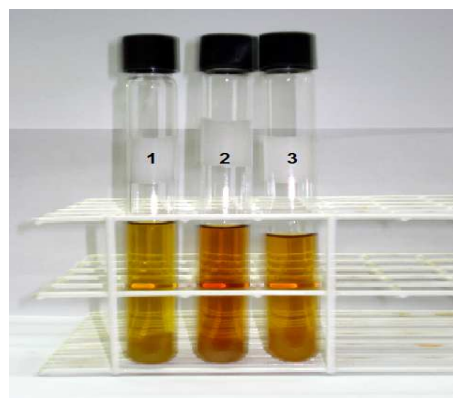
Aparência dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas da cidade de Mogi Mirim em Fevereiro de 2010.



Aparência dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas da cidade de Águas de São Pedro em Fevereiro de 2010.

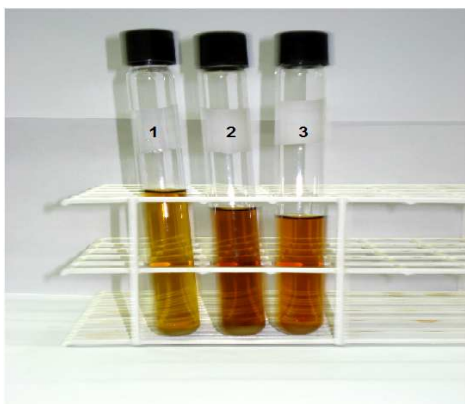


Aparência dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas da cidade de Mogi Mirim em Março de 2010.

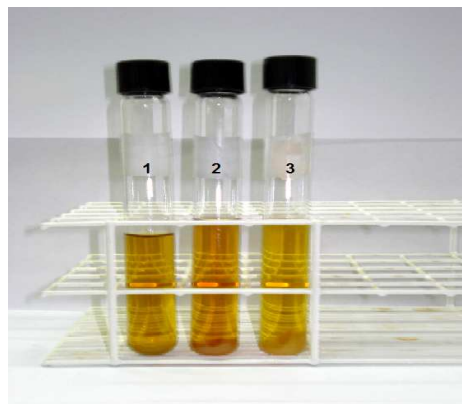


Aparência dos Extratos Etanólicos da Própolis em amostras coletadas da cidade de Águas de São Pedro em Março de 2010.

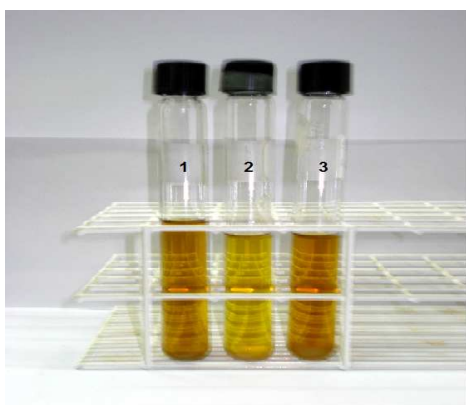
Figura 9. Aparência dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas em apiários das cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro nos meses de Fevereiro de 2010 a Março 2010. A numeração nos tubos foi utilizada para identificação das colméias.



Aparência dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas da cidade de Mogi Mirim em Abril de 2010.



Aparência dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas da cidade de Águas de São Pedro em Abril de 2010.

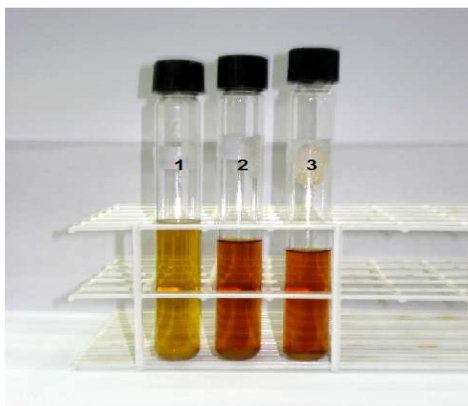


Aparência dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas da cidade de Mogi Mirim em Maio de 2010.

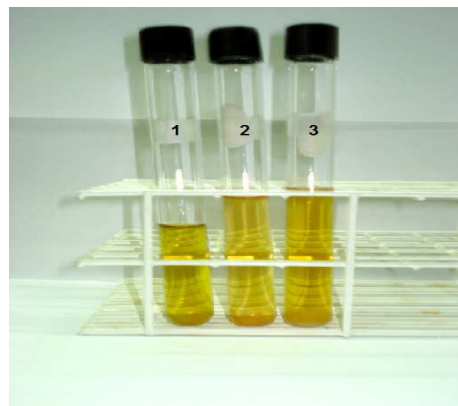


Aparência dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas da cidade de Águas de São Pedro em Maio de 2010.

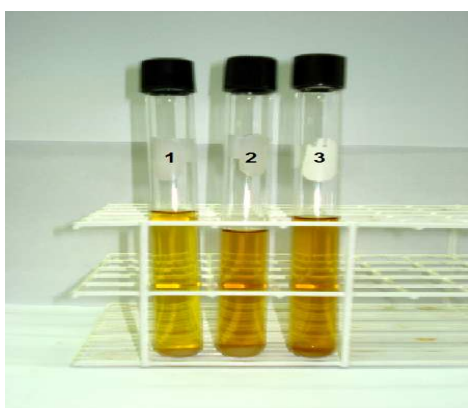
Figura 10. Aparência dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas em apiários das cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro nos meses de Abril de 2010 a Maio de 2010. A numeração nos tubos foi utilizada para identificação das colméias.



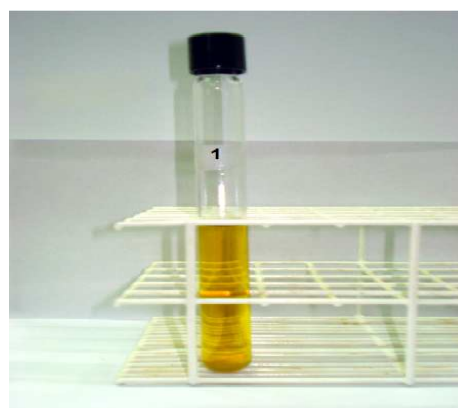
Aparência dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas da cidade de Mogi Mirim em Junho de 2010.



Aparência dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas da cidade de Águas de São Pedro em Junho de 2010.

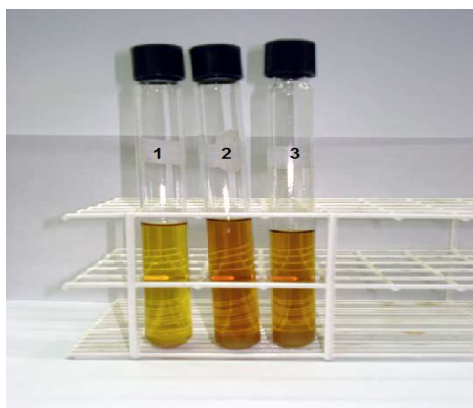


Aparência dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas da cidade de Mogi Mirim em Julho de 2010.

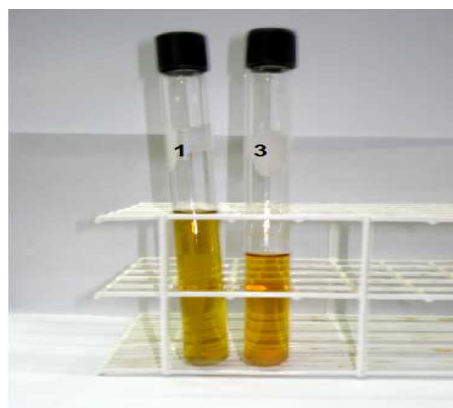


Aparência dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas da cidade de Águas de São Pedro em Julho de 2010.

Figura 11. Aparência dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas coletados nas cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro nos meses de Junho de 2010 a Julho de 2010. A numeração nos tubos foi utilizada para identificação das colméias.



Aparência dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas da cidade de Mogi Mirim em Agosto de 2010.



Aparência dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas da cidade de Águas de São Pedro em Agosto de 2010.

Figura 12. Aparência dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas em apiários das cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro no mês de Agosto de 2010. A numeração dos tubos é a identificação das colméias.

No mês de Dezembro de 2010 não foi realizada a coleta devido ao alto índice pluviométrico com chuvas freqüentes e intensas impedindo assim o acesso até os apiários. Deve – se ressaltar que nos meses de Junho, Julho e Agosto houve estiagem e a umidade do ar ficou em cerca de 15%, e estes fatores certamente influenciaram a composição química das própolis coletadas.

Segundo KOO (1996) as própolis coletadas na região sudeste, nos Estados de São Paulo e Minas Gerais apresentaram coloração característica esverdeada ou ligeiramente esverdeada e consistência mais rígida. Na região de Itamarandiba – MG, zona de reflorestamento com eucaliptos, a própolis apresentou coloração característica marrom e amolecida.

As amostras coletadas em Mogi Mirim e Águas de São Pedro apresentaram-se coloração e textura diferentes. Porém como observado

anteriormente por KOO (1996) as amostras podem ser consideradas como típicas da região sudeste do Brasil.

TOMÁS - BARBERÁN et al. (1993) estudaram a relação entre a coloração dos extratos metanólicos da própolis e sua composição e verificaram que os extratos avermelhados escuros continham grandes quantidades de fenólicos, enquanto que os incolores não continham substâncias fenólicas. Os extratos de coloração amarela apresentaram compostos fenólicos, porém em quantidades menores quando comparados com os extratos mais escuros.

ALENCAR (2002) comparou a coloração dos extratos da própolis com o perfil de compostos separados por cromatografia em camada delgada e verificou que não houve correlação entre essas duas variáveis. Dessa forma ficou claro que a variável coloração dos extratos não pode ser utilizada para predizer grupos distintos da própolis. TOMÁS - BARBERÁN et al. (1993) observaram que é possível fazer a relação da intensidade da coloração dos Extratos Etanólicos da Própolis com a quantidade de compostos fenólicos presentes nas amostras.

Sabe-se, entretanto que o mercado da própolis utiliza o parâmetro de cor e odor para avaliar a qualidade da matéria – prima e dos extratos. O parâmetro coloração deve ser melhor investigado para então ser utilizado ou não como forma de avaliar a qualidade da própolis em relação ao teor de compostos fenólicos.

5.2 Determinações Qualitativas dos Compostos Fenólicos dos Extratos Etanólicos da Própolis

PARK et al. (2000) utilizaram como análise preliminar para classificação das própolis o Espectro de Absorção dos Extratos na região UV - Visível e o perfil de compostos separados por Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência em Fase Reversa que foram utilizados também nesse estudo para a classificação das amostras coletadas.

O espectro de absorção de UV – visível é um dos parâmetros físico-químicos mais utilizados para se avaliar a própolis, pois suas atividades farmacológicas têm sido atribuídas a compostos fenólicos, tais como flavonóides, ácido caféico, ácido cinâmico e derivados, os quais absorvem nesta região do ultravioleta (CASTRO et al., 2007). Os Extratos Etanólicos da Própolis foram analisados através da espectrofotometria na região UV - Visível, na faixa de comprimento de onda entre 200 e 800 nm como descrito no item 4.2.1 e podem ser visualizados nas Figuras 13 a 16.

De modo geral os flavonóides apresentam valores máximos de absorção na faixa de 250 - 350 nm (MARKHAM, 1975). Segundo ALENCAR (2002) amostras da própolis com o mesmo comprimento de onda máximo podem apresentar perfis químicos diferentes, como encontrado para as amostras do G3 (Paraná) e G8 (Pernambuco) com $\lambda_{\text{máx.}}$ 290 nm.

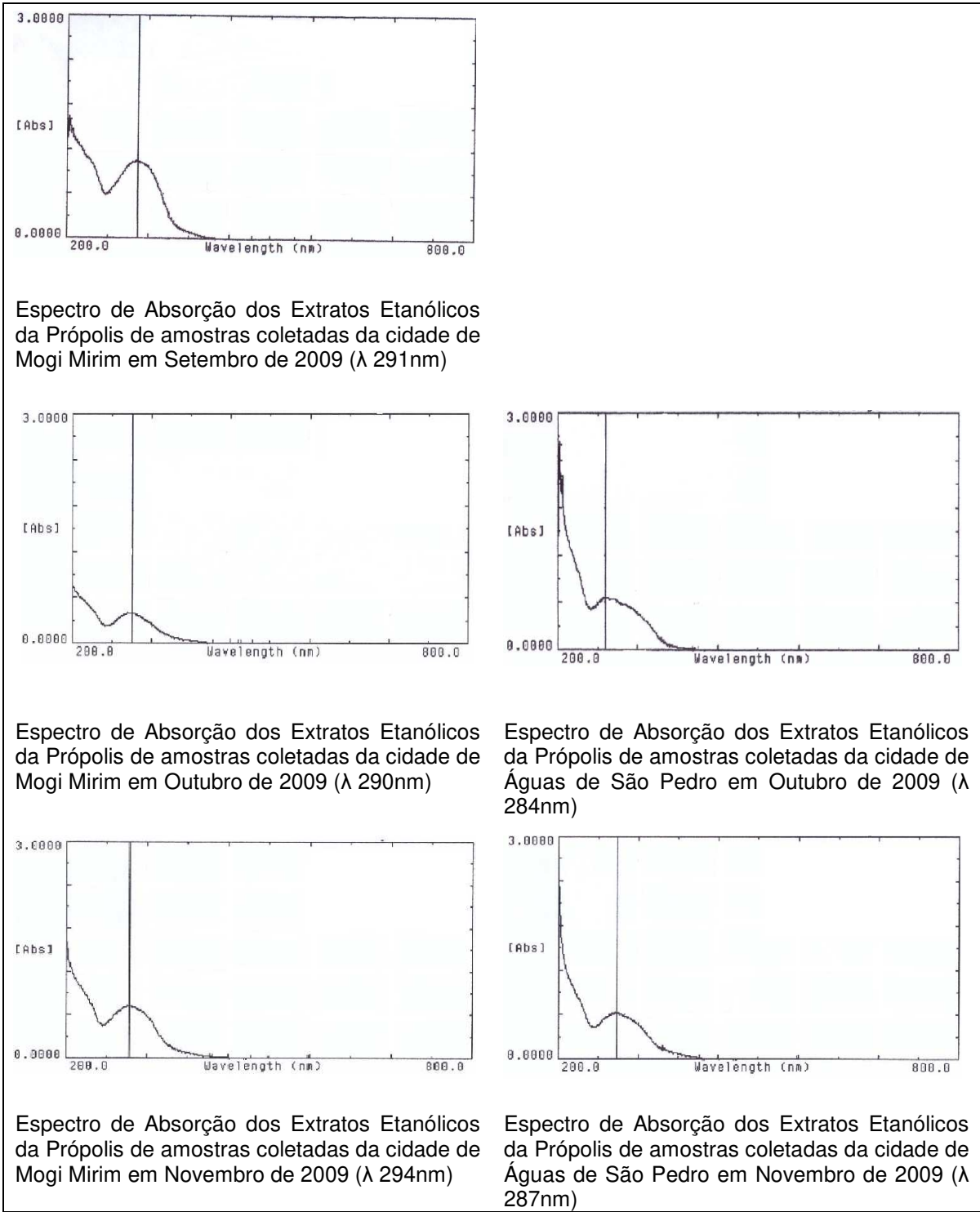


Figura 13. Espectro de Absorção dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas em apiários das cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro nos meses de Setembro de 2009 a Novembro de 2009.

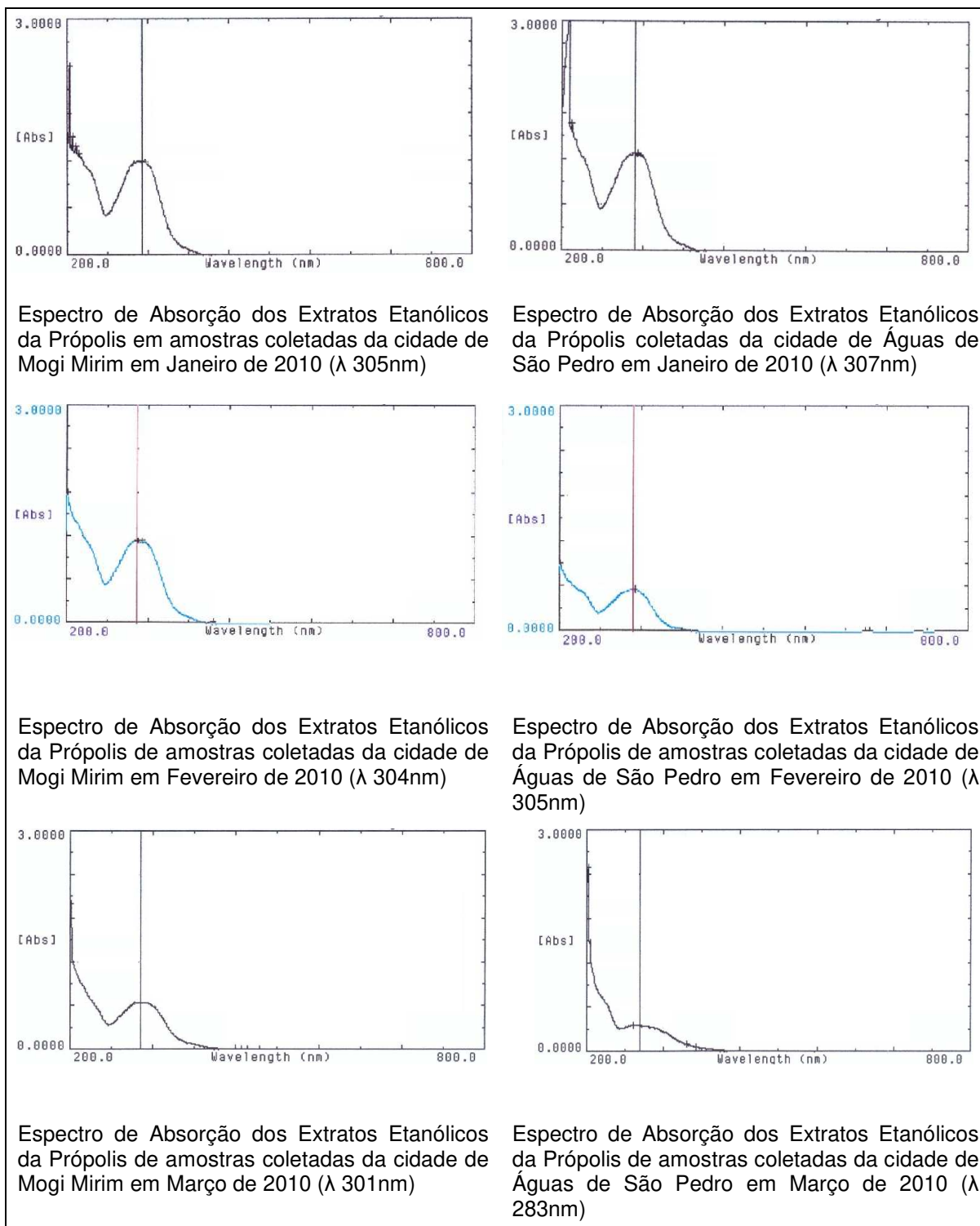


Figura 14. Espectro de Absorção dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas em apiários das cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro nos meses de Janeiro de 2010 a Março de 2010.

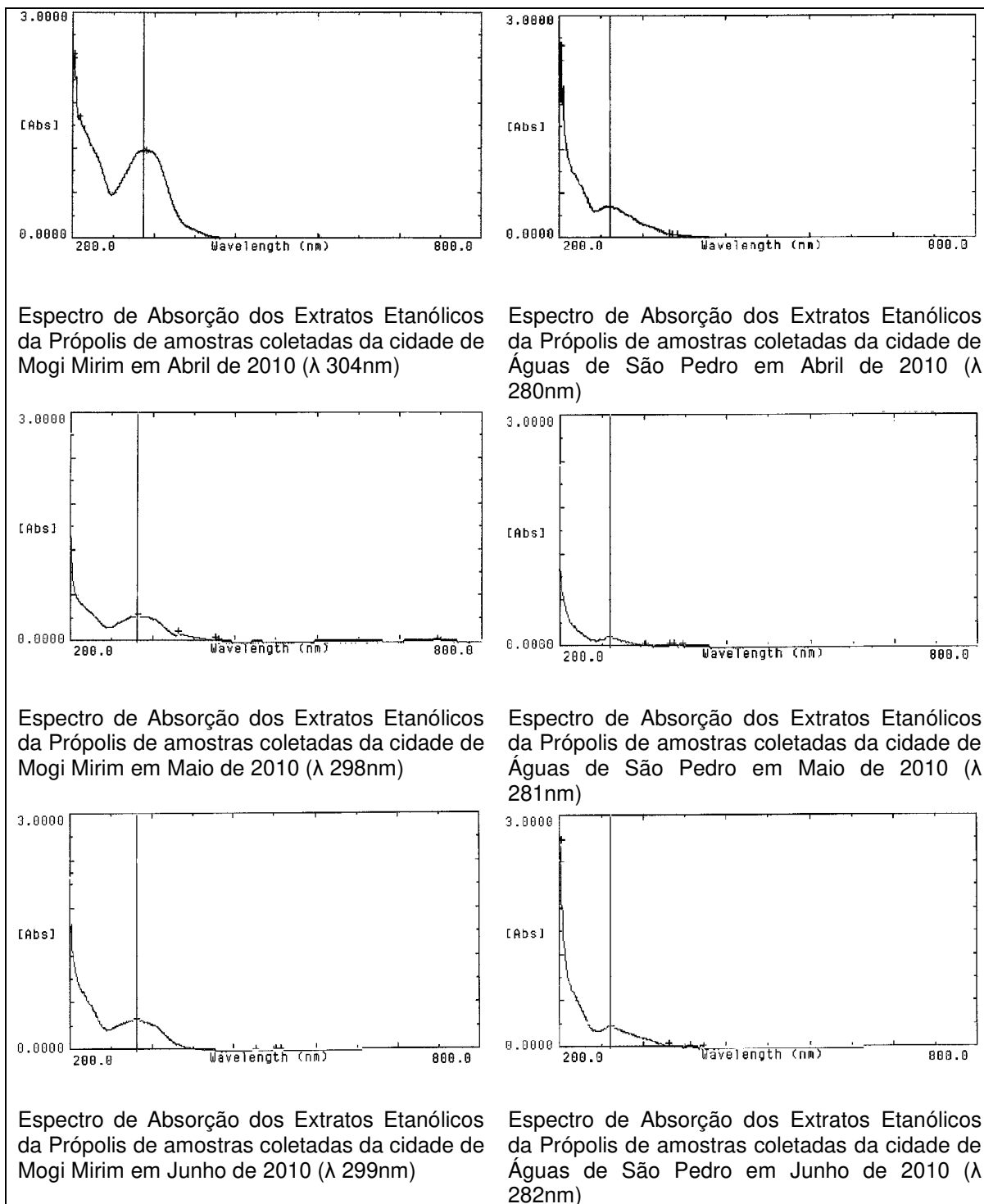


Figura 15. Espectro de Absorção dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas em apiários das cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro nos meses de Abril de 2010 a Junho de 2010.

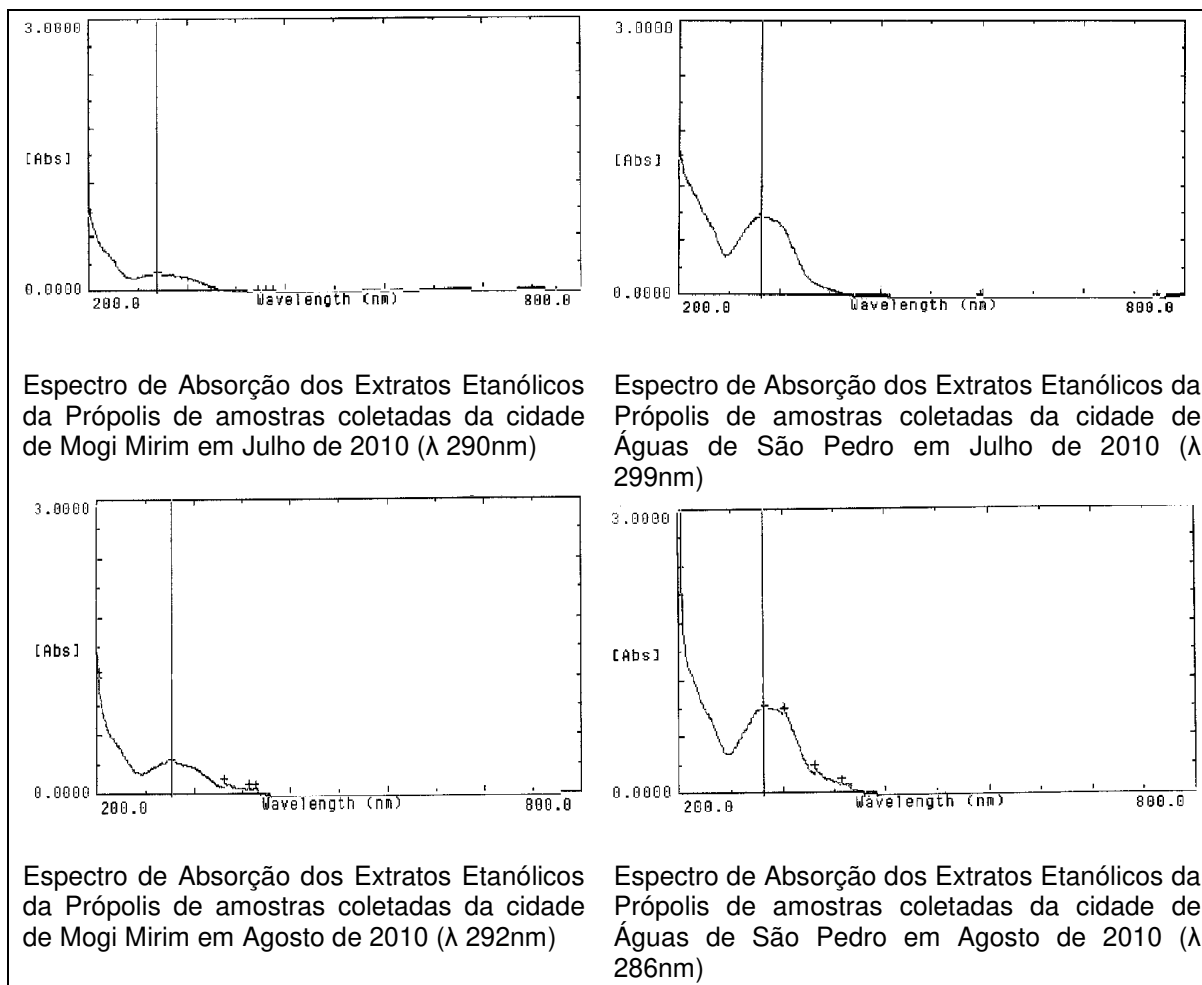


Figura 16. Espectro de Absorção dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas em apiários das cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro nos meses de Julho de 2010 e Agosto de 2010.

A Tabela 6 ilustra os valores de comprimento de onda de absorção máxima dos Extratos Etanólicos da Própolis na região UV – Visível. Verificou-se que variam de 280 - 307 nm e que existem variações no valor de comprimento de onda de absorção máxima dos Extratos Etanólicos da Própolis dentro de um mesmo apiário.

Se esse fosse o único parâmetro para classificar as própolis em Mogi Mirim durante um ano de coleta seria possível classificar três tipos diferentes da própolis

sendo que as própolis de Janeiro e Fevereiro seriam representativas do G5, as amostras de Março, Maio e Junho seriam representativas do G12 e aquelas de Julho, Agosto, Setembro, Outubro e Novembro seriam representativas do G8.

As amostras da própolis coletadas no apiário da cidade de Águas de São Pedro poderiam ser classificadas em quatro tipos diferentes sendo que as própolis de Janeiro e Fevereiro poderiam ser classificadas como G5 sendo que nos mesmos meses no apiário localizado na cidade de Mogi Mirim os resultados foram os mesmos. As amostras da própolis coletadas nos meses de Março, Abril, Maio, Junho e Outubro seriam classificadas como G9, as amostras do mês de Julho seriam do G12 e aquelas coletadas nos meses de Agosto e Novembro seriam classificadas como G6.

Existe uma maior concentração quanto ao comprimento de onda máximo de absorção dos Extratos Etanólicos da Própolis coletadas no apiário localizado na cidade de Águas de São Pedro assim como o desvio também é maior. Isso porque duas das três colméias utilizadas para coleta da própolis apresentaram coloração e textura diferentes mostrando que as abelhas de um mesmo apiário podem procurar fontes vegetais distintas para a coleta de resina para fabricação da própolis.

No entanto, a análise por espectrofotometria dos Extratos Etanólicos da Própolis fornece apenas uma característica geral de todos os compostos fenólicos presentes, sendo que o perfil espectrofotométrico das amostras seria um indicativo do tipo da própolis necessitando dos resultados de Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência em Fase Reversa para classificar o tipo da própolis.

Os EEP foram analisados por Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência em Fase Reversa (CCDAE – FR) de acordo com item 4.2.2. A placa foi visualizada sob a luz ultravioleta no comprimento de onda de 366 nm o que permitiu observar a intensidade e o número de frações de compostos fenólicos, sendo considerada uma técnica rápida e eficiente para análise primária das própolis e como uma alternativa para a avaliação e classificação qualitativa das própolis.

Tabela 6. Comprimento de onda (λ) de absorção máxima, no espectro UV-Visível (200 a 800 nm) dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas em dois apiários do Estado de São Paulo no período de Setembro de 2009 a Agosto de 2010. Média com a mesma letra não apresentam diferença estatisticamente significativa entre si ($p \leq 0,05$) pelo Teste de Tukey.

Local de coleta da própolis	Período Sazonal (mês/ano)										
	Setembro 2009	Outubro 2009	Novembro 2009	Janeiro 2010	Fevereiro 2010	Março 2010	Abril 2010	Mai 2010	Junho 2010	Julho 2010	Agosto 2010
Valores de comprimento de onda (λ) de absorção máxima (nm)											
Mogi Mirim	291±0,5 c	290±1 c	294±2 c	305±3 a	304±2 a	301±1 b	304±2 ab	298±2 b	299±2 b	290±10 c	292±3 c
Águas de São Pedro		282±7 b	287±6 b	307±4 a	305±3 a	283±13 b	280±13 b	281±13 b	282±15 b	299±1 ab	286±18 b

Segundo o método de classificação das própolis brasileiras feita por PARK et al. (2000) todas as amostras da própolis coletadas em Mogi Mirim no período de Setembro de 2009 a Agosto de 2010 podem ser classificadas como pertencentes ao grupo 12.

Em relação às amostras das própolis coletadas em Águas de São Pedro no período de Outubro de 2009 a Agosto de 2010 apenas as amostras de uma colméia apresentaram características da própolis do G12. As outras duas colméias utilizadas para a coleta da própolis não puderam ser classificadas como G12. No mês de Outubro de 2009 foi possível observar que as amostras coletadas nas três colméias da cidade de Águas de São Pedro apresentaram perfil característico da própolis do G12.

As ilustrações referentes às placas de CCDAE – FR encontram-se nas Figuras de 17 a 20.

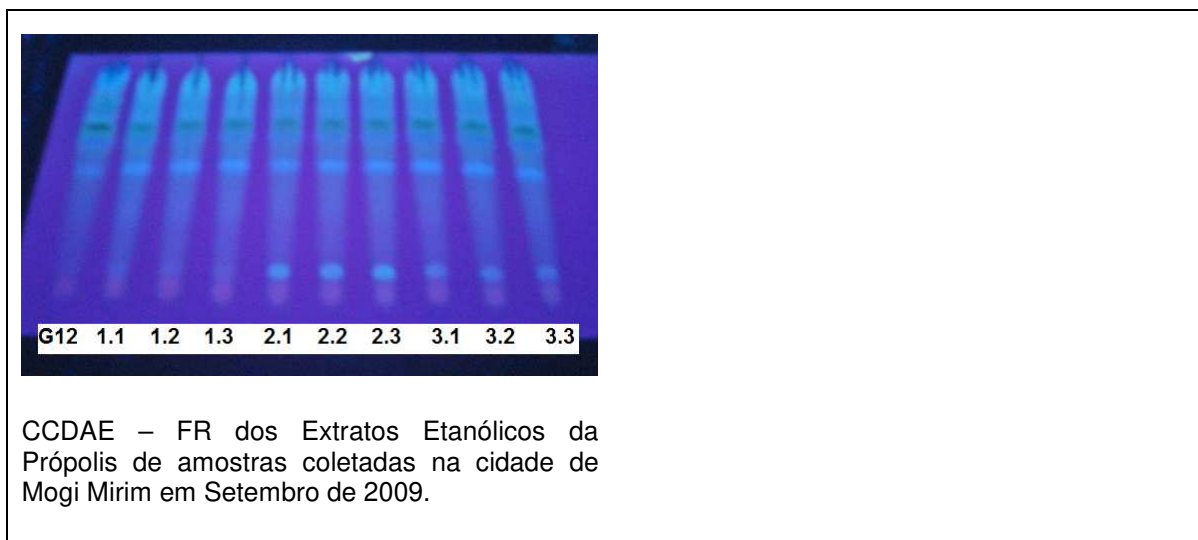
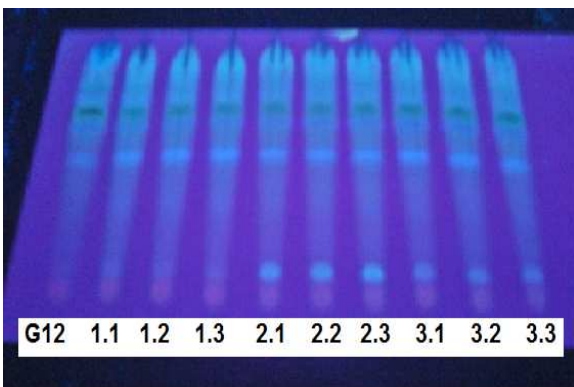
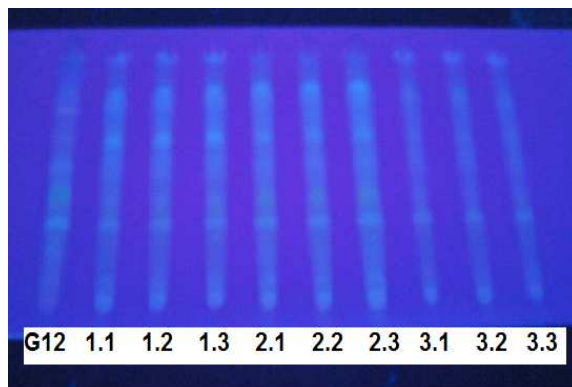


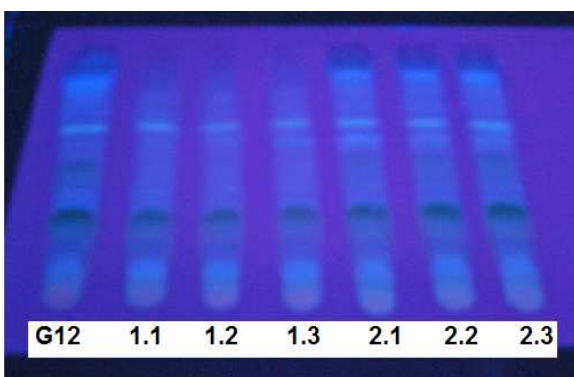
Figura 17. Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência em Fase Reversa dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas das cidades de Mogi Mirim no mês de Setembro de 2009. G12 corresponde a uma amostra típica da própolis da região sudeste utilizada como padrão. A numeração presente em cada aplicação de amostra é a identificação da colméia e da triplicata.



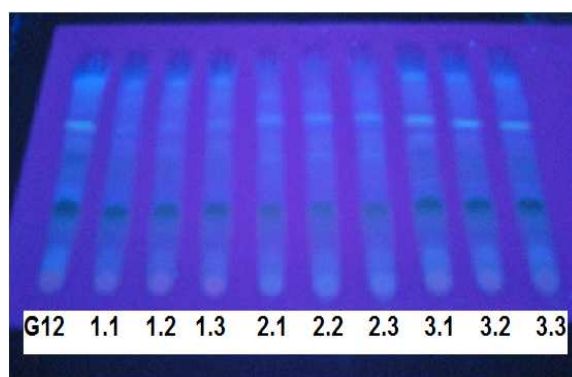
CCDAE – FR dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas na cidade de Mogi Mirim em Outubro de 2009.



CCDAE – FR dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas na cidade de Águas de São Pedro em Outubro de 2009.

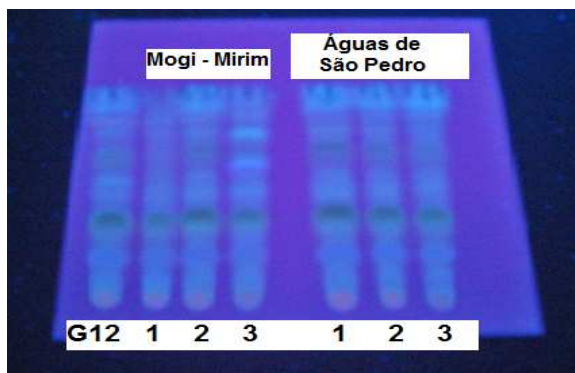


CCDAE – FR dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas na cidade de Mogi Mirim em Novembro de 2009.

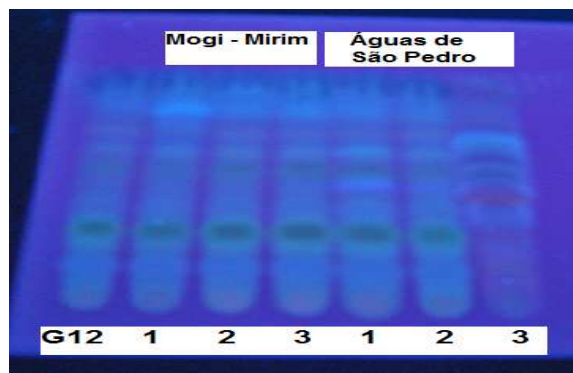


CCDAE – FR dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas na cidade de Águas de São Pedro em Novembro de 2009.

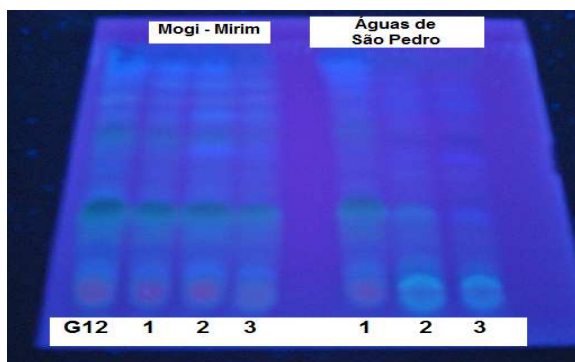
Figura 18. Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência em Fase Reversa dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas das cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro nos meses de Outubro de 2009 e Novembro de 2009. G12 corresponde a uma amostra típica da própolis da região sudeste utilizada como padrão. A numeração presente em cada aplicação de amostra é a identificação da colméia e da triplicata.



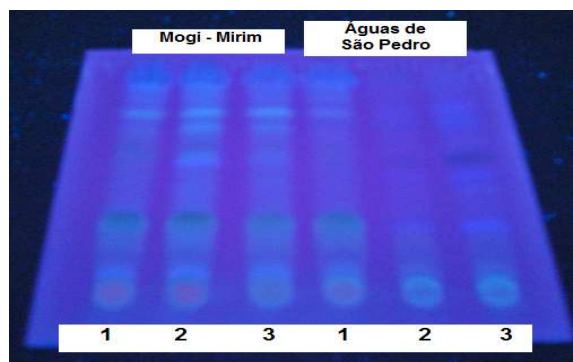
CCDAE – FR dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas nas cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro em Janeiro de 2010.



CCDAE – FR dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas nas cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro em Fevereiro de 2010.



CCDAE – FR dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas nas cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro em Março de 2010.



CCDAE – FR dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas nas cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro em Abril de 2010.

Figura 19. Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência em Fase Reversa dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas das cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro nos meses de Janeiro de 2010 a Abril de 2010. G12 corresponde a uma amostra típica da própolis da região sudeste utilizada como padrão. A numeração presente em cada aplicação de amostra é a identificação da colméia e da triplicata.

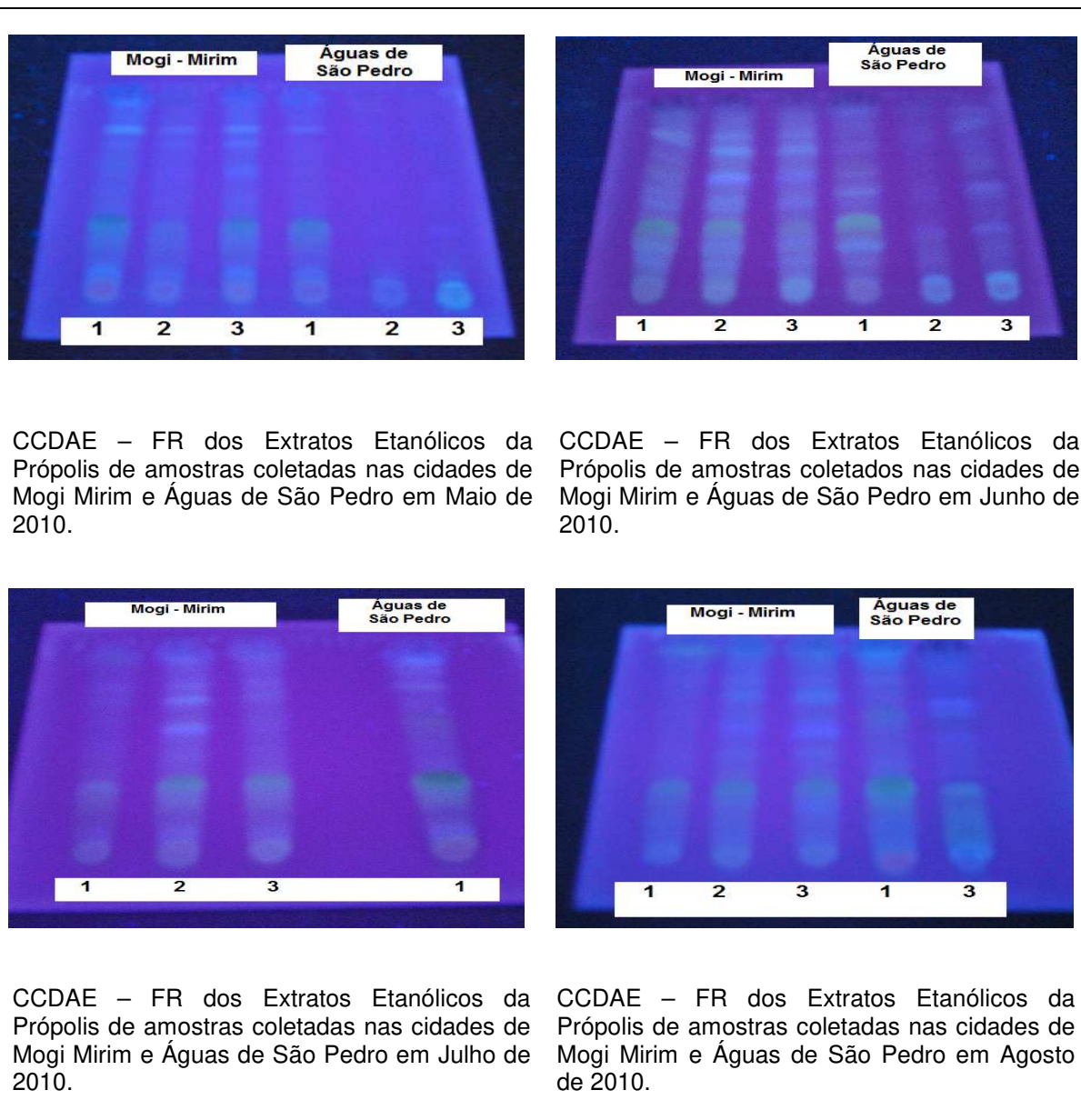


Figura 20. Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência em Fase Reversa dos Extratos Etanólicos da própolis de amostras coletadas das cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro nos meses de Maio de 2010 a Agosto de 2010. G12 corresponde a uma amostra típica da própolis da região sudeste utilizada como padrão. A numeração presente em cada aplicação de amostra é a identificação da colméia e da triplicata.

Com relação ao tipo de vegetação torna - se difícil determinar uma semelhança entre as diferentes localidades, uma vez que os apiários são colocados em locais de flora complexa onde é possível encontrar uma grande variedade de espécies assim como KOO, PARK (1997) investigaram que a composição química da própolis coletada por dois tipos de abelhas diferentes em uma mesma região influenciou na composição química da própolis em relação à quantidade e qualidade de compostos presentes na própolis

A CCDAE - FR economiza tempo na determinação do perfil químico dos Extratos Etanólicos da Própolis assim como auxilia na avaliação das alterações qualitativas ocorridas em um determinado tempo sendo possível observar a intensidade e o número de frações de compostos fenólicos (PAREDEZ - GUZMÁN, 2005). Essa técnica poderia ser empregada como uma alternativa para determinação qualitativa das própolis brasileiras uma vez que corresponde a uma técnica simples e rápida, com a utilização de um sistema de solvente barato (etanol e água) e bastante simples. A única desvantagem é o alto custo das placas (IKEGAKI, 2001).

A análise por espectrofotometria na região UV - Visível em conjunto com os resultados obtidos pela técnica de CCDAE – FR sugere ser uma ferramenta rápida e eficaz para identificação e classificação de diferentes tipos da própolis.

5.3 Determinações Quantitativas dos Compostos Fenólicos da Própolis

5.3.1 Compostos Fenólicos Totais

A determinação de composto fenólicos totais dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas das cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro foi realizada de acordo com o método descrito no item 4.3.1 e os resultados referentes às amostras analisadas estão ilustradas nas Figuras 21 e 22 respectivamente.

Esta técnica baseia-se na reação do reagente de Folin – Ciocalteu que oxida os fenolatos, reduzindo os ácidos a um complexo azul molibdênio-tungstênio, sendo a quantificação feita com base no padrão ácido gálico.

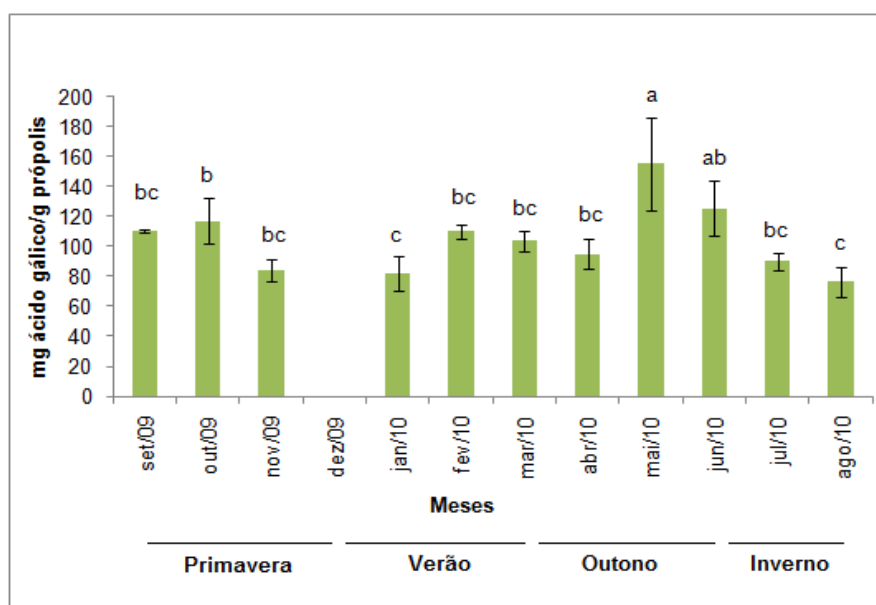


Figura 21. Compostos Fenólicos Totais (mg EAG /g própolis) dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas da cidade de Mogi Mirim no período de Setembro de 2009 a Agosto de 2010. Média com a mesma letra não apresentam diferença estatisticamente significante entre si ($p \leq 0,05$) pelo Teste de Tukey.

A Figura 21 mostra que as amostras da própolis coletadas na cidade de Mogi Mirim no período de Setembro de 2009 a Agosto de 2010 apresentaram diferenças significativas pelo Teste de Tukey, quanto ao teor de compostos fenólicos totais. Sendo que as amostras que apresentaram maior teor de compostos fenólicos totais foram àquelas coletadas nos meses de Maio e Junho de 2010. As amostras coletadas nos meses de Setembro e Novembro de 2009, Fevereiro, Março, Abril, Julho de 2010 não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si e mostraram valores médios quanto ao teor de compostos fenólicos totais. As amostras coletadas nos meses de Agosto de 2010 foram aquelas com menor teor de fenólicos totais e que apresentaram diferença estatística das demais.

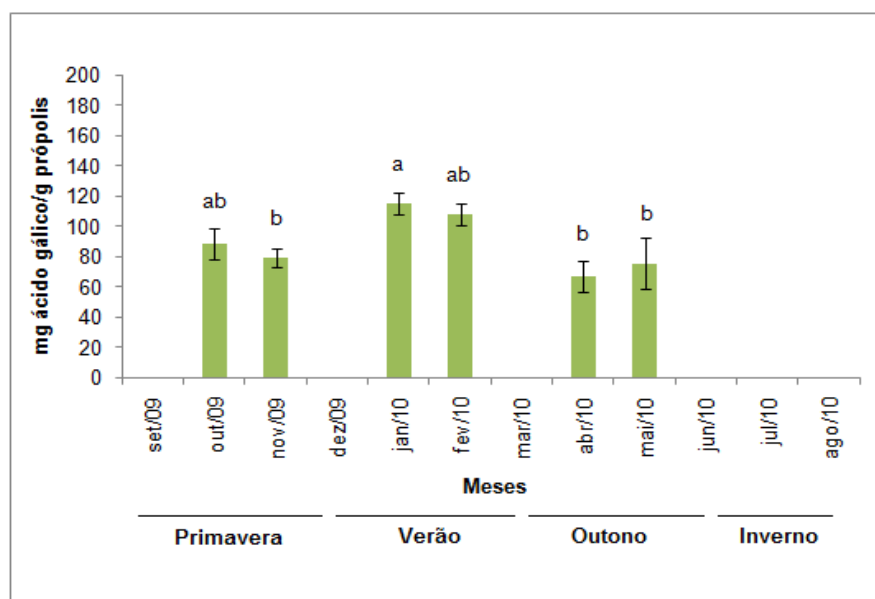


Figura 22. Compostos Fenólicos Totais (mg EAG /g própolis) dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras da própolis coletadas da cidade de Águas de São Pedro no período de Setembro 2009 a Agosto de 2010. Média com a mesma letra não apresentam diferença estatisticamente significativa entre si ($p \leq 0,05$) pelo Teste de Tukey.

A Figura 22 ilustra que as amostras da própolis coletadas na cidade de Águas de São Pedro, no período de Setembro de 2009 a Agosto de 2010

apresentaram diferenças significativas, pelo Teste de Tukey, quanto ao teor de compostos fenólicos totais. As amostras que apresentaram maiores teores de fenólicos totais foram àquelas coletadas nos meses de Outubro de 2009, Janeiro e Fevereiro de 2010. As amostras da própolis coletadas nos meses de Novembro de 2009, Abril e Maio de 2010 não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si. Na determinação de compostos fenólicos totais das amostras da própolis coletadas nos meses de Março, Junho, Julho e Agosto de 2010, as soluções testes apresentaram turvação. As soluções foram centrifugadas, deixadas em repouso por 24 horas e, no entanto continuaram turvas. Desta forma os teores de compostos fenólicos totais dessas amostras não foram determinados já que a turvação interferiu na leitura correta das amostras superestimando o resultado final.

Segundo o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade dos outros Produtos Apícolas (Instrução Normativa nº3 de 19 de Janeiro de 2001), os teores de fenólicos totais devem apresentar valores mínimos de 5% (m/m).

Pelos dados apresentados as amostras da própolis coletadas nos apiários das cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro atendem a regulamentação nesse quesito. Considerando os teores de fenólicos totais, estes extratos também poderiam ser utilizados para consumo humano.

A amostra do mês de Maio de 2010 coletada na cidade de Mogi Mirim apresentou maior teor de fenólicos totais quando comparada com as amostras coletadas na cidade de Águas de São Pedro no mesmo mês. Isso pode ter ocorrido provavelmente por ter havido uma concentração dos princípios ativos nos vegetais, já que este mês corresponde a estação de seca na região sudeste (SP).

Verificou-se grande variação no teor de compostos fenólicos totais nas própolis sendo que as amostras de Mogi Mirim que apresentaram menor teor de fenólicos totais foram coletadas nos meses de Janeiro e Agosto de 2010 enquanto que as amostras de Águas de São Pedro que apresentaram menor teor de compostos fenólicos totais foram coletadas nos meses de Abril e Maio de 2010.

As amostras apresentaram diferença em relação ao conteúdo de compostos fenólicos totais quanto à região de coleta. Verificou-se que a composição da própolis varia com a região de coleta, corroborando com estudos de GREENAWAY et al. (1990); GARCIA – VIGUEIRA et al. (1992); TOMAS – BARBERÁN et al. (1993); BONVEHI, COLL, (1994); PARK et al. (2000b) e PARK et al. (2002a).

Os valores de compostos fenólicos totais dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas mensalmente nos apiários das cidade de Mogi Mirim e Águas de São Pedro variaram respectivamente de 76,6 a 155,0 mg EAG/ g própolis e 66,9 a 115,5 mg EAG/ g própolis. Os dados encontrados foram similares aos valores encontrados por CASTRO et al. (2007) para amostras da própolis coletadas em Brumadinho – MG, na região sudeste do Brasil. Os teores de fenólicos totais determinados atingem e superam os valores mínimos exigidos pela regulamentação para fenólicos totais.

O conteúdo de compostos fenólicos totais dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas no apiário da cidade de Mogi Mirim no período de Setembro de 2009 a Agosto de 2010 também foram similares aos resultados obtidos por TEIXEIRA et al. (2010) em amostras da própolis coletadas nos municípios de Itapecerica, Paula Cândido e Virginópolis (MG).

A variação entre os meses de coleta deve-se aos fatores do desenvolvimento e sazonalidade; índice pluviométrico e sazonalidade; temperatura e altitude entre outros (GOBBO – NETO, LOPES, 2007) que interferem na floração de *B. dracunculifolia* alterando assim a quantidade de matéria – prima disponível assim como a quantidade de compostos fenólicos totais.

Os resultados de composto fenólicos totais das amostras da própolis apresentados nas Figuras 21 e 22 podem ser observados também na Tabela 11 que se encontra no ANEXO 4.

5.3.2 Flavonóides Totais

Flavonóides é uma classe de compostos fenólicos. O teor de flavonóides é um fator muito importante na análise da própolis, pois são os principais compostos fenólicos responsáveis por suas diversas atividades biológicas. A determinação de flavonóides totais foi realizada de acordo com o método descrito no item 4.3.2, baseado no método colorimétrico do cloreto de alumínio (CHANG et al., 2002), sendo a quantificação feita com base no padrão quercetina.

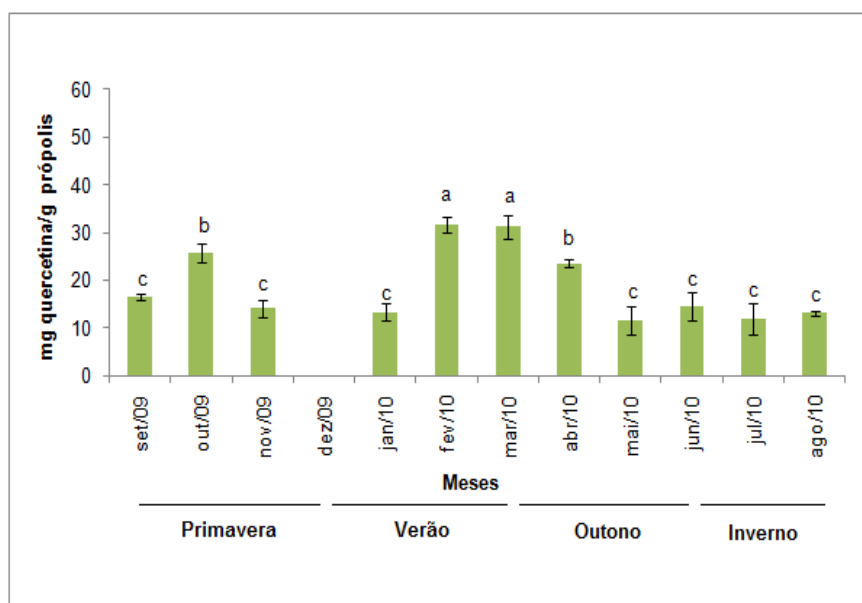


Figura 23. Flavonóides Totais (mg quercetina/g própolis) dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras da própolis coletadas da cidade de Mogi Mirim no período de Setembro 2009 a Agosto de 2010. Média com a mesma letra não apresentam diferença estatisticamente significante entre si ($p \leq 0,05$) pelo Teste de Tukey.

Segundo o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade dos outros Produtos Apícolas, valores abaixo de 1% de flavonóides totais são considerados baixos valores entre 1 e 2 % são considerados medianos e valores acima de 2 % são considerados elevados. As amostras consideradas com alto teor de flavonóides totais com base na regulamentação foram àquelas coletadas

nos meses de Outubro de 2009, Fevereiro, Março e Abril de 2010 (Figura 23). Todas as amostras coletadas nos meses de Setembro e Novembro de 2009, Janeiro, Maio, Junho, Julho e Agosto de 2010 no apiário da cidade de Mogi Mirim apresentaram teores médios de flavonóides totais.

As amostras da própolis coletadas no apiário da cidade de Mogi Mirim coletadas no período de Setembro de 2009 a Agosto de 2010 apresentaram diferenças estatisticamente significativas quanto ao teor de flavonóides totais.

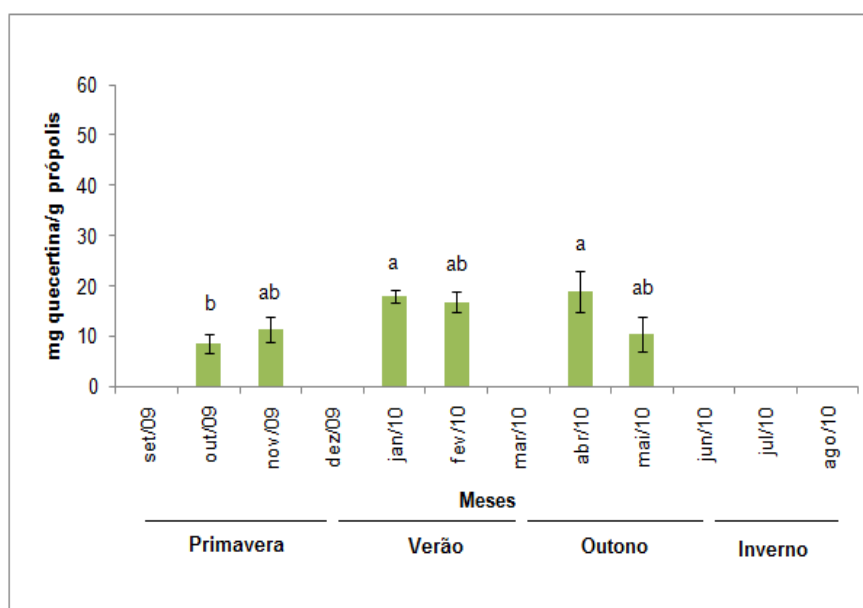


Figura 24. Flavonóides Totais (mg quercetina/g própolis) dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras da própolis coletadas da cidade de Águas de São Pedro no período de Setembro de 2009 a Agosto de 2010. Média com a mesma letra não apresentam diferença estatisticamente significante entre si ($p \leq 0,05$) pelo Teste de Tukey.

Na Figura 24 apresentam-se as amostras da própolis coletadas na cidade de Águas de São Pedro. Nenhuma amostra coletada neste apiário apresentou alto teor de flavonóides totais segundo a regulamentação. As amostras da própolis

coletadas nos meses de Novembro de 2009, Janeiro, Fevereiro, Abril e Maio de 2010 apresentaram teores médios de flavonóides totais e a amostra de Outubro de 2009 apresentou baixo teor de flavonóides totais segundo a regulamentação.

Na determinação de flavonóides totais das amostras da própolis coletadas no apiário de Águas de São Pedro nos meses de Março, Junho, Julho e Agosto de 2010, as soluções testes apresentaram turvação. As soluções foram centrifugadas, deixadas em repouso por 24 horas e, no entanto continuaram turvas. Dessa forma os teores de flavonóides totais dessas amostras não foram determinados já que a turvação interferiu na leitura correta das amostras superestimando o resultado final.

Pode-se observar na Figura 24 que as amostras da própolis coletadas no apiário da cidade de Águas de São Pedro também apresentaram diferenças estatisticamente significativas pelo Teste de Tukey quanto ao teor de flavonóides totais.

Os resultados de flavonóides totais das amostras da própolis apresentados na Figura 23 e 24 também podem ser visualizados na Tabela 12 que encontra-se no ANEXO 4.

Pelos dados apresentados as própolis coletadas nos apiários das cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro atendem a regulamentação quanto aos teores de flavonóides totais apresentando teores médios e altos para a maioria das amostras. Considerando os teores de flavonóides totais, estes extratos também poderiam ser utilizados para consumo humano.

CASTRO et al. (2007) encontraram teores elevados de flavonóides totais em amostras coletadas na região sudeste (Brumadinho – MG) sendo que esses resultados estão de acordo com os resultados obtidos nas amostras da própolis coletadas na cidade de Mogi Mirim. As amostras coletadas na cidade de Águas de São Pedro forneceram teores médios e baixos de flavonóides totais. Esses valores variaram de acordo com os meses de coleta, porém mantiveram-se dentro dos parâmetros estabelecidos pela regulamentação.

MASSUDA (2003) obteve valores de flavonóides totais em amostras de extrato alcoólico da própolis na faixa de 0,53% a 1,49%. SATO (2003) observou variação de 0,0% a 7,04% de flavonóides totais em amostras da própolis de diferentes regiões brasileiras. MARCUCCI et al. (1998) encontraram valores baixos de flavonóides em amostras da própolis brasileiras (0,83% e 0,84%). KUMAZAWA et al. (2004) encontraram teores de flavonóides iguais a 0,05% em amostras da própolis do Brasil. SOUSA et al. (2007) verificaram o teor de flavonóides totais em amostras provenientes no Estado de São Paulo (Franca) e Minas Gerais (região de Passos) e encontraram valores de $0,38 \pm 0,06\%$ em amostra de São Paulo e entre 0,12 e 2,11% para amostras da própolis em Minas Gerais.

Utilizando a técnica de coleta da própolis por CPI (Coletor Própolis Inteligente), SOUZA et al. (2010) encontraram valores de flavonóides totais médios para própolis coletada no outono (1,7% m/m) e baixos teores para própolis coletadas na primavera, verão e inverno (0,4 a 0,5 % - m/m). As amostras da própolis coletadas neste trabalho da cidade de Águas de São Pedro no período de Outubro de 2009 a Agosto de 2010 também apresentaram resultados similares. As amostras da própolis coletadas na cidade de Mogi Mirim apresentaram teores médios e elevados de flavonóides totais.

KUJUMGIEV et al. (1999) encontraram teores altos de flavonóides 42% nas própolis da Bulgária. GONZÁLES, BERNAL (1997), afirmaram que as própolis produzidas nos trópicos são pobres em flavonóides. Devido às diferenças geográficas, amostras da própolis provenientes da Europa contêm maiores teores de flavonóides e ésteres de ácidos fenólicos (BANKOVA et al., 2000). Já os maiores componentes das própolis brasileiras são terpenóides e derivados do ácido *p*-cumárico (MARCUCI, BANKOVA, 1999).

O teste de determinação de flavonóides totais não é específico e não é preciso, pois pode ocorrer variação nos resultados dependendo da composição química da amostra, uma vez que a reação com o alumínio não é igual para todos

os compostos. No entanto o método tem sido comercialmente usado para analisar a própolis para exportação.

5.3.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (CLAE-FR)

As condições para realização dos ensaios em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (CLAE-FR) estão descritas no item 4.3.3.

É possível verificar nas Figuras 25 a 28 que os cromatogramas dos EEPs obtidos por CLAE – FR mostraram perfis de eluição dos compostos similares. Os compostos separados foram identificados utilizando detector de arranjo de diodo comparando-se o tempo de retenção e o espectro de absorção com os padrões disponíveis. Alguns compostos apresentaram tempo de retenção ligeiramente diferente dos padrões e não puderam ser identificados. A análise quantitativa foi feita através do cálculo da área relativa dos picos.

Analisando – se os resultados da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa das amostras da própolis coletadas no apiário de Mogi Mirim (Figuras 25 a 28) foram observados similaridade no perfil de distribuição dos picos, sendo observada variação na quantidade de alguns compostos. Essas amostras também apresentaram perfis similares quanto aos espectros de UV – Visível e CCDAE – FR.

Da mesma forma, verificou que as amostras de Águas de São Pedro apresentaram perfis cromatográficos similares aos obtidos das amostras coletadas na cidade de Mogi Mirim podendo assim dizer que as amostras da própolis de ambas as cidades apresentam perfil cromatográfico característico da própolis do G12. PARK et al. (2002) mostraram no trabalho sobre origem botânica e composição química da própolis brasileira o perfil cromatográfico característico da própolis do G12 e da sua respectiva origem botânica.

Amostras da própolis de duas das três colméias coletadas da cidade de Águas de São Pedro quando submetidas à CLAE – FR não apresentaram perfil

cromatográfico característico da própolis do G12 sendo assim não foram utilizadas para a quantificação dos compostos por CLAE – FR.

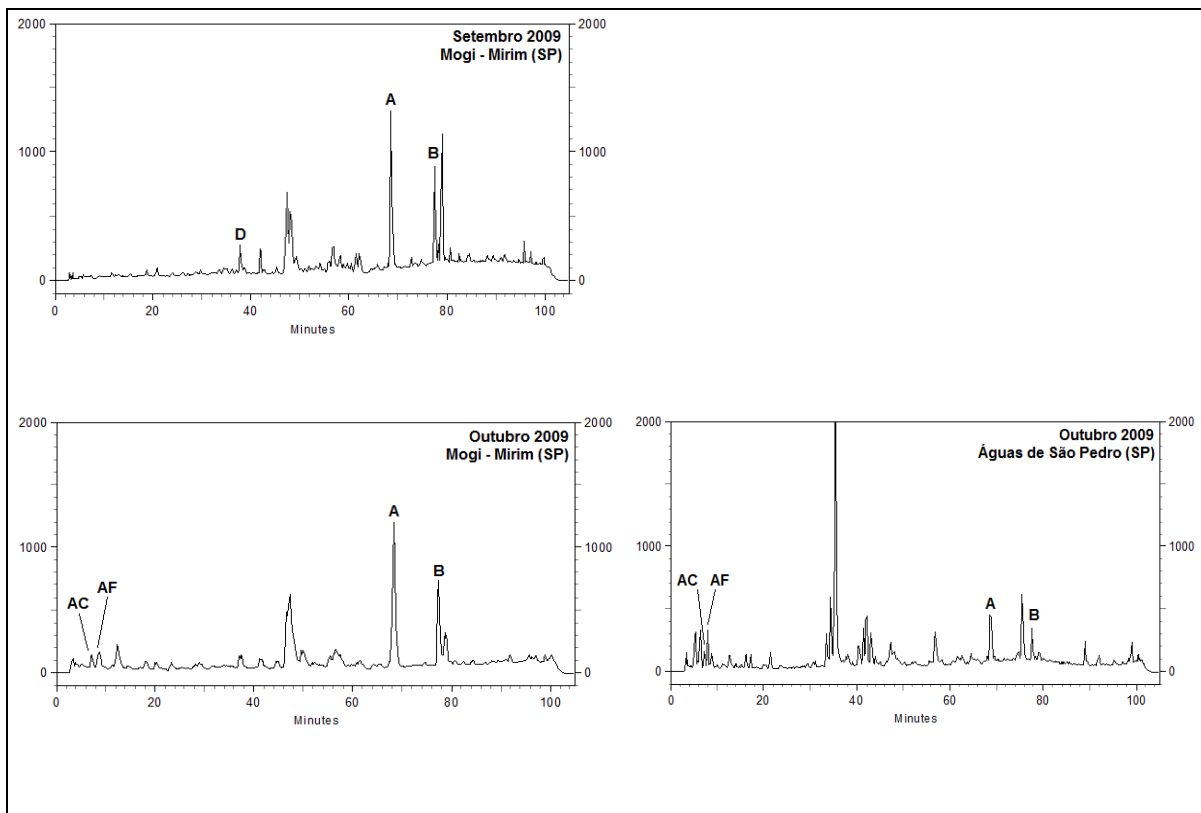


Figura 25. Cromatogramas dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas nos apiários das cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro nos meses de Setembro a Outubro de 2009 analisadas por CLAE – FR. AC = ácido cumárico; AF = ácido ferúlico; D = drupanina; A = artepelin C; B = bacarina.

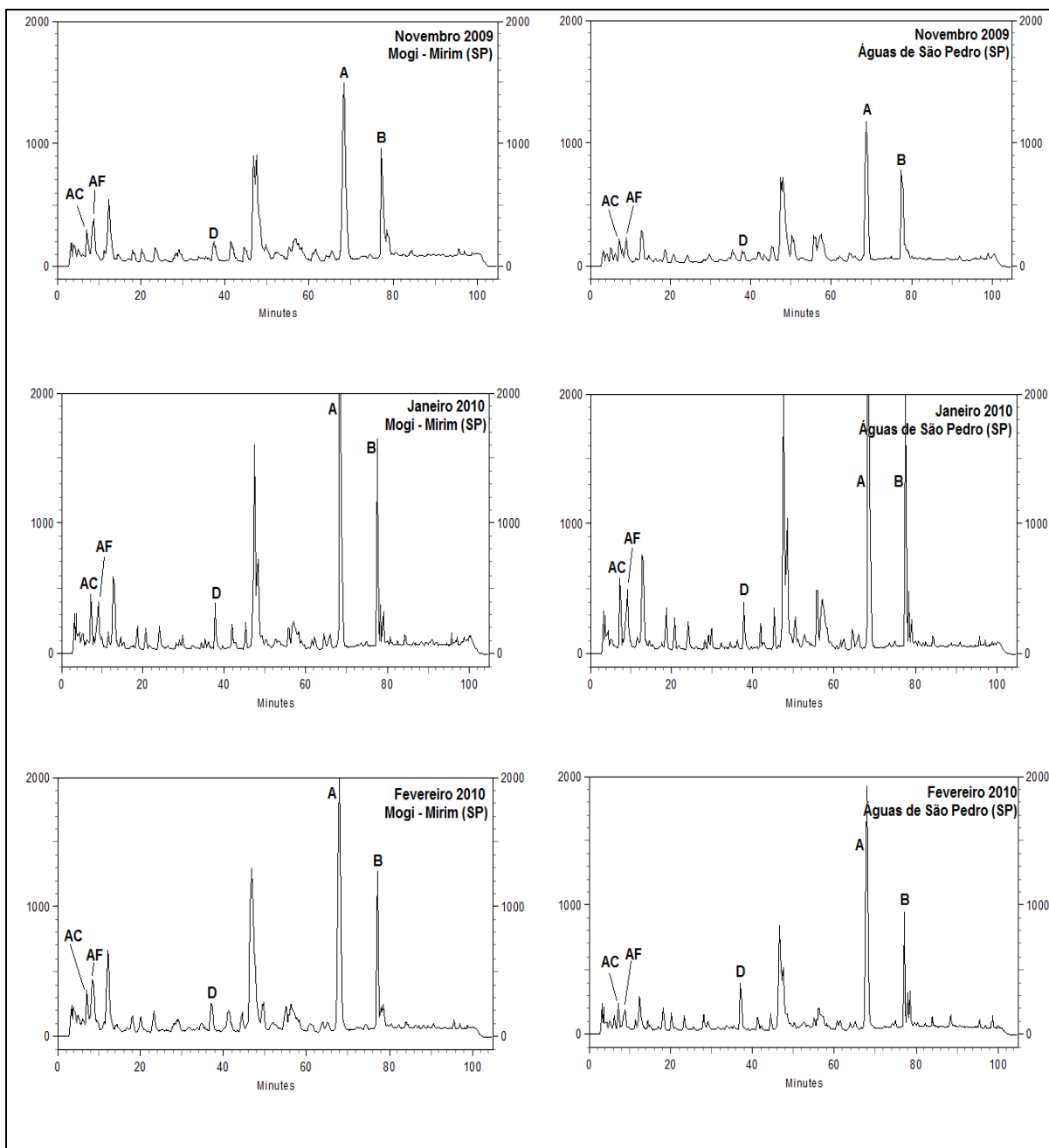


Figura 26. Cromatogramas dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas nos apiários das cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro nos meses de Novembro de 2009 a Fevereiro de 2010 analisadas por CLAE – FR. AC = ácido cumárico; AF = ácido ferúlico; D = drupanina; A = artepelin C; B = bacarina.

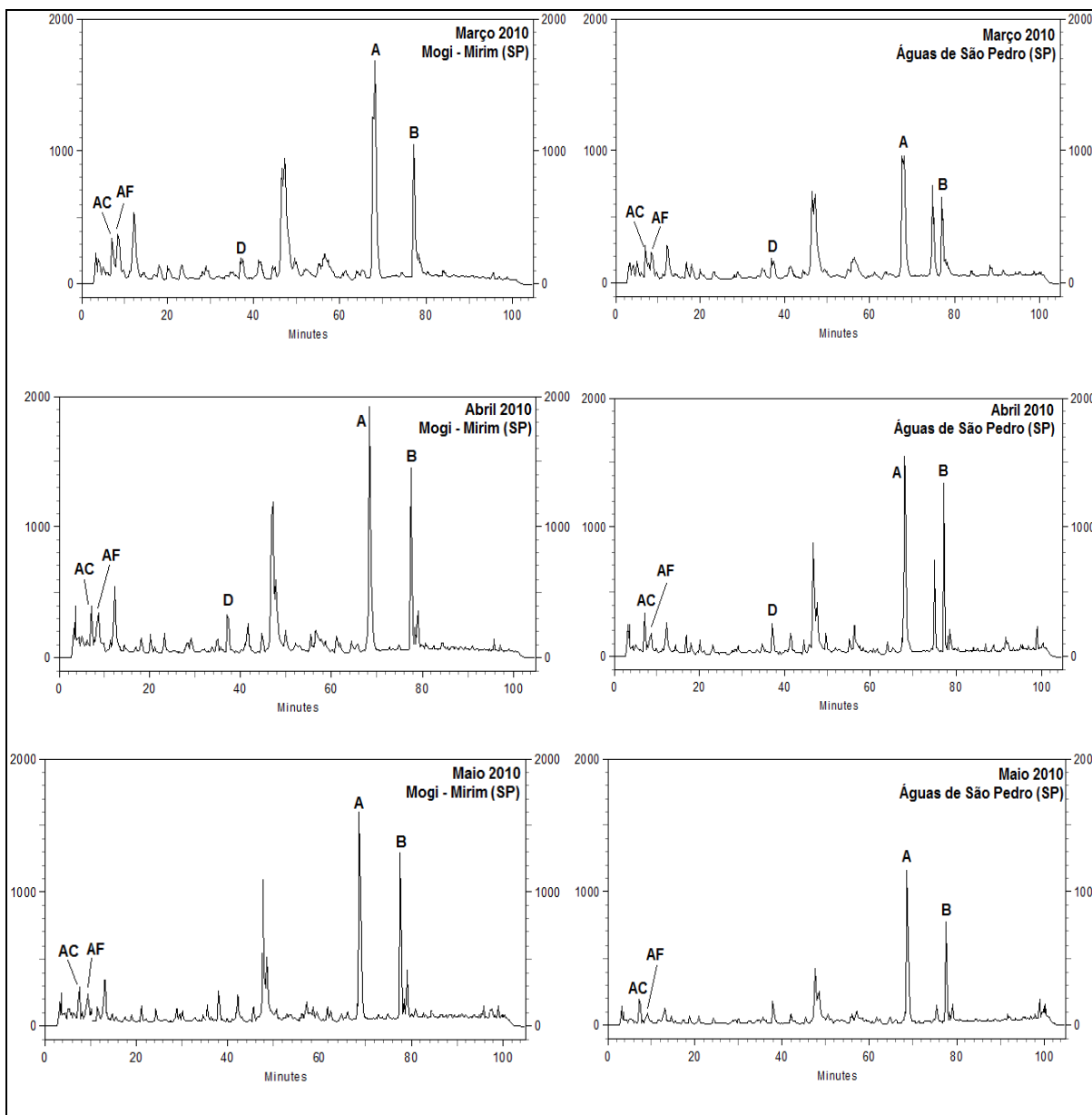


Figura 27. Cromatogramas dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas nos apiários das cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro nos meses de Março de 2010 a Maio de 2010 analisadas por CLAE - FR. AC = ácido cumárico; AF = ácido ferúlico; D = drupanina; A = artepelin C; B = bacarina.

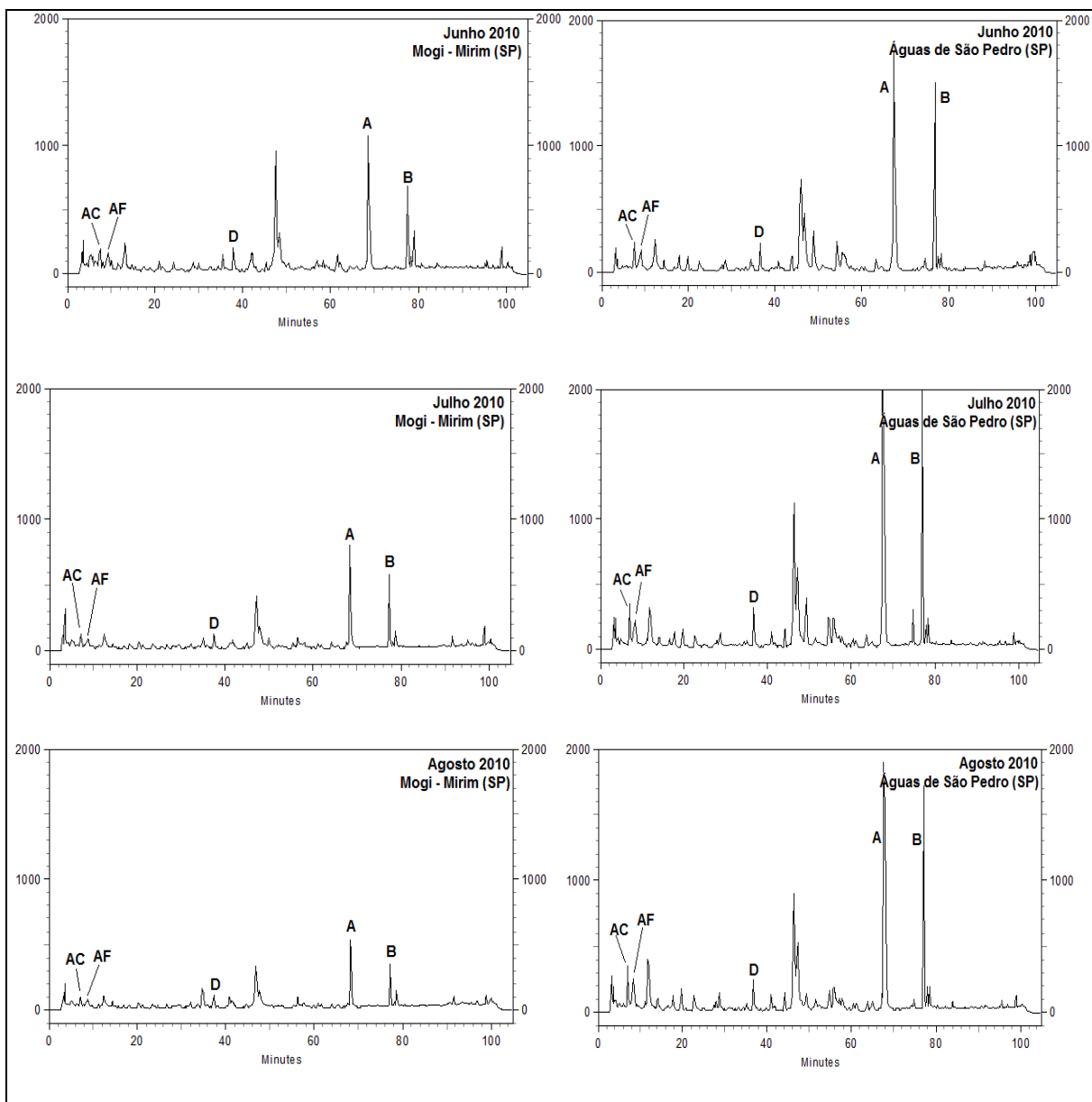


Figura 28. Cromatogramas dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas nos apiários das cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro nos meses de Junho de 2010 a Agosto de 2010 por CLAE – FR. AC = ácido cumárico; AF = ácido ferúlico; D = drupanina; A = artepelin C; B = bacarina.

Nas Tabelas 7 e 8 podemos verificar que as amostras da própolis coletadas das cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro demonstraram ser similares em relação ao tipo de composto fenólico identificado (ácido cumárico, ácido ferúlico, drupanina, artepelin C e bacarina), variando apenas a concentração desses compostos. As amostras da própolis coletadas na cidade de Mogi Mirim que não apresentaram quantidades detectáveis de ácido cumárico e ácido ferúlico foram às amostras do mês de Setembro de 2009 e drupanina nas amostras do mês de Maio de 2010.

Já nas amostras da própolis coletadas da cidade Águas de São Pedro não foi detectado a presença de drupanina nos meses de Outubro de 2009 e Maio de 2010, artepelin C em Julho de 2010. Apesar de algumas diferenças nos cromatogramas, os compostos identificados foram ácido cumárico, ácido ferúlico, drupanina, artepelin C e bacarina na maioria das vezes.

Todos os compostos quantificados ácido cumárico, ácido ferúlico, drupanina, artepelin C e bacarina mostraram maiores teores nas amostras da própolis coletadas nos meses de Janeiro a Abril de 2010 que é equivalente ao verão no Brasil. SIMÕES – AMBROSIO et al. (2010) verificaram que durante o outono e o inverno a quantidade de compostos fenólicos presentes nas amostras da própolis analisadas foram baixas devido ao baixo volume de chuvas e as baixas temperaturas sendo que os maiores teores foram evidenciados na primavera e no verão corroborando assim com os dados desse estudo já que na época de coleta das amostras os índices pluviométricos eram altos.

As amostras coletadas de Setembro de 2009 a Agosto de 2010 das cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro mostraram altas concentrações de artepelin C independente da variação climática. A variação sazonal leva a diminuição de alguns compostos biologicamente ativos, como no caso de fenólicos e é acompanhada pelo aumento de outros, como por exemplo, ácidos diterpênicos (NUNES et al., 2009).

O artepelin C foi identificado em todas as amostras analisadas assim como foi o composto que apresentou maior teor. É um composto de grande interesse

por mostrar algumas propriedades biológicas importantes como imunológica, antioxidante e antimicrobiana. AKAO et al. (2003) demonstraram que artepelin C, drupanina e a bacarina apresentaram propriedades anticancerígenas. KIMOTO et al. (2001a) demonstraram que o artepelin C inibe a peroxidação lipídica e o desenvolvimento de câncer de pulmão em ratos e também previne o câncer de cólon.

O artepelin C foi identificado como sendo um dos compostos majoritários neste tipo da própolis (G12). Vários trabalhos têm demonstrado que os compostos prenilados e os derivados do ácido cinâmico são as substâncias mais abundantes em amostras da própolis das regiões sul e sudeste do Brasil (IKENO et al., 1991; MARCUCCI et al., 2000; TAZAWA et al., 1998).

O ácido *p* - cumárico esteve presente na maioria das amostras da própolis analisadas. Este ácido, também conhecido como ácido – *p* – hidroxicinâmico, é muito comum nos vegetais superiores, pois serve como precursor da biossíntese de diversos compostos fenilpropanoídicos, que compreendem compostos mais simples como outros ácidos e alcoóis hidroxinâmicos e os fenilpropenos, bem como compostos quimicamente mais complexos, como os flavonóides, as lignanas, as neolignanas e as ligninas (ROBBERS et al., 1997 apud IKEGAKI, 2001).

ALENCAR (2002) verificou que a própolis do G12, a que apresenta maior valor econômico no mercado externo, mostrou a presença de compostos fenólicos ácidos como o cumárico, ferúlico, canferol, apigenina, isosakuranetina e canferide sendo observado à presença constante do flavonóide canferide e sempre a uma concentração superior a dos outros compostos fenólicos identificados.

Tabela 7. Teor de compostos fenólicos determinados por CLAE-FR de Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas no apiário da cidade de Mogi Mirim no período de Setembro de 2009 a Agosto de 2010. Média com a mesma letra não apresentam diferença estatisticamente significativa entre si ($p \leq 0,05$) pelo Teste de Tukey. O Teste de Tukey foi feito entre as médias dos resultados do mesmo composto.

		Mogi Mirim (SP)									
		(mg composto/g própolis)									
		ácido cumárico	ácido ferúlico	drupanina		artepelin C		bacarina			
Inverno/ Primavera	Setembro 2009	±	±	11,34 ± 3,91 ^a	116,63 ± 30,25 ^{ab}	12,37 ± 3,22 ^{ab}					
	Primavera										
	Outubro 2009	8,85 ± 3,77 ^{ab}	8,67 ± 3,87 ^{abc}	±	76,75 ± 31,68 ^{bcd}	7,95 ± 2,86 ^{abc}					
	Novembro 2009	16,62 ± 1,51 ^b	13,95 ± 2,25 ^a	4,84 ± 0,88 ^c	40,33 ± 12,64 ^{cd}	14,77 ± 7,36 ^a					
Primavera/ Verão	Dezembro 2009	±	±	±	±	±					
	Verão										
	Janeiro 2010	10,11 ± 6,27 ^{ab}	10,23 ± 4,47 ^{ab}	9,41 ± 2,79 ^{ab}	114,34 ± 45,48 ^{ab}	13,21 ± 5,42 ^a					
	Fevereiro 2010	12,56 ± 3,93 ^a	11,17 ± 3,43 ^{ab}	10,91 ± 3,10 ^a	131,71 ± 37,57 ^a	14,75 ± 7,21 ^a					
Verão/Outono	Março 2010	15,46 ± 4,50 ^a	11,01 ± 2,21 ^{ab}	5,77 ± 1,13 ^{bc}	87,65 ± 26,93 ^{abc}	10,63 ± 1,63 ^{abc}					
	Outono										
	Abril 2010	11,23 ± 2,86 ^{ab}	9,97 ± 1,59 ^{ab}	9,71 ± 3,36 ^{ab}	97,36 ± 50,90 ^{abc}	14,76 ± 6,05 ^a					
	Mai 2010	9 ± 0,66 ^{ab}	5,72 ± 1,33 ^{bcd}	±	68,34 ± 32,47 ^{bcd}	10,85 ± 3,86 ^{abc}					
Outono/ Inverno	Junho 2010	6,96 ± 0,11 ^{ab}	5,08 ± 0,32 ^{bcd}	6,63 ± 0,89 ^{abc}	31,54 ± 26,16 ^d	8,08 ± 6,40 ^{abc}					
	Inverno										
	Julho 2010	4,54 ± 0,61 ^b	3,15 ± 0,83 ^d	3,27 ± 0,45 ^c	26,71 ± 13,56 ^d	4,74 ± 2,56 ^{bc}					
	Agosto 2010	3,4 ± 0,22 ^b	2,74 ± 0,24 ^{cd}	3,42 ± 0,58 ^c	22,46 ± 10,68 ^d	3,69 ± 1,25 ^c					

Tabela 8. Teor de compostos fenólicos determinados por CLAE-FR de Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas no apiário da cidade de Águas de São Pedro no período de Setembro de 2009 a Agosto de 2010. Média com a mesma letra não apresentam diferença estatisticamente significativa entre si ($p \leq 0,05$) pelo Teste de Tukey. O Teste de Tukey foi feito entre as médias dos resultados do mesmo composto.

		Águas de São Pedro (SP)									
		(mg composto/g própolis)									
		ácido cumárico		ácido ferúlico		drupanina		artepelin C		baccarina	
Inverno/ Primavera	Setembro 2009	±		±		±		±		±	
	Primavera										
	Outubro 2009	6,22	± 1,99 ^b	4,4	± 1,27 ^b	±		27,97	± 14,75 ^c	12,26	± 19,05 ^a
	Novembro 2009	10,21	± 3,40 ^{ab}	7,58	± 2,52 ^{ab}	3,49	± 1,08 ^c	56,43	± 38,34 ^{bc}	10,16	± 4,20 ^a
Primavera/ Verão	Dezembro 2009	±		±		±		±		±	
	Verão										
	Janeiro 2010	15,77	± 4,15 ^a	10,44	± 4,32 ^a	11,34	± 4,80 ^{ab}	120,04	± 51,39 ^a	18,32	± 7,14 ^a
	Fevereiro 2010	12,95	± 4,40 ^a	9	± 4,32 ^{ab}	13,9	± 2,41 ^a	100,25	± 18,08 ^{ab}	14,56	± 4,80 ^a
Verão/Outono	Março 2010	16,1	± 4,08 ^a	7,72	± 1,22 ^{ab}	5,36	± 0,34 ^c	43,08	± 27,78 ^{bc}	8,32	± 1,11 ^a
	Outono										
	Abril 2010	10,72	± 0,28 ^{ab}	4,48	± 0,88 ^{ab}	6,62	± 0,56 ^{bc}	32,69	± 35,18 ^{bc}	14,63	± 0,48 ^a
	Maio 2010	7,57	± 1,24 ^{ab}	3,39	± 0,56 ^b	±		60,86	± 11,32 ^{abc}	10,2	± 1,76 ^a
Outono/ Inverno	Junho 2010	8,09	± 0,54 ^{ab}	3,88	± 1,64 ^{ab}	5,44	± 0,16 ^c	73,63	± 4,91 ^{abc}	14,3	± 1,03 ^a
	Inverno										
	Julho 2010	11,13	± 0,53 ^{ab}	7,14	± 3,11 ^{ab}	7,9	± 0,78 ^{bc}	±		23,29	± 2,26 ^a
	Agosto 2010	12,88	± 2,18 ^{ab}	5,42	± 0,86 ^{ab}	7,75	± 1,60 ^{bc}	101,33	± 29,42 ^{ab}	19,7	± 3,46 ^a

MARCUCCI et al. (1998) analisaram a composição da própolis de colméias de duas regiões do Estado de São Paulo, uma delas com grande quantidade de *Pinus sp* e outra em região de floresta de *Eucalyptus sp*. Foi demonstrado similaridade quanto ao aspecto qualitativo, com presença de ácido caféico, ferúlico e *p*-cumárico, sendo que a maior concentração foi encontrada nas própolis de colméias localizadas em região de floresta de eucalipto que também apresentaram maior quantidade de flavonóides.

No presente estudo não foi verificada a vegetação da região de coleta das amostras na cidade de Mogi Mirim e Águas de São Pedro. Se esta variável tivesse sido investigada provavelmente seria possível correlacionar o aspecto qualitativo dos compostos encontrados com a possível origem botânica da própolis dessas regiões verificando dessa maneira as características particulares das amostras coletadas em cada região.

Observou-se pouca variabilidade na composição química das própolis coletadas nos dois apiários da cidade de Mogi Mirim e Águas de São Pedro, sendo que os compostos ácidos cumárico, ácido ferúlico, artepelin C foram identificados e já haviam sido descritos na maior parte dos trabalhos anteriores. Fatores sazonais influenciam na quantidade dos compostos presentes nas amostras da própolis.

O teor de artepelin C nas própolis mostrou-se muito maior nas amostras coletadas nos meses correspondentes ao verão para os dois apiários estudados. Ficando evidente que esse é um composto que está presente na própolis do G12 independente da época de coleta e apresenta seus níveis mais elevados durante o verão.

TEIXEIRA et al. (2010); SIMÔES – AMBROSIO et al. (2010) observaram que o artepelin C é identificado durante todo o ano variando apenas a concentração do composto em relação à época do ano. Os maiores valores encontrados foram referentes aos meses que correspondem ao verão.

5.4 Determinação da Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana da própolis sobre o micro - organismo patogênico gram positivo *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi testada utilizando o material preparado como descrito no item 4.4. Os resultados obtidos encontram - se na Tabela 9. Nas Figuras 29 a 34 é possível observar a formação do halo de inibição das amostras da própolis coletadas de Setembro de 2009 a Agosto de 2010 nos apiários localizados nas cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro.

O resultado obtido baseia-se na medida do halo de inibição do crescimento do micro - organismo *S. aureus* ATCC 25923. A diminuição da atividade antimicrobiana dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas da cidade de Mogi Mirim nos meses de Março a Agosto de 2010 e das amostras da própolis coletadas da cidade de Águas de São Pedro nos meses de Fevereiro a Agosto de 2010 provavelmente ocorreram por haver uma concentração menos dos compostos bioativos na fonte vegetal. (CASTRO et al., 2007) verificaram em amostras da própolis coletadas em Brumadinho – MG, nos meses de Agosto e Setembro, reflete um aumento da atividade antimicrobiana, provavelmente por haver uma concentração dos princípios ativos na fonte vegetal, pois este período correspondeu à estação seca na região sudeste.

A Tabela 9 ilustra que a maioria dos Extratos Etanólicos da Própolis inibiu o crescimento da linhagem de *S. aureus* ATCC 25923 lembrando que os discos que foram impregnados com o EEP foram mantidos por 24 horas em dessecador para eliminação de qualquer resíduo etanólico para evitar que o resíduo etanólico interferisse no crescimento da bactéria patogênica.

As maiores atividades inibitórias foram observadas nas amostras da própolis coletadas nos meses de Novembro de 2009, Janeiro e Fevereiro de 2010 nos apiários das cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro sendo que desses resultados os meses correspondem ao verão.

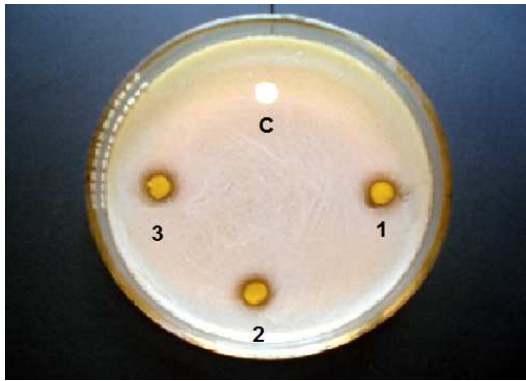
As amostras da própolis que apresentaram as maiores atividades inibitórias quanto ao crescimento do micro – organismo *S. aureus* ATCC 25923 não continham os teores mais elevados de compostos fenólicos totais, mas foram aquelas que apresentaram maior concentração do composto artepelin C na análise por CLAE - FR.

Segundo AGA et al. (1994) a presença do artepelin C é um dos grandes responsáveis pela alta atividade antimicrobiana das própolis brasileiras. Os autores relataram que essa atividade está associada ao número de resíduo prenil existente na molécula, sendo que quanto maior o seu número, maior será sua atividade biológica já que diversos derivados do ácido hidrocínâmico possuem forte atividade antimicrobiana. ALENCAR (2002) observou que a própolis do G12, apresenta vários derivados do ácido hidroxicinâmico junto com outros flavonóides.

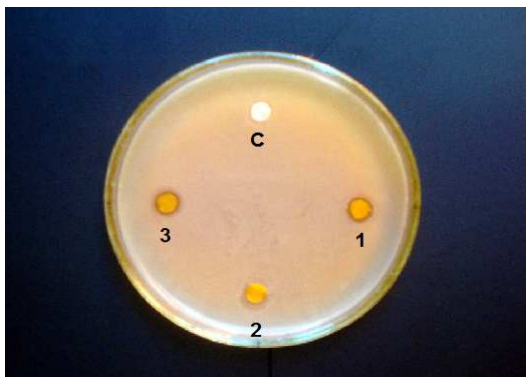
As diferenças no comportamento dos Extratos Etanólicos da Própolis em relação à atividade inibitória do micro-organismo, apresentado na Tabela 9 pode ser justificado segundo HEGAZI et al. (2000) pela variação da composição química das própolis e do efeito sinérgico dos diferentes compostos fenólicos. As áreas geográficas de coleta das amostras diferem quanto à flora vegetal, o que reflete nos constituintes das própolis, por isso, as amostras podem apresentar comportamentos antimicrobianos diferentes entre si.

Alguns compostos responsáveis pela atividade antimicrobiana já foram identificados em trabalhos anteriores. BANKOVA et al. (1996) relacionou a atividade contra *S. aureus* da própolis do Estado do Paraná a ácidos diterpênicos. MACIEJEWICZ, MERESTA, (1999) verificaram que os flavonóides canferide, galangina, apigenina, quercetina, ramnetina, pinocembrina e camferol apresentaram alta atividade bacteriostática contra *S. aureus*.

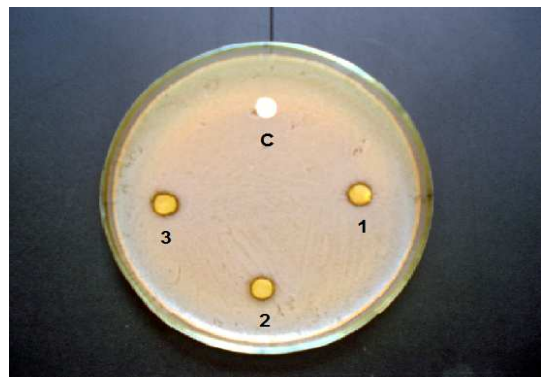
SFORCIN et al. (2000) observaram diferença na atividade antimicrobiana entre diferentes estações sendo que a própolis apresentou excelente atividade antimicrobiana sobre as bactérias Gram - positivas e limitada atividade contra as bactérias Gram - negativas. Os autores não observaram diferença em relação à estação em que a própolis foi coletada.



Atividade Antimicrobiana dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas na cidade de Mogi Mirim em Setembro de 2009.

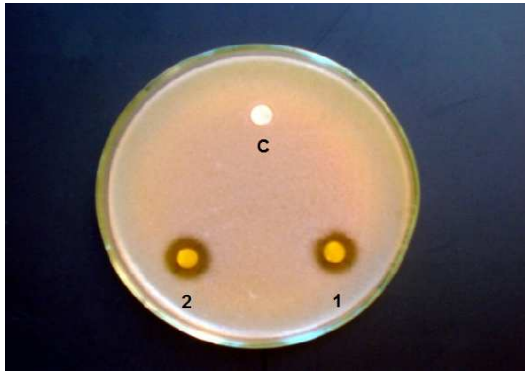


Atividade Antimicrobiana dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas na cidade de Mogi Mirim em Outubro de 2009.

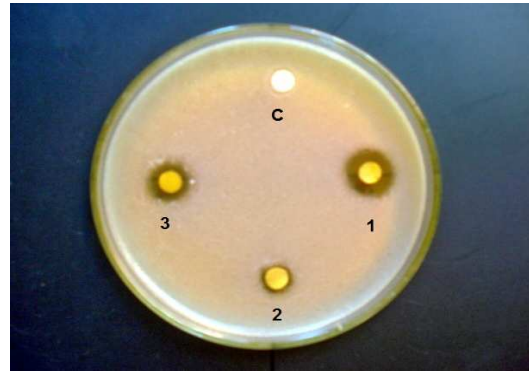


Atividade Antimicrobiana dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas na cidade de Águas de São Pedro em Outubro de 2009.

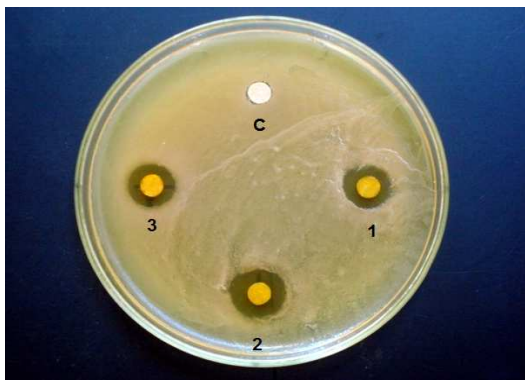
Figura 29. Atividade Antimicrobiana dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas das cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro utilizando-se a linhagem de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, nos meses de Setembro de 2009 e Outubro de 2009. C = disco controle tratado com etanol 70% e depois seco. A numeração abaixo dos discos 1, 2 e 3 são referentes à identificação da colméia utilizada para coleta da própolis.



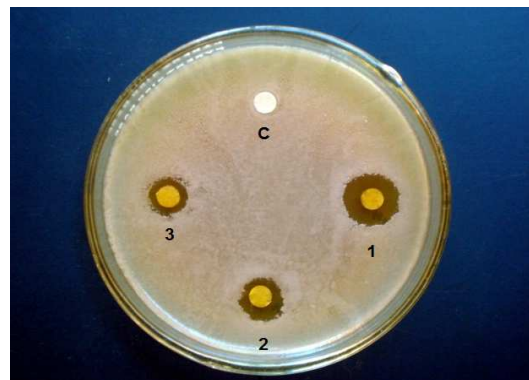
Atividade Antimicrobiana dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas na cidade de Mogi Mirim em Novembro de 2009.



Atividade Antimicrobiana dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas na cidade de Águas de São Pedro em Novembro de 2009.

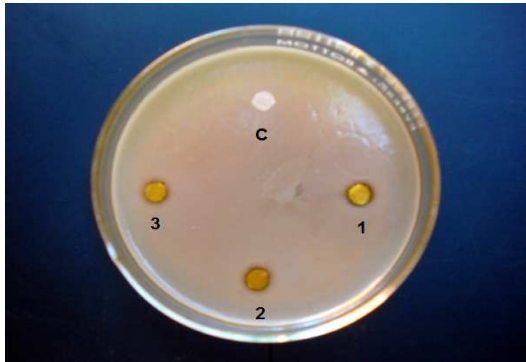


Atividade Antimicrobiana dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas na cidade de Mogi Mirim em Janeiro de 2010.

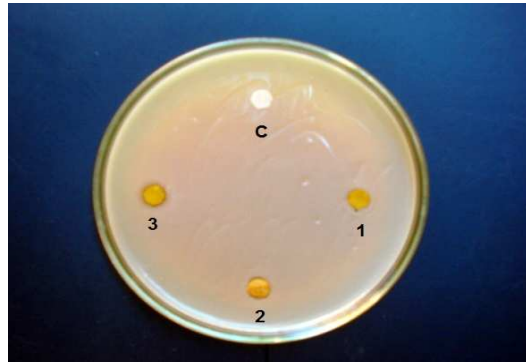


Atividade Antimicrobiana dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas na cidade de Águas de São Pedro em Janeiro de 2010.

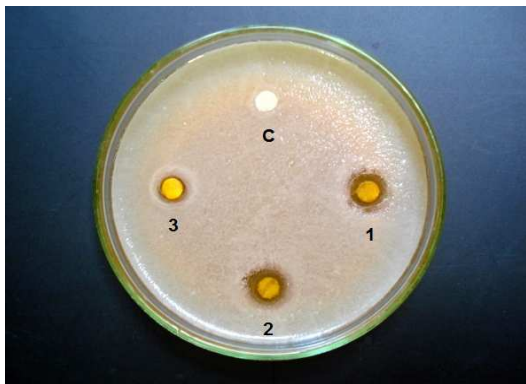
Figura 30. Atividade Antimicrobiana dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas das cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro utilizando-se a linhagem de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, nos meses de Novembro de 2009 e Janeiro de 2010. C = disco controle tratado com etanol 70% e depois seco. A numeração abaixo dos discos 1, 2 e 3 são referentes à identificação da colméia utilizada para coleta da própolis.



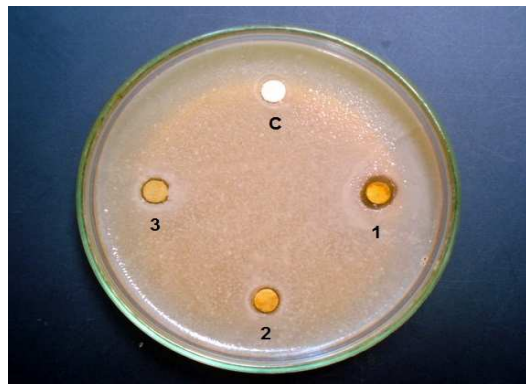
Atividade Antimicrobiana dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas na cidade de Mogi Mirim em Fevereiro de 2010.



Atividade Antimicrobiana dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas na cidade de Águas de São Pedro em Fevereiro de 2010.

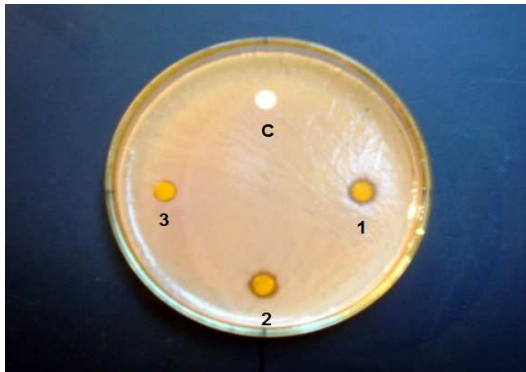


Atividade Antimicrobiana dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas na cidade de Mogi Mirim em Março de 2010.

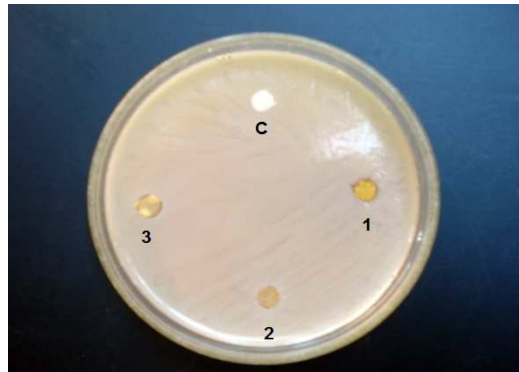


Atividade Antimicrobiana dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas na cidade de Águas de São Pedro em Março de 2010.

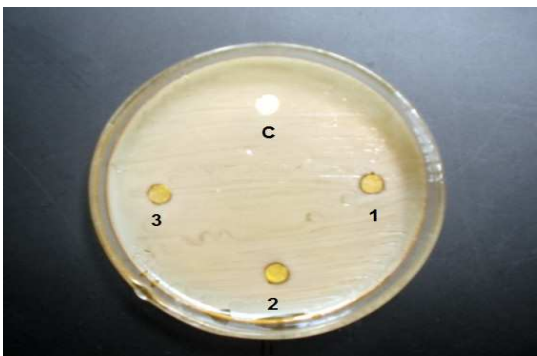
Figura 31. Atividade antimicrobiana dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas das cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro utilizando-se a linhagem de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, nos meses de Fevereiro de 2010 e Março de 2010. C = disco controle tratado com etanol 70% e depois seco. A numeração abaixo dos discos 1, 2 e 3 são referentes à identificação da colméia utilizada para coleta da própolis.



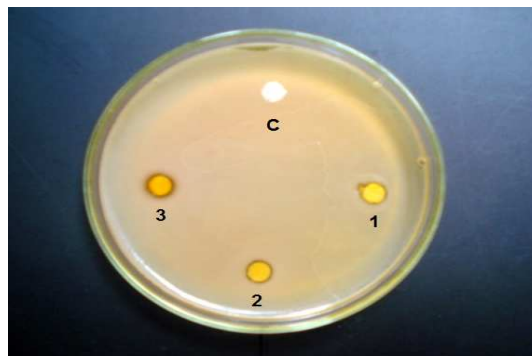
Atividade Antimicrobiana dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas na cidade de Mogi Mirim em Abril de 2010.



Atividade Antimicrobiana dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas na cidade de Águas de São Pedro em Abril de 2010.

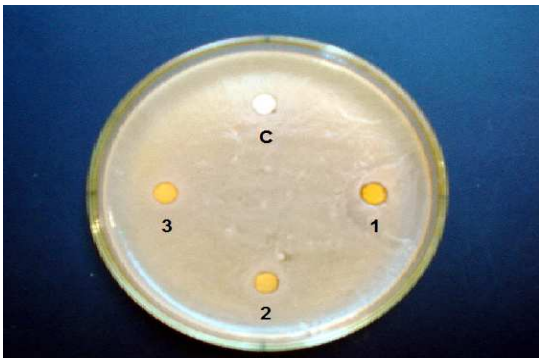


Atividade Antimicrobiana dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas na cidade de Mogi Mirim em Maio de 2010.

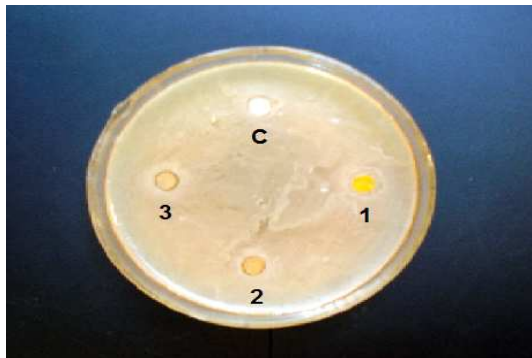


Atividade Antimicrobiana dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas na cidade de Águas de São Pedro em Maio de 2010.

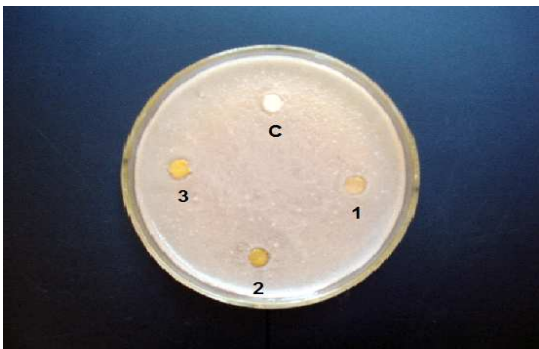
Figura 32. Atividade Antimicrobiana dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas das cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro utilizando-se a linhagem de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, nos meses de Abril de 2010 e Maio de 2010. C = disco controle tratado com etanol 70% e depois seco. A numeração abaixo dos discos 1, 2 e 3 são referentes à identificação da colméia utilizada para coleta da própolis.



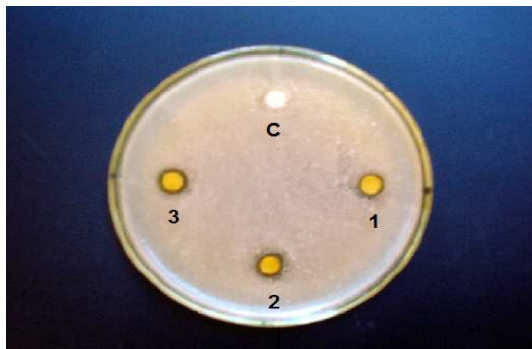
Atividade Antimicrobiana dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas na cidade de Mogi Mirim em Junho de 2010.



Atividade Antimicrobiana dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas na cidade de Águas de São Pedro em Junho de 2010.



Atividade Antimicrobiana dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas na cidade de Mogi Mirim em Julho de 2010.

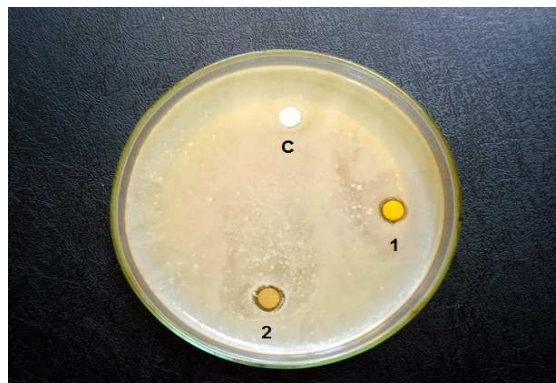


Atividade Antimicrobiana dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas na cidade de Águas de São Pedro em Julho de 2010.

Figura 33 Atividade Antimicrobiana dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas das cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro utilizando-se a linhagem de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 nos meses de Junho de 2010 e Julho de 2010. C = disco controle tratado com etanol 70% e depois seco. A numeração abaixo dos discos 1, 2 e 3 são referentes à identificação da colméia utilizada para coleta da própolis.



Atividade Antimicrobiana dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas na cidade de Mogi Mirim em Agosto de 2010.



Atividade Antimicrobiana dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas na cidade de Águas de São Pedro em Agosto de 2010.

Figura 34 Atividade Antimicrobiana dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas das cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro utilizando-se a linhagem de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 no mês de Agosto de 2010. C = disco controle tratado com etanol 70% e depois seco. A numeração abaixo dos discos 1, 2 e 3 são referentes à identificação da colméia utilizada para coleta da própolis.

Tabela 9. Atividade Antimicrobiana dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas nas cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro no período de Setembro de 2009 a Agosto de 2010. Média com a mesma letra não apresentam diferença estatisticamente significativa entre si ($p \leq 0,05$) pelo Teste de Tukey. O Teste de Tukey foi feito entre as médias das amostras coletadas no mesmo apiário.

Local de coleta da própolis	Período Sazonal (mês/ano)										
	Setembro 2009	Outubro 2009	Novembro 2009	Janeiro 2010	Fevereiro 2010	Março 2010	Abril 2010	Mai 2010	Junho 2010	Julho 2010	Agosto 2010
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923* Halo de Inibição (mm)											
Mogi Mirim	1,0± 0 b	0,4±0,5 c	2,8±0,4 a	2,8±1,0 a	1,3±0,7 b	0,8±0,4 bc	0,8±0,7 bc	0,3±0,5 c	nd c	nd c	0,3±0,5 c
Águas de São Pedro		0,9±0,2 b	1,9±0,8 a	2,2±1,5 a	0,2±0,4 bc	0,4±0,5 bc	nd c	nd c	nd c	0,8±0,3 bc	0,6±0,5 bc

* Linhagem doada pelo Laboratório de Patologia Clínica do HC da Unicamp.

nd = não detectado.

5.4 Determinação da Capacidade Antioxidante

A atividade sequestrante de radicais livres dos EEP foi determinada pela perda de coloração da mistura da reação do radical livre DPPH com os EEP, conforme descrito no item 4.5.

A capacidade antioxidante dos EEP das amostras coletadas nos apiários das cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro, no período de Setembro de 2009 a Agosto de 2010 estão ilustrados nas Figuras 35 e 36 respectivamente.

As amostras da própolis coletadas nos meses de Setembro, Outubro e Novembro de 2009 e também Janeiro e Fevereiro de 2010 apresentaram maior capacidade antioxidante e não apresentaram diferença significativa entre si, já as amostras da própolis coletadas nos meses de Março a Agosto de 2010 a variação da capacidade antioxidante foi menor havendo diferença significativa entre as amostras.

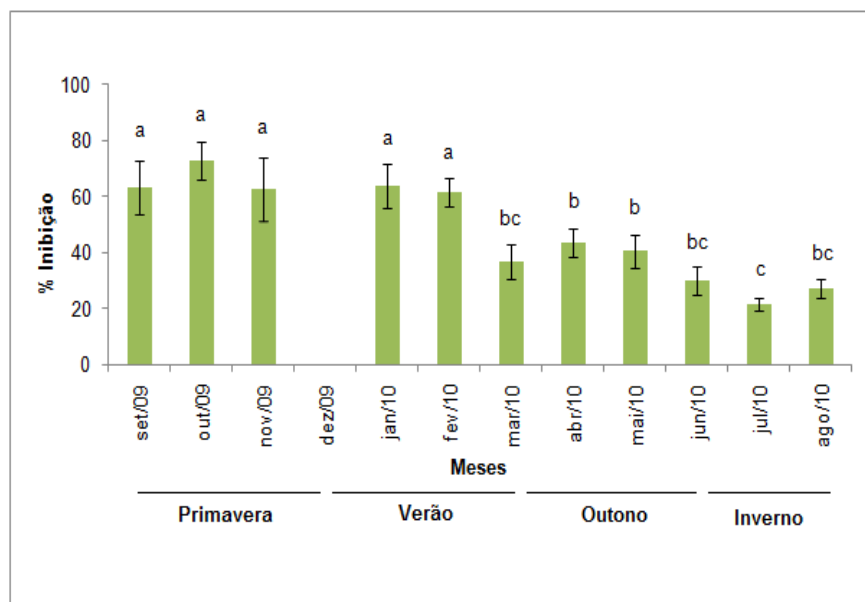


Figura 35. Capacidade Antioxidante (% Inibição) dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas da cidade de Mogi Mirim no período de Setembro de 2009 a Agosto de 2010. Média com a mesma letra não apresentam diferença estatisticamente significativa entre si ($p \leq 0,05$) pelo Teste de Tukey.

As amostras da própolis coletadas no apiário da cidade de Águas de São Pedro nos meses de Janeiro, Fevereiro, Julho e Agosto de 2010 foram as que apresentaram maior capacidade antioxidante e não apresentaram diferença significativa entre si. As amostras da própolis coletadas nos meses de Outubro e Novembro de 2009 e também Março, Abril, Maio e Junho de 2010 mostraram capacidade antioxidante inferior aos demais meses.

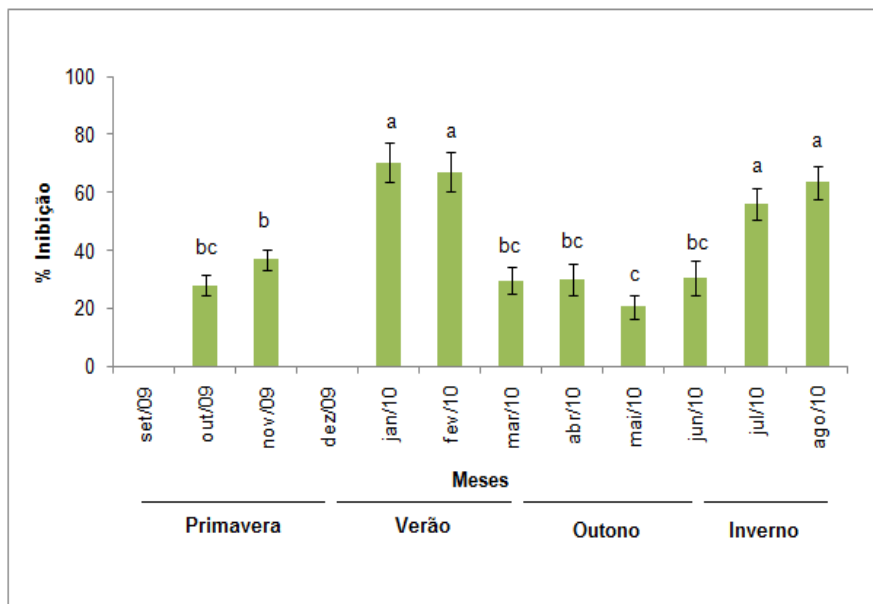


Figura 36. Capacidade Antioxidante (% Inibição) dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas da cidade de Águas de São Pedro no período de Setembro de 2009 a Agosto de 2010. Média com a mesma letra não apresentam diferença estatisticamente significativa entre si ($p \leq 0,05$) pelo Teste de Tukey.

Pode-se observar que as amostras da própolis que apresentaram maior capacidade antioxidante foram às mesmas que continham um teor maior de compostos fenólicos totais. As amostras da própolis que foram coletadas no apiário de Mogi Mirim nos meses de Setembro, Outubro e Novembro de 2009 e também Janeiro e Fevereiro de 2010 foram as que apresentaram maior capacidade antioxidante e também maior atividade antimicrobiana.

Nas própolis coletadas no apiário de Águas de São Pedro não foi observado correlação entre as amostras que apresentaram menor capacidade oxidante e aquelas que mostraram maior atividade antimicrobiana.

Os resultados de capacidade antioxidante das amostras da própolis analisadas foram coerentes em relação à concentração de artepelin C encontrada. TEIXEIRA et al. (2010) observaram que em consequência da variação da composição química das amostras da própolis analisadas mensalmente houve uma variação na atividade antioxidante ao longo do ano, variando de 48 a 66% sendo que estes resultados mostraram diferenças significativas.

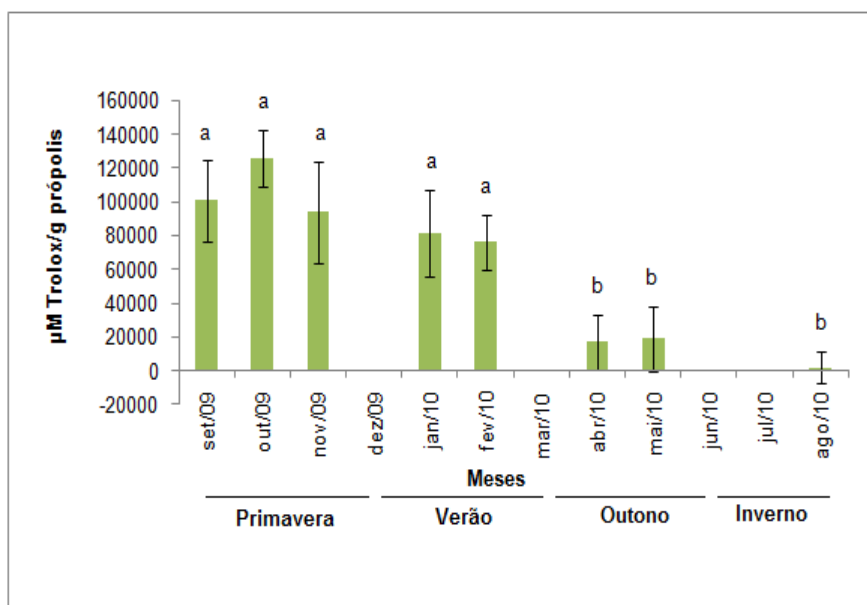


Figura 37. Capacidade Antioxidante (μM equivalente Trolox/g própolis) dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas da cidade de Mogi Mirim no período de Setembro de 2009 a Agosto de 2010. Média com a mesma letra não apresentam diferença estatisticamente significativa entre si ($p \leq 0,05$) pelo Teste de Tukey.

Quando os resultados de capacidade antioxidante apresentados em % Inibição (Figura 35 e 36) são comparados com os mesmos resultados expressos em equivalente de Trolox (Figura 37 e 38) observou - se que somente os

resultados com capacidade antioxidante acima de 50% de inibição podem ser expressos em equivalente de Trolox. Abaixo de 50% de inibição não foi possível determinar a capacidade antioxidante em equivalente de Trolox, pois os resultados não se apresentam dentro da curva de calibração.

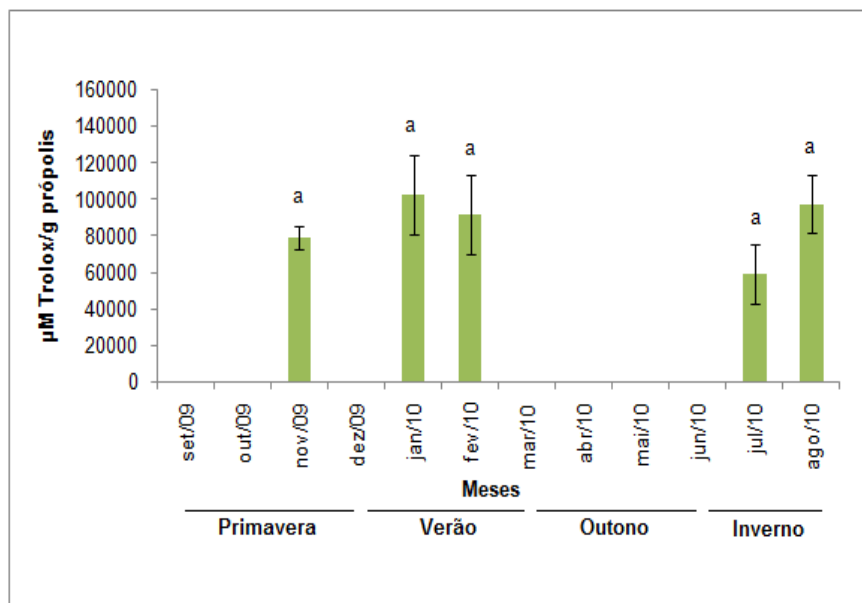


Figura 38. Capacidade Antioxidante (μM equivalente Trolox/g própolis) dos Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas da cidade de Águas de São Pedro no período de Setembro de 2009 a Agosto de 2010. Média com a mesma letra não apresentam diferença estatisticamente significativa entre si ($p \leq 0,05$) pelo Teste de Tukey.

Antioxidantes podem ser usados para preservar a qualidade dos alimentos da deterioração de lipídeos. Portanto, podem ser usados para inibir a deterioração lipídica e desempenhar um papel importante na indústria de alimentos (TEIXEIRA et al., 2010).

5.5 Análises Estatísticas de Correlação entre Compostos encontrados nas Própolis, Capacidade Antioxidante e da Atividade Antimicrobiana

Na Tabela 10 apresentam – se os coeficientes de correlação e os p – valores para a análise de correlação de Pearson com nível de significância de 5%. Os resultados obtidos estão de acordo com SILVA et al. (2006) que demonstraram relação entre atividade antioxidante dos Extratos Etanólicos da Própolis de diferentes regiões do Brasil e o seu conteúdo de fenólicos totais. A correlação entre a atividade antioxidante e o conteúdo de flavonóides totais também foi observada. Os autores constataram que a correlação entre flavonóides totais foi inferior a observada em relação ao conteúdo de fenólicos totais.

Através dos resultados identificou-se que há correlação significativa e positiva entre os valores de capacidade antioxidante e fenólicos totais. Não foi observada correlação entre a capacidade antioxidante das amostras e flavonóides totais, no entanto, houve correlação desta propriedade com as concentrações do composto artepelin C. Desta forma, pode-se sugerir que a capacidade antioxidante das amostras avaliadas é diretamente proporcional à concentração de compostos fenólicos totais, estando mais correlacionada a compostos como o artepelin C do que com flavonóides. SHIMIZU et al. (2004) concluíram que o Artepelin C é um antioxidante biodisponível, corroborando assim com os resultados encontrados.

Tabela 10. Análise Estatística de correlação entre os parâmetros avaliados de fenólicos totais, flavonóides totais, artepelin C, capacidade antioxidante e atividade antimicrobiana.

Correlação	Coefficiente de correlação	p - valor
Capacidade Antioxidante		
Fenólicos Totais	0,493	< 0,0001
Flavonóides Totais	0,102	0,193
artepelin C	0,697	< 0,0001
Atividade Antimicrobiana		
Fenólicos Totais	- 0,01	0,896
Flavonóides Totais	- 0,08	0,304
artepelin C	0,414	< 0,0001
Capacidade Antioxidante X Atividade Antimicrobiana	0,452	< 0,0001

p – valor (< 0,0001) são significativos

A atividade antimicrobiana apresentou correlação não significativa com fenólicos totais. A avaliação da correlação existente entre a atividade antimicrobiana e flavonóides totais indicou falta de correlação significativa e para o artepelin C indicou uma boa correlação positiva. Desta forma, pode-se sugerir que a atividade antimicrobiana é diretamente proporcional à concentração de compostos fenólicos como o artepelin C, no entanto não apresenta correlação com os compostos fenólicos do grupo dos flavonóides.

CASTRO et al. (2007) observaram que os maiores resultados da atividade antibacteriana estiveram também associados com os maiores teores de fenólicos totais e flavonóides totais, demonstrando relação entre atividade bacteriana e o teor de compostos fenólicos para a própolis do G12 corroborando assim com os resultados encontrados.

SALOMÃO et al. (2008) correlacionaram atividade antimicrobiana com alguns compostos da própolis separados, identificados e quantificados por CLAE – FR. Os autores constataram correlação positiva entre a atividade antimicrobiana do *S. aureus* com o composto ácido *p* – cumárico e demonstraram o aumento da concentração do ácido *p* – cumárico leva a um maior efeito bactericida.

6. CONCLUSÃO

1 – As análises de espectrofotometria de UV-visível e CCDAE - FR quando utilizadas em conjunto servem como um primeiro indicador para a classificação das própolis.

2 – As própolis dos apiários de Mogi Mirim e Águas de São Pedro podem ser classificadas como própolis do G12.

3 – A maior parte das amostras da própolis coletadas nos apiários de Mogi Mirim e Águas de São Pedro apresentaram os seguintes compostos: ácido cumárico, ácido ferúlico, drupanina, artepelin C e bacarina.

4 - Através da análise de correlação de Pearson foram possíveis verificar uma correlação positiva e significativa em relação à capacidade antioxidante e o teor de fenólicos totais assim como para capacidade antioxidante e artepelin C.

5 - A sazonalidade influenciou a composição química quantitativa da própolis em relação ao composto artepelin C e também a atividade biológica. A alteração na concentração de compostos bioativos oriundos das fontes vegetais destas própolis demonstrou que a atividade antimicrobiana e antioxidante varia em função do período de coleta e da sazonalidade local sendo o melhor período de coleta o verão nos meses de Dezembro a Março.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

1 – Estudo do efeito da vegetação presente na região, temperatura média mensal, índice pluviométrico mensal, índices de poluição atmosférica, efeito da restrição de nutrientes no solo na composição química das própolis de diferentes regiões do Brasil.

2 – Estudo da estabilidade dos Extratos Etanólicos da Própolis quanto às suas propriedades biológicas.

3 – Aplicação dos Extratos Etanólicos da Própolis *in vivo* para confirmação das atividades biológicas.

4 – Construção de uma planta piloto com as condições ideais para otimização da produção dos Extratos da Própolis.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGA, H.; SUGIMOTO, T.; KURIMOTO, M.; NAKAJIMA, S. Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 58, n. 5, p. 945 - 946, 1994.

AKAO, Y.; MARUYAMA, H.; MATSUMOTO, K.; OHGUCHI, K.; NISHIZAWA, K.; SAKAMOTO, Y.; ARAKI, Y.; MISHIMA, S.; NOZAWA, Y. Cell growth inhibitory effect of cinnamic acid derivatives from propolis of human tumor cell lines. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, 2003.

ALENCAR, S.M. **Estudo fitoquímico da origem botânica da própolis e avaliação da composição química de mel de *Apis mellifera* africanizada de diferentes regiões do Brasil**. Tese de Doutorado – Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas: Universidade Estadual de Campinas. 120p. 2002.

ALMEIDA-MURADIAN, L.B. Controle de qualidade da própolis, pólen e geléia real. SEBRAE, 2008. Disponível em: <
http://www.sebrae.com.br/setor/apicultura/Arquivos/16%c2%ba%20Cong_Bras_Apic/Anais_1/CONTROLE%20DE%20QUALIDADE%20DE%20PR%c3%93POLIS,%20P%c3%93LEN%20E%20GEL%c3%89IA%20REAL.pdf > Acesso em: 05/05/2009.

ANGELIS, R.C. Novos conceitos em nutrição. Reflexões a respeito do elo dieta e saúde. **Arquivos Gastroenterologia**, v. 38, n. 4, p. 269 - 271, 2001.

ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 232 – 240, 2007.

BANKOVA, V.; BOURDOUROVA – KRASTEVA, G. POPOV, S.; SFORCIN, J.M.; FUNARI, S.R.C. Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. **Apidologie**, v. 29, p. 361 - 367, 1998.

BANKOVA, V.; MARCUCCI, M.C.; SIMOVA, S.; NIKOLOVA, N.; KUJUMGIEV, A.; POPOV, S. Antibacterial diterpenic acids from Brazilian propolis. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 51 c, p. 277 – 280, 1996.

BANKOVA, V.S.; DE CASTRO, S.L.; MARCUCCI, M.C. Propolis: recent advances and plant origin. **Apidologie**, v. 31, p. 3 – 15, 2000.

BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; PRASAIN, J.K.; MATSUSHIGE, K.; SAIKI, I.; KADOTA, S. Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities. **Journal of Natural Products**, v. 61, n. 7, p. 896 - 900, 1998.

BLAIR, J.E.; BORMAN, E.K.; BYONE, E.T.; UPDYKE, E.L.; WILLIAMS, R.E.O. Hospital acquired staphylococcal disease, recommended procedures for laboratory investigation, Atlanta, Ga., **Public Health Service**, United States, Department of Health, Education and Welfare, 1958.

BONVEHI, J.S.; COLL, F.V. Phenolic composition of propolis from China and from South – America. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 49 c, p. 712 – 718, 1994.

BOUDORUROVA – KRASTEVA, G.; BANKOVA, V.; SFORCIN, J.M.; NIKOLOVA, N.; POPOV, S. Phenolics from Brazilian propolis. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 52 c, p. 676 – 679, 1997.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO. Instrução normativa nº 3 – Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade dos outros Produtos Apícolas. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 19 jan. 2001.

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

CASTRO, M.L.; CURY, J.A.; ROSALEN, P.L.; ALENCAR, S.M.; IKEGAKI, M.; DUARTE, S.; KOO, H. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1512 – 1516, 2007.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99 - 105, 1998.

CHAILLOU, L.L.; NAZARENO, M.A. Bioactivity of propolis from Santiago del Estero, Argentina, related to their chemical composition. **Food Science Technology**, v. 42, p. 1422 - 1427, 2009.

CHANG, C.C.; YANG, M.H.; WEN, H.M.; CHERN, J.C. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 10, n. 3, p. 178 - 183, 2002.

CHEN, C.N.; WU, C.L.; SHY, H.S.; LIN, J.K. Cytotoxic prenylflavanones from Taiwanese propolis. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 4, p. 503-506, 2003.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. Introdução a métodos cromatográficos. Editora da Unicamp, 1997.

DAUGSCH, A.; MORAES, C. S.; FORT, P.; PARK, Y. K. Brazilian red propolis-chemical composition and botanical origin. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, p. 435 - 441, 2008.

DIAS, D.F.A. Sistema de Acondicionamento para Própolis. **Rede de Tecnologia da Bahia – RETEC/BA**, 2007.

GARCIA – VIGUEIRA, C.; GREENAWAY, W.; WHATLEY, F.R. Composition of propolis from 2 different Spanish regions. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 47 c, p. 634 - 637, 1992.

GEKKER, G.; HU, S.; SPIVAK, M.; LOKENSGARD, J.R.; PETERSON, P.K. Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4 (+) lymphocyte and microglial cell cultures. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, p. 158 - 163, 2005.

GISALBERTI, E.L. Propolis: a review. **Bee World**, v. 60, p. 59 - 84, 1979.

GOBBO-NETO, L. LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374 - 381, 2007.

GONZÁLES, A.R.; BERNAL, R. **Própolis: Un camino hacia La salud**. Ed. Pablo de La Torriente. La Habana, Cuba, 132 p., 1997.

GREENAWAY, W.; SCAYSBROOK, T.; WHATLEY, F.R. The composition and plant origins of propolis. **Bee World**, v. 71, n. 3, p. 107 – 118, 1990.

HAYASHI, K.; KOMURA, S.; ISAJI, N.; OHISHI, N.; YAGI, K. Isolation of antioxidative compounds from Brazilian propolis: 3,4-dihydroxy-5-prenylcinnamic acid, a novel potent antioxidant. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 47, p. 1521 - 1524, 1999.

HEGAZI, A.G.; ABD EL HADY, F.K.; ABD ALLAH, F.A.M. Chemical composition and antimicrobial activity of European propolis. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 55 c, p. 70 – 75, 2000.

IKEGAKI, M. **Determinação da qualidade da própolis de *Apis mellifera* africanizada da região sul do Brasil: avaliação de algumas propriedades físico-químicas e biológicas da própolis**. Tese de Doutorado – Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas: Universidade Estadual de Campinas. 74 p. 2001.

IKENO, K.; IKENO, T.; MIYAZAWA, C. Effects of propolis on dental caries in rats. **Caries Research**, v. 25, p. 347 – 351, 1991.

KIMOTO, T.; AGA, M.; HINO, K.; KOYA-MIYATA, S.; YAMAMOTO, Y.; MICALLEF, M.J.; HANAYA, T.; ARAI, S.; IKEDA, M.; KURIMOTO, M. Apoptosis of human leukemia cells induced by Artepellin C an active ingredient of Brazilian propolis. **Anticancer Research**, v. 21, p. 221 - 228, 2001 a.

KIMOTO, T.; ARAI, S.; AGA, M.; HANAYA, T.; KOHGUCHI, M.; NOMURA, Y.; KURIMOTO, M. Cell cycle and apoptosis in cancer induced by the Artepellin C extracted from Brazilian propolis. **Gan-To-Kagaku-Ryoho**, v. 23, p. 1855 - 1859, 1996.

KIMOTO, T.; ARAI, S.; KOGUCHI, M.; AGA, M.; NOMURA, Y.; MICALLEF, M.J.; KURIMOTO, M.; MITO, K. Apoptosis and suppression of tumor growth by Artepellin C extracted from Brazilian propolis. **Cancer Detection and Prevent Journal**, v. 22, n. 6, p. 506 - 515, 1998.

KIMOTO, T.; KOYA, S.; HINO, K.; YAMAMOTO, Y.; NOMURA, Y.; MICALLEF, M.J.; HANAYA, T.; ARAI, S.; IKEDA, M.; KURIMOTO, M. Renal carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in mice, and protection from it by Brazilian propolis and Artepellin C. **Pathology International**, v. 50, p. 679 - 689, 2000.

KIMOTO, T.; KOYA-MIYATA, S.; HINO, K.; MOCALLEF, M.J.; HANAYA, T.; ARAI, S.; IKEDA, M.; KURIMOTO, M. Pulmonary carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in mice protection from it by Brazilian propolis and Artepellin C. **Virchows Archives**, v. 438, p. 259 - 270, 2001 b.

KOO, H. Estudo **dos Flavonóides da própolis de *Apis mellifera* africanizada provenientes de diversas regiões do Brasil**. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas: Universidade Estadual de Campinas. 67 p. 1996.

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

KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJEIVA, Y.; BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, n. 3, p. 235 – 240, 1999.

KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, v. 84, n. 3, p. 329 – 339, 2004.

MACIEJEWICZ, W.; MERESTA, T. Quantitative determination of the bacteriostatic activity against *Staphylococcus aureus* of certain flavonoids, phenolic acids and esters occurring in propolis. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 43, n. 1, p. 71 – 76, 1999.

MARBY, T.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. The systematic identification of flavonoids. **Springer Verlag**. New York, USA, 1970.

MARCUCCI, M.C.; BANKOVA, V.S. Chemical composition, plant origin and biological activity of Brazilian propolis. **Current Topics in Phytochemistry**, v. 2, p. 115 – 123, 1999.

MARCUCCI, M.C.; FERRERES, F.; CUSTÓDIO, A.R.; FERREIRA, M.M.C.; BANKOVA, V.S.; GARCÍA – VIGUEIRA, C., BRETZ, W.A. Evaluation of phenolic compounds in Brazilian propolis from different geographic regions. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 55, p. 76 - 81, 2000.

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

MARCUCCI, M.C.; RODRIGUEZ, J.; FERRERES, F.; BANKOVA, V.; GROTO, R. POPOV, S. Chemical composition of Brazilian propolis from São Paulo State. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 53, p. 113 - 119, 1998.

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

MARKHAM, K.R. Techniques of flavonoid identification. Academic Press Inc. London, Great Britain, 1982.

MARKHAM, K.R. Ultraviolet and visible absorption spectroscopy. IN: The Flavonoids. HARBONE, J.B.; MABRY, H. New York, Academic Press, p. 47 - 61, 1975.

MASSUDA, K.F. **Parâmetros físico - químicos e atividade biológica da própolis submetida a diferentes tipos de extração. Monografia de Conclusão de Curso.** Rio Claro: Universidade Estadual Paulista. 54 p. 2003.

MATSUNO, T.; JUNG, S.K.; MATSUMOTO, Y.; SAITO, M.; MORIKAWA, J. Preferential cytotoxicity to tummor cells of 3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid (Artepellin C) isolated from propolis. **Anticancer Research**, v. 17, p. 3565 - 3568, 1997.

MELLO, B.C.B.S. **Concentração de extratos da própolis através de membranas poliméricas.** Dissertação de Mestrado – Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas: Universidade Estadual de Campinas. 109 p. 2008.

MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arquivos do Instituto Biologia**, v. 72, n. 3, p. 405 - 411 Jul/ Set, 2005.

MORAES, F.P.; COLLA, L.M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislações e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 109 - 122, 2006.

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

NAKANISHI, I.; UTO, Y.; OHKUBO, K.; MIYAZAKI, K.; YAKUMARU, H.; URANO, S.; OKUDA, H.; UEDA, J.; OZAWA, T.; FUKUHARA, K.; FUKUZUMI, S.; NAGASAWA, H.; HORI, H.; IKOTA, N. Efficient radical scavenging ability of Artepellin C, a major component of Brazilian propolis and mechanism. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 1, p. 1452 - 1454, 2003.

NUNES, L.C.C.; GALINDO, A.B.; OLIVEIRA de DEUS, A.S.O.; RUFINO, D.A.; RANDAU, K.P.; XAVIER, H.S.; CITÓ, A.M.G.P.; NETO, P.J.R. Variabilidade sazonal dos constituintes da própolis vermelha e bioatividade em *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2 B, p. 524 - 529, Abr/ Jun, 2009.

ORSOLIC, N.; KNEZEVIC, A.H.; SVER, L.; TERZIC, S.; BASIC, I. Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 307 - 315, 2004.

ORSOLIC, N.; SARANOVIC, A.B.; BASIC, I. Direct and indirect mechanism(s) of anti-tumour activity of propolis and its polyphenolic compounds. **Planta Medica**, v. 72, p. 20 - 27, 2006.

PADILHA, P.C.; PINHEIRO, R.L. O papel dos alimentos funcionais na prevenção e câncer de mama. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 50, n. 3, p.251 - 260, 2004.

PAREDES – GUSMÁN, J.F. **Avaliação de algumas propriedades físico-químicas e biológicas das própolis produzidas no Perú**. Tese de Doutorado – Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas: Universidade Estadual de Campinas. 70 p. 2005.

PAREDES-GUZMÁN, J.; AGUIAR, C.L.; FUJIWARA, F.; PARK, Y.K. Estudo das própolis que contém Artepilin C. **Mensagem Doce**, nº74, p. 9-16, nov. 2003.

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

PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.; SCAMPARINI, A.R.P.; AGUIAR, C.L. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**, v. 32, n. 6, p. 997 - 1003, 2002.

PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ABREU, J.A.S.; ALCICI, N.M.F. Estudo da preparação dos extratos da própolis e suas aplicações. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 3, 1998.

PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M. Classificação das própolis brasileira a partir de suas características físico – químicas e propriedades biológicas. **Mensagem Doce**, n. 58, p. 2 – 7, 2000 a.

PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M. Evaluation of Brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. **Honeybee Science**, v. 21, n. 2, p. 85 – 90, 2000b.

PARK, Y.K.; PAREDEZ-GUZMAN, J.F.; AGUIAR, C.L.; ALENCAR, S.M.; FUJIWARA, F.Y. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of Southeastern Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1100 - 1103, 2004.

PEGORINI, F.; MARANHO, L.T.; ROCHA, L.D. Organização estrutural das folhas de *Baccharis dracunculifolia* DC., Asteraceae. **Revista Brasileira Farmácia**, v. 83, n. 3, p. 272 - 275, 2008.

PEREIRA, A.D.; PINTO, A.C.; CARDOSO, J.N.; NETO, F.R.D.; RAMOS, H.F.D.; DELLAMORA – ORTIZ, G.M.; dos SANTOS, E.P. Application of high resolution gas chromatography to crude extracts of propolis. **HRC – Journal of High Resolution Chromatography**, v. 21, n. 7, p. 396 – 400, 1998.

PEREIRA, A.S.; SEIXAS, F.R.M.S.; NETO F.R.A. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, v. 25, p. 321 - 326, 2002.

PEREIRA, F.M; LOPES, M.T.R.; CAMARGO, R.C.R.; VILELA, S.L.O. Organização Social e Desenvolvimento das abelhas *Apis mellifera*. EMBRAPA, 2003. Disponível em: <
[HTTP://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mel/SPMel/organizacao.htm](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mel/SPMel/organizacao.htm) > Acesso em 05/09/2010.

RUFINO, M.S.M.; ALEVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.D. Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS⁺. **Embrapa** – Comunicado Técnico online N°128, 2007.

SALATINO, A., TEIXEIRA, E.W., NEGRI, G., Message, D. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n. 1, p. 33 - 38, 2005.

SALOMÃO, K.; DANTAS, A.P.; BORBA, C.M.; CAMPOS, L.C.; MACHADO, D.G.; AQUINO NETO, F.R.; DE CASTRO, S.L. Chemical composition and microbicidal activity of extracts from Brazilian and Bulgarian propolis. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, p. 87 - 92, 2004.

SALOMÃO, K.; PEREIRA, P.R.; CAMPOS, L.C.; BORBA, C.M.; CABELLO, P.H.; MARCUCCI, M.C.; CASTRO, S.L. Brazilian propolis: correlation between chemical composition and antimicrobial activity. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n. 3, p. 317 – 324, 2008.

SANTOS, F.A.; BASTOS, E.M.A.F.; MAIA, A.B.R.A.; UZEDA, M.; CARVALHO, M.A.R.; FARIAS, L.M.; MOREIRA, E.S.A. Brazilian Propolis: physicochemical properties, plant origin and antibacterial activity on periodontopathogens. **Phytotherapy Research**, v. 17, p. 285 – 289, 2003.

SATO, P.M. **Inter-relações das características físicas, químicas e biológicas da própolis das regiões sul e sudeste do Brasil. Monografia de Conclusão de Curso.**Rio Claro: Universidade Estadual Paulista. 49 p. 2003.

SEBRAE, 2010. Disponível em: < <http://www.sebrae.com.br/setor/apicultura/sobre-apicultura/mercado/historico-de-exportacoes> > Acesso em: 16/10/2010.

SFORCIN, J.L.; FERNANDES JR, A.; LOPES, C.A.M.; BANKOVA, V.; FUNARI, S.R.C. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, n. 1 - 2, p. 243 - 249, 2000.

SHIMUZI, K.; ASHIDA, H.; MATSUURA, Y.; KANAZAWA, K. Antioxidative bioavailability of artepellin C in Brazilian propolis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 424, p.181 – 188, 2004.

SHIMUZI, K.; DIAS, S.K.; HASHIMOTO, T.; SOWA, Y.; YOSHIDA, T.; SAKAI, T.; MARSUURA, Y.; KANAZAWA, K. Artepellin C in Brazilian propolis induces G(0)/G(1) arrest via stimulation of Cip1/p21 expression in human colon cancer cells. **Molecular Carcinogenesis**, v. 44, p. 293 - 299, 2005.

SILVA, J.F.M.; SOUZA, M.C.; MATTA, S.R.; ANDRADE, M.R.; VIDAL, F.V.N. Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. **Food Chemistry**, v. 99, p. 431 - 435, 2006.

SIMÕES, L.M.; GREGORIO, L.E.; DA SILVA FILHO, A.A.; DE SOUZA, M.L.; AZZOLINI, A.E.; BASTOS, J.K.; LUCISANO-VALIM, Y.M. Effect of Brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 59 - 65, 2004.

SIMÕES-AMBROSIO, L.M.C.; GREGÓRIO, L.E.; SOUSA, J.P.B.; FIGUEIREDO-RINHEL, A.S.G.; AZZOLINI, A.E.C.S.; BASTOS, J.K.; LUCISANO-VALIM, Y.M. The role of seasonality on the inhibitory effect of Brazilian green propolis on the oxidative metabolism of neutrophils. **Fitoterapia**, p. 1 - 7, 2010.

SOUSA, J.P.B.; FURTADO, N.A.J.C.; JORGE, R.; SOARES, A.E.E.; BASTOS, J.K. Perfis físico-químicos e cromatográfico de amostras de propolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG), Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, -. 85 – 93, 2007.

SOUZA, E.A.; INOUE, H.T.; GOMES, S.M.A.; FUNARI, S.R.C; ORSI, R.O. Propriedade físico – química da própolis em função da sazonalidade e método de produção. **Archivos Zootecnia**, v. 59, n. 228, p. 571 – 576, 2010.

SOUZA, J.P.B. **Influência da sazonalidade no perfil químico dos óleos essenciais e das substâncias fixas de *Baccharis dracunculifolia* cultivada, utilizando-se cromatografia em fases gasosa e líquida.** Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo. 164 p. 2007.

TAZAWA, S.; WARASHINA, T.; NORO, T.; MIYASE, T. Studies on the constituents of Brazilian propolis. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 46, n. 9, p. 1477 – 1479, 1998.

TEIXEIRA, E.W.; MESSAGE, D.; NEGRI, G.; SALATINO, A.; STRINGHETA, P.C. Seasonal variation, chemical composition and antioxidant activity of Brazilian propolis samples. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 7, n. 3, p. 307 - 315, 2010.

TOMÁS - BARBERÁN, F.A.; GARCIA – VIGUEIRA, C.; VIT – OLIVIER, P.; FERRES, F.; TOMÁS – LORENTE. Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. **Phytochemistry**, v. 34, n. 1, p. 191-196, 1993.

VARGAS, A.C.; LOGUERCIO, A.P.; WITT, N.M.; COSTA, M.M.; SILVA, M.S.; VIANA, L.R. Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcoólico da própolis. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, p. 159 - 163, 2004.

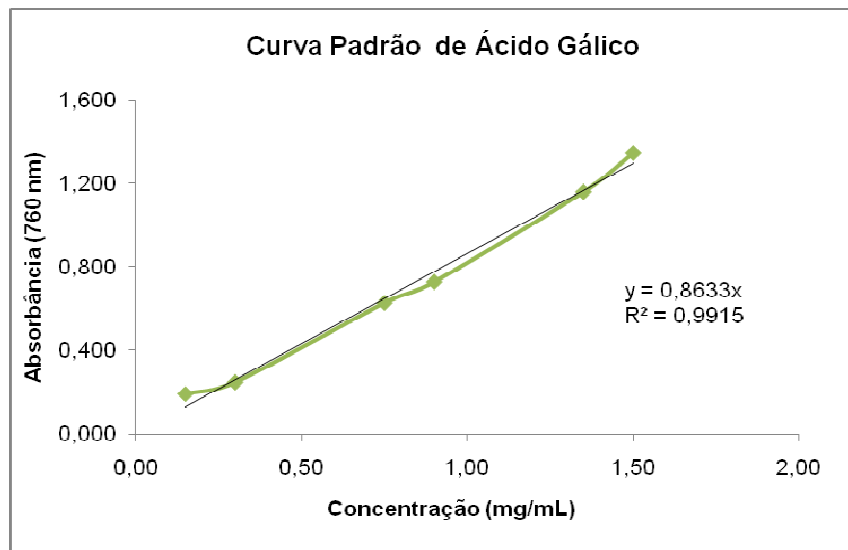
WOISKY, R.G.; SALATINO, A. Analysis of propolis some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v. 37, n. 2, p. 99 - 105, 1998.

XU, Y.; LUO, L.; CHEN, B.; FU, Y. Recent development of chemical components in propolis. **Frontiers of Biology China**, v.4, n. 4, p. 385 - 391, 2009.

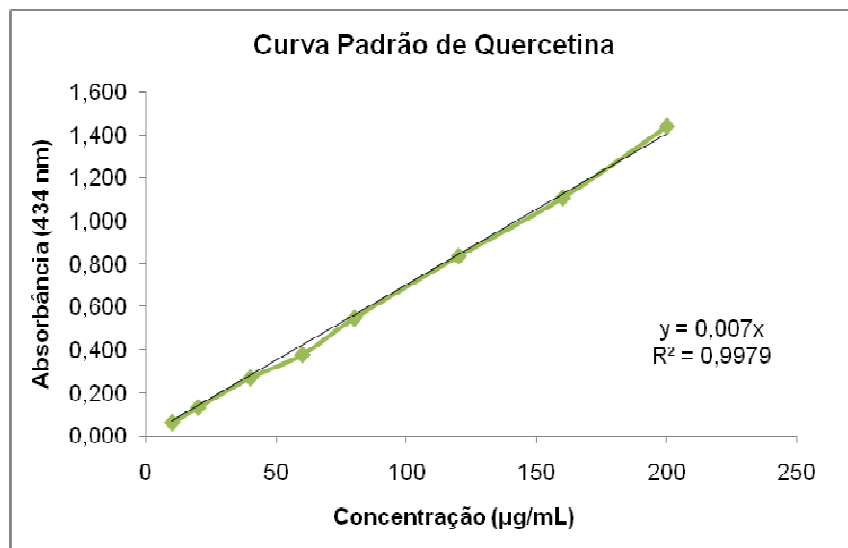
YEN, G.C.; WU, J.Y. Antioxidant and radical scavenging properties of extracts from *Ganoderma tsugar*. **Food Chemistry**, v. 65, p. 375 – 379, 1999.

ANEXOS

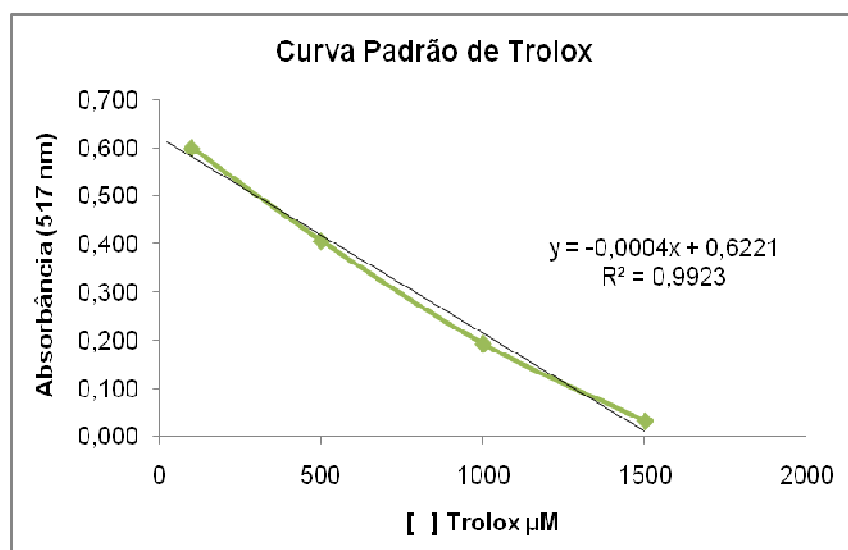
ANEXO 1 - Curva Padrão para Quantificação de Fenólicos Totais



ANEXO 2 - Curva Padrão para Quantificação de Flavonóides Totais



ANEXO 3 - Curva Padrão para Determinação da Capacidade Antioxidante (Trolox)



ANEXO 4 - Resultados apresentados em Tabelas

Tabela 11. Conteúdo de composto fenólicos totais (mg EAG /g própolis) de Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas em apiários das cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro no período de Setembro de 2009 a Agosto de 2010. Média com a mesma letra não apresenta diferença estatisticamente significativa entre si ($p \leq 0,05$) pelo Teste de Tukey. O Teste de Tukey foi feito entre as médias de amostras da própolis coletadas no mesmo apiário em diferentes meses.

Local de coleta da própolis	Período Sazonal (mês/ano)										
	Setembro 2009	Outubro 2009	Novembro 2009	Janeiro 2010	Fevereiro 2010	Março 2010	Abril 2010	Maió 2010	Junho 2010	Julho 2010	Agosto 2010
Fenólicos Totais (mg EAG/ g própolis)											
Mogi Mirim	110,57±2,13 bc	117,03±31,12 b	83,91±15,27 bc	82,11±23,53 c	109,91±9,34 bc	103,62±14,22 bc	94,86±19,80 bc	155,03±62,69 a	125,34±36,94 ab	89,93±11,86 bc	76,62±20,08 c
Águas de São Pedro		88,44±21,20 ab	78,93±12,35 b	115,55±14,18 a	107,97±14,90 ab		66,94±20,79 b	75,49±33,72 b			

Tabela 12. Conteúdo de flavonóides totais (mg quercetina/g própolis) de Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas em apiários das cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro no período de Setembro de 2009 a Agosto de 2010. Média com a mesma letra não apresenta diferença estatisticamente significativa entre si ($p \leq 0,05$) pelo Teste de Tukey. O Teste de Tukey foi feito entre as médias de amostras da própolis coletadas no mesmo apiário em diferentes meses.

Local de coleta da própolis	Período Sazonal (mês/ano)										
	Setembro 2009	Outubro 2009	Novembro 2009	Janeiro 2010	Fevereiro 2010	Março 2010	Abril 2010	Maió 2010	Junho 2010	Julho 2010	Agosto 2010
Flavonóides Totais (mg quercetina/ g própolis)											
Mogi Mirim	16,65±1,29 c	25,86±3,90 b	14,07±3,63 c	13,35±3,46 c	31,61±3,23 a	31,27±4,97 a	23,50±1,60 b	11,69±5,87 c	14,52±5,75 c	11,83±6,45 c	13,09±0,86 c
Águas de São Pedro		8,50±3,80 b	11,32±5,09 ab	18,05±2,59 a	16,76±4,12 ab		18,87±8,28 a	10,48±6,81 ab			

Tabela 13. Capacidade Antioxidante (% Inibição) de Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas em apiários das cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro no período de Setembro de 2009 a Agosto de 2010. Média com a mesma letra não apresenta diferença estatisticamente significativa entre si ($p \leq 0,05$) pelo Teste de Tukey. O Teste de Tukey foi feito entre as médias de amostras da própolis coletadas no mesmo apiário em diferentes meses.

Local de coleta da própolis	Período Sazonal (mês/ ano)										
	Setembro	Outubro	Novembro	Janeiro	Fevereiro	Março	Abril	Maió	Junho	Julho	Agosto
	2009	2009	2009	2010	2010	2010	2010	2010	2010	2010	2010
	% Inibição (DPPH)										
Mogi Mirim	63,23±19,08 a	72,84±13,41 a	62,46±22,54 a	63,76±16,26 a	62,49±10,68 a	36,85±12,55 bc	43,43±10,35b	40,38±11,63 b	30,12±10,27 bc	21,58±4,72 c	27,05±6,56 bc
Águas de São Pedro		28,06±7,14 bc	36,84±7,05 b	70,45±13,86 a	67,11±13,73 a	29,55±9,32 bc	30,03±10,91 bc	20,59±7,78 c	30,61±11,89 bc	56,10±10,36 a	63,46±11,78 a

Tabela 14 Capacidade antioxidante (μM equivalente Trolox/g própolis) de Extratos Etanólicos da Própolis de amostras coletadas em apiários das cidades de Mogi Mirim e Águas de São Pedro no período de Setembro de 2009 a Agosto de 2010. Média com a mesma letra não apresenta diferença estatisticamente significativa entre si ($p \leq 0,05$) pelo Teste de Tukey. O Teste de Tukey foi feito entre as médias de amostras da própolis coletadas no mesmo apiário em diferentes meses.

Local de coleta da própolis	Período Sazonal (mês/ano)										
	Setembro	Outubro	Novembro	Janeiro	Fevereiro	Março	Abril	Maió	Junho	Julho	Agosto
	2009	2009	2009	2010	2010	2010	2010	2010	2010	2010	2010
	μM equivalente Trolox/g própolis										
Mogi Mirim	100864,5±48532 a	126164,06±33693 a	93989,6±60284 a	81281,3±50765 a	76350,7±32734 a		16906,3±32478 b	18920,1±38214 b			1628±18698 b
Águas de São Pedro			78937,5±12879 a	102149,3±43269 a	91732,6±42874 a					58989,6±31952 a	97343,8±31288 a

