

ANÁLISE DE PRÓPOLIS¹

Cristiano S. FUNARI^{2,*}, Vicente O. FERRO²

RESUMO

O objetivo deste trabalho é contribuir para o estabelecimento de rotinas que facilitem o controle de qualidade de própolis, incluindo a identificação de sua(s) fonte(s) botânica(s). Para tanto, traz análises preconizadas pelo Ministério da Agricultura (exame organoléptico, perda por dessecação a 105°C, teores de cinza e de cera, resíduo insolúvel em metanol, resíduo seco e teores de flavonóides e fenóis totais) e análises cromatográficas (CLAE) comparativas entre própolis e sua suposta fonte vegetal. Os resultados permitiram observar que, excetuando-se perda por dessecação a 105°C, todos os demais parâmetros estiveram dentro dos limites estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, e a própolis estudada provavelmente foi elaborada a partir da espécie *Baccharis dracunculifolia* DC, proveniente da Serra do Japi-SP/Brasil. Foram identificados os ácidos clorogênico, cafeico, *para*-cumárico, ferúlico, *trans*-cinâmico e artepillin C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico) e os flavonóides isossacuranetina e canferida, em ambos, própolis e planta.

Palavras-chave: própolis, fenóis, flavonóides, alecrim-do-campo, *Baccharis*, vassourinha.

SUMMARY

PROPOLIS ANALYSIS. The goal of this work is to contribute in establishing routines for the quality control of propolis, including the identification of its botanical source(s). For this reason, we present an analysis in accordance with the Brazilian Agricultural Ministry recommendations (organoleptic evaluation, loss on drying at 105°C, determinations of extractable and non-extractable matter and determinations of ash, wax, flavonoids and total phenolic contents) and comparative chromatographic analysis (HPLC) between propolis and its expected vegetal source. With the exception of the "drying loss test at 105°C", all the parameters were within the limits established by the Ministry of Agricultural to guarantee the identity and quality of propolis. Our results suggested that the species *Baccharis dracunculifolia* DC, was the vegetable source of the propolis from Serra do Japi (São Paulo State)/Brazil. Identification of the acids artepillin C, *para*-coumaric, ferulic, chlorogenic, caffeic and *trans*-cinnamic and of the flavonoids kaempferide and isosakuranetin in propolis and plant was possible.

Keywords: propolis, phenolics, flavonoids, alecrim-do-campo, *Baccharis*, vassourinha.

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, às quais as abelhas acrescentam secreções salivares, cera e pólen para a elaboração do produto final [15]. Seu emprego na vida da colônia está relacionado com suas propriedades mecânicas, sendo utilizada na construção e adaptação da colméia, e antimicrobianas, garantindo um ambiente asséptico [24].

Os primeiros registros da utilização da própolis pelo homem remontam ao Egito antigo e à Mesopotâmia [16, 44, 52]. Desde a década de 1980, este produto vem sendo largamente utilizado em suplementos alimentares e beberagens, como preventivo de enfermidades [12] e em aplicações tópicas [6, 19, 27, 35]. Paralelamente, nota-se um incremento de estudos a partir deste produto, desta-

quando-se aqueles levados a cabo com própolis da Região Sudeste do Brasil [38], o mais bem cotado no mercado internacional, com valores que variam entre US\$ 80 e 100 o kg do produto *in natura*.

Estudos apontam que este produto (ou seus derivados) apresenta toxicidade contra células cancerígenas e as atividades antioxidante, antiinflamatória, hepatoprotetora, imunoestimulante e antibiótica [10, 11, 14, 21, 29, 54, 56]. Sua composição química é variada, sendo que já foram identificadas mais de 200 substâncias em própolis de diferentes localidades, incluindo ácidos fenólicos, flavonóides, ésteres, diterpenos, sesquiterpenos, lignanas, aldeídos aromáticos, álcoois, aminoácidos, ácidos graxos, vitaminas e minerais [9, 13, 20, 26, 30, 36, 37, 39, 42, 50, 53, 57, 49, 59]. Dentre estas classes de substâncias, destacam-se a dos flavonóides e a dos ácidos fenólicos, pois é atribuída a elas grande parte das atividades biológicas constatadas para a própolis.

Como consequência do panorama descrito acima, há uma considerável quantidade de informações disponíveis relativas aos aspectos químicos e biológicos da própolis, porém sua aplicação terapêutica ainda pode ser considerada incipiente. Isto se deve, principalmente, à variabilidade de sua composição química em função de sua origem geográfica, já que em diferentes ecossistemas as abelhas recorrem a distintas espécies vegetais como fontes de matérias-primas empregadas em sua elaboração [8, 38, 39, 62].

¹Recebido para publicação em 7/6/2005. Aceito para publicação em 23/1/2006 (001540)

²Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (USP)

Avenida Lineu Prestes, 580 – Conjunto das Químicas, Bloco 15
CEP 05508-900 – Cidade Universitária, São Paulo (SP), Brasil

E-mail: cristianofunari@yahoo.com.br

*A quem a correspondência deve ser enviada

Neste sentido, os conhecimentos da(s) fonte(s) botânica(s) e da procedência da amostra adquirida ou estudada contribuiriam com a desejada padronização, pois poderiam indicar características típicas de própolis de determinada origem, como sua composição química e atividades biológicas. O objetivo deste trabalho é contribuir para o estabelecimento de rotinas que facilitem o controle de qualidade de própolis, incluindo a indicação de sua provável fonte botânica.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Materiais

Amostras de própolis: três amostras de própolis foram coletadas em apiário localizado no município de Cabreúva (SP), por raspagem de partes internas de colméias do tipo *Langstroth*. Após separação de impurezas, cada amostra foi acondicionada em recipiente fechado, ao abrigo da luz e em freezer.

Amostra vegetal: a aproximadamente 20 m do apiário, foram coletados brotos apicais e partes variadas de um indivíduo de planta denominada regionalmente de vassourinha ou alecrim-do-campo.

Reagente de Folin-Denis: foram adicionados 20 g de tungstato de sódio, 4 g de ácido fosfomolibdico e 10 mL de ácido fosfórico em 150 mL de água destilada, e a solução foi levada a refluxo. Transcorridas 2 h, a solução foi resfriada à temperatura ambiente e diluída em balão volumétrico de 200 mL.

2.2 - Métodos

2.2.1 - Exame organoléptico

Foram realizadas as análises sensoriais preconizadas pelo Ministério da Agricultura para fixação de identidade e qualidade de própolis, sendo elas: cor, sabor, consistência à temperatura ambiente e granulometria [15]. Desde que os caracteres sensoriais são avaliados por meio dos órgãos dos sentidos e assumem, portanto, um aspecto subjetivo, próprio do analista [28], procurou-se expressar os resultados dentro das possibilidades descritas pelo Ministério da Agricultura.

2.2.2 - Teor de cinzas

Aproximadamente 2 g da amostra de própolis bruta pulverizada foram acondicionados em cadinho de porcelana previamente aquecido em mufla a 600°C, por 2 h, resfriado em dessecador e pesado. O conjunto foi posto sobre placa de aquecimento a 350°C, em capela de exaustão, por 1 h (quando não havia mais emissão de fumaça). Em seguida, o conjunto foi levado à mufla a 600°C, onde permaneceu até que as cinzas se apresentassem brancas. O conjunto foi, então, resfriado em dessecador, seguido de pesagem. O processo de aquecimento, resfriamento e pesagem do conjunto foi repetido com intervalos de 1 h, até se atingir massa constante (quando a diferença entre duas pesagens

consecutivas não excedeu 5 mg). Esta análise foi realizada em triplicata e o teor de cinzas foi calculado pela razão entre a massa de cinzas e a massa inicial de própolis, em porcentagem [4, 15, 63].

2.2.3 - Perda por dessecação a 105°C

Aproximadamente 3 g de própolis bruta pulverizada foram acondicionados em cadinho de porcelana previamente aquecido em estufa a 105°C, por 2 h, resfriado em dessecador e pesado. O conjunto foi aquecido em estufa por 3 h, a 105°C, resfriado em dessecador e pesado. O processo de aquecimento, resfriamento e pesagem do conjunto foi repetido com intervalos de 2 h, até se atingir massa constante (quando a diferença entre duas pesagens consecutivas não excedeu 5 mg). Esta análise foi realizada em triplicata e a perda por dessecação a 105°C foi calculada pela razão entre a massa do material volatilizado e a massa inicial de própolis, em porcentagem [15, 22, 23, 63].

2.2.4 - Obtenção de extratos por Soxhlet

Aproximadamente 10 g de própolis bruta pulverizada (ou 10 g de brotos apicais de alecrim-do-campo, sua suposta fonte vegetal) foram acondicionados em cartucho preparado com papel filtro, previamente seco em estufa a 105°C, por 1 h, e pesado. Pedras de porcelana e aproximadamente 150 mL de metanol foram adicionados ao balão destinado ao solvente. O sistema foi mantido sob refluxo por aproximadamente 8 h [65]. Após resfriamento, o extrato foi vertido em proveta de 200 mL, à qual foram adicionadas mais duas pequenas alíquotas de metanol, resultantes da lavagem do balão utilizado. O volume final de extrato obtido foi medido e acondicionado em recipiente vedado e ao abrigo da luz. Este procedimento foi repetido em triplicata para a própolis, com o intuito de se realizar as análises de teor de cera e de resíduo insolúvel em metanol, descritos a seguir.

2.2.5 - Resíduo insolúvel em metanol

O cartucho utilizado na extração por Soxhlet (*Subitem 2.2.4*), contendo substâncias não solubilizadas em metanol, foi colocado sobre vidro de relógio e levado à capela de exaustão, onde permaneceu por 1 h para evaporação do excesso de solvente. O conjunto foi, então, levado à estufa pré-aquecida a 105°C, por 2 h. O conjunto foi resfriado em dessecador e o cartucho (contendo o resíduo) pesado isoladamente. O processo de aquecimento, resfriamento e pesagem do cartucho foi repetido com intervalos de 1 h, até se atingir massa constante (quando a diferença entre duas pesagens consecutivas não excedeu 5 mg). Esta análise foi realizada em triplicata e o teor de resíduo insolúvel foi calculado pela razão entre a massa do resíduo retido no cartucho e a massa inicial de própolis, em porcentagem [15, 18].

2.2.6 - Teor de cera

O extrato metanólico de própolis, obtido por Soxhlet (*Subitem 2.2.4*), foi levado à geladeira por 24 h e posteriormente ao freezer, por 30 min. A solução foi, então, filtrada

em funil de Buchner (com papel filtro previamente seco e pesado) sob vácuo a 400 mmHg. A cera depositada sobre o papel filtro foi lavada com metanol resfriado, até sua clarificação. O volume de extrato livre de cera foi medido e acondicionado em recipiente de vidro vedado. O conjunto filtro/cera foi levado à capela de exaustão, por 1 h, para eliminação do excesso do solvente.

O conjunto foi depositado em estufa pré-aquecida a 105°C, por 2 h, resfriado em dessecador e pesado. O processo de aquecimento, resfriamento e pesagem do material foi repetido com intervalos de 1 h, até se atingir massa constante (quando a diferença entre duas pesagens consecutivas não excedeu 5 mg). Esta análise foi realizada em triplicata e o teor de cera foi calculado pela razão entre a massa de material retido no filtro e a massa inicial de própolis utilizada na extração, em porcentagem [15, 43].

2.2.7 - Resíduo seco (sólidos solúveis em metanol)

Uma alíquota de 5 mL do extrato metanólico de própolis, livre de cera (*Subitem 2.2.6*), foi transferida para cápsula de porcelana seca (aquecida em estufa a 105°C, por 2 h, resfriada em dessecador e pesada) e o conjunto levado à estufa pré-aquecida a 105°C, onde permaneceu por 2 h. Após resfriamento em dessecador, o conjunto foi pesado. O processo de aquecimento, resfriamento e pesagem do conjunto foi repetido com intervalos de 1 h, até se atingir massa constante (quando a diferença entre duas pesagens consecutivas não excedeu 5 mg). Esta análise foi realizada em triplicata e o teor de resíduo seco (sólidos solúveis em metanol) calculado pela razão entre a massa de resíduo depositada no cadinho e a massa inicial de própolis bruta extraída, correspondente à alíquota de 5 mL, em porcentagem [15, 22, 28].

2.2.8 - Teor de flavonóides totais

Inicialmente, uma curva padrão com quercetina di-hidratada, tomada como substância de referência, foi construída. Alíquotas de 2 a 6 mL de solução etanólica de quercetina, a 50 µg/mL, foram transferidas para balões volumétricos de 25 mL, contendo 1 mL de solução de cloreto de alumínio a 2,5%. O volume final de cada balão foi ajustado com etanol. Como branco do sistema, 1 mL da solução aquosa de cloreto de alumínio diluído em balão de 25 mL foi utilizada. Decorridos 30 min, foi tomada a leitura de cada solução a 425 nm, em espectrofotômetro. Para a quantificação de flavonóides na amostra, foram utilizados 2 mL de solução de própolis a 2 mg/mL (obtida pela dissolução de 100 mg de resíduo seco em 50 mL de etanol) [15, 58, 65].

2.2.9 - Teor de fenóis totais

Inicialmente, uma curva padrão com o ácido gálico, tomado como substância de referência, foi construída. Alíquotas de 2 a 9 mL de solução aquosa de ácido gálico, a 100 µg/mL, foram transferidas para balões volumétricos de 100 mL, contendo aproximadamente 70 mL de água desti-

lada. Foram adicionados 5 mL do reagente de Folin-Denis e, após 2 min, 10 mL de solução de carbonato de sódio saturada. O volume de cada balão foi ajustado. O branco do sistema foi preparado da mesma forma, porém sem a alíquota da amostra. Cada solução foi deixada em repouso à temperatura ambiente e, precisamente após 30 min, sua leitura foi tomada em espectrofotômetro a 760 nm. Para quantificação na amostra, foi utilizada uma alíquota de 3 mL de solução aquosa de própolis a 2 mg/mL (obtida pela dissolução de 100 mg de resíduo seco de própolis em 5 mL de metanol, seguida de diluição aquosa a 50 mL) [5, 15, 23, 60].

2.2.10 - Identificação da fonte botânica da própolis

A metodologia descrita a seguir baseia-se na comparação dos perfis cromatográficos do extrato de própolis e de sua suposta fonte vegetal. Com o intuito de se identificar, botanicamente, a planta denominada regionalmente vassourinha ou alecrim-do-campo, com a qual viria a se preparar o extrato de seus brotos apicais, procedeu-se a montagem de exsicata [48]. Foram realizadas análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) a partir de três amostras de própolis e da amostra vegetal (obtidas pela dissolução de 150 mg de resíduo seco em 5 mL de metanol).

Como fase estacionária foi utilizada uma coluna C-18, modelo Shim-Pack CLC-ODS (M), com dimensões de 250 x 4,6 mm, e como fase móvel o sistema gradiente de água Mili-Q e ácido acético (19:1) (A)/Metanol (B), iniciando com 70% A e 30% B; 60% A e 40% B em 15 min; 50% A e 50% B em 30 min; 40% A e 60% B em 45 min; 25% A e 75% B em 65 min; 25% A e 75% B em 85 min; 10% A e 90% B em 95 min; 70% A e 30% B em 105 min; 70% A e 30% B em 115 min; sob fluxo de 1 mL/min e volume de 20 µL [3]. Alguns picos dos cromatogramas foram identificados com base em seus tempos de retenção, visualizados a 280 nm [39], e em seus espectros, em comparação com substâncias de referência (padrões).

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - Exame organoléptico

A própolis apresentou aroma resinoso e balsâmico, cor esverdeada, sabor picante acentuado, consistência rígida à temperatura ambiente e pedaços heterogêneos. O exame organoléptico 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. Por exemplo, a própolis esverdeada (chamada *green propolis*), típica de algumas localidades da Região Sudeste do Brasil, é a mais bem cotada no mercado internacional, 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 tem estes dois tipos de material em sua composição.

Assim, apresentando-se rígida, como no caso da amostra investigada aqui, 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. Ao contrário, apresentando-se maleável, pode indicar um elevado teor de cera. Por sua vez, aroma e sabor indicam se a amostra é nova ou se foi produzida pelas abelhas há muito tempo, o que tornaria estas características menos acentuadas. Finalmente, uma amostra em pedaços maiores, além de permitir a completa execução do exame organoléptico, 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 própolis estudada neste trabalho nos possibilitou, de certa forma, presumir tratar-se de uma amostra com baixos teores de ceras (*Tabela 1*) e com grande número de substâncias que absorvem fortemente a 280 nm, e comprimento de onda, no qual absorvem ácidos fenólicos e flavonóides (*Figura 1*).

3.2 - Análises gravimétricas

A *Tabela 1* reúne os resultados das análises gravimétricas descritas na subseção *Métodos* (*Subitens 2.2.2 a 2.2.7*).

Excetuando-se a análise “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 [15]. A determinação do “teor de cinzas” é particularmente importante para amostra de própolis 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 [64]. 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 “resíduo insolúvel” (comumente chamado “massa mecânica”) e “resíduo seco” estão relacionados à 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 o “resíduo insolúvel”, calculados sobre a matéria-prima que originou aquele extrato, mais solúvel é a amostra bruta no solvente utilizado. O resultado da análise “perda por dessecação a 105°C” excedeu o limite estabelecido pelo Ministério da Agricultura [15], provavelmente, por tratar-se de uma amostra altamente aromática, como foi constatado no exame organoléptico. Desta forma, a amostra analisada deveria conter outras classes de substâncias volatilizáveis 105°C em abundância, além de água. Para se conhecer o real teor de umidade, crítico para a conservação de amostras de própolis, um teste específico para determinação do teor de água poderia ser realizado, complementarmente.

3.3 - Análises espectrofotométricas

A *Tabela 2* traz os resultados dos ensaios espectrofotométricos realizados com a própolis para determinação de seus teores de flavonóides e fenóis totais, expressados como equivalentes de quercetina e de ácido gálico, respectivamente.

O método utilizado para a quantificação de flavonóides totais baseia-se na propriedade do cátion alumínio de formar complexos estáveis com flavonóides, ocorrendo, na análise espectrofotométrica, um deslocamento para maiores comprimentos de onda e uma intensificação de suas absorções [61]. Desta forma, é possível determinar

TABELA 1 – Análises gravimétricas realizadas com amostra de própolis e limites estabelecidos pelo Ministério da Agricultura

Experimento	Resultados ¹			Média±Desvio Padrão ¹	Requisito do Ministério ²
Teor de cinzas	3,152	3,153	3,045	3,117±0,063	Máximo de 5%
Perdas por dessecação	10,864	10,976	11,005	10,948±0,075	Máximo de 8%
Resíduo insolúvel em metanol	32,725	37,956	34,992	35,224±2,623	Máximo de 40% ³
Teor de cera	2,443	234	2,291	2,256±0,207	Máximo de 25%
Resíduo seco	51,962	54,822	54,419	53,734±1,548	Mínimo de 35% ³

¹Valores expressos em porcentagem, sobre a massa bruta de própolis (M/M). ²Limites propostos pelo Ministério da Agricultura [15]. ³Este limite é estabelecido para extrações com etanol

TABELA 2 – Resultados das análises de fenóis e flavonóides totais e limites estabelecidos pelo Ministério da Agricultura

Análise	Teor (%)			Média±Desvio Padrão	Requisito do Ministério ¹
Fenóis totais ²	7,403	7,393	7,382	7,393±0,011	Mínimo de 5%
Flavonóides totais ³	2,645	2,633	2,645	2,641±0,002	Mínimo de 0,5%

¹Requisito do Ministério da Agricultura [15]. ²Expressos como equivalentes de ácido gálico, sobre a própolis bruta (M/M). ³Expressos como equivalentes de quercetina di-hidratada, sobre a própolis bruta (M/M)

a quantidade de flavonóides na amostra, evitando-se a interferência de outras classes de substâncias fenólicas, principalmente a dos ácidos fenólicos [41, 65]. O valor encontrado (2,64%) de flavonóides totais, expressos como equivalentes de quercetina di-hidratada, está próximo ao reportado por BONVEHÍ e COLL [13] para amostra de própolis brasileira (3%), e dentro das faixas de valores encontrados por WOISKY e SALATINO [65] e MORI [46] para amostras de própolis do Estado de São Paulo (0,77-2,69% e 0,67-1,19%, respectivamente), obtidos por método espectrofotométrico baseado na reação de flavonóides com cloreto de alumínio.

No entanto, BONVEHÍ e COLL [13] quantificaram, paralelamente, o teor de flavonóides da mesma amostra por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), chegando ao valor de 18,1% (M/M), aproximadamente seis vezes maior do que o obtido pelo primeiro método. Experimentos realizados por CHANG *et al.* [17] demonstram ser o método de quantificação espectrofotométrica de flavonóides pela reação com cloreto de alumínio específico para flavonóis e flavonas, o que poderia subestimar o teor de flavonóides totais em amostras de própolis que contenham 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, mediram o seu teor de flavonóides empregando método colorimétrico cujo princípio foi a 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 métodos sejam utilizados complementarmente, e que o valor de flavonóides totais seja calculado como a soma dos dois resultados, já que cada método quantificaria flavonóides de subclasses distintas.

MARCUCCI, WOISKY e SALATINO [41] 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, se realizados com a mesma amostra. WOISKY e SALATINO [65] salientam, ainda, a relevância de este método poder ser utilizado por laboratórios desprovidos de aparelhos mais sofisticados. Pelas observações feitas acima, e pelo o fato de se ter identificado o flavonóide isossacuranetina no trabalho ora apresentado, pertencente à subclasse das flavanonas (*Figura 1*), vê-se um indício de que o valor obtido pode estar subestimado (*Tabela 2*). Ainda assim, segundo os parâmetros do Ministério da Agricultura [15], o resultado encontrado por nós classifica a amostra como contendo um “alto teor de flavonóides”.

Desde que própolis de zonas temperadas, como Europa, por exemplo, podem conter acima de 20% destas substâncias [38], nota-se que esta classificação é relativa e leva em conta somente a faixa de teores de flavonóides

comumente reportados em amostras brasileiras, utilizando-se o método de reação de flavonóides com cloreto de alumínio, indicado pelo Ministério da Agricultura.

O método utilizado para o cálculo do teor de substâncias fenólicas totais baseia-se em uma reação de oxidação-redução, na qual 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 este é o método mais comumente utilizado para doseamento de fenóis totais [60].

O teor de fenóis totais encontrado na amostra investigada, de 7,39% (*Tabela 2*), atende ao requisito mínimo do Ministério da Agricultura, que é de 5% [15]. WOISKY [64] encontrou entre 7,05 e 9,29% (M/M) em própolis coletadas em diferentes cidades do Estado de São Paulo, aplicando o mesmo método espectrofotométrico, porém utilizando a quercetina como substância de referência. Paralelamente, utilizando o método de reação de substâncias fenólicas com o reagente de Folin-Ciocalteu (e tendo o ácido gálico como substância de referência), chegou a valores entre 9,49 e 13,72%, para as mesmas amostras. BONVEHÍ e COLL [13] 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 teores presentes em amostras do Uruguai e China, empregando método espectrofotométrico com o reagente de Folin-Ciocalteu.

GONZÁLEZ *et al.* [25] 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 Folin-Ciocalteu e o ácido gálico como substância de referência (entre 3,25 e 33,49%).

KUMAZAWA, HAMASAKA e NAKAYAMA [34] 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 própolis brasileira apresentado teor aproximadamente 50% inferior ao das demais amostras. Ficou acima somente daquelas 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.

3.4 - Identificação da fonte botânica da amostra

A acentuada similaridade observada entre o cromatograma obtido para a amostra vegetal e aqueles conseguidos para três amostras de própolis (*Figura 1*) sugere que a es-

pécie analisada foi a principal fonte botânica na elaboração da própolis em estudo. A partir da exsicata preparada, o indivíduo foi identificado como *Baccharis dracunculifolia* DC. (*Compositae*). A indicação desta espécie como fonte de matérias-primas para a própolis estudada corrobora com trabalhos reportados na literatura, que a identificaram como fonte botânica de amostras de própolis coletadas em diferentes localidades dos Estados de São Paulo e Minas Gerais [7, 33, 49, 51].

As variações observadas nas intensidades de picos correspondentes dos extratos de própolis e da planta (*Figura 1*), coletadas em mesma localidade, podem ser devidas ao fato de que não se teve a mesma precisão de uma abelha na coleta do material vegetal, já que este inseto utiliza suas mandíbulas na execução desta atividade [32, 33], enquanto que nós, removemos os brotos apicais do indivíduo (com os quais o extrato foi preparado) com o auxílio de uma tesoura.

Naturalmente, o material coletado poderia conter partes da planta não extraídas pelas abelhas, como alguns tecidos vegetais, por exemplo. Cabe comentar, ainda, a possibilidade da utilização da técnica Cromatografia em Camada Delgada (CCD) como uma alternativa à Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Estudos realizados por nós indicaram que os sistemas cromatográficos, tendo-se como fase estacionária Silicagel GF₂₅₄ e como fases móveis as soluções tolueno:dioxano:ácido acético glacial (90:25:4), tolueno:acetato de etila:ácido fórmico (36:12:5), tolueno:acetato de etila:ácido fórmico (40:10:5), tolueno:metiletilcetona:ácido acético glacial (18:5:1), apresentaram boas separações das amostras de própolis e de *Baccharis dracunculifolia*, com perfis muito semelhantes. As detecções foram feitas com um dos seguintes reveladores: NP/PEG 4.000, em luz ultravioleta a 254 e 366 nm, vapor de amônia ou solução etanólica de FeCl₃ (3%), ambos na luz visível.

Como destacado na introdução deste trabalho, o conhecimento da(s) fonte(s) botânica(s) de determinada amostra de própolis, ou ao menos de sua origem geográfica, pode trazer, indiretamente, informações sobre suas características químicas e/ou atividades biológicas. Contribui com esta afirmação o fato de que, excetuando-se o ácido trans-cinâmico, as demais substâncias identificadas no trabalho ora apresentado (*Figura 1*) foram reportadas por outros autores em própolis elaboradas a partir da *Baccharis dracunculifolia*, sendo elas os ácidos clorogênico [33], cafeico [33], ferúlico [49], para-cumárico [7, 33, 49] e artemillin C [33] e os flavonóides canferida [7, 49] e isossacuranetina [49]. Este tipo de própolis vem se destacando por sua acentuada propriedade antimicrobiana [45], tendo o artemillin C como um componente muito ativo [2, 40]. Outros autores reportaram, para esta substância isolada, as atividades antioxidante [34, 47, 55] e antitumoral [1, 31]. Desta forma, o artemillin C aparece como um marcador químico em potencial para o controle de qualidade de "própolis de *Baccharis dracunculifolia*".

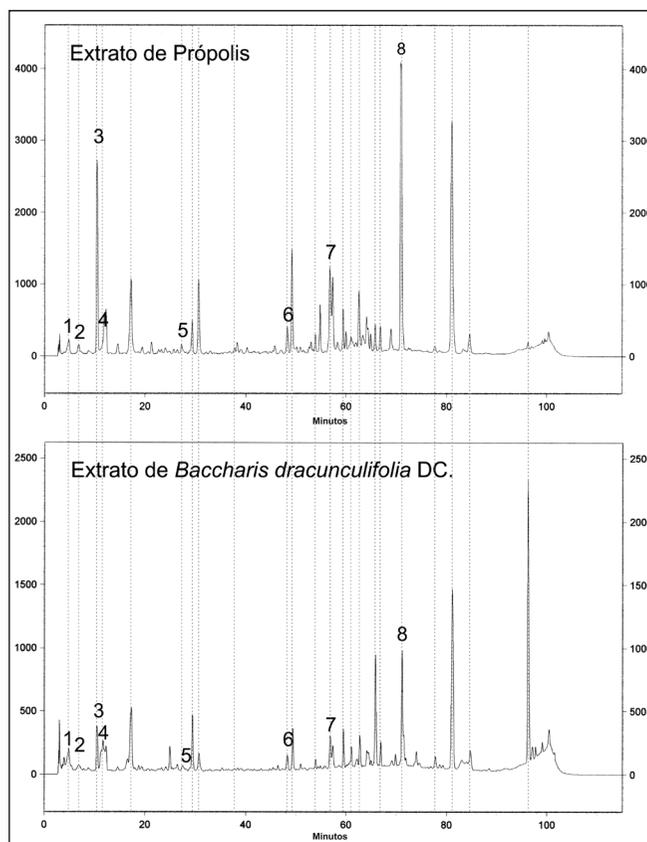


FIGURA 1 – Cromatogramas CLAE, a 280 nm, obtidos a partir do extrato vegetal e de extrato de própolis. Identificação do pico: 1. ácido clorogênico; 2. ácido cafeico; 3. ácido para-cumárico; 4. ácido ferúlico; 5. ácido trans-cinâmico; 6. isossacuranetina; 7. canferida; 8. artemillin C

4 - CONCLUSÕES

Os resultados encontrados neste trabalho sugerem que a própolis analisada é de boa qualidade, pois atendeu aos requisitos do Ministério da Agricultura (exceto no que se refere à "perda por dessecação a 105°C") e apresentou uma grande variedade de substâncias fenólicas, destacando-se o ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (artemillin C), comumente apontadas como seus princípios ativos. Indicam, ainda, que a *Baccharis dracunculifolia* DC. provavelmente é uma fonte botânica de própolis produzida na área de proteção ambiental Serra do Japi (São Paulo), já que seu perfil químico foi muito similar ao das três amostras de própolis investigadas. A simples comparação cromatográfica entre própolis e sua suposta fonte botânica poderia ser incorporada em rotinas de controle de qualidade deste produto, adicionalmente aos recomendados pelo Ministério da Agricultura [15], pois uma indicação de sua provável fonte poderia trazer consigo informações sobre os seus aspectos químicos e as suas prováveis atividades biológicas. A introdução de um método complementar aos apresentados aqui, específico para a quantificação do teor de água na própolis bruta, é recomendável.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] 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. 1.057-1.059, 2003.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] AOAC INTERNATIONAL. **Official methods of analysis of AOAC International**. 16th ed., Gaithersburg, AOAC International, v. 1. cap. 4. 1997a.
- [5] AOAC INTERNATIONAL. **Official methods of analysis of AOAC International**. 16th ed., Gaithersburg, AOAC International, v. 2. cap. 26. 1997b.
- [6] ARVOUET-GRAND, A. *et al.* Extrait de propolis: II. étude 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.
- [7] 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.
- [8] BANKOVA, V.; CASTRO, S.; MARCUCCI, M.C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v. 31, p. 3-15, 2000.
- [9] BANKOVA, V. *et al.* Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 57c, p. 530-533, 2002.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Recent progress in pharmacological and research of propolis. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 561-571, 2001.
- [13] BONVEHÍ, J.S.; COLL, F.V. Phenolic composition of propolis from China and South America. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 49c, p. 712-718, 1994.
- [14] BORRELLI, F. *et al.* Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. **Fitoterapia**, v. 73, s. 1, p. S53-S63, 2002.
- [15] BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Instrução Normativa nº 3 – ANEXO VI – Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 19 jan. 2001.
- [16] CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, v. 73, s. 1, p. S1-S6, 2002.
- [17] 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.
- [18] COSTA, A.F. **Farmacognosia**. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian. v. 3, Farmacognosia experimental, 1982.
- [19] DÍAZ, J.C.Q. *et al.* Empleo de la tinctura de propóleo al 5% en la cura de heridas sépticas faciales. **Revista Cubana de Estomatología**, v. 34, n. 1, p. 25-27, 1997.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] EUROPEAN PHARMACOPOEIA. 4th ed., 2002. Strasbourg: Council of Europe. 2002.
- [23] FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4th ed., São Paulo, Atheneu Editora, v. 2, n. 4, 2002. Suplemento.
- [24] GHISALBERTI, E.L. Propolis: a review. **Bee World**, v. 60, n. 2, p. 59-83, 1979.
- [25] GONZÁLEZ, M. *et al.* Spectrophotometric determination of phenolic compounds in propolis. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 22, n. 3, 2003.
- [26] GREENAWAY, W. *et al.* Identification by gas chromatography-mass spectrometry of 150 compounds in propolis. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 46c, p. 111-121, 1991.
- [27] 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.
- [28] INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 2^a ed., São Paulo, Instituto Adolfo Lutz, v. 1: métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 1976.
- [29] 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.
- [30] 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.
- [31] KIMOTO, T. *et al.* Apoptosis and suppression of tumor growth by artemisinin C extract from Brazilian propolis. **Cancer Detection and Prevention**, v. 22, n. 6, p. 506-515, 1998.
- [32] KÖNIG, B. Plant sources of propolis. **Bee World**, v. 66, p. 136-139, 1985.
- [33] 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.
- [34] KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, v. 84, p. 329-339, 2004.
- [35] MAGRO FILHO, O. **Ação tópica de própolis na reparação de sulcoplastias pela técnica de kanzanian modificada. Avaliação citológica e clínica de pacientes**. Araçatuba. 1991. 144 f. Tese (doutorado em Odontologia). Universidade Estadual Paulista.

- [36] MARCUCCI, M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v. 26, p. 83-99, 1995.
- [37] 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.
- [38] 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.
- [39] 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.
- [40] MARCUCCI, M.C. *et al.* Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, p. 105-112, 2001.
- [41] 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 jul. 2003.
- [42] 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.
- [43] 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.
- [44] MATSUNO, T. **O efeito terapêutico da própolis**. 1ª ed., São Paulo, Nair Tazue Itice, 1997.
- [45] 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.
- [46] 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.
- [47] 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. 1.452-1.454, 2003.
- [48] OLIVEIRA, F.; AKISSUE, G. **Fundamentos de farmacobotânica**. Rio de Janeiro, Livraria Atheneu Editora, 1989.
- [49] 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. 2.502-2.506, 2002.
- [50] 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. 997-1.003, 2002.
- [51] PARK, Y.K. *et al.* Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of south-eastern Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1.100-1.103, 2004.
- [52] 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.
- [53] 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.
- [54] SFORCIN, J.M. *et al.* Seasonal effect of Brazilian propolis antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 243-249, 2000.
- [55] SHIMIZU, K. *et al.* Antioxidative bioavailability of artemillin C in Brazilian propolis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 429, p. 181-188, 2004.
- [56] 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.
- [57] TAZAWA, S. *et al.* Studies on the constituents of Brazilian propolis. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 46, n. 9, p. 1.477-1.479, 1998.
- [58] VENNAT, B. *et al.* Hamamelis virginiana: identification and assay of proanthocyanidins, phenolic acids and flavonoids in leaf extracts. **Pharmaceutica Acta Helveticae**, v. 67, n. 1, p. 11-14, 1992.
- [59] WALKER, P.; CRANE, E. Constituents of propolis. **Apidologie**, v. 18, n. 4, p. 327-334, 1987.
- [60] WATERMAN, P.G.; MOLE, S. **Analysis of phenolic plant metabolites**. London, Blackwell Scientific Publications, 1994.
- [61] WOLLENWEBER, E.; JAY, M. Flavones and flavonols. In: HARBORNE, J. B. **The flavonoids: advances in research since 1980**. 1st ed., London. Chapman and Hall, p. 233-302, 1988.
- [62] 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.
- [63] WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Quality control methods for medicinal plant materials**. England, World Health Organization Editor, 1998.
- [64] 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.
- [65] 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.

6 - AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), que concedeu bolsa de mestrado a Cristiano Soleo de Funari; à Dr^a. Mara Magenta, do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (USP), pela identificação da espécie *Baccharis dracunculifolia* DC.; ao Laboratório de Biofarmacotécnica (Biofar-USP), por colocar à disposição o cromatógrafo líquido de alta eficiência utilizado neste trabalho; ao Dr. Eckhard Wollenweber (Institut Für Botanik der Technischen Universität - Germany); e ao Instituto Fujisaki (Hayashibara Biochemical Labs. Inc. - Japan), pela doação de padrões fitoquímicos.