CAROLINE CRISTINA FERNANDES DA SILVA

ANÁLISE QUÍMICA E ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E CITOTÓXICA
DE AMOSTRAS DE PRÓPOLIS DE ALECRIM

São Paulo

2008

CAROLINE CRISTINA FERNANDES DA SILVA

ANÁLISE QUÍMICA E ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E CITOTÓXICA
DE AMOSTRAS DE PRÓPOLIS DE ALECRIM

Orientador: Prof^ª Dr^ª Maria Luiza Faria Salatino

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo,
para a obtenção de Título de
Mestre em Ciências, na Área
de Botânica

São Paulo

2008

Ficha Catalográfica

Silva, Caroline Cristina Fernandes da

Análise química e atividades antioxidante e citotóxica de amostras de própolis de alecrim

Número de páginas - 102

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de botânica

1. Atividade antioxidante 2. Atividade citotóxica 3. Própolis verde.

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Profa. Dra. Maria Luiza Faria Salatino

Dedico este trabalho à minha família e
ao meu namorado Zé, por existirem na
minha vida.

Agradecimentos

Agradeço a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a elaboração deste trabalho:

À Profa. Dra. Maria Luiza Faria Salatino, pela orientação, carinho e amizade;

Aos Professores Dr. Antônio Salatino e Dra. Déborah Y. A. C. dos Santos, pelos ensinamentos, auxílio e sugestões;

Ao Professor Dr. José Carlos de Freitas, pelo auxílio na realização das atividades citotóxicas;

À todos do Cebimar, especialmente aos técnicos, pelo suporte durante a realização das atividades citotóxicas;

À Dra. Giuseppina Negri, pelo auxílio e atenção na identificação das substâncias;

À todos os colegas e amigos do laboratório de fitoquímica, pelas sugestões, pelos conselhos, pelo suporte e pelo carinho;

Aos amigos do 2001N, por todos os momentos de diversão até hoje, especialmente para o Brutus, Carola, Giu, Foca, Lelê, Nelas, Ninja, Pigozzo, Recoder e Roger;

À Jéssica, por me incentivar a seguir em frente nos momentos difíceis;

À minha família, pelo incentivo aos estudos e à biologia e por sempre acreditarem na minha capacidade;

Ao Zégui e ao Vitão, pelo auxílio nas análises estatísticas;

Ao Zé, por todo amor, pela revisão do inglês e por assistir à todas as minhas prévias;

À Fapesp, pelo suporte financeiro.

Índice

1. Introdução.....	1
1.1. Elaboração e uso da própolis pelas abelhas.....	2
1.2. Origem botânica e composição química da própolis.....	2
1.3. Origem botânica e composição química da própolis brasileira.....	5
1.4. Atividades biológicas e farmacológicas atribuídas à própolis.....	8
1.5. Atividade antioxidante.....	9
1.6. Atividade citotóxica.....	11
2. Objetivos.....	13
3. Material e métodos.....	14
3.1. Amostras de própolis.....	14
3.2. Massa seca.....	14
3.3. Preparação dos extratos metanólicos.....	15
3.4. Extração fracionada.....	15
3.5. Determinação do teor de fenóis totais.....	15
3.6. Determinação do teor de flavonas e flavonóis totais.....	16
3.7. Determinação do teor de flavanonas e isoflavonas totais.....	17
3.8. Determinação do teor de ceras totais.....	18
3.9. Identificação das substâncias presentes nas amostras.....	18
3.10. Derivação das frações de clorofórmio.....	19
3.11. Testes de atividade antioxidante.....	20
3.11.1. Método de seqüestro de radicais livres DPPH.....	20
3.11.2. Sistema β -caroteno/ácido linoléico.....	21

3.11.3. Atividade antioxidante por cromatografia em camada delgada.....	23
3.12. Ensaio de citotoxicidade em embriões de ouriço do mar.....	24
3.13 Análises estatísticas.....	25
4. Resultados.....	27
4.1.Massa seca.....	27
4.2. Determinação do teor de fenóis totais.....	27
4.3. Determinação do teor de flavonas e flavonóis totais.....	29
4.3. Determinação do teor de flavanonas e isoflavonas totais.....	31
4.5. Determinação do teor de ceras totais.....	32
4.6. Teste de regressão linear.....	33
4.7. Identificação das substâncias presentes nas amostras.....	35
4.8. Atividade antioxidante.....	47
4.8.1. Método de seqüestro de radicais livres DPPH.....	47
4.8.2. Atividade antioxidante dos extratos fracionados pelo método do DPPH.....	50
4.8.3. Atividade antioxidante no sistema β -caroteno/ácido linoléico.....	51
4.8.4. Atividade antioxidante dos extratos fracionados no sistema β -caroteno/ácido linoléico.....	54
4.8.5. Teste de regressão linear relacionando a atividade antioxidante.....	56
4.8.6. Atividade antioxidante por cromatografia em camada delgada.....	59

4.9. Ensaio de citotoxicidade em embriões de ouriço do mar.....	65
5. Discussão.....	73
6. Considerações finais.....	86
7. Referências bibliográficas.....	90
8. Resumo.....	101
9. Abstract.....	102

1. INTRODUÇÃO

A palavra própolis deriva do Grego *pro*, em defesa de, e *polis*, cidade, ou seja, é um produto utilizado pelas abelhas na defesa da colméia (Ghisalberti, 1979). Trata-se de uma mistura complexa de substâncias, com aspecto resinoso, elaborada por abelhas *Apis mellifera* e também por abelhas indígenas sem ferrão (*Melipona compressipes*, *Tetragonisca clavipes*, *Melipona quadrifasciata*, *Friesomelitta varia*, *Melipona favosa*, *Scaptotrigona depilis*, *Paratrigona anduzei*, *Tetragonisca angustula*, entre outras) (Tomas-Barberán *et al.*, 1993; Bankova *et al.*, 1999; Pereira *et al.*, 2003).

Sua aparência é bastante variável, tanto na coloração (desde amarelo claro até marrom escuro ou vermelho) quanto na textura (desde rígida, se pulverizando facilmente, até elástica e pegajosa) (Ghisalberti, 1979; Salatino *et al.*, 2005). É composta principalmente por cera de abelhas e substâncias derivadas de plantas, que são incorporadas sem alteração (Burdock, 1998). Para a produção da própolis, as abelhas coletam substâncias que são ativamente secretadas, tais como resinas e compostos voláteis, ou substâncias que são exudadas por ferimentos, como materiais lipofílicos em folhas e gemas foliares, além de mucilagem, gomas, látex etc. (Bankova, 2005). Desse modo, a composição da própolis irá depender da planta da qual o material foi coletado e, portanto, da localização geográfica da colméia, pois as plantas disponíveis para as abelhas serão diferentes dependendo do local onde a colméia está localizada.

1.1. Elaboração e uso da própolis pelas abelhas

As abelhas fragmentam os ápices vegetativos das plantas (gemas, primórdios foliares e folhas jovens) com as mandíbulas, coletando as resinas liberadas. Com o primeiro par de pernas, transferem a massa de resina para as pernas medianas e então para a corbícula (parte posterior da tíbia), nas pernas posteriores. O tempo gasto do início do processo de coleta até o depósito da massa de resina na corbícula, leva em média 7 minutos. A frequência de visita varia dependendo de diversos fatores, dentre eles a necessidade da colméia por própolis (Teixeira *et al.*, 2005).

As abelhas utilizam a própolis para diversos fins, entre eles, selar aberturas e cobrir a entrada da colméia, impedindo dessa forma a entrada de microrganismos, como fungos e bactérias. A própolis contribui também para a manutenção da temperatura interna da colméia por volta de 35°C. As paredes das células hexagonais dos ninhos contêm uma mistura de cera de abelha e própolis. Dessa forma, a própolis não só enrijesse a célula, mas mantém o ambiente interno asséptico. Quando as abelhas não conseguem transportar para fora os animais invasores mortos, elas revestem sua carcaça com própolis. Este processo se assemelha a um embalsamento e impede a putrefação do material (Ghisalberti *et al.*, 1979).

1.2. Origem botânica e composição química da própolis

Diversos estudos foram realizados na tentativa de elucidar quais seriam as plantas utilizadas como fonte de resinas para a elaboração da própolis. Os primeiros trabalhos envolvendo a análise química de amostras de própolis datam

dos anos 70, com Lavie, na França (Lavie, 1975 *apud* Bankova *et al.*, 2000) e Popravko, na Rússia (Popravko *et al.*, 1980 *apud* Bankova *et al.*, 2000). Estudos envolvendo a análise de amostras de própolis de regiões temperadas através de CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) demonstraram que exudatos da gema de *Populus* e seus híbridos são a origem botânica da própolis em diversos locais como Mongólia (*P. suaveolens*), Albânia (*P. nigra* e *P. canadensis*), Bulgária, França, Grã-Bretanha, Hungria, Espanha, México (*P. nigra*) (Marcucci *et al.*, 2001), América do Norte (*P. fremontii*), Reino Unido (*P. euramericana*) (Marcucci, 1995), Norte da Argentina, sul do Brasil e Uruguai (*P. alba*) (Park *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2004; Isla *et al.*, 2005). Na Turquia, a principal fonte também é *P. nigra*, porém foram descritas amostras com a composição química semelhante à de *P. euphratica*, espécie nunca descrita anteriormente como fonte de resinas para elaboração da própolis (Popova *et al.*, 2005). Na Nova Zelândia, espécies de *Populus* introduzidas são fonte de substâncias presentes na própolis (Markham *et al.*, 1996).

Em regiões onde *Populus* não é nativo, as abelhas retiram exudatos de outras plantas para a fabricação da própolis. Na Rússia, a principal fonte é *Betula verrucosa* (Popravko *et al.*, 1980 *apud* Bankova *et al.*, 2000), enquanto na Polônia, substâncias da própolis são retiradas de *Betula* spp. e *Alnus* spp.; no Havaí, *Plumeria acutifolia* e *P. acuminata* são fontes de resinas (Marcucci, 1995) e na Austrália as abelhas utilizam *Xantorrhoea* spp. (Ghisalberti, 1979). Na Venezuela, as abelhas coletam resinas de *Clusia minor* e *C. major* (Tomas-Barberán *et al.*, 1993). Em Cuba, a principal origem botânica é *C. nemorosa* (Cuesta-Rubio *et al.*, 1999).

No Brasil, as abelhas coletam substâncias principalmente de *Baccharis dracunculifolia*.

Em geral, amostras de própolis de diferentes regiões do mundo são constituídas por 30% de ceras, 50% de resinas vegetais, 10% de óleos voláteis, 5% de pólen e 5% de outras substâncias, incluindo compostos orgânicos (Burdock, 1998), além de microelementos (Walker & Crane, 1987).

A própolis apresenta uma fração solúvel em álcool, denominada 'bálsamo da própolis' e uma insolúvel em álcool, ou fração de cera (Marcucci, 1995). Estudos comparativos da cera da própolis e dos ninhos das abelhas demonstraram como principais constituintes ésteres, e hidrocarbonetos. Não foram observadas diferenças que permitissem distinção entre as duas amostras de cera, o que sugere uma fonte comum para ambas. O conteúdo total de cera nos ninhos varia de 1,5 a 3% e na própolis de 4,8 a 19,3%; o conteúdo de hidrocarbonetos varia de 15,5 a 25,2% nos ninhos e de 6,4 a 33,3% na própolis, enquanto o teor de ésteres é de 67,4 a 75,8% nos ninhos e 49,2 a 77,1% na própolis (Negri *et al.*, 2000).

Entre as amostras de própolis parece haver uma variação gradual na proporção de substâncias derivadas da via do mevalonato (terpenóides, incluindo sesqui, di e triterpenos) e os típicos derivados da via do chiquimato (substâncias fenólicas, preniladas ou não) (Salatino *et al.*, 2005). Até o momento, mais de 300 substâncias já foram descritas como constituintes da própolis (Walker & Crane, 1987; Marcucci, 1995; Bankova *et al.*, 2000; Pereira *et al.*, 2003). A maioria das substâncias identificadas é constitutiva da própolis européia e grande parte delas pertence ao grupo dos flavonóides (flavonas, flavonóis e flavanonas) (Kujumgiev *et al.*, 1999; Simões *et al.*, 2004).

Apesar da atividade de algumas substâncias isoladas já ter sido comprovada, em alguns casos não é possível atribuir uma atividade para uma substância específica (Kujumgiev *et al.*, 1999), sendo muitas vezes feito o uso de extratos, o que leva à necessidade de haver uma padronização entre amostras de própolis. Nesse sentido, alguns trabalhos foram realizados na tentativa de se aproximar de uma padronização ou controle de qualidade em amostras de própolis. Woisky e Salatino (1998) realizaram um trabalho com o objetivo de determinar o perfil químico de amostras de própolis de diversas regiões do Brasil. Foi quantificado o teor de fenóis totais, flavonóides, substâncias voláteis, ceras, cinzas e resíduos secos livres de compostos voláteis, sendo estes fatores considerados determinantes para um controle de qualidade. Park e colaboradores (2000) realizaram um trabalho com diversas amostras de própolis brasileiras e, de acordo com a origem botânica e composição química, reconhecem 12 grupos de própolis brasileiras. Ao trabalhar com material padronizado, os cientistas poderiam associar um tipo químico de própolis a um tipo específico de atividade biológica.

1.3. Origem botânica e composição química da própolis brasileira

No Brasil a principal fonte de resinas para a elaboração da própolis verde (a própolis mais comercializada no país e para exportação) é *Baccharis dracunculifolia*. Essa coloração verde característica é devida à clorofila existente nos tecidos jovens (gemas vegetativas) e folhas não-expandidas coletadas pelas abelhas. Essas folhas jovens contêm tricomas secretores, provavelmente com óleos voláteis e aromáticos (Salatino *et al.*, 2005).

Baccharis dracunculifolia, conhecida popularmente como alecrim-do-campo, devido à sua semelhança morfológica com o alecrim europeu, é uma Asteraceae arbustiva com cerca de 2-3 m de altura. Ocorre na América do Sul, do sudeste ao sul do Brasil, Argentina, Uruguai, Paraguai e Bolívia. Possui características de plantas invasoras, produzindo um grande número de frutos e alta capacidade de crescimento natural, além de se desenvolver em áreas que sofreram impacto humano (Gomes *et al.*, 2002).

Além de *B. dracunculifolia*, outras espécies vegetais já foram descritas como fonte de resinas para a elaboração de própolis no Brasil. Em Alagoas *Dalbergia ecastophyllum* (Fabaceae) é a origem botânica de um tipo de própolis conhecido como “própolis vermelha” (Silva *et al.*, 2007). Na Bahia, a origem botânica da própolis marrom é *Hyptis divaricata* (Lamiaceae), enquanto na região Sul, as resinas são retiradas de *Populus alba* (Salicaceae) (Park *et al.*, 2002).

Park e colaboradores (2000), numa tentativa de classificar as amostras de própolis brasileiras de acordo com a origem botânica e composição química, reconhecem 12 grupos diferentes de amostras, classificadas de acordo com suas características físico-químicas. Essa classificação em 12 tipos porém ainda é subestimada, uma vez que as abelhas podem coletar resinas numa grande variedade de plantas, dada a imensa diversidade da flora brasileira.

Dentre os componentes principais da própolis verde brasileira, podem-se citar os fenilpropanóides prenilados, que são ácidos fenólicos contendo um grupo prenila. São substâncias formadas a partir do ácido cinâmico e seus derivados (ácidos p-cumárico, caféico, ferúlico e sinápico), como a artepilina C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico), substância característica da própolis verde (Figura 1)

(Aga *et al.*, 1994; Loayza *et al.*, 1995; Tazawa *et al.*, 1998; Tazawa *et al.*, 1999; Marcucci *et al.*, 2001; Kumazawa *et al.*, 2003; Negri *et al.*, 2003a; Negri *et al.*, 2003b; Park *et al.*, 2004; Salatino *et al.*, 2005; Teixeira *et al.*, 2005). Na própolis vermelha, os constituintes principais são benzofenonas preniladas (Trusheva *et al.*, 2006).

Figura 1 – Fórmula estrutural de alguns fenilpropanóides, classe de substâncias mais abundantes nas própolis verde brasileiras.

Os flavonóides, mesmo não sendo um dos principais constituintes, estão presentes nas própolis brasileira. Quercetina, campferida, isosacuretina, pinocembrina, crisina, naringenina, campferol e galangina são seus principais representantes (Tazawa *et al.*, 1998; Tazawa *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2004). Estão presentes também na própolis verde terpenóides e seus derivados, além de derivados do ácido benzóico.

1.4. Atividades biológicas e farmacológicas atribuídas à própolis

O comportamento de microrganismos frente às ações antibióticas da própolis tem sido amplamente investigado. Estudos sobre a atividade antibacteriana de amostras de própolis de diferentes regiões demonstraram que o crescimento de bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) é inibido por baixas concentrações de própolis, enquanto bactérias gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) são menos suscetíveis (Kujumgiev *et al.*, 1999; Sforcin *et al.*, 2000; Prytyk *et al.* 2003; Popova *et al.*, 2005; Silici *et al.* 2005). Extratos etanólicos de amostras de própolis do Brasil e da Bulgária mostraram-se ativos contra *Neisseria meningitidis* e *Streptococcus pneumoniae* (Salomão *et al.*, 2004). O ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepilina C) é um dos principais compostos antimicrobianos da própolis brasileira (Aga *et al.*, 1994).

A atividade antifúngica da própolis em baixas concentrações também foi verificada contra *Candida albicans* (Kujumgiev *et al.*, 1999; Sforcin *et al.*, 2001; Prytyk *et al.*, 2003; Salomão *et al.*, 2004), *C. tropicalis* (Sforcin *et al.*, 2001), dezesseis linhagens de *Actinobacillus actinomycescomitans* (Santos *et al.*, 2003), *Sporothrix schenckii* e *Paracoccidioides brasiliensis* (Salomão *et al.*, 2004).

A atividade antiviral foi demonstrada contra o vírus da gripe aviária (Kujumgiev *et al.*, 1999), vírus da herpes simples tipo 1 (HSV-I) (Amoros *et al.*, 1992a), poliovírus (Amoros *et al.*, 1992b), vírus influenza A e B e vaccínia vírus (Marcucci, 1995).

Além dessas atividades principais apresentadas pela própolis, muitas outras estão descritas, como por exemplo, antiinflamatória (Krol *et al.*, 1996); antiprotozoa, principalmente contra *Trypanosoma cruzi* *in vitro* e *in vivo* (Higashi e de Castro, 1994; de Castro e Higashi, 1995; Marcucci *et al.*, 2001; Prytyk *et al.*, 2003; Dantas *et al.*, 2006); atividade hepatoprotetora (Banskota *et al.*, 2000); regeneração de tecido cartilaginoso, tecido ósseo e da polpa dental; propriedade anestésica; ação imunomodulatória; anti-úlceras; anticânceres em ratos; proteção contra radiação gama em camundongos, anti-leishmaniose em hamsters; entre outras (Marcucci, 1995).

1.5. Atividade antioxidante

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são formadas nas células, como consequência de reações bioquímicas oxidativas. Esses radicais desempenham papéis importantes no organismo, atuando na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular e sinalização intercelular, e na síntese de compostos biologicamente importantes (Pietta, 2000). No entanto, EROs podem ser danosas se sua produção for excessiva sob condições anormais (inflamação, fatores externos), causando danos em membranas lipídicas, inativação de enzimas e proteínas e danos no DNA (Pietta, 2000). Esses danos podem estar relacionados na etiologia de diversas doenças humanas, como envelhecimento precoce, doenças

cardíacas, inflamação, doenças neurodegenerativas (Parkinson e Alzheimer) e câncer (Pietta, 2000; Russo *et al.*, 2002). O organismo humano possui substâncias antioxidantes endógenas (ex. Se-glutationa peroxidase, catalase, e superóxido dismutase), porém quando estas não são capazes de conter a produção excessiva de EROs, o uso de antioxidantes exógenos através da dieta se faz necessário (Pietta, 2000).

A atividade antioxidante da própolis foi verificada em amostras de diversas localidades, através de metodologias diversas. Extratos de própolis do Brasil, China, Peru, Holanda, Coreia, Austrália, Bulgária, Chile, Ucrânia e Argentina, demonstraram possuir significativa atividade varredora de radicais livres DPPH (Banskota *et al.*, 2000; Ahn *et al.*, 2004; Kumazawa *et al.*, 2004; Isla *et al.*, 2005). Também foi verificada a capacidade de proteção de substratos lipídicos da oxidação, avaliada pelo método do descoramento do β -caroteno (Kumazawa *et al.*, 2004).

Russo *et al.* (2002) avaliaram a capacidade antiperoxidativa de extratos de própolis e de seus compostos ativos (CAPE, do inglês caffeic acid phenethyl ester, e galangina). Demonstraram que os extratos possuíam efeito protetor contra a peroxidação e uma potente capacidade de varrer radicais hidroxila.

Estudos com amostras brasileiras demonstraram a capacidade de substâncias presentes em extratos de própolis em modular a produção de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos estimulados *in vitro*, indicando que a ação destas substâncias não se restringe à ação varredora de radicais livres (Simões *et al.*, 2004).

Estudos envolvendo indução de isquemia cerebral em coelhos demonstraram que a administração subaguda de CAPE desempenha um papel neuroprotetor contra isquemia cerebral, devido à atenuação da peroxidação de lipídeos e suas propriedades antioxidantes (Altug *et al.*, 2008).

1.6. Atividade citotóxica

A busca por substâncias com atividade anticancerígena sempre foi uma das prioridades da química medicinal e um grande número de abordagens diferentes vem sendo utilizado nessa busca. No entanto, a descoberta de substâncias antitumorais seletivas permanece um objetivo elusivo na pesquisa do câncer. Conseqüentemente, novas abordagens são necessárias para uma busca eficiente de candidatos a serem testados como drogas anticancerígenas (Pisco *et al.*, 2006).

Estudos a cerca da atividade antitumoral de extratos e substâncias isoladas da própolis vêm crescendo muito nos últimos anos, mostrando que diversas linhagens de células tumorais são sensíveis à própolis.

No estudo de Orsolic *et al.* (2004) investigou-se o efeito da própolis, e de substâncias polifenólicas isoladas dela, no crescimento e potencial metástico de um carcinoma mamário transplantável de um camundongo CBA. Nesses camundongos foram geradas metástases no pulmão, e os componentes testados diminuíram significativamente o número desses nódulos tumorais.

Duas substâncias isoladas da própolis brasileira, drupanina e baccharina, derivados prenilados do ácido cinâmico, mostraram efeitos antitumorais *in vivo* em camundongos com fibrosarcoma murino S-180. Os camundongos que receberam administração oral dessas substâncias apresentaram diminuição na formação dos

tumores. Esta atividade está relacionada com a morte celular das células tumorais, sendo que a citotoxicidade mostrou-se preferencial para as células tumorais, não afetando as células normais do fígado (Mishima *et al.*, 2005a).

Watanabe e colaboradores (2004) demonstraram que o CAPE, conhecido por inibir o NFkB, induz a morte celular por apoptose em células de câncer de mama MCF-7, pela ativação de receptores Fas (mediador inicial da sinalização da morte celular); O CAPE também demonstrou induzir a apoptose mediada pela mitocôndria, em células tumorais U937 de leucemia mielóide humana (Jin *et al.*, 2008)

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos principais a caracterização química, por meio do doseamento de fenóis, ceras e flavonóides, de seis amostras de própolis verde, provenientes de Minas Gerais e do Paraná, e a identificação de algumas substâncias presentes nas amostras por GC/EM e CLAE/EM. Além disso, foram testados os extratos brutos metanólicos e as frações hexânicas, clorofórmicas, metanólicas e de acetato de etila das amostras, quanto à atividade citotóxica em embriões de ouriço-do-mar, e quanto à atividade antioxidante. A fim de se verificar possíveis relações entre os teores de fenóis totais, os de flavonas e flavonóis totais, e os teores de ceras entre si e também com a atividade antioxidante das amostras, foram realizados testes de correlação linear. A fim de se avaliar possíveis substâncias que apresentavam atividade antioxidante, foi testado o poder antioxidante de uma das amostras estudadas por meio de cromatografia em camada delgada, seguida de análises por cromatografia a gás e cromatografia líquida de alta eficiência.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostras de própolis

No presente trabalho foram estudadas seis amostras de própolis verde, sendo quatro delas provenientes de Minas Gerais (amostras A, B, C e D) e duas do Paraná (amostras E e F). As amostras de Minas Gerais foram gentilmente cedidas pela Cia da Abelha. As amostras do Paraná foram fornecidas pela Breyer e Cia Ltda (Tabela 1).

Tabela 1 – Amostras de própolis verde e localização geográfica.

Amostra*	Localidade
A	Três Pontas/MG
B	Esmeralda/MG
C	Esmeralda/MG
D	Esmeralda/MG
E	União da Vitória/PR
F	União da Vitória/PR

*A, B, C e D - Cia da Abelha Ltda – Contagem, MG; Amostras E e F – Breyer e Cia Ltda– União da Vitória, PR.

3.2. Massa seca

Para a obtenção da massa seca, pesou-se exatamente 1 g de cada amostra, previamente pulverizada, e esta foi mantida em estufa a 80°C, até que fosse atingido peso constante.

3.3. Preparação dos extratos metanólicos

Os extratos das amostras de própolis verde foram preparados partindo-se de 2,5 g das amostras previamente pulverizadas com nitrogênio líquido, até a obtenção de um pó fino. Estes foram então tratados com metanol em extrator soxhlet por 5 hs. O volume final foi ajustado para 250 mL em balão volumétrico, e estes extratos foram utilizados nos ensaios químicos para determinação dos fenóis, flavonas e flavonóis e flavanonas e isoflavonas totais, e também para os testes de atividade antioxidante e citotóxica das amostras.

3.4. Extração fracionada

Exatamente 5 g de própolis bruta previamente pulverizadas foram submetidas a quatro extrações sucessivas em extrator Soxhlet, com solventes de polaridade crescente. Primeiramente, foram tratadas com 200 mL de hexano, sendo em seguida tratadas, consecutivamente, com 200 mL de clorofórmio, 200 mL de acetato de etila e 200 mL de metanol. Após cada tratamento, secava-se a amostra, a fim de que ela fosse submetida ao tratamento seguinte. Os extratos obtidos foram concentrados sob pressão reduzida e ressuspensos em volume e solvente apropriados para análises posteriores.

3.5. Determinação do teor de fenóis totais

A determinação da concentração de fenóis totais nas amostras foi feita com base em uma curva de calibração, preparada a partir de uma solução padrão de ácido *p*-cumárico 100 µg/mL.

Cada volume da solução padrão (0, 10, 20, 30-...-100 μL) foi transferido para um tubo de microcentrífuga, contendo 1 mL de água destilada, ao qual foram adicionados 160 μL do reagente Folin-Ciocalteu e 240 μL de solução saturada de carbonato de sódio, sendo o volume final completado com água destilada para 2 mL. Após duas horas foi feita a leitura em espectrofotômetro UV-visível a 760 nm.

Para os ensaios com os extratos das amostras, 4 μL de cada extrato metanólico bruto a 10 mg/mL foi transferido para um tubo de microcentrífuga, contendo 1 mL de água destilada. Em seguida, foram realizados os mesmos passos utilizados para a construção da curva de calibração (Woisky & Salatino, 1998).

3.6. Determinação do teor de flavonas e flavonóis

O procedimento descrito a seguir segue a adaptação de Woisky & Salatino (1998) do método da German Pharmacopoeia (Deutsches Arzneibuch, 1978) e determina a concentração de flavonas e flavonóis nas amostras. Foi utilizada para isso, uma curva de calibração de quercetina, preparada a partir de uma solução padrão de 20 $\mu\text{g/mL}$.

Alíquotas de solução padrão foram transferidas para tubos de microcentrífuga (0, 200, 400, 600, ..., 1600 μL), ao qual foram adicionados 400 μL de solução metanólica de cloreto de alumínio 5%, e o volume completado com metanol para 2 mL. A seguir a absorbância foi lida em espectrofotômetro UV-visível a 420 nm.

Para a determinação do teor de flavonas e flavonóis totais, foi utilizada uma alíquota de 32 μL do extrato metanólico bruto a 10 mg/mL sendo em seguida, realizados os mesmos passos utilizados na construção da curva padrão.

3.7. Determinação do teor de flavanonas e isoflavonas

O procedimento a seguir segue o método descrito por Nagy & Grancai (1996), com pequenas modificações. A determinação da concentração dessas substâncias nas amostras foi feita com base em uma curva de calibração de pinocembrina, preparada a partir de uma solução padrão de 1 mg/mL, dissolvida em isopropanol. Para o preparo da curva de calibração, 200 µL da solução de pinocembrina foram transferidos para um tubo de microcentrífuga, ao qual foi acrescentado 400 µL de solução do reagente dinitrofenil-hidrazina (0,1g de DNP seco previamente a 60 °C por 3 horas, dissolvido em 200 µL de ácido sulfúrico 96%, e completando-se o volume para 10 mL com metanol). Esta mistura foi mantida a 50 °C em banho-maria, por 50 min. Após esfriar, foram adicionados 1,4 mL de KOH (100 mg/mL), completando o volume para 2 mL. Desta solução foram transferidas alíquotas de 40, 80, 120...320 µL para novos tubos, adicionando-se metanol suficiente para completar 2 mL. Esta mistura foi então centrifugada a 3000 rpm por 5 min, e a absorbância do sobrenadante lida a 486 nm.

Para determinação do teor de flavanonas e isoflavonas das amostras, 200 µL do extrato metanólico das amostras a 10 mg/mL foram tratados com 400 µL do reagente DNP. Esta mistura foi mantida a 50 °C por 50 min. Após esfriar, acrescentou-se 1,4 mL de solução de KOH (100 mg/mL). Uma alíquota de 143 µL da solução acima foi transferida para um novo tubo, adicionando-se metanol suficiente para completar 2 mL. Esta mistura foi então centrifugada a 3000 rpm por 5 min, e a absorbância do sobrenadante lida a 486 nm.

3.8. Determinação do teor de ceras

Porções de 3g de cada amostra previamente pulverizadas foram submetidas à extração exaustiva com clorofórmio em extrator Soxhlet, durante 6 horas. Em seguida, os extratos foram concentrados sob pressão reduzida, e 120 mL de metanol quente foi adicionado ao resíduo. A mistura foi mantida em ebulição até que fossem separadas duas fases: uma solução clara na porção superior e pequena quantidade de resíduo oleoso na porção inferior. A fase metanólica superior foi filtrada a quente através de papel de filtro Whatman nº 1 para um frasco de 150 mL, previamente pesado, evitando a passagem do resíduo oleoso. O filtrado foi então resfriado a 0°C, e o conteúdo novamente filtrado através de papel de filtro Whatman nº 1 previamente pesado. O frasco e o resíduo foram lavados com 25 mL de metanol frio. Após secagem em capela, o frasco e o resíduo no papel de filtro foram transferidos ao dessecador até que atingissem peso constante (Woisky & Salatino, 1998).

3.9. Identificação das substâncias presentes nas amostras

As análises qualitativas das substâncias que compõem as amostras de própolis foram feitas utilizando-se cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLAE/EM). As análises que necessitaram espectrometria de massas foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química – USP.

Os perfis cromatográficos das frações clorofórmicas (metiladas ou não) e de hexano foram obtidos por cromatografia gasosa. Um volume de 1 µL das frações ressuspensas em metanol foi injetado no cromatógrafo a gás 5890 Series II Plus,

operando no modo split, sendo o split ajustado de acordo com a concentração de cada amostra. Foi utilizada uma coluna Zebron ZB 5-HT (30 m X 0,32 mm) a 100 °C, tendo como gás de arraste o Hélio em fluxo de 1 mL/min. O método utilizado consistiu numa rampa de aquecimento de 8° C/min, com temperatura inicial de 100 °C e temperatura final de 300 °C, permanecendo por 10 min a 300 °C ao término do aquecimento; a temperatura do injetor e do detector foi ajustada para 300 °C (Negri *et al.*, 2003a).

Para obtenção do perfil cromatográfico das frações metanólicas e de acetado de etila, 21,7 µL das amostras foram injetados em cromatógrafo líquido de alta eficiência HP 1090 series II, com detector de arranjos de fotodiodos e uma coluna de fase reversa Zorbax C18 (4,6 X 250 mm). A fase móvel utilizada foi ácido acético 0,1% (solvente A) e metanol (solvente B), com fluxo constante de 0,5 mL/min e a leitura foi feita a 270 nm. O gradiente iniciou com 10% do solvente B por 7 min, 10 a 35% de B de 7 a 12 min, 35 a 38% de B de 12 a 27 min, 38% de B de 27 a 35 min, 38 a 50% de B de 35 a 50 min e 50 a 100% de B de 50 a 100 min. Posteriormente as frações foram enviadas à Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, sendo submetidas a CLAE/EM (frações de metanol e acetato de etila) e CG/EM (frações de clorofórmio e hexano), para identificação dos constituintes presentes nas amostras.

3.10. Derivação das frações de clorofórmio

Para a metilação das frações de clorofórmio, 30 µL das amostras foram adicionados a 4 mL de solução de H₂SO₄ 5% (em metanol) e 2 mL de tolueno. A mistura foi mantida aquecida a 80 °C por 4hs. Em seguida, acrescentou-se 4 mL de

solução de NaCl 0,5 M e 1 mL de cloreto de metileno, misturando vigorosamente em vórtex. A mistura foi então centrifugada a 5000 rpm por 5 min, transferindo-se a fase orgânica inferior para um novo tubo. O cloreto de metileno foi adicionado ao primeiro tubo por mais duas vezes, centrifugando-se e transferindo-se a fase orgânica para o tubo novo. Posteriormente, esses extratos de cloreto de metileno foram lavados com 2 mL de NaCl 0,5 M, misturando-se vigorosamente em vórtex e centrifugando a 5000 rpm por 5 min. A fase superior aquosa foi descartada, e a lavagem repetida por três vezes. Adicionou-se ao extrato sulfato de sódio anidro, permanecendo em repouso por 1h. A seguir o extrato foi filtrado para um novo frasco, e seco sob fluxo de nitrogênio.

3.11. Testes de atividade antioxidante

3.11.1. Método de seqüestro de radicais livres DPPH

No presente método, foi avaliada a capacidade das substâncias presentes nas amostras em seqüestrar o radical livre 1,1-difenil-2-picril-hidrasila (DPPH, Sigma). Foi preparada uma solução metanólica do radical livre DPPH em concentração aproximada de 20 µg/mL, de modo que o controle (800 µL da solução de DPPH + 400 µL de metanol) apresentasse sua absorbância entre 0,7 e 0,8 a 517 nm.

Para os testes de atividade antioxidante das amostras de própolis, 400 µL dos extratos metanólicos das amostras nas concentrações de 8, 12,5 e 25 µg/mL, foram transferidos para tubos de microcentrifuga. Em seguida, com dois minutos de intervalo entre cada amostra, foram adicionados 800 µL da solução de DPPH. Após a adição do DPPH, as amostras foram agitadas e mantidas no escuro por 20 min. Após este tempo, foi feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro UV-visível

a 517 nm. Como branco foram utilizados 400 µL da amostra em cada uma das concentrações, adicionados a 800 µL de metanol. Como substância de referência, foi utilizado o ácido sinápico, nas mesmas concentrações das amostras. A porcentagem de atividade antioxidante (%AAox) das amostras foi avaliada de acordo com a equação abaixo (Nieva-Moreno *et al.*, 2000; Duarte-Almeida *et al.*, 2006):

$$\% \text{ Aaox} = \frac{\text{Abs C} - (\text{Abs Am} - \text{Abs B})}{\text{Abs C}} \times 100$$

Na qual, Abs C = absorbância do controle; Abs Am = absorbância da amostra;

Abs B = absorbância do branco.

Para testar a atividade antioxidante das frações das amostras (hexano, clorofórmio, acetado de etila e metanol), 400 µL dos extratos fracionados ressuspensos em metanol (25 µg/mL) foram transferidos para tubos de microcentrifuga, e em seguida foram realizados os mesmos passos utilizados nos extratos brutos metanólicos.

O ácido sinápico foi utilizado como substância de referência por ser um fenilpropanóide, classe de substância principal dentre os componentes da própolis verde brasileira, com propriedades antioxidantes (Hayashi *et al.*, 1999).

3.11.2. Sistema β-caroteno/ácido linoléico

A avaliação da capacidade antioxidante das amostras no sistema β-caroteno/ácido linoléico seguiu o método utilizado por Duarte-Almeida *et al.*, (2006), com pequenas modificações. Para o preparo da solução reativa, uma alíquota de 500 µL de uma solução de β-caroteno em clorofórmio (0,2 mg/mL) foi

misturada com 12,5 µL de ácido linoléico e 100 µL de Tween 40. Em seguida o clorofórmio foi evaporado até secagem completa, sob nitrogênio. Após a retirada do clorofórmio, foram adicionados aproximadamente 12,5 mL de água destilada, saturada de oxigênio. A absorbância da solução foi então ajustada com água, de modo que a absorbância do controle (1 mL da solução reativa, adicionado de 20 µL de metanol.) apresentasse um valor entre 0,8 e 0,9 a 470 nm.

Para a reação de oxidação foram utilizadas cubetas plásticas, às quais foram adicionados 1 mL de solução reativa e 120 µL dos extratos de própolis nas seguintes concentrações: 0,05 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,5 mg/mL e 1 mg/mL. A reação foi mantida em temperatura ambiente por 2 h, tendo a absorbância medida a 470 nm a cada 30 min, incluindo o tempo inicial, até o final das 2 h. Foi utilizado como branco 120 µL de cada concentração de amostra, adicionados de 1 mL de metanol; como substância de referência foi utilizado o ácido sinápico, nas mesmas concentrações da amostra. Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição (%I), comparando-se a queda da absorbância nas amostras (A_m = absorbância final – absorbância inicial), com a queda da absorbância no controle (A_c = absorbância final – absorbância inicial), segundo a equação abaixo:

$$\% I = (A_c - A_m) \times 100 \times A_c^{-1}$$

Nos testes de atividade antioxidante das frações das amostras (hexano, clorofórmio, acetado de etila e metanol), 120 µL dos extratos fracionados ressuspensos em metanol (1 mg/mL) foram transferidos para cubetas

plásticas, sendo em seguida realizados os mesmos passos utilizados nos extratos brutos metanólicos.

3.11.3. Atividade antioxidante por cromatografia em camada delgada

As análises por cromatografia em camada delgada seguiram o método descrito por Jasprica *et al.* (2007), com pequenas modificações. Foram utilizadas placas cromatográficas de 20 X 10 cm, recobertas com sílica gel. A aplicação da amostra foi feita em faixas de 15 cm, tendo como controle positivo o ácido sinápico na concentração de 30 µg/mL. As placas foram desenvolvidas com fases móveis diferentes para cada uma das frações, após testes preliminares, tendo sido utilizada a fase móvel que melhor separou as faixas: para as frações de hexano e acetato de etila: tolueno – clorofórmio - acetona (40:25:35) (Nieva-Moreno *et al.*, 2000); para as frações clorofórmicas: hexano - acetato de etila – ácido acético (31:14:5) (Jasprica *et al.*, 2004); para as frações metanólicas: acetato de etila - acetona - ácido acético - água (60:20:10:10) (Birk *et al.*, 2005). Após o desenvolvimento da cromatografia, uma pequena parte das placas foi nebulizada com DPPH 0,3 mM, e mantidas por 30 segundos em temperatura ambiente. As faixas contendo substâncias antioxidantes foram visualizadas como uma mancha amarela no fundo violeta, devido à transformação do radical DPPH violeta na forma reduzida amarela. As porções das faixas que não foram nebulizadas com o DPPH foram então isoladas, e submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia a gás, para identificação destas substâncias.

3.12. Ensaio de citotoxicidade em embriões de ouriço do mar

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados no Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo (Cebimar), com a colaboração do Prof. Dr. José Carlos de Freitas, do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

A atividade antimitótica foi avaliada como a habilidade dos extratos em inibir a clivagem dos ovos de ouriço do mar *Lytechinus variegatus*, coletados em Ilhabela, São Sebastião, São Paulo, por técnicos do Cebimar. A eliminação dos gametas foi induzida pela injeção de KCl 0,5 M na cavidade perivisceral dos ouriços. Os gametas foram recolhidos em recipientes de vidro, contendo água do mar filtrada. Os óvulos foram lavados duas vezes em água do mar filtrada, para a remoção da cobertura gelatinosa envolvendo as células. Os espermatozóides foram mantidos em refrigerador sem diluição até o momento do uso. Os ensaios foram realizados em placas de 12 poços (Corning™) e consistiu em misturar 1 mL da suspensão de óvulos com 20 µL da suspensão de espermatozóides (0,1 mL de espermatozóides + 4,9 mL de água do mar filtrada). Dois minutos após a fertilização foram adicionados 10 µL dos extratos nas concentrações finais de 8, 16 e 32 µg/mL, diluídos em etanol, sendo em seguida adicionada água do mar filtrada, completando um volume final de 2 mL. Como controle, foi realizado um ensaio utilizando 10 µL de etanol em lugar das amostras. As placas foram mantidas em temperatura ambiente (26 ± 2 °C). Em intervalo apropriado, quando a maioria dos embriões apresentava-se na segunda e terceira clivagens (quatro e oito células), alíquotas de 500 µL foram fixadas no mesmo volume de formaldeído 4%, para observação posterior. Cem ovos ou embriões foram contados em triplicata para cada concentração de extrato,

a fim de determinar o número de embriões com desenvolvimento normal (Costa *et al.*, 1996).

3.13. Análises estatísticas

Para verificar se os valores obtidos nos diferentes ensaios é estatisticamente diferente entre as amostras estudadas (cada triplicada foi considerada um grupo), foi realizado o teste estatístico ANOVA (ANalysis Of VAriance) one-way, considerando como significativos valores de $P < 0,05$. Além disso, foi realizado o pós-teste de comparação múltipla de Tukey, que comparou pares de amostras individualmente, verificando se os valores obtidos eram estatisticamente diferentes entre si.

Possíveis relações entre os resultados obtidos nos diferentes ensaios foram testadas através de correlação linear (método dos mínimos quadrados), considerando como significativas as correlações com $R^2 > 0,5$. Para ambos os testes foi utilizado o Software Prism 4.0.

Todos os ensaios foram realizados em triplicatas, a fim de minimizar o erro do método, e os resultados estão expressos na forma de médias $\pm$ desvio padrão. As triplicatas com valores muito discrepantes das demais foram desconsideradas das análises.

Os dados referentes à composição química e atividades biológicas foram submetidos também a uma análise de componente principal (PCA) com o software Fitopac v1 (Shepherd, 1996), a fim de avaliar as correlações entre as amostras provenientes de Minas Geras e Paraná. A fim de se avaliar qualitativamente as amostras quanto às substâncias identificadas, os dados obtidos foram submetidos à

análise de coordenadas principais (PCO) através do mesmo software utilizado anteriormente.

4. RESULTADOS

4.1. Massa seca

A massa seca das amostras de própolis verde analisadas apresentou valores entre 84 e 90% (Tabela 2), indicando que a quantidade de umidade presente nas amostras variou de 10 a 16%.

Tabela 2 – Massa seca das amostras de própolis verde.

Amostra*	Massa Seca (%)
A	86
B	89
C	86
D	90
E	84
F	84

* A, B, C e D - própolis provenientes de Minas Gerais; E e F - própolis provenientes do Paraná.

4.2. Teor de fenóis totais

A curva padrão de ácido *p*-cumárico obtida, bem como sua equação da reta e coeficiente de determinação (R^2), estão representados na Figura 2.

Figura 2 – Curva padrão obtida a partir do ácido *p*-cumárico, para determinação dos teores de fenóis totais de amostras brasileiras de própolis verde.

Com relação ao teor de fenóis totais, foram obtidos valores variando de $132,69 \pm 0,26$ mg/g (13,27 %, amostra F) a $187,57 \pm 7,17$ mg/g (18,76 %, amostra B) (Tabela 3).

Tabela 3- Teores de fenóis totais dos extratos metanólicos brutos de amostras de própolis verde.

Amostra*	Fenóis totais	
	mg/g**	%
A	$166,63 \pm 9,62^{***}$	$16,66 \pm 0,96$
B	$187,57 \pm 7,17$	$18,76 \pm 0,72$
C	$155,3 \pm 3,98$	$15,53 \pm 0,4$
D	$153,43 \pm 7,54$	$15,34 \pm 0,75$
E	$136,92 \pm 5,73$	$13,69 \pm 0,57$
F	$132,68 \pm 0,26$	$13,27 \pm 0,03$

* = A a D – amostras de Minas Gerais; E e F – amostras do Paraná; ** = mg de fenóis totais presentes em 1g de própolis; resultados expressos em relação à massa seca; *** = valores expressos como equivalente de ácido *p*-cumárico; média $\pm$ desvio padrão, n=3.

O teste estatístico ANOVA demonstrou que houve diferenças significativas entre os teores de fenóis totais das amostras ($P = 0,0002$; $F = 12,5$), o que permitiu comparar os resultados obtidos. O pós-teste de Tukey demonstrou que a amostra B (MG) é estatisticamente diferente das demais amostras ($P < 0,05$).

4.3. Teor de flavonas e flavonóis totais

A curva padrão de quercetina obtida bem como sua equação da reta e coeficiente de determinação (R^2), estão representados na Figura 3.

Figura 3 – Curva padrão obtida a partir da quercetina para determinação dos teores de flavonas e flavonóis de amostras de própolis verdes brasileiras.

As amostras apresentaram valores de flavonas e flavonóis totais variando de $15,17 \pm 0,44$ mg/g (1,52 %, amostra E) a $40,42 \pm 1,06$ mg/g (4,04 %, amostra B) (Tabela 4).

Tabela 4 – Teores de flavonas e flavonóis dos extratos metanólicos brutos de amostras de própolis verde.

Teor de flavonas e flavonóis		
Amostra*	(mg/g)**	(%)
A	$33,71 \pm 2,73^{***}$	$3,37 \pm 0,27$
B	$40,21 \pm 1,06$	$4,02 \pm 0,11$
C	$34,98 \pm 2$	$3,5 \pm 0,2$
D	$31,5 \pm 1,66$	$3,15 \pm 0,17$
E	$15,17 \pm 0,42$	$1,52 \pm 0,04$
F	$18,34 \pm 1,12$	$1,83 \pm 0,11$

* = A a D - amostras de Minas Gerais; E e F - amostras do Paraná;

** = mg de flavonas e flavonóis presentes em 1g de própolis, resultados expressos em relação à massa seca;

*** = valores expressos como equivalente de quercetina; média $\pm$ desvio padrão, n=3.

O teste estatístico ANOVA demonstrou que os valores de flavonas e flavonóis totais das amostras analisadas são estatisticamente diferentes entre si ($P < 0,0004$; $F = 11,5$), o que permitiu a comparação dos resultados obtidos. O pós-teste de Tukey demonstrou que as amostras de Minas Gerais, individualmente, são estatisticamente diferentes das do Paraná ($P < 0,001$).

4.4. Teor de flavanonas e isoflavonas totais

A curva padrão de pinocembrina obtida, bem como sua equação da reta e coeficiente de determinação (R^2), estão representados na Figura 4.

Figura 4 – Curva padrão obtida a partir da pinocembrina para a determinação dos teores de flavanonas e isoflavonas de amostras de própolis verdes brasileiras.

As análises do teor de flavanonas e isoflavonas nas amostras de própolis mostraram resultados variando de 11,95 mg/g $\pm$ 0,57 (1,2%, amostra E) a 18,91 $\pm$ 0,89 mg/g (1,9%, amostra B) (Tabela 5).

Tabela 5 – Teores de flavanonas e isoflavonas dos extratos metanólicos brutos de amostras de própolis verde.

Flavonas e isoflavonas totais		
Amostra*	mg/g**	%
A	16,05 ± 1,55***	1,61 ± 0,16
B	18,91 ± 0,89	1,89 ± 0,09
C	13,91 ± 1,21	1,39 ± 0,12
D	15,54 ± 1,1	1,55 ± 0,11
E	11,95 ± 0,57	1,19 ± 0,06
F	15,23 ± 0,93	1,52 ± 0,09

* = A a D - amostras de Minas Gerais; E e F - amostras do Paraná;

** = mg de flavonas e isoflavonas presentes em 1 g de própolis, resultados expressos em relação à massa seca;

*** = valores expressos como equivalente de pinocembrina; média ± desvio padrão, n=3.

O teste estatístico ANOVA demonstrou que os valores de flavanonas e isoflavonas totais das amostras analisadas são estatisticamente diferentes entre si ($P = 0,0001$; $F = 13,64$), o que permitiu comparar os resultados obtidos. O pós-teste de Tukey demonstrou que as amostras A, C e D (MG), individualmente, não são estatisticamente diferentes da amostra F (PR) ($P > 0,05$), e as amostras C e D não apresentam diferenças estatísticas da amostra E ($P > 0,05$).

4.5. Teor de ceras totais

O conteúdo de ceras totais nas amostras variou de $38,79 \pm 11,06$ mg/g (3,88 %, amostra A) a $104,6 \pm 5,7$ mg/g (10,46 %, amostra F). A amostra A de Minas Gerais apresentou um teor de ceras muito mais baixo do que das demais amostras (Tabela 6).

Tabela 6 – Teores de ceras totais de amostras de própolis verde.

Ceras totais		
Amostra*	mg/g**	%
A	38,79 ± 11,06**	3,88 ± 1,11
B	49,573 ± 0,76	4,96 ± 0,08
C	99,8 ± 11,25	9,98 ± 1,13
D	73,62 ± 7,51	7,36 ± 0,75
E	88,49 ± 5,88	8,85 ± 0,59
F	104,6 ± 5,7	10,47 ± 0,57

* = A a D - amostras de Minas Gerais; E e F – amostras do Paraná; ** =mg de ceras presentes em 1g de própolis, resultados expressos em relação à massa seca; *** = valores expressos como equivalente de ácido sinápico; média ± desvio padrão, n=3.

O teste estatístico ANOVA demonstrou que os valores de ceras totais das amostras analisadas são estatisticamente diferentes entre si ($P = 0,0007$; $F = 23,37$), o que permitiu que os resultados obtidos fossem comparados. O pós-teste de Tukey demonstrou que as amostras C e D (MG), individualmente, não são estatisticamente diferentes das amostras E e F (PR) ($P > 0,05$). Entretanto, as amostras A e B mostraram-se estatisticamente diferentes das demais ($P < 0,05$).

4.6 Teste de regressão linear

A fim de verificar possíveis correlações entre os diversos resultados obtidos, foram realizados testes de regressão linear, pelo método dos mínimos quadrados. Os resultados indicam uma correlação inversa significativa entre os teores de ceras e os teores de fenóis totais ($R^2 = 0,626$) (Figura 5 A), porém tal relação não foi verificada em comparação com os teores de flavonas e flavonóis ($R^2 = 0,3687$) (Figura 5 B).

Figura 5 – Relações entre o conteúdo de ceras nas amostras de própolis verde e os teores de fenóis (A) e flavonas e flavonóis totais (B) dos extratos metanólicos brutos, obtidas pela análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. Correlação significativa - $R^2 > 0,5$. A a D - amostras de Minas Gerais; E e F - amostras do Paraná.

4.7. Identificação das substâncias presentes nas amostras

As análises dos espectros de massas nos permitiram a identificação de 34 substâncias, sendo predominantes os derivados prenilados do ácido *p*-cumárico, com presença de ácidos cafeoilquínicos e alguns flavonóides (Figura 6).

Figura 6 – Fórmulas estruturais das substâncias presentes nas amostras de própolis verde brasileiras estudadas, provenientes dos estados de Minas Gerais e Paraná. As substâncias foram identificadas através de CLAE/EM e CG/EM.

Derivados prenilados do ácido cinâmico

ácido *p*-cumárico

drupanina

Artepilina C

Baccharina

Ácido 3-prenil 4-cinamoiloxi cinâmico

Ácido 3-prenil 4-(2-metilpropionilo) cinâmico

Ácido 4-hidroxi-3 (3-metilbutano-4-sec-butildiidrocinaoilo) 5-prenil cinâmico

Ácido 7-prenil benzofuranil-propenóico

Éster alílico do ácido 3-prenilcinâmico

Ácido 2,2-dimetil 8-prenilcromeno 6-propenóico

Ácido 3-hidroxi 2,2-dimetil 8-prenilcromano 6-propenóico

Ácido 4-hidroxi 6-metoxi 3,5-diprenilcinâmico

Ácido 4-hidroxi 2-metoxi 3,5-diprenilcinâmico

Ácido 4-hidroxi 6-metoxi 3,5-diprenil diidrocinâmico

Ácido 4-hidroxi 2-metoxi 3,5-diprenil diidrocinâmico

Figura 6 – Continuação

A identificação das substâncias pelo CG/EM foi realizada através da reconstrução da fórmula estrutural das substâncias, a partir dos fragmentos gerados no espectrômetro de massas. A Figura 7 é um exemplo dessa reconstituição.

Figura 7 – Padrão de fragmentação e fórmula estrutural do éster alílico do ácido 3-prenil cinâmico que apresentou íon molecular= 256, identificado nas frações hexânica e clorofórmica da amostra de própolis B, de Minas Gerais.

Para a identificação das substâncias submetidas ao CLAE/EM, comparou-se o íon molecular formado e seus espectros de absorção no UV com os de substâncias descritas na literatura. A Figura 8 representa um exemplo dessa identificação.

Figura 8 - Artepilina C, identificada nas frações metanólica e de acetato de etila da amostra D, de Minas Gerais – A: Espectro de massas, $\times 10^5$ $(m/z)^+$ = 299,1; B: espectro de absorção no UV (315 nm); C: fórmula estrutural, peso molecular = 300.

Nas frações de hexano e clorofórmio foram identificadas 4 substâncias (Tabela 7, Figuras 9 e 10). As fórmulas estruturais propostas estão descritas na Figura 6.

Tabela 7– Constituintes das frações de hexano e clorofórmio de amostras de própolis verde brasileiras, identificados por CG/EM.

Pico	TR*	Substância	Estrutura proposta	Íon molecular e Fragmentos
1	15,3	1-benzilideno-2,2,3,3,tetrametil-ciclopropano	Fig. 6 XIX	186 (C ₁₄ H ₁₈ , 30**), 171 (100***), 128 (20), 115 (20), 91 (20), 77 (20)
2	16,7	Ácido benzeno propanóico	Fig. 6 XVII	150 (C ₉ O ₂ H ₁₀ , 40), 104 (70), 91 (100), 77 (30)
3	21	<i>p</i> -vinil- <i>O</i> -prenilfenol	Fig. 6 XVIII	188 (C ₁₃ OH ₁₆ , 70), 133 (100), 104 (30), 91 (30), 77 (30).
4	28,6	éster alílico do ácido 3-prenil cinâmico	Fig. 6 XXVIII	256 (C ₁₇ O ₂ H ₂₀ , 80), 201 (100), 185 (70), 157 (50), 145 (100), 115 (40), 91 (40), 77 (20), 69 (30)

*= Tempo de retenção

**= abundância relativa

***= pico base, abundância relativa =100

Figura 9 – Cromatogramas das frações de hexano de seis amostras de própolis verde brasileiras, obtidos por cromatografia gasosa. A, B, C e D - própolis provenientes de Minas Gerais; E e F – própolis provenientes do Paraná.

Figura 10 – Cromatogramas das frações de clorofórmio de seis amostras de própolis verde brasileiras, obtidos por cromatografia gasosa. A, B, C e D - própolis provenientes de Minas Gerais; E e F – própolis provenientes do Paraná.

As frações de clorofórmio foram metiladas e obteve-se 13 picos que, devido a sua derivação, foram identificados como ésteres metílicos das substâncias presentes nas própolis (Tabela 8, Figura 11). As fórmulas estruturais propostas estão descritas na Figura 6.

Tabela 8– Ésteres metílicos das substâncias presentes nas frações clorofórmicas de amostras de própolis verde brasileiras, obtidos após metilação, identificados por CG/EM.

Pico	TR (min)*	Substância	Estrutura	Íon molecular e fragmentos
1	4,284	Éster metílico do ácido benzenopropanóico	Fig. 6 XVII	164 (13**, $C_{10}H_{12}O_2^+$), 104 (100***)
2	13,452	Éster metílico do ácido palmítico	Fig. 6 XV	270 (1, $C_{17}H_{34}O_2^+$), 41 (98,98)
3	15,461	Éster metílico do ácido 4-hidroxi 3-prenil cinâmico (drupanina)	Fig. 6 XXI	246 (70, $C_{15}H_{18}O_3^+$), 191 (100), 171 (20), 131 (23).
4	16,309	Éster metílico do ácido esteárico	Fig. 6 XVI	298 (4, $C_{19}H_{34}O_2^+$), 74(100)
5	17,479	Éster metílico do ácido 2,2-dimetil 8-prenilcromeno 6-propenóico	Fig. 6	312 (14, $C_{20}H_{24}O_3^+$), 297 (100)
6	19,105	Éster metílico do ácido 3-hidroxi 2,2-dimetil 8-prenilcromano 6-propenóico	Fig. 6 XXX	330 (100, $C_{20}H_{26}O_4^+$), 297 (30), 272 (50), 225 (60), 197 (50), 171 (50).
7	19,230	Éster metílico do ácido 4-hidroxi 3,5-diprenilcinâmico (artepilina C)	Fig. 6 XXII	314 (68, $C_{20}H_{26}O_3^+$), 259 (100), 243 (54), 211 (38), 203 (90).
8	19,561	Éster metílico do ácido 4-hidroxi 6-metoxi 3,5-diprenilcinâmico	Fig. 6 XXXI	344 (18, $C_{21}H_{28}O_4^+$), 86 (100),
9	19,905	Éster metílico do ácido 4-hidroxi 2-metoxi 3,5-diprenilcinâmico	Fig. 6 XXXII	344 (8, $C_{21}H_{28}O_4^+$), 43 (100)
10	20,782	Éster metílico do ácido 4-hidroxi 6-metoxi 3,5-diprenildiidrocinâmico	Fig. 6 XXXIII	346 (2, $C_{21}H_{30}O_4^+$), 43 (100)
11	21,02	Éster metílico do ácido 4-hidroxi 2-metoxi 3,5-diprenildiidrocinâmico	Fig. 6 XXXIV	346 (1,51, $C_{21}H_{30}O_4^+$), 73 (100)
12	21,733	Éster metílico do ácido 3-prenil 4(2-metilpropioniloxi) cinâmico	Fig. 6 XXV	330 (13, $C_{20}H_{26}O_4^+$), 43 (100)
13	22,117	Éster metílico do ácido 3 prenil 4-cinamoiloxi cinâmico	Fig. 6 XXIV	376 (3, $C_{24}H_{24}O_4^+$), 75 (100)

*= Tempo de retenção; **= abundância relativa; ***= pico base, abundância relativa =100

Figura 11 – Cromatogramas obtidos por CG-FID, das frações de clorofórmio metiladas, de seis amostras de própolis verde brasileiras. A, B, C e D - própolis provenientes de Minas Gerais; E e F – própolis provenientes do Paraná.

Nas frações de acetato de etila foram obtidos 11 picos (Tabela 9, Figura 12):
cuja fórmula estrutural está descrita na Figura 6.

Tabela 9 – Constituintes da fração de acetato de etila de amostras de própolis verde brasileira, identificados por CLAE/MS.

Pico	Substância	TR*	UV _{máx} **	(m/z) ⁻	(m/z) ⁺	PM***	Estrutura
1	Ácido <i>p</i> -cumárico	34,073	310	162,9	nd****	164	Fig. 6 XX
2	Metoxipinobanksina	65,9	290	301,1	303,1	302	Fig. 6 II
3	Isoramnetina	71,084	268, 365	315	317,1	316	Fig. 6 I
4	Luteolina-5-metil éter	74,355	265, 350	299	301,2	300	Fig. 6 V
5	Drupanina	78,433	315	231	nd	232	Fig. 6 XXI
6	Ácido 3-prenil-4-(2-metilpropioniloxi) cinâmico	81,54	275Sh, 318	315	nd	316	Fig 6 XXV
7	Campferida	82,883	268, 365	299	301,2	300	Fig. 6 IV
8	Ácido 3-hidroxi 2,2-dimetil 8-prenilcromano 6-propenóico.	87,077	320	315,1	nd	316	Fig. 6 XXX
9	Artepilina C	91,43	315	299,1	nd	300	Fig. 6 XXII
10	5-metoxi-4'-hidroxi-flavanona-7-O-glicosídeo	95,352	280	447,3	nd	448	Fig. 6 III
11	Baccharina (Ácido 3-prenil-4 (diidrocinaoiloxi) cinâmico)	97,179	290, 330	363,1	nd	364	Fig. 6 XXIII

*TR = tempo de retenção; ** UV_{máx}= pico máximo de absorção no ultra-violeta; *** PM = Peso molecular; ****nd = não determinado.

Figura 12 – Cromatogramas das frações de acetato de etila de seis amostras de própolis verde brasileira, obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência, com detecção a 270 nm. A, B, C e D - própolis provenientes de Minas Gerais; E e F - própolis provenientes do Paraná.

Nas frações de metanol foram obtidos 13 picos (Tabela 10, Figura 13), cujas fórmulas estruturais estão descritas na figura 6.

Tabela 10 – Constituintes da fração metanólica de amostras de própolis verde brasileira, identificados por CLAE/EM.

Pico	Substância	TR*	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)**	(m/z)-	(m/z)+	PM***	Estrutura
1	Ácido quínico	6,029	279	191	nd****	192	Fig. 6 VI
2	Ácido 3-O-cafeoilquínico	19,18	300, 330	353	355,1	354	Fig. 6 VII
3	Ácido 5-O-cafeoilquínico	21,651	300, 330	352,9	355,2	354	Fig. 6 IX
4	Ácido 4-O-cafeoilquínico	25,823	312	nd	355,1	354	Fig. 6 VIII
5	4-hidroxi 3-(3-metilbutano 4-sec-butil-diidrocinamoiloxi 5-prenilcinâmico	37,155	290, 325	519,1	521,3	520	Fig. 6 XXVI
6	Ácido 3,5-di-O-cafeoilquínico	39,621	300, 330	515,1	nd	516	Fig. 6 X
7	Ácido 4,5-di-O-cafeoilquínico	50,098	300, 330	515,1	517,2	516	Fig. 6 XI
8	Ácido 5-O-cafeoil-3-O-feruloilquínico	53,138	295, 325	529,2	531,3	530	Fig. 6 XIII
9	Ácido 3-O-feruloil-5-O-cafeoilquínico	56,988	300, 325	529,1	nd	530	Fig. 6 XIV
10	Ácido 3,4,5-tricafeoilquínico	61,798	300, 330	677,1	679,3	678	Fig. 6 XII
11	Artepilina C	91,486	315	299	nd	300	Fig. 6 XXII
12	Ácido 7-prenil benzofuranil propenóico	95,299	312	255,2	nd	256	Fig. 6 XXVII

*TR = tempo de retenção; ** $\lambda_{\text{máx}}$ = pico máximo de absorção no ultra-violeta; ***PM = peso molecular;

****nd = não determinado.

Figura 13 – Cromatogramas das frações de metanol de seis amostras de própolis verde brasileira, obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência, com detecção a 270 nm. A, B, C e D - própolis provenientes de Minas Gerais; E e F – própolis provenientes do Paraná.

4.8. Atividade antioxidante

4.8.1. Método de seqüestro dos radicais livres DPPH

A fim de se obter um gráfico que ilustrasse a cinética de reação antioxidante do ácido sinápico, foi feito um teste utilizando concentrações variadas desse ácido. Os resultados obtidos demonstraram que a partir de 30 µg/mL a atividade antioxidante do ácido sinápico atinge um platô (Figura 14). Portanto, para testar a

atividade antioxidante das amostras, foram utilizadas as concentrações de 8, 12,5 e 25 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 14 – Atividade antioxidante do ácido sinápico, pelo método do DPPH.

O método de seqüestro dos radicais livres DPPH nos permite verificar, de uma maneira rápida e simples, se a amostra em questão possui atividade antioxidante. Os resultados obtidos permitiram concluir que todas as amostras analisadas possuem atividade antioxidante, e que esta é dose-dependente (Figura 15).

Figura 15 – Atividade antioxidante, pelo método do DPPH, dos extratos metanólicos brutos de amostras de própolis verde, em comparação com o ácido sinápico. A, B, C e D - própolis provenientes de Minas Gerais; E e F – própolis provenientes do Paraná

As amostras A e B apresentaram maior capacidade antioxidante, com valores de 19,2 e 18,56 respectivamente, na concentração de 25 µg/mL (Tabela 11).

Tabela 11 – Valores da atividade antioxidante dos extratos metanólicos brutos das amostras de própolis verde, em diferentes concentrações, pelo método do DPPH.

Amostra*	Atividade antioxidante (%)		
	8 µg/mL	12,5 µg/mL	25 µg/mL
A	8,16 ± 0,16**	10,9 ± 0,32	19,2 ± 0,6
B	7,57 ± 0,57	10,02 ± 0,77	18,56 ± 0,62
C	6,32 ± 0,13	8,61 ± 0,83	14,97 ± 1,17
D	6,71 ± 0,65	11,79 ± 0,56	15,19 ± 0,47
E	4,55 ± 0,5	4,76 ± 0,76	12,57 ± 0,66
F	4,02 ± 0,3	5,27 ± 0,7	10,5 ± 0,17

* = A a D - amostras de Minas Gerais; E e F - amostras do Paraná; ** = resultados expressos em relação à massa seca; média ± desvio padrão, n=3.

A atividade antioxidante do ácido sinápico foi bastante superior à das amostras testadas. Porém, é importante salientar que o padrão corresponde a uma substância isolada, ao contrário dos extratos de própolis, que são misturas complexas de substâncias, que podem ou não possuir atividade antioxidante.

O teste estatístico ANOVA demonstrou que os valores de atividade antioxidante do extrato metanólico bruto das amostras analisadas (25 µg/mL) são estatisticamente diferentes entre si ($P < 0,0001$; $F = 56,11$), o que permitiu a comparação dos resultados obtidos. O pós-teste de Tukey demonstrou que as amostras de Minas Gerais, individualmente, são estatisticamente diferentes das amostras do Paraná ($p > 0,05$).

4.8.2. Atividade antioxidante dos extratos fracionados pelo método do DPPH

Além dos testes feitos com o extrato metanólico bruto, foi testado o poder antioxidante dos extratos fracionados, na concentração de 25 µg/mL. Quanto à fração de hexano, a amostra A apresentou maior atividade antioxidante ($20,43 \pm 0,55\%$), enquanto as demais amostras apresentaram valores entre $5,03 \pm 0,7\%$ e $17,48 \pm 0,97\%$. Já nas frações de clorofórmio, os maiores valores apresentados foram $20,22 \pm 1,57$ e $20,69 \pm 0,18 \%$ para as amostras A e B, respectivamente, estando as demais amostras entre $8,13 \pm 0,57\%$ e $17,45 \pm 0,47\%$. No que se refere às frações de acetato de etila, os resultados variaram entre $10,79 \pm 1,1$ e $25,59 \pm 0,73\%$, com maior valor para a amostra D. As frações metanólicas apresentaram os maiores valores de atividade antioxidante dentre as frações

analisadas, com valores variando de $25,6 \pm 0,68$ a $41,68 \pm 1,15\%$, sendo que apenas as amostras A e C apresentaram valores abaixo de 35% (Tabela 12).

Tabela 12 – Valores da atividade antioxidante das frações das amostras de própolis verde, pelo método do DPPH.

Frações (25 µg/mL) (%)				
Amostra*	Hexano	Clorofórmio	Acetato de Etila	Metanol
A	$20,43 \pm 0,55^{**}$	$20,22 \pm 1,57$	$21,67 \pm 1,04$	$25,6 \pm 0,68$
B	$17,48 \pm 0,97$	$20,69 \pm 0,18$	$20,35 \pm 0,32$	$41,68 \pm 1,15$
C	$11,54 \pm 0,13$	$17,65 \pm 0,47$	$21,28 \pm 0,48$	$26,02 \pm 0,76$
D	$8,61 \pm 0,33$	$15,82 \pm 0,71$	$25,59 \pm 0,73$	$39,79 \pm 0,24$
E	$5,03 \pm 0,7$	$8,13 \pm 0,57$	$10,79 \pm 1,1$	$35,12 \pm 1,01$
F	$13,06 \pm 0,64$	$13,43 \pm 0,75$	$16,6 \pm 0,7$	$37,83 \pm 0,73$

** = A, B, C e D – própolis provenientes de Minas Gerais; E e F – própolis provenientes do Paraná;

** = resultados expressos em relação à massa seca; média $\pm$ desvio padrão, n=3.

4.8.3. Atividade antioxidante no sistema β -caroteno/ácido linoléico

A primeira etapa realizada foi um teste com concentrações variadas de ácido sinápico (0,05; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; e 2,0 mg/mL), a fim de se obter um perfil de sua capacidade antioxidante no presente sistema. Os resultados obtidos demonstraram que a partir de 1 mg/mL de ácido sinápico, não há aumento significativo em sua capacidade antioxidante (Figura 16). Dessa maneira a capacidade antioxidante das amostras foi testada na concentração de 1 mg/mL, bem como em concentrações menores (0,05; 0,1 e 0,5 mg/mL).

Figura 16 – Atividade antioxidante do ácido sinápico em diferentes concentrações, no sistema β -caroteno / ácido linoléico

Atividade antioxidante do sistema β -caroteno/ácido linoléico permite verificar a capacidade de proteção de uma amostra contra a oxidação de substratos lipídicos (Duarte-Almeida *et al.*, 2006). Os resultados aqui obtidos mostram que todas as amostras analisadas possuem tal atividade, e que esta é dependente da concentração (Figura 17), com decaimento da absorbância com o tempo, semelhante à do ácido sinápico (Figura 18). As amostras B, C e D apresentaram maior capacidade antioxidante, com valores de 84,11, 80,86 e 83,52% respectivamente, na concentração de 1 mg/mL (Tabela 13).

Figura 17 – Atividade antioxidante dos extratos metanólicos brutos das amostras de própolis verde pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico. A a D amostras de Minas Gerais; E e F – amostras do Paraná.

Figura 18 – Descoramento do β -caroteno relativamente ao tempo, na presença de diferentes concentrações de ácido sinápico.

Tabela 13 – Atividade antioxidante dos extratos metanólicos brutos das amostras de própolis verde, em diferentes concentrações, no sistema β -caroteno/ácido linoléico.

Amostra*	Atividade Antioxidante (%)			
	0,05 mg/mL	0,1 mg/mL	0,5 mg/mL	1 mg/mL
A	41,83 $\pm$ 0,91**	53,78 $\pm$ 1,21	73,34 $\pm$ 0,89	76,82 $\pm$ 0,56***
B	59,56 $\pm$ 1,36	66,01 $\pm$ 0,21	81,63 $\pm$ 0,48	84,11 $\pm$ 1,07
C	54,19 $\pm$ 1,85	63,99 $\pm$ 0,88	78,76 $\pm$ 0,5	80,86 $\pm$ 1,57
D	61,6 $\pm$ 0,69	68,48 $\pm$ 1,25	81,65 $\pm$ 0,14	83,52 $\pm$ 0,71
E	47,12 $\pm$ 2,9	52,59 $\pm$ 1,18	69,15 $\pm$ 1,69	71,25 $\pm$ 0,86
F	56,37 $\pm$ 1,58	61,07 $\pm$ 2,28	74,91 $\pm$ 1,49	76,44 $\pm$ 1,58

** = A a D - amostras de Minas Gerais; E e F – amostras do Paraná;

* = resultados expressos em relação à massa seca; média $\pm$ desvio padrão, n=3.

O teste estatístico ANOVA demonstrou que os valores de atividade antioxidante do extrato metanólico das amostras analisadas (1 mg/mL) são estatisticamente diferentes entre si ($P = 0,0003$; $F = 11,65$), o que permitiu a comparação dos resultados obtidos. O pós-teste de Tukey demonstrou que as amostras A, B, C, e D (MG), individualmente, não são estatisticamente diferentes da amostra F (PR) ($p > 0,05$); a amostra A (MG) também não apresentou diferenças estatísticas da amostra E (PR).

4.8.4. Atividade antioxidante dos extratos fracionados no sistema β -caroteno/ácido linoléico

Também foi testada a atividade antioxidante, na concentração de 1 mg/mL, das frações (hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol) das amostras de

própolis analisadas. Quanto à fração de hexano, os resultados variaram de $50,55 \pm 0,52\%$ a $86,27 \pm 1,19\%$, com as amostras A e D apresentando valores acima de 80%. Já as frações de clorofórmio apresentaram atividade antioxidante entre $65,18 \pm 0,16$ e $87,75 \pm 1,37\%$, sendo que as amostras A, C e D apresentaram valores acima de 80%. Nas frações de acetato de etila, os resultados variaram entre $60,15 \pm 1,58$ e $88,16 \pm 0,97\%$, com maior valor para a amostra D. As frações de metanol apresentaram valores de atividade antioxidante variando de $61,16 \pm 3,95$ a $84,95 \pm 0,64\%$, sendo que as amostras A, C e D apresentaram valores acima de 80% (Tabela 14). As amostras A, C e D apresentaram os valores mais altos de atividade antioxidante, em todas as frações testadas.

Tabela 14 – Atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno / ácido linoléico, de frações de amostras de própolis verde

Amostra*	Frações (1mg/mL)			
	Hexano (%)	Clorofórmio(%)	Acetato de etila(%)	Metanol (%)
A	$80,89 \pm 0,57^{**}$	$81,07 \pm 1,64$	$80,7 \pm 0,57$	$80,39 \pm 1,74$
B	$54,67 \pm 1,42$	$65,18 \pm 0,16$	$60,15 \pm 1,58$	$61,16 \pm 3,95$
C	$76,23 \pm 0,33$	$83,72 \pm 0,44$	$83,05 \pm 1,45$	$82,95 \pm 1,6$
D	$86,27 \pm 1,19$	$87,75 \pm 1,37$	$88,16 \pm 0,97$	$84,95 \pm 0,64$
E	$70,69 \pm 0,93$	$77,69 \pm 0,4$	$79,17 \pm 1,32$	$77,03 \pm 1,07$
F	$50,55 \pm 0,72$	$73,79 \pm 0,72$	$76,72 \pm 0,54$	$73,91 \pm 0,54$

* = A a D - amostras de Minas Gerais; E e F – amostras do Paraná;

** = % de própolis, resultados expressos em relação à massa seca; média $\pm$ desvio padrão, n=3.

4.8.5. Teste de regressão linear relacionando a atividade antioxidante

Quanto às atividades antioxidantes, houve uma correlação positiva significativa entre a atividade antioxidante do extrato metanólico bruto e o teor de fenóis totais ($R^2 = 0,835$) (Figura 19 A), resultado obtido também entre o teor de flavonas e flavonóis totais ($R^2 = 0,738$) (Figura 19 B), no método do DPPH. No sistema β -caroteno/ácido linoléico, os resultados mostraram não haver uma correlação significativa ($R^2 = 0,450$) entre o teor de fenóis totais e a capacidade antioxidante do extrato metanólico bruto das amostras (Figura 20 A), entretanto, houve uma correlação positiva significativa quanto a capacidade antioxidante e o teor de flavonas e flavonóis totais ($R^2 = 0,693, < 0,5$) (Figura 20 B).

Figura 19 – Relações entre a atividade antioxidante, pelo método do DPPH, e os teores de fenóis (A) e flavonas e flavonóis totais (B) dos extratos metanólicos brutos de amostras de própolis verde, obtidas pela análise de regressão linear

Figura 20 – Relações entre a atividade antioxidante, no sistema β -caroteno/ácido linoléico, e os teores de fenóis (A) e flavonas e flavonóis totais (B) dos extratos metanólicos brutos de amostras de própolis verde, obtidas pela análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. Correlação significativa - $R^2 > 0,5$. A a D - amostras de Minas Gerais; E e F - amostras do Paraná.

4.8.6. Atividade antioxidante por cromatografia em camada delgada

Com o intuito de uma possível elucidação sobre quais substâncias seriam responsáveis pela atividade antioxidante nas amostras de própolis estudadas, foi realizado um teste de atividade antioxidante em cromatografia de camada delgada.

O padrão de manchas com atividade antioxidante nas diferentes frações foi semelhante entre as amostras estudadas (Figura 21). Desse modo, o isolamento das faixas, e as análises por CLAE e CG foram realizados somente com a amostra A, MG. Foram obtidas duas bandas contendo atividade antioxidante na fração de hexano (Figura 21 I), seis na fração de clorofórmio (Figura 21 II), seis na fração de acetato de etila (Figura 21 III) e quatro na fração de metanol (Figura 21 IV).

Figura 21 – Atividade antioxidante de amostras de própolis verde brasileiras, por cromatografia em camada delgada. A visualização foi feita pela nebulização com solução de DPPH 0,3 mM. I: fração de hexano, fase-móvel: tolueno-clorofórmio-acetona (40:25:35); II: fração de clorofórmio, fase-móvel: hexano-acetato de etila-ácido acético (31:14:5); III: fração de acetato de etila, fase-móvel: tolueno-clorofórmio-acetona (40:25:35); IV: fração de metanol, fase-móvel: acetato de etila-acetona-ácido acético-água (60:20:10:10). AS = padrão de ácido sinápico; A a D, amostras de Minas Gerais; E e F, amostras do Paraná. Os algarismos arábicos correspondem às bandas com atividade antioxidante.

Na faixa 1 da fração hexânica observou-se a presença de duas substâncias principais, que correspondem aos picos 3 e 4 (Figura 22 A), enquanto na faixa 2 observou-se um pico principal, que correspondeu ao pico 4 (Figura 22 B). O pico 3 corresponde ao *p*-vinil-*O*-prenil fenol (Figura 6 XVIII), enquanto o pico 4 corresponde ao éster alílico do ácido prenilcinâmico (Figura 6 XXVIII). A identificação ocorreu por comparação do tempo de retenção dos picos obtidos no presente teste, com o das substâncias descritas na seção anterior.

Figura 22 – Cromatogramas obtidos por CG-FID, das faixas isoladas por cromatografia em camada delgada da fração hexânica da amostra A (MG), nas quais foi detectada atividade antioxidante. **A**: faixa 1; **B**: faixa 2.

Nas faixas 1 e 2 da fração clorofórmica, verificou-se a presença de muitas substâncias, em quantidade muito pequena, de tal maneira que não foi possível atribuir a atividade antioxidante a uma delas, especificamente (Figura 23 A e B). A cromatografia a gás da faixa 3 mostrou também a presença de várias substâncias, entre elas o 1-benzilideno-2,2,3,3,tetrametil-ciclopropano (pico 1, Fig. 6 XIX), o *p*-vinil-*O*-prenilfenol (pico 3, Fig. 6 XVIII) e o éster alílico do ácido prenilcinâmico (pico 4, Fig. 6 XXVIII) (Figura 23 C). Nas faixas 4 e 5, observou-se a

predominância do *p*-vinil-*O*-prenilfenol (pico 3, Fig. 6 XVIII), além de outros picos de menor abundância (Figura 23 D e E), enquanto na faixa 6 apareceu como pico principal o éster alílico do ácido 3-prenilcinâmico (pico 4, Fig. 6 XXVII) (Figura 23 F).

Figura 23 – Cromatogramas obtidos por CG-FID das faixas isoladas por cromatografia em camada delgada da fração clorofórmica da amostra A (MG), nas quais foi detectada atividade antioxidante. **A:** faixa 1; **B:** faixa 2; **C:** faixa 3; **D:** faixa 4; **E:** faixa 5; **F:** faixa 6.

Nas faixas isoladas das frações de acetato de etila, observamos a presença do ácido quínico (pico A, Figura 6 VI) como pico principal na faixa 1, além da presença de diversos picos de menor abundância (Figura 24 A). Apesar do ácido quínico não ter sido identificado na fração de acetato de etila, o espectro de UV e o tempo de retenção do pico A correspondem ao do ácido quínico, identificado apenas na fração de metanol. A faixa 2 correspondeu a um aglomerado de picos de baixo tempo de retenção, muito difíceis, portanto, de serem identificados (Figura 24 B). Na faixa 3 a substância predominante foi o ácido *p*-cumárico (pico 1, Figura 6 XX), mas encontramos também alguns picos com abundância baixa, entre eles o ácido 3-prenil-4-(2-metilpropioniloxi) cinâmico (pico 6, Figura 6 XXV) (Figura 24 C). Na faixa 4, também é predominante o ácido *p*-cumárico (pico 1, Figura 6 XX), com a presença do ácido quínico (pico A, Figura 6 VI), drupanina (pico 5, Figura 6 XXI), ácido 3-prenil-4-(2-metilpropioniloxi) cinâmico (pico 6, Figura 6 XXV), ácido 3-hidroxi 2,2-dimetil 8-prenilcromano 6-propenóico (pico 8, Figura 6 XXX), artepilina C (pico 9, Figura 6 XXII) e 5-metoxi-4'-hidroxi-flavanona-7-*O*-glicosídeo (pico 10, Figura 6 III) em menor quantidade (Figura 24 D). Na faixa 5 foi encontrado como pico mais abundante a drupanina (pico 5, Figura 6 XXI), embora também estejam presentes em grande quantidade o ácido 3-prenil-4-(2-metilpropioniloxi) cinâmico (pico 6, Figura 6 XXV), a 5-metoxi-4'-hidroxi-flavanona-7-*O*-glicosídeo (pico 10, Figura 6 III) e uma substância não identificada (pico B); com menor abundância, verificamos a presença do ácido quínico (pico A, Figura 6 VI), campferida (pico 7, Figura 6 IV) e artepilina C (pico 9, Figura 6 XXII) (Figura 24 E). Na faixa 6 foi encontrado em grande quantidade uma substância que não pode ser identificada (pico C), a metoxipinobanksina (pico 2, Figura 6 II), a drupanina (pico 5, Figura 6

XXI) e o ácido *p*-cumárico (pico 1, Figura 6 XX), embora este último esteja presente em menor quantidade (Figura 24 F).

Figura 24 – Cromatogramas obtidos por CLAE, das faixas isoladas por cromatografia em camada delgada da fração de acetato de etila da amostra A (MG), nas quais foi detectada atividade antioxidante . **A:** faixa 1; **B:** faixa 2; **C:** faixa 3; **D:** faixa 4; **E:** faixa 5; **F:** faixa 6.

Nas faixas da fração de metanol observamos a predominância do ácido quínico (pico 1, Figura 6 VI) nas faixas 1, 2, e 4 (Figuras 25 A, B e D). Na faixa 3, temos a predominância do ácido 4,5-di-*O*-cafeoilquínico (pico 7, Figura 6 XI), com a presença do ácido 4-*O*-cafeoilquínico (pico 3, Figura 6 VIII) em menor abundância (Figura 25 C).

Figura 25 – Cromatogramas obtidos por CLAE, das faixas isoladas por cromatografia em camada delgada da fração de metanol da amostra A (MG), nas quais foram detectadas atividade antioxidante. **A:** faixa 1; **B:** faixa 2; **C:** faixa 3 e **D:** faixa 4.

4.9. Ensaio de citotoxicidade em embriões de ouriço-do-mar

Os ensaios de atividade citotóxica das amostras de própolis, tanto das frações, como dos extratos metanólicos brutos, demonstraram haver grandes diferenças entre o potencial citotóxico das amostras, bem como das diferentes

frações de uma mesma amostra. Além disso, todas as atividades se mostraram dose-dependentes.

Todos os extratos metanólicos brutos apresentaram alta atividade citotóxica na concentração de 32 µg/mL ($97,33 \pm 1,53\%$ a $100 \pm 0\%$) (Figura 26).

Quanto às frações de hexano, apenas as amostras A e B apresentaram alta atividade ($98,5 \pm 2,12\%$ e $68,5 \pm 4,95\%$, respectivamente). As outras amostras, mesmo na maior concentração testada (32 µg/mL), apresentaram uma atividade citotóxica baixa, com valores entre $4,33 \pm 2,08\%$ e $27,5 \pm 0,7\%$ (Figura 27).

As frações de clorofórmio das amostras A, B, C e D apresentaram alta atividade citotóxica, com valores entre $64 \pm 4,24\%$ e $92,5 \pm 0,7\%$ na concentração de 32 µg/mL, enquanto as amostras E e F apresentaram atividade citotóxica baixa ($2 \pm 1\%$ a $15 \pm 1,41\%$) (Figura 28).

As frações de acetato de etila apresentaram alta atividade citotóxica, com valores próximos de 100% na concentração de 32 µg/mL para todas as amostras. As amostras C, D e F alcançaram valores superiores a 80% na concentração de 16 µg/mL (Figura 29).

As frações metanólicas apresentaram atividade citotóxica baixa, menor do que 5% em todas as amostras, mesmo na concentração mais alta utilizada (Figura 30).

Figura 26 – Atividade citotóxica dos extratos brutos metanólicos, em diferentes concentrações, de amostras de própolis verde brasileiras. A a D - amostras de Minas Gerais; E e F – amostras do Paraná.

Figura 27 – Atividade citotóxica das frações de hexano, em diferentes concentrações, de amostras de própolis verde brasileiras. A a D - amostras de Minas Gerais; E e F – amostras do Paraná.

Figura 28 – Atividade citotóxica das frações de clorofórmio, em diferentes concentrações, de amostras de própolis verde brasileiras. A a D - amostras de Minas Gerais; E e F - amostras do Paraná.

Figura 29 – Atividade citotóxica das frações de acetato de etila, em diferentes concentrações, de amostras de própolis verde brasileiras. A, B, C e D - própolis provenientes de Minas Gerais; E e F - própolis provenientes do Paraná.

Figura 30 – Atividade citotóxica das frações metanólicas, em diferentes concentrações, de amostras de própolis verde brasileira. A a D – amostras de Minas Gerais; E e F – amostras do Paraná.

Como as frações de acetato de etila foram as que apresentaram a maior atividade citotóxica dentre as testadas, foi realizada uma curva dose-resposta de uma das amostras (amostra D), com concentrações logarítmicas de razão 1,2, a fim de traçar o perfil da atividade citotóxica desta amostra. Os resultados obtidos apresentam-se na Figura 31, demonstrando que a partir de 15,48 µg/mL, a inibição da clivagem dos embriões desta amostra foi próxima de 100%.

Figura 31 – Curva dose-resposta da atividade citotóxica da fração de acetato de etila da amostra de própolis verde D (Minas Gerais).

Embriões tratados com 10 µL de etanol foram utilizados como controles, e apresentaram clivagens normais (Figura 32 A). Dentre os embriões tratados com 32 µg/mL de extrato metanólico bruto, a maioria apresentou inibição da 1ª clivagem (Figura 32 B), apresentando anomalias de divisão em concentrações menores; já os embriões tratados com 32 µg/mL de extrato da fração de hexano apresentaram anomalias de divisão (Figura 32 C); os embriões tratados com 32 µg/mL de extrato da fração de clorofórmio também apresentaram maioria das divisões anormais (Figura 32 D); os embriões tratados com 32 µg/mL de extrato da fração acetato de etila apresentaram anomalias de divisão e ausência de clivagem nas mesmas proporções (Figura 32 E); os embriões tratados com 32 µg/mL de extrato da fração metanólica apresentaram clivagens normais (Figura 32 F).

Figura 32 – Micrografias mostrando a atividade citotóxica de amostras de própolis verde em embriões de *Lytechinus variegatus*. **A**: Controle, evidenciando embriões desenvolvimento normal, na segunda clivagem (quatro células); **B**: Embriões tratados com 32 µg/mL do extrato metanólico bruto da amostra D, evidenciando inibição da clivagem; **C**: Embriões tratados com 32 µg/mL da fração de hexano da amostra C, evidenciando anomalias de divisão; **D**: Embriões tratados com 32 µg/mL da fração de clorofórmio da amostra D, evidenciando maioria dos embriões com divisões anormais; **E**: Embriões tratados com 32 µg/mL da fração de acetato de etila da amostra A, evidenciando maioria dos embriões com anomalias de divisão ou inibição da clivagem; **F**: Embriões tratados com 32 µg/mL da fração metanólica da amostra A, evidenciando embriões com clivagem normal. A, C e D: amostras provenientes de Minas Gerais.

O teste estatístico ANOVA demonstrou que os valores de atividade citotóxica do extrato metanólico das amostras analisadas (32 µg/mL) não são estatisticamente diferentes entre si ($P = 0,4362$; $F = 1,051$), ou seja, não há diferenças estatísticas entre a atividade citotóxica das amostras estudadas.

No caso das frações de hexano, não é possível estabelecer uma comparação entre a atividade das amostras de Minas Gerais e do Paraná, pois atividade citotóxica da amostra D (MG) não se mostrou estatisticamente diferente das amostras E e F (PR). Nas frações de clorofórmio, a atividade citotóxica das amostras de Minas Gerais apresentou valores estatisticamente diferentes das amostras do Paraná ($P < 0,0001$), permitindo, portanto, inferir que as frações de clorofórmio das amostras de Minas Gerais possuem atividade citotóxica superior às do Paraná. Nas frações de acetato de etila, apenas a amostra A mostrou-se estatisticamente diferente das amostras E e F (PR). Nas frações metanólicas, não houve diferenças estatísticas entre as amostras de Minas Gerais e Paraná.

5. DISCUSSÃO

Quanto ao teor de massa seca das amostras de própolis (86-90%), as de Minas Gerais (A, B, C, D) apresentaram um menor teor de umidade (10-14 %) do que aquelas do Paraná (16 %) (Tabela 2). Com relação aos dados apresentados no trabalho de Woisky & Salatino (1998) (90,2 - 94%), com amostras de própolis brasileiras dos estados de São Paulo, Rio Grande do Sul e Santa Catarina, os valores aqui mostrados foram um pouco menores. Entretanto, como se trata de amostras de localidades diferentes, uma pequena variação nos resultados deveria mesmo ser esperada.

As amostras de Minas Gerais apresentaram valores de fenóis totais variando de 15,34 a 18,76%, enquanto as amostras do Paraná apresentaram valores de 13,27 e 13,69% (Tabela 3). Uma vez que os testes estatísticos aplicados mostraram que há diferenças significativas entre as amostras de Minas Gerais e as do Paraná, pode-se inferir que os teores de fenóis das amostras das duas localidades são diferentes e que as própolis de Minas Gerais apresentam mais substâncias fenólicas que as do Paraná; além disso, pode-se dizer que a amostra B (MG), apresenta um conteúdo fenólico superior ao das demais amostras. As amostras de Minas Gerais apresentaram teores superiores àqueles encontrados por Woisky e Salatino (1998) em amostras de própolis brasileiras (8,78 a 13,72%); entretanto, em amostras do Paraná (E e F) obteve-se teores de fenóis próximos aos obtidos pelos referidos autores. Sheng e colaboradores (2007), estudando também própolis brasileira, chegaram a um valor próximo ao de Woisky e Salatino (1998),

isto é, 134,40 g/kg (13,44 %), e próximo, portanto, aos valores obtidos neste trabalho para as própolis do Paraná.

Os testes estatísticos demonstraram diferença significativa entre os teores de flavonas e flavonóis das amostras de Minas Gerais e do Paraná. Os teores de flavonas e flavonóis nas amostras de Minas Gerais foram superiores aos das amostras do Paraná (3,15 - 4,02% e 1,52 - 1,83%, respectivamente) (Tabela 4).

Estes valores encontram-se acima daqueles obtidos por Woisky & Salatino (1998) (< 3,0 %), porém abaixo daqueles encontrados por Sheng e colaboradores (2007) (7,3 %), em amostras de própolis brasileiras. Estudos recentes, com própolis de regiões temperadas, também obtiveram valores mais altos que os obtidos neste trabalho (> 10,0 %) (Kumazawa *et al.*, 2004).

Os teores de isoflavonas e flavanonas nas amostras de própolis do presente estudo foram muito baixos (1,2 a 1,9%) (Tabela 5). Como os testes estatísticos não demonstraram diferenças entre as amostras quando comparadas individualmente, não se pode afirmar que os teores de flavanonas e isoflavonas das amostras de Minas Gerais sejam maiores ou menores do que os das do Paraná.

As amostras de própolis estudadas por Woisky e Salatino (1998) eram provenientes de colméias localizadas em plantações de eucalipto e laranja em Ribeirão Preto (SP), de laranja-lima em Piracicaba (SP) e de uma flora complexa no Rio Grande do Sul e Santa Catarina. A própolis utilizada por Sheng *et al.* (2007) foi proveniente de uma amostra comercializada, produzida no Brasil, comprada na China, sendo, provavelmente, uma própolis verde. As amostras do presente trabalho são de própolis verde brasileiras, cuja origem botânica é *Baccharis dracunculifolia*. Dessa maneira, a diferença entre os teores de fenóis e flavonóides

das diversas amostras de própolis brasileiras (deste trabalho e dos dois outros citados) deve estar associada à sua origem botânica, isto é, ao material botânico que as abelhas tiveram acesso. Isso refletiu, portando, numa composição química diferenciada.

As amostras de Minas Gerais também apresentaram variação nos teores de fenóis e flavonóides totais, quando comparadas entre si. Esses resultados podem ter refletido a variação na composição química dos indivíduos de *B. dracunculifolia* utilizados na coleta, pois a constituição química pode variar de acordo com a parte da planta ou mesmo com sua fase de desenvolvimento ou a estação do ano (Kumazawa *et al.*, 2003).

Os baixos teores de flavonóides nas própolis brasileiras já eram esperados, uma vez que aquelas de regiões temperadas são constituídas principalmente por flavonóides, enquanto a própolis verde brasileira caracteriza-se pela presença de fenilpropanóides prenilados como constituintes principais (Salatino *et al.*, 2005). Esse fato corrobora os teores mais altos obtidos por Kumazawa *et al.* (2004).

Avaliar o conteúdo de ceras em amostras de própolis é importante para o seu controle de qualidade, pois grandes quantidades de ceras indicam menor conteúdo de substâncias com atividades farmacológicas importantes (Woisky & Salatino, 1998). Nas amostras analisadas houve uma grande variação no teor dessas ceras (38,79% – 104,60%) (Tabela 6). Entretanto, como os testes estatísticos demonstraram que algumas amostras de Minas Gerais não são estatisticamente diferentes das do Paraná, não se pode afirmar que os teores de ceras das amostras de Minas Gerais sejam maiores ou menores do que aqueles do Paraná. Porém pode-se dizer que as amostras A e B (MG) apresentam teores de ceras

significativamente inferiores aos das demais amostras (Tabela 6), uma vez que elas se mostraram estatisticamente diferentes das demais. A análise do teor de ceras mostrou correlacionar-se inversamente com o teor de fenóis, e flavonas e flavonóis totais (Fig. 5 A, B). Assim, amostras com maiores teores de ceras apresentaram quantidades menores de fenóis, flavonas e flavonóis e vice-versa, conforme pôde ser verificado nos resultados obtidos. Como, as substâncias fenólicas são responsáveis, em parte, pela ação farmacológica da própolis, os dados deste trabalho corroboram as informações de Woisky & Salatino (1998), demonstrando que a quantidade de substâncias fenólicas e ceras são inversamente proporcionais.

A identificação de várias substâncias nas amostras estudadas nesse trabalho (Tabelas 7-10, Fig. 6) revelou a presença de alguns flavonóides (Fig. 6 I-IV) e ácidos cafeoilquínicos (Fig. 6 VI-XIV). Entretanto, como substâncias majoritárias, as própolis estudadas apresentaram os derivados prenilados do ácido cinâmico (Fig. 6 XX-XXIV). Essa composição química é condizente com os altos teores de fenóis totais e baixos teores de flavonóides verificados nas amostras estudadas.

Apesar dos perfis cromatográficos das amostras terem-se mostrado semelhantes (Fig. 9-13), algumas diferenças puderam ser observadas. Nas frações de hexano (Tabela 7, Fig. 9), a abundância relativa do éster alílico do ácido 3-prenil cinâmico (Pico 4 – Fig. 9, Fig. 6 XXVII) é maior do que a do *p*-vinil-*O*-prenil fenol (Pico 3 – Fig. 9) nas amostras de Minas Gerais, enquanto nas amostras do Paraná ocorre o inverso (Fig. 9). Nas frações de clorofórmio (Tabela 7, Fig. 10), o éster alílico do ácido 3-prenil cinâmico (Pico 4 – Fig. 10, Fig. 6 XXVIII) possui abundância relativa superior em todas as amostras (Fig. 10). Nas frações de clorofórmio metiladas (Fig. 11) observou-se a ausência do ácido esteárico (Pico 4 – Fig. 11, Fig.

6 XVI) na amostra C, e a presença do ácido benzenopropanóico (Pico 1 – Fig. 11, Fig. 6 XVII) apenas nas amostras A e B. Nas frações de acetato de etila (Tabela 9, Fig. 12) observou-se a campferida (Pico 7 – Fig. 12, Fig. 6 IV) com alta abundância relativa nas amostras de Minas Gerais e o ácido 3-prenil-4-(2-metilpropioniloxi) cinâmico (Pico 6 – Fig. 12, Fig. 6 XXV) com menor abundância relativa; nas amostras do Paraná ocorreu o oposto (Fig. 12). Além disso, observou-se a presença da luteolina-5-metil-éter (Pico 4 – Fig. 12, Fig. 6 V) apenas nas amostras do Paraná. Nas frações de metanol (Tabela 10, Fig. 13), as substâncias presentes e as abundâncias relativas mostraram-se bastante semelhante.

Nas frações de hexano e clorofórmio o *p*-vinil-*O*-prenilfenol (Pico 3 – Fig. 9 e 10, Fig. 6 XVIII) e o éster alílico do ácido 3-prenilcinâmico (Pico 4 – Fig. 9 e 10, Fig. 6 XXVIII) são as substâncias majoritárias. Nas frações de acetato de etila temos como constituintes principais o ácido *p*-cumárico (Pico 1 – Fig. 12, Fig. 5 XX), seguido do ácido 3-prenil-4-(2-metilpropioniloxi) cinâmico (Pico 6 – Fig. 12, Fig. 5 XXV), campferida (Pico 7 – Fig. 12, Fig. 5 IV), artepilina C (Pico 9 – Fig. 12, Fig. 5 XXII) e 5-metoxi 4'-hidroxi-flavanona-7-*O*-glicosídeo (Pico 10 – Fig. 12, Fig. 5 III). Nas frações de metanol, encontramos em maior abundância os ácidos cafeoilquínicos, sendo o principal constituinte o ácido 3,5-di-*O*-cafeoilquínico (Pico 6 – Fig. 13, Fig. 5 X), seguido do ácido 4,5-di-*O*-cafeoilquínico (Pico 7 – Fig. 13, Fig. 5 XI) e ácido 3,4,5-tricafeoilquínico (Pico 10 – Fig. 13, Fig. 5 XII), além do 4-hidroxi-3-(3-metilbutano-4-sec-butildiidrocinamoiloxi)-5-prenilcinâmico (Pico 5 – Fig. 13, Fig. 5 XXVI). A presença majoritária dessas substâncias sugere suas participações nas atividades antioxidantes e citotóxicas verificadas nas frações.

Os resultados demonstram atividade antioxidante significativa em todas as amostras analisadas pelo método do DPPH (10,5 - 19,2%, a 25 µg/mL) (Tabela 11, Fig. 15), sendo a atividade dos extratos metanólicos brutos das amostras de Minas Gerais, estatisticamente superiores à das amostras do Paraná (15,19 - 19,2% e 10,5 - 12,57%, respectivamente, a 25 µg/mL). Com relação à atividade antioxidante das frações das amostras analisadas (Tabela 12), pode-se notar que apesar dos valores serem mais altos nas frações metanólicas, os extratos menos polares também apresentaram alguma atividade antioxidante. A atividade antioxidante também se mostrou significativa no sistema β-caroteno/ácido linoléico (71,25 - 84,11%, a 1mg/mL) (Tabela 13, Fig. 17). Entretanto, por esse sistema, não ocorreram as diferenças observadas pelo método do DPPH. Quando se analisou o poder de antioxição das frações das amostras por meio do sistema β-caroteno/ácido linoléico, verificou-se que as diferenças entre as frações (Tabela 14) não foi tão grande quanto as observadas nas análises com DPPH.

A alta correlação positiva significativa entre a atividade antioxidante dos extratos metanólicos e os teores de fenóis ($R^2 = 0,835$) e flavonas e flavonóis totais ($R^2 = 0,738$) no método do DPPH (Fig. 19 A e B) sugere que essas classes de substâncias atuam como antioxidantes. Esta correlação positiva também foi verificada nos estudos de Chen e colaboradores (2004). De fato, substâncias hidrossolúveis (portanto mais polares) são mais ativas no método do DPPH, enquanto substâncias lipossolúveis (de menor polaridade) são relativamente mais ativas no sistema β-caroteno/ácido linoléico. Os resultados obtidos no sistema β-caroteno/ácido linoléico reforçam esta idéia, uma vez que não houve uma correlação significativa ($R^2 = 0,450$) entre o poder antioxidante e o conteúdo de

fenóis; entretanto, apresentaram uma correlação positiva com o teor de flavonas e flavonóis ($R^2 = 0,693$) (Fig. 20 A e B). Talvez esses flavonóides apresentem muitas metoxilações, o que diminuiria muito a sua polaridade; sua solubilidade em solventes menos polares poderia explicar essa correlação positiva e o poder antioxidante alto das frações de menor polaridade nas amostras analisadas por meio do sistema β -caroteno/ácido linoléico. A atividade antioxidante de frações menos polares de própolis verde já foi previamente verificada. Frações de hexano, clorofórmio e *n*-butanol demonstraram atuar na redução de espécies reativas de oxigênio produzidas por neutrófilos (Simões *et al.* 2004), enquanto frações de éter de petróleo mostraram-se ativas no seqüestro de radicais livres DPPH e no sistema β -caroteno/ácido linoléico (Sheng *et al.*, 2007). Análises de extratos clorofórmicos de própolis verde revelaram a presença de triterpenóides pentacíclicos, substâncias que possuem atividade biológica (Negri *et al.*, 2000). Dessa maneira, ao analisar somente extratos alcoólicos de própolis, corre-se o risco de perder substâncias com atividades biológicas importantes (Negri *et al.*, 2003a). Apesar disso, não foram encontradas pelos métodos utilizados, substâncias que se enquadrassem nessas características.

Foi testado o poder antioxidante das seis amostras de própolis por meio de cromatografia em camada delgada, pela nebulização, depois de desenvolvida a cromatografia, com solução de DPPH 0,3 mM (Fig. 21). Entretanto, não se conseguiu identificar as substâncias responsáveis por tal atividade, uma vez que quando essas faixas isoladas eram cromatografadas em CLAE e CG, várias substâncias estavam presentes. Estas análises com CLAE e CG foram feitas apenas com a amostra A (MG). Nas faixas isoladas das frações de hexano e clorofórmio

(Fig. 22 e 23) observou-se a presença predominante do *p*-vinil-*O*-prenilfenol (Pico 3 – Fig. 22 e 23, Fig. 6 XVII) e do éster alílico do ácido prenilcinâmico (Pico 4 – Fig. 22 e 23, Fig. 6 XXVIII), muitas vezes aparecendo como picos quase isolados, sugerindo fortemente a responsabilidade dessas substâncias pela atividade antioxidante nessas frações. Até onde se sabe, nenhum estudo acerca das atividades dessas substâncias foi reportado até o momento.

A análise das faixas isoladas da fração de acetato de etila (Fig. 24) não nos permitiu atribuir atividade antioxidante a uma substância específica. O ácido *p*-cumárico (Fig. 6 XX), aparece como pico predominante nas faixas 3 e 4 (Pico 1 – Fig. 24 C e D). Como o ácido *p*-cumárico possui atividade antiradicalar (Ferguson *et al.*, 2005), é possível sua participação na atividade antioxidante dessa fração. A presença do ácido quínico (Pico A – Fig. 24, Fig. 6 VI), luteolina-5-metil éter (Pico 4 – Fig. 24, Fig. 6 V), drupanina (Pico 5 – Fig. 24, Fig. 6 XXI), ácido 3-prenil-4-(2-metilpropioniloxi) cinâmico (Pico 6 – Fig 24, Fig. 6 XXV), ácido 3-hidroxi 2,2-dimetil 8-prenilcromano 6-propenóico (Pico 8 – Fig 24, Fig. 6 XXIX), artepilina C (Pico 9 – Fig 24, Fig. 6 XXII), baccharina (Pico 11 – Fig. 24, Fig. 6 XXIII), 5-metoxi 4'-hidroxi-flavanona-7-*O*-glicosídeo (Pico 10 – Fig. 24, Fig. 6 III), campferida (Pico 7 – Fig 24, Fig. 6 IV), e metoxipinobanksina (Pico 2 – Fig. 24, Fig. 6 II), em menor abundância nas faixas, também sugere a participação dessas substâncias como antioxidantes na fração de acetato de etila. No estudo de Hayashi e colaboradores (1999), diversas substâncias isoladas de própolis verde brasileiras foram testadas quanto à atividade antioxidante, através da inibição da peroxidação do ácido linoléico. A artepilina C e a campferida demonstraram alta atividade em baixas

concentrações ($IC_{50}=0,44$ e $0,72 \mu M$, respectivamente), sendo esta atividade verificada também na baccharina ($IC_{50}=160 \mu M$) e na drupanina ($IC_{50}=2,9 \mu M$).

A presença predominante do ácido quínico (Pico 1 – Fig 25, Fig. 6 VI), na maioria das faixas sugere sua participação na atividade antioxidante da fração de metanol (Fig. 25). A presença do 4,5-di-*O*-cafeoilquínico (Pico 7 – Fig.25, Fig. 6 XI) como pico mais abundante na faixa 3 (Fig. 25C), e do ácido 4-*O*-cafeoilquínico (Pico 4 – Fig. 25, Fig. 6 VIII) em menor abundância, também aponta para uma participação dessas substâncias na atividade antioxidante das amostras. O ácido clorogênico possui atividade antioxidante conhecida, atuando como varredor de radicais hidroxila (Zang *et al.*, 2003), sendo tal atividade também verificada no ácido quínico e nos isômeros dos ácidos mono- e di-cafeoilquínicos (Bastos *et al.*, 2007). Os estudos de Wu e colaboradores (2007) demonstraram alta atividade antioxidante dos ácidos 3,5-, 4,5- and 3,4-di-*O*-cafeoilquínicos, no método do DPPH.

Os extratos metanólicos brutos (Fig. 26) mostraram alta atividade citotóxica em embriões de *Lytechinus variegatus*, sendo próxima de 100% na concentração de $32 \mu g/mL$. Com relação à atividade dos extratos fracionados das amostras estudadas, a atividade da fração hexânica (Fig. 27) se mostrou muito variável na concentração de $32 \mu g/mL$. A fração clorofórmica (Fig. 28) mostrou uma baixa atividade das amostras do Paraná (E e F), enquanto as amostras de Minas gerais (A-D) apresentaram atividade acima de 60%. A atividade da fração de acetato de etila (Fig. 29) da maioria das amostras analisadas se mostrou alta a partir de $16 \mu g/mL$. A fração metanólica quase não apresentou atividade em qualquer das concentrações testadas (Fig. 30). A atividade citotóxica das amostras caracterizou-

se principalmente pela inibição da primeira clivagem dos ovos recém-fertilizados, demonstrando um efeito anti-mitótico (Fig. 32). Essa inibição na primeira clivagem, induzida pelas amostras de própolis, pode estar relacionada com a inibição da replicação do DNA e/ou síntese de proteínas (Naves *et al.*, 2006). Estes resultados indicam a presença de substâncias com alto poder citotóxico nas amostras de própolis estudadas.

A atividade citotóxica de amostras de própolis em embriões de *Lytechinus variegatus* é inédita, porém este tipo de teste é usualmente empregado na verificação de atividade citotóxica de extratos de invertebrados marinhos (Costa *et al.*, 1996; Rangel *et al.*, 2001; Naves *et al.*, 2006). É um método rápido e fácil de verificar o potencial citotóxico de substâncias e extratos, podendo ser uma ferramenta útil na busca de substâncias com potencial antitumoral.

A presença predominante do *p*-vinil-*O*-prenilfenol (Pico 3 – Fig. 11, Fig. 6 XVIII) e do éster alílico do ácido 3-prenilcinâmico (Pico 4 – Fig. 11, Fig. 6 XXVIII) nas frações de clorofórmio, sugerem que essas substâncias possam ter alguma participação no potencial citotóxico demonstrado. Porém, elas também estão presentes em grande quantidade nas frações de hexano (Tabela 7, Fig. 10) que, por sua vez, apresentaram atividades citotóxicas baixas (Fig. 27). Uma das explicações poderia ser o fato das frações de clorofórmio possuírem o éster alílico do ácido 3-prenilcinâmico em maior quantidade do que o *p*-vinil-*O*-prenilfenol, enquanto nas frações de hexano as duas substâncias apresentam abundância relativa próxima na faixa A, mas a faixa B apresenta quase que exclusivamente o éster alílico do ácido 3-prenilcinâmico. Nesse caso, o constituinte majoritário seria o responsável pela atividade, sendo, portanto, dependente da quantidade da

substância presente na fração. Porém, tudo isso é especulação, uma vez que não há estudos que liguem essas substâncias a alguma atividade biológica, sendo necessários mais estudos para que se possa chegar a alguma conclusão.

Algumas das substâncias identificadas neste trabalho já foram testadas quanto a sua atividade antitumoral. De acordo com estudos prévios, dentre aquelas que possuem grande atividade anticâncer, estão os derivados do ácido caféico, os flavonóides e a artepilina C (Banskota *et al.*, 1998). Nesses estudos, os autores verificaram alta atividade antitumoral (com $IC_{50} \leq 10 \mu\text{g/mL}$) em algumas substâncias isoladas de própolis brasileiras, dentre elas a campferida; a artepilina C apresentou $IC_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$. Nos estudos de Mishima e colaboradores (2005a) verificou-se a atividade antitumoral da drupanina e da baccharina, em camundongos que receberam células de sarcoma S-180. A ação dessas substâncias induziu a morte celular nos tumores, apresentando menor genotoxicidade às células hematopoiéticas normais do que as drogas anticâncer. No estudo de Ferguson e colaboradores (2005) o ácido *p*-cumárico demonstrou inibir o crescimento de diversas linhagens de células tumorais.

A artepilina C é uma substância que vem sendo muito estudada quanto a diversas atividades biológicas, inclusive contra diversas linhagens de células tumorais. Verificou-se que essa substância em concentrações de $50 \mu\text{g/mL}$ possui atividade citotóxica preferencial contra linhagens de células tumorais, enquanto que as células normais não são afetadas (Matsuno *et al.*, 1997). No estudo de Shimizu *et al.* (2005), constatou-se uma ação bastante eficaz da artepilina C contra o desenvolvimento de células de câncer de cólon.

A alta atividade citotóxica apresentada pela fração de acetato de etila (Fig. 29 e 31) pode ser resultado da alta abundância nessa fração de ácido *p*-cumárico (Pico 1 – Fig. 12, Fig. 6 XX), campferida (Pico 7 – Fig. 12, Fig. 6 IV), artepilina C (Pico 9 – Fig. 12, Fig. 6 XXII) e 5-metoxi 4'-hidroxi-flavanona-7-*O*-glicosídeo (Pico 10 – Fig. 12, Fig. 6 III), com possível participação da drupanina (Pico 5 – Fig. 12, Fig. 6 XXI) e baccharina (Pico 11- Fig. 12, Fig. 6 XXIII), presentes em menor abundância.

As frações metanólicas apresentaram baixa atividade citotóxica (Fig. 30), sugerindo, portanto, que os ácidos cafeoilquínicos (Tabela 10, Fig. 13, Fig. 6 VI- XIV), principais constituintes dessas frações, não possuem tal atividade. No entanto a atividade antitumoral dos ácidos 3,5- di-*O*-cafeoilquínico, 4,5-di-*O*-cafeoilquínico e 3,4,5-tricafeoilquínico foi verificada previamente em células HL-60, de leucemia humana (Mishima *et al.*, 2005b). Nesse estudo, a quantidade de extrato aquoso de própolis brasileira (do estado de Minas Gerais) necessária para um efeito antitumoral foi de 500 µg/mL, enquanto nas atividades testadas no presente trabalho foi utilizada concentração máxima de 32 µg/mL. Além disso, no estudo de Mishima *et al.* (2005b) foram testadas as atividades das substâncias isoladas. Segundo os autores, pode haver uma relação entre essa atividade e o número de grupos cafeoil ligados ao ácido quínico, já que o ácido 3,4,5-tricafeoilquínico apresentou atividade maior do que os ácidos contendo dois grupos cafeoil. Tal relação já havia sido verificada previamente nos estudos antimutagênicos de Yoshimoto e colaboradores (2002), nos quais os ácidos monocafeoilquínicos apresentaram atividade menor do que os dicafeoilquínicos que, por sua vez, apresentaram atividade menor do que o tricafeoilquínico. Sendo assim, é possível

que a ausência de atividade citotóxica nas frações de metanol do presente estudo esteja ligada à baixa concentração testada, e não à ausência de substâncias com tal atividade nas amostras.

Dessa maneira, apesar da semelhança qualitativa das substâncias que compõem as amostras, podemos observar diferenças quantitativas entre as amostras de Minas Gerais e do Paraná, especialmente quanto aos teores de fenóis, flavonas e flavonóis, e a atividade antioxidante no método do DPPH, que se mostraram superiores nas amostras de Minas Gerais. Seria necessário isolar as substâncias encontradas em maior quantidade a fim de testá-las. Mais estudos são necessários para desvendar quais são as substâncias responsáveis pelas atividades observadas nas amostras, principalmente no que diz respeito ao éster alílico do ácido 3-prenil-cinâmico.

6. Considerações Finais

A fim de avaliar as correlações entre as amostras de própolis verde estudadas, foram realizadas Análise de Componente Principal (PCA), e Análise de Coordenadas Principais (PCO). Foi construída uma matriz ordenada com dados quantitativos resultantes de análises químicas e de atividades biológicas na PCA. Os parâmetros considerados foram: teores de fenóis, de flavonas e flavonóis, de isoflavonas e flavanonas, e de ceras totais; atividade antioxidante do extrato metanólico bruto e das frações a 25 µg/mL pelo método do DPPH e a 1 mg/mL pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico; e atividade citotóxica do extrato metanólico bruto e das frações a 32 µg/mL. Para a PCO, foi construída uma matriz binária de presença e ausência, comparando qualitativamente as amostras quanto às substâncias identificadas.

Na PCA obteve-se a separação de quatro grupos, sendo um deles formado pelas amostras E e F (PR), um pelas amostras C e D (MG) e as amostras A e B (MG) separadas em dois grupos distintos (Figura 33). Já a PCO permitiu verificar a separação de quatro grupos, sendo um deles formado pelas amostras E e F (PR), outro pelas amostras A e C (MG) e as amostras B e D (MG) separadas em grupos distintos (Figura 34). As porcentagens de variação elevadas nos dois primeiros eixos (PCA - eixo 1 = 19,11%; eixo 2 = 29,30% e PCO - eixo 1 = 50,43%; eixo 2 = 25,14%), observadas nas análises revelam que a maior parte da variação foi resumida em poucos componentes, sendo visível sua representação gráfica. Apesar das duas análises terem resultado em agrupamentos distintos, algumas semelhanças puderam ser observadas. As amostras provenientes do Paraná, E e F,

foram agrupadas juntas nas duas análises (Figuras 33, 34), demonstrando uma maior similaridade entre elas. As amostras de Minas Gerais agruparam de maneira distinta nas duas análises, porém, em ambos os casos observou-se a separação da amostra B (MG) das demais, demonstrando diferenças entre essa amostra e as demais. Podemos observar que as amostras do Paraná foram as únicas que apresentaram a luteolina 5-metil éter em sua composição (Tabela 9, Pico 4 – Fig. 12) e isso pode ter contribuído para sua separação em relação as amostras de Minas Gerais na PCO. No caso da PCA, os fatores que podem ter contribuído para a separação entre as amostras do Paraná e de Minas Gerais são os teores de fenóis totais (Tabela 3), flavonas e flavonóis totais (Tabela 4) e a atividade antioxidante do extrato metanólico bruto no método do DPPH (Tabela 11, Figura 15). Esses resultados se mostraram superiores nas amostras de Minas Gerais em relação às do Paraná, sendo estes maiores na amostra B, dentre as amostras de Minas Gerais.

Essas análises demonstram, portanto que as amostras do Paraná são semelhantes entre si e diferentes das de Minas Gerais, levando em conta sua composição química e suas atividades biológicas. No caso das amostras de Minas Gerais, estas não formam um agrupamento conciso, refletindo haver uma variação entre elas. Amostras de uma mesma localidade, como a amostra B (município de Esmeralda) é distinta das outras duas, C e D, e com relação ao PCA, está próxima da amostra A, que foi coletada no município de Três Pontas. Isso sugere que as abelhas ao coletarem material para produzirem as própolis, o fazem de plantas diferentes, tendo cada uma delas constituição química diferenciada. Os resultados observados sugerem, portanto, uma ampliação dos estudos químicos e de atividade biológica de própolis de diferentes localidades brasileiras.

Figura 33 – Análise de component principal (PCA) referente às análises químicas e atividades biológicas de amostras de própolis verde brasileiras. Os vetores correlacionam os resultados obtidos nas diferentes análises com seus respectivos agrupamentos. Percentagem de variação dos componentes: eixo 1= 29,30%; eixo 2 = 19,11%. A a D – amostras de Minas Gerais; E e F – Amostras do Paraná.

Figura 34 – Análise de coordenada principal (PCO) referente às substâncias presentes em própolis verde brasileiras. Porcentagem de variação dos componentes: eixo 1 = 50,43%; eixo 2 = 25,14%. A a D – amostras de Minas Gerais; E e F – Amostras do Paraná.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aga, H.; Shibuya, T.; Sugimoto, T.; Kurimoto, M.; Nakajima, S. Isolation and Identification of antimicrobial compounds in Brazilian própolis. Biosci. Biotech. Biochem., 58 (5): 945-946, 1994.
- Ahn, M. K.; Kumazawa, S.; Hamasaka, S.; Bang, K. S.; Nakayama, T. Antioxidant Activity and Constituents of Propolis Collected in Various Areas of Korea. J. Agric. Food Chem. 52: 7286-92, 2004.
- Altug, M. E.; Serarslan, Y.; Bal, R.; Kontas, T.; Ekici, F.; Melek, I. M.; Aslan, H. Duman, T. Caffeic acid phenethyl ester protects rabbit brains against permanent focal ischemia by antioxidant action: A biochemical and planimetric study. Brain Research. 1201: 135 – 142, 2008.
- Amoros, M.; Simoes, C.M.; Girre, L.; Sauvager, F.; Cormier, M. Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. J. Nat. Prod., 55(12): 1732-40, 1992a.
- Amoros, M.; Sauvager, F.; Girre, L.; Cormier, M. *In vitro* antiviral activity of propolis. Apidologie, 23: 231-240, 1992b.
- Bankova, V.; Christov, R.; Popov, S.; Marcucci, M. C.; Tsvetkova, I.; Kujumgiev, A. Antibacterial activity of essential oils from Brazilian propolis. Fitoterapia, 70: 190-193, 1999.
- Bankova, V. S.; de Castro, S. L.; Marcucci, M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. Apidologie, 31: 3-15, 2000.
- Bankova, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. J

- Ethnopharmacol., 100(1-2):114-7, 2005. Review.
- Banskota, A. H.; Tezuka, Y.; Prasain, J. K.; Matsushige, K.; Saiki, I.; Kadota, S. Chemical Constituents of Brazilian Propolis and Their Cytotoxic Activities. J. Nat. Prod., 61: 896-900, 1998.
- Banskota, A. H.; Tezuka, Y.; Adnyana, I. K.; Midorikawa, K.; Matsushige, K.; Message, D.; Huertas, A. A.; Kadota, S. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. J. Ethnopharmacol., 72(1-2): 239-46, 2000.
- Bastos, D. H. M.; Saldanha, L. A.; Catharino, R. R.; Sawaya, A. C. H. F.; Cunha, I. B. S.; Carvalho, P. O.; Eberlin, M. N. Phenolic Antioxidants Identified by ESI-MS from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) and Green Tea (*Camelia sinensis*) Extracts. Molecules, 12: 423-232, 2007.
- Birk, C. D.; Provensi, G.; Gosmann, G.; Reginatto, F. H.; Schenkel, E. P. TLC Fingerprint of Flavonoids and Saponins from Passiflora Species. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 28 (14): 2285 -2291, 2005.
- Burdock, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. Food Chem Toxicol., 36(4): 347-63, 1998. Review.
- Chen, C. N.; Weng, M. S.; Wu, C. L. and Lin, J. K. Comparison of Radical Scavenging Activity, Cytotoxic Effects and Apoptosis Induction in Human Melanoma Cells by Taiwanese Propolis from Different Sources. Evid. Based Complement. Alternat. Med., 1(2): 175-185, 2004.
- Costa, L. V.; Malpezzi, E. L. A.; Matsui, D. H., Machado-Santeli, G. M.; Freitas, J. C. Cytotoxic activity of a methanol extract of *Phallusia nigra* (Tunicata, Ascidiacea). Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 29: 367-

373, 1996.

Cuesta-Rubio, O.; Cuellar-Cuellar, A.; Rojas, N.; Velez-Castro, H.; Rastrelli, L.;

Aquino, R. A polyisoprenylated benzophenone from Cuban propolis. J. Nat. Prod., 62: 1013-1015, 1999.

Dantas, A. P.; Olivieri, B. P.; Gomes, F. H.; De Castro, S. L. Treatment of Trypanosoma cruzi-infected mice with propolis promotes changes in the immune response. J. Ethnopharmacol., 103(2): 187-93, 2006.

de Castro S. L.; Higashi, K. O. Effect of different formulations of propolis on mice infected with Trypanosoma cruzi. J. Ethnopharmacol., 46(1):55-8, 1995.

Duarte-Almeida, J. M.; Santos, R. J.; Genovese, M. I.; Lajolo, F. M. Avaliação da Atividade Antioxidante Utilizando Sistema β -Caroteno/Ácido Linoléico e Método de Seqüestro de Radicais DPPH*. Ciê. Tecnol. Aliment. Campinas, 26(2): 446-52, 2006.

Ferguson, L. R.; Zhu, S.; Harris, P. J. Antioxidant and antigenotoxic effects of plant cell wall hydroxycinnamids acids in cultured HT-29 cells. Mol. Nutr. Food Res., 49: 585 – 693, 2005.

Ghisalberti, E. L. Propolis: a review. Bee world, 60: 59-84, 1979.

Gomes, V.; Fernandes, G. W. Germinação de aquênios de *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae). Acta bot. bras., 16(4): 421-27, 2002.

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. Chem. Pharm. Bull., 47(11): 1521-24, 1999.

Higashi, K. O.; de Castro, S. L. Propolis extracts are effective against Trypanosoma cruzi and have an impact on its interaction with host cells. J.

- Ethnopharmacol., 43(2):149-55, 1994.
- Isla, M. I.; Paredes-Guzman, J. F.; Nieva-Moreno, M. I.; Koo, H.; Park, Y. K. Some chemical composition and biological activity of northern Argentine propolis. J. Agric. Food. Chem., 53(4): 1166-72, 2005.
- Jasprica, I.; Smolcic-Bubalo, A.; Mornar, A.; Medic-Saric, M. Investigation of the flavonoids in Croatian propolis by thin-layer chromatography. JPC – Journal of Planar Chromatography – Modern TLC, 17 (2): 95-101, 2004.
- Jasprica, I.; Bojic, M.; Mornar, A.; Besic, E.; Bucan, K.; Medic-Saric, M. Evaluation of Antioxidative Activity of Croatian Propolis Samples Using DPPH[•] and ABTS^{•+} Stable Free Radical Assays. Molecules, 12: 1006-1021, 2007.
- Jin, U.; Song, K.; Motomura, M.; Suzuki, I. Caffeic acid phenethyl ester induces mitochondria-mediated apoptosis in human myeloid leukemia U937 cells. Mol. Cell. Biochem., 310:43–48, 2008.
- Krol, W.; Scheller, S.; Czuba, Z.; Matsuno, T.; Zydowicz, G.; Shani, J.; Mos, M. Inhibition of neutrophils' chemiluminescence by ethanol extract of propolis (EEP) and its phenolic components. J. Ethnopharmacol., 55(1): 19-25, 1996.
- Kujumgiev, A.; Tsvetkova, I.; Serkedjieva, Y.; Bankova, V.; Christov, R.; Popov, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. J. Ethnopharmacol., 64(3): 235-401, 1999.
- Kumazawa, S.; Yoneda, M.; Shibata, I.; Kanaeda, J.; Tomoko, H.; Nakayama, T. Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of the honeybee behavior and phytochemical analysis. Chem. Phar. Bull., 51 (6): 740-742, 2003.
- Kumazawa, S.; Hamasaka, T.; Nakayama, T. Antioxidant activity of propolis from

- various geographic origins. Food Chemistry, 84: 329-39, 2004.
- Lavie P. The relationship between propolis, poplar buds (*Populus* spp.) and castoreum. Proc.XXV Int. Beekeeping Congr., Grenoble, 1975, Apimondia Publ. House, Bucharest, 1976, pp. 229–233.
- Loayza, I.; Abujder, D.; Aranda, R.; Jakupovic, J.; Collin, G.; Deslauriers, H.; Jean, F. I. Essential oils of *Baccharis salicilifolia*, *B. latifolia* and *B. dracunculifolia*. Phytochemistry, 38: 381-389, 1995.
- Marcucci, M. C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. Apidologie, 26: 83-99, 1995.
- Marcucci, M. C.; Ferreres, F.; Garcia-Viguera, C.; Bankova, V. S.; De Castro, S. L.; Dantas, A. P.; Valente, P.H.; Paulino, N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. J. Ethnopharmacol., 74(2): 105-12, 2001.
- Markham, K. R.; Mitchell, K. A.; Wilkins, A. L.; Daldy, J. A.; Lu, Y., HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zealand propolis. Phytochem., 42(1): 205-11, 1996.
- Matsuno, T.; Jung, S. K.; Matsumoto, Y.; Saito, M.; Morikawa, J. Preferential cytotoxicity to tumor cells of 3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid (artepillin C) isolated from propolis. Anticancer Res. 17(5A): 3565-8, 1997.
- Mishima, S.; Ono,Y.; Araki, Y.; Akao,Y.; Nozawa, Y. Two Related Cinnamic Acid Derivatives from Brazilian Honey Bee Propolis, Baccharin and Drupanin, Induce Growth Inhibition in Allograftedv Sarcoma S-180 in Mice. Biol. Pharm. Bull., 28(6): 1025–1030, 2005a.

- Mishima, S.; Inoh, Y.; Narita, Y.; Ohta, S.; Sakamoto, T.; Araki, Y.; Suzuki, K.; Akao, Y.; Nozawa, Y. Identification of caffeoylquinic acid derivatives from Brazilian propolis as constituents involved in induction of granulocytic differentiation of HL-60 cells. Bioorganic & Medicinal Chemistry., 13: 5814–5818, 2005b.
- Naves, J. L.; Prado, M. P.; Rangel, M.; De Sanctis, B.; Machado-Santelli, G.; Freitas, J. C. Cytotoxicity in the marine dinoflagellate *Prorocentrum mexicanum* from Brazil. Comparative Biochemistry and Physiology, 143 (C): 73–77, 2006.
- Negri, G.; Marcucci, M. C.; Salatino, A.; Salatino, M. L. F. Comb and propolis waxes from Brazil (States of São Paulo and Paraná). J. Braz. Chem. Soc., 11(5): 453-457, 2000.
- Negri, G. N.; Salatino, M. L. F.; Salatino, A. "Green propolis": unreported constituents and a novel compound from chloroform extracts. Journal of Apicultural Research, 42(3): 39-41, 2003a.
- Negri, G.; Salatino, M. L. F.; Salatino, A. Unusual chemical composition of a sample of Brazilian propolis, as assessed by analysis of a chloroform extract. Journal of Apicultural Research, 42 (4): 53-56, 2003b.
- Nieva-Moreno, M. I.; Isla, M. I.; Sampietro, A. R.; Vattuone, M. A. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis of several regions of Argentina. J. Ethnopharmacol., 71: 109-114. 2000.
- Orsolic, N.; Knezevic, A. H.; Sver, L.; Terzic, S.; Basic, I. Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. J Ethnopharmacol., 94(2-3): 307-15, 2004.

- Park, Y. K.; Ikegashi, M.; Alencar, S. M. Classification of Brazilian propolis by physicochemical methods and biological activity. Mensagem doce, 58: 2-7, 2000.
- Park, Y. K.; Alencar, S. M.; Aguiar, C. L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. J Agric Food Chem., 50(9): 2502-6, 2002.
- Park, Y. K.; Paredes-Guzman, J. F.; Aguiar, C. L.; Alencar, S. M.; Fujiwara, F. Y. Chemical constituents in *Baccaris dracunculifolia* as the main botanical origin of Southeastern Brazilian propolis. J. Agric. Food Chem., 52: 110-1103, 2004.
- Pereira, A. S.; Bicalho, B.; Aquino Neto, F. R. Comparison of propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula*. Apidologie, 34: 291-298, 2003.
- Pietta, P. G. Flavonoids as Antioxidants. J. Nat. Prod., 63: 1035-1042, 2000.
- Pisco, L.; Kordian, M.; Peseke, K.; Feist, H. Michalik, D.; Estrada, E.; Carvalho, J.; Hamilton, G.; Rando, D.; Quincoces, J. Synthesis of compounds with antiproliferative activity as analogues of prenylated natural products existing in Brazilian propolis. European Journal of Medicinal Chemistry, 41: 401-407, 2006.
- Popova, M.; Silici, S.; Kaftanoglu, O.; Bankova, V. Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. Phytomedicine., 12(3): 221-8, 2005.
- Popravko S. A., Chemical composition of propolis, its origin and standardization, in: A Remarkable Hive Product: PROPOLIS, Apimondia Publ. House, Bucharest, 1978, pp. 15-18.

- Prytyk, E.; Dantas, A. P.; Salomão, K.; Pereira, A. S.; Bankova, V. S.; De Castro, S. L.; Neto, F. R. Flavonoids and trypanocidal activity of Bulgarian propolis. J Ethnopharmacol., 88(2-3): 189-93, 2003.
- Rangel, M.; de Sanctis, B.; Freitas, J. C.; Polatto, J. M.; Granato, A. C.; Berlinck, R. G. S.; Hadju, E. Cytotoxic and neurotoxic activities in extracts of marine sponges (Porifera) from southeastern Brazilian coast. Journal of experimental Marine Biology and Ecology., 262: 31-40, 2001.
- Russo, A.; Longo, R.; Vanella, A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. Fitoterapia. 73 (1): S21-S29, 2002.
- Salatino, A.; Teixeira, E. W.; Negri, G.; Message, D. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. Evid. Based Complement. Alternat. Med., 2(1): 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. Lett. Appl. Microbiol., 38(2): 87-92, 2004.
- Santos, F. A.; Bastos, E. M. A. F.; Maia, A. B. R. A.; Uzeda, M.; Carvalho, M. A. R.; Farias, L. M.; Moreira, S. A. Brazilian propolis: physicochemical properties, plant origin and antibacterial activity on periodontopathogens. Phytoter. Res., 71: 285-289, 2003.
- Sforcin, J. M.; Fernandes, A. Jr.; Lopes, C. A.; Bankova, V.; de Funari, S. R. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. J. Ethnopharmacol., 73(1-2): 243-9, 2000.

- Sforcin, J. M.; Fernandes-Júnior, A.; Lopes, C. A. M.; Funari, S. R. C.; Bankova, V. Seasonal effect of Brazilian propolis on *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. J. Venom. Anim. Toxins, vol 7, 2001.
- Sheng, J.; Zhou, J.; Wang, L.; Xu, J.; Hu, Q. Antioxidant activity of ethanol and petroleum ether extracts from Brazilian propolis. Eur. Food. Res. Technol. 225: 249–53, 2007.
- Shepherd, G. J.; Fitopac 1. Manual de usuário. Departamento de Botânica, UNICAMP.
- Shimizu, K.; Das, S. K.; Hashimoto, T.; Sowa, Y.; Yoshida, T.; Sakai, T.; Matsuura, Y.; Kanazawa, K. Artepillin C in Brazilian Propolis Induces G0/G1 Arrest via Stimulation of Cip1/p21 Expression in Human Colon Cancer Cells. Molecular Carcinogenesis, 44: 293–299, 2005.
- Silici, S.; Kutluca, S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. J Ethnopharmacol., 99(1): 69-73, 2005.
- Silva, B. B.; Rosalen, P. L.; Cury, J. A.; Ikegaki, M.; Souza, V. C.; Esteves, A.; Alencar, S. M. Chemical Composition and Botanical Origin of Red Propolis, a New Type of Brazilian Propolis. Evid. Based Complement. Alternat. Med., 1-4, 2007.
- Simões, L. M.; Gregório, 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. J Ethnopharmacol., 94(1): 59-65, 2004.

- Tazawa, S.; Warashina, T.; Noro, T.; Miyase, T. Studies on the constituents of Brazilian propolis. Chem. Pharm. Bull., 46(9): 1477-1479, 1998
- Tazawa, S.; Warashina, T.; Noro, T. Studies on the constituents of Brazilian propolis II. Chem. Pharm. Bull., 47(10): 1388-1392, 1999.
- Teixeira, E. W.; Negri, G.; Meira, R. M.; Message, D.; Salatino, A. Plant Origin of Green Propolis: Bee Behavior, Plant Anatomy and Chemistry. Evid. Based Complement. Alternat. Med., 2(1): 85-92, 2005.
- Tomas-Barberán, F. A.; Garcia-Viguera, C.; Vitolivier, P.; Ferreres, F.; Tomás-Lorente, F. Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. Phytochemistry, 34: 191-6, 1993.
- Trusheva, B.; Popova, M.; Bankova, V.; Simova, S.; Marcucci, M. C.; Miorin, P. L.; Pasin, F. R.; Tsvetkova, I. Bioactive Constituents of Brazilian Red Propolis. Evid. Based Complement. Alternat. Med., 3(2): 249-54, 2006.
- Walker, P. and Crane, E. Constituents of propolis. Apidologie, 18(4): 327-334, 1987.
- Watanabe, M.; Hishikawa, K.; Takayanagi, A.; Shimizu, N.; Nakaki, T. Caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis by inhibition of NFkB and activation of Fas in human breast cancer MCF-7 cells. The Journal of Biological Chemistry, 279(13): 6017-6026, 2004.
- Woisky, R. G.; Salatino, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. J Apicultural Res., 37: 99-105, 1998.
- Wu, C.; Chen, F.; Wang, X.; Wu, Y.; Dong, M.; He, G.; Galyean, R. D.; He, L.; Huang, G. Identification of Antioxidant Phenolic Compounds in Feverfew

(*Tanacetum parthenium*) by HPLC-ESI-MS/MS and NMR. Phytochem. Anal. 18: 401-410, 2007.

Yoshimoto, M.; Yahara, S.; Okuno, S.; Islam, M. S.; Ishiguro, K.; Yamakawa, O. Antimutagenicity of Mono-, Di-, and Tricaffeoylquinic acid derivatives isolated from sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) leaf. Biosci. Biotechnol. Biochem., 66 (11): 2336-2341, 2002.

Zang, L.; Cosma, G.; Gardner, H.; Castranova, V.; Vallyathan, V. Effect of chlorogenic acid on hydroxyl radical. Mol. Cell. Biochem., 274: 205 - 210, 2003.

8. RESUMO

A própolis é uma mistura complexa de substâncias, constituída por ceras de abelhas e resinas de plantas. Sua coloração e textura são bastante variáveis, e a composição química difere com o local onde está localizada a colméia. As abelhas utilizam a própolis para selar aberturas na colméia, como revestimento interno, manutenção de um ambiente asséptico, entre outros propósitos. Suas propriedades farmacológicas são conhecidas há tempos, sendo que, dentre as principais, pode-se citar a ação antimicrobiana, a antiinflamatória, a antioxidante e a citotóxica. O presente trabalho teve como objetivos principais a caracterização química, por meio do doseamento de fenóis, ceras e flavonóides, de seis amostras de própolis verde, provenientes de Minas Gerais e do Paraná, e a identificação por CG/EM e CLAE/EM de algumas substâncias presentes nas amostras. Além disso, foram testados os extratos brutos metanólicos e as frações hexânicas, clorofórmicas, metanólicas e de acetato de etila das amostras, quanto à atividade citotóxica em embriões de ouriço-do-mar, e quanto à atividade antioxidante. A caracterização química ocorreu através da quantificação do teor de ceras, por gravimetria, que variou de 38,79 a 104,6 mg/g. Os teores de fenóis totais foram obtidos através de reação colorimétrica com o reagente Folin-Ciocalteu ($\lambda=760$ nm) e variou de 132,69 a 187,57 mg/g. A quantificação de flavonas e flavonóis ocorreu através da reação com AlCl_3 ($\lambda=420$ nm), variando de 15,17 a 40,42 mg/g. Os teores de flavanonas e isoflavonas foram quantificados através da reação com a dinitrofenilhidrazina ($\lambda=486$ nm), sendo obtidos os valores de 11,95 a 18,91 mg/g. Os perfis cromatográficos mostraram-se bastante semelhantes, sendo identificadas 35 substâncias, predominando os derivados prenilados do ácido *p*-cumárico, ácidos cafeoilquínicos e alguns flavonóides. As atividades antioxidantes seguiram os métodos de redução do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila, $\lambda=517$ nm) e o sistema β -caroteno/ácido linoléico ($\lambda=470$ nm). Os resultados obtidos pelo primeiro método variaram de 10,50 a 18,56% (25 $\mu\text{g/mL}$), e pelo segundo método a variação foi de 71,2 a 84,1% (1 mg/mL). Alta atividade antioxidante, nas mesmas concentrações, também foi verificada nas frações de hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, nos dois métodos. Possíveis relações entre a atividade antioxidante e os teores de fenóis e flavonas e flavonóis foram testadas através de correlação linear, pelo método dos mínimos quadrados, assumindo como significantes valores de $R^2 > 0,5$. Verificou-se uma correlação positiva significativa entre a atividade antioxidante e os teores de fenóis no método do DPPH ($R^2 = 0,835$). Essa correlação, entretanto, não foi observada no sistema β -caroteno/ácido linoléico ($R^2 = 0,450$). Quanto ao teor e flavonas e flavonóis, observou-se uma correlação positiva significativa tanto no método do DPPH ($R^2 = 0,783$) quanto no sistema β -caroteno/ácido linoléico ($R^2 = 0,693$). A ausência de correlação com o método de descoloração do β -caroteno e a presença de atividade antioxidante em frações de menor polaridade sugere que substâncias solúveis em solventes menos polares estejam atuando como antioxidantes nas própolis estudadas. As atividades citotóxicas foram testadas em embriões de ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* e foram caracterizadas principalmente pela inibição da primeira clivagem dos ovos recém-fertilizados, demonstrando um efeito anti-mitótico. Foi utilizada a concentração de 32 $\mu\text{g/mL}$ de extrato para os testes, e a atividade variou de 97,33 a 100%. Na mesma concentração, verificou-se alta atividade nas frações de acetato de etila (100%), e baixa nas frações de metanol (< 5%); nas frações de hexano e clorofórmio a atividade foi bastante variável (4,33 a 98,5% e 2 a 92,5%, respectivamente). Os resultados sugerem a presença de substâncias com potencial citotóxico e, possivelmente, antitumoral, importantes para o desenvolvimento de novos tratamentos para o câncer. Por meio das PCA e PCO concluiu-se que as própolis coletadas em Minas Gerais diferem entre si, inclusive entre aquelas de mesma localização. As amostras coletadas no Paraná se mostraram muito semelhantes nas duas análises. Houve, entretanto, diferenças significativas entre as amostras A-D, coletadas em Minas Gerais, e aquelas, E e F, coletadas no Paraná.

9. ABSTRACT

Propolis is a complex mixture of substances derived from bee products and plant resins. Propolis color and texture vary widely and chemical composition is dependent on the hive locality. Bees use propolis to seal openings in the hive and to line it internally, which help keeping the environment aseptic. Propolis properties in medicine has been known since ancient times, and more recently activities such as antimicrobial, anti-inflammatory, antioxidant and cytotoxic have been demonstrated. The present work aimed to characterize chemically six samples of green propolis produced in the states of Minas Gerais and Paraná and identify their constituents by GC/MS and HPLC/MS. In addition, this investigation aimed to evaluate cytotoxic and antioxidant activities of the crude hexane, chloroform, ethyl acetate and methanol extracts of all samples. Chemical characterization was carried out by the determination of the contents of wax, total phenols and flavonoids. Wax content was determined by extracting the waxes with chloroform, followed by purification with cold methanol and gravimetric determination. Wax contents varied from 28.79 to 104.6 mg/g. Total phenols were determined with the Folin-Ciocalteu reagent and. Values obtained varied in the range 132.69 – 187.57 mg/g. Flavone and flavonol contents combined were determined by the AlCl_3 method and values obtained varied from 15.72 to 40.42 mg/g. Contents of flavanones and isoflavones combined were determined by the dinitrophenylhydrazine method, values varying in the range 11.95 – 18.91. Chromatographic patterns were similar for all samples, with the predominance of derivatives of *p*-coumaric acid, caffeoylquinic acids and few flavonoids. Antioxidant activity determination followed the methods of the free radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrihydrazyl) and the β -carotene/linoleic acid. Results relative the former method and the crude methanol extract at 25 $\mu\text{g/mL}$, results varied from 10.50 to 18.56%; regarding the latter method and the crude methanol extract at 1 mg/ml, results varied in the range 71.2 – 84.1%. High antioxidant activities at the same concentrations and using both methods were observed with the hexane, chloroform, ethyl acetate and methanol fractions. Relationships between antioxidant activity and contents of total phenols and flavonoids of the crude methanol extract were tested by means of linear correlation and the minimum square method, assuming as significant values of $R^2 > 0.5$. Positive significant correlation was observed between antioxidant activity and total phenol contents determined with the DPPH method ($R^2 = 0.835$). No significant correlation was obtained, however, with the β -carotene/linoleic acid method ($R^2 = 0.450$). As to the flavone plus flavonol content, positive correlation was obtained with both DPPH and β -carotene/linoleic acid methods ($R^2 = 0.783$ and 0.693 , respectively). No correlation with the β -carotene discoloration method and high antioxidant activity of fractions obtained with low polarity solvents suggest that lipophylic chemical constituents exert antioxidant activity in analyzed samples. Cytotoxic activities of crude methanol extracts at 32 $\mu\text{g/mL}$ were determined using sea urchin (*Lytechinus variegatus*) embryos, taking into account mainly the inhibition of the first cleavage of recently fertilized eggs, which characterize an anti-mitotic effect. Values obtained varied in the range 97.33 – 100%. At the same concentration, high activities were obtained with the ethyl acetate fraction (100%) and low activities with methanol fraction ($< 0.5\%$). Regarding hexane and chloroform fractions, values varied widely (4.33 – 98.5% and 2 – 92.5%, respectively). Based on chemical composition, PCA and PCO analyses were carried out aiming the establishment of affinities among the six propolis samples. The results indicate that the samples from Minas Gerais differ significantly from those of Paraná. The two samples of Paraná are very similar; however, significant differences exist among the four samples of Minas Gerais, even among samples from the same locality.