UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

Análise de própolis da Serra do Japi, determinação de sua
origem botânica e avaliação de sua contribuição em processos
de cicatrização

Cristiano Soleo de Funari

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Vicente de Oliveira Ferro

São Paulo
2005

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Funari, Cristiano Soleo de
F979a Análise de própolis da Serra do Japi, determinação de sua
origem botânica e avaliação de sua contribuição em processos
de cicatrização / Cristiano Soleo de Funari. -- São Paulo, 2005.
138p.

Dissertação (mestrado)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Ferro, Vicente de Oliveira

I. Própolis : Produtos naturais : Farmacognosia 2. Própolis :
Farmacologia 3. Flavonóide : Produtos naturais I. T. II.
Ferro, Vicente de Oliveira, orientador.

615.321 CDD

Cristiano Soleo de Funari

Análise de própolis da Serra do Japi, determinação de sua origem
botânica e avaliação de sua contribuição em processos de cicatrização

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Vicente de Oliveira Ferro
orientador/presidente

Dra. Mônica Beatriz Mathor

Dra. Lia Shiguemi Sudo

São Paulo, 31 de janeiro de 2005.

Dedico este trabalho a meus pais,
que me ensinaram a crer
na natureza.

AGRADECIMENTOS

Ao professor e orientador Vicente de Oliveira Ferro, por sua orientação e amizade.

À Dra. Mônica Beatriz Mathor (IPEN), por sua enorme contribuição às análises biológicas desenvolvidas neste trabalho, por sua amizade e por seus ensinamentos.

A todos do Laboratório de Biofarmacotécnica (Biofar-USP) e em especial à Profa. Valentina Porta, por disponibilizar equipamento e materiais para análises cromatográficas, e a Eder Benassi e Eunice Kono, por suas colaborações práticas.

À Dra. Mara Magenta, do Instituto de Biociências (USP), pela identificação botânica de espécie coletada para este trabalho.

Ao Prof. Dr. Eckhard Wollenweber (Institut Für Botanik der Technischen Universität – Darmstadt – Germany), pela doação de padrões de flavonóides e pelas discussões eletrônicas concedidas.

Ao Instituto Fujisaki (Hayashibara Biochemical Labs, Inc. - Japão), pela doação do padrão da substância Artepillin C.

À Dra. Maria Cristina Marcucci (Natural Labor), pelas consultas concedidas e por disponibilizar materiais utilizados neste trabalho.

Ao Sr. Joanielso dos Santos (ABRACAM), missionário da apicultura brasileira, pelos ensinamentos no campo da apicultura, por sua amizade e incentivo.

Aos colegas Pedro Lopez Garcia e Konan N'Zi Andre, por seus companheirismos e participação nas análises espectrofotométricas contidas neste trabalho.

À Dra. Olga Zazuco Higa (IPEN), pela doação de alguns reagentes utilizados nas análises biológicas.

Ao Grupo Centroflora, pelo incentivo à realização deste trabalho e pela doação de alguns reagentes e padrões fitoquímicos.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS E LISTA DE SIGLAS.....	XI
RESUMO.....	XII
ABSTRACT	XIII
DADOS BIOGRÁFICOS DO AUTOR	XIV
1. INTRODUÇÃO E OBJETIVO.....	1
1.1 INTRODUÇÃO	1
1.2 OBJETIVO.....	6
2. REVISÃO DE LITERATURA	7
2.1 FONTES BOTÂNICAS DE PRÓPOLIS	7
2.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA PRÓPOLIS	13
2.2.1 Composição Química de Própolis em Zonas Temperadas.....	13
2.2.2 Composição Química de Própolis em Zonas Tropicais	14
2.2.3 Composição de Própolis Brasileiras	16
2.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA PRÓPOLIS.....	24
2.3.1 Atividade Antimicrobiana	24
2.3.2 Atividade Antiinflamatória	28
2.3.3 Atividade Antioxidante	31
2.3.4 Ensaios de Cicatrização	35
2.3.5 Atividade Antitumoral.....	37
2.3.6 Outras Atividades Biológicas	39
3. MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.1 MATERIAIS	42
3.1.1 Amostras.....	42
3.1.2 Reagentes e Soluções.....	43
3.1.2.1 Reagentes utilizados em análises espectrofotométricas.....	43

3.1.2.2	Reagentes e soluções utilizados em ensaios de proliferação de fibroblastos	44
3.1.3	Padrões Fitoquímicos	45
3.1.4	Equipamentos	46
3.2	MÉTODOS	47
3.2.1	Preparação dos Extratos	48
3.2.1.1	Extrato etanólico de própolis	48
3.2.1.2	Extrato metanólico de própolis	49
3.2.2	Exame Organoléptico	50
3.2.3	Análises Gravimétricas	50
3.2.3.1	Teor de cinzas	51
3.2.3.2	Perda por dessecação a 105°C.....	52
3.2.3.3	Resíduo insolúvel em metanol (massa mecânica)	53
3.2.3.4	Teor de cera	54
3.2.3.5	Sólidos solúveis em metanol e em etanol	55
3.2.4	Análises Espectrofotométricas.....	56
3.2.4.1	Teor de flavonóides totais	56
3.2.4.2	Teor de fenóis totais.....	57
3.2.4.3	Precipitação com pó de pele	59
3.2.5	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE.....	61
3.2.6	Identificação da Fonte Botânica da Própolis.....	62
3.2.7	Ação da Própolis, <i>in vitro</i> , sobre Fibroblastos de Camundongo (NIH-3T3).....	65
3.2.7.1	Preparação das células.....	65
3.2.7.2	Preparação das soluções teste e controle.....	66
3.2.7.3	Experimento A - análise qualitativa	67
3.2.7.4	Experimento B - análise quantitativa	68
3.2.7.4.1	Análises estatísticas.....	70
4.	RESULTADOS.....	73
4.1	EXAME ORGANOLÉPTICO.....	73

4.2 ANÁLISES GRAVIMÉTRICAS	73
4.2.1 Teor de Cinzas, Perda por Dessecação a 105°C, Resíduo Insolúvel em MeOH, Teor de Cera e Sólidos Solúveis.....	73
4.3 ANÁLISES ESPECTROFOTOMÉTRICAS	74
4.3.1 Teores de Flavonóides e Fenóis Totais	74
4.3.2 Precipitados com Pó de Pele.....	76
4.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA - CLAE	76
4.5 IDENTIFICAÇÃO DA FONTE BOTÂNICA DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS	80
4.6 AÇÃO DA PRÓPOLIS, <i>IN VITRO</i> , SOBRE FIBROBLASTOS DE CAMUNDONGO (NIH-3T3).....	86
4.6.1 Experimento A - Análise Qualitativa.....	86
4.6.2 Experimento B – Análise Quantitativa.....	89
5. DISCUSSÃO	94
5.1 EXAME ORGANOLÉPTICO.....	94
5.2 ANÁLISES GRAVIMÉTRICAS	95
5.3 ANÁLISES ESPECTROFOTOMÉTRICAS.....	96
5.3.1 Teor de Flavonóides Totais	96
5.3.2 Teor de Fenóis Totais	98
5.3.3 Precipitados com Pó de Pele.....	100
5.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	101
5.5 IDENTIFICAÇÃO DA FONTE BOTÂNICA DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS	102
5.6 AÇÃO DA PRÓPOLIS, <i>IN VITRO</i> , SOBRE FIBROBLASTOS DE CAMUNDONGOS - CÉLULAS NIH 3T3	103
6. CONCLUSÕES	112
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	114
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115
APÊNDICES	126

LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1 - FONTES BOTÂNICAS DE PRÓPOLIS EM ALGUMAS REGIÕES GEOGRÁFICAS	12
TABELA 2.2 - SUBSTÂNCIAS ENCONTRADAS EM AMOSTRAS DE PRÓPOLIS BRASILEIRAS	20
TABELA 4.1 - CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS DA AMOSTRA DE PRÓPOLIS 1	73
TABELA 4.2 - VALORES DE TRÊS REPLICATAS (R), MÉDIA E DESVIO PADRÃO (DP), EM % (M/M), PARA AS ANÁLISES GRAVIMÉTRICAS REALIZADAS COM A AMOSTRA DE PRÓPOLIS 1	74
TABELA 4.3 - ABSORBÂNCIAS (ABS), DESVIOS PADRÃO (DP) E TEORES DE FENÓIS E FLAVONÓIDES TOTAIS, POR CENTO, SOBRE A MASSA DE PRÓPOLIS BRUTA QUE DEU ORIGEM AO EXTRATO METANÓLICO (M/M).....	75
TABELA 4.4 - ABSORBÂNCIAS (ABS), MÉDIAS, DESVIOS PADRÃO (DP) E CONCENTRAÇÕES DE FENÓIS TOTAIS EM SOLUÇÃO ESTOQUE DE PRÓPOLIS, PREPARADA A PARTIR DE EXTRATO ETANÓLICO SECO, ANTES E APÓS CONTATO COM PÓ DE PELE	76
TABELA 4.5 - SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS NOS RESÍDUOS METANÓLICO E ETANÓLICO DE PRÓPOLIS E SUAS RESPECTIVAS QUANTIDADES, EM RELAÇÃO À MASSA DA PRÓPOLIS BRUTA (PB)	79
TABELA 4.6 - MÉDIAS DOS DADOS DE 8 EXPERIMENTOS QUANTITATIVOS DE CULTURA DE CÉLULAS NIH 3T3 E SEUS RESPECTIVOS DESVIOS PADRÕES RELATIVOS (DPR)	90

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1	- NÚCLEOS FUNDAMENTAIS DE ALGUNS GRUPOS QUÍMICOS ENCONTRADOS EM PRÓPOLIS, E SUBSTÂNCIAS DAS QUAIS DERIVAM COMPONENTES COMUMENTE ENCONTRADOS NESTE PRODUTO.....	23
FIGURA 3.1	- SEQUÊNCIA DE EXPERIMENTOS REALIZADOS COM A AMOSTRA DE PRÓPOLIS 1.....	47
FIGURA 3.2	- SEQUÊNCIA DE EXPERIMENTOS REALIZADOS A PARTIR DA AMOSTRA DE PRÓPOLIS 2 (a) E DA AMOSTRA VEGETAL (b)..	47
FIGURA 3.3	- FIBROBLASTOS DE CAMUNDONGO (CÉLULAS NIH 3T3) UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS.....	66
FIGURA 3.4	- ESTRUTURAS DO MTS E DA FORMAZANA.....	69
FIGURA 4.1	- CURVAS DE RINGBOM E DE CALIBRAÇÃO, COM SEUS RESPECTIVOS COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO, PARA QUERCETINA DIIDRATADA E ÁCIDO GÁLICO.....	75
FIGURA 4.2	- CROMATOGRAMAS DO RESÍDUO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS, OBTIDO POR MECERAÇÃO, A 280 E 340 NM	77
FIGURA 4.3	- CROMATOGRAMAS DO RESÍDUO METANÓLICO DE PRÓPOLIS 1, OBTIDO POR EXTRATOR SOXHLET, A 280 E 340 NM	78
FIGURA 4.4	- ESTRUTURAS DAS SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS POR CLAE80	
FIGURA 4.5	- CROMATOGRAMAS CLAE A 280 NM, OBTIDOS A PARTIR DO EXTRATO DA AMOSTRA VEGETAL E DO EXTRATO METANÓLICO PREPARADO COM AMOSTRA DE PRÓPOLIS 2.	81
FIGURA 4.6	- CROMATOGRAMAS CLAE A 340 NM, OBTIDOS A PARTIR DO EXTRATO DA AMOSTRA VEGETAL E DO EXTRATO METANÓLICO PREPARADO COM A AMOSTRA DE PRÓPOLIS 2	82
FIGURA 4.7	- CROMATOGRAMAS CLAE A 280 NM, OBTIDOS A PARTIR DO EXTRATO DA AMOSTRA VEGETAL E DO EXTRATO METANÓLICO PREPARADO COM A AMOSTRA A DE PRÓPOLIS 1	83
FIGURA 4.8	- CROMATOGRAMAS CLAE A 340 NM, OBTIDOS A PARTIR DO EXTRATO DA AMOSTRA VEGETAL E DO EXTRATO METANÓLICO PREPARADO COM A AMOSTRA DE PRÓPOLIS 1	84
FIGURA 4.9	- FOTOS DO INDIVÍDUO QUE FOI IDENTIFICADO COMO <i>Baccharis dracunculifolia</i> DC. (vassourinha).....	85

FIGURA 4.10 - CÉLULAS NIH 3T3 P18 (I) E P17 (II), CORADAS COM RODAMINA 2% EM FORMOL 4%, APÓS INCUBAÇÃO COM SOLUÇÕES TESTE (I-O) OU COM SUAS RESPECTIVAS SOLUÇÕES CONTROLE (Ic-Oc) E CONTROLE NEGATIVO (CONT-).....	87
FIGURA 4.11 - CÉLULAS NIH 3T3 P16 (III) E P15 (IV), CORADAS COM RODAMINA 2% EM FORMOL 4%, APÓS INCUBAÇÃO COM SOLUÇÕES TESTE (I - O) OU COM SUAS RESPECTIVAS SOLUÇÕES CONTROLE (Ic – Oc) E CONTROLE NEGATIVO (CONT-).....	88
FIGURAS 4.12 - VIABILIDADE DAS CÉLULAS SUBMERSAS EM SOLUÇÕES TESTE (T) E CONTROLE (C), EM RELAÇÃO A SEUS RESPECTIVOS CONTROLES NEGATIVOS (C-).....	91
FIGURA 4.13 - CARTAS DE CONTROLE PARA SOLUÇÕES TESTE, EM RELAÇÃO A SEUS RESPECTIVOS CONTROLES, COM INTERVALOS DE CONFIANÇA DE 99%.....	92

LISTA DE ABREVIATURAS E LISTA DE SIGLAS

CAPE - Cafeato de Fenetila
CCD - Cromatografia em Camada Delgada
CCDA - Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência
CG - Cromatografia Gasosa
CIM - Concentração Inibitória Mínima
CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DMSO - Dimetilsulfóxido
DP - Desvio Padrão
DPPH - 1,1 - Diprenil - 2- Picrilidrazil
DPR - Desvio Padrão Relativo ou Erro
EAP - Extrato Aquoso de Própolis
EEP - Extrato Etanólico de Própolis
EM - Espectrometria de Massas
ETOH - Etanol
EUA - Estados Unidos da América
FCF - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
HPLC - High Performance Liquid Chromatography
IPEN - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
IV - Infra-Vermelho
MEOH - Metanol
MTS - (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2*H*-tetrazólio)
PEG 400 - Polietilenoglicol 400
PMS - Metilsulfato de Fenazina
RMN - Ressonância Magnética Nuclear
USP - Universidade de São Paulo
UV - Ultra-Violeta
VEGF - Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

RESUMO

Atualmente, há uma considerável quantidade de informações relativas a aspectos químicos e biológicos da própolis, porém sua aplicação terapêutica ainda pode ser considerada incipiente. Isto se deve, principalmente, à grande variabilidade da composição química deste produto em função de sua origem geográfica/botânica, já que em diferentes ecossistemas as abelhas recorrem a distintas espécies vegetais como fontes de matérias-primas para sua elaboração. Desta forma, para se chegar a uma futura padronização, os conhecimentos da(s) fonte(s) botânica(s) e da origem geográfica da amostra são fundamentais e devem acompanhar qualquer estudo biológico, no sentido de se estabelecer quais atividades biológicas correspondem a um tipo específico de própolis. O presente trabalho objetiva contribuir para os conhecimentos da composição de própolis do estado de São Paulo (coletado na Serra do Japi) e de sua fonte botânica, bem como para a discussão dos possíveis mecanismos envolvidos em processos de cicatrização, influenciados pela aplicação tópica de própolis (um de seus usos mais difundidos mundialmente é como "cicatrizante"). Para tanto, traz análises físico-químicas, preconizadas pelo Ministério da Agricultura (teores de cinzas, cera, sólidos solúveis, flavonóides e fenóis totais, perda por dessecação a 105 °C e massa mecânica), estudos de composição química pela técnica CLAE, análises cromatográficas comparativas entre o extrato metanólico de própolis e de sua suposta fonte botânica, quantifica a complexação de substâncias fenólicas da própolis ao pó de pele e traz estudos, *in vitro*, da influência deste produto sobre proliferação de fibroblastos de camundongos (células NIH 3T3). Excetuando-se a perda por dessecação a 105 °C, todos os demais parâmetros estiveram dentro dos limites estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, para a fixação de identidade e qualidade da própolis. Identifica os flavonóides canferol, canferida e isossacuranetina e os ácidos *para*-cumárico, ferúlico, clorogênico, cafeico, *trans*-cinâmico e Artepillin C, na própolis, e comprova ser a *Baccharis dracunculifolia* DC. (vassourinha) a sua fonte botânica. Mostra que a própolis foi tóxica aos fibroblastos nas concentrações de 125,00; 62,50 e 31,25 µg/mL e levemente proliferativa entre as concentrações 7,812 e 0,732 µg/mL, mas sem diferenças estatisticamente significativas em relação a seus controles. Indica que 68,12% das substâncias fenólicas presentes no extrato etanólico de própolis complexaram com pó de pele. Conclui, dentre outras coisas, que a própolis estudada apresenta grande variedade de substâncias fenólicas, adsorve fortemente à pele humana, não possui efeito proliferativo estatisticamente significativo sobre os fibroblastos de camundongo (células NIH 3T3) e, provavelmente, atua auxiliando o processo de cicatrização indiretamente, facilitando o estabelecimento das condições ideais para que a cicatrização ocorra.

ABSTRACT

Nowadays a great amount of information relating chemical and biological aspects of propolis is available in the literature, but only a few data on its therapeutic uses are found. The major reason of this fact is due to the enormous variability of chemical composition of propolis regarding the geographic/botanic source of the material, because bees prepare propolis using different vegetable species as raw materials from different ecosystems in the environment. In order to increase the therapeutic use of propolis, it is important to establish which biological activity corresponds to a specific type of propolis (regarding its origin and chemical composition). Therefore, the botanical and geographic origin of propolis knowledge should follow any biological investigations with this material. This paper offers a contribution to the chemical composition knowledge of propolis from São Paulo state (Serra do Japi – Brazil) and its botanical vegetable source, as well as the discussion of possible mechanisms involved in wound healing process related to this material. For this reason, presents commended Ministry of Agricultural analysis (loss on drying at 105 °C, determinations of extractable and non-extractable matter and determinations of ash, wax, flavonoids and total phenolic contents), chemical composition studies by HPLC, comparative chromatographic analysis between propolis and its expected vegetal source, adsorption determination of phenolic substances in skin powder and fibroblast proliferation assay (NIH 3T3 cells). Excepting the drying loss test at 105 °C, all the parameters have been according the limits established by the Ministry of Agricultural to guarantee the identity and quality of propolis. Identification of kaempferol, kaempferide, isosakuranetin, Artepillin C, *p*-coumaric acid, ferulic acid, chlorogenic acid, caffeic acid and *t*-cinnamic acid in propolis was possible. The specie *Baccharis dracunculifolia* DC was identified as the vegetable source of the propolis. About 68% of phenolic substances present in the original extract adsorbed to the skin powder. Propolis was toxic to the fibroblasts at 125,0, 62,5, and 31,25 µg/mL and slightly proliferative between concentrations of 7,812 and 0,732 µg/mL but with no significant statistic differences relating the controls. It is conclusive that the propolis under study presents a great variety of phenolic substances, adheres strongly to the human skin, presents no proliferative effect to the mouse fibroblasts (NIH 3T3 cells) and probably helps to establish good conditions to the wound healing process.

DADOS BIOGRÁFICOS DO AUTOR

O autor graduou-se em Engenharia Química em 1999, pela Universidade Estadual de Campinas. Durante a graduação, fez iniciação científica por dois anos consecutivos e estagiou na empresa Zeneca do Brasil. No primeiro semestre de 2000, lecionou física para o 2º grau, tendo se expatriado para a Espanha no segundo semestre do mesmo ano, onde coordenou projeto da empresa Labiana Life Sciences S.A., pertencente ao grupo BASF, para o lançamento de uma linha de produtos fitoterápicos. De volta ao Brasil, trabalhou como consultor de empresas do segmento farmacêutico, desenvolvendo trabalhos para o Grupo Centroflora, dentre outros. Ingressou no mestrado em julho de 2002. É apicultor amador e mantém um pequeno apiário no município de Cabreúva (SP).

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVO

1.1 INTRODUÇÃO

Própolis é uma denominação genérica utilizada para descrever uma mistura complexa de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas, colhidas por abelhas melíferas de brotos, flores e exsudatos de plantas, à qual as abelhas acrescentam secreções salivares, cera e pólen para a elaboração do produto final (BRASIL, 2001).

O termo “própolis” deriva do grego *pró*, em defesa de, e *polis*, cidade, o que quer dizer “em defesa da cidade ou da colônia” (GHISALBERTI, 1979). De fato, as abelhas utilizam-se da própolis para modelar a entrada da colméia de forma a protegê-la do vento ou da entrada de invasores. Também aplicam-na em finas camadas nas paredes internas da colméia ou em cavidades inabitadas, no reparo de quebraduras, para tapar buracos e reforçar favos de mel (GHISALBERTI, 1979). É utilizada, ainda, para embalsamar invasores que após serem atacados e mortos pelas abelhas não podem ser removidos para fora da colméia. Segundo revisões elaboradas por MARCUCCI (1996) e BURDOCK (1997), costuma-se encontrar na colméia pequenos animais, ou parte deles, envoltos em própolis e em perfeito estado de conservação. Portanto, estes usos diversificados sugerem que as abelhas preparam a própolis tanto para se beneficiarem de suas propriedades mecânicas como de sua ação antibiótica.

Ao longo do tempo, o Homem vem aprendendo a se beneficiar de diferentes atividades biológicas da própolis. Seu emprego já era descrito por assírios, no tratamento de infecções e intumescências (MATSUNO, 1997). Os egípcios, por volta de 1700 A.C., utilizavam a própolis (então chamada “cera negra”), juntamente com outros materiais, na mumificação de cadáveres (PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2002; CASTALDO; CAPASSO, 2002). Posteriormente, teve suas propriedades medicinais reconhecidas pelos cientistas gregos Aristóteles (em seu livro “Catálogo animal” – recomendada no tratamento de abscessos e feridas),

Dióclides (no manuscrito “Catálogo de medicamentos” – para “eliminar agentes estranhos” e para “acalmar a tosse”) e Hipócrates (que a indicava como cicatrizante para uso interno e externo). Mais tarde, algumas de suas propriedades foram descritas pelos romanos Plínio e Galeno (MATSUNO, 1997; CASTALDO; CAPASSO, 2002; PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2002). Também há indícios de seu uso fora do antigo mundo, tendo sido empregada pelos incas como um agente antipirético e listada nas farmacopéias londrinas do século XVII como uma droga (CASTALDO; CAPASSO, 2002). Durante a Guerra Anglo-Boer, ocorrida na África do Sul, no século XIX, foi utilizada em pomadas elaboradas com vaselina e empregadas na cicatrização de feridas pós-operatórias (MATSUNO, 1997). Na ex-União Soviética, durante a segunda Guerra Mundial, uma pomada à base de própolis foi experimentada em duas clínicas cirúrgicas no tratamento de feridas, tendo apresentado bons resultados (IORICH, 1981).

A partir da década de 1980, verifica-se um renovado interesse pela própolis, que vem ganhando popularidade e sendo largamente utilizada em nutracêuticos e bebidas, como preventivo de enfermidades, tais como diabetes, câncer, doenças cardiovasculares e inflamações (BANSKOTA; TEZUCA; KADOTA, 2001). Também é utilizada em aplicações tópicas, como cicatrizante de ferimentos e regeneradora de tecidos (MAGRO FILHO, 1988; MAGRO FILHO, 1991; ARVOUET-GRAND et al., 1993; DIAZ et al., 1997; GREGORY et al., 2002). Impulsionados por esta nova demanda, inúmeros estudos científicos vêm sendo desenvolvidos e, segundo PEREIRA, SEIXAS e AQUINO NETO (2002), o número de trabalhos publicados sobre própolis e citados no *Chemical Abstracts*, até 1999, totalizava 450, oriundos de 39 países, além de terem resultado em 239 patentes, sendo que o grande incremento deu-se nas décadas de 1980 e 1990. Deve-se destacar o interesse por própolis brasileiras, já que em 1998, segundo MARCUCCI e BANKOVA (1999), publicações de estudos desenvolvidos em diversos países, a partir de amostras brasileiras, corresponderam a 50% do número total de publicações sobre própolis. Isto também se reflete no comércio, já que a própolis oriunda da região sudeste do Brasil, rica em derivados prenilados do ácido *p*-cumárico (KUMAZAWA et al., 2003), como o Artepillin C, por exemplo, é a mais bem cotada no mercado internacional,

sendo exportada principalmente para o Japão, com valores que variam entre 80 e 100 dólares¹ por quilograma do produto *in natura*².

Dentre suas atividades biológicas já estudadas cientificamente, com resultados positivos (para a própolis ou para substâncias dela isoladas), destacam-se: toxicidade contra células cancerígenas, antioxidante, antiinflamatória, hepatoprotetora, imunoestimulante e antibiótica (BORELLI et al., 2002a; BANSKOTA et al., 2000; BORELLI et al., 2002b; EL-KHATTIB et al., 2002; IVANOVSKA et al., 1995; SFORCIN et al., 2000), esta última mostrando-se uma atividade comum a amostras de própolis oriundas de diferentes países. Talvez isto se deva ao fato de que as abelhas preparam a própolis, segundo GHISALBERTI (1979), com a função primeira de agir contra bactérias invasoras, fungos e larvas, tomando o ambiente da colméia asséptico.

Outros grupos de pesquisadores dedicaram-se mais especificamente aos estudos químicos da própolis. Se contabilizadas as substâncias encontradas em amostras de diferentes países, já foram identificadas mais de duzentas, incluindo ácidos fenólicos, flavonóides, ésteres, diterpenos, sesquiterpenos, lignanas, aldeídos aromáticos, álcoois, aminoácidos, ácidos graxos, vitaminas e minerais (WALKER; KRANE, 1987; GREENAWAY et al., 1991; BONVEHÍ; COLL, 1994; MARCUCCI, 1995; MARKHAN et al., 1996; MARCUCCI; CAMARGO; LOPES, 1996; GONZÁLEZ; ORZAEZ, 1997; MARCUCCI; FERRERES; CUSTÓDIO, 2000; TAZAWA et al., 1998; KARTAL; KAYA; KURUCU, 2002; EL HADY; HEGAZI, 2002; BANKOVA et al., 2002; PEREIRA et al., 2003). Dentre estas classes de substâncias, destacam-se a dos fenólicos (flavonóides e ácidos fenólicos), pois é atribuída a ela grande parte das atividades biológicas constatadas na própolis. Em geral, própolis de zonas temperadas, como Europa, Estados Unidos e regiões da Ásia têm se mostrado mais ricas em flavonóides (20 a 30%), enquanto que amostras brasileiras (das regiões sul e sudeste) são mais ricas em ácidos fenólicos (MARCUCI; BANKOVA, 1999).

¹ Preços praticados pela cooperativa CONAP em 11.05.04 – entrega do produto no país de destino.

² O Brasil é atualmente o terceiro produtor mundial da própolis, ficando atrás de Rússia e China (PEREIRA, SEIXAS, AQUINO NETO, 2002).

Como consequência do panorama descrito acima, há uma considerável quantidade de informações disponíveis relativas a aspectos químicos e biológicos da própolis, porém sua aplicação terapêutica (por meio de prescrições médicas, medicamentos registrados, etc.) ainda pode ser considerada incipiente. Isto se deve, principalmente, à grande variabilidade de composição química em função da origem geográfica em que foi elaborada, já que em diferentes ecossistemas as abelhas recorrem a distintas espécies vegetais para extrair matérias-primas empregadas na preparação da própolis (WOLLENWEBER; BUCHMANN, 1997; MARCUCCI; BANKOVA, 1999; BANKOVA; CASTRO; MARCUCCI, 2000; MARCUCCI; FERRERES; CUSTÓDIO, 2000). Contudo, se consideradas as regiões de onde provêm as amostras esta variabilidade não é tão expressiva, uma vez que muitos estudos concluem serem as espécies de álamo (*Populus spp.*) e seus híbridos as principais fontes de própolis de regiões temperadas (GREENAWAY; SCAYSBROOK; WHATLEY, 1990; KÖNIG, 1985; BANKOVA; CASTRO; MARCUCCI, 2000). BANKOVA et al. (1999), PARK, SEVERINO e AGUIAR (2002), KUMAZAWA et al., (2003) e PARK et al. (2004) identificaram a espécie *Baccharis dracunculifolia* como sendo a fonte botânica principal de amostras de própolis da região sudeste do Brasil (especificamente São Paulo e Minas Gerais).

Assim, os conhecimentos da(s) fonte(s) botânica(s) e da procedência da amostra contribuiriam com a desejada padronização. O próprio termo “própolis” é demasiadamente genérico e poderia acompanhar um complemento de sua origem botânica ou geográfica, por exemplo “própolis de *Baccharis dracunculifolia*” ou “própolis do estado de São Paulo”, ou ainda, “própolis de *Populus spp*” ou “própolis européia”, sendo que das duas primeiras poderia se esperar uma composição rica em ácidos fenólicos, como o Artepillin C (como demonstrado neste trabalho), enquanto que as duas últimas sugeririam amostras ricas em flavonóides.

Neste sentido, cabe destacar os trabalhos desenvolvidos por Marcucci e colaboradores (FAPESP, 2003) e por Park e colaboradores (PARK; IKEGAKI; ALENCAR, 2000; PAREDES-GUSMÁN et al., 2003), visando a classificação de própolis brasileiras. Por meio da análise de mais de 2.000 amostras, oriundas das regiões brasileiras tradicionalmente produtoras de própolis (sul e sudeste), Marcucci criou e patenteou um modelo de classificação de própolis baseado em dois grupos e

um subgrupo, segundo marcadores químicos. Segundo Marcucci (FAPESP, 2003), do norte de Minas Gerais ao sul de São Paulo são encontradas própolis do grupo BRP (as iniciais significam Brasil e prenilados). Nos estados do Sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) são encontradas própolis do grupo BRG (o G refere-se a coniferaldeído, encontrado em espécies de coníferas, como araucária). Um subgrupo de própolis, denominado BRPG (com marcadores do BRP e BRG) é freqüente no Paraná e em Santa Catarina. Todos os grupos são mapeados e acompanhados de números, que funcionam como sinalizadores de concentração química (FAPESP, 2003). Park e colaboradores vêm sistematicamente analisando amostras de própolis oriundas de diferentes regiões brasileiras, classificando-as em grupos, segundo seus perfis químicos, prevalência na região e suas propriedades biológicas (PARK; IKEGAKI; ALENCAR, 2000; PAREDES-GUSMÁN et al., 2003). Recentemente, em sua dissertação de mestrado (sob orientação de Park), PACHECO (2001) conclui que no estado de São Paulo a diversidade da própolis é muito pequena, o que reforça a idéia de que a fonte botânica principal das amostras coletadas em diferentes pontos do estado é comum. Este tipo de padronização propiciaria se estabelecer quais atividades biológicas corresponderiam a um tipo específico de própolis.

Segundo CASTALDO e CAPASSO (2002), o uso humano da própolis como cicatrizante de ferimentos é, ainda hoje, um dos empregos mais populares ao redor do mundo. Alguns autores demonstraram haver aceleração no processo de cicatrização em animais (MAGRO FILHO, 1988; ARVOUET-GRAND et al., 1993) e humanos (MAGRO FILHO, 1991; GREGORY et al., 2002) tratados topicamente com extrato de própolis, porém sem que sua influência direta sobre células com grande atividade no processo de cicatrização, como os fibroblastos, fosse investigada.

1.2 OBJETIVO

Diante das constatações expostas acima, objetivou-se, no trabalho ora apresentado, contribuir para:

- O conhecimento da constituição química de própolis da região sudeste do Brasil e para o estabelecimento de rotinas que facilitem o controle de qualidade de própolis.
- O conhecimento da(s) fonte(s) botânica(s) de própolis da região sudeste do Brasil.
- O conhecimento dos mecanismos envolvidos em processos de cicatrização, influenciados pela aplicação tópica de própolis com origem botânica e composição química conhecidas.
- Estabelecer quais atividades biológicas correspondem a um tipo específico de própolis, com origens geográfica e botânica conhecidas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FONTES BOTÂNICAS DE PRÓPOLIS

Em diferentes ecossistemas as abelhas recorrem a distintas plantas como fontes de matérias-primas na elaboração da própolis (KÖNIG, 1985; WOLLENWEBER; BUCHMANN, 1997; MARCUCCI; BANKOVA, 1999; BANKOVA; CASTRO; MARCUCCI, 2000; MARCUCCI; FERRERES; CUSTÓDIO, 2000). A compreensão de que o conhecimento da(s) fonte(s) botânica(s) de determinada amostra de própolis é uma informação útil, já que pode dar indícios de sua composição química e de suas atividades biológicas, vem estimulando inúmeros pesquisadores a investigarem as fontes botânicas de própolis de diferentes regiões do planeta. Além da observação direta da atividade de abelhas coletando resinas e bálsamos de plantas, o que muitas vezes torna-se difícil por não ser esta uma atividade rotineira na vida das colônias ou quando estes produtos são coletados nas extremidades de árvores grandes (MARCUCI; BANKOVA, 1999), a comparação química entre planta e própolis tem se mostrado uma estratégia eficaz na detecção de fontes botânicas de própolis, como pode-se observar nos trabalhos apresentados à continuação .

GHISALBERTI et al. (1978) analisaram amostra de própolis coletada da região oeste da Austrália, isolando e identificando sete substâncias, sendo quatro delas típicas de espécies do gênero *Xanthorrhoea*, gramínea endêmica no país. Segundo BANKOVA, CASTRO e MARCUCCI (2000), estes dados serviriam somente como guia para novos estudos que contemplem a comparação química direta entre a própolis e partes das espécies pertencentes a este gênero, a fim de se determinar suas contribuições na elaboração da própolis da região oeste da Austrália.

GREENAWAY, SCAYBROOK e WHATLEY (1990) compararam quimicamente amostras de própolis de alguns países de zonas temperadas (Áustria, Alemanha, Israel, Reino Unido e Estados Unidos) e do Equador com exsudatos de brotos de algumas espécies do gênero *Populus*. Exceto na amostra de própolis oriunda do

Equador (cuja fonte botânica preferencial não foi identificada), em todas as demais foram identificadas somente substâncias típicas dos exsudatos de brotos de espécies do gênero *Populus*, pertencentes à seção *Aigeiros* (*Populus nigra*, *Populus deltóides* e espécies relacionadas a esta última, tais como *Populus fremontii*, *Populus sargentii* Dode e *Populus wilizeni* Sarg.), e de híbridos resultantes de cruzamentos destas espécies, juntamente com compostos de ceras e açúcares adicionados pelas abelhas na elaboração final da própolis.

WOLLENWEBER et al. (1987) compararam a composição de componentes fenólicos identificados em amostras de própolis oriundas do deserto do Sonora (EUA) com dados obtidos pelos mesmos autores, em trabalhos anteriores, para as espécies *Populus nigra*, *Populus trichordata* e um híbrido de *Populus grandidentata* x *tremuloides*. Embora espécies do gênero *Populus* sejam raras nesta área, somente um flavonóide aglicona encontrado nas amostras de própolis não foi encontrado nos exsudatos das espécies estudadas, com o qual os autores concluem serem as espécies deste gênero as fontes botânicas principais das amostras de própolis coletadas neste trabalho. Comentam ainda, que a presença do flavonóide 5,4'-diidroxí-6,7,8-trimetoxi flavona (xantomicrol) indica que as abelhas recorreram a uma fonte botânica secundária. Mais tarde, WOLLENWEBER e BUCHMANN (1997) compararam quimicamente as frações lipofílicas de amostras de própolis de diferentes localidades do deserto do Sonora (EUA) e de partes aéreas das espécies *Ambrósia deltoidea* e *Encelia farinosa*. Duas amostras coletadas exibiram flavonóides característicos de exsudatos de espécies *Populus*, embora não idênticos àqueles encontrados em *Populus fremontii*, presentes no raio de vôo das abelhas. As amostras coletadas em colônias distantes de quaisquer espécies *Populus* apresentaram baixo teor de flavonóides, sendo que as substâncias pertencentes a esta classe e presentes em maiores quantidades (5,4'-diidroxí-6,7,8-trimetoxiflavona e 5,7,4'-triidroxí-6,8-dimetoxiflavona) corresponderam às encontradas na espécie *Ambrosia deltoidea*. A presença de constituintes comuns a esta espécie em amostras de própolis foi confirmada posteriormente, comparando-se diretamente os perfis cromatográficos obtidos por Cromatografia de Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Gasosa (CG) de ambas, própolis e planta, que apresentaram picos correspondentes. Os resultados

encontrados permitiram concluir que a *Ambrosia deltoidea*, distribuída por todo o deserto do Sonara, é uma fonte de matérias-primas para a elaboração de própolis e que não havendo disponibilidade de espécies do gênero *Populus*, as abelhas recorrem a outras fontes botânicas para sua elaboração.

BANKOVA et al. (1992) pesquisaram as possíveis fontes botânicas de amostras de própolis coletadas na Bulgária e na Mongólia, confrontando as análises químicas (por Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas – CG/EM) dos extratos de própolis com os extratos de exsudatos de espécies pertencentes a diferentes gêneros, presentes nas regiões onde as amostras de própolis foram coletadas. Os resultados demonstraram claramente que, em ambos os países, as matérias-primas para a elaboração da própolis foram coletada de espécies do gênero *Populus* : *Populus nigra* e *Populus italica*, na Bulgária, e *Populus suaveolens*, na Mongólia.

TOMÁS-BÁRBERAN et al. (1993) analisaram 29 amostras de própolis coletadas na Venezuela tropical e em cinco países de clima temperado (Espanha, Bulgária, Canadá, Estados Unidos e Nova Zelândia), por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). A maioria das amostras venezuelanas mostrou perfil fenólico uniforme, caracterizado pela presença de benzofenonas polipreniladas, sendo estas substâncias os componentes principais do exsudato de flores de algumas espécies do gênero *Clusia*. Baseados em comparações diretas, os autores concluem ser *Clusia major* e *Clusia minor* (Guttiferae) as fontes botânicas principais das amostras de própolis na Venezuela tropical, enquanto que espécies do gênero *Populus* foram as fontes principais das amostras de zonas temperadas, tendo sido identificada a *Populus nigra* como fonte das amostras européias.

PARK et al. (2002) investigaram, por Cromatografia e em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCDAE), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Cromatografia Gasosa (CG), 150 amostras de própolis coletadas no sul do Brasil, Argentina e Uruguai e exsudato de álamo (*Populus alba*) coletado em reflorestamento na cidade de Santa Cruz do Timbó (onde esta espécie foi introduzida). As amostras brasileiras apresentaram perfis cromatográficos variados, tendo sido divididas em 5 grupos distintos. A amostra de própolis coletada na cidade de Santa Cruz do Timbó (SC) apresentou perfis cromatográficos muito similares aos

observados para as própolis argentinas (Buenos Aires e Tucumán) e uruguaia (Montevidéu) e também aos observados para o álamo. A partir destes resultados os autores concluem ser a *Populus alba* a fonte botânica comum a estas amostras.

CUESTA-RUBIO et al. (2002) observaram a visita de abelhas à espécie *Clusia rosea* e, posteriormente, comprovaram quimicamente serem os exsudatos das folhas e dos frutos verdes da *Clusia rosea* as matérias-primas preferenciais na elaboração de própolis cubanas. Os autores ponderam, ainda, que esta espécie não pode ser considerada essencial a esta atividade, já que em algumas amostras de própolis cubanas não foram verificadas substâncias típicas desta espécie, como as benzofenonas poliisopreniladas.

BANKOVA et al. (1999) compararam, por CCD e CG-EM, extrato de própolis coletada no estado de São Paulo (Brasil) com extratos de folhas de *Baccharis dracunculifolia* DC, de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kunt e de tronco de *Eucalyptus citriodora* Hook, sendo que própolis e plantas foram coletadas em mesmo local e em mesma época do ano. Os cromatogramas para os extratos de própolis e *Baccharis dracunculifolia* DC. apresentaram grandes similaridades. Posteriormente, os componentes das folhas *Baccharis dracunculifolia* DC. foram isolados e identificados, sendo detectados como os mesmos encontrados na amostra de própolis. Segundo os autores, a ocorrência de substâncias na própolis que se mostraram ausentes nas folhas de *Baccharis dracunculifolia* sugere que pode ter havido uma fonte botânica secundária, que não as outras duas espécies estudadas.

PARK, ALENCAR e AGUIAR (2002) compararam, por CCDAE, CLAE e CG-EM, amostras de própolis com botões ou brotos apicais de espécies vegetais visitadas por abelhas *Apis mellifera*, em diferentes regiões do Brasil, identificando as espécies *Hyptis divaricata*, *Populus spp.* e *Baccharis dracunculifolia* DC. como fontes principais de própolis coletadas em Salvador (BA), Santa Cruz (SC) e estados de São Paulo e Minas Gerais, respectivamente.

SANTOS et al. (2003) analisaram microscopicamente amostra de própolis coletada no estado de Minas Gerais (região de cerrado), tendo encontrado pêlos secretores

comuns em folhas da espécie *Baccharis dracunculifolia* DC., com o qual concluem ser esta espécie uma fonte de matérias-primas na elaboração da própolis da região.

KUMAZAWA et al. (2003) compararam quimicamente extratos de folhas em expansão de *Baccharis dracunculifolia* DC. e de própolis, coletados no estado de Minas Gerais. Os autores identificaram 18 substâncias comuns a ambos os extratos, verificando que não houve diferenças entre os cromatogramas obtidos por CLAE. Diante dos resultados, concluíram ser a *Baccharis dracunculifolia* a fonte botânica da amostra de própolis estudada.

PARK et al. (2004) compararam qualitativa e quantitativamente, por CLAE, amostras de própolis coletadas nos estados de São Paulo e Minas Gerais com brotos, folhas em expansão e folhas expandidas de *Baccharis dracunculifolia* DC., macho e fêmea. Os resultados permitiram aos autores constatarem que os perfis da *Baccharis dracunculifolia* DC., macho e fêmea, e das diferentes amostras de própolis não variaram qualitativamente. Por meio das análises quantitativas, constataram que os teores das substâncias fenólicas encontradas nos brotos são praticamente os mesmos encontrados em amostra de própolis, decrescendo para folhas em expansão e folhas expandidas, progressivamente. Os autores concluem ser a *Baccharis dracunculifolia* DC. a fonte botânica na elaboração de própolis, sempre que esta espécie estiver disponível no raio de vôo das abelhas, pois em amostras coletadas em áreas sem ocorrência desta espécie apresentaram perfis cromatográficos diferentes das demais, sugerindo que as abelhas recorreram a outra(s) fonte(s) botânica(s), não identificada(s).

Os trabalhos compilados nesta revisão corroboram com as revisões apresentadas por KÖNIG (1985) e BANKOVA, CASTRO e MARCUCCI (2000), que apontam que as espécies do gênero *Populus* são as principais fontes de própolis em zonas temperadas ou em regiões onde foram introduzidas. Em zonas tropicais, onde estas espécies estão praticamente ausentes, as abelhas recorrem a outras fontes botânicas para a elaboração da própolis, como pode ser observado na tabela 2.1. Na região sudeste do Brasil, as evidências científicas apontam que a *Baccharis dracunculifolia* é a fonte principal de própolis, sempre que esteja disponível. Não havendo a ocorrência desta espécie no raio de vôo de abelhas, estas recorrem a

outras fontes botânicas para elaboração da própolis (BANKOVA et al., 1999; PARK et al., 2004)

TABELA 2.1 - FONTES BOTÂNICAS DE PRÓPOLIS EM ALGUMAS REGIÕES GEOGRÁFICAS

GÊNERO OU ESPÉCIE	ORIGEM GEOGRÁFICA	REFERÊNCIA
<i>Xanthorrhoea</i> spp.	Austrália	GHISALBERTI et al., 1978
<i>Populus</i> spp. (seção <i>Aigerus</i>)	Áustria, Alemanha, Estados Unidos, Israel e Reino Unido	GREENAWAY; SCAYBROOK; WHATLEY (1990)
<i>Populus nigra</i> e <i>Populus italica</i>	Bulgária	BANKOVA et al., 1992
<i>Populus suaveolens</i>	Mongólia	BANKOVA et al., 1992
<i>Clusia major</i> e <i>Clusia minor</i>	Venezuela tropical	TOMÁS-BARBERAN et al., 1993
<i>Ambrosia deltoidea</i>	Deserto do Sonara - EUA	WOLLENWEBER; BUCHAMAN, 1997.
<i>Clusia rosea</i>	Cuba	CUESTA-RUBIO et al., 2002.
<i>Populus alba</i>	Argentina, Uruguai e Brasil (SC)	PARK et al., 2002
<i>Baccharis dracunculifolia</i>	Brasil (MG e SP)	BANKOVA et al., 1999; SANTOS et al., 2003; PARK et al., 2004; KUMAZAWA et al., 2003.
<i>Hyptis divaricata</i>	Brasil (BA)	PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002
<i>Betula verrucosa</i>	Rússia central	BANKOVA; CASTRO; MARCUCCI (2000)

2.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA PRÓPOLIS

A própolis é o produto de uma mistura complexa de resinas e bálsamos vegetais, cera, óleos essenciais e aromáticos, pólen e outros materiais orgânicos, sendo que a proporção entre estes tipos de materiais, bem como as substâncias químicas contidas neles, pode variar em função da origem geográfica da amostra e da época de sua coleta (VANHAELLEN; VANHAELLEN-FASTRÉ, 1979a; GONZÁLEZ; ORZAES, 1997; MARCUCCI, 1995; BURDOCK, 1998). A Figura 2.1 traz alguns núcleos fundamentais de grupos químicos encontrados em própolis, bem como algumas substâncias das quais derivam componentes comumente encontrados neste produto.

2.2.1 Composição Química de Própolis em Zonas Temperadas

Segundo GHISALBERTI (1979), embora outros autores já tivessem identificado alguns componentes da própolis anteriormente, foi no ano de 1969 que Popravko e colaboradores aplicaram técnicas modernas de separação e identificação de substâncias, em estudos sobre própolis européias. Desde então, diversos pesquisadores vêm aplicando técnicas cromatográficas (principalmente Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE e Cromatografia Gasosa - CG) e espectrométricas (Ressonância Magnética Nuclear - RMN e Espectrometria de Massas - EM) em análises de própolis de diferentes regiões da Europa, tendo sido possível a identificação de aproximadamente 200 substâncias diferentes, entre elas flavonóides, cumarinas, ácidos aromáticos, aldeídos, ésteres, álcoois, cetonas, lignanas, terpenos, hidrocarbonetos, carboidratos, aminoácidos, ácidos graxos, vitaminas e minerais (VANHAELLEN; VANHAELLEN-FASTRÉ, 1979b; BANKOVA; POPOV; MAREKOV, 1982; GRENAWAY; SCAYSBROOCK; WHATLEY, 1990; GREENAWAY et al., 1991; BANKOVA et al., 1992; ARVOUET-GRAND et al., 1994; VENNAT et al., 1995; VELIKOVA et al., 2000; BANKOVA et al., 2002; KARTAL; KAYA; KURUCU, 2002; PIETTA; GARDANA; PIETTA, 2002; KOSALEC; BAKMAZ;

PEPELJNJAK, 2003). Outros trabalhos reportam a identificação de substâncias em própolis de outras regiões de clima temperado, como EUA (WOLLENWEBER et al., 1987; GRENAWAY; SCAYSBROOCK; WHATLEY, 1990), Canadá (TOMÁS-BARBERÁN et al., 1993), Israel (GRENAWAY; SCAYSBROOCK; WHATLEY, 1990), China (BONVEHÍ; COLL, 1994), Mongólia (BANKOVA et al., 1992), Nova Zelândia (MARKHAN et al., 1996), Uruguai (BONVEHÍ; COLL, 1994; PARK et al., 2002) e Argentina (PARK et al., 2002). Em geral, amostras originárias de regiões de clima temperado são caracterizadas por composições químicas similares, apresentando elevados teores de substâncias fenólicas: flavonóides agliconas, principalmente, ácidos aromáticos e seus ésteres (BANKOVA; CASTRO e MARCUCCI, 2000), encontradas em exsudatos de algumas espécies do gênero *Populus* (consulte subseção 2.1).

2.2.2 Composição Química de Própolis em Zonas Tropicais

Estudos químicos com própolis de zonas tropicais, especialmente originárias do Brasil (que serão tratadas à parte, nesta seção), vêm possibilitando a identificação de novas substâncias farmacologicamente ativas, diferentes daquelas encontradas em própolis de zonas temperadas. Isto explica-se pelo fato de que em áreas tropicais, não havendo a disponibilidade de espécies do gênero *Populus*, as abelhas recorrem a outras fontes botânicas para a elaboração da própolis (BANKOVA; CHRISTOV; TEJERA, 1998).

GHISALBERTI et al. (1978) isolaram e identificaram sete substâncias de própolis proveniente da região oeste da Austrália, sendo quatro delas pertencentes à classe dos flavonóides (pinostrobina, sacuranetina, isossacuranetina e (-)-5-hidróxi-4',7-dimetóxi-flavanona), e as substâncias pterostilbeno, xantorroel e álcool 3,5-dimetoxibenzílico.

TOMÁS-BARBERÁN et al. (1993) investigaram a ocorrência de substâncias fenólicas em amostras de própolis de diferentes localidades da Venezuela tropical. Excetuando-se aquelas provenientes de Mérida e Aragua, as amostras das outras

localidades foram caracterizadas pela presença de nove substâncias fenólicas (benzofenonas), cujas estruturas não foram totalmente elucidadas. Os autores constataram traços dos flavonóides hispidulina, eupatorina, 5-hidroxi-6,7,3',4'-tetrametoxiflavona e 5-hidroxi-7,3',4'-tetrametoxiflavona. Para efeito comparativo, os autores analisaram amostras de própolis de países de clima temperado (Espanha, Bulgária, Canadá, Estados Unidos e Nova Zelândia), tendo constatado que nenhum dos flavonóides detectados em amostras venezuelanas se encontrava nestas amostras.

WOLLENWEBER e BUCHMANN (1997) analisaram própolis do deserto do Sonora (EUA), tendo isolado flavonóides agliconas característicos do exsudato de *Ambrosia deltoidea* (espécie onipresente na região), entre eles as flavonas 5,7,4'-triidroxi-6,8-dimetoxiflavona e 5,3',4'-triidroxi-6,7,8-trimetoxiflavona (sideritiflavona), identificadas pela primeira vez em própolis.

BANKOVA, CHRISTOV e TEJERA (1998) estudaram quimicamente duas amostras de própolis das Ilhas Canárias. Ambas as amostras apresentaram perfis cromatográficos (por CG/EM) qualitativamente muito similares entre si, contendo majoritariamente carboidratos e substâncias fenólicas atípicas a amostras oriundas de zonas temperadas. Treze lignanas do tipo furofuranas foram detectadas, sendo possível somente a elucidação estrutural de duas delas: episesamina e metil xantoxilol. Segundo os autores, até então lignanas furofuranas não haviam sido isoladas de fontes naturais e poderiam ser úteis na caracterização de própolis das Ilhas Canárias.

CUESTA-RUBIO et al. (2002) isolaram de própolis cubanas as benzofenonas poliisopreniladas nemorosona, xantocimol e gutiferona E. Os autores concluem ser a nemorosona o componente principal na maioria das amostras estudadas.

EL HADY e HEGAZI (2002) analisaram amostras de própolis oriundas de diferentes províncias do delta leste do Rio Nilo, no Egito. A amostra da província de Dakahlia apresentou composição química típica de própolis de zonas temperadas, além de dois novos ésteres (cafeato de tetradecenila e cafeato de tetradecanila) e dois novos triterpenóides (lupeol e α -amirina). A própolis da província de Ismailia apresentou composição química totalmente diferente da anterior, tendo sido isolado desta, pela

primeira vez em amostra de própolis, três ácidos alifáticos (ácido 2-deoxi-3,5-diidroxi- γ -lactona, seu isômero e ácido 2,3,4,5-tetraidroxipentanoico), cinco novos triterpenóides (sendo 4 do tipo ácido 3-oxo-triterpenico metil ester e um do tipo β -amirina), quatro novos açúcares (galactitol, ácido glucônico, ácido galacturônico e 2-O-glicerilgalactose), além dos componentes 1,2,3-triidroxi-butanal (isômero), 1-metóxi-1,3-diidroxiopropano e um dímero da diidroxiacetona.

2.2.3 Composição de Própolis Brasileiras

Serão resumidos, a seguir, alguns trabalhos que resultaram na identificação de substâncias em amostras de própolis brasileiras, sendo que toda substância encontrada em cada trabalho, sempre que possível, será indicada na Tabela 2.2.

AGA et al. (1994)^A isolaram e identificaram, combinando as técnicas CLAE, UV, IV e RMN, três novas substâncias de amostra de própolis do estado de São Paulo: ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico, Ácido 3-prenil-4-(diidrocinamoiloxi) cinâmico e 2,2-Dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano (Tabela 2.2).

BONVEHÍ e COLL. (1994)^B isolaram e identificaram, por CLAE, 17 substâncias em amostra de própolis brasileira, sendo 13 flavonóides, os ácidos ferúlico e *p*-cumárico e o 4-hidroxibezoato de etila (Tabela 2.2).

BANKOVA et al. (1995)^C analisaram duas amostras de própolis do estado de São Paulo, uma do estado do Paraná e uma do estado do Ceará, tendo identificado, por CG/EM, 32 compostos voláteis (10 deles pela primeira vez em própolis) e 12 compostos mais polares (1 novo), sendo que a maioria dos picos não foi identificada e mostraram-se incomuns a amostras de própolis de zonas temperadas. As substâncias identificadas (indicadas na Tabela 2.2) permitiram aos autores concluir que, comparativamente a amostras européias, as própolis estudadas apresentaram elevados teores de hidroquinonas e de ácidos diidrocinâmicos e baixa ocorrência e teores de flavonóides.

BASNET et al. (1996)^D isolaram de extrato aquoso de própolis brasileira dois derivados do ácido dicafeoilquínico, sendo eles o 3,4-di-O-cafeoilquínico e o metil 3,4-di-O-cafeoilquinato (Tabela 2.2).

TAREFUJI et al. (1996)^E isolaram e identificaram 6 derivados do ácido cafeoilquínico de extrato aquoso de própolis brasileira. Foram eles: ácido 5-cafeoilquínico, ácido 4-cafeoilquínico, ácido 3-cafeoilquínico, ácido 4,5-dicafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico e ácido 3,4-dicafeoilquínico (indicados na Tabela 2.2).

MARCUCCI, CAMARGO e LOPES (1996)^F investigaram a ocorrência de aminoácidos em própolis de diferentes regiões do Brasil (São Paulo, Ceará e Paraná), quantificando-os. Foram identificados 18 aminoácidos (indicados na Tabela 2.2), sendo que sete deles estiveram presentes nas mesmas porcentagens em todas as amostras. Os autores levaram a cabo, ainda, análises de variância de cada aminoácido presente nas amostras de própolis, em pólen e em fragmentos de suas possíveis fontes botânicas o que, segundo os autores, indicou que os aminoácidos presentes na própolis provêm de três fontes: óleos e resinas extraídas de partes de plantas, pólen e do próprio metabolismo das abelhas.

BOUDOUROVA-KRASTEVA et al. (1997)^G isolaram e identificaram, por UV e RMN, 6 compostos de amostra de própolis do estado de São Paulo, sendo três flavonóides (canferida, 5,6,7-triidóxi-3,4-dimetóxi-flavona e aromadendrina-4'-metil éter), um derivado prenilado do ácido cumárico e dois novos benzopiranos (9-E e 9-Z-22, dimetil-6-carboxietenil-2H-benzopirano) (Tabela 2.2).

MARCUCCI et al. (1998)^H analisaram duas amostras de própolis do estado de São Paulo, por CG/MS, tendo isolado 39 substâncias (8 encontradas pela primeira vez em amostra de própolis), entre ácidos aromáticos, terpenos, flavonóides e outros componentes (indicados na Tabela 2.2).

TAZAWA et al. (1998)^I separaram e identificaram, por CLAE/RMN, 24 componentes de amostra do estado de Minas Gerais, sendo 5 flavonóides, 6 ácidos cafeoilquínicos, 10 derivados do ácido cinâmico e três outros compostos fenólicos. As substâncias identificadas pela primeira vez em própolis, segundo os autores, foram: Ácido(E)-3-(2,2-dimetil-3,4-diidróxi-3-hidróxi-8-prenil-2H-1-benzopirano-6-il)-2-

propenóico, Ácido (*E*)-3-[2,3-diidroxi-2-(1-hidroxi-1-metiletil)-7-prenil-benzopirano-5-il]-2-propenóico, Ácido 3-prenil-4-(2-metilpropioniloxi) cinâmico, diidrocanferida e (+)-treo-1-C-guaiacilglicerol. As substâncias identificadas neste trabalho estão compreendidas na Tabela 2.2.

PARK et al. (1998)^J analisaram, pela técnica CLAE, amostras de própolis dos estados de Minas Gerais, São Paulo, Goiás, Mato Grosso do Sul, Paraná e Rio Grande do Sul. As comparações com padrões fitoquímicos indicaram a presença de flavonóides em todas as amostras, num total de 13 substâncias desta classe (Tabela 2.2).

BANSKOTA et al. (1998)^K isolaram e identificaram 23 substâncias em própolis brasileiras, entre elas um novo derivado do cromano (ácido 3-hidróxi-2,2-dimetil-8-prenilcromano-6-propenóico) e 11 compostos encontradas pela primeira vez em amostras de própolis (indicadas na Tabela 2.2).

NEGRI et al. (2000)^L estudaram a fração cera de amostras de própolis dos estados do Paraná e São Paulo, constatando variação entre 4,8 a 19,3% na porção cera sobre a massa bruta da própolis. Segundo os autores, a classe dos monoésteres predominou, seguida da classe dos hidrocarbonetos (indicados Tabela 2.2). Entre estes, os alcanos (principalmente o C₂₇, C₂₉ e C₃₁) prevaleceram sobre os alcenos e iso-alcanos.

KUSUMOTO et al. (2001)^M investigaram o óleo essencial extraído de amostra de própolis do estado de Minas Gerais, tendo identificado, por UV e RMN, dois novos componentes (2,2-dimetil-8-prenil-6-vinilcromeno e 2,6-diprenil-4-vinilfenol), além de outras substâncias já identificadas anteriormente em amostras de própolis.

PEREIRA, NASCIMENTO e AQUINO NETO (2002)^N analisaram, combinando as técnicas CG/MS, diversas frações de amostra de própolis do estado de Minas Gerais, tendo identificado 26 componentes polares, além de hidrocarbonetos, ésteres de ácidos graxos, triterpenos e seus derivados (Tabela 2.2). Segundo os autores, o Lupeol e seus alcanóatos foram identificados pela primeira vez em própolis.

PEREIRA et al. (2003)^O estudaram a distribuição de derivados do ácido quínico e de três outros ácidos fenólicos em amostras de própolis das regiões sul e sudeste do Brasil, tendo identificado pela primeira vez em própolis brasileiras os ácidos 4-feruolquínico e 5-feruolquínico, encontrados em 10 das 13 amostras estudadas. Dentre os derivados do ácido quínico, houve a predominância dos ácidos dicafeoilquínicos em 12 amostras. Os ácidos 5-cafeoilquínico, cafeico, cumárico e ferúlico estiveram presentes em todas as amostras coletadas.

NAFADY et al. (2003)^P isolaram e identificaram 5 substâncias fenólicas de própolis brasileira (indicadas na Tabela 2.2), entre elas o ácido 3-(3-hidroxi-3-metilbutil)-5-prenil-4-hidroxicinâmico que, segundo os autores, ainda não havia sido reportado.

KUMAZAWA et al. (2003)^Q investigaram própolis e alecrim-do-campo, coletados na cidade de Carvalhópolis (MG), tendo isolado e identificado em ambos os materiais 18 componentes, entre eles alguns derivados do ácido quínico e do ácido cinâmico, flavonóides, dentre outros, indicados na Tabela 2.2.

TABELA 2.2 - SUBSTÂNCIAS ENCONTRADAS EM AMOSTRAS DE PRÓPOLIS
BRASILEIRAS

continua

SUBSTÂNCIA	SUBSTÂNCIA
<p>Ácido Benzoico e Derivados</p> <p>Ácido benzoico^{C,H}</p> <p>Ácido diidrobenczoico^C</p> <p>Ácido 4-metóxi-benzoico^H</p> <p>Ácido 3,4-dimetoxibenzóico^N</p> <p>Ácido 4-hidóxi-benzoico^{C,H}</p> <p>Ácido 3-metóxi-4-hidroxibenzóico^H</p> <p>Ácido 3,4-diidroxibenzóico (protocatechuico)^{H,I}</p> <p>Derivados do Ácido Quínico</p> <p>Ácido 3-cafeoilquínico (clorogênico)^{E,I,O,Q}</p> <p>Ácido 4-cafeoilquínico^{E,I,O}</p> <p>Ácido 5-cafeoilquínico^{E,I,O}</p> <p>Ácido 3,4-di-O-cafeoilquínico^{D,E,I,O}</p> <p>Ácido 3,5-dicafeoilquínico^{E,I,O}</p> <p>Ácido 4,5-dicafeoilquínico^{E,I,O,Q}</p> <p>Ácido 3,4-di-O-cafeoilquínico metil ester^D</p> <p>Ácido 4,5-dicafeoilquínico metil ester^Q</p> <p>Ácido 4-feruolquínico^O</p> <p>Ácido 5-feruolquínico^O</p> <p>Ácido 3,4,5-tricafeoilquínico^Q</p> <p>Ácido Cinâmico e Derivados</p> <p>Ácido cinâmico^B</p> <p>Ácido diidrocinâmico^{C,H}</p> <p>Ácido 4-hidroxicinâmico (<i>p</i>-cumárico)^{B,C,H,I,Q}</p> <p>Ácido <i>m</i>-cumárico^C</p> <p>Ácido prenil-<i>p</i>-cumárico^H</p> <p>Ácido diprenil-<i>p</i>-cumárico^H</p> <p>Ácido <i>p</i>-hidroxidiidrocinâmico^H</p> <p>Ácido 3-(4-hidroxifenil) propenóico^I</p> <p>Ácido 2,3-diidroxipropanóico^N</p> <p>Ácido 3,4-diidroxicinâmico (cafeico)^{C,H,I,Q}</p> <p>Ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico (drupanin)^{I,K,Q}</p> <p>Ácido 3-prenil-4-(2,3-diidrocinamoiloxi) cinâmico^I</p> <p>Ácido 3-prenil-4-(diidroxinamoiloxi) cinâmico^{A,K,Q}</p> <p>Ácido 3-prenil-4-(2-metilpropioniloxi) cinâmico^{I,Q}</p> <p>Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepillin C)^{A,I,K,P,Q}</p> <p>Ácido ferúlico^{C,H}</p> <p>Ácido diidroferúlico^H</p> <p>Ácido 3-(-3-hidroxi-3-metilbutil)-5-prenil-4-hidroxicinâmico^P</p> <p>Capilartemisina A^Q</p>	<p>Diidrobenzofuranos</p> <p>Ácido (<i>E</i>)-3-[2,3-diidroxi-2-(1-hidroxi-1-metiletil)-7-prenil-benzofurano-5-il]-2-propenóico^{I,Q}</p> <p>Ácido (<i>E</i>)-3-[2,3-diidroxi-2-(1-metiletil)-7-prenil-benzofurano-5-il]-2-propenóico^{K,Q}</p> <p>Acetato dimérico de coniferila^K</p> <p>Tremetona^K</p> <p>Viscidona^K</p> <p>12-acetoxiviscidona^K</p> <p>Flavonóides</p> <p>Acacetina^{B,J}</p> <p>Alnusina^K</p> <p>Apigenina^{B,J}</p> <p>Aromadendrina^P</p> <p>Aromadendrina-4'-metil ester^G</p> <p>Betuletol^{I,K}</p> <p>Canferida^{G,I,J,K}</p> <p>Canferol^{B,H,J}</p> <p>Crisina^{B,J}</p> <p>Diidrocanferida^{I,Q}</p> <p>Ermanina^K</p> <p>Hesperidina^B</p> <p>Galangina^{B,J}</p> <p>Isorramnetina^{B,J}</p> <p>Isossacuranetina^{I,J}</p> <p>6-Metoxicanferol^Q</p> <p>Naringenina^B</p> <p>Pinobancsina^B</p> <p>Pinocembrina^{B,I,J}</p> <p>Quercetina^{B,J}</p> <p>Ranetina^{B,J}</p> <p>Rutina^B</p> <p>Sacuranetina^J</p> <p>Tectocrisina^J</p> <p>5,6,7-Triidroxi-3,4'-dimetoxiflavona^{G,J}</p> <p>3,5,7-Triidroxi-4'-metoxiflavanol^{K,P}</p> <p>Benzopiranos e Diidrobenzopiranos</p> <p>Ácido 3-(2,2-dimetil-8-prenil-2<i>H</i>-1-benzopirano-6-il)-2-propenóico^{I,K}</p> <p>Ácido (<i>E</i>)-3-(2,2-dimetil-3,4-diidroxi-3-hidroxi-8-prenil-2<i>H</i>-1-benzopirano-6-il)-2-propenóico^{I,K,Q}</p> <p>9-<i>E</i>-2,2-Dimetil-6-carboxietenil-8-prenil-2<i>H</i>-1-benzopirano^G</p> <p>9-<i>Z</i>-2,2-Dimetil-6-carboxietenil-8-prenil-2<i>H</i>-1-benzopirano^G</p> <p>2,2-Dimetil-6-carboxietenil-2<i>H</i>-1-benzopirano^{A,K}</p> <p>2,2-Dimetil-6-carboxietil-benzopirano^{H,K}</p>

TABELA 2.2 - SUBSTÂNCIAS ENCONTRADAS EM AMOSTRAS DE PRÓPOLIS
BRASILEIRAS

continua

SUBSTÂNCIA	SUBSTÂNCIA
Aldeídos e Cetonas	Derivados de Álcool e Fenol
Acetofenona ^{C,M}	2-Feniletanol ^C
Metóxi acetofenona ^C	3-Fenilpropanol ^C
Fenil acetofenona ^C	Álcool α -metil benzílico ^C
Prenil acetofenona ^C	Etilfenol ^C
Diprenil acetofenona ^C	Glicerol ^{H,N}
Metóxi benzaldeído ^C	1,2,4-butanotriol ^N
4-hidroxi-3,5-diprenil-benzaldeído ^M	Álcool vanílico ^H
3-metoxi-4-hidroxibenzaldeído (vanilina) ^{B,H,I,K}	Álcool <i>cis-p</i> -cumarílico ^H
coniferaldeído ^{H,K}	Álcool <i>trans-p</i> -cumarílico ^H
	3-vanililpropanol ^H
	Isoeugenol ^C
Terpenóides	Álcoois e Ácidos Carboxílicos de Monoesteres
β -Carofileno ^C	Ácidos C _{16:0} - C _{28:0} e C _{18:1} ^L
δ -Cadineno ^C	Álcoois C ₂₂ - C ₃₄ ^L
Ledol ^C	
α -Muroleno ^C	Aminoácidos
2 Z, 6 E-Farnesol ^C	Ácido aspártico ^F
(-)-espatuleno ^M	Treonina ^F
β -Amirina ^{H,N}	Serina ^F
α -Amirina ^N	Ácido glutâmico ^F
Lanosterol ^H	Prolina ^F
Isômero do lanosterol com ligação dupla 9(11) ^H	Glicina ^F
Lupeol ^N	Alanina ^F
α -Terpineol ^C	Cisteina ^F
Humuleno ^C	L-Valina ^{F,N}
Ácido abiético ^H	Metionina ^F
Ácido desidroabiético ^H	Isoleucina ^F
Lupenona ^N	Leucina ^F
Ácido cupréssico ^K	Tirosina ^F
Ácido isocupréssico ^K	Fenilalanina ^F
Ácido agático ^K	Lisina ^F
Ácido 15-acetoxiisocupréssico ^K	Histidina ^F
Ácido 15-metil éster agático ^K	Arginina ^F
Ácido agatólico ^K	NH ₄ ^F
Hidrocarbonetos	Ácidos Graxos
Xileno ^C	Ácido hexadecanóico (palmítico) ^{C,N}
Octadecano ^C	Ácido octadecanóico (esteárico) ^N
Nonadecano ^C	Ácido 9-octadecenóico (oléico) ^{C,N}
Heneicosano ^C	Ácido decanóico ^C
Tricosano ^C	Ácido nonanóico ^C
Pentacosano ^C	Ácido tetradecanóico (mirístico) ^C
Heptacosano ^{C,L}	Ácido tetracosanóico (lignocérico) ^N
Neofitadieno	Ácido hexacosanóico (cerótico) ^N
Alcanos C ₂₃ - C ₃₃ ^L	Ácido butanodióico ^H
Alcenos C ₃₁ , C ₃₃ e C ₃₅ ^L	Ácido octadecenóico ^H
Isso-alcanos C ₂₉ e C ₃₁ ^L	Ácido octadecadienóico ^H

TABELA 2.2 - SUBSTÂNCIAS ENCONTRADAS EM AMOSTRAS DE PRÓPOLIS BRASILEIRAS

conclusão	
SUBSTÂNCIA	SUBSTÂNCIA
<p>Outros aromáticos</p> <p><i>p</i>-cumarato de diidroconiferila^Q</p> <p>2,2-dimetil-8-prenil-6-vinilcromeno^M</p> <p>2,2-dimetil-6-vinilcromeno^M</p> <p>3,4-dimetoxi-alilbenzeno^M</p> <p>3,4-dimetoxi-estireno^M</p> <p>(+)-<i>treo</i>-1-C-guaiacilglicerol^I</p> <p>2,6-diprenil-4-vinilfenol^M</p> <p>2-prenil-4-vinilfenol^M</p> <p>Hidroquinona^C</p> <p>4-hidroxibenzoato de etila^B</p> <p>Ácido 2,4-diidroxibutanóico^N</p> <p>Capilartermisina^P</p> <p>Acetato de benzila^C</p> <p>Dihidrocinamato de metila^{C,H}</p> <p>Diidrocinaamato de etila^C</p> <p>Fenilacetato de etila^C</p> <p>Cafeato de etila^C</p> <p>3,4-dimetoxi-fenetilamina^N</p> <p>Ácido 3,4-diidroxibutanóico^N</p>	<p>Outros compostos</p> <p>Fosfato^{H,N}</p> <p>9,19-ciclolananastona-24-em-3-ol^N</p> <p>acetato de 9,19-ciclolananastona-24-em-3-ol^N</p> <p>Ácido láctico^N</p> <p>Ácido hidracrílico^N</p> <p>Ácido succínico^N</p> <p>Ácido fumárico^N</p> <p>Ácido málico^N</p> <p>Eritritol^N</p> <p>Eritrose^N</p> <p>D-Glucose^H</p> <p>Inositol^H</p>

NOTA: As letras em sobrescrito que seguem aos nomes dos componentes da tabela, referem-se aos trabalhos resumidos na subseção 2.2.3.

FIGURA 2.1 - NÚCLEOS FUNDAMENTAIS DE ALGUNS GRUPOS QUÍMICOS ENCONTRADOS EM PRÓPOLIS, E SUBSTÂNCIAS DAS QUAIS DERIVAM COMPONENTES COMUMENTE ENCONTRADOS NESTE PRODUTO

2.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA PRÓPOLIS

Se considerados os estudos efetuados com própolis de diferentes regiões geográficas, sabendo-se que suas composições químicas variam acentuadamente em função de sua origem, não é de se estranhar que uma extensa lista de atividades biológicas venha sendo observada. Não obstante, nesta seção dar-se-á prioridade a estudos biológicos efetuados com amostras de própolis brasileiras, por ser desta origem (mais precisamente do estado de São Paulo) o objeto de estudo deste trabalho de mestrado.

2.3.1 Atividade Antimicrobiana

AGA et al. (1994) isolaram os ácidos 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepillin C) e 3-prenil-4-diidrocinamoiloxicinâmico e a substância 2,2 dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano de amostra própolis do estado de São Paulo, testando suas atividades antimicrobianas. As Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) contra *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes* e *Arthroderma benhamiae* foram, respectivamente, 15,6, 31,3 e 15,6 µg/mL, para o Artepillin C, 31,3; 62,5 e 250 µg/mL, para o ácido 3-prenil-4-diidrocinamoiloxicinâmico e 125, 125 e 62,5 µg/mL, para 2,2 dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano.

BANKOVA et al. (1995) examinaram a atividade antimicrobiana de diferentes frações de própolis brasileiras (estados de São Paulo, Paraná e Ceará) e da Bulgária sobre *Staphylococcus aureus*, usando método de bioautografia. Os autores observaram que todas as amostras estudadas apresentaram atividade antimicrobiana, com intensidades diferentes, e que esta atividade deveu-se mais fortemente aos compostos polares, majoritariamente fenólicos. Posteriormente, BANKOVA et al. (1996) isolaram alguns componentes de própolis brasileiras com marcadas atividades antimicrobianas, incluindo quatro ácidos diterpênicos tipo labdano (ácido comúncio, ácido isocuprêssico, ácido acetilisocuprêssico e ácido imbricatolóico), juntamente com o siringaldeído.

FERNANDES et al. (1995) investigaram as atividades de extrato hidroalcoólico de própolis brasileira, coletada na cidade de Botucatu (SP), frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida guilliermondii*, isoladas de infecções humanas. Entre todos os microorganismos, os gram-negativos mostraram-se menos suscetíveis à ação da própolis, apresentando concentrações inibitórias mínimas para 90% das cepas testadas (CIM₉₀), variando de 22,5 mg/ml (10,2% v/v) a 23,1 mg/ml (10,5% v/v). As CIM₉₀ para os tipos de *Candida* variaram de 0.80 mg/ml a 11 mg/ml (ou 0.40% v/v a 5.0% v/v), sendo as cepas de *C. parapsilosis* as menos suscetíveis. A ordem relativa de suscetibilidade dos microorganismos foi: *S. aureus* > *C. tropicalis* > *C. albicans* > *C. guilliermondii* > *C. parapsilosis* > *S. typhimurium* > *E. coli*.

PARK et al. (1998) estudaram a atividade de extratos etanólicos de própolis (EEP) de diferentes regiões do Brasil, frente ao *Streptococcus mutans* e sobre a enzima *glucosiltransferase*. Os resultados demonstraram que todos os extratos inibiram tanto a *glucosiltransferase* como o crescimento do *S. mutans*, sendo que uma amostra proveniente do Rio Grande do Sul (a que possuía a maior concentração de pinocembrina e galangina) apresentou o maior poder de inibição frente a ambos. Posteriormente, KOO et al (2000) avaliaram o efeito de uma nova variedade de própolis, coletada na Bahia, frente ao *S. mutans*. Os ensaios demonstraram que o EEP da Bahia apresentou atividade ainda mais acentuada do que todas as amostras das regiões sul e sudeste, estudadas anteriormente. Os valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) variaram de 50 µg/mL (amostra da Bahia) a 400 µg/mL (amostra de Minas Gerais), para o *S. mutans* e de 25 µg/mL (Ba) a 400 µg/mL (MG), para *S. sobrinus* e *S. cricetus*.

SANTOS et al. (1999) investigaram a atividade de própolis do estado de Minas Gerais frente a *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium* spp. e bactérias do grupo *Bacteroides fragilis*, isolados de hospedeiros humanos e de macacos. Os autores prepararam extrato etanólico de própolis na porcentagem de 25% (m/v), diluindo-o em diferentes concentrações (0,025 – 2,0% v/v) para os testes microbiológicos. Para as 30 linhagens de *A. actinomycetemcomitans*, as CIM₁₀₀ variaram de 0,05 a 0,5%, tendo sido encontrados resultados similares para o grupo *B. fragilis*. O grupo *Fusobacterium* spp. foi o mais susceptível, com CIM₁₀₀ variando

entre 0,05 e 0,25%. Os autores observaram que, em geral, as atividades de amostras coletadas em diferentes estações do ano e em mesma área, não variaram significativamente. Mais tarde, SANTOS et al. (2002) avaliaram a susceptibilidade *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrens* e *Porphyromonas gingivalis* a diferentes amostras de própolis do estado de Minas Gerais. Todas as linhagens estudadas mostraram-se susceptíveis à própolis, com a CIM₅₀ e CIM₉₀ variando de 64 a 256 µg/mL, sendo que os valores para cada linhagem específica variaram em função da procedência da amostra .

KUJUNGIEV et al. (1999) avaliaram as atividades antibacteriana (*E.coli*, *S.aureus*), antifúngica (*C. albicans*) e antiviral (influenza de aves) de amostras de própolis originárias da Bulgária, Albânia, Mongólia, Egito, Brasil e Ilhas Canárias. Todas as amostras mostraram-se ativas contra o *S. aureus* e *C. albicans* e inativas contra o *E. coli*. A maioria das amostras apresentou-se ativa contra o vírus influenza de aves. Segundo os autores, atividades similares foram observadas para amostras com composições químicas totalmente diferentes.

SFORCIN et al. (2000) investigaram a suposta variação da atividade antibacteriana de própolis coletadas nas quatro estações do ano, em Botucatu (SP), frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Salmonella thyphimuriun*. Para os testes de susceptibilidade, cada amostra foi testada em concentrações variando de 0.4 a 14% (v/v). Verificou-se que o crescimento de bactérias gram-positivas foi inibido com baixas concentrações de própolis (0.4%), enquanto que as bactérias gram-negativas mostraram-se menos suscetíveis. As Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM₅₀ e CIM₉₀) variaram de 4.5 a 8.0%, para o segundo grupo. Os resultados permitiram aos autores concluir que não houve variação sazonal significativa na atividade antibacteriana da própolis. Posteriormente, SFORCIN et al. (2001) estudaram a suposta variação sazonal da atividade de própolis coletada em Botucatu (SP), frente a *Candida albicans* e *Candida tropicalis*, utilizando diluições seriadas entre 0,4 e 14% (v/v). Ambas as linhagens mostraram-se susceptíveis à própolis, com CIM₅₀ e CIM₉₀ na faixa de 2,32 a 3,33%, para a *C. albicans*, e 3,22 a 3,88%, para a *C. tropicalis*, não havendo sido observadas diferenças significativas nas atividades das amostras coletadas nas diferentes estações do ano.

MARCUCCI et al. (2001) testaram as atividades de quatro componentes da própolis brasileira (ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico, 2,2-dimetil-6-carboxietenil-2H-benzopirano, ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico - Artepillin C - e 2,2-dimetil-6-carboxietenil-8-prenil-2H-1-benzopirano) frente a *Trypanosoma cruzi*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus faecalis*. Todos os quatro componentes mostraram-se ativos contra o *T. cruzi*, com valores de concentrações inibitórias mínimas, correspondentes à eliminação de 50% dos parasitos (CIM₅₀), de 0,733; 1,205; 0,770 e 0,743 mg/mL, respectivamente. Exceto o ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico, todos os demais se mostraram ativos frente às demais bactérias.

MIORIN et al. (2003) estudaram o efeito de diferentes amostras de mel e de própolis, dos estados do Paraná e Minas Gerais, frente ao *S. aureus*. As amostras de própolis demonstraram CIM variando de 0,36 a 3,65 mg/mL, sendo as amostras de Minas Gerais, coletadas em áreas contendo a espécie vegetal *Baccharis dracunculifolia*, foram as mais ativas (com concentrações de Artepillin C próximas a 15,94 mg/g de própolis bruta).

AMOROS et al. (1994) compararam as atividades, *in vitro*, de própolis francesa e da substância 3-metilbutil-2-enil cafeato, isolado da própolis ou sintetizada, contra o vírus causador do Herpes Simplex (HSV1). Observaram atividades crescentes destas substâncias entre as concentrações de 6,25 e 50 µg/mL, diminuindo a multiplicação do vírus e sua síntese de DNA.

HULEIHEL e ISANU (2002) investigaram o efeito de extrato aquoso de própolis de Israel sobre o vírus causador do Herpes Simplex (HSV1), em modelos *in vivo* e *in vitro*. Os ensaios *in vitro* mostraram que a administração do extrato a 0,5% (obtido pela diluição de extrato aquoso preparado na concentração de 20% m/v), no momento da inoculação ou anteriormente a esta etapa, causou 50% de inibição da infecção das células Vero, enquanto que somente a administração de extrato a 10% inibiu entre 80-85% da infecção viral, após 2 horas de inoculação. Os ensaios *in vivo* demonstraram que o extrato aquoso a menos de 5% preveniu o surgimento e desenvolvimento de sintomas da infecção local e intraperitoneal, em ratos, e infecção córnea, em coelhos. Os autores dizem, ainda, que a potente ação

apresentada pela própolis contra a infecção do HSV-1 deve-se, provavelmente, à prevenção da absorção do vírus nas células hospedeiras e/ou pela inibição de etapas internas da replicação viral.

Estudos de atividade antimicrobiana, levados a cabo com própolis de diferentes regiões geográficas, como Mongólia (KUJUNGIEV et al., 1999), Ilhas Canárias (KUJUNGIEV et al., 1999), Egito (HEGAZI; EL HADY, 2002), Argentina (NIEVA MORENO et al., 1999), Bulgária (BOYANOVA et al., 2003), Turquia (YILDIRIM et al., 2003), com resultados positivos, indicam ser esta atividade comum a própolis de diferentes regiões geográficas. Esta constatação não é surpreendente desde que é sabido que as abelhas preparam a própolis com o intuito de empregá-la na assepsia e no reparo mecânico da colméia.

2.3.2 Atividade Antiinflamatória

KROL et al. (1996) avaliaram a atividade antiinflamatória de 19 compostos fenólicos, encontrados em própolis, por meio da medição de quimioluminescência formada após captura de radicais livres por estes, que é gerada por neutrófilos estimulados por miristato acetato de forbol. O cafeato de fenetila (CAPE) aboliu completamente a quimioluminescência de luminol-H₂O, *in vitro*, à concentração de 10 µM, enquanto que os favonóides galangina, canferol e canferida, nas mesmas concentrações, a diminuíram em 73-93%. Os resultados indicaram que alguns componentes fenólicos do extrato de própolis são componentes ativos como antiinflamatórios.

MIYATAKA et al. (1997) investigaram a atividade inibitória de doze amostras de própolis brasileiras, sete chinesas e de uma amostra japonesa, sobre a enzima hialuronidase, conhecida como uma enzima inflamatória, como um método indireto de avaliação do potencial antiinflamatório da amostra. Para tanto, os autores prepararam extratos etanólico e aquoso para cada amostra, testando-os isoladamente. Todos os extratos etanólicos inibiram a atividade enzimática de maneira concentração-dependente, entre 0,01 – 0,1% (m/v). As médias de concentrações inibitórias (CIM₅₀) das amostras brasileiras, divididas em dois grupos,

segundo suas atividades, ficaram em 5,4 (amostras coletadas em locais com predominância de *Araucaria angustifolia*) e 0,5 mg/mL (amostras coletadas em locais com predominância de *Eucaliptus globulus* ou de *Rosmarinus officinalis*). As amostras chinesas e a japonesa apresentaram IC₅₀ entre 0,4 e 0,3 mg/mL. Excetuando-se as duas amostras brasileiras coletadas em região com predominância de *Araucaria angustifolia*, todos os extratos aquosos das demais amostras estudadas apresentaram atividades enzimáticas inibitórias mais fracas do que seus correspondentes extratos etanólicos. Os valores de CIM₅₀ para os extratos aquosos das amostras brasileiras variaram de 1,1 a 2,2 mg/mL, as chinesas apresentaram valores entre 1,7 e 21,1 mg/mL, enquanto que a amostra japonesa apresentou valor de 1,8 mg/mL. Finalmente, os autores concluem que a própolis possui atividade antiinflamatória em intensidades variáveis, dependendo da origem da amostra, e que o método enzimático utilizado é uma ferramenta útil na avaliação do potencial antiinflamatório de amostras de própolis.

MENEZES, ÁLVARES e ALMEIDA (1999) avaliaram a atividade antiinflamatória de 14 extratos comerciais de própolis brasileiras (etanólicos) e de 2 extratos produzidos em laboratório (amostra oriunda de Rio Claro – SP), pelo método de inflamação em orelha de camundongo induzida pelo ácido araquidônico. Os autores utilizaram Indometicina e etanol a 95% como controles. Os resultados indicaram que 4 extratos apresentam atividades similares à Indometicina, 8 não apresentaram atividades significativas e 1 aumentou o edema. A comparação entre as atividades dos dois extratos preparados pelos próprios autores (20 e 40% m/v, de matéria-prima) lhes permitiu concluir que a atividade antiinflamatória foi dose-dependente. Mais tarde, ALMEIDA e MENEZES (2002) avaliaram as atividades antiinflamatórias de extratos comerciais e de dois extratos preparados internamente (etanólicos), por administração intraperitoneal e por aplicação tópica na pele de camundongos, utilizando sete metodologias: (1) modelo de peritonite induzida por levedura; (2) edema de orelha induzido por ácido araquidônico e óleo de *Croton* sp; (3) edema plantar induzido por carragenina; (4) modelo de granuloma por grão de algodão; (5) artrite induzida por *Adjuvante Completo de Freund's*; (6) reação de *Arthus* induzida por ovalbumina e (7) modelo de *hipersensibilidade tardia*. No modelo (1), 100% dos extratos comerciais inibiram o influxo de leucócitos polimorfonucleares na cavidade

peritoneal, quando comparados com antiinflamatórios convencionais, como a ácido acetilsalicílico (6 mg/kg), e 30% apresentaram efeito similar à Indometicina (1,3 mg/kg). No modelo de edema induzido pelo ácido araquidônico (2), 32% dos extratos comerciais mostraram alguma atividade quando comparados com os veículos (etanol 55%) e drogas padrão, de maneira dose-dependente, enquanto que no caso de edemas induzidos por óleo de *Croton sp*, 96% dos extratos mostraram-se efetivos e apenas 4% mostraram atividade antagônica. No modelo (7), 100% dos extratos inibiram reações inflamatórias, 66,7% mostraram atividades similares aos corticóides (aplicação tópica de 0,1 mg de hidrocortisona) e 11,1% similares à ação de drogas não esteroidais, de maneira dose-dependente. Os autores concluem que as atividades antiinflamatórias apresentadas pelas própolis estudadas dependeram da rota de administração, dosagem e duração da terapia.

ALENCAR (2002) estudou a atividade inibitória de 12 extratos etanólicos de própolis (preparadas pela extração de 2g de própolis em 25 mL de etanol), de diferentes regiões do Brasil, sobre a enzima hialuronidase, como um método indireto na determinação da atividade antiinflamatória. Todas as amostras apresentaram algum grau de inibição da enzima, sendo que 6 delas a inibiram a um nível acima de 35%, em relação ao controle, sendo 3 destas amostras identificadas como produzidas a partir das plantas *Populus alba*, *Hyptis divaricata* e *Baccharis dracunculifolia*.

BORRELLI et al. (2002b) avaliaram a importância dos constituintes cafeato de fenetila (CAPE) e galangina (comumente encontrados em própolis européias) na atividade antiinflamatória da própolis, valendo-se de modelos de inflamações aguda e crônica em ratos e de amostras de própolis com e sem estes constituintes. O extrato de própolis contendo CAPE, bem como esta substância isoladamente, inibiram edema induzido por carragenina, pleurisia e artrite adjuvante. Em contraste, a própolis sem CAPE e galangina não mostrou qualquer atividade antiinflamatória. Os autores concluem que a atividade antiinflamatória de própolis européias não pode ser atribuída a um sinergismo entre galangina, CAPE e outros constituintes presentes na resina, mas que apenas o CAPE é essencial para suas atividades antiinflamatórias.

NAGAOKA et al. (2003) testaram a atividade inibitória dos extratos metanólico e aquoso de própolis da Holanda, na produção de óxido nítrico em lipopolissacarídeo ativado em macrófagos de ratos (células tipo J774.1). Ambos os extratos apresentaram fortes atividades, com valores de CIM_{50} de 23,8 e 51,5 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Entre os componentes isolados da amostra, testados isoladamente, o CAPE e seus análogos cafeato de benzila e cafeato de cinamila apresentaram atividades mais acentuadas, com valores de CIM_{50} de 13,8, 7,64 e 9,53 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Os autores concluem que o efeito inibitório de óxido nítrico deve estar diretamente relacionado com as propriedades antiinflamatórias da própolis de origem holandesa.

ANSORGE, REINHOLD e LENDECKEL (2003) estudaram o efeito de diferentes frações de extrato de própolis polonesa, bem como dos flavonóides hesperidina e quercetina e do cafeato de fenetila (CAPE), comumente encontrados em própolis da região, sobre células básicas da função imunológica de humanos. Os parâmetros utilizados foram: síntese de DNA e produção de diferentes tipos de citocinas. Segundo os autores, os dados demonstraram que a própolis e seus constituintes estudados possuem efeitos regulatórios diretos nas atividades funcionais básicas das células do sistema imunológico. Finalmente, os autores concluem que a própolis pode ser considerada um potente antiinflamatório natural, influenciando diferentes tipos de respostas imunológicas, provavelmente *via* regulação das células T.

2.3.3 Atividade Antioxidante

Radicais livres mediam inúmeros fenômenos biológicos, como envelhecimento, diabetes, hepatite, inflamação e outras doenças crônicas. O efeito antioxidante da própolis tem sido demonstrado por sua habilidade em capturar radicais livres, sendo de grande interesse na prevenção e tratamento de diabetes e outros distúrbios (PACHECO, 2001).

BANSKOTA et al. (2000) estudaram a atividade de própolis oriundas do Brasil (MG e PR), Peru, Holanda e China, na captura de radicais livres 1,1-diprenil,2-picrilidrazil

(DPPH). Todos os extratos apresentaram alguma atividade, de forma concentração-dependente. Os extratos aquosos de própolis brasileiras e chinesas apresentaram atividades mais acentuadas em relação a seus respectivos extratos metanólicos, enquanto que as demais amostras apresentaram o inverso. Dentre todas as amostras, os dois extratos aquosos de própolis brasileiras (ambos do estado de Minas Gerais) apresentaram atividades mais acentuadas, com captura de 50% dos radicais livres (CIM₅₀) à concentração de 5,9 µg/mL. O ácido cafeico, tomado como controle positivo, apresentou CIM₅₀ de 1,9 µg/mL.

NAGAI et al. (2003) avaliaram a atividade antioxidante, pelo modelo de peroxidação do ácido linoleico, e a habilidade na captura dos radicais livres (superóxido, DPPH e hidroxilas) de extrato aquoso de própolis brasileira, oriunda do estado de Minas Gerais. A própolis mostrou atividade antioxidante bastante acentuada, apresentando-se mais efetiva, às concentrações de 1 e 5 mg/mL, do que o ácido ascórbico a 5mM (controle positivo). Apresentou, ainda, atividade acentuada nos ensaios de captura de radicais livres, com inibição total dos radicais superóxido e hidroxila às concentrações de 50 e 100 mg/mL. Os autores concluem ser o extrato aquoso de própolis um antioxidante natural, cuja atividade é concentração-dependente.

NAKANISHI et al. (2003) investigaram os possíveis mecanismos envolvidos na reação de transferência de hidrogênio do Artepillin C (encontrado em amostras da região sudeste do Brasil) para radicais ativos, bem como quantificaram sua habilidade na captura de radicais livres. Para tanto, os autores mediram a taxa de transferência de hidrogênio do Artepillin C para o radical cumilperoxil em propionitrila, a 203 K, pela técnica EPR. Os autores concluem que o Artepillin C foi eficiente na captura de radicais livres cumilperoxil, em meio aprótico, com atividade comparável ao apresentado pela (+)-catequina. A ausência do efeito catalisador do Sc³⁺ demonstrou que a transferência de hidrogênio do Artepillin C para o radical livre cumilperoxil ocorre *via passo-único (one-step hydrogen transfer)* em detrimento à *via transferência eletrônica seguida de transferência protônica*.

KUMAZAWA, HAMASAKA e NAKAYAMA (2004) avaliaram a atividade antioxidante de própolis de diferentes regiões geográficas (Argentina, Austrália, África do Sul, Brasil -estado de Minas Gerais - Bulgária, Chile, China, Hungria, Nova Zelândia,

Tailândia, Ucrânia, Uruguai, Estados Unidos e Uzbequistão), bem como as atividades de substâncias comumente isoladas destas amostras. Para tanto, os autores prepararam extratos etanólicos de própolis e avaliaram suas atividades antioxidantes pelos sistemas β -caroteno-ácido linoleico (o primeiro é descorado pela oxidação do segundo), à concentrações de 10 $\mu\text{g/mL}$, e captura de radicais livres 1,1-diprenil,2-picrilidrazil (DPPH), a 20 $\mu\text{g/mL}$. Como resultados dos testes pelo primeiro sistema, os extratos de própolis da Argentina, Chile, China e Hungria mostraram fortes atividades, acima de 60% em relação ao controle (etanol), enquanto a própolis brasileira apresentou atividade próxima a 40%. Nos ensaios de captura de radicais DPPH, as amostras da Austrália, China, Hungria e Nova Zelândia apresentaram atividades acima de 60%, enquanto a própolis brasileira apresentou atividade antioxidante em cerca de 40% em relação ao controle. Quanto às atividades das substâncias isoladas de própolis, ácido cafeico, quercetina, canferol, cafeato de fenetila, cafeato de cinamila e Artepillin C apresentaram atividades acima de 60%, em captura de radicais DPPH. Segundo os autores, os resultados apresentados demonstram claramente a diversidade de própolis em relação a suas origens geográficas/botânicas e atividades específicas.

SHIMIZU et al. (2004) estudaram a possível atividade de prevenção em danos celulares, causados por processos oxidativos, de substâncias presentes em própolis brasileira do estado de Minas Gerais. Inicialmente, o extrato purificado de própolis, livre de ceras e resinas, foi colocado em contato com células intestinais humanas do tipo carcinoma de cólon (Caco-2), com o intuito de encontrar aquelas substâncias capazes de passar através das células. Em ensaio subsequente, as substâncias que permearam as células Caco-2 foram colocadas em contato com células hepáticas carcinoma HepG2, com o objetivo de se estimar as suas habilidades em prevenir danos celulares causados por oxidação (peroxidação lipídica da membrana e oxidação intracelular do DNA). Os resultados indicaram que o Artepillin C foi o componente do extrato que apresentou maior permeabilidade nas células Caco-2, tendo sido transportado para o lado basal das células na forma livre. Quando adicionado às células hepáticas HepG2, o Artepillin C preveniu danos oxidativos às células, de forma concentração-dependente, diminuindo a oxidação lipídica da membrana celular em 16% em relação ao controle (veículo). À concentração de

20µM, reduziu em 36% a formação de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina, em DNA. Finalmente, os autores concluem que por não ser facilmente conjugado e por possuir afinidade com membranas celulares, o Artepillin C é um antioxidante biodisponível e é uma substância com aplicação potencial em quimioprevenção de doenças degenerativas.

Outros autores vêm reportando a atividade antioxidante ou a habilidade em capturar radicais livres de própolis de regiões de clima temperado ou de componentes comumente encontrados em amostras destas regiões, como resumido à seguir:

NIEVA MORENO et al. (2000) avaliaram a atividade de extratos alcoólicos de própolis, de diferentes regiões da Argentina, na captura dos radicais livres DPPH. Observaram que todos os extratos estudados apresentaram alguma atividade, sendo que a mais acentuada coube à amostra de própolis de Tucumán e Santiago Del Estero, com valores de inibição de radicais livres DPPH da ordem de 60-70%.

ISLA et al. (2001) analisaram o possível efeito protetor da própolis contra modificação oxidativa lipídica em soro humano, monitorando a cinética de oxidação induzida pelo cobre na formação de dienos conjugados. Os resultados variaram entre os grupos de amostras estudadas, sendo que dois grupos apresentaram acentuada atividade, protegendo os lipídios do soro de modificações induzidas pelo cobre e revelaram que a atividade é concentração-dependente.

RUSSO, LONGO e VANELLA (2002) e HOSNUTER et al. (2004) demonstraram fortes atividades do cafeato de fenetila (CAPE) em processos antioxidativos e na captura de radicais livres, sendo que os primeiros constataram que a própolis, mesmo sem esta substância, apresenta alguma atividade antioxidante, que é potencializada pela presença do CAPE.

2.3.4 Ensaios de Cicatrização

MAGRO FILHO (1988) investigou histologicamente os efeitos da irrigação com solução hidroalcoólica de própolis do estado de São Paulo sobre ferimentos cutâneos induzidos em ratos albinos e sobre a cronologia do processo de reparo de feridas de extração dental. Em relação às feridas cutâneas, o autor constatou que houve uma aceleração da epitelização, com formação de um tecido conjuntivo rico em fibras, e também da evolução do quadro inflamatório conjuntivo agudo para o crônico, em relação ao grupo controle e ao grupo tratado com solução hidroalcoólica. Já em relação às feridas da extração dental, constata que a solução hidroalcoólica de própolis não ofereceu vantagens para a cronologia da reparação alveolar, pois os alvéolos irrigados com esta solução tiveram uma reparação mais adiantada, em relação aos demais grupos, somente aos três dias pós-operatórios, mantendo-se sempre mais atrasados que o grupo controle a partir deste dia.

MAGRO FILHO (1991) analisou clínica e citologicamente os efeitos da ação tópica da solução hidroalcoólica de própolis do estado de São Paulo, a 5% (m/v), na reparação de feridas intrabuciais de 27 pacientes submetidos a cirurgia de inversão de retalho. Pelo método de citologia esfoliativa, o autor deduziu que a evolução da epitelização e sua maturação, duas semanas após a cirurgia, ocorreram mais rapidamente no grupo teste em relação aos grupos controle. Entre uma e duas semanas pós-cirurgia, todos os grupos passaram a apresentar infiltrado inflamatório agudo e crônico estatisticamente diferentes em relação ao padrão pré-operatório, sendo que após duas semanas o grupo teste mostrou uma tendência à inflamação moderada, leve e ausente, enquanto que os demais grupos apresentaram inflamação intensa e moderada. Segundo o autor, os resultados deixaram claro que a própolis favoreceu a evolução do infiltrado inflamatório do agudo para o crônico e do intenso para o ausente, sendo que tal constatação não pôde ser atribuída ao veículo, como comprovado estatisticamente. A associação do estudo citológico e clínico permitiu, segundo o autor, se verificar uma ação antiinflamatória da própolis associada a uma maturação epitelial mais rápida.

ARVOUET-GRAND et al. (1993) estudaram o efeito do uso de extrato de própolis (origem não revelada) e de bálsamo do Peru no tratamento de escarificações provocadas em coelhos, no limite do sangramento, e em cortes de 5 mm de profundidade, em ratos. No decorrer dos tratamentos, avaliaram os seguintes parâmetros: profundidade do ferimento, aparecimento de edema, presença de brotamentos e espessura da crosta. Os ensaios preliminares, realizados com coelhos, permitiram se determinar que os extratos de própolis e de bálsamo do Peru, a 5 % (m/v), melhoraram o desenvolvimento do processo de cicatrização em relação aos grupos controle. Os ensaios realizados com os ratos mostraram uma maior eficácia da própolis no tratamento de cortes mais profundos e uma melhor performance deste produto em relação à superfície e diminuição da profundidade do corte, ao longo do tempo. Quanto à aparição de edemas, suas durações e freqüências diminuíram ligeiramente entre os animais tratados com própolis em relação àqueles tratados com bálsamo do Peru. Quanto à presença de brotamentos, as diferenças não foram significativas entre os dois grupos, que apresentaram atividade comparável. Finalmente, concluem que a qualidade da cicatrização foi melhorada pela aplicação de ambos os produtos, com regeneração de tecidos mais acelerada no grupo tratado com a própolis.

GREGORY et al. (2002) investigaram as evoluções microbiana, inflamatória e da cicatrização de queimaduras de segundo grau, comparando feridas tratadas com creme contendo própolis brasileira (CP) com feridas tratadas com sulfadiazeno de prata (SSD). Foram admitidos, para este estudo, somente pacientes com 48 horas pós-injúria e com a presença de feridas bilaterais, de mesma profundidade e qualidade, de tal forma que cada paciente teve uma ferida tratada com creme de própolis e a outra tratada com SSD. A cada três dias, realizaram-se culturas microbianas e foram tomadas fotografias para documentação da inflamação e da cicatrização, seguidas de substituição do curativo. Como resultados, os autores não encontraram diferenças significativas na colonização microbiana das feridas tratadas com CP e com SSD, mas, por outro lado, constataram que as feridas tratadas com creme contendo própolis mostraram-se menos inflamadas e tiveram uma cicatrização mais rápida, em relação às tratadas com SSD.

2.3.5 Atividade Antitumoral

BANSKOTA et al. (1998) isolaram 23 componentes de amostra de própolis brasileira, testando suas atividades citotóxicas, *in vitro*, contra células fibrossarcoma humanas (HT-1080) e células carcinoma de cólon de ratos (26-L5). As substâncias coniferaldeído, betuletol, canferida e ermanina mostraram acentuadas citotoxicidades, com valores de CIM₅₀ iguais ou inferiores a 10 µg/mL. Posteriormente, BANSKOTA et al. (2000) avaliaram a atividade citotóxica de extratos metanólicos e aquosos de própolis oriundas do Brasil, Peru, Holanda e China, contra as mesmas linhagens de células. Na totalidade dos casos, os extratos metanólicos mostraram-se mais potentes em relação a seus respectivos extratos aquosos. Os extratos metanólicos da Holanda e da China apresentaram maiores atividades, com valores de CIM₅₀ para células 26-L5 de 3,5 e 3,9 µg/mL, respectivamente. Dentre as amostras brasileiras, duas do tipo “própolis verde” (típicas da região sudeste) apresentaram-se mais ativas, uma atingindo valor de CIM₅₀, para células 26-L5, de 14,3 µg/mL, enquanto que outra apresentou valor de 12,5 µg/mL, para células HT-1080. A substância 5-Fluorouracil, tomada como controle positivo, apresentou valores de CIM₅₀, para células 26-L5 e HT-1080, de 0,07 e 1,04 µg/mL, respectivamente.

KIMOTO et al. (1998) testaram o efeito do Artepillin C, substância isolada de própolis brasileira, sobre variedades de células tumorais malignas, humanas e de ratos, em ensaios *in vitro* e sobre tumores humanos enxertados em ratos. Os resultados indicaram claramente que 100 µg/mL de Artepillin C foram inibitórios ao crescimento das células tumorais e causaram danos significativos à tumores sólidos, *in vitro* e *in vivo*. Apoptoses, mitoses abortivas e necroses massivas foram identificadas após injeção intratumoral de 500 µg de Artepillin C, 3 vezes por semana. Os autores observaram, ainda, o incremento da razão CD4/CD8 de células T, bem como em seus números absolutos. Finalmente, concluem que o Artepillin C ativa o sistema imunológico e possui ação antitumoral direta. Posteriormente, Kimoto et al. (2001) estudaram o efeito da própolis brasileira e do Artepillin C em carcinogênese pulmonar de rato, *in vivo*, induzida por nitrilotriacetato férrico (FeNTA). Os resultados

demonstram uma proteção significativa aos indivíduos dos grupos tratados com própolis ou Artepillin C, no que tange o desenvolvimento ou progressão de adenomas e adenocarcinomas, em relação aos controles. Enquanto 50% dos indivíduos do grupo controle desenvolveram adenocarcionomas, nenhum indivíduo dos grupos tratados com 1,0 mg de própolis/indivíduo ou 350 µg de Artepillin C/indivíduo a desenvolveram. Análises histológicas evidenciaram que as substâncias 4-hidróxi-2-nonenal e 8-hidróxi-2'-desoxiguanosina, formadas no processo de oxidação lipídica dos tecidos pulmonares, aumentaram em células bronquiolares e alveolares após administração de FeNTA, diminuindo significativamente após a administração oral de própolis ou Artepillin C. Finalmente, os autores concluem que a própolis e o Artepillin C inibiram a peroxidação lipídica dos tecidos e o desenvolvimento de cânceres pulmonares em ratos.

LUO et al. (2001) avaliaram, *in vitro*, o comportamento de células cancerígenas de mama do tipo MCF-7, quando em contato com o ácido 3-[2-dimetil-8-(3-metil-2-butenil)-benzopirano]-6-propenóico, isolado de própolis brasileira. Os resultados indicaram uma forte atividade antiproliferativa desta substância, associada à inibição do ciclo de progressão das células e à indução de apoptoses.

SUGIMOTO et al. (2003) testaram o efeito de própolis padronizada em 35,8 µg de Artepillin C / g de própolis (chamado própolis A.P.C), sobre tumorigenese induzidas em pulmão de rato. Os resultados indicaram não haver redução na incidência de tumores no grupo tratado com a própolis em relação ao grupo controle, porém a multiplicidade destes tumores, no primeiro grupo, foi reduzida em 72% em relação ao segundo. Finalmente, os autores concluem que a própolis A.P.C pode ser um agente preventivo contra o câncer de pulmão em humanos.

AKAO et al. (2003) investigaram os efeitos de dois derivados do ácido cinâmico (ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico, conhecido como Drupanin, e ácido (E)-3-prenil-4-(2,3-diidrocinamoiloxi)-cinâmico, denominado Baccharin), isolados de própolis brasileira, sobre linhagens de células tumorais humanas, *in vitro*, comparando-os com aqueles encontrados para o Artepillin C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico). O crescimento das células cancerígenas (gástrica, de cólon e

leucemia) foi inibido acentuadamente quando em contato com 150 μM destas substâncias, sendo os valores de CIM_{50} do Artepillin C, baccharin e drupanin, para células leucêmicas HL60, de 51.1, 78.8 e 85.6 μM , respectivamente. Os testes permitiram, ainda, verificar que estes compostos induzem apoptoses nas células cancerígenas. O efeito tóxico do drupanin sobre linfócitos normais do sangue foi menor que o observado para o Artepillin C, que é considerada uma substância segura em modelos animais.

Outros autores vêm reportando atividades antitumorais e contra células cancerígenas de amostras de própolis de zonas temperadas ou de alguns de seus componentes isolados, como cafeatos de fenetila (CHEN et al., 1996; BORRELLI et al., 2002b; BANSKOTA et al., 2002; LEE et al., 2003; LIAO et al., 2003), de benzila e de cinamila (BANSKOTA et al., 2002).

2.3.6 Outras Atividades Biológicas

Além das atividades biológicas resumidas acima, outras vêm sendo reportadas em diversos periódicos, sendo algumas delas resumidas à continuação:

TATEFUJI et al. (1996) isolaram e identificaram seis ácidos cafeoilquínicos de fração aquosa de extrato de própolis brasileira, com atividades no aumento e na mobilidade de macrófagos de ratos. Acima de 10^{-5} M, todos os componentes aumentaram a expansão dos macrófagos de maneira dose-dependente, não se observando diferenças significativas entre o grupo dos ácidos dicafeoilquínicos (ácido 3,5-dicafeoilquínico, ácido 3,4-dicafeoilquínico e ácido 4,5-dicafeoilquínico) e o grupo dos ácidos monocafeoilquínicos (ácido 4-cafeoilquínico, ácido 5-cafeoilquínico e ácido clorogênico). Todos os ácidos cafeoilquínicos incrementaram acentuadamente a mobilidade dos macrófagos, sendo mais efetivos, à mesmas concentrações, que o *N*-formil-metionil-leucil-fenilalanina, tido como controle positivo. ORSI et al. (2000) estudaram a ação imunomoduladora de própolis do estado de São Paulo em ativação de macrófagos de ratos, enquanto que SFORCIN, KANENO e FUNARI (2002) avaliaram a atividade das células assassinas naturais sobre células linfoma

de ratos (tipo YAC-1), influenciada pela administração de extratos de própolis de mesmas procedências, coletados nas diferentes estações do ano. Os dados obtidos pelos primeiros sugeriram que a própolis atuou na imunidade não específica dos ratos pela ativação dos macrófagos, enquanto que os segundos indicaram um aumento na atividade das células assassinas naturais dos animais tratados com própolis, sem diferenças significativas entre as amostras coletadas nas diferentes estações do ano. ORSOLIC e BASIC (2003) estudaram a atividade imunomoduladora, *in vivo*, de própolis do Brasil (MG) e da Croácia, no combate a células cancerígenas. Os resultados indicaram uma pronunciada atividade anti-metastática nos animais tratados com própolis, aumentando a resistência não específica *via* ativação de macrófagos.

BASNET et al. (1996) avaliaram o efeito hepatoprotetor da própolis brasileira contra toxicidade induzida por CCl₄ em ratos. O extrato aquoso de própolis (EAP) mostrou um efeito hepatoprotetor mais acentuado do que seus respectivos extratos metanólico e clorofórmico, quando 200 mg/kg do extrato aquoso (EAP) foram administrados oralmente a 24, 12 e 1 h antes da administração de 2 mL/kg de CCl₄, decrescendo os níveis de Transaminase Oxalacético Glutâmico, Transaminase Pirúvico Glutâmico e Lactato de Desidrogenase no soro sanguíneo dos animais deste grupo, em relação aos do grupo de controle. Os autores avaliaram também o efeito hepatoprotetor da administração oral de extrato aquoso de própolis (EAP) em ratos com injúria de fígado, induzida pela administração de D-galactosamina (D-GalN) / Lipopolissacarídeo (LPS). Quando administrado a 100 e 200 mg/kg, o EAP reduziu os níveis de Transaminase Pirúvico Glutâmico no soro sanguíneo dos animais teste, em relação a seus controles, em 83 e 95%, respectivamente. Procedeu-se, ainda, estudo *in vitro* do efeito protetor de duas substâncias (metil 3,4-di-O-cafeoilquinato e ácido 3,4-di-O-cafeoilquínico) isoladas da fração mais ativa do extrato aquoso, sobre células de fígado de rato injuriadas pela administração de CCl₄, tendo ambas apresentado efeitos significativos. As atividades hepatoprotetoras do metil 3,4-di-O-cafeoilquinato (1 µm/mL) e de glicirrizina (10 µm/mL) foram as mesmas, sob condições experimentais similares.

BANSKOTA et al. (2001) examinaram o efeito hepatoprotetor de 24 constituintes isolados de extrato metanólico de própolis brasileira (EMP), em culturas primárias de

hepatócitos de fígado de camundongos injuriados pela administração de D-galactosamina (D-GalN)/Fator alfa de necrose tumoral (TNF- α). Entre os componentes testados, os flavonóides 3,5,7-triidroxi-4'-metoxiflavanol, betuletol, canferida e ermanina mostraram potentes efeitos inibitórios, com valores de CIM₅₀ abaixo de 25 μ M. Os componentes fenólicos prenilados, ácido 4-diidrocinamoiloxi-3-prenil cinâmico, ácido 4-hidroxi-3-prenilcinâmico e ácido 2,3-diidro-2-(1-metiletenil)-7-prenil-5-benzofurano]-2-propenóico apresentaram CIM₅₀ de 26.9, 34.6 e 15.2 μ M, respectivamente. Os diterpenos tipo labdanos, ácido isocuprêssico, ácido agático, ácido 15-acetoxiisocuprêssico e ácido cuprêssico apresentaram valores de CIM₅₀ de 94.4, 79.6, 80.2 e 44.1 μ M, respectivamente. Benzofuranos A e B, ambos isolados recentemente da própolis brasileira, mostraram valores de CIM₅₀ de 63.5 e 15.0 μ M, respectivamente. Alguns destes componentes apresentaram atividade hepatoprotetora mais efetiva que a da silibinina (CIM₅₀ 39,6 μ M), substância clinicamente utilizada em culturas primárias de células de fígado de camundongos, injuriadas pela administração de D-GalN/TNF- α .

CICALA et al. (2004) investigaram a atividade vascular, *in vitro*, do cafeto de fenetila (CAPE) na aorta torácica de ratos, demonstrando a atividade desta substância como vasorrelaxante. OZER, PALAKPINAR e ACET (2004) avaliaram a atividade do CAPE sobre infartos de miocárdio induzidos em ratos. Comparada ao grupo controle, a administração intravenosa de 50 μ M/kg de CAPE reduziu estatisticamente a relação volume de infarto miocárdial / área, na zona de risco, e a quantidade de infartos miocárdiais, mostrando ser esta substância uma importante redutora de danos miocárdiais e isquemias induzidas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Amostras

Amostra de própolis 1

Coletou-se própolis em apiário localizado na Serra do Japi (município de Cabreúva - SP), por raspagem de partes internas de colméias do tipo *Langstroth* (utilizadas em apicultura racional de abelhas *Apis mellifera*). Após separação de impurezas, acondicionou-se o material em recipiente fechado, ao abrigo da luz e em freezer doméstico.

Amostra de própolis 2

Com o intuito de se identificar a fonte botânica da própolis em estudo (vide subseção 3.2.6), coletou-se nova amostra, em mesmo apiário, porém pela raspagem de própolis depositada em abertura promovida lateralmente em uma das colméias. Após separação de impurezas, acondicionou-se o material em recipiente fechado, ao abrigo da luz e em freezer doméstico.

Amostra vegetal

A aproximadamente 20 metros da colméia da qual se retirou a *amostra de própolis 2*, coletaram-se partes da planta denominada regionalmente “vassourinha” ou “alecrim-do-campo”, com as quais procederam-se testes para identificação da fonte botânica utilizada na elaboração da própolis (consultar subseção 3.2.6).

3.1.2 Reagentes e Soluções

3.1.2.1 Reagentes utilizados em análises espectrofotométricas

Solução de cloreto de alumínio a 2,5%: pesaram-se 5,0 g de cloreto de alumínio (AlCl_3), que foram transferidos para balão volumétrico de 200 mL. Completou-se o volume do balão com água destilada e agitou-se a solução por alguns segundos.

Solução estoque de quercetina diidratada a 50 $\mu\text{g/mL}$: pesaram-se exatamente 50,00 mg de padrão de quercetina diidratada, que foram transferidos para balão volumétrico de 50 mL, contendo aproximadamente 30 mL de etanol PA. Levou-se a solução a ultra-som por 2 minutos e, em seguida, completou-se o volume do balão com o solvente. Transferiram-se 25 mL da solução obtida para um balão volumétrico de 50 mL e completou-se seu volume com o solvente. Após agitação, transferiu-se uma alíquota de 25 mL desta nova solução para balão volumétrico de 250 mL, completando-se o volume com etanol PA.

Reagente de Follin-Denis: adicionaram-se 20,0 g de tungstato de sódio, 4,0 g de ácido fosfomolibdico e 10 mL de ácido fosfórico em 150 mL de água destilada e levou-se a solução a refluxo. Transcorridas 2 horas, resfriou-se a solução a temperatura ambiente, seguida de diluição em balão volumétrico de 200 mL.

Solução de carbonato de sódio saturada: em 400 mL de água destilada aquecida a 80 °C, solubilizaram-se 140,0 g de carbonato de sódio anidro (Na_2CO_3). Deixou-se a solução resfriar por uma noite. Semearam-se, então, aproximadamente 10,0 g de carbonato de sódio anidro à solução que, após agitação, foi filtrada em lã de vidro.

Solução estoque de ácido gálico a 100 $\mu\text{g/mL}$: pesaram-se exatamente 50,0 mg de padrão de ácido gálico, que foram transferidos para um balão volumétrico de 500 mL, já contendo aproximadamente 200 mL de água destilada. Após vigorosa agitação, completou-se o volume do balão com o solvente.

3.1.2.2 Reagentes e soluções utilizados em ensaios de proliferação de fibroblastos

Meio de congelamento de células: preparou-se esta solução na proporção de 60 mL de *Dulbeccos's Modified Eagle Medium* para 30 mL de Soro Fetal Bovino e 10 mL de Glicerol. À solução resultante, adicionaram-se 400 mM de Glutamina, 10.000 UL de Penicilina, 10 mg de Estreptomicina e 2,5 µg de Anfotericina.

Meio de cultura celular (D10): preparou-se esta solução na proporção de 90 mL de *Dulbeccos's Modified Eagle Medium* para 10 mL de Soro Fetal Bovino. À solução resultante, adicionaram-se 400 mmol de Glutamina, 10.000 UL de Penicilina, 10 mg de Estreptomicina e 2,5 µg de Anfotericina.

Solução "STOP": a solução "STOP" foi obtida simplesmente juntando-se pequenos volumes restantes de soluções D10. Esta solução tem a função única de interromper a reação da tripsina 0,05% / EDTA 0,02%, em tampão fosfato (PBS) (veja subseção 3.2.7.1).

Rodamina B a 2% em formol 4% (m/v): diluíram-se 8,0 g de Rodamina B em 400 mL de Formol a 4%. Esta solução foi empregada para se realizar a coloração das células NIH 3T3, em ensaio qualitativo de proliferação celular (veja subseção 3.2.7.3).

Solução de MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio): adicionaram-se 21 mL de *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (DPBS) a um recipiente âmbar ao qual foram adicionados 42 mg de MTS em pó (PROMEGA CORPORATION, USA). Agitou-se a solução por 15 minutos (até a total diluição do reagente) e procedeu-se com filtração através de filtro esterilizado e âmbar de 0,2 µm. Finalmente, armazenou-se a solução ao abrigo da luz e a -20°C.

Solução PMS (metilsulfato de fenazina): adquirido de PROMEGA CORPORATION, USA.

3.1.3 Padrões Fitoquímicos

Padrões de flavonóides

- Acacetina (5,7-diidroxiflavanona-4'-metoxiflavona)
- Apigenina (5,7,4'-triidroxiflavona)
- Canferida (3,5,7-triidroxi-4-metoxiflavona)
- Canferol (3,5,7,4'-tetraidroxiflavona)
- Crisina (5,7-diidroxiflavona)
- Galangina (3,5,7-triidroxiflavona)
- Isorramnetina (3,5,7,4' -tetraidroxi-3'-metoxiflavona)
- Isossacuranetina (5,7-diidroxi-4'-metoxiflavanona)
- Naringenina (5,7,4'-triidroxiflavanona)
- Pinobancsina (3,5,7-triidroxiflavanona)
- Pinocembrina (5,7-diidroxiflavanona)
- Quercetina (3,5,7,3',4'-pentaoidroxiflavona)

Padrões de ácidos aromáticos e fenólicos

- Ácido cafeico (ácido 3-(3,4-diidroxifenil)-2-propenóico)
- Ácido trans-cinâmico (ácido 3-fenil-2-propenóico)
- Ácido clorogênico (ácido 3-dicafeoilquínico)

- Ácido gálico (ácido 3,4,5-triidroxibenzóico)
- Ácido ferúlico (ácido 3-(3-metóxi-4-hidroxifenil)-2-propenóico)
- Ácido benzóico
- Ácido p-cumárico (ácido 3-(4-hidroxifenil)-2-propenóico)
- Artepillin C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico)

3.1.4 Equipamentos

Espectrofotômetro - Shimadzu, Japan - modelo UV-1601, munido de cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico e acoplado a computador. Disponibilizado pelo Laboratório de Controle Físico-Químico de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos (FCF/USP).

Cromatógrafo líquido - SHIMADZU 10AD VP composto pelos seguintes módulos: forno CTO – 10A VP, duas bombas LCD – M 10AD VP, controlador SCL – 10A VP, degaseificador DGU – 14A, auto-injetor SIL – 10AD VP e detector de arranjo de diodos SPD – M 10A VP. Disponibilizado pelo Laboratório de Biofarmacotécnica (FCF/USP).

Capela de fluxo laminar* - GERMFREE Laboratories Incorporated BBF-455, USA.

Estufa de atmosfera controlada* - Queue Stabil Therm, Germany.

Centrífuga* - Eppendorf 5810 R, Germany.

Microscópio óptico invertido* - Nikon TMS, Japan.

Espectrofotômetro de placa de ELISA* - Dynatech MR 4000, acoplado a impressora.

* Disponibilizado pela Divisão de Química de Proteínas – Centro de Biologia Molecular – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.

3.2 MÉTODOS

As Figuras 3.1 e 3.2, a seguir, ilustram os experimentos levados a cabo com as diferentes amostras descritas na subseção 3.1.1.

FIGURA 3.1 - SEQUÊNCIA DE EXPERIMENTOS REALIZADOS COM A AMOSTRA DE PRÓPOLIS 1

FIGURA 3.2 - SEQUÊNCIA DE EXPERIMENTOS REALIZADOS A PARTIR DA AMOSTRA DE PRÓPOLIS 2 (a) E DA AMOSTRA VEGETAL (b)

3.2.1 Preparação dos Extratos

Optou-se pela preparação de dois tipos de extratos de própolis, utilizando-se a amostra de própolis 1 (subseção 3.1.1). Para se atender a necessidade que laboratórios têm de desenvolver análises para o controle de qualidade da própolis em um tempo reduzido, antes de iniciarem processos extrativos em escala industrial, preparou-se um extrato metanólico utilizando-se extrator Soxhlet. Por outro lado, com o intuito de se reproduzir um extrato comercial, popularmente utilizado, e com o qual foram desenvolvidos os testes biológicos neste trabalho, preparou-se extrato etanólico por maceração em temperatura ambiente, por noventa dias.

3.2.1.1 Extrato etanólico de própolis

Extraíram-se aproximadamente 900 g de própolis bruta, pulverizada, com 1875 mL de álcool de cereais (etanol). O processo extrativo empregado foi a maceração, com agitação diária de 1 minuto. Transcorridos 90 dias, filtrou-se o extrato obtido com auxílio de papel filtro e funil simples, acondicionando-se o filtrado em recipiente vedado e ao abrigo da luz.

Obtenção do resíduo seco do extrato etanólico

Retiraram-se 1.000 mL do extrato etanólico obtido e subdividiu-se este volume em três alíquotas, que foram concentradas, uma a uma, em rotaevaporador operando à pressão e temperatura médias de 450 mmHg e 75 °C, respectivamente. As alíquotas concentradas foram recolhidas em mesmo frasco, de vidro âmbar, posteriormente levado à estufa a 43 °C, onde permaneceu por 15 dias. Mediu-se a massa do resíduo seco obtido, que foi acondicionado ao abrigo de luz e umidade.

3.2.1.2 Extrato metanólico de própolis

Utilizou-se processo extrativo estudado por WOISKY (1996), que avaliou a eficácia de extração de própolis em extrator Soxhlet, tendo-se o metanol como solvente. Medindo a recuperação de quercetina, adicionada à própolis, o autor concluiu que o método foi satisfatório e levou ao quase esgotamento das substâncias fenólicas presentes na amostra.

Procedimento experimental

Pulverizou-se uma pequena quantidade de própolis bruta (amostra de própolis 1), resfriada em freezer, até que se obtivessem partículas finas. Colocaram-se aproximadamente 10 g do material obtido em cartucho preparado com papel filtro, previamente seco em estufa a 105° C, por uma hora, e pesado após resfriamento em dessecador. Antes do início da extração, protegeu-se a boca do cartucho com algodão. A o b alão d estinado a o s olvente, a dicionaram-se pedras d e p orcelana e aproximadamente 150 mL de metanol P.A. Montou-se o sistema e manteve-se a amostra sob refluxo, com auxílio de manta de aquecimento, por aproximadamente 8 horas. Após resfriamento do sistema, verteu-se o extrato em proveta de 200 mL, à qual foram adicionadas mais duas pequenas alíquotas de metanol, resultantes da lavagem do balão utilizado. Mediu-se, então, o volume final obtido e acondicionou-se o extrato em recipiente vedado e ao abrigo da luz. Repetiu-se este procedimento três vezes, com o intuito de se realizar as análises de *teor de cera* e de *resíduo insolúvel em metanol*, descritos à continuação.

Obtenção do resíduo seco do extrato metanólico

Eliminou-se o solvente (metanol PA) de aproximadamente 50 mL de cada extrato preparado por extrator soxhlet, já livre de cera (subseção 2.2.6). Inicialmente, concentraram-se os extratos em rotaevaporador operando à pressão e temperatura médias de 450 mmHg e 75 °C, respectivamente. Transferiu-se o extrato concentrado para um cadinho de porcelana e o conjunto fora levado à estufa a 70° C, por aproximadamente 4 horas. Acondicionou-se o resíduo seco ao abrigo de luz e umidade.

3.2.2 Exame Organoléptico

O exame organoléptico foi realizado pelo autor deste trabalho, tendo-se como parâmetros as análises sensoriais normalmente empregadas para se identificar amostras de própolis e que são definidas pelo Ministério da Agricultura (BRASIL, 2001). São elas: cor, sabor, consistência à temperatura ambiente e granulometria. “Desde que os caracteres organolépticos são avaliados por meio dos órgãos dos sentidos e assumem, portanto, um aspecto subjetivo, próprio do analista” (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1976), procurou-se expressar os resultados dentro das possibilidades descritas pelo Ministério da Agricultura, para própolis de distintas fontes vegetais.

3.2.3 Análises Gravimétricas

Excetuando-se a análise do teor de cinzas totais, realizado em Natural Labor - Análises e Pesquisas Ltda., todas as demais análises gravimétricas descritas a seguir foram realizadas no Laboratório de Farmacognosia do Departamento de Farmácia (FCF/USP).

3.2.3.1 Teor de cinzas

O método gravimétrico empregado para se medir o teor de cinzas da própolis bruta, descrito a seguir, foi baseado nas metodologias preconizadas em WORLD HEALTH ORGANIZATION (1998) e AOAC INTERNATIONAL (1997a), para drogas vegetais e alimentos de origem animal, respectivamente.

Procedimento experimental

Pesaram-se aproximadamente 2,0 g da *amostra de própolis 1* (subseção 3.1.1), pulverizada, em cadinho de porcelana previamente aquecido em mufla a 600 °C, por 2 horas, resfriado em dessecador e pesado. O conjunto foi posto sobre placa de aquecimento a 350 °C, em capela de exaustão, por uma hora (quando não havia mais emissão de fumaça). Em seguida, levou-se o conjunto à mufla a 600 °C, onde permaneceu até que as cinzas se apresentassem brancas. Resfriou-se o conjunto em dessecador, seguido de pesagem. Repetiu-se, com intervalos de 1 hora, o processo de aquecimento em mufla a 600 °C, resfriamento e pesagem do conjunto até se atingir massa constante (quando a diferença entre duas pesagens consecutivas não excedeu 5,0 mg). Este procedimento foi realizado uma única vez, em triplicata. Calcularam-se a média aritmética e o desvio padrão do experimento.

Cálculo do teor de cinzas:

$$TC = \frac{(M_2 - Mc)100}{M_1}$$

Onde:

TC: Teor de cinzas (em porcentagem, sobre a massa da amostra bruta);

Mc: Massa do cadinho;

M₁: Massa inicial de própolis colocada no cadinho;

M₂ - Massa final de cadinho com as cinzas, após a calcinação.

3.2.3.2 Perda por dessecação a 105°C

O método gravimétrico empregado para se medir a perda por dessecação da própolis bruta, descrito a seguir, foi baseado nas metodologias preconizadas na Farmacopéia Brasileira (1998), em WORLD HEALTH ORGANIZATION (1998) e em EUROPEAN PHARMACOPOEIA (2002), para drogas vegetais.

Procedimento experimental

Pesaram-se aproximadamente 3,0 g de *amostra de própolis 1* (subseção 3.1.1), pulverizada, em cadinho de porcelana previamente aquecido em estufa a 105°C, por 2 horas, resfriado em dessecador e pesado. Aqueceu-se o conjunto em estufa por 3 horas, a 105°C. Resfriou-se em dessecador, seguido de pesagem. Repetiu-se, com intervalos de 2 horas, o processo de aquecimento, resfriamento e pesagem do conjunto até se atingir massa constante (quando a diferença entre duas pesagens consecutivas não excedeu 5,0 mg). Este procedimento foi realizado uma única vez, em triplicata. Calcularam-se a média aritmética e o desvio padrão do experimento.

Cálculo do teor da perda por dessecação:

$$PD = \frac{M_1 - (M_2 - Mc)100}{M_1}$$

Onde:

PD: Perda por dessecação (em porcentagem, sobre a massa da amostra bruta);

Mc: Massa do cadinho;

M₁: Massa inicial de própolis colocada no cadinho;

M₂: Massa final de cadinho com o resíduo, após aquecimento a 105°C.

3.2.3.3 Resíduo insolúvel em metanol (massa mecânica)

O método gravimétrico empregado para se medir o quanto da amostra de própolis é insolúvel em metanol, descrito a seguir, foi baseado na metodologia indicada por COSTA (1982), para drogas vegetais. Porém, utilizou-se, aqui, extração por Soxhlet ao invés de maceração a quente e com refluxo, conforme indica o autor.

Procedimento experimental

Colocou-se o cartucho utilizado na extração por Soxhlet (subseção 3.2.1.2), contendo substâncias não solubilizadas em metanol, sobre vidro de relógio e levou-se o conjunto à capela de exaustão, onde permaneceu por 1 hora para evaporação do excesso de solvente. Levou-se, então, o conjunto à estufa pré-aquecida a 105 °C, por 2 horas. Resfriou-se o conjunto em dessecador e pesou-se o cartucho isoladamente. Repetiu-se o processo de aquecimento, resfriamento e pesagem do cartucho com intervalos de 1 hora, até se atingir massa constante (quando a diferença entre duas pesagens consecutivas não excedeu 5,0 mg). Este procedimento foi realizado três vezes, em dias diferentes, com o intuito de se fazer uma análise estatística do experimento, contemplando média aritmética e desvio padrão.

Cálculo do teor de resíduo insolúvel:

$$RI = \frac{(M_3 - Mc)100}{Mi}$$

Onde:

RI: Teor de resíduo insolúvel (em porcentagem, sobre a massa da amostra bruta);

Mc: Massa do cartucho seco utilizado na extração;

Mi: Massa inicial da amostra de própolis utilizada na extração;

M₃: Massa final do cartucho contendo os resíduos insolúveis de própolis após secagem.

3.2.3.4 Teor de cera

O método gravimétrico empregado para se medir o teor de cera da própolis, descrito a seguir, baseia-se na metodologia utilizada por MATSUDA (2002).

Procedimento experimental

Levou-se o extrato metanólico, obtido por extração em Soxhlet (subseção 2.2.1.2), à geladeira por 24 horas e posteriormente ao freezer por trinta minutos. Filtrou-se a solução em funil de Buchner sob vácuo a aproximadamente 400 mm Hg. Lavou-se a cera depositada sobre o filtro com metanol PA resfriado, até sua clarificação. Mediu-se, então, o volume de extrato livre de cera, que foi acondicionado em recipiente de vidro vedado.

Levou-se o conjunto filtro/cera à capela de exaustão, por 1 hora, para eliminação do excesso do solvente. Depositou-se o conjunto em estufa pré-aquecida a 105 °C, por 2 horas. Resfriou-se em dessecador e pesou-se. Repetiu-se, com intervalos de 1 hora, o processo de aquecimento, resfriamento e pesagem do material até se atingir massa constante (quando a diferença entre duas pesagens consecutivas não excedeu 5,0 mg). Este procedimento foi realizado três vezes, em dias diferentes, com o intuito de se fazer uma análise estatística do experimento, contemplando média aritmética e desvio padrão.

Cálculo do teor de cera:

$$TC = \frac{(M_4 - M_p)100}{M_i}$$

Onde:

TC: Teor de cera (em porcentagem, sobre a massa da amostra bruta);

M_p: Massa do papel de filtro seco em estufa;

M_i: Massa inicial de própolis utilizado na extração em Soxhlet;

M₄: Massa final do papel de filtro com cera, após secagem.

3.2.3.5 Sólidos solúveis em metanol e em etanol

O método gravimétrico empregado para se medir o resíduo seco do extrato metanólico e do extrato etanólico de própolis, descrito a seguir, está baseado em metodologias indicadas pelo INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1976) e pela EUROPEAN PHARMACOPOEIA (2000), para determinação de resíduo seco de extratos.

Procedimento experimental

Transferiu-se uma alíquota de 5,0 mL do extrato metanólico, livre de cera (subseção 3.2.3.4), ou do extrato etanólico (subseção 3.2.1.1) , para cápsula de porcelana seca (aquecida em estufa a 105°C, por duas horas, resfriada em dessecador e pesada). Levou-se o conjunto à estufa, pré-aquecida a 105 °C, onde permaneceu por duas horas. Após resfriamento em dessecador, pesou-se o conjunto. Repetiu-se, com intervalos de 1 hora, o processo de aquecimento, resfriamento e pesagem do conjunto até se atingir massa constante (quando a diferença entre duas pesagens consecutivas não excedeu 5,0 mg). Este procedimento foi realizado uma única vez, em triplicata. Calcularam-se a média aritmética e o desvio padrão do experimento.

Cálculo do teor de sólidos solúveis:

$$SS = \frac{(M_5 - Mc)100}{M_1}$$

Onde:

SS: Teor de sólidos solúveis (em porcentagem, sobre a massa da amostra bruta);

M_5 : Massa final do cadinho com o resíduo seco;

Mc : Massa do cadinho utilizado;

M_1 : massa de própolis bruta extraída, correspondente à alíquota de 5,0 mL.

3.2.4 Análises Espectrofotométricas

As análises espectrofotométricas, descritas a seguir, foram realizadas no Laboratório de Controle Físico-Químico de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos do Departamento de Farmácia (FCF/USP).

3.2.4.1 Teor de flavonóides totais

Os procedimentos descritos abaixo foram baseados em VENNAT et al. (1992) e WOISKY e SALATINO (1998), aos quais acrescentou-se a construção da curva de Ringbom para a quercetina diidratada, obtida segundo EWING (1972) e GARCIA (2004). Este experimento baseia-se na propriedade do cátion alumínio de formar complexos estáveis com flavonóides em metanol, ocorrendo, na análise espectrofotométrica, um deslocamento para maiores comprimentos de onda e uma intensificação de suas absorções.

Construção da curva de Ringbom para quercetina diidratada

Transferiram-se alíquotas de 1,0 a 20 mL (de 1 em 1 mL) da solução estoque de quercetina, a 50 µg/mL, para balões volumétricos de 25 mL, contendo 1,0 mL de solução aquosa de cloreto de alumínio a 2,5% (*Materias* – subseção 3.1.2.1). Ajustou-se o volume final de cada balão com etanol PA e agitou-se por alguns segundos. Para o branco do sistema, transferiu-se 1,0 mL de solução aquosa de cloreto de alumínio a 2,5% para balão volumétrico de 25 mL, completando seu volume com etanol PA e agitando-se a solução por alguns segundos. Decorridos 30 minutos, fez-se a leitura de cada solução a 425 nm, em espectrofotômetro. Procedeu-se a construção do gráfico de concentração de quercetina versus absorbância das soluções a 425 nm, com o intuito de se observar o intervalo de linearidade da curva em função de um possível desvio do equipamento ou do esgotamento do reagente cloreto de alumínio.

Construção da curva de calibração para quercetina diidratada

Para a construção da curva padrão da quercetina, elegeram-se os pontos que estivessem simultaneamente dentro da faixa de linearidade da curva de Ringbom construída e entre as absorvâncias 0,2 e 0,9 nm.

Preparação das amostras de própolis

a) Solução estoque: Pesaram-se, em Béquer, aproximadamente 100 mg de resíduo seco do extrato metanólico (subseção 3.2.1.2). Adicionaram-se 5,0 mL de etanol PA ao recipiente e após solubilização do resíduo seco, transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 50 mL. Lavou-se o béquer com mais três alíquotas de 5,0 mL, que foram adicionadas ao balão. Completou-se seu volume com etanol PA, obtendo-se, assim, solução estoque a 2,0 mg/mL.

b) Quantificação na amostra: Transferiram-se, com auxílio de pipeta volumétrica, 2,0 mL da solução estoque para balão volumétrico de 25 mL. Acrescentou-se 1,0 mL de solução aquosa de cloreto de alumínio a 2,5% e completou-se o seu volume com etanol PA, agitando-se a solução por alguns segundos. Decorridos 30 minutos, fez-se a leitura da solução conforme descrito para a construção da curva de Ringbom da quercetina diidratada. Este procedimento foi realizado uma única vez para cada solução estoque, em triplicata. Calculou-se a média aritmética das absorvâncias, com a qual efetuou-se o cálculo do teor de flavonóides totais na amostra, pela equação da curva padrão da quercetina diidratada. Calculou-se, ainda, o desvio padrão de cada experimento.

3.2.4.2 Teor de fenóis totais

Os procedimentos descritos abaixo foram baseados na FARMACOPÉIA BRASILEIRA (2002), em WATERMAN e MOLE (1994) e em AOAC INTERNATIONAL (1997b), para análises de teor de substâncias fenólicas em droga vegetal, aos quais acrescentou-se a construção da curva de Ringbom para o ácido gálico, obtida segundo EWING (1972) e GARCIA (2004). O método utilizado baseia-

se em uma reação de óxido-redução, onde o íon fenolato é oxidado em meio alcalino, enquanto reduz o complexo fosfotúngstico-fosfomolibdico no reagente para uma solução azul (o cromóforo).

Construção da curva de Ringbom para o ácido gálico

Transferiram-se alíquotas de 1,0 a 20 mL (de 1 em 1 mL) de solução estoque de ácido gálico, preparada na concentração de 100 µg/mL, para balões volumétricos de 100 mL, já contendo aproximadamente 70 mL de água destilada. Adicionaram-se 5,0 mL do reagente de Folin-Denis e, após 2 minutos, 10 mL de solução de carbonato de sódio saturada (*MATERIAIS* – subseção 3.1.2.1). Ajustou-se o volume de cada balão e promoveu-se agitação por inversões sucessivas dos mesmos. O branco do sistema foi preparado exatamente da mesma forma, porém sem a alíquota da amostra. Deixou-se cada solução em repouso, à temperatura ambiente, e decorridos precisamente 30 minutos fez-se sua leitura em espectrofotômetro, a 760 nm. Procedeu-se a construção de um gráfico de concentração de ácido gálico versus absorbância das soluções a 760 nm, com o intuito de se observar o intervalo de linearidade da curva em função de um possível desvio do equipamento ou do esgotamento do reagente de Folin-Denis.

Construção da curva de calibração do ácido gálico

Para a construção da curva padrão do ácido gálico, elegeram-se os pontos que estivessem simultaneamente dentro da faixa de linearidade da curva de Ringbom construída e entre as absorbâncias 0,2 e 0,8 nm.

Preparação das amostras de própolis

a) Solução estoque: pesaram-se, em Béquer, aproximadamente 200 mg do resíduo seco do extrato metanólico de própolis (subseção 3.2.1.2). Adicionaram-se 5,0 mL de metanol PA ao recipiente que, após solubilização do resíduo, foram transferidos para um balão volumétrico de 100 mL. Lavou-se o béquer com mais uma alíquota de 5,0 mL de metanol, que foi adicionada ao balão. Completou-se seu volume com água destilada, obtendo-se, assim, a solução estoque a 2,0 mg/mL.

b) Quantificação de fenólicos: transferiram-se, com auxílio de pipeta volumétrica, 3,0 mL da solução estoque para balão volumétrico de 100 mL, já contendo aproximadamente 70 mL de água destilada. Adicionaram-se 5,0 mL do reagente de Folin-Denis e, após 2 minutos, 10 mL de solução de carbonato de sódio saturada. Ajustou-se o volume do balão e promoveu-se agitação por inversões sucessivas do mesmo. Deixou-se a solução em repouso, à temperatura ambiente, e decorridos precisamente 30 minutos fez-se sua leitura em espectrofotômetro a 760 nm. Este procedimento foi realizado uma única vez para cada solução estoque, em triplicata. Calculou-se a média aritmética das absorbâncias, com a qual efetuou-se o cálculo do teor de fenólicos totais na amostra, pela equação da curva padrão do ácido gálico. Calculou-se, ainda, o desvio padrão de cada experimento.

3.2.4.3 Precipitação com pó de pele

Este experimento fundamenta-se em propriedade comum a substâncias fenólicas que, segundo HARBORNE (1984), formam complexos com proteínas, por meio de ligações de hidrogênio. Os procedimentos adotados aqui são adaptações de experimentos preconizados por COSTA (1982) e pela FARMACOPÉIA BRASILEIRA (BRASIL, 2002), para a quantificação de taninos em drogas vegetais.

a) Solução estoque: preparou-se a solução estoque de própolis a partir do resíduo seco do extrato etanólico de própolis (veja 3.2.1.1) , segundo os mesmos procedimentos descritos em 3.2.4.2a. Em seguida, procedeu-se a quantificação de substâncias fenólicas presentes na solução, segundo metodologia descrita em 3.2.4.2b.

b) Reação dos fenólicos com pó de pele: transferiram-se 50 mL da solução estoque para um béquer, ao qual adicionou-se 0,5 g de pó de pele (Merck, Germany). Com auxílio de peixinho e misturador, promoveu-se agitação constante da solução por 1 hora. Filtrou-se o precipitado com lã de vidro e recolheu-se o filtrado para quantificação de substâncias fenólicas não adsorvidas em pó de pele.

c) Quantificação de fenólicos não adsorvidos pelo pó de pele: transferiram-se, com auxílio de pipeta volumétrica, 3,0 mL do filtrado obtido para balão volumétrico de 100 mL, já contendo aproximadamente 70 mL de água destilada. Adicionaram-se, então, 5,0 mL do reagente de Folin-Denis e, após 2 minutos, 10 mL de solução de carbonato de sódio. Ajustou-se o volume do balão, seguido de homogeneização por inversões sucessivas do mesmo. Deixou-se a solução em repouso e decorridos precisamente 30 minutos fez-se sua leitura em espectrofotômetro a 760 nm. Este procedimento foi realizado uma única vez, em triplicata. A partir da média aritmética das absorbâncias e da equação que descreve a curva de calibração do ácido gálico (3.2.4.2), calculou-se a concentração de substâncias fenólicas presentes no filtrado, ou seja, aquelas que não adsorveram em pó de pele. Calculou-se, ainda, o desvio padrão do experimento.

d) Quantificação de substâncias fenólicas precipitadas com pó de pele: calculou-se a porcentagem de substâncias fenólicas adsorvidas ao pó de pele a partir das concentrações de substâncias fenólicas presentes na solução estoque de própolis e no filtrado, como mostra a equação abaixo.

Cálculo da porcentagem de substâncias adsorvidas em pó de pele:

$$AD = \frac{(C_1 - C_2)100}{C_1}$$

onde:

AD: Adsorção ao pó de pele (em porcentagem, sobre a concentração inicial da solução estoque)

C₁: concentração de substâncias fenólicas presentes na solução estoque, antes da reação com pó de pele;

C₂: concentração de substâncias fenólicas da solução estoque, após reação com pó de pele (no filtrado).

3.2.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE

Todas as análises em aparelho CLAE, descritos na seção 3.2.5 e 3.2.6, foram realizadas no Laboratório de Biofarmacotécnica (FCF/USP).

Com o intuito de identificar e quantificar substância fenólica presentes na amostra de própolis em estudo, utilizou-se a técnica Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE ou HPLC). Esta técnica vem sendo utilizada com sucesso por outros autores na análise de amostras de própolis de diferentes origens geográficas e também na análise de outros produtos ricos em substâncias fenólicas.

Confrontaram-se os extratos de própolis, obtidos por maceração (em etanol) e por soxhlet (em metanol), conforme descrito em 3.2.1, contra padrões puros de substâncias fenólicas, sendo eles os flavonóides pinobancsina, canferida, isossacuranetina, canferol, pinocembrina, acacetina, isorramnetina, galangina, quercetina, apigenina, naringenina e crisina e os ácidos cafeico, *trans*-cinâmico, clorogênico, gálico, ferúlico, benzóico, *para*-cumárico e artepillin C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico).

Utilizou-se como fase estacionária uma coluna C-18, modelo SHIM-PACK CLC-ODS (M), com dimensões de 250 x 4,6 mm e como fase móvel os solventes água ultra-pura – ácido acético (19:1) (A) e Metanol (B), formando-se um sistema comumente empregado para análise de substâncias fenólicas em produtos vegetais . Utilizou-se fluxo constante e igual a 1,0 mL/min, distribuído no sistema gradiente primeiramente utilizado por ALENCAR (2002): 70% de A no instante inicial da corrida, decrescendo para 60%, aos 15 minutos, e para 50%, aos 30 minutos. Continuou decrescendo até atingir 40% de A, aos 45 minutos, e 25% de A, aos 65 minutos, permanecendo nesta proporção até os 85 minutos da corrida. Decresce até atingir 10% de A, aos 95 minutos. Aos 105 minutos, inicia um crescimento até 70% de A, permanecendo nesta proporção até os 115 minutos.

Os volumes injetados de soluções de própolis e de padrões foram de 20 µl, sendo que as primeiras foram preparadas diluindo-se 150 mg de resíduo seco (subseções 3.2.1.1 e 3.2.1.2) e em 5,0 mL de metanol, seguidas de filtração e membrana de

teflon com porosidade de 0,45 μm . Manteve-se o forno à temperatura constante de 32 °C.

Procedeu-se a identificação dos picos de cada cromatograma com base em seus tempos de retenção, visualizados a 280 e 340 nm (MARCUCCI; FERRERES; CUSTÓDIO, 2000), bem como comparando-se seus espectros (entre 250 e 350 nm) com o espectro do padrão correspondente, ou seja, aquele que apresentou o mesmo tempo de retenção nas mesmas condições cromatográficas.

A quantificação de cada substância identificada foi realizada tomando-se como base a curva concentração versus área, com no mínimo de 5 pontos, construída para cada padrão (BANKOVA; POPOV; MAREKOV, 1982). As áreas dos picos foram calculadas pelo programa SHIMADZU CLASS VP. Com o intuito de se minimizar possíveis influências externas, prepararam-se séries de corridas cromatográficas para as diferentes concentrações de cada padrão, seguidas das amostras de própolis a serem quantificadas.

3.2.6 Identificação da Fonte Botânica da Própolis

A metodologia descrita a seguir vem sendo empregada na identificação de fontes botânicas de própolis e baseia-se na comparação dos perfis cromatográficos do extrato de própolis e de sua suposta fonte vegetal. BANKOVA et al (1999), KUMAZAWA et al. (2003) e PARK et al. (2004) indicaram ser o “alecrim-do-campo” ou “vassourinha” a principal fonte botânica de amostras de própolis da região sudeste do Brasil, de tal forma que esta espécie foi o alvo inicial neste trabalho de identificação da fonte botânica das amostras de própolis em estudo.

Preparação de exsicata

Com o intuito de se identificar botanicamente a planta denominada regionalmente “vassourinha” ou “alecrim-do-campo”, com qual viria a se preparar o extrato de seus brótos apicais, procedeu-se a montagem de exsicata segundo OLIVEIRA e AKISSUE (1989). Para tanto, preparou-se um conjunto, chamado pasta, disposta da

seguinte maneira: entre duas armações de madeira, de dimensões 42 x 28cm, colocaram-se folhas de papelão do mesmo tamanho e entre as folhas de papelão acomodaram-se folhas de jornal; dobradas de tal forma a terem as mesmas dimensões do restante do material. Coletaram-se ramos floridos, galhos com folhas e pedaços do caule, de mesmo indivíduo, que foram distribuídas, um a um, entre as dobras dos papéis de jornal. Montou-se a exsicata intercalando-se uma folha de papelão com uma folha de jornal dobrada (em cujo interior havia parte da planta), finalizando-se o conjunto por uma folha de papelão. Entre as duas extremidades da pilha montada dispuseram-se as armações de madeira, prensando-se o conjunto com o auxílio de uma corda bem tencionada. O material foi rotulado, contendo as seguintes informações:

Data de coleta: 01.02.04.

Nome do coletor: Cristiano Soleo de Funari.

Local de coleta: Rodovia dos Romeiros, km 23,5; Sítio Dra. Abelha, a 700 m da Rodovia -Cabreúva - SP

Nome vulgar da planta: "vassourinha" ou "alecrim-do-campo".

Cor das flores: esbranquiçada.

Cor das folhas: verde.

Porte: aproximadamente 2,2 m.

Habitat: localizada em clareira com solo pedregoso.

Finalmente, secou-se o conjunto em forno com circulação de ar, aquecido a aproximadamente 50 °C.

Preparação do extrato vegetal

Coletaram-se brotos apicais do indivíduo que teve sua exsicata preparada, identificando-se o material e acondicionando-o em recipiente fechado e em freezer doméstico. Os extratos foram preparados por extrator soxhlet, tendo-se o metanol como líquido extrator, segundo as metodologias descritas na subseção 3.2.1.2, intituladas “extrato metanólico de própolis” e “resíduo seco do extrato metanólico”.

Preparação de extrato de própolis

No mesmo dia em que se realizou a coleta do material vegetal, promoveu-se a abertura lateral de uma das colméias de apiário, localizada a aproximadamente 20 metros do indivíduo que deu origem à exsicata. Decorridos 10 dias, retornou-se ao local e raspou-se a própolis depositada pelas abelhas na abertura promovida (*amostra de própolis 2* – subseção 3.1.1), garantindo-se, assim, que a própolis coletada foi produzida pelas abelhas na mesma época em que a amostra vegetal foi coletada. Procedeu-se a extração e secagem desta nova amostra, segundo metodologias utilizadas para a preparação do extrato vegetal, descrito acima.

Comparações fitoquímicas entre o extrato vegetal e o extrato de própolis

Realizaram-se as análises do extrato vegetal e do novo extrato de própolis, preparados segundo descrito acima, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). A metodologia utilizada está descrita em detalhes na subseção 3.2.5. Compararam-se os cromatogramas obtidos para se verificar possíveis semelhanças em seus perfis.

Identificação botânica da fonte das amostras de própolis

Após se constatar grande semelhança entre os cromatogramas obtidos a partir dos extratos de própolis e da planta, encaminhou-se a exsicata do indivíduo ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, a fim de se ter sua identidade botânica conhecida.

3.2.7 Ação da Própolis, *in vitro*, sobre Fibroblastos de Camundongo (NIH-3T3)

Os ensaios descritos nesta seção foram realizados em parceria com a Dra. Mônica Beatriz Mathor, pesquisadora do Centro de Tecnologia das Radiações – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), nos laboratórios da Divisão de Química de Proteínas - Centro de Biologia Molecular - IPEN.

Todos os procedimentos descritos nesta subseção foram realizados em ambiente descontaminado. A manipulação das células foi feita em capela de fluxo laminar, descontaminada em luz ultravioleta, por 15 minutos, antes de se iniciar cada experimento.

3.2.7.1 Preparação das células

Descongelaram-se células NIH-3T3 (mantidas em “meio de congelamento de células”, a -190 °C) em banho-maria, a 37 °C. Imediatamente, transferiu-se o conteúdo para um tubo de funco cônico contendo aproximadamente 5,0 mL de “meio de cultura celular” (D10). Centrifugou-se a solução resultante a 1500 rpm, por 5 minutos, aspirou-se a solução sobrenadante e adicionou-se nova alíquota de D10 sobre as células depositadas ao fundo do recipiente. Homogeneizou-se a solução, que foi, então, transferida para garrafa de cultura celular e incubada em estufa de atmosfera controlada a 37 °C, 5% CO₂ e 95% de umidade relativa, por 72 horas. Após constatar-se o crescimento das células, as mesmas foram suspendidas com a adição de solução tripsina 0,05% / EDTA 0,02%, que foi inativada pela adição de “solução STOP” imediatamente após verificar-se a sua ação. A solução resultante foi transferida para um novo tubo e submetida a centrifugação. A solução sobrenadante foi aspirada, permanecendo as células ao fundo do tubo, sobre as quais adicionou-se 1,0 mL de D10. Valendo-se de uma câmara de NEUBAUER e de microscópio invertido, fez-se a contagem das células.

Ajustou-se a concentração da solução final para aproximadamente 40.000 células/mL.

FIGURA 3.3 - FIBROBLASTOS DE CAMUNDONGO (CÉLULAS NIH 3T3) UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS

3.2.7.2 Preparação das soluções teste e controle

a) Solução estoque de própolis

Preparou-se solução estoque na concentração de 100 mg/mL, solubilizando-se o extrato etanólico seco de própolis (*Métodos*, subseção 3.2.1.1) em polietilenoglicol 400 (PEG 400).

b) Soluções mãe

Transferiu-se uma alíquota da solução estoque, descrita acima, ou seu volume correspondente de solvente puro, para dois tubos de fundo cônico, previamente esterilizados por radiação γ e contendo solução D10. Obtiveram-se, assim, duas soluções mãe (uma solução teste e uma solução controle).

c) Diluições seriadas – Soluções teste e controle

A partir de cada uma das duas soluções mãe, descritas em 3.2.7.2b, promoveram-se diluições seriadas 1:2 em D10, num total de 11 diluições (sendo 11 soluções teste e 11 soluções controle para cada solvente). Entre alguns poços, realizaram-se diluições 1:1,5.

3.2.7.3 Experimento A - análise qualitativa

Iniciou-se o trabalho de avaliação da influência da própolis sobre células NIH 3T3 por análise qualitativa (visual), para se estimar as melhores condições de trabalho, tais como a faixa de concentração de própolis que demonstrasse sua ação sobre as células e o solvente mais apropriado para se dispersar a própolis em meio de cultura celular (testaram-se os solventes polietilenoglicol 400 e dimetilsulfóxido). Após o estabelecimento destes parâmetros, passou-se a realizar análises quantitativas, em paralelo (conforme descrito mais adiante, na subseção 3.2.7.4).

Procedimento experimental

Transferiu-se uma alíquota (contendo aproximadamente 20.000 células) da solução descrita na subseção 3.2.7.1 para cada poço de placa Multi-Well 24 e, quando necessário, completou-se o volume para 0,5 mL com solução D10. Incubou-se a placa em estufa de atmosfera controlada a 37°C, com 5% de CO₂ e 95% de umidade relativa, por 24 horas.

Decorrido este período, adicionou-se 0,5 mL de cada uma das soluções teste e controle (subseção 3.2.7.2c) em cada um dos 22 poços teste e controle. Em dois poços, tomados como controle negativo, simplesmente adicionou-se nova alíquota de 0,5 mL da solução D10. Neste arranjo têm-se 11 pontos teste e 11 poços controle, dispostos uns sobre os outros no sentido vertical da placa, e 02 poços controle negativo, ao final da mesma. Finalmente, incubou-se a placa em estufa de atmosfera controlada e observou-se o comportamento das células periodicamente.

Aos primeiros poços atingirem a semi-confluência das células, aplicou-se o método qualitativo de coloração das células aderidas aos fundos dos poços da placa, conforme descrito por MATHOR et al. (1996). Para tanto, aspiraram-se as soluções dos poços e lavaram-se os mesmos com solução de cloreto de sódio a 0,9% (objetivou-se, aqui, remover as células mortas, que poderiam interferir na análise). Procedeu-se com a adição de aproximadamente 0,2 mL da solução corante rodamina B a 2% em formol 4% em cada poço (volume suficiente para recobrir totalmente o fundo dos poços), promovendo-se o contato células/corante por aproximadamente 20 minutos. Por fim, descartou-se o volume sobrenadante da solução corante em recipiente apropriado e lavaram-se os poços com água corrente. Após secagem das placas ao ar livre, pôde-se visualizar a intensidade e distribuição das células aderidas ao fundo dos poços.

3.2.7.4 Experimento B - análise quantitativa

Com o intuito de se quantificar a proliferação das células, aplicou-se o método colorimétrico intitulado *CellTiter 96® - Ensaio Aquoso Não Radioativo de Proliferação Celular* (PROMEGA CORPORATION, 2001), que tem o seguinte princípio:

O sal 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS) é biorreduzido pelas enzimas desidrogenases, encontradas nas células ativas de fibroblastos (NIH 3T3), a um produto (formazana) que é solúvel no meio de cultura celular e que absorve fortemente a 490 nm (Figura 3.4). Desta forma, a absorbância da formazana pode ser medida diretamente nos poços da placa Multi-Well 96, sem nenhum processo adicional. A quantidade de formazana medida pela absorbância da solução a 490 nm é diretamente proporcional ao número de célula vivas, em cultura (PROMEGA CORPORATION, 2001).

FIGURA 3.4 - ESTRUTURAS DO MTS E DA FORMAZANA

Preparação das soluções MTS/PMS em D10

Descongelaram-se as soluções de MTS e PMS (*MATERIAIS*, subseção 3.1.2.2) em banho-maria a 37°C, por 10 minutos. Para se obter solução suficiente para uma placa de 96 poços, transferiram-se 2,0 mL de solução MTS para um tubo de fundo cônico contendo 10,5 mL de meio de cultura celular (D10). Em seguida, adicionaram-se 100 microlitros de solução PMS e agitou-se a solução vigorosamente.

Execução do ensaio proliferativo

Transferiu-se uma alíquota correspondente a aproximadamente 1.000 células da solução descrita na subseção 3.2.7.1 para 93 poços de placa Multi-Well 96 (sendo 3 *brancos*). Completou-se o volume para 50 µL, com D10, e incubou-se a placa em estufa de atmosfera controlada a 37°C, com 5% de CO₂ e 95% de umidade relativa, por 24 horas.

Decorrido este período, adicionaram-se 50 µL das soluções teste e controle, resultantes das diluições descritas na subseção 3.2.7.2c, aos poços da placa, que foram divididos em triplicatas. Nos três poços tomados como “controle negativo”, simplesmente adicionaram-se 50 µL de solução D10, enquanto que nos 3 poços tomados como “branco” adicionaram-se 100 µL de D10. Finalmente, incubou-se a placa em estufa de atmosfera controlada, observando-se o comportamento das células periodicamente.

Decorridas 72 horas, aspiraram-se as soluções contidas nos poços da placa e adicionaram-se alíquotas de 120 μ L da solução MTS/PMS em D10 em todos os 96 poços da mesma, que foi imediatamente acondicionada em estufa mantida a 37°C, com 5% de CO₂ e 95% de umidade relativa. Após duas horas, tomou-se a primeira medida das absorvâncias dos poços, a 490 nm, em espectrofotômetro de placa de ELISA acoplado a impressora. Incubou-se novamente a placa e tomaram-se mais três leituras, com intervalos de 1 hora.

A fim de se comparar o comportamento das células em contato com as soluções teste, controle e controle negativo, construiu-se gráfico de “concentração de própolis versus absorvância”, sendo que o valor da absorvância utilizada para a construção do gráfico corresponde à média da triplicata (estes gráficos pode, ser vistos no Apêndice 1).

3.2.7.4.1 Análises estatísticas

A fim de se conhecer o comportamento das células NIH 3T3, quando em meios de cultura contendo diferentes concentrações de própolis, em relação a seus controles, procedeu-se a análise estatística com os dados obtidos em 8 ensaios experimentais, realizados segundo procedimentos descritos na subseção 3.2.7.4.

a) Organização dos dados

Os dados foram analisados como as porcentagens de células vivas nos poços teste (T_i) e controle (C_i), em relação aos controles negativos ($\bar{C}$ - poços contendo somente meio de cultura), expressando a “viabilidade das células”. Estes valores são expressos como a razão da absorvância lida em cada poço (teste ou controle), pela média da triplicata das absorvâncias de seus respectivos poços controle negativo, em porcentagem ($T_i/\bar{C} \cdot 100$ e $C_i/\bar{C} \cdot 100$). Este tipo de arranjo permite a comparação interensaios, pois embora os valores absolutos de absorvâncias possam variar significativamente entre ensaios, para uma mesma diluição (em função de pequenas variações no número de células semeadas inicialmente no poço e da vitalidade das

mesmas, já que foram testadas células com diferentes graus de manipulação em laboratório – “passagens”), o comportamento daquele ponto de diluição em relação a seu respectivo controle negativo deve manter-se.

b) Estimativa do erro do experimento e do desvio padrão, para cada ponto

Fez-se a estimativa do erro por meio do cálculo do desvio padrão relativo (DPR) das determinações, de acordo com a fórmula 3. O desvio padrão do método (DP), calculado pela fórmula 2, é a dispersão de uma medida experimental em torno do valor médio e depende da dimensão dos dados. O DPR apresenta esta dispersão em porcentagem e em relação à média dos dados, permitindo uma melhor visualização do desvio do método. Tanto o DP quanto o DPR são uma estimativa da precisão do método (BOX; HUNTER; HUNTER, 1978). Nas fórmulas 2 e 3, x_i é o valor experimental para a i -ésima amostra, $\bar{x}$ é o valor médio das determinações e n equivale ao número de determinações.

$$DP = \frac{\sum_i^n (x_i - \bar{x})^2}{n} \quad (2)$$

$$DPR = \frac{\left(\frac{\sum_i^n (x_i - \bar{x})^2}{n} \right)}{\bar{x}} \times 100\% \quad (3)$$

Os cálculos do DP e DPR foram feitos para as triplicatas de cada experimento, separadamente, e para o conjunto total dos dados, em cada concentração.

c) Cartas de controle

As cartas de controle são utilizadas para detectar amostras anômalas num processo. Para a construção de uma carta de controle é necessário estimar o valor médio e o desvio padrão de um número significativo de determinações experimentais, em geral entre 20 e 30 replicatas. De posse do valor médio e do desvio padrão, calcula-se então os limites de controle (LC) com grau de confiança de 99%, segundo a fórmula 4. Amostras que encontram-se dentro dos limites de controle estão dentro do

comportamento esperado, e amostras que encontram-se fora destes limites apresentam comportamento significativamente diferente das amostras referência. Costuma-se chamar de amostras de referência aquele conjunto de amostras (entre 20 e 30 replicatas) que foram utilizadas para a construção das cartas de controle (BOX; HUNTER; HUNTER, 1978).

$$LC_{99\%} = \bar{x} \pm 3DP \quad (4)$$

Neste caso, as amostras de referência foram as razões das absorbâncias lidas em cada poço controle pela média da triplicata das absorbâncias de seus respectivos poços “controle negativo”, em porcentagem ($C_i/\bar{C} \cdot 100$). Para se atingir o número necessário de replicatas para a construção dos limites de controle, em cada diluição, procedeu-se esta análise com o conjunto das taxas $T_i/\bar{C} \cdot 100$ e $C_i/\bar{C} \cdot 100$, obtidas em todos os 8 ensaios. Objetivou-se, aqui, verificar se houve incremento no crescimento das células ou toxicidade estatisticamente significativos provocados pelas amostras teste ($T_i/\bar{C} \cdot 100$), em relação a seus respectivos controles ($C_i/\bar{C} \cdot 100$).

4. RESULTADOS

4.1 EXAME ORGANOLÉPTICO

A Tabela 4.1 traz as características sensoriais detectadas em exame organoléptico, realizado com a amostra de própolis obtida por raspagem das partes internas de colméias tipo *Langstroth* (consulte *MATERIAIS E MÉTODOS*, subseções 3.1.1 e 3.2.2).

TABELA 4.1 - CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS DA AMOSTRA DE PRÓPOLIS 1

CARACTERÍSTICA	RESULTADOS
Aroma	Resinoso e intenso
Cor	Esverdeada
Sabor	Forte e picante
Consistência à temperatura ambiente	Rígida
Granulometria	Pedaços heterogêneos

4.2 ANÁLISES GRAVIMÉTRICAS

4.2.1 Teor de Cinzas, Perda por Dessecação a 105°C, Resíduo Insolúvel em MeOH, Teor de Cera e Sólidos Solúveis

A Tabela 4.2, a seguir, reúne os resultados das análises gravimétricas descritas na seção *Materiais e Métodos*, subseções 3.2.3.1 a 3.2.3.5.

TABELA 4.2 - VALORES DE TRÊS REPLICATAS (R), MÉDIA E DESVIO PADRÃO (DP), EM % (M/M), PARA AS ANÁLISES GRAVIMÉTRICAS REALIZADAS COM A AMOSTRA DE PRÓPOLIS 1

EXPERIMENTO	R1	R2	R3	MÉDIA ± DP	REQUISITO DO MINISTÉRIO ⁽¹⁾
Teor de Cinzas	3,1527	3,1538	3,0454	3,1173 ± 0,0627	Máximo de 5%
Perdas por Dessecação	10,8640	10,9762	11,0053	10,9485 ± 0,0746	Máximo de 8%
Massa Mecânica	32,7249	37,9562	34,9925	35,2245 ± 2,6234	⁽²⁾ Máximo de 40%
Teor de Cera	2,4435	2,0338	2,2918	2,2564 ± 0,2071	Máximo de 25%
Sólidos Solúveis em Metanol	51,9619	54,8221	54,4188	53,7343 ± 1,5481	-
Sólidos Solúveis em Etanol	38,7864	38,7653	37,4746	38,3421 ± 0,7513	Mínimo de 35%

(1) Limites propostos pelo Ministério da Agricultura (BRASIL, 2001).

(2) Este limite é estabelecido para extrações em etanol.

4.3 ANÁLISES ESPECTROFOTOMÉTRICAS

4.3.1 Teores de Flavonóides e Fenóis Totais

A Figura 4.1, a seguir, traz a curva de Ringbom e a curva de calibração, com seu respectivo coeficiente de correlação, para a quercetina diidratada e para o ácido gálico. A Tabela 4.3 contém os valores de absorbância coletados nos ensaios espectrofotométricos, para a *amostra de própolis 1*, e os teores de flavonóides e fenóis calculados segundo descrito na seção *MATERIAIS E MÉTODOS*, subseções 3.2.4.1 e 3.2.4.2.

FIGURA 4.1 - CURVAS DE RINGBOM E DE CALIBRAÇÃO, COM SEUS RESPECTIVOS COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO, PARA QUERCETINA DIIDRATADA E ÁCIDO GÁLICO

TABELA 4.3 - ABSORBÂNCIAS (ABS), DESVIOS PADRÃO (DP) E TEORES DE FENÓIS E FLAVONÓIDES TOTAIS, POR CENTO, SOBRE A MASSA DE PRÓPOLIS BRUTA QUE DEU ORIGEM AO EXTRATO METANÓLICO (M/M)

ANÁLISE	ABS 1	ABS 2	ABS 3	MÉDIA ± DP	TEOR (%)	REQUISITO DO MINISTÉRIO ⁽¹⁾
Fenóis Totais	0,6873	0,6866	0,6855	0,6865 ± 0,0009	7,3932	Mínimo de 5,0 %
Flavonóides Totais	0,5760	0,5740	0,5747	0,5749 ± 0,0010	2,6435	Mínimo de 0,5 %

(1) Requisito do Ministério da Agricultura (BRASIL, 2001).

4.3.2 Precipitados com Pó de Pele

As concentrações de substâncias fenólicas em solução de própolis a 2,0 mg/mL, antes e após contato com pó de pele, bem como as medidas experimentais que permitiram seus cálculos, são apresentadas na Tabela 4.4 (*MATÉRIAS E MÉTODOS*, subseção 3.2.4.3). A partir destas concentrações calculou-se a porcentagem de substâncias fenólicas adsorvidas ao pó de pele, que foi de **68,1347%**.

TABELA 4.4 - ABSORBÂNCIAS (ABS), MÉDIAS, DESVIOS PADRÃO (DP) E CONCENTRAÇÕES DE FENÓIS TOTAIS EM SOLUÇÃO ESTOQUE DE PRÓPOLIS, PREPARADA A PARTIR DE EXTRATO ETANÓLICO SECO, ANTES E APÓS CONTATO COM PÓ DE PELE

CONTATO COM PÓ DE PELE	ABS 1	ABS 2	ABS 3	MÉDIA $\pm$ DP	FENÓIS ⁽¹⁾ ($\mu\text{g/mL}$)
Antes	0,6083	0,6101	0,6027	0,6070 $\pm$ 0,0038	7,1821
Após	0,2496	0,2389	0,2284	0,2390 $\pm$ 0,0106	2,2886

(1) calculadas como equivalentes de ácido gálico, a partir da equação da reta da Figura 4.1.

4.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA - CLAE

Os cromatogramas obtidos a partir dos resíduos etanólico e metanólico de própolis (*MATERIAIS E MÉTODOS*, subseção 3.2.5) são apresentados nas Figuras 4.2 e 4.3. As substâncias identificadas estão assinaladas sobre os cromatogramas, seus tempos de retenção são transcritos nas legendas das Figuras e seus teores estão indicados na Tabela 4.5. A Figura 4.4 traz as estruturas planas das substâncias identificadas.

FIGURA 4.2 - CROMATOGRAMAS DO RESÍDUO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS 1, OBTIDO POR MECERAÇÃO, A 280 E 340 NM

1. Ácido Clorogênico (Rt: 4,851); 2. Ácido Cafeico (Rt: 6,773); 3. Ácido *para*-Cumárico (Rt: 10,506); 4. Ácido Ferúlico (Rt: 11,500); 5. Ácido *trans*-Cinâmico (Rt: 27,818); 6. Canferol (Rt: 37,926); 7. Isossacuranetina (Rt: 48,452); 8. Canferida (Rt: 56,936); 9. Artepillin C (Rt: 71,136)

FIGURA 4.3 - CROMATOGRAMAS DO RESÍDUO METANÓLICO DE PRÓPOLIS 1, OBTIDO POR EXTRATOR SOXHLET, A 280 E 340 NM

1. Ácido Clorogênico (Rt: 4,851); 2. Ácido Cafeico (Rt: 6,773); 3. Ácido *para*-Cumárico (Rt: 10,506); 4. Ácido Ferúlico (Rt: 11,500); 5. Ácido *trans*-Cinâmico (Rt: 27,818); 6. Canferol (Rt: 37,926); 7. Isossacuranetina (Rt: 48,452); 8. Canferida (Rt: 56,936); 9. Artepillin C (Rt: 71,136)

TABELA 4.5 - SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS NOS RESÍDUOS METANÓLICO E ETANÓLICO DE PRÓPOLIS E SUAS RESPECTIVAS QUANTIDADES, EM RELAÇÃO À MASSA DA PRÓPOLIS BRUTA (PB)

SUBSTÂNCIA	RESÍDUO ETANÓLICO		RESÍDUO METANÓLICO	
	mg/g PB	% PB	mg/g PB	% PB
Artepillin C	34,0264	3,4026	54,8718	5,4872
Ácido <i>p</i> -cumárico	6,4144	0,6414	11,6326	1,1633
⁽¹⁾ Ácido ferúlico	+	+	+	+
Ácido <i>trans</i> -cinâmico	0,5637	0,0563	0,8123	0,0812
Ácido clorogênico	2,1422	0,2142	4,5826	0,4582
Ácido cafeico	0,4438	0,0444	0,3767	0,0377
Canferol	0,8583	0,0858	1,1965	0,1196
Canferida	6,3529	0,6353	9,4540	0,9454
Isossacuranetina	1,2797	0,1280	1,7020	0,1702
TOTAL	52,0814	5,2081	84,6285	8,4628

(1) Não se obteve resolução suficiente que permitisse sua quantificação.

FIGURA 4.4 - ESTRUTURAS DAS SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS POR CLAE

(1) Canferol; (2) Canferida; (3) Isossacuranetina; (4) Ácido *trans*-Cinâmico; (5) Ácido *para*-Cumárico, (6) Ácido Cafeico; (7) Ácido Ferúlico; (8) Artepillin C; (9) Ácido Clorogênico.

4.5 IDENTIFICAÇÃO DA FONTE BOTÂNICA DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS

Nas Figuras 4.5, 4.6, 4.7 e 4.8, são apresentados os cromatogramas obtidos por *Cromatografia Líquida de Alta Eficiência* para os extratos elaborados a partir das amostras de própolis 1 e 2 e para o extrato vegetal (*MATERIAIS E MÉTODOS*, subseção 3.2.6). Com o intuito de facilitar a comparação entre eles, dispôs-se, em cada Figura, o cromatograma do extrato vegetal sobre o da própolis, numerando-se os picos correspondentes, ou seja, aqueles que indicam substâncias com mesmo tempo de retenção.

FIGURA 4.5 - CROMATOGRAMAS CLAE A 280 NM, OBTIDOS A PARTIR DO EXTRATO DA AMOSTRA VEGETAL E DO EXTRATO METANÓLICO PREPARADO COM AMOSTRA DE PRÓPOLIS 2

NOTA: Números iguais correspondem a picos com mesmos tempos de retenção.

FIGURA 4.6 - CROMATOGRAMAS CLAE A 340 NM, OBTIDOS A PARTIR DO EXTRATO DA AMOSTRA VEGETAL E DO EXTRATO METANÓLICO PREPARADO COM A AMOSTRA DE PRÓPOLIS 2

NOTA: Números iguais correspondem a picos com mesmos tempos de retenção.

FIGURA 4.7 - CROMATOGRAMAS CLAE A 280 NM, OBTIDOS A PARTIR DO EXTRATO DA AMOSTRA VEGETAL E DO EXTRATO METANÓLICO PREPARADO COM A AMOSTRA A DE PRÓPOLIS 1

NOTA: Números iguais correspondem a picos com mesmos tempos de retenção.

FIGURA 4.8 - CROMATOGRAMAS CLAE A 340 NM, OBTIDOS A PARTIR DO EXTRATO DA AMOSTRA VEGETAL E DO EXTRATO METANÓLICO PREPARADO COM A AMOSTRA DE PRÓPOLIS 1

NOTA: Números iguais correspondem a picos com mesmos tempos de retenção.

Identificação botânica da fonte das amostras de própolis

A acentuada similaridade observada entre os cromatogramas obtidos para a amostra vegetal e aqueles obtidos para as amostras de própolis, expressada nas Figuras 4.5 a 4.8, nos indica que a espécie vegetal analisada foi a principal fonte botânica na elaboração da própolis em estudo. A partir da exsicata preparada o indivíduo foi, então, identificado como ***Baccharis dracunculifolia* DC.** (Compositae)³.

FIGURA 4.9 - FOTOS DO INDIVÍDUO QUE FOI IDENTIFICADO COMO *Baccharis dracunculifolia* DC. (vassourinha)

³ O material Voucher está depositado no Herbário do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (C.S. de Funari 01 (SPF))

4.6 AÇÃO DA PRÓPOLIS, *IN VITRO*, SOBRE FIBROBLASTOS DE CAMUNDONGO (NIH-3T3)

4.6.1 Experimento A - Análise Qualitativa

Foram realizados 20 experimentos de análise qualitativa de proliferação de fibroblastos, onde variaram-se o solvente da solução inicial de própolis (soluções estoque), a concentração da solução de própolis em contato com as células e a quantidade de células semeadas em cada poço da placa Multi-Well de 24 poços. A seguir serão mostrados os resultados que apresentaram melhor fixação do corante nas células, ausência de contaminação microbiana e que seguiram os procedimentos descritos em *MATERIAIS E MÉTODOS*, subseções 3.2.7.1 a 3.2.7.3.

As Figuras 4.10 e 4.11, à continuação, mostram os resultados da coloração dos fibroblastos de camundongos (células NIH 3T3) que estiveram em contato com soluções teste (preparadas a partir de solução estoque em PEG 400) ou com suas respectivas soluções controle.

FIGURA 4.10 - CÉLULAS NIH 3T3 P18 (I) E P17 (II), CORADAS COM RODAMINA 2% EM FORMOL 4%, APÓS INCUBAÇÃO COM SOLUÇÕES TESTE (I-O) OU COM SUAS RESPECTIVAS SOLUÇÕES CONTROLE (Ic-Oc) E CONTROLE NEGATIVO (CONT-)

NOTA: A: 2.000 $\mu\text{g/mL}$; B: 1.000 $\mu\text{g/mL}$; C: 500 $\mu\text{g/mL}$; D: 250 $\mu\text{g/mL}$; E: 125 $\mu\text{g/mL}$; F: 62,50 $\mu\text{g/mL}$; G: 31,250 $\mu\text{g/mL}$; H: 15,625 $\mu\text{g/mL}$; I: 7,812 $\mu\text{g/mL}$; J: 3,906 $\mu\text{g/mL}$; J1: 2,929 $\mu\text{g/mL}$; K: 1,953 $\mu\text{g/mL}$; K1: 1,465 $\mu\text{g/mL}$; L: 0,977 V; L1: 0,732 $\mu\text{g/mL}$; M: 0,488 $\mu\text{g/mL}$; M1: 0,366 $\mu\text{g/mL}$; N: 0,244 $\mu\text{g/mL}$; O: 0,122 $\mu\text{g/mL}$.

FIGURA 4.11 - CÉLULAS NIH 3T3 P16 (III) E P15 (IV), CORADAS COM RODAMINA 2% EM FORMOL 4%, APÓS INCUBAÇÃO COM SOLUÇÕES TESTE (I - O) OU COM SUAS RESPECTIVAS SOLUÇÕES CONTROLE (Ic - Oc) E CONTROLE NEGATIVO (CONT-)

NOTA: I: 7,812 $\mu\text{g/mL}$; J: 3,906 $\mu\text{g/mL}$; J1: 2,929 $\mu\text{g/mL}$; K: 1,953 $\mu\text{g/mL}$; K1: 1,465 $\mu\text{g/mL}$; L: 0,977 $\mu\text{g/mL}$; L1: 0,732 $\mu\text{g/mL}$; M: 0,488 $\mu\text{g/mL}$; M1: 0,366 $\mu\text{g/mL}$; N: 0,244 $\mu\text{g/mL}$; O: 0,122 $\mu\text{g/mL}$.

A Figura 4.10 mostra claramente que a própolis foi extremamente tóxica às células na faixa de concentrações que vai de 2,0 mg/mL (A) a 125 µg/mL (E), sendo que esta toxidez diminui gradativamente entre as concentrações 62,5 µg/mL (F) e 31,25 µg/mL (G). A partir do ponto H (Figuras 4.10 e 4.11), torna-se difícil dizer se há ou não toxidez das soluções de própolis às células, o que é elucidado pelas análises quantitativas, apresentadas à continuação.

4.6.2 Experimento B – Análise Quantitativa

Foram realizados oito ensaios quantitativos, segundo procedimentos descritos em *Materiais e Métodos*, subseção 3.2.7.4, com concentrações de própolis variando de 125,00 a 0,122 µg/mL. O resultado de cada ensaio pode ser consultado no Apêndice 1, sendo que nesta seção apresentaremos os resultados interexperimentos, por serem aqueles que permitem a avaliação estatística do comportamento das células.

A Tabela 4.6 e a Figura 4.12, à continuação, representam o comportamento geral dos fibroblastos de camundongo (células NIH 3T3) em contato com as soluções teste e controle, sendo que o valor lido na ordenada (y) é a média de todas as replicatas dos experimentos (21 replicatas para os pontos J1, K1, L1 e M1 e 24 para os demais pontos), em cada diluição, expressadas na forma da razão entre a absorbância lida em cada poço (teste ou controle), pela leitura média da triplicata de seus respectivo poços controle negativo, em porcentagem ($T/C \cdot 100$ e $C/C \cdot 100$). Esta relação expressa a porcentagem de células vivas, em cada ponto, em relação a seu controle negativo.

TABELA 4.6 - MÉDIAS DOS DADOS DE 8 EXPERIMENTOS QUANTITATIVOS DE CULTURA DE CÉLULAS NIH 3T3 E SEUS RESPECTIVOS DESVIOS PADRÕES RELATIVOS (DPR)

DILUIÇÃO	[C] TESTE ($\mu\text{g/mL}$)	MÉDIA TESTE ⁽¹⁾	DPR (%)	MÉDIA CONTROLE ⁽²⁾	DPR (%)
E	125,0	2,3265	66,5261	98,0227	11,9664
F	62,5	18,9946	47,5412	96,3556	14,7913
G	31,25	54,6189	26,6130	89,1280	16,6010
H	15,625	88,1037	19,5763	94,1694	13,3750
I	7,8125	105,5543	12,3568	91,4731	13,2194
J	3,9062	110,1001	12,7034	87,1116	17,5510
J1	2,9297	106,9351	10,7966	92,5730	12,1557
K	1,9531	106,4459	11,1088	91,5918	15,5459
K1	1,4648	103,6995	8,9809	92,4317	13,5235
L	0,9766	101,0270	13,3890	93,4697	14,9921
L1	0,7324	105,2349	9,82350	98,4850	11,9021
M	0,4883	94,1289	12,3997	100,3113	14,6517
M1	0,3662	87,8378	14,9836	103,4841	14,4744
N	0,2441	89,2662	14,5220	101,7932	12,6379
O	0,1221	93,0212	10,9388	99,1926	12,6750

(1) Expressadas como a razão entre a absorbância lida em cada poço teste pela média da triplicata de seu respectivo controle negativo, em porcentagem ($T/C \cdot 100$). Esta relação expressa a viabilidade das células.

(2) Expressadas como a razão entre a absorbância lida em cada poço controle pela média da triplicata das absorbâncias de seus respectivos poços "controle negativo", em porcentagem ($C/C \cdot 100$). Esta relação expressa a viabilidade das células.

FIGURAS 4.12 - VIABILIDADE DAS CÉLULAS SUBMERSAS EM SOLUÇÕES TESTE (T) E CONTROLE (C), EM RELAÇÃO A SEUS RESPECTIVOS CONTROLES NEGATIVOS (C⁻)

NOTA: Cada ponto do gráfico representa a média das replicatas de oito ensaios (para as soluções teste: diluição E: 125 µg/mL; F: 62,50 µg/mL; G: 31,250 µg/mL; H: 15,625 µg/mL; I: 7,812 µg/mL; J: 3,906 µg/mL; J1: 2,929 µg/mL; K: 1,953 µg/mL; K1: 1,465 µg/mL; L: 0,977 V; L1: 0,732 µg/mL; M: 0,488 µg/mL; M1: 0,366 µg/mL; N: 0,244 µg/mL; O: 0,122 µg/mL).

Análise estatística

As cartas de controle, com intervalos de confiança de 99% (Figura 4.13), de mostraram haver um efeito tóxico da própolis a concentrações de 125 µg/mL (E), 62,50 µg/mL (F), em relação a seus controles, pois as replicatas $T/C^- \times 100$ de todos os ensaios estiveram fora do limite inferior deste ponto. O ponto 31,250 µg/mL (G) também pode ser considerado tóxico, tendo-se em vista que mesmo trabalhando com intervalo de confiança de 99%, metade das replicatas posicionou-se fora do limite inferior. A Figura 4.12 nos permite observar, ainda, que a própolis a 125 µg/mL (ponto E) eliminou aproximadamente 98% das células em relação aos controles negativos, sendo que esta toxidez diminuiu gradativamente nas concentrações 62,50µg/mL(F) e 31,250µg/mL (G), com eliminação de aproximadamente 80% e 45% das células, respectivamente. A partir do ponto de concentração 15,625 µg/mL (H) até o ponto 0,122 µg/mL (O), não foram observadas diferenças de comportamento estatisticamente significativas entre soluções teste e seus respectivos controles, pois as soluções teste estiveram dentro dos limites das soluções controle, como pode ser observado na Figura 4.13.

FIGURA 4.13 - CARTAS DE CONTROLE PARA SOLUÇÕES TESTE, EM RELAÇÃO A SEUS RESPECTIVOS CONTROLES, COM INTERVALOS DE CONFIANÇA DE 99%

continua

FIGURA 4.13 - CARTAS DE CONTROLE PARA SOLUÇÕES TESTE, EM RELAÇÃO A SEUS RESPECTIVOS CONTROLES, COM INTERVALOS DE CONFIANÇA DE 99%

conclusão

NOTA: Pontos teste - E: 125 $\mu\text{g/mL}$; F: 62,50 $\mu\text{g/mL}$; G: 31,250 $\mu\text{g/mL}$; H: 15,625 $\mu\text{g/mL}$; I: 7,812 $\mu\text{g/mL}$; J: 3,906 $\mu\text{g/mL}$; J1: 2,929 $\mu\text{g/mL}$; K: 1,953 $\mu\text{g/mL}$; K1: 1,465 $\mu\text{g/mL}$; L: 0,977 V; L1: 0,732 $\mu\text{g/mL}$; M: 0,488 $\mu\text{g/mL}$; M1: 0,366 $\mu\text{g/mL}$; N: 0,244 $\mu\text{g/mL}$; O: 0,122 $\mu\text{g/mL}$.

5. DISCUSSÃO

5.1 EXAME ORGANOLÉPTICO

O exame de caracteres organolépticos da própolis merece atenção, pois pode indicar o caminho analítico a se seguir ou até mesmo permitir deduções prévias de algumas características físico-químicas da amostra. De fato, a própria compra da própolis por entrepostos comerciais de produtos apícolas é feita, muitas vezes, somente pela análise destes caracteres, tendo-se em conta a origem geográfica da amostra. Por exemplo, a própolis esverdeada (chamada *green propolis*), típica de algumas localidades da região sudeste do Brasil, é a mais bem cotada no mercado, sugerindo que há uma relação entre sua cor e sua composição química, rica em ácidos fenólicos. A consistência à temperatura ambiente também pode dar indícios da relação resina/cera na própolis, que possui estes dois tipos de material em sua composição. Assim, apresentando-se rígida, como no caso da amostra investigada aqui (Tabela 4.1), pode indicar um elevado teor de resinas, o que é desejável, pois as atividades biológicas constatadas para a própolis vêm sendo atribuídas a substâncias contidas nesta fração. Apresentando-se maleável, pode indicar um elevado teor de cera, o que é indesejável. Por sua vez, aroma e sabor podem indicar se a amostra é nova ou se foi produzida pelas abelhas há muito tempo, o que tornaria estas características menos acentuadas. Finalmente, amostra em pedaços maiores (análise granulométrica), além de permitir a execução dos demais testes organolépticos, torna mais fácil a visualização de materiais estranhos, como terra e areia, que poderiam ser incorporados à própolis em pó para “aumentar sua massa”, caracterizando uma violação do material. O conjunto de caracteres sensoriais observados para a amostra estudada neste trabalho (cor esverdeada, rígida à temperatura ambiente, com aroma intenso, sabor forte e picante e em pedaços heterogêneos, como pode ser observado na Tabela 4.2) nos possibilitou esperar determinados resultados das análises gravimétricas, espectrofotométricas e cromatográficas, que demonstram ser uma amostra rica em ácidos fenólicos (Tabelas 4.3 e 4.5) e com baixos teores de ceras e de cinzas (Tabela 4.2).

5.2 ANÁLISES GRAVIMÉTRICAS

Excetuando-se a análise de perda por dessecação a 105 °C, todos os demais parâmetros estão dentro dos limites preconizados pelo Ministério da Agricultura, em seu regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis (BRASIL, 2001).

A determinação do “teor de cinzas” é particularmente importante para amostra de própolis, principalmente se comercializada em pó, pois esta análise pode indicar uma possível adulteração do material pela adição de impurezas, como terra, por exemplo, ou mesmo de resíduo de própolis já extraída (WOISKY, 1996).

Desde que a própolis é uma mistura complexa, contendo resinas, bálsamos e cera, além de outros componentes, e que os principais componentes fenólicos (comumente mencionados como seus princípios ativos) não estão presentes na cera, sua quantificação na amostra torna-se um parâmetro importante. Assim, faz-se desejável o menor teor de cera na amostra (o que pode sinalizar para um elevado teor de resinas).

Já os parâmetros “massa mecânica” e “resíduo seco” estão relacionados com a solubilidade da amostra em um determinado solvente. Desta forma, quanto maior o resíduo seco obtido a partir de um extrato de própolis e, ao contrário, quanto menor a massa mecânica calculada sobre a matéria-prima que originou aquele extrato, mais solúvel é a amostra bruta, o que é desejável. A Tabela 4.2 mostra que a maior eficiência extrativa foi alcançada com extrator Soxhlet, tendo-se o metanol como solvente, em relação ao processo de extração por maceração, com álcool de cereais.

O resultado da análise “perda por dessecação” excedeu o limite estabelecido pelo Ministério da Agricultura (BRASIL, 2001), provavelmente, por tratar-se de uma amostra altamente aromática, como foi constatado em exame organoléptico. Desta forma, a amostra deve conter em abundância outras classes de substâncias

volatilizáveis 105 °C, além de água. Para se conhecer o real teor de umidade, crítico para a conservação de amostras de própolis, um teste por destilação com tolueno, por exemplo, poderia ser realizado.

5.3 ANÁLISES ESPECTROFOTOMÉTRICAS

5.3.1 Teor de Flavonóides Totais

O experimento utilizado para quantificação de flavonóides totais (*MATERIAIS E MÉTODOS*, 3.2.4.1) baseia-se na propriedade do cátion alumínio de formar complexos estáveis com flavonóides em metanol, ocorrendo, na análise espectrofotométrica, um deslocamento para maiores comprimentos de onda (deslocamento batacrômico) e uma intensificação de suas absorções (WOLLENWEBER; JAY, 1988). Desta forma, é possível se determinar a quantidade de flavonóides, evitando-se a interferência de outras classes de substâncias fenólicas, principalmente a dos ácidos fenólicos (WOISKY; SALATINO, 1998; MARCUCCI; WOISKY; SALATINO, 2003).

O valor encontrado de 2,64% de flavonóides totais, expressos como equivalentes de quercetina diidratada, está próximo ao valor reportado por BONVEHÍ e COLL (1994), para amostra de própolis brasileira (3,00%), e dentro das faixas de valores encontrados por WOISKY e SALATINO (1998) e MORI (1997), em amostras de própolis do estado de São Paulo (0,77 - 2,69% e 0,67 – 1,19%, respectivamente), sendo que todos estes autores utilizaram método espectrofotométrico baseado na reação de flavonóides com cloreto de alumínio. No entanto, BONVEHÍ e COLL (1994) quantificaram, paralelamente, o teor de flavonóides pela técnica CLAE, chegando ao valor de 18,10% (m/m) para a mesma amostra, aproximadamente seis vezes maior que o obtido pelo primeiro método.

Experimentos realizados por CHANG et al. (2002) demonstram ser o método de quantificação espectrofotométrica de flavonóides pela reação com cloreto de

alumínio específico para flavonóis e flavonas, o que poderia levar a valores subestimado do teor de flavonóides totais em amostras de própolis, desde que esta contenha também outras classes de flavonóides. Os autores quantificaram uma amostra de própolis brasileira por este método, atingindo um teor de 3,26% de flavonóides totais. Paralelamente, determinaram seu teor de flavonóides pelo método colorimétrico de complexação de flavonóides com 2,4-dinitrofenilidrazina que, segundo os autores, mostrou-se específico para flavanonas, atingindo o valor de 7,12%. Desta forma, sugerem que estes dois experimentos sejam realizados em paralelo e que o valor de flavonóides totais seja calculado como a soma dos dois resultados, já que cada método quantificaria flavonóides de classes distintas.

MARCUCCI, WOISKY e SALATINO (2003) afirmam ser o método de quantificação espectrofotométrica de flavonóides pela reação com cloreto de alumínio preciso e reprodutível, ainda que pouco exato (geralmente fornece valores inferiores ao real), apresentando desvios muito pequenos ou nulos entre um ensaio e outro, realizados com a mesma amostra, sendo indicado para o controle de qualidade de própolis. WOISKY e SALATINO (1998) salientam, ainda, a relevância deste método por poder ser utilizado por laboratórios desprovidos de aparelhos mais sofisticados.

Pelas observações de BONVEHÍ e COLL (1994), CHANG et al. (2002) e MARCUCCI, WOISKY e SALATINO (2003), apresentadas acima, e pelo o fato de se ter identificado o flavonóide isossacuranetina neste trabalho, pertencente à subclasse das flavanonas (Figuras 4.2 e 4.3 e Tabela 4.5), vê-se um indício de que o valor obtido pode estar subestimado. Ainda assim, segundo os parâmetros do Ministério da Agricultura (BRASIL, 2001), a amostra em estudo é classificada como contendo um “alto teor de flavonóides”. Desde que amostras de própolis de zonas temperadas, como Europa, por exemplo, podem conter acima de 20% destas substâncias (MARCUCCI; BANKOVA, 1999), nota-se que esta classificação é relativa e leva em conta somente a faixa de teores de flavonóides comumente encontrados em amostras brasileiras, utilizando-se o método de reação de flavonóides com cloreto de alumínio (de fato, este método é indicado pelo Ministério).

A curva de Ringbom, obtida para a quercetina diidratada (Figura 4.1), mostra que a relação concentração versus absorvância é linear até aproximadamente 1,8 nm. Porém, com o intuito de se trabalhar o mais próximo possível do intervalo recomendado pela lei de Lambert-Beer, elegeu-se somente uma faixa desta curva (veja curva de calibração da quercetina, Figura 4.1) como referência para o cálculo do teor de flavonóides na amostra de própolis.

5.3.2 Teor de Fenóis Totais

O método utilizado para o cálculo do teor de substâncias fenólicas totais (*MATERIAIS E MÉTODOS*, 3.2.4.2) baseia-se em uma reação de óxido-redução, onde o íon fenolato é oxidado em meio alcalino, enquanto reduz o complexo fosfotúngstico-fosfomolibdico no reagente para uma solução azul (o cromóforo), que absorve fortemente a 760 nm. O preparo do reagente de Folin-Denis é bastante simples e, segundo WATERMAN e MOLE (1994), este é o método mais comumente utilizado para doseamento de fenóis totais. Segundo os mesmos autores, um dos problemas do método é a formação ocasional de um precipitado branco, que impossibilitaria a medida espectrofotométrica, o que não foi observado no ensaio realizado neste trabalho.

A curva de Ringbom, construída para o ácido gálico (Figura 4.1), mostra uma relação linear entre a concentração do padrão e a absorvância até aproximadamente 0,8. Isto indica que a partir de 10 µg/mL há um total consumo do reagente de Folin-Denis em contato com o ácido gálico, uma vez que, conforme constata-se na construção da curva de Ringbom da Quercetina Diidratada (Figura 4.1), não se verificam desvios do espectrofotômetro até absorvâncias de 1,8 (utilizou-se o mesmo aparelho em ambos os experimentos). Portanto, verificamos aqui que uma suposta leitura de solução contendo substâncias fenólicas (como a solução de própolis), cujo valor estivesse ligeiramente acima da curva de calibração estabelecida (ilustrada na Figura 4.1), poderia levar a uma estimativa do teor de fenóis totais extremamente falsa.

O teor de fenólicos totais encontrado, de 7,39% (Tabela 4.3), atende ao requisito mínimo do Ministério da Agricultura (BRASIL, 2001), porém parece estar subestimado se comparado com os resultados encontrados nos ensaios onde se utilizou a técnica CLAE (*RESULTADOS E COMENTÁRIOS*, subseção 4.4). Somente a somatória dos teores de substâncias fenólicas identificadas no extrato metanólico, excetuando-se o ácido ferúlico, cuja separação apenas parcial não permitiu sua quantificação, atingiu 8,38% sobre a massa bruta da amostra de própolis. Alguns picos bastante pronunciados (Figuras 4.2 e 4.3) não foram identificados ou quantificados e poderiam corresponder a substâncias fenólicas, uma vez que as detecções foram feitas em comprimentos de ondas onde esta classe de substâncias absorve fortemente. Isto pode indicar uma sensibilidade parcial do método de Folin-Denis às substâncias fenólicas presentes no extrato de própolis.

Reforça esta hipótese o fato de que WOISKY (1996) encontrou entre 7,05 e 9,29% (m/m) de substâncias fenólicas em própolis coletadas em diferentes cidades do estado de São Paulo, aplicando o mesmo método espectrofotométrico (porém utilizando a quercetina como substância de referência), enquanto que utilizando o método de reação de substâncias fenólicas com o reagente de Follin-Ciocalteu, tendo-se o ácido gálico como substância de referência, chegou a valores entre 9,49 e 13,72%, para as mesmas amostras. BONVEHÍ e COLL (1994) encontraram 18,72% (m/m) de substâncias fenólicas em amostra de própolis brasileira (valor que supera o encontrado neste trabalho em mais de 150%), estando abaixo dos valores encontrados para amostras do Uruguai e China, empregando método espectrofotométrico com o reagente de Follin-Ciocalteu.

GONZÁLEZ et al. (2003) mediram os teores de substâncias fenólicas em própolis de diferentes regiões da Argentina por três métodos colorimétricos distintos, tendo encontrado os maiores valores para as análises em que se empregou o reagente de Follin-Ciocalteu e o ácido gálico como substância de referência (entre 3,25 e 33,49%). KUMAZAWA, HAMASAKA e NAKAYAMA (2004) compararam os teores de substâncias fenólicas de própolis de diferentes origens geográficas (África do Sul, Argentina, Austrália, Brasil, Bulgária, Chile, China, Estados Unidos, Hungria, Nova Zelândia, Tailândia, Ucrânia, Uruguai, Uzbequistão), por método espectrofotométrico, tendo a amostra brasileira apresentado teor inferior a 50% das

demais amostras, estando acima somente das amostras oriundas da África do Sul e da Tailândia.

Estes resultados sugerem que o valor terapêutico da própolis brasileira estaria em sua composição diferenciada, em termos de substâncias fenólicas, e não no teor total destas substâncias. De fato, diversos autores têm demonstrado que a própolis brasileira é rica em ácidos fenólicos prenilados, diferenciando-se de amostras de zonas temperadas, mais ricas em flavonóides (*REVISÃO DA LITERATURA*, subseção 2.2).

5.3.3 Precipitados com Pó de Pele

A acentuada adsorção das substâncias fenólicas ao pó de pele, observada no ensaio realizado (68,13%), está em acordo com o predito por GHISALBERTI (1979), que em sua revisão bibliográfica afirma que a própolis interage fortemente com os óleos e proteínas da pele, sendo muito difícil de removê-la da pele humana.

A baixa solubilidade dos compostos fenólicos da própolis, causada pela suspensão do resíduo etanólico seco em água, pode ter contribuído para a precipitação e aderência ao pó de pele, o que se dá, segundo HARBORNE (1984), pela complexação entre substâncias fenólicas e proteínas da pele por meio de ligações de hidrogênio.

Como principal vantagem do método empregado neste trabalho (*MATÉRIAS e MÉTODOS*, subseção 3.2.4.3), bem como dos métodos utilizados para as quantificações de substâncias fenólicas e flavonóides totais, pode-se citar o emprego de uma curva de calibração construída a partir de diferentes soluções de um padrão fenólico, em detrimento a uma única solução de referência, como proposto por COSTA (1982) e pela FARMACOPÉIA BRASILEIRA (2002). Esta adaptação torna as leituras tomadas em espectrofotômetro, e conseqüentemente os resultados calculados em função destas, mais confiáveis.

5.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A observação dos cromatogramas obtidos por CLAE (*RESULTADOS*, Figuras 4.2 e 4.3) permite concluir que o sistema cromatográfico utilizado logrou uma boa separação dos componentes da própolis em estudo, especialmente se considerarmos a acentuada diversidade de substâncias presentes na amostra e que absorvem nos comprimentos de onda monitorados. Outros sistemas foram testados anteriormente, com variações das dimensões da coluna e do sistema gradiente utilizado, porém sem que se obtivesse uma boa separação. As leituras em dois comprimentos de ondas, 280 e 340 nm (MARCUCCI; FERRERES; CUSTÓDIO, 2000), mostraram-se de grande valia, pois algumas substâncias identificadas absorveram mais fortemente em um comprimento do que em outro, o que permitiu proceder-se a quantificação para cada substância no comprimento de onda que proporcionou maior intensidade do pico e/ou melhor definição do mesmo.

Foram identificadas nove substâncias nas amostras de própolis investigadas neste trabalho, sendo que todas elas já haviam sido reportadas por um ou mais autores em amostras de própolis brasileiras, como pode ser visto mais detalhadamente na seção *REVISÃO DA LITERATURA*, subseção 2.2.3. Porém, a identificação destas substâncias nas amostras em estudo foi de grande importância, já que parte do objetivo do trabalho ora apresentado é correlacionar um tipo de própolis específico (em função de sua composição química e origem botânica) com sua suposta ação cicatrizante. Cabe destacar a identificação do Artepillin C, que apresentou-se como o pico mais pronunciado e em maior concentração na amostra (5,49% sobre a massa da própolis bruta, quantificada no resíduo metanólico), por se tratar de uma substância bastante investigada atualmente, tendo apresentado atividades antimicrobiana (AGA et al., 1994), antioxidante (NAKANISHI et al., 2003; KUMAZAWA; HAMASAKA; NAKAYAMA, 2004; SHIMIZU et al., 2004) e antitumoral (KIMOTO et al., 1998; AKAO et al., 2003). Esta substância também foi reportada por NAKANISHI et al. (2003) como sendo majoritária em amostra de própolis oriunda da região sudeste do Brasil (Minas Gerais), o que a torna um marcador químico em potencial para própolis desta região.

Somente a somatória dos teores das substâncias fenólicas identificadas, excetuando-se o ácido ferúlico, cuja separação apenas parcial não permitiu sua quantificação, já corresponde a aproximadamente 8,38% sobre a massa da amostra bruta (Tabela 4.5), o que nos indica que o teor de substâncias fenólicas totais (7,39%), calculado por método espectrofotométrico, pode estar subestimado. Este valor pode ser bem maior, pois algumas substâncias que apresentaram picos pronunciados não foram identificadas e quantificadas neste trabalho e poderiam corresponder a substâncias fenólicas, já que utilizaram-se comprimentos de ondas onde estas substâncias absorvem fortemente.

A comparação entre os cromatogramas obtidos para os extratos etanólico e metanólico nos permite constatar que seus perfis são parecidos, compostos pelas mesmas substâncias. Alguns picos correspondentes variam de intensidade em função de terem sido obtidos por solventes e processos extrativos distintos. Pôde-se observar uma maior solubilização das substâncias identificadas por CLAE (Tabela 4.5) quando empregou-se o método de extração por Soxhlet, tendo-se o metanol como solvente, em relação à maceração em álcool de cereais.

5.5 IDENTIFICAÇÃO DA FONTE BOTÂNICA DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS

A identificação da *Baccharis dracunculifolia* DC. como fonte de matérias-primas para as amostras de própolis estudadas neste trabalho corrobora com estudos reportados por BANKOVA et al. (1999), PARK, ALENCAR e AGUIAR (2002), KUMAZAWA et al. (2003) e PARK et al. (2004), que identificaram ser esta espécie a fonte botânica de amostras de própolis coletadas no estado de São Paulo e Minas Gerais.

As variações observadas nas intensidades de picos correspondentes, entre os extratos da própolis (amostra de própolis 2) e da planta (veja Figuras 4.5 e 4.6), coletados em mesma época e em mesma localidade, podem ser devidas ao fato de que não se teve a mesma precisão de uma abelha ao se coletar o material vegetal, supostamente utilizado na elaboração da própolis. Este trabalho foi executado com o auxílio de uma tesoura, removendo-se os brotos apicais do indivíduo, com os quais

preparou-se o extrato. Naturalmente, o material coletado poderia conter partes da planta não coletadas pelas abelhas, como alguns tecidos vegetais, por exemplo, pois estas, segundo KÖNIG (1985) e KUMAZAWA et al. (2003), utilizam suas mandíbulas na execução desta atividade.

Como destacado na introdução deste trabalho, a identificação da(s) fonte(s) botânica(s) da própolis oriunda de determinada região permite se esperar determinadas características físico-químicas e atividades biológicas, o que vem a contribuir para uma padronização da própolis daquela região específica e para o estabelecimento da relação “tipo de própolis/ação biológica”. Contribui com esta afirmação o fato de oito das nove substâncias encontradas neste trabalho também terem sido reportadas por outros autores em amostras de própolis cujas fontes botânicas foram identificadas como sendo a *Baccharis dracunculifolia*, sendo elas os ácidos clorogênico (KUMAZAWA et al., 2003), cafeico (KUMAZAWA et al., 2003), ferúlico (PARK et al., 2002), *p*-cumárico (BANKOVA et al., 1999; PARK et al., 2002; KUMAZAWA et al., 2003) e Artepillin C (KUMAZAWA et al., 2003) e os flavonóides canferida (BANKOVA et al., 1999; PARK et al., 2002), canferol (PARK et al., 2002) e isossacuranetina (PARK et al., 2002).

5.6 AÇÃO DA PRÓPOLIS, IN VITRO, SOBRE FIBROBLASTOS DE CAMUNDONGOS - CÉLULAS NIH 3T3

5.6.1 Análise Qualitativa

Os ensaios qualitativos foram de grande valia na escolha do solvente mais apropriado para a preparação das soluções estoque de própolis, bem como na escolha da faixa de concentrações das soluções teste que fosse representativa para se ilustrar o efeito da própolis sobre as células de fibroblastos. A partir de dois ensaios realizados em paralelo, um utilizando-se como solvente da solução estoque de própolis o dimetilsulfóxido (DMSO) e outro utilizando-se polietilenoglicol (PEG

400), suspeitou-se de um efeito de favorecimento da proliferação de fibroblastos induzido pelo primeiro (a possibilidade da ocorrência deste fenômeno já havia sido alertada, verbalmente, pela Dra. Renata X. Kover, diretora científica da EXTRACTA S.A., que trabalhou com o DMSO para a dispersão de princípios ativos em meio de cultura celular), o que foi confirmado em ensaio posterior do mesmo gênero e em ensaio preliminar de análise quantitativa de proliferação de fibroblastos. Com isso, optou-se por trabalhar somente com o solvente PEG 400, evitando-se a interferência de um possível efeito proliferativo do solvente sobre as células. Em função da larga faixa de concentrações em que a própolis demonstrou-se tóxica às células, observado nos primeiros ensaios qualitativos (Figura 4.10 - I), decidiu-se iniciar os testes com solução a 125 µg/mL (E), possibilitando, assim, a inserção de pontos intermediários entre as soluções em que suspeitou-se haver tendências ligeiramente proliferativas da própolis sobre as células.

Portanto, por meio destes ensaios qualitativos puderam-se definir alguns parâmetros importantes a serem seguidos nos ensaios quantitativos, poupando o gasto de materiais mais caros e o uso de equipamentos mais sofisticados, utilizados neste último tipo de ensaios.

Este experimento também nos permitiu observar, sem margem a dúvidas, o efeito tóxico total da própolis entre os pontos A e E, bem como a gradativa diminuição deste efeito até o ponto G (Figura 4.10 I), o que foi confirmado pelos ensaios quantitativos posteriores. Porém, a partir do ponto H este experimento mostrou-se limitado (Figuras 4.10 e 4.11), não sendo possível tirar conclusões sem o auxílio dos ensaios quantitativos.

5.6.2 Análise Quantitativa

A própolis vem sendo empregada ao longo do tempo na cicatrização de ferimentos e na regeneração de tecidos (IORICH, 1981; GHISALBERTI, 1979; ARVOUET-GRAND et al., 1993; MARCUCCI, 1995; MARCUCCI, 1996; MATSUNO, 1997; DÍAZ et al., 1997, BURDOCK, 1998; GHISALBERTI, 1979; PEREIRA; SEIXAS; AQUINO

NETO, 2002), sendo ainda hoje uma das aplicações mais difundidas mundialmente (CASTALDO; CAPASSO, 2002). Este uso também se verifica na região onde coletamos a própolis estudada neste trabalho. Alguns autores mostraram haver uma cicatrização acelerada em animais (ARVOUET-GRAND et al., 1993; MAGRO FILHO, 1988) e humanos (MAGRO FILHO, 1991; GREGORY et al., 2002), quando suas feridas foram tratadas com solução de própolis ou creme contendo este produto. Com base nestas informações, na *Revisão da Literatura* (seção 3) e nos resultados encontrados neste trabalho, levantaremos, no decorrer desta discussão, algumas hipóteses que explicariam esta possível atividade cicatrizante da própolis tanto de forma direta, atuando sobre células com importância no processo de cicatrização, como de forma indireta, propiciando as condições ideais para que este fenômeno ocorra.

Uma análise da Figura 4.12 (*RESULTADOS*, subseção 4.6.2) nos permite observar o efeito tóxico da própolis às células NIH 3T3 (fibroblastos de camundongo) a concentrações de 125 µg/mL (E), 62,50 µg/mL (F) e 31,250 µg/mL (G), de forma decrescente, o que foi comprovado estatisticamente pelas cartas de controle contidas na Figura 4.13 (nos dois primeiros pontos todas as replicatas situaram-se abaixo do limite inferior do intervalo, enquanto que no terceiro, embora somente parte das replicatas esteja fora do intervalo de confiança, todas elas situaram-se abaixo da média C/C-). Este resultado corrobora, resguardadas as diferenças em termos de linhagens de células e da faixa de concentrações tóxicas, com estudos realizados por AL-SHAHER et al. (2004), que investigaram a tolerância, *in vitro*, de fibroblastos humanos de ligamento periodontal (PDL) e de polpa dental à própolis, coletada na cidade de Piracicaba (SP), e ao hidróxido de cálcio, substância atualmente utilizada na desinfecção microbiana de canais dentários. Os resultados encontrados por estes autores revelaram que exposições a 1, 2 e 4 mg/mL de própolis levaram à viabilidade de 75% a 44% dos fibroblastos PDL, e de 100% a 50% dos fibroblastos de polpa dental (comparativamente, o hidróxido de cálcio mostrou-se aproximadamente 10 vezes mais tóxicos que a própolis). A maior resistência das células investigadas por estes autores em relação às que trabalhamos pode-se dever a fatores como a própria diferença da natureza das células (de camundongo versus humanas) ou ao grau de manipulação das mesmas

(os autores as retiraram diretamente de pacientes e as submeteram aos testes, enquanto que as que utilizamos - células NIH 3T3 - são de gerações muito avançadas em relação às células retiradas inicialmente dos animais, o que poderia causar certa fragilização às mesmas. Por outro lado, NIH 3T3 é uma linhagem celular estabelecida, facilitando a padronização e a reprodutibilidade do experimento). Há que se considerar, ainda, a hipótese de ser devido a diferenças nas composições químicas das amostras de própolis, embora os autores citados também tenham utilizado amostra do estado de São Paulo (ambas provavelmente apresentariam perfis fitoquímicos similares, podendo haver variações nos teores de alguns princípios ativos). A toxidez observada em concentrações mais elevadas poderia ser causada pelas substâncias fenólicas identificadas na própolis testada (consulte subseção 4.4), já que estas vêm sendo responsabilizadas pelas atividades tóxicas de própolis da região sudeste do Brasil contra micróbios (AGA et al., 1994; MARCUCCI et al., 2001) e células cancerígenas (BANSKOTA et al., 1998; KIMOTO et al., 1998; AKAO et al., 2003).

As Figuras 4.12 e 4.13 também nos permitem observar um ligeiro efeito proliferativo, induzido pela própolis, entre as concentrações 7,812 $\mu\text{g/mL}$ (I) e 0,732 $\mu\text{g/mL}$ (L1), com ponto máximo em 3,906 $\mu\text{g/mL}$ (J). Embora este efeito não tenha se mostrado significativo estatisticamente, como demonstram as cartas de controle da Figura 4.13, pois as replicatas estão dentro dos intervalos compreendidos entre os limites superior e inferior, uma análise mais detalhada revela que a grande maioria das replicatas teste, em cada carta, está distribuída acima de sua linha média C/C-correspondente. Esta tendência também pode ser observada em pelo menos 4 dos 8 ensaios quantitativos realizados (Apêndice 1). Uma vez que as substâncias responsáveis pelo efeito tóxico às células deixaram de sê-lo a partir da concentração 15,625 $\mu\text{g/mL}$ (H), algumas classes de substâncias presentes na própolis poderiam ter contribuído para a nutrição das células na faixa de concentrações onde este leve efeito proliferativo foi observado (entre 7,8125 $\mu\text{g/mL}$ e 0,7324 $\mu\text{g/mL}$). Os aminoácidos, como a arginina e a prolina, presentes em própolis de diversas regiões do Brasil, incluindo o estado de São Paulo (MARCUCI; CAMARGO; LOPES, 1996), desempenham importante efeito no processo de regeneração de colágeno e de elastina (LEJEUNE; PORRAT; DEHMOUCHE, 1988) e no aumento da mitose

celular, necessários no processo de regeneração da pele e da cicatrização conjuntiva (MAGRO FILHO, 1991). O ferro e o zinco, oligoelementos presentes em própolis (GHISALBERTI, 1979; MARCUCCI, 1996; GONZÁLEZ; ORZAEZ, 1997; PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2002), são substâncias importantes para a síntese do colágeno (MAGRO FILHO, 1991). Quando a pele é alterada, como no caso de um ferimento, o colágeno se despolimeriza, a trama perde elasticidade e resistência. Sua capacidade de retenção de água diminui, o N.M.F. (*Natural Moisturing Factor*) se concentra e, para manter a isotonicidade, os elementos nutritivos veiculados pelo sangue são aportados em quantidades menores (LEJEUNE; PORRAT; DEHMOUCHE, 1988). Desta forma, o extrato de própolis em contato com a pele danificada (ferimento) poderia alimentá-la com vitaminas, aminoácidos e oligoelementos (LEJEUNE; PORRAT; DEHMOUCHE, 1988), estimulando os fibroblastos à produção dos elementos fibrosos, como o colágeno e a elastina, que atuariam na regeneração da derme e, conseqüentemente, da pele. Esta hipótese suporia haver um balanço entre substâncias benéficas às células e aquelas com efeitos antagônicos.

A pele possui uma rede sanguínea particularmente importante no nível da hipoderme e da derme, sendo esta vascularização responsável pela nutrição do folículo pilossebáceo, das glândulas sudoríparas, da hipoderme, da derme e da epiderme, graças à permeabilidade da membrana basal da junção dermoepidérmica (HERNANDEZ; MERCIER-FRESNEL, 1999). Os flavonóides, substâncias que conhecidamente atuam aumentando a permeabilidade dos vasos (PATHAK; PATHAK; SINGLA, 1991) e que foram identificadas na própolis em estudo (veja seção *RESULTADOS*, 4.4), poderiam propiciar um melhor fluxo de nutrientes na pele danificada, contribuindo para a cicatrização. KHANNA et al. (2002) demonstraram que solução de proantocianidinas, obtida do fracionamento de extrato de semente uva, incrementou a transcrição do Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF) em queratinócitos humanos HaCaT, *in vitro*. Em experimento posterior, realizado com ratos, demonstraram que o grupo teste apresentou um aumento na velocidade de formação de epiderme e na deposição de tecido conectivo, sendo caracterizado por uma organização histológica mais favorável do que o observado no grupo controle. Segundo estes autores, o VEGF é tido como o

mais eficaz fator de crescimento no estímulo de angiogeneses em feridas, pois ele induz a migração e proliferação de células endoteliais e aumenta a permeabilidade vascular, o que contribui para a cicatrização.

Sabe-se que a pele é preenchida em toda sua superfície por diversos tipos de microorganismos, constituindo a flora cutânea. Esta é subdividida em flora permanente, formada por microorganismos chamados “saprófitos”, e em flora transitória, constituída por microorganismos chamados “contaminadores” ou “patógenos (PEYREFITTE; MARTINI; CHIVOT, 1998). Em condições normais, os dois tipos de flora mantêm-se em equilíbrio. Porém, um agente contaminante pode provocar a proliferação exagerada destes microorganismos, principalmente dos patógenos, levando a uma infecção (HERNANDEZ; MERCIER-FRESNEL, 1999). Assim, quando a pele é ferida por algum objeto estranho pode-se formar um processo infeccioso, dificultando a cicatrização do local. A própolis, conhecida como um produto com forte atividade antimicrobiana (REVISÃO DA LITERATURA, 2.3.1), inclusive contra algumas linhagens comumente presentes na flora transitória, como os estafilococos (BANKOVA et al., 1995; FERNANDES et al., 1995; KUJUNGIEV et al., 1999; SFORCIN et al., 2000; MIORIN et al., 2003), os estreptococos (PARK et al., 1998; MARCUCCI et al., 2001) e as cândidas (FERNANDES et al., 1995; KUJUNGIEV et al., 1999; SFORCIN et al., 2001), ao ser aplicada na região do ferimento provocaria a assepsia do local, impedindo o desencadeamento de um processo infeccioso e, portanto, favorecendo as condições para a cicatrização. Cabe ainda destacar que o tipo de própolis cuja fonte botânica é a *Baccharis dracunculifolia* vem se destacando por sua acentuada propriedade antimicrobiana (MIORIN, et al., 2003), tendo o Artepillin C como um componente muito ativo (AGA et al., 1994; MARCUCCI et al., 2001). Em dois dos ensaios qualitativos de proliferação de fibroblastos, levado a cabo neste trabalho, constatou-se contaminação microbiana. Este incidente, no entanto, nos permitiu observar que haviam mais fibroblastos aderidos aos fundos dos poços contendo soluções teste do que em seus respectivos poços controle, demonstrando que a própolis atacou os microorganismos e protegeu os fibroblastos (os resultados destes ensaios podem ser vistos no Apêndice 2). Reforça esta hipótese o estudo desenvolvido por DÍAZ et al. (1997), que aplicou extrato etanólico de própolis a 5,0% (de origem cubana) em

feridas sépticas faciais de 10 pacientes, sendo que 9 estavam contaminadas por bactérias gram-positivas e somente uma continha também bactérias gram-negativas. Após 7 dias de tratamento, as feridas inicialmente contaminadas por bactérias gram-positivas estavam totalmente curadas, sem nenhuma contaminação no local, enquanto que a ferida contaminada por bactérias gram-negativas teve sua total cicatrização e assepsia após 13 dias de tratamento.

Outras atividades já comprovadas para a própolis (*REVISÃO DA LITERATURA*, subseções 2.3.2 e 2.3.3) e que poderiam atuar combatendo a inflamação patológica de ferimentos, quando aplicada topicamente, são as atividades antiinflamatória e de captura de radicais livres (antioxidante), pois estes mediam, entre outros fenômenos biológicos, a inflamação (PACHECO, 2001). MIYATAKA et al. (1997) verificaram que extratos etanólicos de própolis brasileiras inibiram em 50% a enzima hialuronidase (que atua no processo inflamatório), em relação ao controle, à concentração de 0,5 mg/mL. ALENCAR (2002) verificou que um extrato de própolis de *Baccharis dracunculifolia*, preparada pela extração de 2g de matéria bruta em 25 mL de etanol, inibiu a enzima hialuronidase acima de 35%, em relação ao controle. MENEZES, ÁLVARES e ALMEIDA (1999) demonstraram, pelo método de inflamação em orelha de camundongo induzida pelo ácido araquidônico, que extratos etanólicos de própolis comerciais e preparadas em laboratórios (oriundos do estado de São Paulo) apresentaram atividade antiinflamatória comparáveis à Indometicina e que esta atividade foi concentração-dependente. MAGRO FILHO (1991) analisou clinicamente e citologicamente os efeitos da ação tópica da solução hidroalcoólica de própolis, a 5% (m/v), no reparo de feridas intrabuciais, em humanos. A própolis favoreceu a evolução do infiltrado inflamatório do agudo para o crônico e do intenso para o ausente, sendo que tal constatação não pôde ser atribuída ao veículo, como comprovado estatisticamente. A associação do estudo citológico e clínico permitiu verificar uma ação antiinflamatória da própolis, acompanhada de uma epitelização mais rápida. ARVOUET-GRAND et al. (1993) verificaram que a frequência e a duração de edemas, em escarificações induzidas em ratos e coelhos, foram menores nos grupos tratados com extrato de própolis em comparação com o grupo tratado com bálsamos do Peru e ao grupo controle negativo. Outros autores demonstraram a atividade antioxidante de amostras de própolis dos estados de São

Paulo e Minas Gerais (BANSKOTA et al., 2000; NAGAI et al., 2003; KUMAZAWA; HAMASAKA; NAKAYAMA, 2004) e para algumas substâncias fenólicas isoladas destas amostras, entre eles o ácido cafeico, o canferol e o Artepillin C (NAKANISHI et al., 2003; KUMAZAWA; HAMASAKA; NAKAYAMA, 2004; SHIMIZU et al., 2004), presentes na própolis estudada neste trabalho. LEJEUNE, PORRAT e DEHMOUCHE (1998) dizem que as substâncias antioxidantes presentes na própolis, com a propriedade de capturar radicais-livres, impediriam ataques destes radicais a macromoléculas do ácido hialurônico e do colágeno e ao DNA das células, evitando suas degradações.

A própolis interage fortemente com os óleos e proteínas da pele, sendo difícil removê-la da pele humana (GHISALBERTI, 1979). Realmente, quando aplicada solução etanólica de própolis à pele humana pode-se observar, após evaporação do solvente, a formação de uma fina película sobre esta, de difícil remoção. Neste trabalho demonstrou-se a forte adsorção das substâncias fenólicas da própolis ao pó de pele, chegando a 68,12% das substâncias fenólicas quantificadas no extrato (*RESULTADOS*, subseção 4.3.3). Isto nos leva a crer que a própolis pode atuar como impermeabilizante, protegendo o ferimento das agressões do meio externo e favorecendo, assim, a cicatrização normal sob esta camada. Propriedade semelhante é atribuída aos taninos, substâncias fenólicas que se complexam com a pele danificada formando uma camada protetora (complexo tanino-proteína e/ou polissacarídeo) sobre o ferimento (SANTOS; MELLO, 2000). Segundo HARBORNE (1984), esta complexação das substâncias fenólicas com as proteínas da pele se daria pela formação de ligações de hidrogênio.

Outra hipótese, talvez menos provável em função da acentuada toxidez sobre fibroblastos de camundongo observada neste trabalho, seria que a própolis atua sobre células envolvidas no processo de cicatrização no nível de epiderme, acelerando, por exemplo, a proliferação de queratinócitos da camada germinativa, que migrariam para a região afetada, ligando novamente as margens do corte ou ferimento e formando nova carapaça, a camada córnea. Ou, ainda, a aplicação tópica da própolis poderia intensificar o metabolismo das células no sentido da produção de uma substância colagenolítica, secretada por estas, que facilita a mobilidade das células através das fibras do corium superficial. Após o encontro das

mesmas e a formação de desmossomas, poderia estimular a produção de queratina, favorecendo a regeneração rápida da camada córnea (MAGRO FILHO, 1988). Em outra possibilidade, esta para feridas superficiais e rasas, onde a epitelização pode se originar dos apêndices epidermais (MAGRO FILHO, 1988), a própolis aceleraria as atividades das glândulas sebáceas e do folículo piloso. SCHELLER⁴ e KAMINSKI⁵, citados por Magro Filho (1991, p.82), observaram que células embrionárias e células de fígado de ratos tiveram as atividades de seus retículos endoplasmáticos aceleradas, quando em contato com solução de própolis.

Não podemos deixar de considerar que o comportamento dos fibroblastos estudados poderia ser distinto quando em contato com própolis de outras regiões geográficas e/ou fontes botânicas, em função da provável variabilidade de suas composições químicas em relação à própolis de *Baccharis dracunculifolia*, utilizada neste trabalho. Assim, o suposto balanço entre substâncias tóxicas e substâncias benéficas às células, proposto nesta discussão, poderia ser deslocado em favor da proliferação ou deletério dos fibroblastos.

⁴ SCHELLER, S. et al. Biological properties and clinical application of propolis. I. Some physico-chemical properties of propolis. *Arzneim. Forsch/Drug. Res.*, v. 27, n. 1, p. 889-890, 1977.

⁵ KAMINSKI, M.; SCHELLER, S.; NOLEWAJKA, E. Biological properties and clinical application of propolis. V. The action of ethanol extract of propolis (EEP) on laboratory animals. *Arzneim. Forsh./Drug. Res.*, v. 27, n. 2, p. 1962-1964, 1977.

6. CONCLUSÕES

1. A *Baccharis dracunculifolia* DC. é uma fonte botânica de própolis produzida na Área de Proteção Ambiental “Serra do Japi” (Cabreúva-SP).
2. A própolis em estudo atendeu aos requisitos do Ministério da Agricultura, exceto no que se refere à “Perda por dessecação a 105 °C”.
3. A própolis de *Baccharis dracunculifolia* DC. apresentou uma grande variedade de substâncias fenólicas, incluindo ácidos aromáticos e flavonóides.
4. O processo extrativo por Soxhlet, tendo o metanol como líquido extrator, foi mais efetivo na extração de substâncias fenólicas da própolis do que o processo por maceração em álcool de cereais.
5. A própolis em estudo apresentou alto teor de Artepillin C, substância com propriedades antioxidante, antimicrobiana e antitumoral comprovadas por outros autores.
6. O Artepillin C apresenta-se como um marcador fitoquímico em potencial para própolis de *Baccharis dracunculifolia*.
7. A própolis de *Baccharis dracunculifolia* DC. foi tóxica aos fibroblastos de camundongo (células NIH 3T3) em concentrações iguais ou acima de 31,25 µg/mL, deixando de sê-lo em concentrações iguais ou inferiores a 15,62 µg/mL.
8. A combinação de ensaios qualitativos e quantitativos mostrou-se de grande valia, pois os primeiros permitiram o estabelecimento de parâmetros a serem seguidos nos segundos, poupando recursos financeiros e tempo, enquanto que os ensaios quantitativos permitiram uma análise estatística do comportamento das células em contato com a própolis.
9. A própolis de *Baccharis dracunculifolia* DC. adsorveu fortemente à pele humana, contribuindo para isso as substâncias fenólicas presentes em seu extrato alcoólico.

10. Até o momento, a aceleração em processos de cicatrização, influenciada pela aplicação tópica de própolis de *Baccharis dracunculifolia*, não pode ser atribuída à sua ação direta sobre células da pele mas, provavelmente, ao estabelecimento de condições ideais para que a cicatrização ocorra, mantendo o ferimento asséptico e livre de inflamação patológica.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Desde que os experimentos levados a cabo neste trabalho, bem como os estudos reportados na literatura, não esgotam o conhecimento das substâncias presentes na própolis e a investigação de todos os mecanismos que poderiam estar envolvidos em processos de cicatrização, influenciados pela administração tópica deste produto, novos estudos poderão ser desenvolvidos, futuramente, para se investigar:

1. As estruturas de substâncias que apresentaram picos pronunciados nos cromatogramas apresentados neste trabalho, mas que não foram identificadas;
2. O comportamento de fibroblastos de camundongo (NIH 3T3) quando em contato com diferentes frações do extrato de própolis de *Baccharis dracunculifolia*, procurando se conhecer quais são as classes de substâncias tóxicas a estas células e quais, eventualmente, se apresentariam proliferativas;
3. A produção de colágeno e elastina, *in vitro*, por fibroblastos em contato com a própolis;
4. A proliferação de queratinócitos e a produção de substâncias secretadas por estas células, quando em contato com a própolis;
5. A espessura e a porosidade da película que se forma sobre a superfície da pele humana, quando se aplica sobre esta uma alíquota do extrato etanólico de própolis;
6. O processo de cicatrização em ferimentos provocados em camundongos, influenciado pela administração tópica de própolis;
7. Estudos de cicatrização em pele humana, *in vitro*, influenciada pela administração tópica de própolis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGA, H. et al. Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.58, n. 5, p. 945-946, 1994.

AKAO, Y. et al. Cell growth inhibitory effect of cinnamic acid derivatives from propolis on human tumor cell lines. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, n. 7, p. 1057-1059, 2003.

ALENCAR, S. M. de. **Estudo fitoquímico da origem botânica da própolis e avaliação da composição química de mel de *Apis mellifera* africanizada de diferentes regiões do Brasil**. Campinas, 2002. 120 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

ALMEIDA, E. C.; MENEZES, H. Evaluation of the anti-inflammatory activity of propolis extracts. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 8, n. 1, 2002.

AL-SHAHER, A. et al. Effect of propolis on human fibroblasts from the pulp and periodontal ligament. **Journal of Endodontics**, v. 30, n. 5, p. 359-361, 2004.

AMOROS, M. et al. Comparison of the anti-herpes simplex virus activities of propolis and 3-methyl-but-2-enyl caffeate. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 5, p. 644-647, 1994.

ANSORGE, S.; REINHOLD, D.; LENDECKEL, U. Propolis and some of its constituents down-regulate DNA synthesis and inflammatory cytokine production but induce TGF- β 1 production of human immune cells **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 58c, p. 580-589, 2003.

AOAC INTERNATIONAL. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 16. ed. Gaithersburg: AOAC International, 1997a. v. 1. Cap. 4.

AOAC INTERNATIONAL. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 16. ed. Gaithersburg: AOAC International, 1997b. v. 2. Cap. 26.

ARVOUET-GRAND, A. et al. Extrait de propolis: II. etude de la cicatrisation de plaies chez le lapin et chez le rat; **Journal de Pharmacie de Belgique**, v. 48, n. 3, p. 171-178, 1993.

ARVOUET-GRAND, A. et al. Standardisation d'un extrait de propolis et identification des principaux constituants. **Journal de Pharmacie de Belgique**, v. 49, n. 6, p. 462-468, 1994.

BANKOVA, V. S.; POPOV, S. S.; MAREKOV, N. L. High-performance liquid chromatographic analysis of flavonoids from propolis. **Journal of Chromatography**, v. 242, p. 135-143, 1992.

- BANKOVA, V. et al. Propolis produced in Bulgaria and Mongolia: phenolic compounds and plant origin. **Apidologie**, v. 23, p. 79-85, 1992.
- BANKOVA, V. et al. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 50c, p. 167-172, 1995.
- BANKOVA, V. et al. Antibacterial diterpenic acids from Brazilian propolis. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 50c, p. 277-280, 1996.
- BANKOVA, V.; CHRISTOV, R. S.; TEJERA, A. D. Lignans and other constituents of propolis from the canary islands. **Phytochemistry**, v. 49, n. 5, p. 1411-1415, 1998.
- BANKOVA, V. et al. Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from São Paulo state. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 54c, p. 401-405, 1999.
- BANKOVA, V.; CASTRO, S.; MARCUCCI, M.C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v. 31, p. 3-15, 2000.
- BANKOVA, V. et al. Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results; **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 57c, p. 530-533, 2002.
- BANSKOTA, A. H. et al. Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities. **Journal of Natural Products**, v. 61, n. 7, p. 896-900, 1998.
- BANSKOTA, A. H. et al. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, The Netherlands and China. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, p. 239-246, 2000.
- BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Recent Progress in Pharmacological and Research of Propolis. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 561-571, 2001.
- BANSKOTA A. H. et al. Hepatoprotective and anti-Helicobacter pylori activities of constituents from Brazilian propolis. **Phytomedicine**, v. 8, p. 16-23, 2001.
- BANSKOTA, A. H. et al. Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 80, p. 67-73, 2002.
- BASNET, P. et al. Potent antihepatotoxic activity of dicafeoyl quinic acids from propolis. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 19, n. 4, p. 655-657, 1996.
- BONVEHÍ, J. S.; COLL, F. V. Phenolic composition of propolis from China and South America. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 49c, p. 712-718, 1994.
- BORRELLI, F. et al. Effect of a propolis extract and caffeic acid phenethyl ester on formation of aberrant crypt foci and tumors in the rat colon. **Fitoterapia**, v.73, s. 1. p. S38-S43, 2002a.
- BORRELLI, F. et al. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. **Fitoterapia**, v. 73, s.1, p. S53-S63, 2002b.
- BOUDOUROVA-KRASTEVA, G. et al. Phenolics from Brazilian propolis. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 52c, p. 676-679, 1997.

BOYANOVA, L. et al. Inhibition of *Helicobacter pylori* growth in vitro by Bulgarian propolis: preliminary report. **Journal of Medical Microbiology**, v. 52, p. 417-419, 2003.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G., HUNTER, J. S. **Statistic for experimenters: an introduction to design, data analysis, and model building**. New York: J. Wiley, 1978.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Instrução Normativa Nº 3 - ANEXO VI – Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Própolis**. Brasília, 19 de janeiro de 2001.

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

CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, v. 73, s. 1, p. S1-S6, 2002.

CHANG, C. C. et al. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. **Journal of Food and drug Analysis**, v. 10, n. 3, p. 178-182, 2002.

CHEN, J. H. et al. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on human leukemia HL-60 cells. **Cancer Letters**, v. 108, p. 211-214, 1996.

CICALA, C. et al. Vascular effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on isolated rat thoracic aorta. **Life Sciences**, v. 73, p. 73-80, 2003.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 1982. v.3: Farmacognosia experimental.

CUESTA-RUBIO, O. et al. Polyisoprenylated benzophenones in Cuban propolis; biological activity of nemorosone. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 57c, p. 372-378, 2002.

DÍAZ, J. C. Q. et al. Empleo de la tintura de propóleo al 5% en la cura de heridas sépticas faciales. **Revista Cubana de Estomatología**, v. 34, n. 1, p. 25-27, 1997.

DOBROWOLSKI, J. W. et al. Antibacterial, antifungal, antiamebic, anti-inflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. **Journal of Ethnopharmacology**, v.35, p. 77-82, 1991.

EL HADY, A. F. K.; HEGAZI, A. G. Egyptian propolis 2. chemical composition, antiviral and antimicrobial activities of East Nile Delta propolis. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 57c, p. 386-394, 2002.

EL-KHATIB, A. S. et al. Prophylactic effect of aqueous propolis extract against acute experimental hepatotoxicity in vivo. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 57c, p. 379-385, 2002.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. 3. ed. Strasbourg: Council of Europe. 1996.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. 4. ed. 2002. Strasbourg: Council of Europe. 2002.

EWING, G. W. **Métodos instrumentais de análise química**. São Paulo: Edgard Blücher, 1972. p.48-64.

FAPESP. Amostras de saúde. **Pesquisa FAPESP**. n. 83, p. 72-75, jan., 2003.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4 ed. São Paulo: Atheneu editora, 1998.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4 ed. São Paulo: Atheneu editora, v. 2, n. 4, 2002. Suplemento.

FERNANDES JÚNIOR, A. et al. In vitro activity of propolis against bacterial and yeast pathogens isolated from human infections. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 1, n.2, 1995.

GARCIA, P. L. **Desenvolvimento de metodologias analíticas para determinação de Hidroquinona em cosméticos e medicamentos**. São Paulo, 2004. 100 f. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. 100 p. 2004.

GHISALBERTI, E. L. et al. Constituents of propolis. **Experientia**, v. 34, n. 2, p. 157-158, 1978.

GHISALBERTI, E. L. Propolis: a review. **Bee World**, v. 60, n. 2, p. 59-83, 1979.

GONZÁLES, E.; ORZAES, M. T. Estudio del propoleo: origen e importancia de los compuestos fenolicos en su composicion. **Alimentaria**, p. 103 – 107, mayo, 1997.

GONZÁLEZ, M. et al. Spectrophotometric determination of phenolic compounds in propolis. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 22, n. 3, 2003.

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

GREENAWAY, W. et al. Identification by gas chromatography-mass spectrometry of 150 compounds in propolis. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 46c, p. 111-121, 1991.

GREGORY, S. R. et al. Comparison of propolis skin cream to silver sulfadiazine: a naturopathic alternative to antibiotics in treatment of minor burns. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 8, n. 1, p. 77-83, 2002.

HARBORNE, J. B. **Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis**. 2. ed. London: Chapman and Hall, 1984.

HEGAZI, A. G.; EL HADY, F. A. Egyptian propolis: 3. antioxidant, antimicrobial activities and chemical composition of propolis from reclaimed lands. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 57c, p. 395-402, 2002.

HERNANDEZ, M.; MERCIER-FRESNEL, M. M. **Manual de cosmetologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Livraria e Editora Revinter, 1999.

HOSNUTER, M. et al. The effect of CAPE on lipid peroxidation and nitric oxide levels in the plasma of rats following thermal injury. **Burns**, v. 30, p. 121-125, 2004.

HULEIHEL, M.; ISANU, V. Anti-Herpes simplex virus effect of an aqueous extract of propolis. **IMAJ**, v. 4 (suppl.), p. 923-927, 2002.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 2. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1976. v. 1: métodos químicos e físicos para análise de alimentos.

IOIRICH, N.P. **As abelhas farmacêuticas com asas**. URSS: MIR MOSCOVO, 1981.

ISLA, M. I. et al. Antioxidant activity of Argentine propolis extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 165-170, 2001.

IVANOVSKA, N. D. et al. Immunomodulatory action of propolis. VI. Influence of water soluble derivative on complement activity in vivo. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 47, p. 145-147, 1995.

KARTAL, M.; KAYA, S.; KURUCU, S. GC-MS analysis of propolis samples from two different regions of Turkey. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 57c, p. 905-909, 2002.

KHANNA, S. et al. Dermal wound healing properties of redox-active grape seed proanthocyanidins. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 33, n. 8, p. 1089-1096, 2002.

KIMOTO, T. et al. Apoptosis and suppression of tumor growth by Artepillin C extract from Brazilian propolis. **Cancer Detection and Prevention**, v. 22, n. 6, p. 506-515, 1998.

KIMOTO, T. et al. Pulmonary carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in mice and protection from it by Brazilian propolis and artepillin C. **Virchows Archiv**, v. 438, p. 259-270, 2001.

KÖNIG, B. Plant sources of propolis. **Bee World**, v.66, p. 136-139, 1985.

KOO, H. et al. Effect of a new variety of *Apis mellifera* propolis on mutans streptococci. **Current Microbiology**, v. 41, p. 192-196, 2000.

KOSALEC, I.; BAKMAZ, M.; PEPELJNJAK, S. Analysis of propolis from the continental and Adriatic regions of Croatia. **Acta Pharmaceutica**, v. 53, p. 275-285, 2003.

KROL, W. et al. Inhibition of neutrophils' chemiluminescence by ethanol extract of propolis (EEP) and its phenolic components. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 55, p. 19-25, 1996.

KUJUNGIEV, A. et al. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 64, p. 235 – 240, 1999.

KUMAZAWA, S. et al. Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, n. 6, p. 740-742, 2003.

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

KUSUMOTO, T. et al. Isolation and structures of two new compounds from the essential oil of Brazilian propolis. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 49, n. 9, p. 1207-1209, 2001.

LEE, Y. J. et al. Involvement of tumor suppressor protein p53 and p38 MAPK in caffeic acid phenethyl ester-induced apoptosis of C6 glioma cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, p. 2281-2289, 2003.

LEJEUNE, B.; PORRAT, A.; DEHMOUCHE, H. Propolis utilisation en dermocosmétique. **Parfums, Cosmétiques, Arômes**, n. 82, p. 73-77, out./sept. 1988.

LIAO, H. F. et al. Inhibitory effect of caffeic phenethyl ester on angiogenesis, tumor invasion, and metastasis. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 51, p. 7907-7912, 2003.

LUO, J. Q. et al. PM-3, a benzo-gamma-pyran derivative isolated from propolis, inhibits growth of MCF-7 human breast cancer cells. **Anticancer Research**, v. 21, n. 3B, p. 1665-1671, 2001.

MAGRO FILHO, O. **Reparação de alvéolo dental e de ferida cutânea após irrigação com solução de própolis. Estudo histológico em ratos.** Araçatuba, 1988. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Estadual Paulista.

MAGRO FILHO, O. **Ação tópica de própolis na reparação de sulcoplastias pela técnica de kazanjian modificada. Avaliação citológica e clínica de pacientes.** Araçatuba, 1991. 144 f. Tese (Doutorado em Odontologia) – Universidade Estadual Paulista.

MARCUCCI, M. C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v. 26, p. 83-99, 1995.

MARCUCCI, M. C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes da própolis. **Química Nova**, v. 19, n. 5, p. 529-536, 1996.

MARCUCCI, M. C.; CAMARGO, F. A. de; LOPES, C. M. A. Identification of amino acids in Brazilian propolis. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 51c, p. 11-14, 1996.

MARCUCCI, M. C. et al. Chemical composition of Brazilian propolis from São Paulo state. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 53c, p. 117-119, 1998.

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

MARCUCCI, M. C.; FERRERES, F.; CUSTÓDIO, A. Evaluation of phenolic compounds in Brazilian propolis from different geographic regions. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 55c, p. 76-81, 2000.

MARCUCCI, M. C. et al. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, V. 74, p. 105 – 112, 2001.

MARCUCCI, M. C.; WOISKY, R. G.; SALATINO, A. **Uso do cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis**. Disponível em: <www.roberg.com.br/PaginaTrabalhoCientifico06.htm> Acesso em: 31.07.03.

MARKHAN, K. R. et al. HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zealand propolis. **Phytochemistry**, v. 42, n.1, p. 205-211, 1996.

MATHOR, M. B. et al. Clonal analysis of stably transduced human epidermal stem cells in culture. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 10371-10376, 1996.

MATSUDA, A. H. **Aplicação da técnica de irradiação gama para preservação de própolis**. São Paulo, 2002. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações) – Instituto de Pesquisas Nucleares e Energéticas.

MATSUNO, T. **O efeito terapêutico da própolis**. 1. ed. São Paulo: Nair Tazue Itice, 1997.

MENEZES, H.; ALVAREZ, J. M.; ALMEIDA, E. Mouse ear edema modulation by different propolis ethanol extracts. **Arzneimittel Forschung Drug Research**, v. 49 (II), n. 8, 1999.

MIYATAKA, H. et al. Evaluation of propolis. I. Evaluation of Brazilian and Chinese propolis by enzymatic and physico-chemical methods. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 20, n. 5, p. 496-501, 1997.

MIORIN, P. L. et al. Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, n. 95, p. 913 – 920, 2003.

MONTPIED, P. et al. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) prevents inflammatory stress in organotypic hippocampal slice cultures. **Molecular Brain Research**, v. 115, p. 111-120, 2003.

MORI, A. L. P. M. **Própolis – Identificação de flavonóides e ácidos aromáticos em tintura. Estimativa de FPS de extrato mole em base cosmética**. São Paulo, 1997. 114 f. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos) – Faculdade de Ciência Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

NAFADY, A. M. et al. Cyclodextrin-enclosed substances of Brazilian propolis. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, n. 8, p. 984-985, 2003.

NAGAI, T. et al. Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. **Food Chemistry**, v. 80, p. 29-33, 2003.

NAGAOKA, T. et al. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) analogues: potent nitric oxide inhibitors from the Netherlands propolis. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, n. 4, p. 487-491, 2003.

NAKANISHI, I. et al. Efficient radical scavenging ability of artemillin C, a major component of Brazilian propolis, and the mechanism. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 1, p. 1452-1454, 2003.

NEGRI, G. et al. Comb and propolis waxes from Brazil (states of São Paulo and Paraná). **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 11, n. 5, p. 453-457, 2000.

NIEVA MORENO, M. I. et al. Screening of antibacterial activity of Amaicha del Valle (Tucumán, Argentina) propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 68, p. 97-102, 1999.

NIEVA MORENO, M. I. et al. Comparison of the radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, p. 109-114, 2000.

OLIVEIRA, F.; AKISSUE, G. **Fundamentos de Farmacobotânica**. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu Editora, 1989.

ORSI, R. O. et al. Immunomodulatory action of propolis on macrophage action. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 6, n. 2, 2000.

ORSOLIC, N.; BASIC, I. Immunomodulation by water-soluble derivative of propolis: a factor of antitumor reactivity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 84, p. 265-273, 2003.

PACHECO, T. A. R. C. **Determinação das características físico-químicas e propriedades biológicas das própolis de Apis Mellifera coletadas no Estado de São Paulo**. Campinas, 2001. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

PAREDES-GUZMÁN, J. et al. Estudo das própolis que contém artemillin C. **Mensagem Doce**, n. 74, nov. 2003.

PARK, Y. K. et al. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. **Current Microbiology**, v. 36, p. 24-28, 1998.

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

PARK, Y. K. et al. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 6, p. 997-1003, 2002.

PARK, Y. K. et al. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1100-1103, 2004.

PATHAK, D.; PATHAK, K.; SINGLA, A. K. Flavonoids as medicinal agents – recent advances. **Fitoterapia**, v. 62, n. 5, p. 371-389, 1991.

PEREIRA, A. S.; SEIXAS, F. R. M.; AQUINO NETO, F. R. de. Própolis: 100 anos de pesquisas e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 321-326, 2002.

PEREIRA, A. S.; NASCIMENTO, A. A.; AQUINO NETO, F. R. de. Lupeol alkanoates in Brazilian propolis. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 57c, p. 721-726, 2002.

PEREIRA, A. S. et al. Distribution of quinic acid derivatives and other phenolic compounds in Brazilian propolis. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 58c, p. 590-593, 2003.

PEYREFITTE, G.; MARTINI, M. C.; CHIVOT, M. Biologia da pele. In: _____. **Estética – Cosmética**. São Paulo: Organização Andrei Editora, 1998. p. 325-361.

PIETTA, P. G.; GARDANA, C.; PIETTA, A. M. Analytical methods for quality control of propolis. **Fitoterapia**, v. 73, s.1, p. S7-S20, 2002.

PROMEGA CORPORATION. **TECHNICAL BULLETIN Nº. 169**: CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay. Revisado em 07/2001. Disponível em: <www.promega.com> Acesso em: 05.12.03.

ROSSI, A. et al. The role of the phenethyl ester caffeic acid (CAPE) in the inhibition of rat lung cyclooxygenase activity by propolis. **Fitoterapia**, v. 73, s. 1, p. S30-S37, 2002.

RUSSO, A.; LONGO, R.; VANELLA, A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. **Fitoterapia**, v. 73, s. 1, p. S21-S29, 2002

SANTOS, S. da C.; MELLO, J. C. P. de. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Porto Alegre: Editora da Universidade/UFRGS, 2000. p. 517-544.

SANTOS, F. A. et al. Antibacterial activity of propolis produced in Brazil against *Actinobacillus actinomycescomitans*, *Fusobacterium* spp. and Bacteria from *Bacteroids fragilis* group isolated from human and marmoset hosts. **Anaerobe**, v. 5, p. 479-481, 1999.

SANTOS, F. A. et al. Susceptibility of *Prevotella intermedia*/*Prevotella nigrescens* (and *Porphyromonas gingivalis*) to propolis (bee glue) and other antimicrobial agents. **Anaerobe**, v. 8, p. 9-15, 2002.

SANTOS, F. A. et al. Brazilian propolis: physicochemical properties, plant origin and antibacterial activity on periodontopathogens. **Phytotherapy Research**, v. 17, p. 285-289, 2003.

SFORCIN, J. M. et al. Seasonal effect of Brazilian propolis antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.73, p. 243-249, 2000.

SFORCIN, J. M. et al. Seasonal effect of Brazilian propolis on *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 7, n. 1, 2001.

SFORCIN, J. M.; KANENO, R.; FUNARI, S. R. C. Absence of seasonal effect on the immunomodulatory action of Brazilian propolis on natural killer activity. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 8, n. 1, 2002.

SHIMIZU, K. et al. Antioxidative bioavailability of artemisinin C in Brazilian propolis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 429, p. 181-188, 2004.

SUGIMOTO, Y. et al. Inhibitory effects of propolis granular A. P. C. on 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung tumorigenesis in A/J mice. **Cancer Letters**, v. 193, p. 155-159, 2003.

TATEFUJI, T. et al. Isolation and identification of compounds from Brazilian propolis which enhance macrophage spreading and mobility. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 17, n. 7, p. 966-970, 1996.

TAZAWA, S. et al. Studies on the constituents of Brazilian propolis. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 46, n. 9, p. 1477-1479, 1998.

TOMÁS-BARBERÁN, F. A. et al. Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. **Phytochemistry**, v. 34, n.1, p. 191-196, 1993.

VANHAELEN, M.; VANHAEFEN-FASTRÉ, R. Propolis. – I. origine, micrographie, composition chimique et activité thérapeutique. **Journal de Pharmacie de Belgique**, v. 34, n. 5, p. 253-259, 1979a.

VANHAELEN, M.; VANHAEFEN-FASTRÉ, R. Propolis. – II. Identification par chromatographies haute-performance (liquide, gaz-liquide et sur couches minces) des constituants. Bioautographie des chromatogrammes des composés antibactériens **Journal de Pharmacie de Belgique**, v. 34, n. 6, p. 317-328, 1979b.

VELIKOVA, M. et al. Propolis from the mediterranean region: chemical composition and antimicrobial activity. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 55c, n. 9/10, p. 790-793, 2000.

VENNAT, B. et al. Hamamelis virginiana: identification and assay of proanthocyanidins, phenolic acids and flavonoids in leaf extracts. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 67, n. 1. p. 11-14, 1992.

VENNAT, B. et al. Qualitative and quantitative analysis of flavonoids and identification of phenolic acids from propolis extract. **Journal de Pharmacie de Belgique**, v. 50, n. 5, p. 438-444, 1995.

WALKER, P.; CRANE, E. Constituents of propolis. **Apidologie**, v. 18, n. 4, p. 327-334, 1987.

WATERMAN, P. G.; MOLE, S. **Analysis of phenolic plant metabolites**. London: Blackwell Scientific Publications, 1994.

WOLLENWEBER, E. et al. A novel caffeic acid derivative and other constituents of Populus bud excretion and propolis (bee-glue). **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 42c, p. 1030-1034, 1987.

WOLLENWEBER, E.; JAY, M. Flavones and flavonols. In: HARBORNE, J. B. **The flavonoids: advances in research since 1980**. 1. ed. London: Chapman and Hall, 1988. p. 233-302.

WOLLENWEBER, E.; BUCHMANN, S. L. Feral honey bees in the Sonoran Desert: propolis sources other than Poplars (*Populus spp.*). **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 52c, 530-535, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Quality control methods for medicinal plant materials**. England: World Health Organization Editor, 1998.

WOISKY, R. G. do Rio. **Métodos de controle químico de amostras de própolis**. São Paulo, 1996. 74 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

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

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – DADOS BRUTOS DOS ENSAIOS QUANTITATIVOS	127
APÊNDICE 2 – ENSAIOS QUALITATIVOS COM CONTAMINAÇÃO MICROBIANA ..	137

APÊNDICE 1 – DADOS BRUTOS DOS ENSAIOS QUANTITATIVOS

ENSAIOS QUANTITATIVOS

As Tabelas 1 a 8, à continuação, trazem os resultados dos 8 ensaios quantitativos realizados a partir de soluções teste e controle, tendo-se o polietilenoglicol 400 (PEG 400) como solvente. A Figura 1, ao final deste Apêndice, traz o gráfico da média das absorbâncias versus diluição, para cada ensaio.

TABELA 1 - ABSORBÂNCIAS A 490 NM, MÉDIAS, DESVIOS PADRÃO (DP) E ERROS (DPR) DAS SOLUÇÕES TESTE (T), CÔNTROLE (C) E CÔNTROLE NEGATIVO (C-) - ENSAIO 1

DILUIÇÃO (µg/mL)	T1	T2	T3	MÉDIA	DP	DPR	C1	C2	C3	MÉDIA	DP	DPR (%)
125,00 (E)	0,037	0,079	0,047	0,0543	0,0219	40,3791	1,299	1,184	1,147	1,2100	0,0793	6,5509
62,500 (F)	0,252	0,261	0,377	0,2967	0,0697	23,4998	1,369	1,353	1,195	1,3057	0,0962	7,3659
31,250 (G)	0,981	0,966	1,018	0,9885	0,0265	2,6823	1,328	1,230	1,246	1,2680	0,0526	4,1462
15,625 (H)	1,260	1,307	1,347	1,3047	0,0435	3,3378	1,377	1,360	1,081	1,2727	0,1662	13,0596
7,812 (I)	1,234	1,267	1,375	1,2920	0,0737	5,7082	1,352	1,277	1,131	1,2533	0,1124	8,9669
3,906 (J)	1,193	1,418	1,318	1,3097	0,1127	8,6076	1,432	1,376	1,183	1,3303	0,1306	9,8194
1,953 (K)	1,139	1,384	1,235	1,2527	0,1235	9,8551	1,305	1,345	1,189	1,2797	0,0810	6,3319
0,977 (L)	1,158	1,242	1,416	1,2720	0,1316	10,3451	1,345	1,353	1,206	1,3013	0,0827	6,3518
0,488 (M)	1,257	1,245	1,309	1,2703	0,0340	2,6780	1,400	1,383	1,219	1,3340	0,1000	7,4929
0,244 (N)	1,220	1,278	1,290	1,2627	0,0374	2,9647	1,377	1,378	1,291	1,3487	0,0499	3,7032
0,122 (O)	1,282	1,177	1,142	1,2003	0,0729	6,0698	1,355	1,224	1,093	1,2240	0,1310	10,7026
Controle Negativo-							1,127	1,195	1,230	1,1840	0,0524	4,4200

TABELA 2 - ABSORBÂNCIAS A 490 NM, MÉDIAS, DESVIOS PADRÃO (DP) E ERROS (DPR) DAS SOLUÇÕES TESTE (T), CONTROLE (C) E CONTROLE NEGATIVO (C-) - ENSAIO 2

DILUIÇÃO (µg/mL)	T1	T2	T3	MÉDIA	DP	DPR	C1	C2	C3	MÉDIA	DP	DPR (%)
125,0 (E)	0,019	0,001	0,011	0,0103	0,0090	87,2758	0,826	0,806	0,921	0,8510	0,0614	7,2199
62,5 (F)	0,078	0,072	0,073	0,0743	0,0032	4,3245	1,067	0,875	0,741	0,8943	0,1639	18,3218
31,25 (G)	0,281	0,331	0,287	0,2997	0,0273	9,1104	0,626	0,443	0,569	0,5460	0,0936	17,1507
15,625 (H)	0,609	0,606	0,533	0,5827	0,0430	7,3865	0,917	0,936	0,798	0,8837	0,0748	8,4642
7,8125 (I)	0,924	0,816	0,909	0,8830	0,0585	6,6259	0,727	0,840	0,784	0,7837	0,0565	7,2098
3,9062 (J)	0,965	0,878	0,676	0,8397	0,1483	17,6575	0,920	0,915	0,619	0,8180	0,1724	21,0706
2,9297 (J1)	0,825	0,874	0,830	0,8430	0,0270	3,1985	0,870	0,854	0,933	0,8857	0,0418	4,7157
1,9531 (K)	0,984	0,929	1,061	0,9913	0,0663	6,6885	0,730	0,903	0,781	0,8047	0,0889	11,0474
1,4648 (K1)	1,102	0,917	0,870	0,9630	0,1226	12,7362	0,674	0,814	0,581	0,6897	0,1173	17,0064
0,9766 (L)	0,771	0,732	0,905	0,8027	0,0907	11,3052	0,945	0,622	1,084	0,8837	0,2370	26,8233
0,7324 (L1)	0,943	0,958	0,894	0,9317	0,0335	3,5926	0,962	0,887	0,797	0,8820	0,0826	9,3666
0,4883 (M)	0,839	0,939	0,933	0,9037	0,0561	6,2062	1,121	0,988	0,921	1,0100	0,1018	10,0791
0,3662 (M1)	0,570	0,671	0,631	0,6240	0,0509	8,1511	0,858	1,159	1,076	1,0310	0,1555	15,0789
0,2441 (N)	0,934	0,754	0,902	0,8633	0,0960	11,1229	0,993	0,968	0,920	0,9603	0,0371	3,8631
0,1221 (O)	0,866	0,879	0,784	0,8430	0,0515	6,1100	0,764	0,857	0,867	0,8293	0,0568	6,8490
Controle Negativo-							0,967	0,890	0,848	0,9016	0,0603	6,6900

TABELA 3 - ABSORBÂNCIAS A 490 NM, MÉDIAS, DESVIOS PADRÃO (DP) E ERROS (DPR) DAS SOLUÇÕES TESTE (T), CONTROLE (C) E CONTROLE NEGATIVO (C-) - ENSAIO 3

DILUIÇÃO (µg/mL)	T1	T2	T3	MÉDIA	DP	DPR	C1	C2	C3	MÉDIA	DP	DPR (%)
125,0 (E)	0,01	0,008	0,012	0,0100	0,0020	20,0000	1,062	0,964	1,104	1,0433	0,0718	6,8859
62,5 (F)	0,296	0,232	0,223	0,2503	0,0398	15,9003	0,882	1,02	0,961	0,9543	0,0692	7,2554
31,25 (G)	0,562	0,502	0,581	0,5483	0,0412	7,5201	0,988	0,864	0,933	0,9283	0,0621	6,6928
15,625 (H)	0,950	0,811	0,836	0,8657	0,0741	8,5595	1,13	0,949	1,025	1,0347	0,0909	8,7841
7,8125 (I)	1,040	1,074	0,901	1,0050	0,0917	9,1201	0,989	0,913	1,063	0,9883	0,0750	7,5888
3,9062 (J)	1,046	1,023	0,994	1,0210	0,0261	2,5522	0,878	0,863	0,856	0,8657	0,0112	1,2984
2,9297 (J1)	1,074	1,021	0,984	1,0263	0,0452	4,4076	0,961	1,043	0,847	0,9503	0,0984	10,3579
1,9531 (K)	0,999	0,978	0,816	0,9310	0,1001	10,7567	1,022	0,918	0,986	0,9753	0,0528	5,4150
1,4648 (K1)	1,087	0,986	0,928	1,0003	0,0805	8,0436	1,056	1,113	0,923	1,0307	0,0975	9,4599
0,9766 (L)	1,044	1,054	1,016	1,0380	0,0197	1,8977	1,031	1,002	0,91	0,9810	0,0632	6,4398
0,7324 (L1)	1,167	1,112	1,058	1,1123	0,0545	4,8997	1,042	1,062	1,068	1,0573	0,0136	1,2876
0,4883 (M)	0,998	1,126	1,108	1,0773	0,0693	6,4318	0,998	1,067	1,043	1,0360	0,0350	3,3811
0,3662 (M1)	1,116	0,946	1,118	1,0600	0,0987	9,3143	0,944	1,240	1,135	1,1063	0,1501	13,5644
0,2441 (N)	0,888	0,982	0,975	0,9483	0,0524	5,5220	1,104	1,044	1,184	1,1107	0,0702	6,3239
0,1221 (O)	0,996	0,99	1,098	1,0280	0,0607	5,9043	1,204	1,065	1,142	1,1370	0,0696	6,1244
Controle Negativo-							0,983	1,028	1,048	1,0197	0,0333	3,2600

TABELA 4 - ABSORBÂNCIAS A 490 NM, MÉDIAS, DESVIOS PADRÃO (DP) E ERROS (DPR) DAS SOLUÇÕES TESTE (T), CONTROLE (C) E CONTROLE NEGATIVO (C-) - ENSAIO 4

DILUIÇÃO (µg/mL)	T1	T2	T3	MÉDIA	DP	DPR	C1	C2	C3	MÉDIA	DP	DPR (%)
125,0 (E)	0,000	0,006	0,013	0,0063	0,0065	102,7327	1,090	0,944	0,947	0,9937	0,0834	8,3972
62,5 (F)	0,341	0,268	0,203	0,2707	0,0690	25,5069	1,025	0,954	1,080	1,0197	0,0632	6,1951
31,25 (G)	0,532	0,576	0,58	0,5627	0,0266	4,7334	0,993	0,894	0,757	0,8813	0,1185	13,4465
15,625 (H)	0,876	0,840	0,833	0,8497	0,0231	2,7155	1,002	1,087	1,019	1,0360	0,0450	4,3415
7,8125 (I)	0,913	0,964	0,989	0,9553	0,0387	4,0545	0,993	1,005	1,109	1,0357	0,0638	6,1594
3,9062 (J)	1,222	1,091	1,022	1,1117	0,1016	9,1384	0,987	1,005	0,951	0,9810	0,0275	2,8028
2,9297 (J1)	1,028	1,042	0,962	1,0107	0,0427	4,2273	1,018	1,117	1,037	1,0573	0,0525	4,9690
1,9531 (K)	1,055	0,971	1,111	1,0457	0,0705	6,7388	1,204	1,090	1,027	1,1070	0,0897	8,1044
1,4648 (K1)	1,075	0,989	1,075	1,0463	0,0497	4,7453	1,171	1,013	1,012	1,0653	0,0915	8,5899
0,9766 (L)	1,084	0,951	1,032	1,0223	0,0670	6,5561	1,087	1,027	0,971	1,0283	0,0580	5,6413
0,7324 (L1)	1,201	1,085	1,111	1,1323	0,0609	5,3758	1,075	1,140	1,110	1,1083	0,0325	2,9352
0,4883 (M)	0,789	0,894	0,910	0,8643	0,0657	7,6046	1,024	1,072	1,127	1,0743	0,0515	4,7974
0,3662 (M1)	0,879	0,934	1,154	0,9890	0,1455	14,7135	1,227	1,231	1,125	1,1943	0,0601	5,0302
0,2441 (N)	1,026	1,022	0,917	0,9883	0,0618	6,2538	1,108	1,175	1,085	1,1227	0,0468	4,1649
0,1221 (O)	1,041	0,956	1,105	1,0340	0,0747	7,2288	1,137	1,127	1,101	1,1217	0,0186	1,6567
Controle Negativo-							1,083	0,956	0,870	0,9697	0,1072	11,0500

TABELA 5 - ABSORBÂNCIAS A 490 NM, MÉDIAS, DESVIOS PADRÃO (DP) E ERROS (DPR) DAS SOLUÇÕES TESTE (T), CONTROLE (C) E CONTROLE NEGATIVO (C-) - ENSAIO 5

DILUIÇÃO (µg/mL)	T1	T2	T3	MÉDIA	DP	DPR	C1	C2	C3	MÉDIA	DP	DPR (%)
125,0 (E)	0,023	0,025	0,019	0,0223	0,0031	13,6793	0,984	0,683	0,610	0,7590	0,1982	26,1192
62,5 (F)	0,164	0,129	0,129	0,1407	0,0202	14,3654	0,913	0,611	0,587	0,7037	0,1817	25,8197
31,25 (G)	0,482	0,456	0,469	0,4690	0,0130	2,7719	0,855	0,697	0,652	0,7347	0,1066	14,5118
15,625 (H)	0,904	0,882	0,714	0,8333	0,1039	12,4715	0,740	0,747	0,610	0,6990	0,0772	11,0380
7,8125 (I)	1,047	0,988	0,945	0,9933	0,0512	5,1552	0,751	0,599	0,689	0,6797	0,0764	11,2450
3,9062 (J)	0,998	1,085	0,974	1,0190	0,0584	5,7315	0,583	0,613	0,545	0,5803	0,0341	5,8722
2,9297 (J1)	1,059	0,902	0,900	0,9537	0,0912	9,5659	0,715	0,677	0,717	0,7030	0,0225	3,2061
1,9531 (K)	0,993	0,833	0,890	0,9053	0,0811	8,9574	0,647	0,638	0,610	0,6317	0,0193	3,0548
1,4648 (K1)	0,827	0,834	0,758	0,8063	0,0420	5,2093	0,654	0,646	0,643	0,6477	0,0057	0,8780
0,9766 (L)	0,914	0,760	0,767	0,8137	0,0870	10,6876	0,652	0,614	0,655	0,6403	0,0229	3,5692
0,7324 (L1)	0,807	0,877	0,820	0,8347	0,0372	4,4609	0,634	0,609	0,690	0,6443	0,0415	6,4372
0,4883 (M)	0,698	0,608	0,687	0,6643	0,0491	7,3901	0,650	0,757	0,606	0,6710	0,0777	11,5737
0,3662 (M1)	0,679	0,682	0,643	0,6680	0,0217	3,2489	0,782	0,688	0,693	0,7210	0,0529	7,3352
0,2441 (N)	0,667	0,523	0,622	0,6040	0,0737	12,1967	0,730	0,75	0,774	0,7513	0,0220	2,9322
0,1221 (O)	0,657	0,686	0,744	0,6957	0,0443	6,3677	0,694	0,725	0,751	0,7233	0,0285	3,9451
Controle Negativo-							0,823	0,727	0,776	0,7753	0,0480	6,1900

TABELA 6 - ABSORBÂNCIAS A 490 NM, MÉDIAS, DESVIOS PADRÃO (DP) E ERROS (DPR) DAS SOLUÇÕES TESTE (T), CONTROLE (C) E CONTROLE NEGATIVO (C-) - ENSAIO 6

DILUIÇÃO (µg/mL)	T1	T2	T3	MÉDIA	DP	DPR	C1	C2	C3	MÉDIA	DP	DPR (%)
125,0 (E)	0,014	0,015	0,039	0,023	0,0142	62,4437	0,621	0,767	0,652	0,680	0,0769	11,3121
62,5 (F)	0,171	0,129	0,152	0,151	0,0210	13,9591	0,875	0,614	0,609	0,699	0,1522	21,7568
31,25 (G)	0,475	0,444	0,469	0,463	0,0164	3,5537	0,713	0,6669	0,673	0,684	0,0250	3,6594
15,625 (H)	0,843	0,822	0,787	0,817	0,0283	3,4613	0,714	0,581	0,589	0,628	0,0746	11,8767
7,8125 (I)	1,021	0,940	0,907	0,956	0,0587	6,1360	0,655	0,649	0,606	0,637	0,0267	4,1980
3,9062 (J)	0,985	0,948	0,962	0,965	0,0187	1,9359	0,659	0,494	0,571	0,575	0,0826	14,3668
2,9297 (J1)	1,001	0,897	0,842	0,913	0,0807	8,8411	0,589	0,557	0,632	0,593	0,0376	6,3500
1,9531 (K)	0,930	0,848	0,849	0,876	0,0471	5,3738	0,669	0,544	0,583	0,599	0,0640	10,6830
1,4648 (K1)	0,881	0,776	0,797	0,818	0,0556	6,7923	0,690	0,679	0,689	0,686	0,0061	0,8867
0,9766 (L)	-	1,067	0,755	0,911	0,2206	24,2170	0,674	0,603	0,649	0,642	0,0360	5,6096
0,7324 (L1)	0,638	0,768	0,767	0,724	0,0748	10,3224	0,682	0,647	0,663	0,664	0,0175	2,6388
0,4883 (M)	0,752	0,649	0,503	0,635	0,1251	19,7139	0,692	0,622	0,634	0,649	0,0374	5,7650
0,3662 (M1)	0,649	0,605	0,658	0,637	0,0284	4,4499	0,680	0,636	0,697	0,671	0,0315	4,6915
0,2441 (N)	0,591	0,544	0,679	0,605	0,0685	11,3335	0,684	0,683	0,724	0,697	0,0234	3,3555
0,1221 (O)	0,665	0,661	0,631	0,652	0,0186	2,8487	0,689	0,706	0,586	0,660	0,0649	9,8334
Controle Negativo-							0,92	0,710	0,764	0,798	0,1091	13,6655

TABELA 7 - ABSORBÂNCIAS A 490 NM, MÉDIAS, DESVIOS PADRÃO (DP) E ERROS (DPR) DAS SOLUÇÕES TESTE (T), CONTROLE (C) E CONTROLE NEGATIVO (C-) - ENSAIO 7

DILUIÇÃO (µg/mL)	T1	T2	T3	MÉDIA	DP	DPR	C1	C2	C3	MÉDIA	DP	DPR (%)
125,0 (E)	0,021	0,025	0,018	0,0213	0,0035	16,4620	0,937	0,762	0,701	0,8000	0,1225	15,3129
62,5 (F)	0,189	0,218	0,219	0,2087	0,0170	8,1657	0,924	0,693	0,700	0,7723	0,1314	17,0126
31,25 (G)	0,400	0,404	0,417	0,4070	0,0089	2,1838	0,862	0,686	0,776	0,7747	0,0880	11,3607
15,625 (H)	0,667	0,626	0,622	0,6383	0,0249	3,9018	0,716	0,711	0,673	0,7000	0,0235	3,3594
7,8125 (I)	0,766	0,873	0,752	0,7970	0,0662	8,3048	0,770	0,748	0,674	0,7307	0,0503	6,8831
3,9062 (J)	0,869	0,948	0,910	0,9090	0,0395	4,3465	0,721	0,663	0,693	0,6923	0,0290	4,1896
2,9297 (J1)	0,932	0,938	0,934	0,9347	0,0031	0,3269	0,714	0,775	0,777	0,7553	0,0358	4,7409
1,9531 (K)	1,041	0,942	0,909	0,9640	0,0687	7,1260	0,757	0,727	0,687	0,7237	0,0351	4,8529
1,4648 (K1)	1,010	0,901	0,853	0,9213	0,0805	8,7320	0,784	0,727	0,847	0,7860	0,0600	7,6368
0,9766 (L)	0,997	0,813	0,725	0,8450	0,1388	16,4254	0,811	0,785	0,692	0,7627	0,0626	8,2034
0,7324 (L1)	1,003	0,872	0,878	0,9177	0,0740	8,0598	0,846	0,811	0,862	0,8397	0,0261	3,1064
0,4883 (M)	0,802	0,771	0,774	0,7823	0,0171	2,1855	1,007	0,860	0,833	0,9000	0,0936	10,4048
0,3662 (M1)	0,753	0,721	0,689	0,7210	0,0320	4,4383	0,829	0,835	0,891	0,8517	0,0342	4,0151
0,2441 (N)	0,752	0,661	0,671	0,6947	0,0499	7,1838	0,898	0,839	0,842	0,8597	0,0332	3,8656
0,1221 (O)	0,716	0,692	0,793	0,7337	0,0528	7,1922	0,844	0,850	0,915	0,8697	0,0394	4,5275
Controle Negativo-							0,945	0,723	0,776	0,8150	0,1160	14,232

TABELA 8 - ABSORBÂNCIAS A 490 NM, MÉDIAS, DESVIOS PADRÃO (DP) E ERROS (DPR) DAS SOLUÇÕES TESTE (T), CONTROLE (C) E CONTROLE NEGATIVO (C-) - ENSAIO 8

DILUIÇÃO (µg/mL)	T1	T2	T3	MÉDIA	DP	DPR	C1	C2	C3	MÉDIA	DP	DPR (%)
125,0 (E)	0,016	0,032	0,023	0,0237	0,0080	33,8907	0,863	0,781	0,838	0,8273	0,0420	5,0799
62,5 (F)	0,03	0,035	0,022	0,0290	0,0066	22,6119	0,733	0,755	0,699	0,7290	0,0282	3,8702
31,25 (G)	0,342	0,334	0,302	0,3260	0,0212	6,4926	0,763	0,732	0,653	0,7160	0,0567	7,9216
15,625 (H)	0,579	0,557	0,557	0,5643	0,0127	2,2507	0,748	0,662	0,663	0,6910	0,0494	7,1441
7,8125 (I)	0,797	0,727	0,788	0,7707	0,0381	4,9416	0,676	0,678	0,557	0,6370	0,0693	10,8774
3,9062 (J)	0,822	0,798	0,785	0,8017	0,0188	2,3414	0,65	0,603	0,603	0,6187	0,0271	4,3861
2,9297 (J1)	0,840	0,775	0,781	0,7987	0,0359	4,4976	0,689	0,826	0,683	0,7327	0,0809	11,0398
1,9531 (K)	0,767	0,723	0,756	0,7487	0,0229	3,0585	0,624	0,682	0,657	0,6543	0,0291	4,4460
1,4648 (K1)	0,813	0,763	0,71	0,7620	0,0515	6,7595	0,76	0,763	0,766	0,7630	0,0030	0,3932
0,9766 (L)	0,786	0,684	0,635	0,7017	0,0770	10,9788	0,653	0,679	0,647	0,6597	0,0170	2,5785
0,7324 (L1)	0,848	0,749	0,760	0,7857	0,0543	6,9065	0,797	0,869	0,882	0,8493	0,0458	5,3908
0,4883 (M)	0,816	0,637	0,735	0,7293	0,0896	12,2899	0,817	0,622	0,689	0,7093	0,0991	13,9677
0,3662 (M1)	0,74	0,666	0,677	0,6943	0,0399	5,7507	0,827	0,777	0,762	0,7887	0,0340	4,3154
0,2441 (N)	0,568	0,711	0,625	0,6347	0,0720	11,3427	0,624	0,625	0,694	0,6477	0,0401	6,1959
0,1221 (O)	0,630	0,654	0,68	0,6547	0,0250	3,8198	0,749	0,660	0,748	0,7190	0,0511	7,1068
Controle Negativo-							0,78	0,850	0,815	0,815	0,0350	4,294

FIGURA 1 – GRÁFICOS DE ABSORBÂNCIA VERSUS DILUIÇÃO, PARA CADA ENSAIO QUANTITATIVO REALIZADO

NOTAS: O valor de absorbância lido no eixo das ordenadas corresponde à média de três poços, como pode ser observado nas Tabelas 1 a 8, deste Apêndice.

Pontos teste - E:125 µg/mL; F: 62,50 µg/mL; G: 31,250 µg/mL; H: 15,625 µg/mL; I: 7,812 µg/mL; J: 3,906 µg/mL; J1: 2,929 µg/mL; K: 1,953 µg/mL; K1: 1,465 µg/mL; L: 0,977 V; L1: 0,732 µg/mL; M: 0,488 µg/mL; M1: 0,366 µg/mL; N: 0,244 µg/mL; O: 0,122 µg/mL.

APÊNDICE 2 – ENSAIOS QUALITATIVOS COM CONTAMINAÇÃO MICROBIANA

FIGURA 1 - CÉLULAS NIH 3T3, CORADAS COM RODAMINA 2% EM FORMOL 4%, APÓS INCUBAÇÃO COM SOLUÇÕES TESTE (I-O) OU COM SUAS RESPECTIVAS SOLUÇÕES CONTROLES (Ic-Oc) E CONTROLE NEGATIVO (CONT-)

NOTAS: Detectou-se contaminação microbiana em ambos os experimentos (I e II)

I: 7,812 $\mu\text{g/mL}$; J: 3,906 $\mu\text{g/mL}$; J1: 2,929 $\mu\text{g/mL}$; K: 1,953 $\mu\text{g/mL}$; K1: 1,465 $\mu\text{g/mL}$;
 L: 0,977 $\mu\text{g/mL}$; L1: 0,732 $\mu\text{g/mL}$; M: 0,488 $\mu\text{g/mL}$; M1: 0,366 $\mu\text{g/mL}$; N: 0,244 $\mu\text{g/mL}$;
 O: 0,122 $\mu\text{g/mL}$.