

Avaliação farmacognóstica da própolis da região de Maringá.

Franco, S.L.^{1*}; Bruschi, M.L.¹; Moura, L.P.P.¹; Bueno, J.H.F.².

¹Universidade Estadual de Maringá - PR;

²Unesp - Araraquara - SP

RESUMO: Os autores propõem procedimentos para estabelecer o controle de qualidade da própolis. Para tanto, foram adaptadas e executadas técnicas farmacopéicas e/ou desenvolvidas técnicas novas. Foram estabelecidos perfis dos teores de flavonóides, de ceras, de substâncias voláteis totais (através da perda por dessecação) e de cinzas totais. Os valores obtidos para as amostras de própolis estudadas, coletadas em um apiário-escola, foram comparados com os de própolis adquiridas no mercado. Foi estabelecido, ainda, o perfil destes parâmetros para amostras de própolis coletadas nos diferentes locais da colméia, no período de três anos, com coletas de inverno e verão. Os teores de flavonóides variaram entre 2,05 - 5,52%.

Unitermos: Própolis, controle de qualidade, padronização, fitoterápicos.

ABSTRACT: The aim of this work was to establish a control quality methodology for propolis. For that, techniques were carried out as described in pharmacopoeias, or adapt from it. Moreover it developed new techniques. It was used propolis collected in the school apiary. Profiles of flavonoids, waxes, total volatile substances and total ashes were determined in propolis collected in different places of bees' hive. The results obtained from this propolis were compared with commercial propolis. Flavonoid drift values obtained from apiary school were established in the range between 2.05-5.52%.

Key words: Propolis, control quality, phytopharmaceuticals, standardization.

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, as pesquisas de produtos apoterápicos assumiram grande importância. A própolis, um dos produtos resultante da coleta das abelhas *Apis mellifera*, é uma resina formada pela mistura de substâncias retiradas de botões de flores de árvores ou cascas de árvores com substâncias do próprio organismo da abelha. Ela serve como material cimentante e para proteção e manutenção da colméia, sendo composta basicamente de resinas (47%), ceras (30%), substâncias voláteis (4-15%), sujidades e compostos desconhecidos (13%) e pólen (5%) (Vanhaelen e Vanhaelen-Fastré, 1979). Nesta resina figuram substâncias como vitaminas, sais minerais (Moreira, 1986), flavonóides (Vanhaelen e Vanhaelen-Fastré, 1979), ácidos graxos, álcoois aromáticos e ésteres (Bankova et al., 1982).

A própolis é utilizada popularmente no tratamento de infecções, em problemas de pele e, também, como antiviral e antiúlcera (Moreira, 1986). Ela fortalece, ainda, o sistema imunológico, equilibrando o organismo (Kosonocka, 1990; Ivanovska et al., 1995; Sforcin, 1996). É utilizada também como cicatrizante em escaras de decúbito (Azevedo et al., 1986) e apresenta atividade antibiótica frente a bactérias Gram-positivas (Bankova et al., 1999). Possui, ainda, ações anti-séptica, adstringente e antiinflamatória (Hay e Grig, 1990; Ruppelt et al., 1991; Burdock, 1998).

Devido à grande variação em sua composição química, a qual difere de acordo com a flora existente ao redor do apiário, torna-se muito importante buscar ferramentas que permitam

padronizar a própolis. No presente trabalho objetivou-se caracterizar a própolis coletada em diferentes locais da colméia de um mesmo apiário, procurando estabelecer os perfis de parâmetros como teores de flavonóides e de ceras, cinzas totais, e perda por dessecação, bem como comparar estes produtos com própolis totais que habitualmente são comercializadas no Brasil e destinadas à exportação.

MATERIAIS E MÉTODOS

Própolis do Apiário-Escola

As amostras de própolis foram coletadas das colméias de abelhas *Apis mellifera*, na Fazenda Experimental de Iguatemi, da Universidade Estadual de Maringá (FEI-UEM) localizadas no apiário da clareira, no interior de uma reserva de eucaliptos rodeada de mata nativa.

Própolis Total (adquiridas do apicultor)

Foram adquiridas própolis totais no mercado (diretamente do apicultor) em várias regiões do Estado do Paraná, em sua grande maioria, destinadas à exportação. Trata-se de produtos cuja composição corresponde à mistura de própolis interna, externa e da tela.

Coleta da própolis

Foram realizadas coletas nos períodos imediatamente após o verão e o inverno durante três anos. No verão-ano I foram coletadas amostras de própolis das melgueiras interna (Mi) e externa (Me), caixilho (Cai), alvado (Alv) e tela excludora (Tela). Após as análises, foram padronizados os locais de coletas das amostras e denominadas como própolis Interna (melgueiras interna e externa, caixilho), própolis Externa (alvado) e Tela (tela excludora). As amostras de própolis Externa e Interna foram coletadas raspando as superfícies suavemente com formão de madeira. As telas foram retiradas da parte intermediária do ninho e da tampa, enroladas e estocadas em freezer. Após congelamento foi realizada a retirada da própolis através de fricção das telas sobre uma superfície sólida limpa. As telas foram novamente acondicionadas em freezer por um período mínimo de 12 horas e feita nova retirada de própolis.

Para a primeira coleta, as amostras foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar bem vedados, e armazenadas em local escuro e fresco. A partir da segunda coleta, foram acondicionadas em sacos plásticos bem vedados e armazenadas a -4 °C.

Preparação das amostras do Apiário-Escola e Própolis Total

As amostras foram congeladas e, em seguida, trituradas em turboextrator, acondicionadas em frascos de vidro âmbar bem vedados e estocadas a -4 °C.

Determinação do teor de flavonóides

Cerca de 0,4 g foram submetidos à extração e quantificação preconizadas na literatura (Bianchi, 1995). Os resultados são expressos em porcentagem de quercetina e representam a média de cinco determinações.

Determinação da perda por dessecação

A perda por dessecação foi determinada de acordo com a Farmacopéia Brasileira (1988). Os resultados são expressos em porcentagem (% p/p) e representam a média de cinco determinações.

Determinação do teor de ceras

Para a determinação do teor de ceras, pesou-se 1,0 g de Própolis, colocou-se em frascos de vidro com tampa e submeteu-se à extração com três frações de 10 mL de éter de petróleo sob aquecimento em banho-maria fervente (b.m.f.). A fração etérea foi desprezada e as própolis remanescentes foram secas em b.m.f., resfriadas e submetidas à nova pesagem. Os resultados são expressos em porcentagem (% p/p) e representam a média de três determinações.

Determinação do teor de cinzas totais

A determinação do teor de cinzas totais foi realizada segundo a Farmacopéia Brasileira (1988) e os resultados expressam a média de três determinações.

Avaliação estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística, utilizando a análise de variância entre múltiplos tratamentos e obtidos os respectivos valores de F. Foi avaliada, ainda, a interação entre tratamentos através do teste de Tukey. Para todo o experimento foram comparados dois fatores: origem da própolis e período de coleta. Foram avaliadas as diferenças e as interações entre estes dois fatores, tendo como variáveis os teores de flavonóides, de ceras, de cinzas e a perda por dessecação. As análises foram avaliadas em nível de significância de 5 e 1%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as amostras de própolis apresentaram odor aromático e sabor picante, com aspecto de gomo-resina ligante, com coloração verde-escura e algumas apresentando maior quantidade de ceras.

Em função da grande variação na composição das própolis relatada para os teores de cera, de flavonóides, de cinzas, entre outros, na primeira etapa deste trabalho tornou-se necessário avaliar o perfil das própolis obtidas em vários locais da colméia. Na primeira coleta foram avaliadas as amostras obtidas dos locais: Mi, Me, Cai, Tela e Alv (Figura 1).

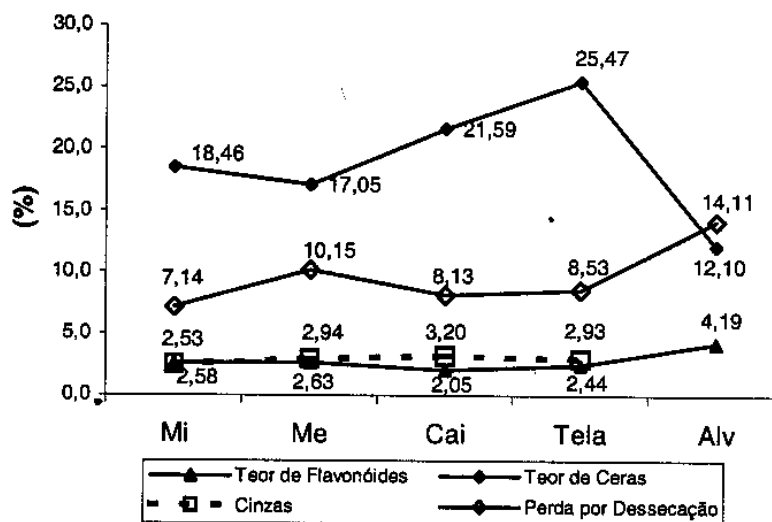


FIGURA 1. Valores dos teores de flavonóides, ceras, cinzas totais e da perda por dessecação obtidos das própolis coletadas em vários locais da colméia – coleta verão - ano I. Resultados expressos em porcentagem (% p/p) (n=5).

O perfil obtido para o teor de flavonóides mostra variação na faixa de 1,72 a 5,44% nos diversos locais de coleta, apresentando diferenças não significantes entre as amostras coletadas na parte interna da colméia (Mi, Me, Cai), mas com diferenças significantes entre amostras obtidas do alvado (externa) e da parte interna (Figura 2). A proximidade destes valores propiciou melhor definição dos locais de coleta na colméia. Deste modo, os locais de coleta foram definidos como própolis Interna, as coletadas nas melgueiras e caixilho e própolis Externa, as coletadas no alvado. Foi mantida, ainda, para comparação, a Tela por ser a prática colocar tela entre a o ninho e a tampa da colméia, sendo este um recurso utilizado pelo apicultor para estimular as abelhas a aumentarem a produção de própolis, merecendo assim ser avaliada individualmente.

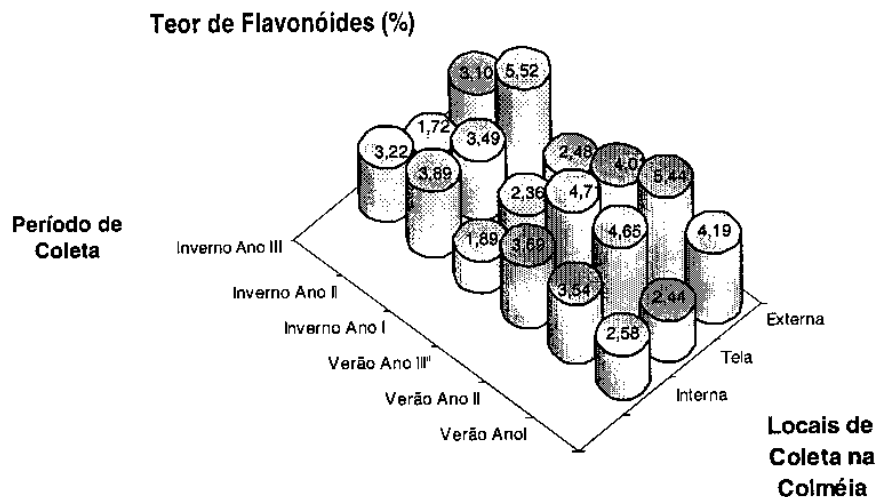


FIGURA 2. Teores de flavonóides obtidos das própolis coletadas nos vários locais da colméia, durante 3 anos imediatamente após o inverno e o verão. Resultados expressos em porcentagem (%; p/p; n=5).

O teor de flavonóides (figura 2) mostra um aumento crescente nas amostras coletadas no verão durante os três anos, permitindo delinear um perfil de maior teor de flavonóides nestas própolis. É detectável teor de flavonóides maior para as própolis de Tela e alvado, sugerindo estes resultados, que a própolis Externa teria melhor qualidade, embora a própolis Interna tenha também qualidade adequada apresentando teor de flavonóides maior que o encontrado, por exemplo, na marcela (Sonaglio, 1987). A análise de variância mostrou alta significância na diferença entre médias ao nível de 1%. Já o teste das diferenças mínimas significantes (Tukey) sobre o fator período de coleta mostra que as amostras obtidas no verão II e III e inverno II pertencem à mesma população, com exceção das obtidas da Tela (inverno II), externa (verão III) e diferem significativamente de todas amostras do ano I (verão e inverno) e ano III (inverno). A avaliação do fator origem (na colméia) mostra diferença significativa entre as amostras de própolis Externa e Interna, mas a amostra de própolis de Tela não se diferencia da Interna.

A determinação das cinzas totais evidencia o grau de substâncias residuais não voláteis presentes nas amostras em análise (Hay e Grid, 1990). Os valores, normalmente obtidos para matérias-primas de origem sintética ou vegetal, variam em torno de 1% (Hay e Grid, 1990), mas não podem ser considerados para própolis, pois estas contêm altos teores de gomo-resina, entre outros materiais, que poderiam elevar o valor de cinzas totais. Este fato justifica a necessidade de determinar um perfil específico para a própolis.

Na figura 3, os dados mostram variações no teor de cinzas que poderiam ser permitidas para a própolis, na faixa de 2,45 a 3,63% (p/p). A avaliação estatística mostra que as diferenças são significantes, não apresentando um perfil de maior ou menor teor de acordo com o período ou o local de coleta para o nível de 1%. Este alto teor de cinzas obtido das amostras de própolis deve-se provavelmente às impurezas naturais por contaminação do ambiente, já que as colméias são colocadas ao ar livre e expostas à partículas de poeira, folhas e insetos. Existem, ainda, as impurezas colocadas intencionalmente na colméia para a abelha propolizar (esterco de gado, pedra), com o objetivo de aumentar o peso da mesma e obter maior ganho no momento de comercialização. É possível adulterar colocando a borra da própolis (bolo ou marco), previamente extraída, misturada à própolis. Estas situações poderiam ser detectadas com a determinação do teor de cinzas totais, pelo aumento significativo destes valores, acima desta faixa proposta. Obviamente, as contaminações naturais anteriormente citadas estão previstas nesta faixa de teor de cinzas.

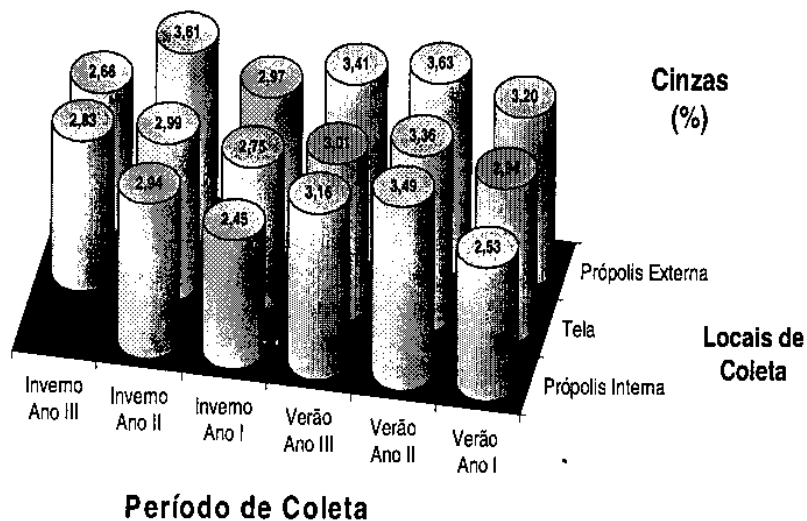


FIGURA 3. Valores de Cinzas totais obtidos das própolis coletadas nos diversos locais da colméia, durante 3 anos após o inverno e o verão. Resultados expressos em porcentagem (% p/p) (n=5).

A figura 4 mostra teores elevados de ceras para as amostras coletadas da Tela. Isto pode ser devido à necessidade de uma propolização mais intensa do que o normal, fato este que leva as abelhas a uma maior produção de ceras para juntar à própolis para vedar a colméia no local onde é colocada a tela. É possível que o teor de ceras seja menor no verão do que no inverno, fato este que ocorre provavelmente em função das abelhas terem que vedar muito melhor a colméia no inverno, e/ou pelo fato destas permanecerem internadas na estação do frio e, portanto, obterem menos material para a produção de própolis.

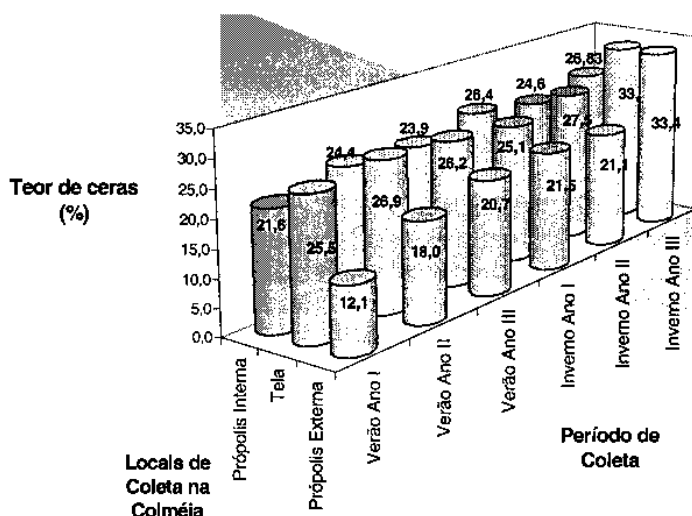


FIGURA 4. Teores de ceras obtidos das própolis coletadas nos diversos locais da colméia, durante 3 anos após o inverno e o verão. Resultados expressos em porcentagem (% p/p) (n=5).

As diferenças entre os valores obtidos são altamente significantes para o nível de significância de 1%. As amostras obtidas no período de verão estão na mesma população, assim como as obtidas no inverno, excetuando as do ano I (verão e inverno). Considerando o fator local de coleta, as amostras obtidas da parte Interna e Tela pertencem a mesma população e apresentam diferenças significantes com relação à própolis externa. Há relatos de valores no teor de ceras na faixa de 30% (Vanhaelen e Vanhaelen-Fastré, 1979), mas a variação dos teores de ceras observados nos diferentes períodos de coleta está na faixa de 12,1 a 33,4 % (p/p), demonstrando a necessidade de que esta análise seja feita para cada amostra como controle de qualidade obrigatório, em função da possibilidade da diminuição do teor de substâncias ativas na própolis.

A determinação da perda por dessecação é utilizada para avaliar o grau de umidade de uma amostra, embora seja conhecido que o aquecimento pode promover liberação de substâncias voláteis presentes nas plantas e mesmo na própolis.

Na figura 5 é possível observar para as diversas coletas, um aumento crescente da umidade ao longo dos três anos, sendo que as amostras de própolis Interna e Tela (obtidas no verão) apresentaram menor perda por dessecação do que a Externa, provavelmente devido ao maior contato das últimas com a umidade do ar. Inversamente, nas coletas de inverno as amostras de própolis Interna apresentaram maiores índices de perda por dessecação do que as de própolis Externa. Na avaliação estatística as diferenças entre os fatores origem e período de coleta são altamente significantes para nível de 1%. O teste de Tukey mostra que as amostras obtidas da Telas, Interna e Externa apresentam também diferenças significantes para o nível de 1%. A análise da própolis Interna versus período de coleta mostra que as amostras obtidas no verão II e III diferem significativamente entre si e das outras. Isto sugere que na parte interna da colméia, o clima interfere em menor escala. As própolis obtidas da Tela e Externa apresentam um perfil de maior umidade nas amostras de inverno, mas algumas fogem a este padrão como verão II e III.

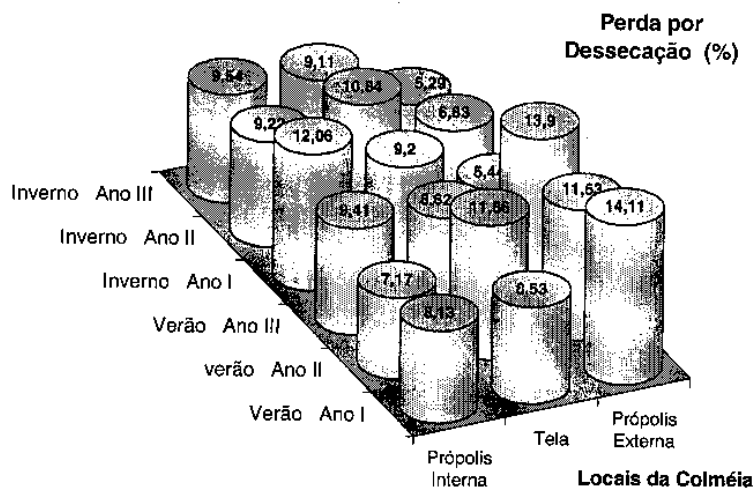


FIGURA 5. Valores da perda por dessecação obtidos para as amostras coletadas nos diversos locais da colméia, durante 3 anos após o inverno e o verão. Resultados expressos em porcentagem (%; p/p) (n=5).

Os perfis detectados para as própolis totais (figura 6), produtos em geral comercializados para exportação, demonstram a importância do controle de qualidade para assegurar a manutenção de padrões dentro de limites aceitáveis. O teor de flavonóides varia bastante entre 2,33 a 8,48%. Esta variação pode ocorrer em função do manuseio na hora da coleta. Muitas amostras de própolis apresentavam aspecto excessivamente úmido (às vezes até molhado), ceroso e/ou muito seco, quase pétreo. Havia amostras contaminadas com impurezas como pedaços de madeira, pedras, entre outras. Não obstante, o teor de cinzas na faixa de 1,65 e 3,98%, revela que a própolis de mercado encontra-se dentro dos limites encontrados para a própolis da região de Maringá. Algumas amostras como a PT06, apresentaram um baixo no teor de cinzas (1,65%) o que sugere um maior cuidado de coleta e, conseqüentemente, um menor índice de contaminação por impurezas.

Com relação ao teor de ceras, comportamento semelhante ao obtido na análise de própolis das diversas partes da colméia pode ser detectado para as própolis totais. Algumas apresentam altos teores de ceras (PT01, PT02, PT03, PT05, PT06, PT08), e outras (PT04, PT07) baixos teores, sugerindo que as primeiras foram coletadas dos vários locais e reunidas, enquanto as outras teriam sido obtidas mais de Alvado e Tela ou, ainda, já haviam sido previamente limpas.

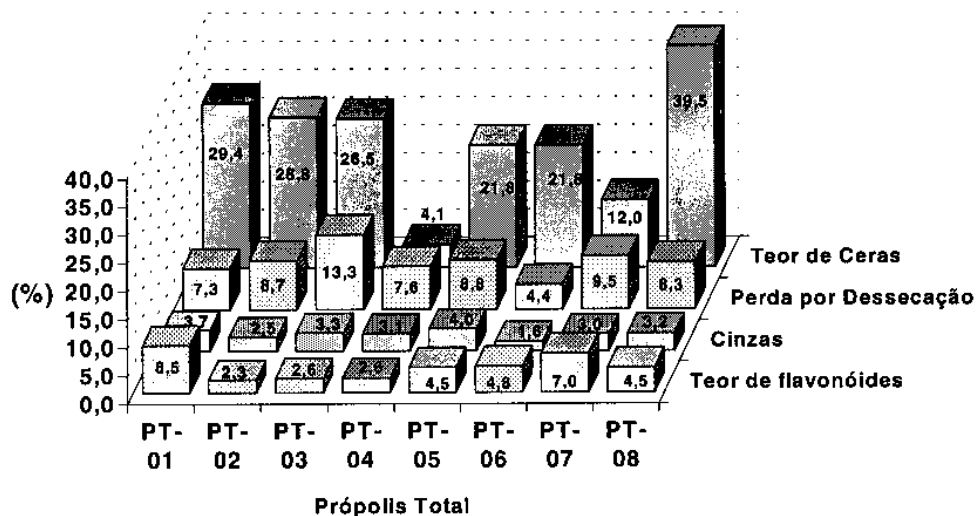


FIGURA 6. Valores dos teores de flavonóides, ceras, cinzas totais e da perda por dessecação, obtidos para Própolis Total (PT) da região de Maringá. Resultados expressos em porcentagem (%), p/p) (n=5).

Com relação à umidade das própolis totais pode ser observado que os valores obtidos variam consideravelmente (de 4,4% a 13,3%), devendo ser também um parâmetro obrigatório para avaliação da qualidade da amostra e para o preparo de formas farmacêuticas.

Também na figura 6 pode ser observado que quanto maior o teor de ceras, menor a perda de água por dessecação. Este fato parece ser absolutamente coerente, uma vez que a cera constitui um corpo graxo, hidrófobo com baixo índice de água (Prista et al., 1996) e, conseqüentemente, dificulta a fixação de água na própolis. Assim pode ser observado um perfil quase linear, com a umidade maior para a própolis de alvado. Esta umidade pode ser explicada pela maior exposição do alvado à umidade do ambiente.

Não parece haver relação de proporcionalidade direta ou inversa entre os perfis de teor de flavonóides e perda por dessecação (Figuras 2, 5 e 6). Entre os teores de flavonóides e de ceras é possível observar uma tendência no aumento do teor de substâncias ativas na proporção em que o teor de ceras diminui (figuras 2 e 4). Quando avaliamos as própolis totais podemos verificar esta tendência nas amostras PT05, PT08, PT02 e PT03. Portanto, pode-se inferir que a qualidade está diretamente ligada ao correto manejo para a obtenção das diferentes frações do produto em questão, fato já amplamente discutido por Bianchi (1995).

A comparação destes parâmetros e o estabelecimento de correlações fica difícil em função da falta de padronização das amostras comerciais, desde a coleta da própolis. É possível propor uma faixa para os parâmetros teor de ceras, cinzas e perda por dessecação, e exigir sua determinação para avaliar a qualidade do material. Isto permitiria um controle de qualidade adequado e também evitaria a rejeição de lotes com qualidade, apenas por apresentarem elevado teor de ceras. Esta discussão é importante tendo em vista que a própolis de exportação é normalmente a Externa (própolis de alvado), por se apresentarem como pedaços sólidos, aparentemente mais difíceis de adulterar.

CONCLUSÕES

- As própolis com maiores teores de flavonóides foram as obtidas no verão.
- As própolis coletadas em todas as partes da colméia (tanto interna como externa) apresentam teores de flavonóides iguais ou superiores às plantas medicinais com qualidade para o consumo.
- A determinação dos teores de ceras, de cinzas e da umidade é imprescindível para obter própolis com teor correto de substâncias ativas.
- As faixas obtidas para umidade, teores de flavonóides, de ceras e cinzas podem ser consideradas adequadas como referência para o controle de qualidade.
- As amostras adquiridas dos apicultores apresentaram teores de flavonóides, cinzas, ceras e perda por dessecação dentro das faixas obtidas neste trabalho, inclusive as destinadas à exportação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AZEVEDO, I.B.S.; SAMPAIO, R.F.; MONTES, J.C.; CONTRERAS, R.L.L. Tratamento de escaras de decúbito com própolis. **Rev. Bras. Enfermagem**, 39(2/3): 33-7, 1986.
- BANKOVA, V.; CRISTOV, R.; POPOV, S. MARCUCCI, M.C.; TSVETKOVA, I. KUJUMGIEV, A. Antibacterial activity of essential oils from brazilian propolis. **Fitoterapia**, 70: 190-3, 1999.
- BANKOVA, V.S.; POPOV, S.S. and MAREKOV, N.L. High-performance liquid chromatographic analysis of flavonoids from propolis. **J. Chromatography**, 242:135-143, 1982.
- BIANCHI, E.M. The preparation of the tincture, the soft extract, the ointment, the soap and other propolis-based products. **Apiacta**, 30 (3-4): 121-7, 1995.
- BUNDESVEREINIGUNG Deutscher Apothekerverbände ed. **Deutscher Arzneimittel - Codex**, 1979. Frankfurt: GOVI - Deutscher Apotheker, 1979a. Holunderblüten. V.2. Ergänzung, 81. pag. Irreg.
- BURDOCK, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food Chem. Toxicol.**, 36: 347-63, 1998.
- FARMACOPÉIA Brasileira. 4 ed., São Paulo: Ateneu, 1988.
- HAY, K.D.; GRIG, D.E. Propolis allergy: a cause of oral mucositis with ulceration. **Oral Surgery Oral Med. Oral Pathology**, 70(8) 8: 584-6, 1990.
- IVANOVSKA, N.D.; DIMOV, V.B.; PAVLOVA, S.; BANKOVA, V.S.; POPOV, S.S. Immunomodulatory action of propolis. V. Anticomplementary activity of a water-soluble derivative. **J. Ethnopharmacol.**, 47(3): 135-43, 1995.
- KOSONOCCA, L. Própolis fortalece o sistema imunológico. **Rev. Bras. Apicultura, (set/out): 22-4, 1991** (Retirado e traduzido da revista American Bee Journal (julho), 1990).
- MOREIRA, T.F. Composição química da própolis: vitaminas e aminoácidos. **Rev. Bras. Farmacog.**, 1 (1):12-9, 1986.

- PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R. **Tecnologia farmacêutica**. Porto: Fundação Calouste Gulbenkian, 1996, v.2. Capítulo 4.
- RUPPELT, B.M.; PEREIRA, E.F.R.; GONÇALVES, L.C.; PEREIRA, N. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as anti-snake venom – I. Analgesic and anti-inflammatory activities. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**; 86 (suppl. II): 203-5, 1991.
- SFORCIN, J.M. Efeito da sazonalidade sobre as propriedades imunomoduladora e antibacteriana da própolis e perfil bioquímico em ratos. Dissertação UNESP-Botucatu, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Botucatu – SP, 1996.
- SONAGLIO, D. Padronização de extrato hidroalcoólico das sumidades floridas de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. – Compositae (marcela). **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – 1987. p.83
- VANHAELLEN, M.; VANHAELLEN-FASTRÉ, R. Própolis - I. Origine, micrographie, composition chimique et activité therapeutique. **J. Pharmacie Belgique**, 34(5):253-9, 1979.

Autor para correspondência:

Profa. Dra. Selma Lucy Franco
Departamento de Farmácia e Farmacologia
Universidade Estadual de Maringá
Avenida Colombo, 5790
87020-900 – Maringá – PR
E-mail: slfranco@uem.br