

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Curso de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos**

**MÉTODOS DE CONTROLE QUÍMICO
DE AMOSTRAS DE PRÓPOLIS**

RICARDO GOMIDE WOISKY DO RIO

**Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE**

Orientador:

Prof. Dr. ANTONIO SALATINO

São Paulo

1996

Este trabalho dedico à minha mãe e ao Hillo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que colaboraram de forma direta ou indireta na realização deste trabalho, especialmente

Ao Prof. Antonio Salatino pela orientação e abertura para novas idéias.

À Profa Maria Luiza Faria Salatino pelas críticas e sugestões.

Ao Laboratório de Sistemática do Depto de Botânica/USP pela identificação dos espécimens vegetais.

Ao Laboratório de Genética de Abelhas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, ao Depto de Entomologia da ESALQ/USP e à empresa Apisflora de Ribeirão Preto pelas amostras de própolis.

Ao amigo Alexandre pela elaboração das curvas padrões.

À Hyun Sun Cho pela amizade e auxílio ao longo deste trabalho.

À Lili.

Às moças do Laboratório pelo ambiente alegre e descontraído (em especial à Neidinha), pelos cafezinhos e pelos litros e litros de metanol e clorofórmio destilados.

À Elisabete Claro de Souza Paiva, secretária do curso de Pós-graduação em Fármaco e Medicamentos, pela atenção dispensada ao longo deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pelos recursos financeiros que possibilitaram a realização deste trabalho.

RICARDO GOMIDE WOISKY DO RIO

MÉTODOS DE CONTROLE QUÍMICO
DE AMOSTRAS DE PRÓPOLIS

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE

Prof. Dr. Antonio Galatino
Presidente e Orientador

Prof. Dra. Maria Cristina Marcucci Ribeiro
2º Examinador

Prof. Dr. Jorge Luiz Sefren
3º Examinador

SÃO PAULO, 22 DE 11 DE 1996

ÍNDICE

1 - INTRODUÇÃO.....	1
1.1 - Definição.....	1
1.2 - Origem, elaboração e função da própolis na colméia.....	1
1.3 - Farmacologia.....	5
1.4 - Composição química e métodos analíticos.....	9
2 - PROPOSIÇÃO.....	15
3 - MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 - Material.....	17
3.1.1 - Amostras de própolis.....	17
3.1.2 - Reagentes e soluções.....	20
3.1.3 - Aparelhos.....	22
3.2 - Métodos.....	22
3.2.1 - Preparação das amostras de própolis.....	22
3.2.1.1 - Tinturas.....	23
3.2.1.2 - Extração em aparelho de Soxhlet.....	23
3.2.2 - Obtenção da quercetina a partir de rutina.....	23
3.2.3 - Métodos espectrofotométricos.....	24
3.2.3.1 - Teor de fenóis totais pelo método de Folin-Denis.....	24
3.2.3.2 - Teor de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteau.....	24
3.2.3.3 - Teor de flavonóides.....	25
3.2.3.4 - Teor de ácidos fenólicos.....	26
3.2.3.5 - Avaliação do percentual de erro dos métodos espectrofotométricos.....	26
3.2.3.6 - Avaliação da eficácia do processo extrativo S.....	26
3.2.4 - Teor de ceras.....	26

3.2.4.1 - Teor de ceras em própolis bruta.....	27
3.2.4.2 - Teor de ceras em tinturas.....	27
3.2.5 - Teor de cinzas.....	28
3.2.6 - Teor de compostos voláteis.....	28
3.2.7 - Resíduo seco.....	28
3.2.8 - Densidade.....	28
3.2.9 - Teor de álcool etílico absoluto.....	28
4 - RESULTADOS.....	30
4.1 - Métodos espectrofotométricos.....	30
4.1.1 - Curvas padrões e coeficientes de correlação.....	30
4.1.2 - Estimativa do percentual de erro.....	32
4.1.3 - Avaliação da eficácia do processo extrativo S.....	33
4.1.4 - Teores de fenóis totais, flavonóides e ácidos fenólicos em extratos e tinturas.....	34
4.2 - Teor de ceras.....	36
4.3 - Teores de cinzas e compostos voláteis.....	37
4.4 - Resíduo seco.....	37
4.5 - Densidade.....	38
4.6 - Teor de álcool etílico absoluto.....	38
5 - DISCUSSÃO.....	39
5.1 - Métodos espectrofotométricos.....	39
5.1.1 - Escolha das metodologias.....	39
5.1.2 - Problemas de precipitação da solução de carbonato de sódio e da própolis presente no extrato.....	39
5.1.3 - Escolha das substâncias padrões.....	41
5.1.4 - Escolha do comprimento de onda no doseamento de flavonóides.....	41
5.1.5 - Análises estatísticas.....	42

5.1.6 - Validação dos métodos espectrofotométricos.....	42
5.1.7 - Validação do processo extrativo S.....	49
5.1.8 - Teores de fenóis totais, flavonóides e ácidos fenólicos em extratos e tinturas.....	49
5.2 - Teor de ceras.....	51
5.3 - Teor de cinzas.....	52
5.4 - Teor de compostos voláteis.....	52
5.5 - Resíduo seco.....	53
5.6 - Densidade.....	53
5.7 - Teor de álcool etílico absoluto.....	53
5.8 - Perfil químico das amostras de própolis ensaiadas.....	54
6 - CONCLUSÕES.....	56
7 - BIBLIOGRAFIA.....	58
RESUMO.....	73
ABSTRACT.....	74

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Definição

A própolis é uma complexa mistura de substâncias, elaborada pelas abelhas (*Apis mellifera* L.), de aspecto resinoso cuja coloração varia bastante em função da flora disponível pela colméia, podendo ir do amarelo-esverdeado ao marrom escuro; aumenta bastante sua viscosidade com o aquecimento, por volta de 40°C, ocorrendo endurecimento abaixo de 10°C^{39,48,62}.

A palavra própolis é derivada do grego pro - para ou em defesa, e polis - a cidade (no caso a colméia), dando o significado de “em defesa da colméia”³⁹.

1.2 - Origem, elaboração e função da própolis na colméia

Estudos acerca da origem da própolis têm sido feitos desde 1900. Em 1908, Helfenberg⁵⁰ mencionou que as abelhas obtêm resina de ramos, folhas e botões de *Betula*, *Ulmus* e árvores contendo bálsamo. Por isso, a composição da própolis varia em função da flora. A origem vegetal da própolis foi constatada por Jaubert⁵¹ em 1926, que isolou crisina de amostras de própolis. Esse flavonóide foi encontrado também em *Populus nigra* L. var. *pyramidalis* que vegetava no local da colméia³⁹.

É geralmente aceito que as abelhas coletam resina de várias plantas nos países de clima temperado do hemisfério norte, particularmente espécies de *Populus*, *Betula*, *Ulmus*, *Pinus*, *Alnus*, *Prunus*, *Salix*, *Quercus*, *Picea* e *Aesculus hippocastanum* L.⁹³. No entanto, muito pouco se conhece sobre essas árvores como fonte de própolis. Menos ainda se sabe sobre a origem da própolis nos trópicos³⁹.

Um trabalho realizado na Itália com amostras de própolis de vários países, inclusive do Brasil, demonstrou ser possível, com poucas exceções, estabelecer a origem geográfica da própolis com base na análise do pólen presente nas amostras⁸¹.

A análise macroscópica e microscópica do resíduo insolúvel em solventes orgânicos ou água revelou a presença de elementos de condução do xilema, fragmentos epidérmicos apresentando tricomas tectores e fibras⁹³.

Atualmente, acredita-se que a própolis é formada a partir de produtos do metabolismo das abelhas (ceras)^{74,92}, de resinas de plantas (quercetina, apigenina, ácido ferúlico, ácido cafeico etc.), materiais que foram introduzidos durante a elaboração da própolis (pólen)⁶² e substâncias coletadas que sofreram algum tipo de modificação na sua estrutura por alguma enzima presente na saliva das abelhas^{39,75}.

Os fatores que desencadeiam a elaboração de própolis pelas abelhas não estão completamente esclarecidos. Alguns observadores⁴¹ têm sugerido que fatores sazonais podem ter um peso maior do que a disponibilidade de resina pela colméia³⁹.

O mecanismo de coleta e deposição de resina por abelhas operárias dentro da colméia tem sido descrito por vários autores^{1,18,66,68}. Um artigo¹⁸ descreve claramente a coleta de resina de *Populus*. Gemas que se desenvolvem nos ramos no início de março atraem as abelhas coletoras de resina. As abelhas rompem pedaços de resina exsudada das gemas, usando as patas posteriores e as peças bucais. Os pedaços são umedecidos com a língua, formando pequenas esferas pelas mandíbulas. Com a ajuda das patas, as abelhas transferem as esferas da mandíbula para a corbícula, que é uma parte externa posterior da tíbia (Figura 1). Enquanto a abelha deposita resina na corbícula ela também pode estar elaborando própolis com a mandíbula^{39,102}.

A coleta de resina pode levar um longo tempo, podendo ser interrompida por visitas à colméia para alimentação. Quando a corbícula está totalmente tomada, as abelhas finalmente depositam a resina na colméia. Parece que as abelhas que normalmente elaboram própolis também a manipulam dentro da colméia. Essas abelhas são mais velhas do que aquelas que fazem os favos e as células de mel, e

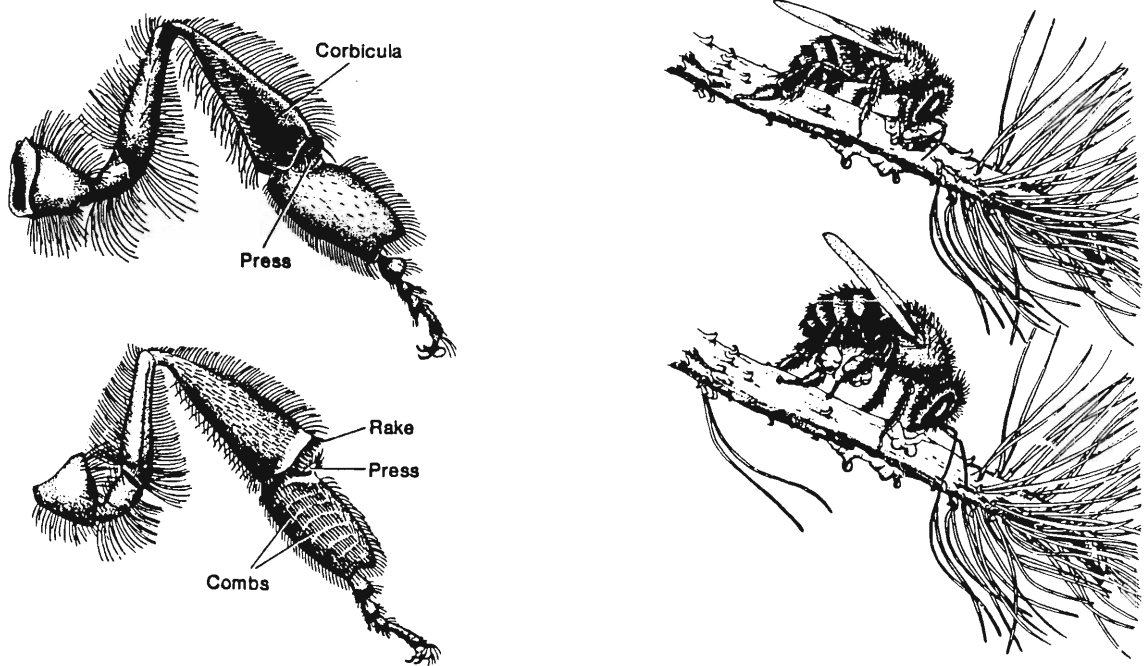


Figura 1. Coleta de resina de *Pinus* por abelhas.

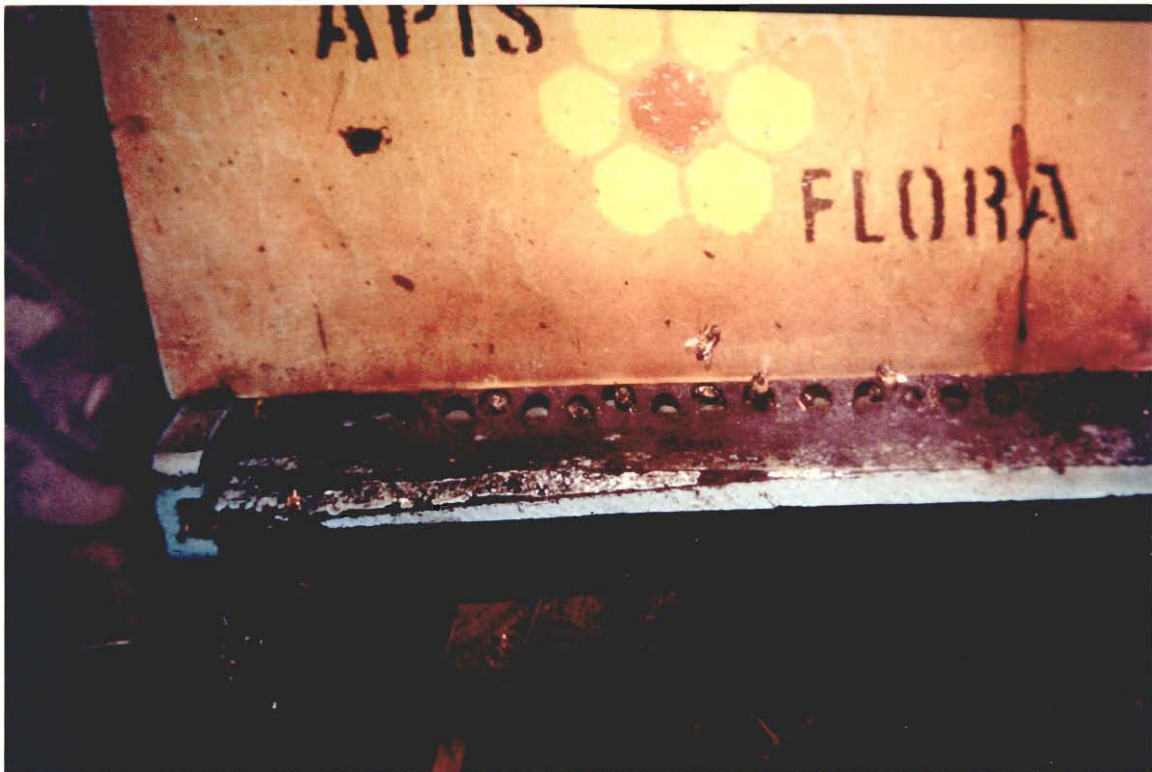


Figura 2A. Deposição de própolis na entrada do ninho da colméia.



Figura 2B. Deposição de própolis na tampa da colméia.



Figura 2C. Deposição de própolis na caixa e caixilhos da colméia.

suas glândulas de secreção de cera são relativamente atrofiadas³⁹.

As abelhas utilizam a própolis para vedar frestas e cavidades, ocorrendo também grande deposição de própolis na entrada do ninho (Figura 2A), na tampa da colméia (Figura 2B) e na caixa e caixilhos (Figura 2C)^{38,62}. Essa atividade tem por objetivo manter a temperatura estável dentro da colméia o que acarreta em maior deposição de própolis nos períodos de temperatura mais baixa, ou seja, no inverno. A própolis é também utilizada para “embalsamar” invasores que são mortos pelas abelhas e que elas não conseguem transportar para fora da colméia, como por exemplo camundongos, besouros, vespas etc^{17,62,73}. A decomposição desses organismos acarretaria em crescimento de bactérias e outros microrganismos que poderiam ser prejudiciais à colméia³⁹.

1.3 - Farmacologia

Para alguns constituintes presentes na própolis já se verificou atividade farmacológica. Por exemplo, nas concentrações de 0,065 mg/ml a galangina inibe o crescimento de *Bacillus subtilis* por 12 horas; a 0,080 mg/ml, ela inibe o crescimento de *B. alvei* por 24 horas e o crescimento de *Proteus vulgaris* por 12 horas. A pinocembrina inibe o crescimento de *B. subtilis* por 24 horas na concentração de 0,03 mg/ml. O ácido cafeico demonstrou ter atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *P. vulgaris*; apresenta ainda atividade inibitória sobre *Micobacterium tuberculosis* e sobre *Helminthosporium carbonum*. O ácido ferúlico evidenciou atividade antibacteriana para alguns microrganismos gram-positivos e gram-negativos, contribuindo para a ação bactericida e bacteriostática da própolis³⁹.

Os flavonóides em geral têm amplo espectro de atividade: antiinflamatória, antitrombogênica, antiviral, nas anormalidades da permeabilidade capilar etc³⁹.

Na medicina popular de muitas partes do mundo, a própolis desfruta de boa reputação como eficiente medida contra diversos males causados por bactérias, inclusive a tuberculose^{42,62}.

Na ex-URSS, a própolis mereceu especial atenção em medicina humana e veterinária. Relata-se que ensaios clínicos ali realizados revelaram resultados positivos com o uso da própolis no tratamento da tuberculose⁸⁶.

Ensaio microbiológicos com extratos de própolis foram realizados por vários autores, observando-se atividade pronunciada contra grande parte dos microrganismos estudados⁴². Assim, relata-se boa atividade da própolis contra *Bacillus alvei*, *B. subtilis* e *Proteus vulgaris*; atividade mediana contra *B. larvae*, *Escherichia coli* B, *Salmonella gallinarum* e *S. pullorum*, atividade nula contra *Pseudomonas pyocyanea* e quatro linhagens de *E. coli*^{57,93}. Própolis coletada no estado de São Paulo revelou-se ativa contra *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium smegmatis* e *Staphylococcus aureus*, revelando-se inativa contra *E. coli*⁴. A atividade antibacteriana da própolis presente em uma formulação foi ensaiada *in vitro* frente a diversas bactérias recém isoladas de pacientes com inflamação das vias respiratórias superiores. Observou-se boa atividade contra as bactérias gram-positivas e nenhuma ou pouca atividade em gram-negativas¹⁰³.

Extratos de própolis foram também ensaiados frente a fungos, verificando-se sua atividade contra 20 das 39 espécies estudadas³⁹. Ensaio realizados com *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. guilliermondii* demonstrou ter atividade inibitória do crescimento em concentrações de 5%³⁰.

Além de ação antimicrobiana, atribui-se à própolis outras atividades farmacológicas, como ação anestésica (três vezes mais ativa que a procaína na anestesia completa da córnea de coelho), ação estimulante na regeneração de tecidos³ (daí seu uso em dermatologia e como coadjuvante no tratamento de úlceras), além de uma série de outras propriedades medicinais³⁹.

Em odontologia, verificou-se que a ação tópica de uma solução hidroalcoólica de própolis a 5% favorece a reparação de ferida cirúrgica, exercendo, também, leve efeito analgésico e antiinflamatório⁶¹.

Há poucos estudos sobre os efeitos antivirais da própolis. Estudos realizados com extratos obtidos de diferentes solventes e algumas de suas frações demonstraram ter efeito sobre a reprodução de viroses tipo A e B de influenza e vaccinia virus. Muitos flavonóides e derivados de ácidos aromáticos exibem atividade antiviral. Um desses derivados, o isopentil-ferulato⁶², em concentração de 50 mg/ml inibiu significativamente virus da gripe *in vitro*.

A atividade antiprotozoária do extrato etanólico de própolis foi constatada *in vitro* em 3 linhagens de *Trichomonas vaginalis*, além do efeito coccidiostático considerável contra *Chilomonas paramecium*. Outros efeitos sobre o crescimento *in vitro* de *Giardia lamblia* também foi observado⁶².

A avaliação *in vivo* da atividade antimalárica da própolis contra *Plasmodium berghei*¹³ não foi evidenciada, apesar de relato³⁷ de um apicultor da região amazônica sobre o uso de extrato de própolis como profilático e curativo.

Verificou-se a atividade antiinflamatória em modelos de inflamação aguda e crônica²⁵ e em edema de pata de cobaias, provocado por carragenina, em comparação com diclofenaco⁵².

A atividade antioxidante foi evidenciada em dois ensaios: inibição da quimioluminescência, provavelmente devido ao alto conteúdo de flavonóides⁵⁶, e inibição da peroxidase⁹⁹.

Demonstrou-se atividade antitumoral em tumores de Ehrlich, observando-se sobrevivência de 55% nos animais aos quais se administrou o extrato etanólico de própolis, e de 40% nos animais tratados com bleomicina⁸². Um éster do ácido cafeico isolado da própolis^{80,85,88} teve atividade citotóxica em células tumorais⁴⁷ e inibiu um tumor de pele em rato³⁵.

Poucos estudos têm sido feitos para determinar se a própolis e seus extratos são tóxicos, embora sejam geralmente considerados produtos inócuos, talvez devido ao grande consumo pela população sem que tenha havido casos de intoxicação³⁹.

O extrato etéreo de própolis revelou-se atóxico para ratos brancos em doses de 0,35 mg/g p.c. e a DL₅₀ após 19 horas para o extrato etéreo e etanólico foi de 0,7 mg/g p.c. Gatos toleram a concentração de 0,1 mg/g p.c. do extrato etanólico administrado subcutaneamente¹. Para ratos a toxicidade sub-aguda do extrato etanólico administrado por via oral foi maior que 7,34 g/kg pelo tempo de 8 dias².

Casos de dermatites são poucos: estudos recentes indicam que por volta de 1 a cada 2000 apicultores podem ser sensíveis. Os estudos sobre alergia têm determinado que os componentes alergênicos da própolis derivam principalmente de resinas de *Populus*³⁹.

Ensaio de sensibilização demonstraram que 26 compostos diferentes foram capazes de sensibilizar cobaias. Dentre eles, 19 ocorrem na própolis e em *Populus*, e 14 compostos são também encontrados no bálsamo do Peru. Os ésteres do ácido cafeico e ferúlico foram os que tiveram a mais forte sensibilização. Flavonóides aglicônicos são fracos sensibilizadores, tendo um papel menor na hipersensibilização⁴⁹.

Nos casos de alergia à própolis recomenda-se a aplicação de uma camada de pasta de silicone antes da exposição³⁹.

Quando as fontes de própolis estão ausentes, as abelhas usam substitutos, por exemplo produtos feitos pelo homem como tinta, betúmen ou óleos minerais. Na Austrália, as abelhas raspam esmalte de maquinário agrícola recém-pintado, antes da secagem. Esse tipo de produto pode conferir alguma toxicidade à própolis⁵⁴.

1.4 - Composição química e métodos analíticos

A própolis contém uma fração insolúvel em água ou solventes orgânicos, constituída provavelmente por material polimérico de origem natural³⁹.

Na fração solúvel em água ou solventes orgânicos são encontrados os principais compostos com atividade farmacológica. Em termos amplos, ela contém 50% de resinas, 40% de cera e 10% de substâncias voláteis^{14,26,40}. No entanto, a proporção dessas substâncias depende do local e época de coleta^{7,40}. Estudos minuciosos sobre a composição de própolis de regiões de clima temperado revelaram que a fração resinosa é composta principalmente por substâncias fenólicas, com o predomínio de flavonóides^{8,39,43,58,70,76,93,94,100}. Dentre as 149 substâncias listadas por Ghisalberti³⁹ que compreendem substâncias fenólicas e não fenólicas, 38 são flavonóides, 14 fenilpropanóides e 12 derivados do ácido benzóico. Os demais componentes são álcoois terpênicos e sesquiterpênicos, além de hidrocarbonetos.

Walker & Crane¹⁰⁰ publicaram uma lista de compostos identificados em própolis, compreendendo várias classes de substâncias. Diversas classes são mencionadas abaixo.

a - Componentes da fração resinóide

- Flavonóides, como quercetina, galangina, pinocembrina e apigenina (Figura 3A)^{97,98}. Os flavonóides apresentam biogênese mista, com o anel A formado pela via biossintética do acetato-malonato, iniciando-se pelos precursores acetil-CoA e malonil CoA. O anel B é formado a partir da via do ácido chiquímico, partindo dos precursores eritrose-4-fosfato e fosfoenol piruvato, que formam o ácido chiquímico. Com a adição de outra molécula de fosfoenolpiruvato, ao final do processo forma-se fenilalanina ou tirosina. Por desaminação desses aminoácidos aromáticos, obtêm-se fenilpropanóides, como o ácido cinâmico (derivado da fenilalanina) e o ácido *p*-cumárico (derivado da tirosina). Com a inclusão dos fenilpropanóides na biossíntese dos flavonóides, o anel aromático da unidade

C_6C_3 corresponderá ao anel B, e a cadeia lateral C_3 do fenilpropanóide corresponderá aos átomos de carbono 2, 3 e 4 do flavonóide⁹⁶.

- Ácidos aromáticos, como ácido salicílico, ácido gálico (Figura 3B), ácido p-cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico (Figura 3C) todos com biossíntese baseada na via do ácido chiquímico^{19,59,60,77,78,96}.

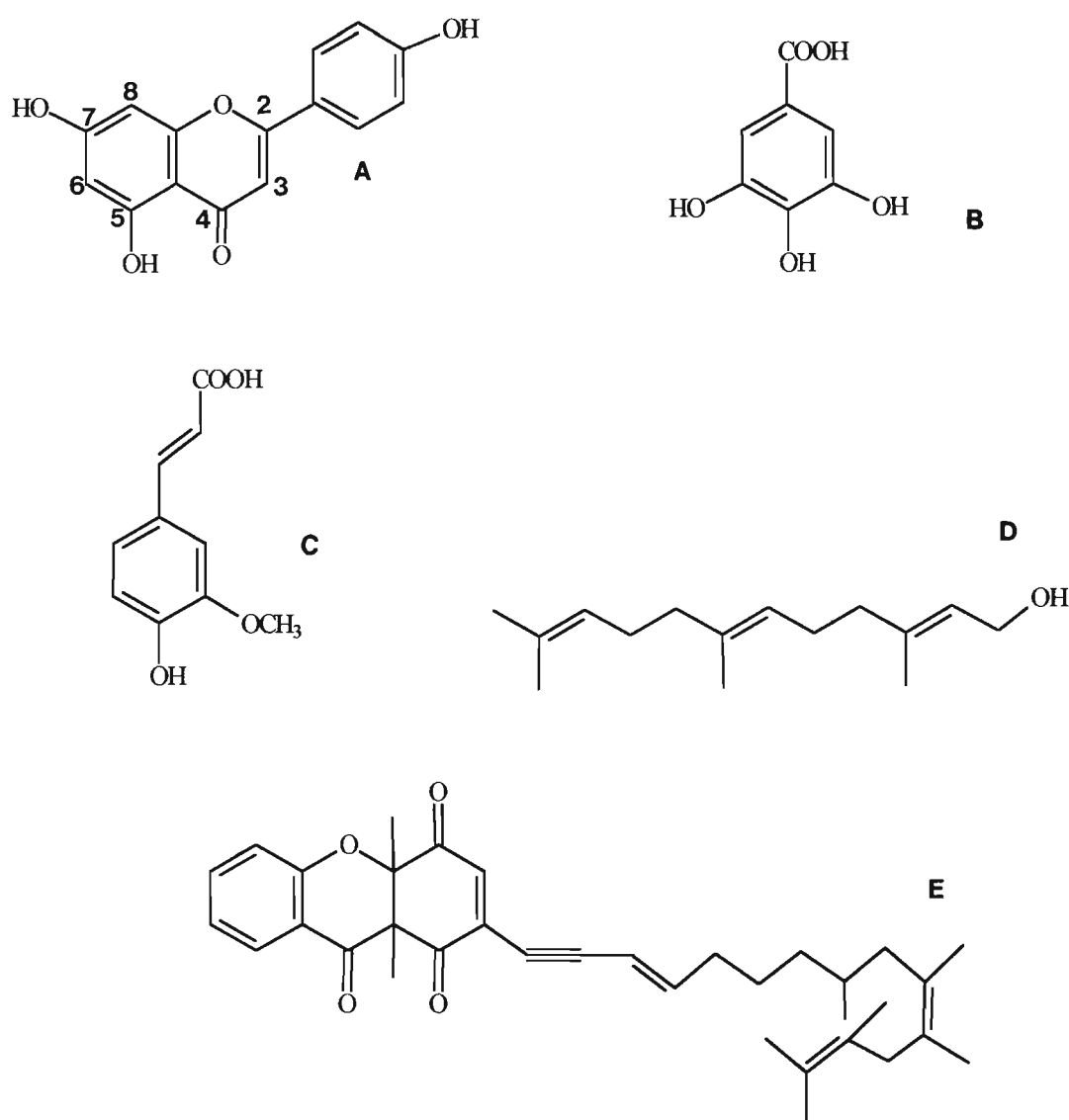


Figura 3. Substâncias encontradas em amostras de própolis. A: apigenina; B: ácido gálico; C: ácido ferúlico; D: farnesol; E: isolada de própolis cubana.

b - Componentes de ceras

Em termos quantitativos as ceras representam uma importante fração da própolis, e têm a sua origem biossintética a partir da via do acetato-malonato⁹⁶. Em sua composição química predominam: 1) hidrocarbonetos com número ímpar de átomos de carbono, variando de C₂₁H₄₄ a C₃₅H₇₂, com cadeia normal e saturada; 2) ésteres de cadeia longa e saturada, mas ocasionalmente podendo apresentar uma insaturação, 3) álcoois e ácidos livres, como ácido esteárico⁷⁵.

c - Outros componentes

- Derivados do benzaldeído como vanilina e isovanilina, álcoois, cetonas, e compostos heteroaromáticos como álcool benzílico e cumarina⁴⁴.
- Compostos terpênicos, com biossíntese pela via do acetato-mevalonato a partir dos precursores acetil-CoA e acetoacetil-CoA⁹⁶. Geraniol, farnesol (Figura 3D), cariofileno, esqualeno, lanosterol, colesterol são exemplos dessa classe de compostos⁵³.
- minerais (Na, K, Mg, Fe, Ca, Zn, etc.)^{83,64}, açúcares (D-frutose, D-glicose etc.), aminoácidos^{36,63} e vitaminas, como B1, B2, B6, C e E^{62,22,23}.

Em própolis de origem cubana isolou-se uma substância inédita²⁰, dotada de atividade antimicrobiana (Figura 3E). Substâncias com esse padrão estrutural não foram ainda detectadas em amostras de própolis de regiões de clima temperado.

Há evidências de que a composição química da própolis varia em função da flora disponível pela colméia^{7,9,45,62,71}. Em uma amostra de própolis de origem tropical detectaram-se dois compostos com espectros de UV e fragmentação em espectrômetro de massa, muito semelhantes a uma benzofenona poliprenilada (Figura 4) isolada de frutos de *Clusia nemorosa*, não encontradas em amostras de própolis de regiões de clima temperado⁹¹. Em outras amostras de própolis de região tropical detectou-se a presença de flavonóides encontrados em própolis de clima temperado, entretanto em outras amostras sua presença foi somente a nível de traços. Outras amostras não evidenciaram a presença de compostos fenólicos⁹¹.

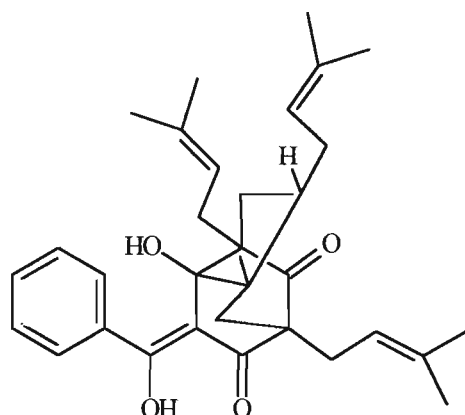


Figura 4. Substância isolada de *Clusia nemorosa*.

Muitos métodos analíticos têm sido utilizados para o isolamento e identificação dos constituintes da própolis^{6,9,10,11,44,46,55,62}.

Bankova et al.⁷ analisaram a composição fenólica e a possível flora provedora de resinas de amostras de própolis da Bulgária e Mongólia. A investigação envolveu o uso de espectrômetro de massa acoplado a cromatógrafo a gás. De 31 compostos identificados na própolis, 26 foram encontrados em concentrações semelhantes à observada na resina de *Populus nigra*.

Em um estudo de flavonóides de própolis, Bankova et al.⁸ isolaram e identificaram sete flavonóides com uso de HPLC, MS, PMR, TLC e UV. Todos esses compostos haviam sido encontrados previamente em própolis.

Greenaway et al.⁴⁵ utilizando espectrômetro de massa acoplado a cromatógrafo a gás, verificaram que todos os compostos identificados nas amostras de própolis analisadas eram similares aos encontrados na composição do exsudato das gemas de espécies de *Populus*, que seriam as possíveis fontes de resina para a elaboração da própolis.

Muito pouco tem sido feito para determinar quantitativamente classes de substâncias ou mesmo um constituinte de amostras de própolis. A quase totalidade dos trabalhos publicados trata da determinação qualitativa dos componentes da

própolis. Um trabalho foi desenvolvido por Bankova et al.¹² com o emprego de cromatografia gás-líquido, na tentativa de determinar quantitativamente quatro principais compostos com propriedades farmacológicas de amostras de própolis de clima temperado.

Por outro lado, já existem na literatura vários métodos de dosagem de classes de substâncias em plantas, como por exemplo fenóis totais¹⁰¹.

Folin & Denis publicaram em 1912 dois trabalhos^{31,32}, um baseado no uso de compostos com estrutura fosfotúngstica-fosfomolibdica como reagentes de coloração, e outro baseado no uso dos mesmos reagentes na determinação de tirosina em proteínas. Embora o método seja bastante eficiente para medir o teor de tirosina em proteínas, é raramente utilizado para isso atualmente.

Quimicamente, a reação de Folin & Denis é simples, embora a estrutura do complexo inorgânico formado permaneça desconhecida. A reação é uma oxidação-redução na qual o íon fenolato é oxidado sob condições alcalinas, enquanto reduz o complexo fosfotúngstico-fosfomolibdico no reagente, resultando uma solução de coloração azul¹⁰¹.

A metodologia publicada inicialmente por Folin & Denis em 1912 passou por sucessivas modificações até ser adotada pela AOAC (Association of Official Agricultural Chemists)¹⁰¹ em 1975.

Folin & Ciocalteu³³ em 1927 aperfeiçoaram o reagente de Folin-Denis tornando-o mais sensível à redução pelos fenóis e diminuindo a tendência à precipitação. O primeiro destes aperfeiçoamentos foi o aumento da quantidade de molibdênio em relação ao tungstato e o uso de bromo para oxidar algum traço de molibdênio-tungstato no reagente recém preparado. O problema de precipitação foi resolvido pela adição de sulfato de lítio. Este método também passou por diversos aprimoramentos até ser adotado pela AOAC o proposto por Singleton e Rossi⁸⁷ em 1965. Quimicamente, também é uma reação de oxidação-redução que sob condições alcalinas reduz o complexo no reagente dando uma coloração azulada à solução.

Um método pioneiro foi desenvolvido por Price & Butler⁷⁹ que explora, a exemplo do método clássico de Folin-Denis, a reação de oxidação-redução. O íon fenolato é oxidado, enquanto o íon férrico é reduzido ao estado ferroso e então detectado pela formação do complexo Azul da Prússia ($\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$) com um reagente contendo ferricianeto de potássio. Esse método é 65 anos mais recente do que o método de Folin-Denis e muito menos testado e utilizado.

Eskin et al.²⁸ propuseram em 1978 um método quantitativo para fenóis totais, baseado na formação de complexo colorido entre os compostos fenólicos e o titânio, utilizando-se como reagente o cloreto de titânio a 20% em ácido clorídrico concentrado.

Mais recentemente, foram propostos métodos espectrofotométricos de dosagem de flavonóides totais^{24,84} em plantas, com o uso de AlCl_3 . Vennat et al.⁹⁵ em 1992 desenvolveram um método para determinar o teor de flavonóides em extrato de folhas de *Hamamelis virginiana*. Trata-se de uma derivação do método de Dowd²⁷ para quercetina, usando cloreto de alumínio. O alumínio forma quelatos estáveis com flavonóides em metanol, resultando um desvio batocrômico e intensificação da absorção. Com isto, aumenta-se a sensibilidade do processo e evita-se a interferência de outras substâncias fenólicas, em particular os ácidos fenólicos. A leitura é feita a 420 nm, utilizando-se uma solução de cloreto de alumínio a 2% em metanol.

2 - PROPOSIÇÃO

O aumento da utilização da própolis na composição de diversos produtos ou na forma de tinturas pela população acarretou na necessidade de se fazer um controle de qualidade, tanto para se detectar adulterações como para confirmar a presença da própolis nessas formulações. Além disso, observa-se uma crescente procura, por parte de empresários exportadores, de laudos de análise exigidos pelo importador.

A legislação brasileira regulamentou o uso da própolis em cosméticos com limite máximo de 2,5% de concentração¹⁶. Não foi ainda regulamentado o seu uso em alimentos e medicamentos.

Nesse sentido, faz-se necessária a proposta de um protocolo inicial de análise que permita caracterizar as amostras de própolis e seus produtos derivados como méis, xaropes, cosméticos etc.

O objetivo deste trabalho é propor um conjunto de métodos padronizados, de baixo custo e fácil execução, que possam ser utilizados em análises de amostras de própolis e de extratos e tinturas.

Os parâmetros escolhidos foram:

- Métodos espectrofotométricos
 - Teor de fenóis totais pelo método de Folin-Denis
 - Teor de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu
 - Teor de flavonóides com o uso de AlCl_3
 - Teor de ácidos fenólicos, determinados pela diferença entre fenóis totais e flavonóides
- Teor de ceras
- Teor de cinzas
- Teor de compostos voláteis

- Resíduo seco
- Densidade
- Teor de álcool etílico absoluto

Propõe-se também determinar preliminarmente o perfil químico de própolis brasileiras, através da aplicação dos métodos acima a uma seleção de amostras de própolis provenientes de diversas localidades.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Material

3.1.1 - Amostras de própolis

Algumas amostras foram coletadas na região oeste do estado de São Paulo, mais precisamente nos municípios de Ribeirão Preto e Piracicaba, outras nos municípios de Sombrio-SC e Nova Petrópolis-RS.

Em Ribeirão Preto, estabeleceu-se um convênio com o Depto de Genética de abelhas da Faculdade de Medicina da USP com o intuito de coletar própolis de suas colméias. O apiário da USP (amostra I) está localizado nos arredores do município em uma Estação Experimental do Instituto Agrônomo de Campinas. A flora disponível pelo apiário é altamente diversificada, sendo composta por uma plantação de eucalipto de diferentes espécies com vegetação arbustiva variada, cerrado e culturas diversas, como por exemplo soja, café, arroz, feijão etc.

Foram escolhidas algumas colméias que seriam as fornecedoras de própolis para a pesquisa e raspou-se com uma espátula a própolis da tampa e também da entrada da colméia, no período de maio a setembro de 1994. Essa própolis foi acondicionada em frasco de vidro.

Também foi firmado um convênio com a empresa Apisflora, localizada no município de Ribeirão Preto, que mantém apiários de sua propriedade em monoculturas de eucalipto e laranja-pera na região. Na região de eucalipto (Figura 5) onde a coleta de própolis (amostra II, Figura 6A) foi feita entre os meses de maio e setembro de 1994, há também uma flora arbustiva. Algumas espécies dessa região foram identificadas pelo Laboratório de Sistemática do Depto de Botânica do Instituto de Biociências-USP: *Didymopanax vinosum* E. Marchal, *Pyrostegia*



Figura 5. Apiário em flora de eucalipto.



Figura 6A. Amostra de própolis de flora de eucalipto.



Figura 6B. Amostra de própolis de flora de laranja.

venusta (Ker Gaww) Miers, *Miconia albicans* (Sw.) Triana, *Mikania bradei* Robinson e *Vernonia rubriramea* Mart. Na região de laranjeira (amostra III, Figura 6B) não há flora arbustiva e o período de coleta se deu entre os meses de outubro e fevereiro de 1994/95. Em ambas as monoculturas foram separadas cerca de 20 colméias com tampas limpas, nas quais se fez a raspagem após um período de dois a quatro meses, acondicionando-se o material em frascos de vidro.

O Depto de Entomologia da ESALQ-USP forneceu própolis oriunda de colméias localizadas em plantações de laranja-lima (amostra IV) nos arredores do município de Piracicaba, coletada entre os meses de outubro e fevereiro de 1994/95. Também aqui foi adotado o mesmo procedimento para as amostras anteriores com a utilização de tampas limpas descontaminadas de própolis de outra procedência vegetal.

Mais duas amostras de flora diversificada também foram analisadas: uma procedente do Rio Grande do Sul, Nova Petrópolis (amostra V), e outra proveniente de região de serra no município de Sombrio, estado de Santa Catarina (amostra VI). As duas amostras foram coletadas entre os meses de maio e junho de 1994.

O material foi armazenado a -10°C até o momento de sua pulverização. O material foi pulverizado até a obtenção de pó grosso. Em seguida o pó foi submetido a diferentes formas de extração e ensaios.

3.1.2 - Reagentes e soluções

Todos os reagentes empregados foram de grau analítico.

3.1.2.1 - Solução padrão de quercetina ($200\ \mu\text{g/ml}$)

Obteve-se uma amostra de quercetina a partir de rutina (ver item 3.2.2).

A um balão volumétrico de 500 ml, com 350 ml de metanol, adicionou-se 100 mg de quercetina. Após a dissolução a quente, completou-se o volume final à temperatura de 15°C .

3.1.2.2 - Solução padrão de ácido gálico ($200\ \mu\text{g/ml}$)

A um balão volumétrico de 500 ml, com 350 ml de metanol, adicionou-se 100 mg de ácido gálico. Após a dissolução a quente, completou-se o volume final à temperatura de 15°C .

3.1.2.3 - Reagente de Folin-Denis¹⁰¹

A um balão de fundo chato de 2 litros, adicionaram-se 750 ml de água destilada, 100 g de tungstato de sódio, 20 g de ácido fosfomolibdico e 50 ml de ácido ortofosfórico. Refluxou-se por 2 horas, resfriou-se e completou-se o volume para 1 litro com água destilada.

3.1.2.4 - Solução saturada de carbonato de sódio¹⁰¹

Misturou-se carbonato de sódio anidro e água destilada na razão de 35 g por 100 ml. Dissolveu-se o sal a 70-80°C e deixou-se por uma noite. Semeou-se a solução com carbonato de sódio decaidratado e após a cristalização filtrou-se através de lã de vidro.

3.1.2.5 - Reagente de Folin-Ciocalteu¹⁰¹

A um balão de fundo chato de 2 litros, adicionaram-se 700 ml de água destilada, 100 g de tungstato de sódio, 25 g de ácido fosfomolibdico, 50 ml de ácido ortofosfórico e 100 ml de ácido clorídrico concentrado. Refluxou-se por 10 horas, resfriou-se e adicionaram-se 150 g de sulfato de lítio. Adicionaram-se algumas gotas de bromo e deixou-se em ebulição para eliminar o bromo em excesso. Completou-se para 1 litro com água destilada.

3.1.2.6 - Solução de cloreto de alumínio a 5%

Em um balão volumétrico de 250 ml, dissolveram-se-se 12,5 g de cloreto de alumínio hexaidratado em 200 ml de metanol. Após a dissolução completou-se o volume com metanol a 15°C.

3.1.2.7 - Mistura padrão

Em um balão volumétrico de 250 ml, dissolveram-se em metanol a 15°C ácidos fenólicos e não fenólicos e flavonóides comumente encontrados na própolis. São listadas na página seguinte as substâncias e respectivas quantidades incluídas na mistura.

ácido ferúlico	3,1 mg	quercetina	15,1 mg
ácido cafeico	14,7 mg	miricetina	2,3 mg
ácido gálico	5,8 mg	apigenina	6,0 mg
ácido p-cumárico	5,1 mg	ramnetina	11,6 mg
ácido cinâmico	5,2 mg	galangina	2,5 mg
ácido benzóico	5,1 mg	crisina	5,0 mg
ácido salicílico	4,8 mg	campferol	3,4 mg

3.1.2.8 - Solução aquosa de cloreto férrico a 5%.

3.1.2.9 - Solução de carbonato de sódio 20%.

3.1.3 - Aparelhos

3.1.3.1 - Moinho tipo martelo.

3.1.3.2 - Espectrofotômetro BECKMAN modelo DU-70.

3.1.3.3 - Cromatógrafo gás-líquido modelo CG-37, acoplado a integrador-processador modelo CG-300, coluna capilar de sílica fundida - fase CG-FI-547, comprimento 25,5 m, diâmetro interno 0,25 mm.

3.2 - Métodos

Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.2.1 - Preparação das amostras de própolis

3.2.1.1 - Tinturas

Foram feitas extrações segundo procedimentos comumente postos em prática por fornecedores de tinturas oferecidas comercialmente à população. Submeteu-se 20 g de própolis pulverizada correspondente à amostra **II** à maceração com 100 ml álcool etílico absoluto (processo **A**) e 100 ml de álcool etílico 70°GL (processo **B**) por períodos de tempo diferentes: 2 , 7 e 30 dias com agitação esporádica. Os extratos foram filtrados através de papel de filtro, completou-se o volume em proveta de 100 ml a 20°C e acondicionou-se a solução obtida em frascos âmbar. As tinturas obtidas foram designadas **A.2**, **A.7**, **A.30**, **B.2**, **B.7** e **B.30**, de acordo com o processo (**A** ou **B**) e o número de dias de extração (2, 7 ou 30).

3.2.1.2 - Extração em aparelho de Soxhlet

Foram feitas extrações com metanol a partir de 2,5 g da própolis pulverizada até reação negativa com cloreto férrico. Diluiu-se o extrato até o volume final de 250 ml em balão volumétrico à temperatura de 15°C (processo **S**). Esse procedimento extrativo foi realizado para as amostras **I**, **II**, **III**, **IV**, **V** e **VI**, obtendo-se os extratos **S.I**, **S.II**, **S.III**, **S.IV**, **S.V** e **S.VI**.

3.2.2 - Obtenção da quercetina a partir de rutina⁶⁵

A um erlenmeyer de 250 ml, adicionaram-se 2 g de rutina e 100 ml de solução de ácido clorídrico a 5%. Aqueceu-se por 30 minutos, adicionando-se água destilada ocasionalmente para compensar a perda por vaporização. Esfriou-se e filtrou-se a solução, lavando-se o resíduo com água até reação negativa ao papel

tornassol. Secou-se o resíduo e procedeu-se à recristalização com água, primeiramente, e em seguida etanol. Secou-se a quercetina obtida em estufa a 95-97°C por 2 horas e depois em dessecador até peso constante²⁹.

3.2.3 - Métodos espectrofotométricos

Todas as absorbâncias utilizadas para efeito de cálculo situaram-se no intervalo 0,2 a 0,8, utilizando-se como branco todas as substâncias com exceção da amostra ensaiada. As tinturas e os extratos ensaiados foram: **A.2, A.7, A.30, B.2, B.7, B.30, S.I, S.II, S.III, S.IV, S.V e S.VI**. As tomadas de alíquota com o uso de pipeta volumétrica e acerto do volume final foram realizados a 15°C. Para as dosagens relativas a amostras de própolis pulverizada, os teores foram calculados em função do resíduo. No caso das tinturas, os teores foram calculados em função do volume de 100 ml.

3.2.3.1 - Teor de fenóis totais pelo método de Folin-Denis

a - Construção da curva padrão

Construiu-se a curva padrão utilizando-se soluções metanólicas de quercetina em concentrações de 2,0, 3,0,..., 8,0 µg/ml. Transferiu-se para um balão volumétrico de 50 ml contendo 35 ml de água uma alíquota correspondente a cada concentração e 4 ml do reagente de Folin-Denis. Agitou-se por alguns segundos e no intervalo de 1 a 8 minutos acrescentaram-se 4 ml da solução de carbonato de sódio saturada. Após acerto do volume final agitou-se por alguns segundos. Decorrido o tempo de 30 minutos fez-se a leitura a 760 nm. Calculou-se a equação da curva padrão pelo método dos mínimos quadrados⁶⁹.

b - Teor de fenóis totais dos extratos e tinturas

Transferiu-se uma alíquota do extrato ou tintura e 4 ml do reagente de Folin-Denis para um balão volumétrico de 50 ml contendo 35 ml de água destilada. A

seguir executaram-se os mesmos procedimentos descritos no item a acima.

3.2.3.2 - Teor de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu

a - Construção da curva padrão

Construiu-se a curva padrão utilizando-se soluções metanólicas de ácido gálico em concentrações de 1,5, 2,0,..., 4,5 $\mu\text{g/ml}$. Transferiu-se para um balão volumétrico de 50 ml contendo 35 ml de água destilada uma alíquota correspondente a cada concentração e 4 ml do reagente de Folin-Ciocalteu. Agitou-se por alguns segundos e no intervalo de 1 a 8 minutos acrescentaram-se 6 ml da solução de carbonato de sódio a 20%. Após acerto do volume final, agitou-se por alguns segundos. Decorrido o tempo de 2 horas, fez-se a leitura a 760 nm. Calculou-se a equação da curva padrão pelo método dos mínimos quadrados.

b - Teor de fenóis totais de extratos e tinturas

Transferiu-se uma alíquota do extrato ou tintura e 6 ml do reagente de Folin-Ciocalteu para um balão volumétrico de 50 ml contendo 35 ml de água destilada. A seguir executaram-se os mesmos procedimentos descritos no último item a acima.

3.2.3.3 - Teor de flavonóides

a - Construção da curva padrão

Construiu-se a curva padrão utilizando-se soluções metanólicas de quercetina em concentrações de 4,0, 5,0,..., 12,0 $\mu\text{g/ml}$. Transferiu-se para um balão volumétrico de 50 ml contendo 40 ml de metanol uma alíquota correspondente a cada concentração e 1 ml da solução de AlCl_3 . Após acerto do volume final a 15°C , agitou-se por alguns segundos. Decorrido o tempo de 30 minutos, fez-se a leitura a 425 nm. Calculou-se a equação da curva padrão pelo método dos mínimos quadrados.

b - Teor de flavonóides de extratos e tinturas

Transferiu-se uma alíquota do extrato ou tintura e 1 ml da solução de AlCl_3 para um balão volumétrico de 50 ml contendo 40 ml de metanol. A seguir, executaram-se os mesmos procedimentos descritos no último item a acima.

3.2.3.4 - Teor de ácidos fenólicos

Determinou-se o teor de ácidos fenólicos pela diferença entre as quantidades dosadas de flavonóides e de fenóis totais, tanto pelo método de Folin-Denis como pelo de Folin-Ciocalteu.

3.2.3.5 - Avaliação do percentual de erro dos métodos espectrofotométricos

Foram feitos ensaios, exceto para ácidos fenólicos, seguindo os procedimentos descritos acima, com a mistura padrão de substâncias aromáticas com o objetivo de comparar as quantidades efetivamente presentes na mistura e as quantidades obtidas através dos métodos de determinação.

3.2.3.6 - Avaliação da eficácia do processo extrativo S

Procedeu-se a um teste de recuperação de substâncias fenólicas, utilizando-se como substância padrão a quercetina. Fez-se a extração de 2,5 g da amostra **III** pulverizada com a adição de 10 mg do padrão e outra sem a adição do padrão, até reação negativa com cloreto férrico. Pelo acréscimo do valor de absorbância resultante da adição de quercetina, calculou-se a porcentagem de recuperação da massa de quercetina adicionada. Empregaram-se os métodos de Folin-Ciocalteu e flavonóides no cálculo da massa recuperada.

3.2.4 - Teor de ceras

Considerou-se como cera todo o material solúvel em metanol a quente, insolúvel em metanol gelado, previamente extraído com clorofórmio a quente. Essas

propriedades físicas são características das classes de constituintes comumente encontradas em ceras naturais, como os alcanos, ésteres, cetonas e álcoois de cadeia longa e linear, todos derivados de ácidos graxos²¹.

3.2.4.1 - Teor de ceras em própolis bruta

A determinação do teor de ceras foi efetuada por gravimetria para as amostras **I**, **II**, **III** e **VI**. Uma porção de 3 g de própolis pulverizada foi submetida à extração em aparelho de Soxhlet com 150 ml de clorofórmio por 6 horas. Concentrou-se o extrato até a secura em rotaevaporador sob pressão reduzida e dissolveu-se o resíduo em 120 ml de metanol a quente. Deixou-se em ebulição até a formação de duas fases líquidas bem definidas, sendo uma composta por substâncias solúveis no metanol a quente, e outra um pequeno resíduo insolúvel mais denso. Transferiu-se a fase metanólica a quente para um béquer de 150 ml tarado, que foi levado, após atingir a temperatura ambiente, ao congelador por 25 minutos. Filtrou-se através de papel de filtro tarado, lavando-se o béquer e o resíduo com 25 ml de metanol gelado. O béquer e o papel de filtro ficaram expostos ao ar até secar e em seguida mantido em dessecador até peso constante. Calculou-se o teor de ceras em função do peso seco da própolis pulverizada.

3.2.4.2 - Teor de ceras em tinturas

Determinou-se o teor de ceras de tinturas obtidas pelos processos extrativos **A.7** e **B.7**, a partir da amostra **II**. Evaporaram-se em banho-maria até secura 15 ml da tintura (alíquota tomada a 20°C). O resíduo foi retomado em 100 ml de clorofórmio em ebulição. Após atingir a temperatura ambiente filtrou-se para béquer de 150 ml tarado. O filtrado foi evaporado em banho-maria até a secura. O resíduo foi retomado em 120 ml de metanol a quente até ficar límpido (caso se observe a formação de duas fases, transferir a fase metanólica a quente para outro béquer de 150 ml tarado). Após atingir a temperatura ambiente, o béquer foi colocado em

congelador por 25 minutos. Filtrou-se através de papel de filtro tarado, lavando-se o béquer e o resíduo com 25 ml de metanol gelado. O béquer e o papel de filtro ficaram expostos ao ar até secar, em seguida foram mantidos em dessecador até peso constante. O teor de ceras foi calculado em função do volume de 100 ml da tintura.

3.2.5 - Teor de cinzas²⁹

A determinação do teor de cinzas para as amostras **I**, **II**, **III** e **VI** foi realizado através de calcinação de 2 g de própolis pulverizada em mufla a 600°C por 1 hora. Deixou-se em dessecador até peso constante. Calculou-se o teor de cinzas em função do peso seco da própolis pulverizada.

3.2.6 - Teor de compostos voláteis

O teor de compostos voláteis foi determinado através de extração com aparelho de Clevenger para as amostras **I**, **II**, **III** e **VI**. Adicionaram-se a um balão de 500 ml 50 g de própolis pulverizada e 220 ml de água, deixando-se em ebulição por 12 horas. O destilado insolúvel em água foi recolhido em frasco tarado, que foi mantido em dessecador por 4 horas e pesado. Calculou-se o teor de substâncias voláteis em função do peso seco da própolis pulverizada.

3.2.7 - Resíduo seco²⁹

A determinação do resíduo seco isento de compostos voláteis foi feita através de aquecimento de 10 g das amostras **I-VI**, previamente pulverizadas, em estufa a 100°C por 5 horas. Deixou-se em dessecador até peso constante.

3.2.8 - Densidade²⁹

Determinou-se a densidade das tinturas obtidas pelos processos extrativos **A.7** e **B.7**, a partir da amostra **II**, com o uso de picnômetro de 25 ml. Para cada amostra, realizaram-se 5 determinações a 25°C.

3.2.9 - Teor de álcool etílico absoluto⁶⁷

Determinou-se o teor de álcool etílico de tinturas da amostra II (ver ítem 3.2.1.1), utilizando-se cromatografia gás-líquido. A um balão volumétrico de 50 ml, contendo 48 ml de acetona, adicionou-se uma alíquota de 1,0 ml da tintura. Após agitação, completou-se o volume com acetona a 15°C. Injetou-se 1 µl da solução, observando-se as seguintes condições: temperatura do vaporizador 105°C; temperatura do forno 55°C; temperatura do detector 120°C; gás de arraste H₂, fluxo de entrada no detector igual a 30 cm³/min, fluxo do divisor de amostra igual a 100 cm³/min. Construiu-se uma curva padrão, injetando-se 1 µl de solução acetônica de álcool etílico absoluto nas concentrações (v/v) 0,0, 0,6, 0,8,..., 1,8%, nas condições descritas acima, anotando-se as áreas dos picos correspondentes a cada concentração.

4 - RESULTADOS

Todos os resultados apresentados nesta seção representam a média aritmética de triplicatas, a não ser nos raros casos em que a diferença entre o maior valor e o menor excederam 2%.

4.1 - Métodos espectrofotométricos

4.1.1 - Curvas padrões e coeficientes de correlação

A Figura 8 apresenta as curvas padrões para a análise de fenóis totais pelos métodos de Folin-Denis e Folin-Ciocalteu, e flavonóides totais.

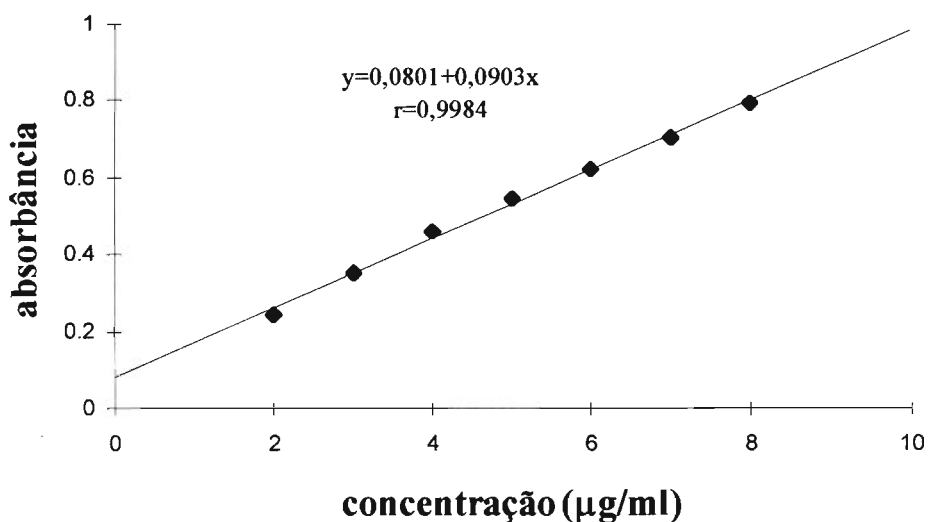


Figura 8A. Curva padrão para fenóis totais pelo método de Folin-Denis.

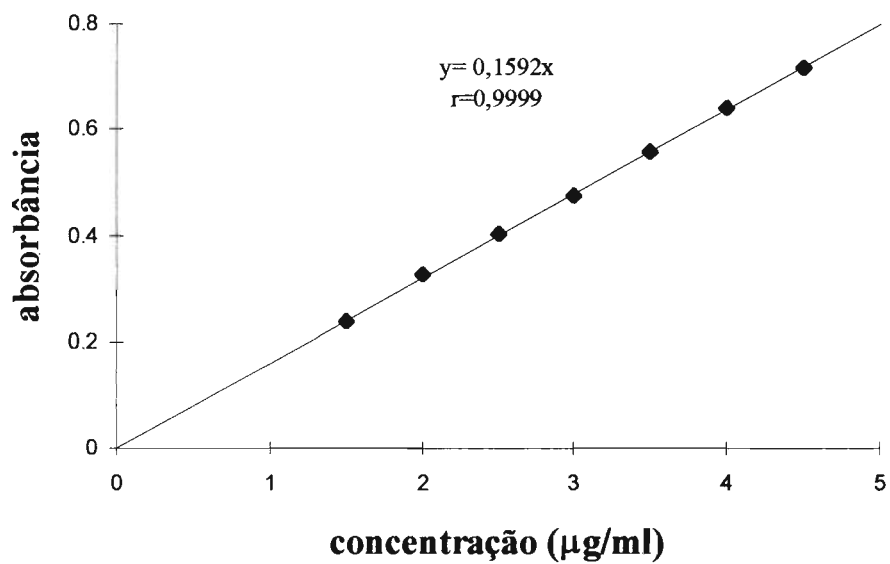


Figura 8B. Curva padrão para fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu.

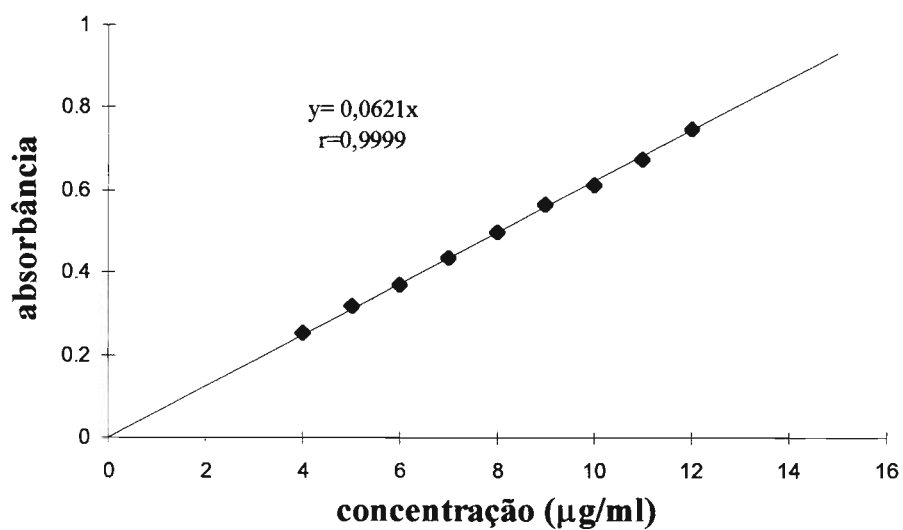


Figura 8C. Curva padrão para flavonóides .

4.1.2 - Estimativa do percentual de erro

A Tabela 1 apresenta os resultados relativos a fenóis totais (determinados pelos métodos de Folin-Denis e Folin-Ciocalteu), flavonóides e ácidos fenólicos, contidos em uma mistura de substâncias de composição conhecida.

Tabela 1. Porcentagem de erro entre as quantidades (μg) esperadas e quantidades (μg) encontradas de fenóis^a totais, flavonóides^b e ácidos fenólicos^c, em 1 ml da solução da mistura padrão (vide material e métodos para informações sobre composição).

SUBSTÂNCIAS DOSADAS	QUANTIDADES ESPERADAS	QUANTIDADES ENCONTRADAS	PERCENTUAL DE ERRO
FENÓIS TOTAIS			
FOLIN-DENIS	317,6	300,0	5,54
FOLIN-CIOCALTEAU	317,6	316,6	0,32
FLAVONÓIDES	183,6	170,0	7,41
ÁCIDOS FENÓLICOS			
FOLIN-DENIS	134,0	130,0	2,99
FOLIN-CIOCALTEAU	134,0	146,6	9,40

a - como quercetina pelo método de Folin-Denis e como ácido gálico pelo método de Folin-Ciocalteu.

b - como quercetina, dosagem por método empregando AlCl_3 .

c - diferença entre as quantidades dosadas de fenóis totais, por ambos os métodos, e flavonóides.

4.1.3 - Avaliação da eficácia do processo extrativo S

A Tabela 2 apresenta o percentual de recuperação de quercetina adicionada a 2,5 g da amostra III após extração em aparelho de Soxhlet. Avaliação feita pelo método de Folin-Ciocalteu para fenóis totais e pelo método usando $AlCl_3$ para flavonóides.

Tabela 2. Porcentagem de recuperação de quercetina adicionada a 2,5 g da amostra III submetida à extração em aparelho de Soxhlet. Dosagem de flavonóides e fenóis totais, este último determinado pelo método de Folin-Ciocalteu.

SUBSTÂNCIAS DOSADAS	QUANTIDADE (μg) ADICIONADA	QUANTIDADE (μg) RECUPERADA	PORCENTAGEM DE RECUPERAÇÃO
FENÓIS TOTAIS	1000	10400	104
FLAVONÓIDES	1000	9375	93,75

4.1.4 - Teores de fenóis totais, flavonóides e ácidos fenólicos em extratos e tinturas

A Tabela 3 mostra os teores de fenóis totais, flavonóides e ácidos fenólicos de amostras de própolis provenientes de várias localidades brasileiras.

Tabela 3. Teores percentuais de fenóis totais^a; flavonóides^b e ácidos fenólicos^c de amostras^d de própolis extraídas em aparelho de Soxhlet.

SUBSTÂNCIAS DOSADAS	AMOSTRAS					
	I	II	III	IV	V	VI
FENÓIS TOTAIS						
FOLIN-DENIS	7,05	7,12	8,55	6,93	7,92	9,29
FOLIN-CIOCALTEAU	9,63	9,49	12,60	8,78	10,87	13,72
FLAVONÓIDES	0,77	2,69	0,83	2,58	2,12	2,16
ÁCIDOS FENÓLICOS						
FOLIN-DENIS	6,28	4,43	4,77	4,35	5,80	7,13
FOLIN-CIOCALTEAU	8,86	6,80	7,72	6,20	8,75	11,56

a: determinados como quercetina pelo método de Folin-Denis e como ácido gálico pelo método de Folin-Ciocalteu.

b: determinados como quercetina com o uso de $AlCl_3$.

c: determinados pela diferença entre os teores de fenóis totais e flavonóides .

d: proveniência das amostras indicadas no item Material e Métodos.

A Tabela 4 apresenta os teores percentuais de fenóis totais, flavonóides e ácidos fenólicos de tinturas de própolis preparadas segundo procedimentos diversos

Tabela 4. Teores percentuais de fenóis totais^a, flavonóides^b e ácidos fenólicos^c de tinturas^d da amostra II.

SUBSTÂNCIAS DOSADAS	TINTURAS					
	A.2	A.7	A.30	B.2	B.7	B.30
FENÓIS TOTAIS						
FOLIN-DENIS	0,96	1,00	1,08	1,21	1,25	1,27
FOLIN-CIOCALTEAU	1,20	1,25	1,30	1,46	1,56	1,67
FLAVONÓIDES	0,35	0,37	0,39	0,36	0,37	0,38
ÁCIDOS FENÓLICOS						
FOLIN-DENIS	0,61	0,63	0,69	0,85	0,88	0,89
FOLIN-CIOCALTEAU	0,85	0,88	0,91	1,1	1,19	1,29

a: determinados como quercetina pelo método de Folin-Denis e como ácido gálico pelo método de Folin-Ciocalteau.

b: determinados como quercetina com o uso de AlCl₃.

c: determinados pela diferença entre os teores de fenóis totais e flavonóides.

d: **A** indica extração com etanol absoluto, **B**, extração com etanol 70°GL, **2**, **7** e **30** número de dias de maceração.

4.2 - Teor de ceras

Os teores de ceras em amostras de própolis provenientes de diversas localidades do Brasil e tinturas de própolis são apresentados na Tabelas 5.

Tabela 5: Teores percentuais de ceras em amostras^a de própolis e em tinturas^b da amostra II.

MATERIAL	TEORES
Amostras	
I	7,82
II	7,16
III	4,63
VI	6,79
Tinturas	
A.7	0,27
B.7	0,00

a: ver proveniência das amostras no item Material e Métodos.

b: **A** indica extração com etanol absoluto, **B**, com etanol 70° GL e **7** representa o número de dias de maceração.

4.3 - Teores de cinzas e compostos voláteis

A Tabela 6 apresenta os teores de cinzas e compostos voláteis em amostras de própolis provenientes de diversas localidades do Brasil.

Tabela 6: Teores percentuais de cinzas e compostos voláteis em amostras^a de própolis.

PARÂMETROS ANALISADOS	AMOSTRAS			
	I	II	III	VI
CINZAS	2,80	3,78	1,87	3,74
VOLÁTEIS	0,28	0,49	0,35	0,49

a: ver proveniência das amostras no ítem Material e Métodos.

4.4 - Resíduo seco

A Tabela 7 apresenta os valores percentuais de resíduo seco em amostras de própolis.

Tabela 7: Teores percentuais de resíduo seco em amostras de própolis^a.

AMOSTRAS	TEORES
I	93,0
II	92,2
III	92,6
IV	90,2
V	92,0
VI	94,2

a: ver proveniência das amostras no ítem Material e Métodos.

4.5 - Densidade

A Tabela 8 apresenta os valores de densidade de tinturas elaboradas a partir da amostra II.

Tabela 8: Densidade de tinturas^a da amostra II.

TINTURAS	g/ml
A.7	0,822
B.7	0,914

a: **A** indica extração com etanol absoluto, **B**, extração com etanol 70°GL, **7** representa o número de dias de maceração.

4.6 - Teor de álcool etílico absoluto

A Tabela 9 apresenta os teores percentuais de álcool etílico absoluto de tinturas de própolis preparadas segundo procedimentos diversos.

Tabela 9: Teores percentuais de álcool etílico absoluto em tinturas^a da amostra II.

TINTURAS	TEORES
A.2	88,0
A.7	91,0
A.30	87,0
B.2	61,5
B.7	62,0
B.30	57,0

a: **A** indica extração com etanol absoluto, **B**, extração com etanol 70°GL, **2**, **7** e **30** representa o número de dias de maceração.

5 - DISCUSSÃO

5.1 - Métodos espectrofotométricos

5.1.1 - Escolha das metodologias

A literatura a respeito do doseamento de fenóis totais relata quatro metodologias, já mencionadas na Introdução. Os métodos utilizando TiCl_3 e o que forma o complexo Azul da Prússia foram exaustivamente ensaiados mas apresentaram falta de reprodutibilidade e problemas de precipitação de substâncias menos polares. Com os outros dois métodos, os resultados foram satisfatórios, motivo pelo qual eles acabaram sendo utilizados.

O uso de AlCl_3 já é consagrado na identificação de flavonóides⁶⁵. Mais recentemente, esse reagente vem sendo utilizado no doseamento de flavonóides^{24,84,95}. Tamas et al.⁸⁹ relataram o uso de oxiclreto de zircônio no doseamento de flavonóides na resina de *Populus nigra* L. mencionando a formação do complexo Zr-flavonóide, com uma absorção característica no UV a 286 nm. Tomando por base esse trabalho, Franco et al.³⁴ tentaram adaptar o uso do oxiclreto de zircônio para amostras de própolis, sem contudo chegar a validar a metodologia. Optou-se, portanto, pela metodologia em que se emprega AlCl_3 .

5.1.2 - Problemas de precipitação da solução de carbonato de sódio e da própolis presente no extrato

As metodologias para doseamento de fenóis totais em plantas¹⁰¹ sofreram algumas adaptações para que se pudesse adequá-las ao doseamento dos extratos de própolis.

Um dos problemas enfrentados foi a questão da solubilidade do extrato. Primeiramente tivemos como obstáculo a precipitação da solução de carbonato de sódio devido ao álcool presente no extrato.

Os extratos de própolis foram preparados utilizando-se como solvente o etanol, etanol 70°GL e o metanol. Sabe-se que os sais são muito pouco solúveis em solventes orgânicos. Houve, portanto, a necessidade de se adequar um volume de álcool que não provocasse precipitação. Depois de várias tentativas, padronizou-se o volume de no máximo 3 ml de etanol ou metanol e 4 ml da solução saturada de carbonato de sódio para um volume final de 50 ml. A solução saturada tem como característica uma certa instabilidade, o que acaba criando uma maior dependência em relação às condições do ensaio, por exemplo, alterações de temperatura ou uma agitação mais vigorosa da solução.

Na metodologia de Folin-Ciocalteu, como a solução de carbonato de sódio não é saturada, essa questão foi mais facilmente resolvida. Nesse caso, manteve-se o volume de 3 ml de etanol ou metanol e utilizou-se um volume de 6 ml da solução de carbonato.

Outro problema enfrentado nos dois métodos foi a pouca solubilidade da maioria dos componentes em água. Para evitar a precipitação, foram feitas diluições graduais do extrato inicial em solventes com porcentagens crescentes de água até que se pudesse tirar uma alíquota para doseamento que não causasse precipitação ao contato com a água presente no balão volumétrico, onde ocorre a reação de coloração. Todas as diluições foram preparadas no momento do doseamento, pois verificou-se que quanto maior o tempo que o extrato ficava em contato com solventes com maior teor de água, tanto maior era a possibilidade de ocorrer turvação antes da colocação dos reagentes. A adição dos reagentes é feita imediatamente após a última diluição do extrato evitando, assim, o problema da turvação.

Com relação ao doseamento de flavonóides, não se enfrentou problemas de precipitação pelo fato de se usar metanol como solvente, o qual facilmente solubiliza os extratos e tinturas.

5.1.3 - Escolha das substâncias padrões

Para os três métodos três espectrofotométricos utilizados, três razões foram decisivas para a escolha das substâncias padrões: facilidade de obtenção, custo baixo e presença frequente na composição química de amostras de própolis. O ácido gálico é facilmente adquirido no mercado. A quercetina pode ser rapidamente obtida através da hidrólise ácida da rutina, esta última também disponível em abundância comercialmente.

Após várias tentativas de utilização do ácido gálico como padrão no doseamento de fenóis totais pelo método de Folin-Denis, optou-se pela quercetina, pelo fato desta ter apresentado menor porcentagem de erro nos ensaios de validação com a mistura padrão. A quercetina também apresentou parâmetros melhores na análise estatística, em comparação com o ácido gálico.

No doseamento de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu, aconteceu exatamente o inverso: nos ensaios de validação com a mistura padrão e na análise estatística, o ácido gálico apresentou os melhores resultados.

O fato de se tratar de um flavonol foi um fator importante na escolha da quercetina como padrão no doseamento de flavonóides, além de já ter sido descrita a sua utilização em outros ensaios de doseamento⁹⁵.

5.1.4 - Escolha do comprimento de onda no doseamento de flavonóides

Na composição flavonoídica da própolis encontramos flavonas, flavonóis, flavanonas, diidroflavonóis e chalconas. Percebe-se, no entanto, que há um predomínio de flavonóis, muitos dos quais absorvem fortemente em torno de 425 nm em solução metanólica contendo AlCl_3 . São exemplos o campferol, galangina,

rhamnetina e quercetina. Flavonas com hidroxilas vicinais também apresentam forte absorção naquele comprimento de onda, podendo-se destacar a luteolina que tem λ máximo em 424 nm naquelas condições.

A farmacopéia alemã²⁴ recomenda a leitura em 425 nm para a dosagem de flavonóides em plantas, enquanto Vennat et al.⁹⁵ optaram pela leitura em 420 nm. Decidimo-nos pela leitura em 425 nm, pois muitos flavonóides têm um pico de absorbância nesse comprimento de onda.

Em 425 nm, os ácidos fenólicos e outras substâncias fenólicas como a vanilina e pinosilvina não absorvem em presença de $AlCl_3$. Por isso, não há interferência dessas substâncias no doseamento de flavonóides. A Figura 9A representa o espectro de absorção do ácido gálico em metanol e a Figura 9B mostra o espectro de absorção da mesma substância em presença de $AlCl_3$. As Figuras 9C, 9D, 9E e 9F mostram o comportamento do ácido cafeico e da quercetina sem e com $AlCl_3$. Percebe-se que em 425 nm somente a quercetina absorve.

5.1.5 - Análises estatísticas

Para os três métodos espectrofotométricos foram obtidos bons coeficientes de correlação. Portanto as três retas de calibração permitem avaliar com segurança os teores de compostos fenólicos e flavonoídicos presentes nas amostras.

5.1.6 - Validação dos métodos espectrofotométricos

A Tabela 1 apresenta dados de ensaios para determinação do teor de fenóis totais pelo método de Folin-Denis e Folin-Ciocalteu e para a dosagem de flavonóides e ácidos fenólicos em uma mistura padrão. O objetivo é o de estimar a porcentagem de erro entre as quantidades efetivamente presentes na mistura e as quantidades obtidas através das metodologias de determinação.

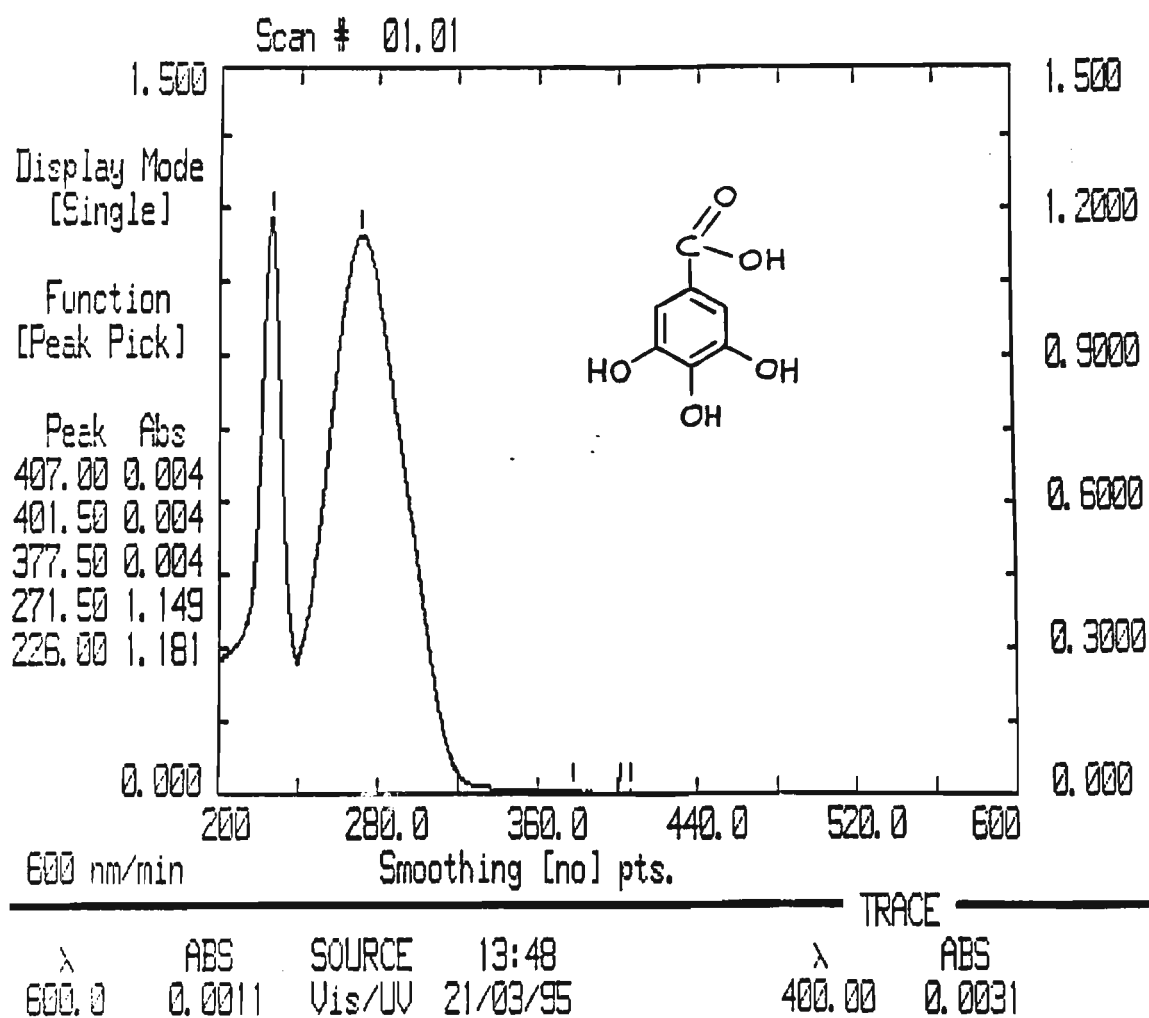


Figura 9A. Espectro de absorção no UV-Visível do ácido gálico em metanol.

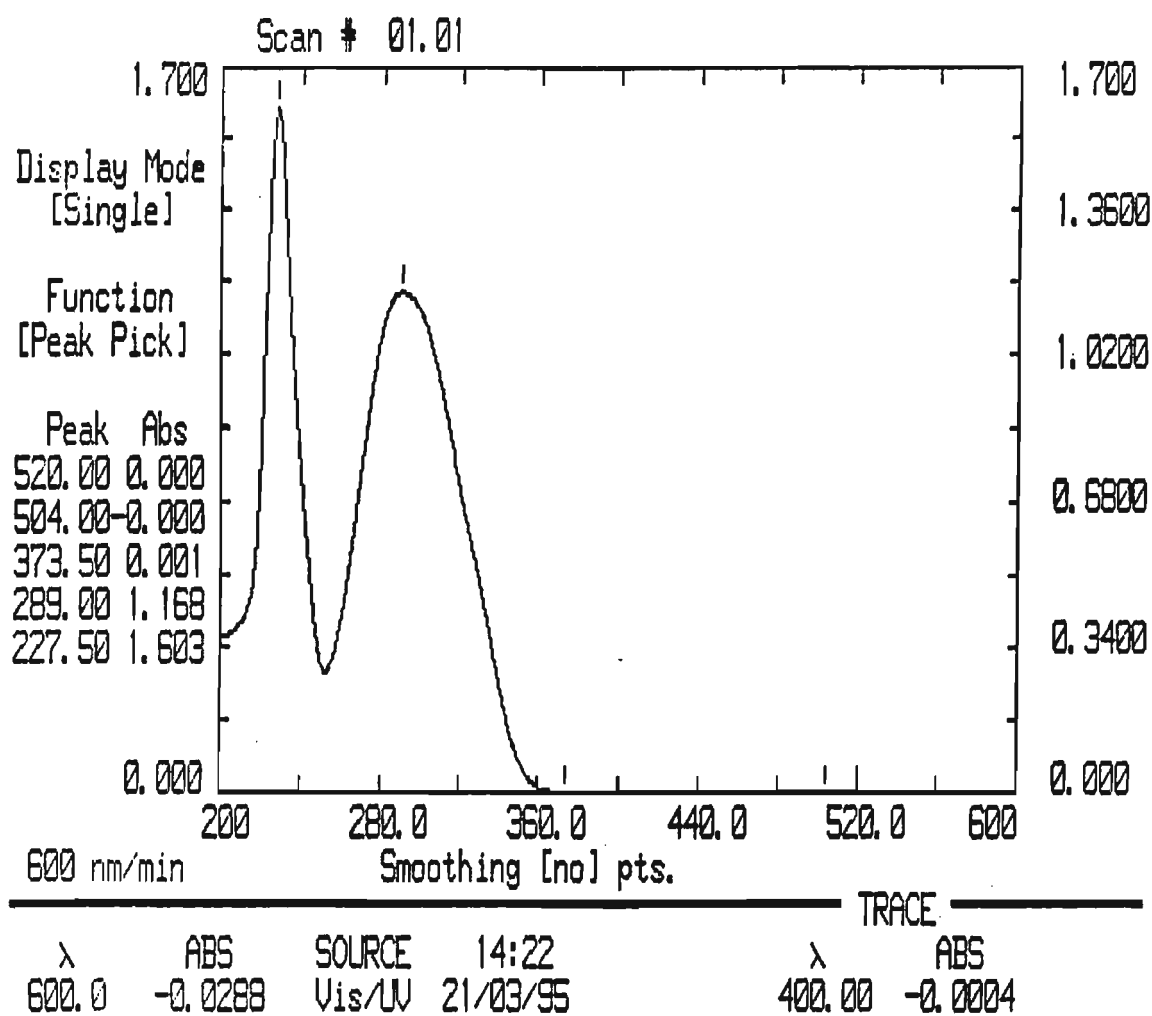


Figura 9B. Espectro de absorção no UV-Visível do ácido gálico em AlCl_3 .

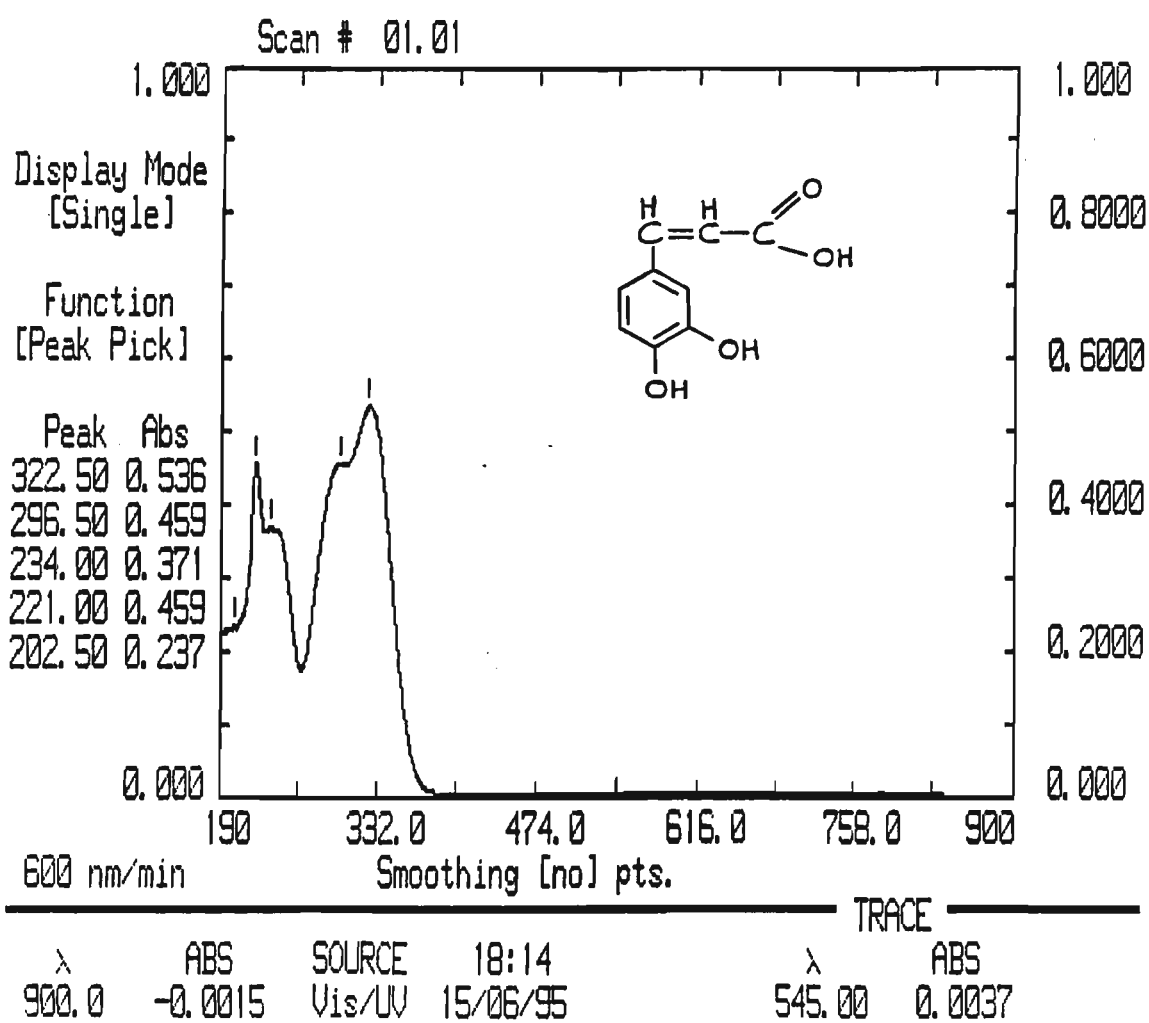


Figura 9C. Espectro de absorção no UV-Visível do ácido cafeico em metanol.

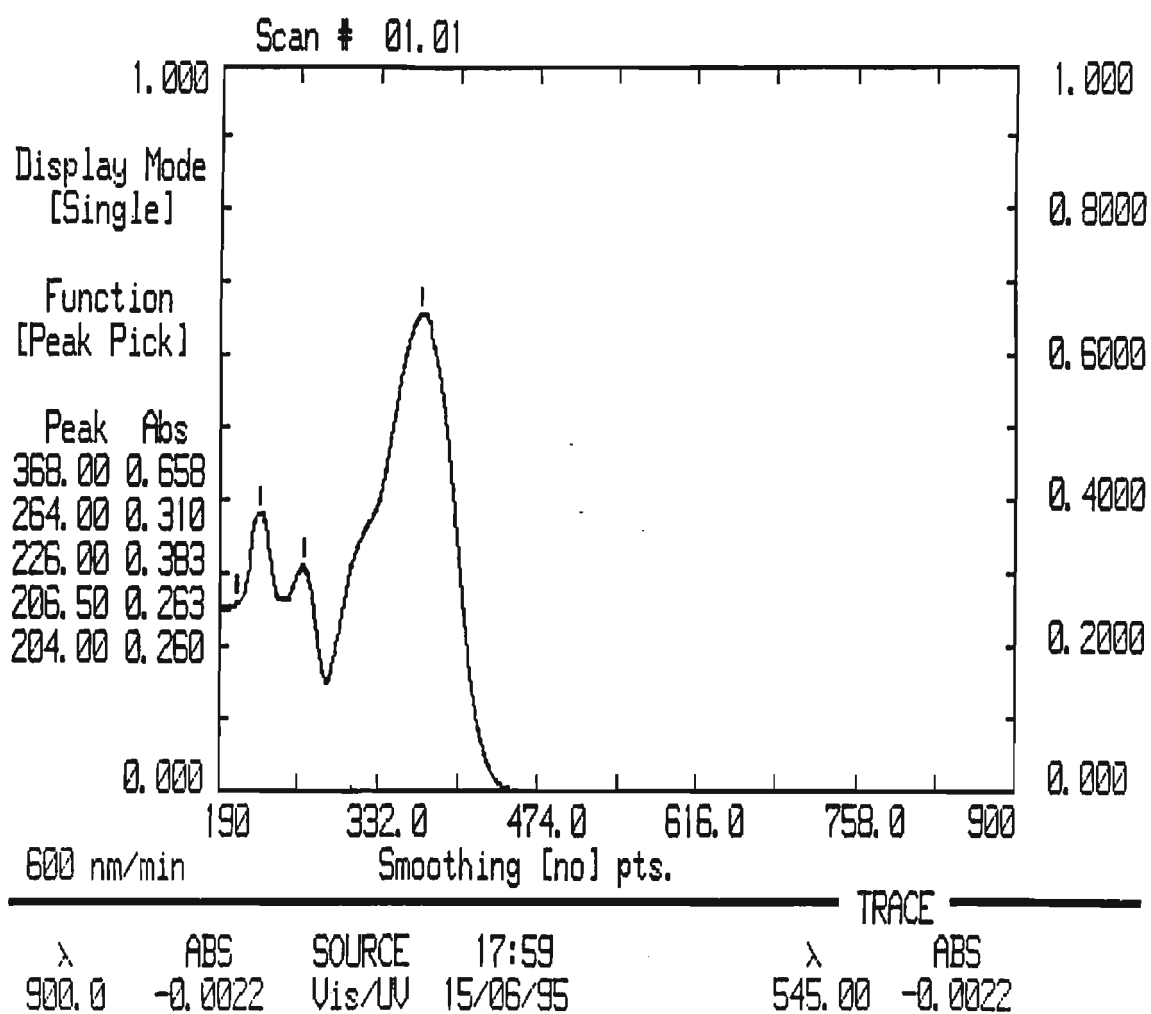
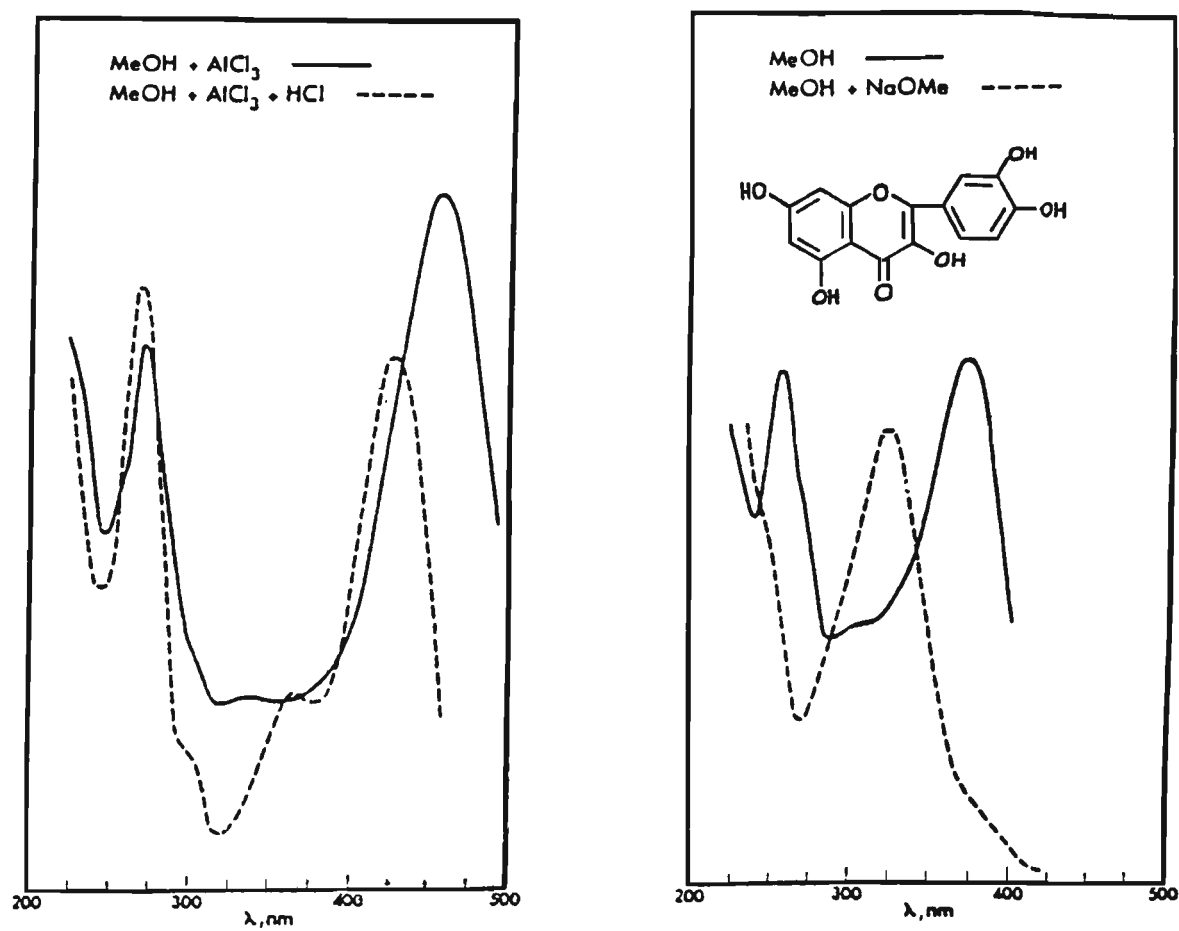


Figura 9D. Espectro de absorção no UV-Visível do ácido cafeico em AlCl_3 .



Figuras 9E e 9F. Espectros de absorção no UV-Visível da quercetina em metanol e em AlCl₃, respectivamente.

Observa-se que o método de Folin-Denis resultou em um erro percentual de 5,54% e o de Folin-Ciocalteu de 0,32% o que nos dá uma boa estimativa do teor levando-se em conta tratar-se de análise de uma complexa mistura de produtos naturais, como relata Bankova et al.¹² em suas determinações de fenóis por cromatografia em fase gasosa, com os quais se obtiveram erros abaixo de 4%.

É importante alertar que uma mistura tão complexa como a própolis impõe muitas dificuldades para as tentativas de análise, como a escolha da substância padrão. Uma substância pode ser o melhor padrão para uma amostra de própolis proveniente de uma determinada flora. No entanto, a mesma substância pode não ser a mais adequada como padrão para dosagens de outra amostra originada de flora diferente. Podemos ter dificuldades referentes às metodologias, originalmente descritas para doseamento em plantas e necessitando adaptações para se adequarem a análises de soluções de extratos de própolis (item 5.1.2). Outra questão, segundo Waterman & Mole¹⁰¹, é a variação do grau de saturação da solução de carbonato de sódio com a temperatura, alterando o pH e, conseqüentemente, o resultado do ensaio.

A metodologia de Folin-Ciocalteu apresentou erro percentual menor em nossas análises, provavelmente pelo fato de não envolver problemas de precipitação de carbonato de sódio. Essa questão foi solucionada com a adição de sulfato de lítio¹⁰¹.

Com relação à determinação de flavonóides, deve-se levar em conta os diferentes tipos de flavonóides e seu comportamento ao formar complexos com $AlCl_3$. Nesse caso, diferentemente da metodologia de fenóis, na qual o reagente se reduz levando à formação de uma solução colorida com um pico de absorção em 760 nm, tem-se a complexação do reagente dependendo da estrutura de cada molécula, com o que nem sempre se obtém picos de absorção na região de 425 nm. A este fato relaciona-se diretamente a escolha do padrão que melhor possa representar a mistura de flavonóides, em função do comportamento espectrofotométrico naquele

comprimento de onda escolhido. Essa possível diferenciação na composição flavonoídica das amostras pode acarretar erros maiores ou menores. Em geral, se tem optado por definir a quercetina como padrão em métodos de doseamento de flavonóides, dada a facilidade de obtenção no mercado e ao fato de ser a aglicona flavonoídica mais comum nas angiospermas. Uma vez que os flavonóis parecem ser mais freqüentes que as flavonas em amostras de própolis, justifica-se com mais forte razão o emprego de quercetina como substância de referência para o doseamento dos flavonóides de própolis e seus extratos. É importante lembrar também que algumas flavonas comuns em própolis, como a luteolina, têm comportamento espectrofotométrico semelhante à quercetina em presença de $AlCl_3$. Provavelmente, por essa razão obtivemos em nossas análises um baixo percentual de erro.

Para ácidos fenólicos a diferença percentual de um método para outro ultrapassa os 6%. O percentual calculado usando-se os teores de fenóis totais pelo método de Folin-Denis foi o que mais se aproximou da efetiva composição da mistura de padrões. Apesar do método de Folin-Ciocalteu ser mais preciso, o erro percentual na determinação dos flavonóides acabou resultando num erro maior ao se usar os teores de fenóis totais determinados pelo último método.

5.1.7 - Validação do processo extrativo S

As porcentagens de recuperação do padrão de quercetina apresentadas na Tabela 2 demonstram que o processo extrativo foi satisfatório. De fato, o emprego de metanol, que é considerado o solvente ideal para flavonóides, em extrator de Soxhlet deve praticamente levar ao esgotamento do material submetido à extração.

5.1.8 - Teores de fenóis totais, flavonóides e ácidos fenólicos em extratos e tinturas

Das metodologias utilizadas para avaliar os teores de fenóis totais, a determinação pelo método de Folin-Ciocalteu apresentou valores cerca de 30%

maiores do que os obtidos através do método de Folin-Denis (Tabelas 3 e 4). Este fato deve-se ao aumento da sensibilidade do reagente à redução pelos fenóis, em função do aumento da quantidade de molibdênio em relação ao tungstato, e menor tendência a formar precipitado (vide Introdução).

Pode-se observar pelos teores encontrados que amostras de própolis de uma mesma região, no caso o município de Ribeirão Preto, apresentam índices diversos, tanto para fenóis quanto para flavonóides. Este fato contraria a crença entre os apicultores de julgar a qualidade da própolis em função da região de origem. Por outro lado, podemos ter amostras de regiões diferentes com teores semelhantes. Os resultados sugerem que os índices estão mais relacionados com a flora disponível pela colméia e sua fenologia no momento da coleta do que com a região onde se localiza.

Os baixos valores de flavonóides encontrados (Tabela 3) para regiões de clima tropical e com flora bem diversa daquela de regiões de clima temperado parecem indicar que a matéria prima utilizada pelas abelhas na elaboração da própolis é pobre em compostos flavonoídicos. Tomás-Barbéran et al.⁹¹ verificaram em amostras de própolis de clima tropical baixos teores de flavonóides e em algumas amostras somente traços. Analisando uma amostra de própolis brasileira, Bonvehi et al.¹⁵ encontraram valores de 3% para flavonóides e 10,1% para fenóis. Estes resultados têm a mesma ordem de grandeza dos valores encontrados no presente trabalho.

Os resultados achados para os teores de ácidos fenólicos indicam que essa classe de substâncias contribui de forma mais acentuada na composição fenólica da própolis do que os flavonóides. Este fato pode ser um indicativo de que a contribuição dessa classe de substâncias para a atividade farmacológica da própolis é maior do que a dos flavonóides, que reiteradamente vêm sendo indicados como os principais agentes da própolis em termos terapêuticos. Recentemente, tem-se dado

muito interesse e muita pesquisa sendo feita para avaliar a ação farmacológica de ésteres do ácido cafeico^{47,35,80,88}.

Os resultados apresentados na Tabela 4 indicam que tinturas elaboradas com etanol 70°GL e por um período de 30 dias apresentam teores mais altos de fenóis e ácidos fenólicos. Quanto aos flavonóides, não há uma variação muito grande com relação ao solvente utilizado, podendo-se destacar que um período maior de extração é mais importante para o aumento dos teores do que o tipo de solvente utilizado.

5.2 - Teor de ceras

A metodologia desenvolvida para avaliar o teor de ceras tem sua importância relacionada ao fato de que as substâncias que compõem as ceras não são consideradas ativas farmacologicamente, portanto sua presença nas tinturas e extratos não é desejável. Além disso, em quantidades mais altas, as ceras são a principal causa de turvação de amostras de extratos e tinturas de própolis, quando armazenadas em baixas temperaturas. Outro fato que torna importante a determinação do teor de ceras relaciona-se a possíveis adulterações com a introdução de cera do favo nos extratos como forma de ganho de volume. Os extratos utilizados na forma de aerossóis também devem ser isentos de ceras porque podem causar o bloqueio da válvula do nebulizador. Outro fator que aparentemente leva a teores elevados de ceras nas amostras de própolis é o estímulo que muitos apicultores aplicam à produção de própolis pelas abelhas, ao introduzir uma tela de nylon entre a tampa e o ninho das colméias.

Pelos resultados da Tabela 5 os teores de ceras nas amostras estão abaixo dos 10%, enquanto nas tinturas com etanol abaixo de 1% e ausentes em tinturas hidroalcoólicas. Esses resultados apontam para uma possível constatação de que amostras de própolis de regiões tropicais teriam baixos teores de ceras em comparação com as de regiões temperadas⁴⁰. Solventes hidroalcoólicos seriam os mais indicados para que se tenha a ausência de ceras nos extratos. Isso se explica

pela insolubilidade dos compostos menos polares típicos da composição química das ceras em solventes polares como a água e o etanol.

No momento, não se dispõe ainda de informações que permitam entender a variação observada nos resultados da Tabela 5, referente aos teores de ceras nas amostras de própolis, embora o fator genético deva ser um dos mais importantes.

5.3 - Teor de cinzas

A importância de se avaliar o teor de cinzas está no fato de se poder detectar adulterações, tão frequentes principalmente em amostras na forma de pó, feitas com terra ou mesmo o resíduo de outras extrações. Certamente, uma adulteração desse tipo teria um claro reflexo no aumento dos teores de cinzas.

Pelos resultados apresentados na Tabela 6 pode-se perceber que os teores não ultrapassam a casa dos 4%. Temos valores semelhantes para as amostras II e VI, que provêm de floras e regiões distintas, enquanto as amostras I, II e III apresentam valores distintos, apesar de serem oriundas da mesma região. Essa constatação nos leva a crer que amostras de própolis de uma mesma região pode apresentar características diferentes, portanto não se pode avaliar, como tem sido feito por muitos apicultores, a qualidade da própolis pela região de onde se origina.

O teor de cinzas deve ser avaliado no conjunto dos outros parâmetros, pois se avaliado isoladamente pode-se incorrer em erros de caracterização das amostras.

5.4 - Teor de compostos voláteis

O teor de voláteis também representa mais um parâmetro que contribui para a caracterização química de uma determinada amostra de própolis. Percebe-se que novamente há uma semelhança nos valores das amostras II e VI e valores distintos para as amostras I, II e III..

Através desse parâmetro, pode-se detectar adulterações feitas com substâncias voláteis que têm poder bactericida como por exemplo o álcool benzílico⁹⁰ que

também pode ocorrer na composição da própolis em condições naturais. Também o eugenol⁹⁰ é citado como adulterante de amostras de própolis, devido ao seu poder anestésico local. Deve-se lembrar que entre as propriedades farmacológicas atribuídas à própolis inclui-se a atividade anestésica. Uma conseqüente extensão na análise de substâncias voláteis seria a verificação, através de cromatografia em fase gasosa, de possíveis adulterações e a determinação do perfil cromatográfico de amostras de própolis.

5.5 - Resíduo seco

A Tabela 7 fornece informações sobre os teores de resíduo seco presente nas amostras. Verifica-se que os valores nunca são inferiores a 90%.

Este é um parâmetro de muita importância para que se possa efetuar os cálculos de teores nos ensaios de doseamento, pelo fato de que a umidade presente em uma mesma amostra varia bastante em função da manipulação e das condições de armazenamento. Poderíamos incorrer em grave erro de cálculo se não considerássemos o peso da amostra isento de umidade.

5.6 - Densidade

Os valores apresentados na Tabela 8 demonstram que a densidade de tinturas feitas com álcool 70°GL têm um valor mais alto, obviamente em função da presença de água no solvente extrator. A densidade constitui-se num parâmetro importante para o controle da quantidade de água em extratos e tinturas.

5.7 - Teor de álcool etílico absoluto

A Tabela 9 fornece valores relacionados ao teor alcoólico das tinturas. Tanto o processo extrativo **A** como o **B** apresentam teores de álcool etílico absoluto abaixo dos teores de seus respectivos solventes, devido à umidade presente nas amostras e a alguma evaporação durante a manipulação.

A análise cromatográfica de extratos e tinturas é de um valor inestimável pelo fato de com ela torna-se possível detectar a presença de outros solventes alcoólicos, como o metanol e o isopropanol. Como a produção de extratos muitas vezes é feita por pessoas sem a devida formação profissional, a população corre o risco de consumir um produto que pode estar contaminado com solventes muito perigosos, causando sérios danos à saúde podendo, inclusive, causar a morte de pessoas como ocorreu alguns anos atrás na Argentina.

5.8 - Perfil químico das amostras de própolis ensaiadas

Os valores de teores de fenóis totais e flavonóides encontrados em amostras de própolis brasileiras são cerca de 50% menores que os encontrados em amostras de própolis oriundas da China¹⁵. Em amostras de própolis da Europa Oriental os valores são cerca de 30% maiores³⁹. Esses dados sugerem que as amostras brasileiras ensaiadas têm quantidades inferiores de compostos fenólicos que as amostras originadas da Europa e China.

Os teores de compostos voláteis de amostras brasileiras são em média cerca de 40% menores que os encontrados por Bonhevi et al.¹⁵ em amostras chinesas. Para os teores de ceras, as amostras chinesas¹⁵ são de 100 a 300% maiores do que as amostras brasileiras. Proporções semelhantes são válidas também para amostras oriundas da Europa Oriental³⁹.

Entre as amostras brasileiras há uma variação de até 50% para fenóis totais e cerca de 80% para ácidos fenólicos. Para flavonóides esse valor pode ser de até 180%. Essas variações encontradas entre as amostras sugerem que diversos fatores podem influenciar na composição da própolis. Entre eles pode-se destacar a flora disponível pela colméia⁹¹, a estação do ano, o fator genético, o estado nutricional da colméia e o manejo pelo homem.

Os valores de teores de ceras indicam uma variação de 60% entre a amostra III de flora de laranja e a amostra I de flora diversificada, ambas oriundas do

município de Ribeirão Preto. Para os teores de cinzas e voláteis, amostras **II** e **VI**, encontramos valores semelhantes para regiões diferentes e valores diferentes para a mesma região (amostras **I**, **II** e **III**). Percebe-se que não há uma padronização de valores entre as amostras brasileiras, nem há no momento uma explicação que justifique essa variação. Para tentar esclarecer essa variação deveriam ser feitas análises de teores de uma mesma amostra, fixando-se a flora e a colméia, por vários anos seguidos a fim de se verificar se é possível estabelecer um padrão para a composição das própolis.

6 - CONCLUSÕES

Pelos dados experimentais obtidos e nas condições em que foi realizado o trabalho, pode-se concluir que:

1 - Fenóis totais podem ser determinados com boa margem de segurança em amostras de própolis, usando-se quercetina como referência pelo método de Folin-Denis e ácido gálico pelo método de Folin-Ciocalteu.

2 - Flavonóides podem ser determinados com boa margem de segurança em amostras de própolis, usando-se quercetina como referência e AlCl_3 como reagente de deslocamento.

3 - Os teores de ácidos fenólicos podem ser estimados em amostras de própolis pela diferença entre os teores de fenóis totais e de flavonóides .

4 - O processo extrativo de substâncias fenólicas em aparelho de Soxhlet apresentou resultados que comprovaram a sua eficiência no sentido de se obter praticamente o esgotamento total da amostra.

5 - Os teores de ceras podem ser determinados quantitativamente em amostras de própolis através do método gravimétrico descrito neste trabalho.

6 - Os teores de cinzas, compostos voláteis, resíduo seco, álcool etílico e densidade são outros parâmetros analíticos importantes para caracterização de amostras ou extratos de própolis.

7 - Os resultados sugerem que os teores de compostos fenólicos, voláteis e ceras têm valores mais baixos que os encontrados em amostras de própolis do continente europeu.

7 - BIBLIOGRAFIA*

1. ALFONSUS, E.C. Some sources of propolis. Glean. Bee Cult , v.61, p. 92-93, 1933.
2. ARVOUET-GRAND, A.; LEJEUNE, B.; BASTIDE, P.; POURRAT, A.; PRIVAT, A.M.; LEGRET, P. Extrait de propolis: I. Etude de la toxicité aiguë et détermination de l'indice d'irritation primaire cutanée. J. Pharm. Belg. , v.48, n.3, p. 165-70, 1993.
3. ARVOUET-GRAND, A.; LEJEUNE, B.; BASTIDE, P.; POURRAT, A.; PRIVAT, A.M.; LEGRET, P. Extrait de propolis: II. Etude de la cicatrisation de plaies chez le lapin et chez le rat. J. Pharm. Belg. , v.48, n.3, p. 171-178, 1993.
4. AZEVEDO, J.L.; FLECHYMANN, C.H. Occurrence of antimicrobial substances in certain social insects. Escola Superior Agric., Rev. Piracicaba v.38, p.129-36, 1963.
6. BANKOVA, V.S.; POPOV, S.S.; MAREKOV, N.L. High performance liquid chromatographic analysis of flavonoids from propolis. J. Chromatogr. v.242, p. 135-143, 1982.

* De acordo com normas elaboradas pelo Grupo de Estudo de Referências Bibliográficas - SISTEMA INTEGRADO DE BIBLIOTECAS/USP, 1990.

7. BANKOVA, V.; DYULGEROV, A.; POPOV, S.; EVSTATIEVA, L.; KULEVA, L.; PUREB, O.; ZAMJANSAN, Z. Propolis produced in Bulgaria and Mongolia: phenolics compounds and plant origin. Apidologie , v.23, p. 79-85, 1992.
8. BANKOVA, V.S.; POPOV, S.S.; MAREKOV, N.L. A study of flavonoids of propolis. J. Natur. Prod. , v.46, n.4, p. 771-774, 1983.
9. BANKOVA, V.S.; POPOV, S.S.; MAREKOV, N.L. Isopentenyl cinnamates from poplar buds and propolis. Phytochemistry , v.28, p. 871-873, 1989.
10. BANKOVA, V.S.; POPOV, S.S.; MAREKOV, N.L. On the chemical composition of some propolis fractions with antiviral action. Acta Microbiol. Bulg. , v.23, p. 52-57, 1988.
11. BANKOVA, V.S.; CHRISTOV, R.; POPOV, S.; PUREB, O.; BOCARI, G. Volatile constituents of propolis. Z. Naturforsch. , v.49C, p. 6-10, 1994.
12. BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; STOEV, G.; POPOV, S. Determination of phenolics from propolis by capillary gas chromatography. Journal of Chromatography , v.607, p. 150-153, 1992.
13. BIAZETI, L.; WOISKY, R.G.; SALATINO, A.; OHARA, T.M.; SAKURA, T.M. Avaliação "in vivo" da Atividade Antimalárica de própolis contra *Plasmodium berghei*. In: 1st INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF LATIN AMERICAN AND CARIBBEAN SECTION OF AOAC INTERNATINAL, 1995.

14. BIRI, M.; ALBERT, J.M.A. Moderna criação de abelhas. Barcelona, p. 105, Editorial De Vecchi S.A., 1979.
15. BONHEVI, J.S.; COLL, F.V.; JORDÀ, R.E. The Composition, Active Components and Bacteriostatic Activity of Propolis in Dietetics. JAOCS , v.71, n.5, p.529-532, 1994.
16. BRASIL. Leis, decretos, etc. - Portaria nº 5, de 25 de fevereiro de 1985, da Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Cosméticos. Diário Oficial da União , Brasília, 4 de março de 1985. Seção I, p. 3536.
17. BRUMFITT, W.; HAMILTON-MILLER, J.T.M.; FRANKLIN, I. Antibiotic activity of natural products: 1. Propolis. Microbios , v.62, p. 19-22, 1990.
18. CATTORINI, P.E. Le api e gli uomini. Fitoterapia , v.34, p. 85-93, 1963.
19. CIZMARIK, J.; MATEL, I. Examination of the chemical composition of propolis. Isolation and identification of 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid (ferulic acid) from propolis. Journal of Apicultural Research , v.12, n.1, p. 63-65, 1973.
20. CUELLAR, A.; ROJAS, N.; MARTINEZ, J. Nueva estructura antimicrobiana del propoleo colectado en Cuba. In: MEMORIAS DEL I SIMPOSIO SOBRE LOS EFECTOS DEL PROPOLEO EN LA SALUD HUMANA Y ANIMAL, Varadero, Cuba , 1988.

21. CUTLER, D.F.; ALVIN, K.L.; PRICE, C.E. The Plant Cuticle. Academic Press, London, 1982.
22. DEBLOCK-BOSTYN, G. L'Abeille et ses produits. Bull. Soc. Pharm. Lille, v.38, p. 181-203, 1982.
23. DEBUYSER, E. La propolis. Docteur en Pharmacie Thesis, Université de Nantes, France, 1983.
24. DEUTSCHES ARZNEIBUCH. Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart. Govi-Verlag GmBh. Frankfurt, 1978.
25. DOBROWOLSKY, J.W.; VOHORA, S.B.; SHARMA, K.; SHAH, S.A.; NAQVI, S.A.; DANDIYA, P.C. Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. J. Ethnopharmacol., v.35, n.1, p. 77-82, 1991.
26. DONADIEU, Y. La propolis. Paris, p. 15, Maloine S.A. Éditeur, 1980.
27. DOWD, L.E. Spectrophotometric Determination of Quercetin. Analytical Chemistry, v.31, n.7, p. 1184-1187, 1959.
28. ESKIN, N.A.M.; HOEHN, E.; FRENKEL, C. A simple and rapid quantitative method for total phenols. J. Agric. Food Chem., v.26, n.7, p. 973-975, 1978.
29. FARMACOPÉIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL. 2ª EDIÇÃO, 1959.

30. FERNANDES JR., A.; SUGIZAKI, M.F.; FOGO, M.L.; LOPES, C.A.M.; FUNARI, S.R.C. Suscetibilidade *in vitro* de *Candida* a própolis. In: IV CONGRESSO IBEROLATINO-AMERICANO DE APICULTURA, 1994.
31. FOLIN, O.; DENIS, W. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as colour reagents. Journal of Biological Chemistry , v.12, p. 239-343, 1912.
32. FOLIN, O.; DENIS, W. Tyrosine in proteins as determined by a new colorimetric method. Journal of Biological Chemistry , v.12, p. 245-251, 1912.
33. FOLIN, O.; CIOCALTEAU, V. On tyrosine and tryptophane determination in proteins. Journal of Biological Chemistry , v.27, p. 627-650, 1927.
34. FRANCO, T.T.; KUREBAYASHI, A.K. Isolamento de princípios ativos da própolis por cromatografia em papel bidimensional e doseamento espectrofotométrico. Rev. Inst. Adolfo Lutz , v.46, n.1/2, p. 81-86, 1986.
35. FRENKEL, K.; WEI, H.; BHIMANI, R.; YE, J.; ZADUNAISKY, J.A.; HUANG, M.T.; FERRARO, T.; CONNEY, A.H.; GRUNBERGER, D. Inhibition of tumor promoter-mediated processes in mouse skin and bovine lens by caffeic acid phenethyl ester. Cancer Res. , v.53, n.6, p. 1255-61, 1993.

36. GABRYS, J.; KONECKI, J.; KROLL, W.; SCHELLER, S.; SHANI, J. Free amino acids in bee hive product (propolis) as identified and quantified by gas-liquid chromatography. Pharm. Res. Comm. , v.18, n.6, p. 513-518, 1986.
37. GAMA, G.B. CARTA AO EDITOR - A própolis e a malária. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical , v.26, n.3, p. 193, 1993.
38. GARCIA-VIGUERA, C.; GREENAWAY, W.; WHATLEY, F.R. Composition of propolis from two different Spanish regions. Z. Naturforsch. , v.47C, p. 634-637, 1992.
39. GHISALBERTI, E.L. Propolis: a review. Bee World , v.60, p. 59-84, 1979.
40. GHISALBERTI, E.L.; JEFFERIES, P.R. ; LANTERI, R.; MATISONS, J. Constituents of propolis. Experientia , v.34, p. 157-158, 1978.
41. GONTARSKY, H. Beitrag zur Analyse des Kittinstinktes der Honigbiene. Z. Bienenforsch. , v.3, n.3, p. 80-87, 1955.
42. GRANGE, J.M.; DAVEY, R.W. Antibacterial properties of propolis (bee glue). Journal of the Royal Society of Medicine , v.83, n.3, p. 159-160, 1990.
43. GREENAWAY, W.; SCAYSBROOK, T.; WHATLEY, F.R. The composition and plant origins of propolis. Bee World , v.71, p. 107-118, 1990.

44. GREENAWAY, W.; SCAYSBROOK, T.; WHATLEY, F.R. Headspace volatiles from propolis. Flavour Fragr. J. , v.4, p. 173-175, 1989.
45. GREENAWAY, W.; SCAYSBROOK, T.; WHATLEY, F.R. Composition of propolis of Oxfordshire, UK and its relation to poplar exudate. Z. Naturforsch. , v.43C, p. 301-304, 1988.
46. GREENAWAY, W.; MAY, J.; SCAYSBROOK, T.; WHATLEY, F.R. Identification by gas chromatography-mass spectrometry of 150 compounds in propolis. Z. Naturforsch. , v. 46C, p. 111-121, 1991.
47. GRUNBERGER, D.; BANERJEE, R.; EISINGER, K.; OLTZ, E.M.; EFROS, L.; CALDWELL, M.; ESTEVEZ, V.; NAKANISHI, K. Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. Experientia , v.44, n.3, p. 230-32, 1988.
48. HAUSEN, B.M.; WOLLENWEBER, E.; SENFF H.; POST, B. Propolis allergy. I. Origin, properties, usage and literature review. Contact Dermatitis , v.17, p. 163-170, 1987.
49. HAUSEN, B.M.; EVERS, P.; STUEWE, H.T.; KOENIG, W.A.; WOLLENWEBER, E. Propolis allergy: (IV). Studies with further sensitizers from propolis and constituents common to propolis, poplar buds and balsam of Peru. Contact Dermatitis , v.26, n.1,p. 34-44, 1992.
50. HELFENBERG, K.D. The analysis of beeswax in propolis. Chemikerzeitung v.31, p. 987-988, 1908.

51. JAUBERT, G.F. Origin of the colour of beeswax and the composition of propolis. C. r. hebd. Séanc. Acad. Sci. , v.184, p. 1134-1136, 1926.
52. KHAYAL, M.T.; EL-GHAZALY, M.A.; EL-KHATIB, A.S. Mechanisms involved in the antiinflammatory effect of propolis extract. Drugs Under Experimental and Clinical Research , v.19, n.5, p. 197-203, 1993.
53. KHODOLOVA, Y.D. Squalene, lanosterol and cholesterol of propolis and its probable sources. Khim. Biol. Nauki , v.5, p. 88-90, 1981.
54. KÖNIG, B. Plant sources of propolis. Bee World , v.66, p. 136, 1985.
55. KÖNIG, B. Studien zur antivirotischen Aktivität von Propolis (Kittharz der Honigbiene, *Apis mellifera* L.), Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften, Universität Hannover, Germany, 1986.
56. KROL, W.; CZUBA, Z.; SCHELLER, S.; GABRYS, J.; GRABIEC, S.; SHANI, J. Anti-oxidant property of ethanolic extract of propolis (EEP) as evaluated by inhibition the chemiluminescence oxidation of luminol Biochemistry International , v.21, n.4, p. 593-598, 1990.
57. LAVIE, P. Les substances antibiotiques dans la colonie d'abeilles. In R. Chauvin (ed.) Traité de biologie de l'abeille . Paris, p. 1-115, Masson et Cie., 1968.

58. MACIEJEWICZ, W. Chemical composition of propolis: latest investigation and own research. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON APITHERAPY, Cracow, Poland, 1985.
59. MACIEJEWICZ, W.; DANIEWSKY, M.; MEILNICZUK, Z. Gas chromatography - mass spectrometry investigation of propolis. Analysis of phenolic acids and sugars. Chemia Analit. (Warsaw) , v.29, n.2, p. 421-427, 1984.
60. MACIEJEWICZ, W.; Gas chromatography - mass spectrometry investigation of propolis. Analysis of sesquiterpenes. Acta Polon. Pharm. , v.40, n.2, p. 251-253, 1983.
61. MAGRO, O. Ação tópica da própolis na reparação de sulcoplastias pela técnica de Kazanjian modificada. Avaliação citológica e clínica em pacientes. Tese de Doutorado, Araçatuba, Estado de São Paulo, Brasil, 1991.
62. MARCUCCI, M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. Apidologie , v. 26, p. 83-99, 1995.
63. MARCUCCI, M.C.; CAMARGO, F.A.; LOPES, C.M.A. Identification of some propolis constituents: amino acids. In: PROC. XXIII ANNUAL MEETING BRAZ. BIOCHEM. SOC., Caxambu, Brasil, 1994.
64. MARINESCU, I.; TAMAS, M. Phytochemical analysis of poplar buds, a possible source of propolis. Apicultura in Romania , v.54, n.12, p. 14-16; v.55, n.2, p. 21-22, 1979-1980.

65. MARKHAN, K.R. Techniques of Flavonoid Identification. Academic Press, London, 1982.
66. MCGREGOR, S.E. Collection and utilization of propolis and pollen by caged honey bee colonies. Am. Bee J. , v.92, n.1, p. 20-21, 1952.
67. MCNAIR, H.M.; BONELLI, E.Y. Basic gas chromatography. 5^a ed. California, Copyright, p. 169-87, 1969.
68. MEYER, W. 'Propolis bees' and their activities. Bee World. , v.37, n.2, p. 25-36, 1956.
69. MILLER, J.C. & MILLER, J.N. Statistics for Analytical Chemistry. Ellis Horwood Limited, New York, 1988.
70. MOCHIDA, S.; HAGA, M.; TAKINO, Y. Chemical constituents and antimicrobial activity of Japanese propolis. In: PROC. 30 INT. BEEKEEPING CONGR., p. 455-456, 1985.
71. NAGY, E.; PÁPAY, V.; LITKEY, G.; DINYA, Z. Investigation of the chemical constituents, particularly the flavonoid components of propolis and *Populi gemma* by the GC/MS method. In: Flavonoids and Bioflavonoids (L. Farkas, M. Gábor, F. Kallay, eds), Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 1985.

72. NEGRI, G.; MARCUCCI, M.C.; SALATINO, A. & SALATINO, M.L.F. Characterization of Brazilian Propolis Waxes by Gas-Chromatography/Mass Spectrometry. Submetida à publicação, 1996.
73. NICOLAS, A. Cire d'abeilles et propolis. Nancy: Thomas, p. 141-142, 1947.
74. PIEK, T. Synthese von Wachs bei der Honigbiene. Doctorate thesis, Utrecht, Netherlands, 1962.
75. POPRAVKO, S.A. Flavonoid components of propolis. Khim. Prir. Soedin. v.5, n.6, p. 476-482, 1969.
76. POPRAVKO, S.A. Plant sources of propolis. Phelovodstvo, v.96, n.7, p.38-41, 1976.
77. POPRAVKO, C.A.; SOKOLOV, I.V.; TURGOV, I.V. Derivatives of unsaturated aromatic alcohols in propolis and gum benzoin. Khim. Prir. Soedin., v.1, p. 152-160, 1984.
78. POPRAVKO, C.A.; SOKOLOV, I.V.; TURGOV, I.V. New natural phenolics triglycerides. Khim. Prir. Soedin., v.2, p. 169-173, 1982.
79. PRICE, M.L.; BUTLER, L.G. Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.25, p. 1268-1273, 1977.

80. RAO, C.V.; DESAI, D.; KAUL, B.; AMIN, S.; REDDY, B.S. Effect of caffeic acid esters on carcinogen-induced mutagenicity and human colon adenocarcinoma cell growth. Chemico-biological Interactions , v.84, n.3, p. 277-290, 1992.
81. RICCIARDELLI, G. L'origine Géographique de la Propolis. Apidologie , v.10, n.3, p. 241-267, 1979.
82. SCHELLER, S.; KROL, W.; SWIACIK, J.; OWCZAREK, S.; GABRYS, J.; SHANI, J. Antitumoral property of ethanolic extract of propolis in mice-bearing Ehrlich carcinoma, as compared to bleomycin. Z. Naturforsch. C. , v.44, n.11-12, p. 1063-1065, 1989.
83. SCHELLER, S.; SZAFIARSKI, J.; TUSTANOWSKI, J.; NOLEWAJKA, E.; STOJKO, A. Biological properties and clinical application of propolis. I. Some physico-chemical properties of propolis. Arzneimittelforsch. , v.27, n.4, p. 889-890, 1977.
84. SCHMIDT, P.C.; ORTEGA, G.G. Passionsblumenkraut. Bestimmung des Gesamtflavonoidgehaltes von Passiflorae herba. Deutsche Apotheker Zeitung , v.133, n.47, p. 17-26, 1993.
85. SCHNEIDWIND, E.M.; BUJE, A.; KALA, H.; METZNER, J.; ZSCHUNKE, A. Identification of an antimicrobially active constituent isolated from propolis. Pharmazie , v.34, n.2, p. 103-106, 1979.

86. SHARMA, H.C.; SINGH, O.P. Medicinal properties of some lesser known but important bee products. In: SECOND INTERNATIONAL CONFERENCE ON APICULTURE CLIMATES. K.N. Mehrota (ed.) New Delhi, p. 694-710, Indian Agr. Res. Inst., 1980.
87. SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. Colorimetric of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture , v.16, p. 144-158, 1965.
88. SU, Z.Z.; LIN, J.; GRUNBERGER, D.; FISHER, P.B. Growth supression and toxicity induced by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) intype 5 adenovirus-transfiomed rat embryo cells correlates directly with transformation progression. Cancer Research , v.54, n.7, p. 1865-1870, 1994.
89. TAMAS, M.; MARINESCU, I. Asupra continutului de flavone din mugurii de plop. St. Cerc. Biochim. , v.26, n.2, p. 182-185, 1983.
90. THE MERCK INDEX. 20^a ed. Whitehouse Station, NJ, 1996.
91. TOMÁS-BARBÉRAN, F.A.; GARCIA-VIGUERA, C.; VIT-OLIVIER, P.; FERRERES, F.; TOMÁS-LORENTE, F. - Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. Phytochemistry , v.34, p. 191-196, 1993.
92. TULLOCH, A.P. The composition of beeswax and other waxes secreted by insects. Lipids , v.5, n.2, p. 247-258, 1970.

93. VANHAELEN, M. ; VANHAELEN-FASTRÉ, R. Propolis I. Origine, micrographie, composition chimique et activité thérapeutique. J. Pharm. Belg. , v.34, p. 253-259, 1979.
94. VANHAELEN, M.; VANHAELEN-FASTRÉ, R. Propolis II. Identification par chromatographies haute-performance des constituants. J. Pharm. Belg. v.34, n.6, p. 317-328, 1979.
95. VENNAT, B. ; GROSS, D.; POURRAT, A. ; POURRAT, H. *Hamamelis virginiana*: Identification and assay of proanthocyanidins, phenolic acids and flavonoids in leaf extracts. Pharm. Acta Helv. , v.67, n.1, p. 11-14, 1992.
- 96 VICKERY, M.L. & VICKERY, B. Secondary plant metabolism. The MacMillan Press Ltd, London, 1981.
97. VILLANUEVA, V.R.; BARBIER, M.; GONNET, M.; LAVIE, P. Les flavonoides de la propolis. Isolement d'une nouvelle substance bactériostatique: La pinocembrine (Dihydroxy-5, 7 flavanone). Ann. Inst. Pasteur , v.118, p. 84-87, 1970.
98. VILLANUEVA, V.R.; BOGDANOVSKY, D.; BARBIER, M.; GONNET, M.; LAVIE, P. Sur l'isolement et l'identification de la 3,5,7-trihydroxy flavone (galangine) a partir de la propolis. Ann. Inst. Pasteur , v.106, p. 292-302, 1964.

99. VOLPERT, R.; ELSTNER, E.F. Biochemical activities of propolis extracts. I. Standardization and antioxidative properties of ethanolic and aqueous derivatives. Z. Naturforsch. C. , v.48, n.11/12, p. 851-7, 1993.
100. WALKER, P.; CRANE, E. Constituents of propolis. Apidologie , v.18, p. 327-34, 1987.
101. WATERMAN, P.G.; MOLE, S. Analysis of Phenolic Plant Metabolites. London, p.78-91, Blackwell Scientific Publications, 1994.
102. WINSTON, M.L. The Biology of the honey Bee. Harvard University Press, New York, p. 24-25, 1987.
103. WOISKY, R.G.; GIESBRECHT, A.M.; SALATINO, A. Atividade antibacteriana de uma formulação preparada a partir de própolis de *Apis mellifera* L. Rev. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo , v.30, n.1, p. 19-21, 1994.

RESUMO

Propõe-se um conjunto de parâmetros e respectivos métodos para análise de amostras de própolis bruta e tinturas de própolis, com vistas ao seu controle químico. Para amostras de própolis bruta, propõe-se a determinação dos teores de fenóis totais, flavonóides, ácidos fenólicos, ceras, cinzas, substâncias voláteis e resíduo seco. Para a análise de tinturas, propõe-se a determinação dos quatro primeiros itens acima, acrescidos do teor de álcool etílico e densidade. A adequação dos métodos apresentados para a determinação de fenóis totais, flavonóides e ácidos fenólicos foi avaliada através de sua aplicação a uma mistura contendo quantidades conhecidas de flavonóides e ácidos fenólicos. O percentual das diferenças entre os teores reais e os teores medidos na mistura padrão situaram-se sempre abaixo de 10,0%.

O emprego do conjunto de análises propostas é exemplificado, através da determinação dos parâmetros em amostras de própolis bruta, coletadas em distintas localidades do Brasil, e em amostras de tinturas etanólicas e hidroalcoólicas de própolis. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, o que permitiu verificar que os métodos propostos apresentam boa reprodutibilidade. As amostras de própolis analisadas apresentam teores de fenóis totais cerca de 30% inferiores à média dos resultados relatados para amostras de origem européia. Os teores de flavonóides encontrados são muito pequenos, se comparados com os valores geralmente reportados para amostras de própolis de regiões temperadas.

ABSTRACT

A number of parameters and respective methods of analysis for chemical control of samples and tinctures of propolis is presented. It is suggested the determination of the contents of total phenolics, flavonoids, phenolic acids, waxes, ashes, volatile substances and dry residue for chemical control of samples of crude propolis. For propolis tinctures, in addition to the first four parameters it is proposed the determination of the density and the content of ethyl alcohol. The validity of the proposed methods for quantification of total phenolics, flavonoids and phenolic acids was evaluated by means of analysis of a mixture containing known quantities of several flavonoids and phenolic acids. The percentages of the differences between the actual contents and the measured quantities in the standard mixture remained always below 10,0%.

The utility of the proposed methods is shown by the determination of the proposed parameters in samples of crude propolis collected in distinct localities of Brasil, and also in samples of ethanolic and hydroalcoholic tinctures of propolis. Because all assays were conducted as triplicates it was possible to demonstrate that all methods present good reproducibility. The samples of crude propolis assayed showed contents of total phenolics 30% below the average of the values reported for samples of propolis from Europe. The contents of flavonoids are also relatively small when compared with the contents generally reported for samples of propolis from temperate regions.