

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Química

MON
541
B574c
TES MEM
1001

**Contribuição ao Estudo dos Constituintes
Químicos da Própolis de *Eucalyptus*
urophilla da Região do Triângulo Mineiro**

SISBI/UFU



1000198364

Aluna: Lélia Cordeiro Freire Bezzan

Orientador: Prof. Evandro Afonso do Nascimento

Maio de 2000



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
INSTITUTO DE QUÍMICA

ALUNA: LÉLIA CORDEIRO FREIRE BEZZAN

NÚMERO DE MATRÍCULA: 5981423-X

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: QUÍMICA ORGÂNICA

PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA: NÍVEL MESTRADO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:

*“Contribuição ao Estudo dos Constituintes Químicos do
Própolis de Eucalyptus urophilla da Região do Triângulo
Mineiro”.*

ORIENTADOR: Prof. Dr. Evandro Afonso do Nascimento

A Dissertação foi **APROVADA** em reunião pública, realizada no Anfiteatro da Biblioteca, do Campus Santa Mônica, em 10 de maio de 2000, às 14:00 horas, com a seguinte Banca Examinadora:

NOME:

Prof. Dr. Evandro Afonso do Nascimento (UFU)

Profa. Dra. Amazile Biagioni Maia (UNI-BH)

Profa. Dra. Maria Cristina Marcucci Ribeiro (UNIBAN)

ASSINATURA

Evandro Afonso do Nascimento

Amazile Biagioni Maia

Maria Cristina Marcucci Ribeiro

Uberlândia, 10 de maio de 2000.

Lista das siglas e abreviaturas

RMN – ressonância magnética nuclear

UV – Ultravioleta

HPLC – high performance liquid chromatography

HT – HRCG – High temperature – high resolution chromatography gas

HT – HRCG – MS - High temperature – high resolution chromatography gas – mass spectrometry

CG/MS – cromatography gas /mass spectrometry

FTIR – fourrier transformation infra red

CHN – carbono, hidrogênio, nitrogênio

CG/EM – cromatografia gasosa/espectrometria de massa

TLC – thin layer chromatography

GPC – gel permeation chromatography

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência

CCD – cromatografia de permeação em gel

Mw – massa molar media em massa

BSTFA – bis – (trimetilsilil)trifluoroacetamida

Agradecimentos

- ao Senhor Ricardo Hensing, proprietário do Apiário Santa Rita que nos forneceu a amostra e informações técnicas
- ao professor Reinaldo Ruggiero pela análise de CPG
- ao professor Julien Coleta Boots pelos espectros de difração de raio – X
- à professora Dorila Piló Veloso pela análise de infravermelho e RMN
- aos técnicos André Macedo e Buiati do Instituto de Química pelas inúmeras ajudas ao longo deste trabalho
- à Leonora Mattos pela valiosa ajuda no início do trabalho

Agradecimentos Especiais

ao amigo Roberto Chang

ao professor Evandro

Meu Carinho Especial

Para o Ailton, meus pais e irmãos.

Sempre Grata a Deus pelo Dom da vida.

Sumário

<u>Assunto</u>	<u>Página</u>
I – Introdução.....	1
I.1 - Revisão Bibliográfica.....	4
I.2 – Objetivo.....	13
II – Metodologia.....	14
II.1 – Amostra de própolis.....	14
II.2 – Amostra de resina.....	14
II.3 – Preparação dos extratos.....	15
II.3.1 – Extrato de própolis.....	15
II.3.2. – Extrato de resina.....	15
II.4 – Procedimentos.....	16
II.4.1 – Determinação de substâncias fenólicas totais.....	16
II.4.2 – Det. dos flavonóides como teor de quercetina.....	17
II.4.3 – Determinação da quantidade de cera.....	17
II.4.4 – Cinzas.....	18
II.4.5 – Determinação dos componentes voláteis.....	18
II.4.6 – Resíduo seco das substâncias voláteis.....	19
II.4.7 – Determinação dos componentes não voláteis.....	19
II.4.7.1 – Da própolis.....	19
II.4.7.1.1 – cromatografia de coluna.....	19
II.4.7.1.2 – cromatografia de permeação em gel.....	21
II.4.7.2 – Da resina.....	21
II.4.8 – Técnicas espectroscópicas.....	22
II.4.8.1 – Infravermelho.....	22
II.4.8.2 – Ultravioleta.....	22
II.4.8.3 – RMN de C ¹³	22
II.4.9 – Análise Elementar – CHN.....	22
II.4.10 – Difração de Raios X.....	22
III – Resultados	23
III.1 – Análise da amostra natural.....	23
III.2 – Análise dos extratos.....	23
III.2.1 – Extrato clorofórmico.....	23
III.2.2 – Extrato metanólico.....	28
III.2.1 – Fenólicos totais e flavonóides.....	28
III.2.2 – Cromatografia de coluna.....	30
III.2.3 – Extrato aquoso.....	31
III.2.3.1 – Estudo dos componentes voláteis.....	31
III.2.4 – Rota Extrativa de Banskota.....	33
III.2.4.3 – Estudo do resíduo insolúvel.....	37
III.2.5 – Análise da Resina.....	44
III.2.5.1 – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.....	44

III.2.5.2 – Teores de fenóis totais e flavonóides no extrato metanólico.....	46
IV – Discussão dos resultados.....	47
V – Conclusões.....	51
VI – Bibliografia.....	54
VII – Apêndice.....	59

Figuras

Figura 1 – Estrutura Básica dos flavonóides.....	2
Figura 2 – Estruturas básicas das flavonas, chalconas e flavanonas.....	6
Figura 3 –Complexo alumínio-quercetina.....	9
Figura 4 – Estrutura do complexo azul de ferro III.....	15
Figura 5 – Cromat. do Res. seco do ext. clorof. metilado.....	24
Figura 6 – Cromat. do Resíduo seco do extrato Clorof. sililado.....	25
Figura 7 – Espectro de Infravermelho da cera ext. com clorof.....	26
Figura 8 – Curva de calibração de fenóis totais em eq. de ácido gálico segundo método de Folin -Ciocalteu.....	28
Figura 9 – Curva de calibração para leitura de flavonóides totais em equivalentes de quercetina.....	29
Figura 10 – Cromat. dos compostos vol. da amostra de própolis.....	32
Figura 11 – Flux. da extração dos comp. segundo Banskota.....	33
Figura 12 – Cromat. do ext. clorof. após a ext. com água e metanol.....	34
Figura 13 – Cromatograma de CPG do resíduo acetilado.....	38
Figura 14– Espectro de IV do resíduo final da extração.....	39
Figura 15 – RMN de C ¹³ do resíduo final.....	41
Figura 16 – Dif. de raio X da cinza da amostra original.....	43

Figura 17 - Difração de raio X da cinza do resíduo final.....	44
Figura 18 – Curva de calibração para o ácido gálico.....	46
Figura 19 – Curva de calibração para o complexo alumínio-quercetina.....	47

Tabelas

Tabela 1 – Correlação entre a formulação e os principais usos da própolis.....	5
Tabela 2 – Conteúdos em porcentagem das amostras de própolis brasileira.....	9
Tabela 3 – Principais compostos encontrados na própolis brasileira.....	12
Tabela 4 - Comp. ident. no extrato clorofórmico metilado.....	24
Tabela 5 – Comp. ident. no extrato clorofórmico sililado.....	25
Tabela 6 – Principais bandas da cera da própolis.....	27
Tabela 7 – Fenóis totais e flavonóides do extrato metanólico.....	30
Tabela 8 – Eluentes utilizados na cromatografia de coluna.....	30
Tabela 9 – CG/EM das frações separadas por cromatografia de coluna.....	31
Tabela 10 – Componentes voláteis na amostra de própolis.....	32
Tabela 11 - Componentes do no extrato clorofórmico.....	34
Tabela 12 – Composição da fração de acetato de etila.....	36
Tabela 13– FTIR do resíduo final.....	39
Tabela 14 – Análise elementar do resíduo final.....	42
Tabela 15 – Componentes dos extratos da resina.....	45
Tabela 16 – Padrões adicionados ao CG.....	48

Abstract

Propolis is a resinous mixture consisting of products collected by bees. It's known that bees collect resin from several plant species. Brazilian propolis have good prices in international commerce by its higher medicinal value, especially those produced near a eucalyptus forest. This work studies a sample of propolis and a sample of exudate collected in a forest of *Eucalyptus urophilla*. There were no other species near the place from where the samples were collected, at least at 300 m.

Water, methanol and chloroform were used as solvents to prepare the resin and propolis extracts. The methanolic extracts were employed to determinate total phenolics compounds and total flavonoids. A silica-gel chromatographic column (CC) was prepared with ciclohexane and 0,5 g of methanol propolis extractives were added in the column. This column was eluted with chloroform, acetone and methanol. Volatile compounds were investigated in the aqueous extract using Clevenger apparatus. The chloroform extract was used in wax quantification and in GC/MS investigation. The propolis wax was analyzed by FTIR. The methanolic extract was washed with ethyl acetate and soluble portions were separated by CC. A final insoluble residue was obtained. This residue was analysed by GPC, FTIR, solid state ^{13}C NMR spectroscopy and CHN. Ash determination was quantified on the residue.

CG/MS was the most useful tool applied in this work. All samples were prepared with derivatization methods like methylation and silylation.

One compound was isolated in this work. Behenic acid was obtained in the silica gel column eluted with ciclohexane. This compound was identified by melting point tests and IR spectra. Fifty-

five compounds were identified in propolis and twelve in the *Eucalyptus* exudate.

The propolis and exudate extracts analysed did not present the same compounds as assumed. Further analysis of the aqueous extracts from both samples is being carried out in order to comprove that.

Solid-state ^{13}C NMR spectroscopy shows no signals of phenolic carbon in the residue resulting after the solvent extraction.

The ashes quantity, volatile-free dry residue, volatile and wax compounds are in good agreement with other samples from Brazilian propolis. However, lower quantities of total phenols and flavonoids were found in the propolis studied when compared with another sample extracted in the surroundings of a *Eucalyptus citriodora* forest in São Paulo State.

Resumo

Própolis é o termo genérico utilizado para denominar um material resinoso, de composição bastante complexa, coletado pelas abelhas a partir de brotos, exudatos da árvore e de outras partes do tecido vegetal e posteriormente modificado na colméia por adição de secreções salivares e cera⁽¹⁾. A própolis brasileira, segundo apreciação dos apicultores, é muito valorizada no mercado internacional pelo seu valor medicinal, especialmente aquele proveniente de colméias situadas próximas a florestas de eucalipto. O presente trabalho estuda uma amostra de própolis e outra de exsudato coletadas em meio a uma floresta de *Eucalyptus urophilla*. Conforme pôde ser observado nas ocasiões das coletas das amostras não havia outras espécies botânicas que servissem de alimento para as abelhas ao redor do local onde se encontravam as caixas de abelhas (colméias artificiais).

Foram preparados extratos de própolis e do exsudato com os seguintes solventes: água, clorofórmio, metanol. Os extratos metanólicos foram utilizados para avaliação dos teores de fenóis totais e de quercetina. Uma coluna de sílica gel preparada em ciclohexano suportou uma carga de aproximadamente 0,5 g do resíduo metanólico seco de própolis. Esta coluna foi eluída com três solventes: clorofórmio, acetona, metanol. O extrato aquoso do própolis serviu para se avaliar os componentes voláteis através de uma extração no sistema de Clevenger. O extrato clorofórmico de própolis foi base para o cálculo do teor de cera e a caracterização do resíduo clorofórmico por cromatografia foi realizada para a própolis e a resina. A cera obtida foi caracterizada por espectroscopia no infravermelho. Uma outra separação em coluna de sílica gel foi realizada. Desta vez o material a ser separado na coluna foi obtido

após uma seqüência de extração da amostra de própolis que teve início com a retirada dos produtos solúveis em água para, então, se obter o extrato metanólico do resíduo da extração com água do qual seria obtida então a fração solúvel em acetato de etila para então separá-la na coluna. A massa de própolis que ficou após a separação dos componentes solúveis em metanol foi ainda extraída com clorofórmio, mesmo assim restou um resíduo insolúvel. Este resíduo foi analisado por GPC, infravermelho e teor de cinzas.

A técnica mais utilizada para caracterização da amostra de própolis e de resina foi a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa. Todas as amostras analisadas por este método foram derivatizadas por metilação ou sililação.

Um único composto pôde ser isolado, durante todo o trabalho. Este composto foi obtido na primeira coluna de sílica em ciclohexano: o ácido behênico que apresentou ponto de fusão e espectro de infravermelho confirmatórios de sua estrutura. Foram identificados 55 compostos no própolis. Na resina foram identificados 12 compostos. O resíduo final da extração estava constituído fundamentalmente por polímeros alifáticos e aromáticos que contém as funções álcool e éter e não contém fenóis como se pode inferir da RMN do C^{13} no estado sólido.

Não foi encontrada concordância entre os constituintes identificados na própolis e na resina. Talvez porque os extratos aquosos das duas amostras não puderam ser analisados ou porque este fato venha a comprovar que a amostra de própolis analisada não teve o Eucalipto como fonte fornecedora de matéria prima ou ainda que a matéria prima retirada pelas abelhas sofra um processo degenerativo.

A RMN do C^{13} no estado sólido mostrou que o resíduo final da extração não continha fenóis.

Quanto aos teores de cinzas, resíduo seco livre de voláteis, voláteis e de cera, que são alguns dos valores que atestam a qualidade do própolis, a amostra estudada não se distinguia de outras amostras de própolis brasileira. No entanto, os teores de fenóis totais e flavonóides estavam abaixo de valores encontrados para uma outra amostra extraída de uma floresta de *Eucalyptus citriodora* na região de São Paulo.

I – Introdução

A vida pode ser encarada como a luta pela sobrevivência para a maioria dos seres vivos. A organização de indivíduos em sociedade de mesma espécie, fortalece o grupo e lhe dá maior proteção. Por outro lado, quanto mais indivíduos viverem em comum, maior o perigo desta sociedade ou comunidade ser ameaçada. O perigo de infecção é uma realidade para as plantas assim como para os animais e sempre são os microrganismos, bactérias, vírus e fungos, que trazem este perigo. Quanto mais eficiente um material se mostrar na proteção de uma espécie contra microrganismos tanto maior são as chances desta espécie permanecer ou viver por longos períodos de tempo.

As árvores são consideradas as plantas mais desenvolvidas e têm conseguido sobreviver por longos períodos de tempo. De acordo com Rohwedder⁽²⁾ foi nelas que as abelhas buscaram proteção contra os microrganismos. Por volta de 50 milhões de anos atrás, as abelhas começaram a se organizar em colônias, as quais eram constantemente infectadas por microrganismos. Assim, no seu processo evolutivo, aprenderam que a resina das árvores servia de proteção contra infecções. As abelhas misturavam esta resina das árvores com uma secreção glandular e revestiam suas colméias com a pasta formada, conhecida como própolis que, em grego, significa "sistema de defesa da cidade". O sucesso desta proteção aprendida e assimilada das árvores tornou-se absoluto: as conhecidas abelhas e suas colmeias permanecem imutáveis há pelo menos 42 milhões de anos e com costumes de vida surpreendentes: aproximadamente 50 a 60 mil abelhas vivem numa colméia onde cada uma dispõe de um espaço menor que 1 cm³. Isso exige uma ordem social extraordinária e, por outro lado, um excelente sistema sanitário, já que, se uma única abelha adoecer, toda a colmeia poderá ser infectada. Já foi demonstrado que uma colmeia é mais esterilizada que o mais limpo dos hospitais⁽²⁾.

Ainda segundo Rohwedder ⁽²⁾, o maior interesse da humanidade na própolis é seu emprego como medicamento. As abelhas empregam a própolis para impermeabilizar e “envernizar” as paredes da colmeia. Na colmeia, qualquer corpo estranho que elas não consigam remover para fora – como pequenos animais mortos, camundongos, por exemplo – é encapado com uma camada de própolis, para impedir ou retardar o processo de putrefação. Desta forma, o cadáver do animal fica mumificado com a camada de própolis, e seu processo de decomposição é retardado por vários anos. Sua carne continua vermelha e não exala o menor odor, mesmo considerando que a temperatura da colmeia situa-se entre 36 e 37 °C e a umidade interior é relativamente alta.

Comercialmente, a própolis é vendida em solução alcóolica, em concentrações variadas. O produto tem sido testado, experimentalmente, em doenças como faringite, câncer de garganta e pulmão e infecções gerais, em diferentes formulações e concentrações. Atribui-se sua propriedade anti-câncer aos compostos fenólicos existentes em sua composição, sobretudo aos flavonóides.

Os flavonóides contêm 15 átomos de carbono em seu núcleo básico e estão arranjados em uma configuração C₆-C₃-C₆, ou seja, dois anéis aromáticos ligados por 3 átomos de carbono que podem ou não formar um terceiro anel⁽³⁾. Sua estrutura básica pode ser conferida na figura 1.

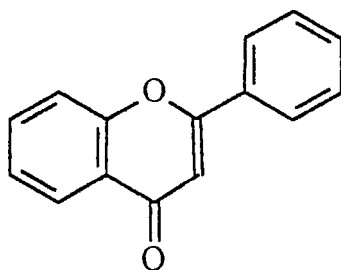


Figura 1 – Estrutura básica dos flavonóides

Segundo Markham⁽³⁾, flavonóides são compostos encontrados em plantas que comumente ocorrem como O-glicosídeos nos quais um ou mais grupos hidroxilas são ligados a um açúcar ou açúcares por uma ligação hemiacetal lábil. Este grupo de compostos possui as seguintes propriedades: antioxidante, bactericida, antifúngica, antivirótica e antiinflamatória. Outras propriedades da própolis incluem ainda ação local anestésica e redução de espasmos.

Estimou-se, segundo Markham⁽³⁾ que em torno de 2% de todo o carbono fotossintetizado pelas plantas seja convertido em flavonóides ou compostos correlatos. A maioria dos taninos também são derivados de flavonóides.

A própolis é largamente utilizada na Europa, Rússia, China, Japão e Estados Unidos, mas ainda é pouco difundida no Brasil. Os estudiosos recomendam o seu uso com cautela, sem exagero e sempre com pouca constância (máximo de 90 dias). Assim, ela não deve ser usada como um profilático medicinal, apesar de não possuir contra-indicações.

Os persas, gregos, romanos e incas já utilizavam a própolis. No Egito antigo ela era empregada para embalsamar os mortos. Há anos, famosos fabricantes de violinos na Itália, incluindo *Stradivarius*, vêm utilizando a própolis como um dos ingredientes na composição de vernizes. A coloração especial de alguns violinos feitos pelos antigos mestres de Cremona foi atribuída ao uso de própolis nos polidores e vernizes, hábito que existe até hoje. Na África do Sul, durante a guerra Anglo-Boer, há quase um século, a própolis foi utilizado com vaselina na confecção de um ungüento aplicado nos ferimentos de guerra^(4,5).

A flora apícola é o que se pode chamar de pastagem das abelhas. Há plantas que produzem flores com elevadas concentrações de néctar, outras que produzem bastante pólen e outras ainda que fornecem igualmente pólen e néctar. Infelizmente não existe o chamado pasto apícola ideal. Uma espécie vegetal de

alto potencial apícola é o eucalipto, que não deve ser explorado como monocultura pois só fornece alimento às abelhas durante uma época do ano. Apesar disso, o eucalipto é considerado uma espécie apícola muito importante, pois produz uma grande quantidade de néctar. Este tipo de escolha de pasto apícola só se justifica na atividade comercial, forçando o apicultor à atividade migratória em busca de outras espécies que sejam de interesse como alimento para as abelhas. O mais importante na questão do pasto apícola é a identificação das espécies que servirão de pasto para as abelhas, de forma que sejam espécies vegetais adaptadas e apropriadas à apicultura.

1.2 - Revisão Bibliográfica

- **Produção da própolis**

Segundo Ghisalberti⁽⁵⁾, uma colônia de abelhas chega a acumular cerca de 150 a 200 g de própolis por ano, embora certas espécies o façam em muito menor proporção.

- **Usos da própolis**

Apesar da pequena quantidade produzida por colônia de abelhas, a própolis tem sido usada em drogas cruas desde os tempos mais remotos, nas mais diversas regiões do mundo⁽⁵⁾. Drogas cruas são aquelas onde o ingrediente principal não passa por nenhum processo e é utilizado em sua forma natural. Na tabela 1 acham-se apresentados alguns dos usos farmacológicos da própolis, ainda segundo Ghisalberti⁽⁵⁾:

Tabela 1 – Correlação entre as formulações da própolis e principais usos

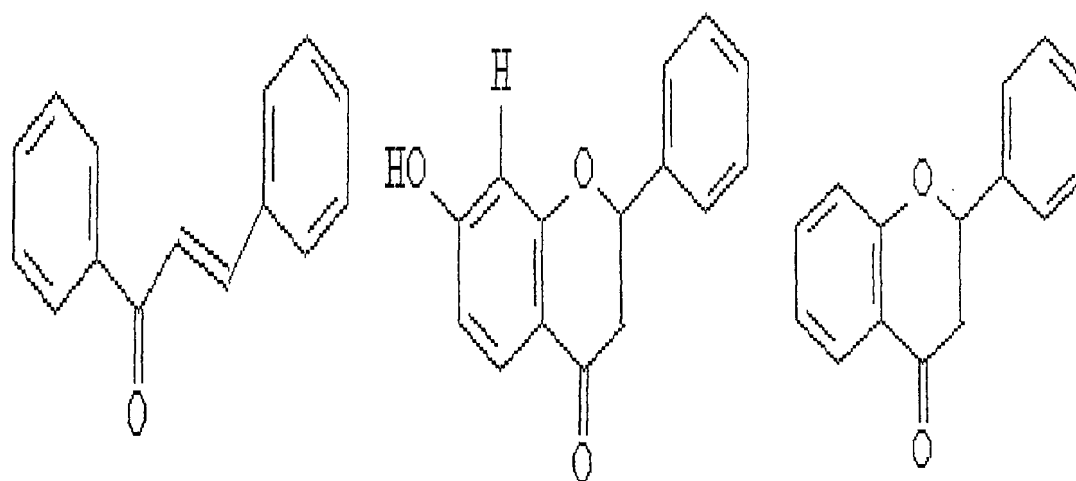
Produto	Uso Farmacológico
Extrato alcoólico (C = 200 g/l em etanol a 70%)	Antibacteriano; antifúngico; Agente de potencialização sobre antibióticos
Extrato em álcool a 4%	Anestésico (córnea de coelho)
Tintura (C = 200 g/l em etanol absoluto)	Acne; abscesso; hemorragia; herpes; cortes na pele; dor de dente; úlcera externa;
Extrato aquoso	Efeito bacteriostático sobre saprófitas resistentes a ácido; anestésico local.
Extrato hidroalcoólico (30 –50%)	Tratamento de candidíase; otite crônica; regeneração de tecidos e tratamento de úlcera.

Nos últimos anos a própolis tem sido utilizada na fabricação de pastas de dentes, chocolates, xampus, cremes, tabletes, etc. Sua produção mundial é da ordem de milhares de toneladas/ano⁽⁶⁾.

• Composição

Walker & Crane⁽⁷⁾ relataram que a maior parte dos estudos sobre a composição da própolis têm sido feita com base no conhecimento das plantas que originaram as amostras, ou das partes das plantas empregadas pelas abelhas.

Garcia-Viguera et al.⁽⁸⁾ estudaram a composição da própolis canadense . Caracterizaram, principalmente, flavanonas juntamente com flavonas e chalconas. Ácidos graxos de cadeia longa e hidrocarbonetos foram também detectados, assim como uma razoável quantidade de açúcares como glicose e frutose. A seguir podem ser observadas as estruturas da chalcona, flavanona e flavona respectivamente. As estruturas apresentadas são os flavonóides de cada classe.



Chalcona

Flavanona

Flavona

Figura 2 – Estrutura da chalcona, flavanona e flavona

Bankova et al.⁽⁹⁾ estudaram os componentes voláteis do óleo da própolis. Este óleo é composto principalmente de terpenóides, onde foram caracterizados mais de 30 componentes voláteis, com predominância de sesquiterpenos e hidrocarbonetos.

Marcucci et al.⁽¹⁰⁾ estudaram identificaram e quantificaram os aminoácidos de quatro amostras de própolis de diferente origem. Sete aminoácidos estavam presentes em todas as amostras praticamente na mesma porcentagem, indicando que as abelhas obtêm os aminoácidos de 3 fontes: plantas, pólen contaminação e seu próprio metabolismo.

• Análise

Greenaway et al.⁽¹¹⁾ analisaram amostras de própolis européias utilizando a técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Foram caracterizados cerca de 150 compostos entre componentes voláteis e componentes não voláteis.

Bankova e Christov⁽¹²⁾ analisaram os constituintes fenólicos de própolis utilizando como técnica a cromatografia gasosa (CG) com sistema de detecção de captura de elétron. A análise se tornou

possível por causa da característica que os flavonóides têm de ser bons captores de elétrons.

- **Ação**

Kinsella et al⁽¹³⁾ estudaram a ação antioxidante dos flavonóides, que minimizam a peroxidação lipídica e o efeito dos radicais livres. Segundo este trabalho, atribui-se às oxidações dos ácidos graxos polissaturados uma forte influência no estímulo ao desenvolvimento de doenças como a arterosclerose, enfermidades coronárias e determinados tipos de câncer. Foi demonstrado que indivíduos que ingerem uma maior quantidade de flavonóides apresentam uma considerável diminuição no risco de morte por acidentes cardiovasculares.

- **Mercado**

A própolis de certas regiões de Minas Gerais tem tido excelente aceitação no mercado japonês, onde encontra atualmente a mais alta cotação, relativamente ao produto de outras regiões do país e do mundo⁽¹⁴⁾. Esta valorização encontra-se fortemente relacionada aos tipos específicos de flavonóides presentes, tendo em vista sua aplicabilidade terapêutica.

- **Critério de qualidade**

Sabe-se que a qualidade da própolis depende da sua procedência, que a mesma possui um odor característico que pode variar de uma amostra para outra. Certas amostras podem não apresentar qualquer odor. Segundo Maia⁽¹⁵⁾, existe uma grande variação nos conteúdos e nos tipos de compostos flavonóides presentes na própolis, conforme sua origem botânica, apresentando faixas de variação suficientemente amplas para que se questione a real correspondência entre os métodos de determinação e os valores normalmente encontrados, o que serve de alerta para que algumas técnicas, embora largamente usadas e referidas na literatura

internacional, sejam vistas com reservas para fim de classificação da própolis quanto ao potencial terapêutico.

- **Seleção do solvente para análise**

O solvente apropriado para a extração deve ser selecionado com base na polaridade dos flavonóides a serem estudados. Solventes tais como benzeno, clorofórmio, éter ou acetato de etila são usados para extrair as agliconas menos polares⁽¹⁶⁾.

Banskota et al.⁽¹⁷⁾ isolaram alguns constituintes da própolis brasileira de dois extratos: o aquoso e o alcóolico. Foram realizados testes de espectroscopia de RMN protônica e de carbono 13, análise de UV e espectrometria de massas. Além disso testaram a atividade citotóxica de seus constituintes em células cancerígenas.

- **Técnicas de análise e quantificação dos flavonóides**

Maia et al.⁽¹⁸⁾, estudaram a separação dos flavonóides agliconas através de hidrólise ácida, com o objetivo de se evidenciar flavonóides específicos em suas formas agliconas. A comparação foi feita com extratos hidrolisados e não hidrolisados utilizando um cromatógrafo líquido de alta eficiência para a detecção dos picos. Os resultados encontrados mostraram que nem todos os flavonóides ligados extraídos de plantas são convertidos para as respectivas agliconas pela ação das enzimas salivares das abelhas.

Woisky et al.⁽¹⁹⁾ quantificaram os flavonóides presentes na própolis evitando a interferência de outras substâncias através de leitura por espectrofotometria de absorção a 425 nm, utilizando-se complexos flavonóide-alumínio. A vantagem reside no fato de que o complexo absorve em um comprimento de onda superior à do flavonóide sem o metal, e mesmo os ácidos fenólicos que formam complexos com o alumínio absorvem num valor de comprimento de onda muito menor do que o complexo flavonóide-alumínio. A figura 3 apresenta a quercetina e sua forma complexada com o alumínio após a reação com o cloreto de alumínio.

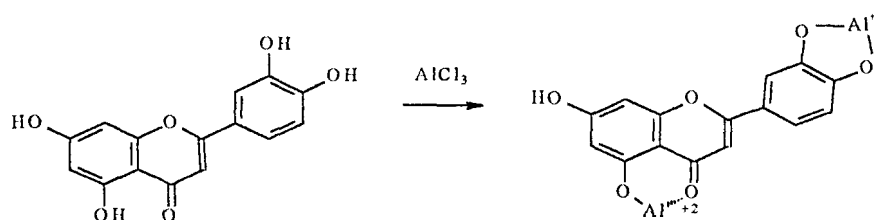


Figura 3 – Formação do complexo alumínio-quercetina

A tabela 2 apresenta os resultados encontrados por Woisky⁽¹⁹⁾.

Tabela 2 – Conteúdos, em porcentagem, de amostras de própolis brasileira⁽¹⁹⁾.

Origem da amostra	Fenóis totais	Flavonóides	Cera	Cinzas	Resíduo seco
Flora complexa – Ribeirão Preto	9.63	0.77	7.82	2.8	93.0
Plantação de Eucalipto – Estado de São Paulo	9.49	2.69	7.16	3.78	92.2
Plantação de Laranja-R. Preto	12.6	0.83	4.63	1.87	92.6

Plantação de "Laranja- Lima" – Estado de São Paulo	8.78	2.58	XXXXXXX	XXXXXXX	90.2
Flora complexa – Nova Petrópolis Est. Rio Grande do sul	10.87	2.12	XXXXXXX	XXXXXXX	92.0
Flora complexa – Sombrio Estado de Santa Catarina	13.72	2.16	6.79	3.74	94.2

Mattos⁽²⁰⁾ discute a técnica de quantificação de flavonóides na própolis por complexação com alumínio e espectrofotometria no ultravioleta e propões que esta quantificação seja feita por CLAE. Segundo Mattos, mesmo sem emprego de arranjo de diodos a cromatografia líquida de alta eficiência é muito mais confiável para aplicação ao controle de qualidade de própolis já que permite evidenciar teores de flavonóides específicos e eliminar interferência de outros componentes da amostra que podem prejudicar a confiabilidade da técnica espectrofotométrica.

- **Novos compostos**

Um novo composto, de massa molecular 298,30 e fórmula $C_{19}H_{22}O_3$. Foi isolado por Matsuno et al.⁽²¹⁾, do extrato metanólico fracionado por CLAE, a estrutura deste composto descolorido foi determinada como: 3-[2-dimetil -8-(3-metil-2-butenil) benzopiran-]-6-propeno.

- **Comparação entre própolis e resina**

Bankova et al.⁽²²⁾ fizeram um estudo comparativo entre a própolis e secreções de plantas das três espécies (*Baccharis dracunculifolia*, *Araucaria angustifolia* e *Eucalyptus citriodora*) mais freqüentemente mencionadas como fontes botânicas de constituintes da própolis no Brasil. Os estudos foram realizados utilizando-se cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa⁽²²⁾. Concluíram que os principais constituintes da resina do *Eucalyptus citriodora* são ácidos aromáticos, classe de compostos usualmente encontrados na própolis, e açúcares. Contudo os ácidos aromáticos encontrados na própolis foram diferentes dos encontrados no *Eucalyptus citriodora*. A Própolis contém os ácidos dihidrocinâmico, p-cumárico, ferúlico e cafeico, assim como os derivados prenilados do ácido p-coumárico. Por outro lado, a resina do *Eucalyptus citriodora* contém os ácidos cinâmico e p-cumárico sem os derivados prenilados, e o principal constituinte é o ácido gálico, que não se encontra na própolis.

- **Técnicas de identificação**

Os extratos em hexano e acetona, sem serem derivatizados, de duas amostras brasileiras de própolis, foram analisados por HT-HRCG e HT-HRCG – MS. Muitos compostos incluindo flavonóides agliconas, ácidos fenólicos e compostos de alta massa molecular puderam ser caracterizados. As duas técnicas utilizadas se mostraram ferramentas eficientes para análises rápidas dos extratos sem necessidade de derivatização e purificação⁽²³⁾.

Maia⁽²⁴⁾ propôs um método de avaliação para o teor de quercetina em amostras de própolis. A medida seria realizada com a construção de uma curva de calibração utilizando padrões de quercetina e valores de área do pico obtido por cromatografia líquida de alta eficiência. Para maior exatidão, deve-se separar os componentes fenólicos presentes na própolis antes da análise cromatográfica e fazer uso de um detetor de rede de diodos (“*diode array*”) para detecção da quercetina. A vantagem deste sistema de detecção é que pode ser feito um espectro de ultravioleta de varredura para cada pico detectado no cromatograma.

A quercetina, por exemplo, apresenta absorção máxima nos comprimentos de onda $\lambda = 255 \text{ nm}$ e 370 nm em solução metanólica⁽²⁵⁾.

Método do azul da prússia para determinação de fenois totais descrito por Price e Butler⁽²⁶⁾. Este teste é baseado na redução pelos taninos e outros compostos polifenólicos do íon férrico a íon ferroso, seguida da formação do íon complexo ferricianeto-ferroso. O produto colorido comumente chamado azul da prússia tem o máximo de absorbância em 720 nm .

Na tabela 3 serão apresentados os compostos encontrados na própolis brasileira nos últimos dez anos e as correspondentes fontes bibliográficas:

Tabela 3 – Principais compostos encontrados na própolis brasileira

Composto	Referência
Ácido p-cumárico, ácido dihidrocinâmico, ácido prenil – p-cumárico, ácido diprenil –p-cumárico, metil éter do 4-aromadendrino, canferol, β - amirina, cicloartenol.	Bankova et al ⁽²¹⁾
Quercetina	Maia et al ⁽²⁴⁾
3-hexen-2-ona, acetofenona, 2-butil-1-octanol, metil éster do ácido hidrocínâmico, ácido hidrocínâmico, 4-hidróxi-3-metóxi-benzaldeído, 7-metóxi-2,2-dimetil-2H-1-benzopirano, 2,4-bis(dimetil-	Pereira et al ⁽²²⁾

etil-)-fenol, isômeros do octil-fenol, α e β - amirina, metil éter da β - amirina, dotriacontanol, nonatriacontano, tetracoisilhexadecanoato, heneicosilhexadecanoato, octaicosilhexadecanoato, tricontilhexadecanoato, dotriacontilhexadecanoato, tetratriacontilhexadecanoato, octatriacontilhexadecanoato	
Ácido 2,2 - dimetil-8-fenilcromeno-6-propenóico, 2,2 - dimetil-cromeno-6-propenóico, 2,2 - cromeno-6-carboxílico, artepilina (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico), ácido 4-hidróxicinamolóxi-3-prenilcinâmico, ácido 4-hidróxi-3-prenilcinâmico, vanilina, aldeído coniferílico, ácido isocuprêssico, ácido 15-acetóxiisocuprêssico, ácido agático, 15-metil éster do ácido agático, ácido agatálico, ácido cuprêssico, tremetona, viscidona, 12-acetóxiviscidona, ernamina, 3,5,7-triidróxi-4'-metóxi flavonol, dímero do acetato coniferílico.	Banskota ⁽¹⁶⁾
Ácido aspartico, treonina, serina, ácido glutâmico, prolina, glicina, alanina, cisteína, valina, metionina, isoleucina, leucina, tirosina, fenilalanina, lisina, amônia, histidina, arginina	Marcucci et al ⁽¹⁰⁾ .
C ₁₉ H ₂₈ O ₃ (M ⁺ 298)	Matsuno ⁽²¹⁾

1.2 - Objetivo

O objetivo do presente trabalho é caracterizar qualitativa e quantitativamente uma amostra de própolis da Região do Triângulo Mineiro, originada de uma pasto apícola constituído de árvores de Eucalyptus urophilla e, ainda, verificar se alguns constituintes da resina extraída das árvores que serviram de pasto apícola estão presentes na própolis. O resíduo insolúvel da própolis também será caracterizado e quantificado.

II - Metodologia

II.1 – Amostra de própolis

A amostra fornecida pelo Apiário Santa Rita foi coletada em 24 de fevereiro de 1999 na região do Triângulo Mineiro. Localização em 2D: latitude 19°01,62 sul e 48° 37,38 oeste, altitude de 900m, a 40 Km de Uberlândia, com a vegetação local constituída de uma floresta de Eucalyptus urophilla. A principal característica sensorial desta amostra é sua cor amarronzada e textura elástica. Foram tomados cuidados na retirada da amostra procurando obter-se uma amostra sem muita cera dos favos, mais no interior do que na tampa das caixas onde a amostra se encontra livre de impurezas e umidade originada das chuvas.

II.2 – Amostra de resina

Foram extraídas 10 g de resina de Eucalyptus Urophilla, no mesmo local em que se situavam as caixas de abelha. Não havia outra vegetação ao redor do local onde se encontravam as caixas, a pelo menos 300 m. De acordo com a percepção dos apicultores, as abelhas podem voar até dez quilômetros à procura de alimento, se não houver alimento perto das colméias. Havendo alimento disponível elas não saem à procura de outras fontes. A amostra formou cristais marrons rapidamente apesar de ser viscosa no momento da coleta. Os cristais foram armazenados em vidro.

II.3 - Preparação dos extratos

II.3.1 – Extrato de própolis

O extrato foi preparado com amostra de própolis pulverizada em almofariz. A extração foi feita em extrator Soxhlet com metanol até reação negativa com cloreto férrico a 5%. Uma gota de solução aquosa adicionada a poucas gotas de solução contendo compostos fenólicos em álcool provoca o aparecimento de uma cor intensa, geralmente azul, verde ou púrpura⁽²⁶⁾. A estrutura do complexo azul de ferro (III) com um composto fenólico qualquer está representada na figura 4.

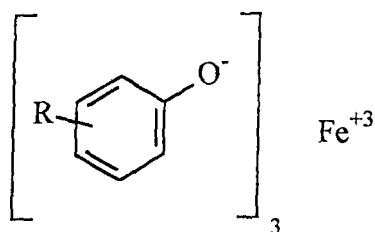


Figura 4 – Estrutura genérica do complexo azul de ferro (III)

Foi utilizada uma massa em torno de 2,5 g de própolis. O extrato foi diluído para 250 mL em balão volumétrico a 20 °C .

II.3.2 – Extrato de resina

O extrato foi preparado com amostra de resina pulverizada em almofariz. A extração foi feita a frio com metanol até que toda a amostra tivesse sido dissolvida. Foram utilizados cerca de 2,50 g de resina. O volume total do extrato em metanol foi de 250,0 mL que foram medidos em balão volumétrico a 20°C.

II.4 - Procedimentos

II.4.1 - Determinação de substâncias fenólicas totais

Método de Folin-Ciocalteu

Foram empregados padrões de ácido gálico em solução metanólica com concentrações que variavam no intervalo de 1,5 – 4,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de acordo com o método descrito por Waterman & Mole⁽²⁷⁾. Um mililitro de cada solução referência foi transferido para um balão volumétrico de 50,0 mL; 4,0 mL do reagente de Folin - Ciocalteu e 6,0 mL de uma solução de carbonato de sódio a 20% foram adicionados.

Esta reação de complexação é baseada na redução do ácido fosfomolibidênico pelos fenóis em solução básica.

O volume do balão volumétrico foi completado com água destilada a 20 °C. Depois de 2 h, tempo de formação e estabilização do complexo, as absorbâncias foram medidas a 760 nm. As soluções foram diluídas cinco vezes com metanol para a leitura do extrato metanólico. Para 30 mL da solução metanólica, foram adicionados 20 mL de água e o procedimento descrito acima para as soluções padrão foi realizado.

Método do azul da prússia

Este é o método descrito por Price e Butler⁽²⁵⁾. O produto colorido comumente chamado azul da prússia tem o máximo de absorbância em 720 nm.

Em um Erlenmeyer de 125 mL foram adicionados 0,10 mL da amostra e 50 mL de água destilada. Misturou-se bem. Adicionou-se 3,0 mL da solução de sulfato de ferro amoniacal sob agitação. Exatamente 20 minutos após, tempo necessário para formação e estabilização do complexo, adicionou - se 3,0 mL de ferricianeto de

potássio e misturou-se bem. A leitura no U.V. foi feita 20 minutos após em 720 nm. Um padrão de ácido gálico de concentração conhecida foi preparado e analisado, nas mesmas condições contra um branco.

II.4.2 - Determinação dos flavonóides como teor de quercetina

O método empregado na determinação dos flavonóides está baseado na farmacopéia alemã, segundo Deutches Arzneibuch⁽²⁸⁾, que utiliza medidas de absorbância a 425 nm.

Soluções metanólicas de quercetina de concentração entre 4,0 – 12,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram utilizadas para se preparar a curva de calibração. Para 2,0 mL de cada solução referência, 20,0 mL de metanol e 1,0 mL de uma solução a 5% de AlCl_3 foram misturados e o volume completado até 50 mL com metanol em um balão volumétrico. Depois de 30 minutos as soluções foram analisadas em 425 nm. Para a análise do extrato metanólico foram utilizados 3,0 mL do extrato no lugar da solução referência. A diferença no volume pipetado entre a solução referência e a amostra aconteceu para que se pudesse ter o complexo da amostra na mesma faixa de concentração da curva de calibração. O procedimento continua da mesma forma como utilizado para a solução referência⁽¹⁹⁾.

II.4.3 - Determinação da quantidade de cera

O conteúdo de cera foi determinado da seguinte forma: 3,0 g da amostra pulverizada em almofariz, foram tratadas com clorofórmio em extrator de Soxhlet por 6 horas. Os extratos foram concentrados em rotoevaporador e 120 mL de metanol a quente foram adicionados ao resíduo. Esta mistura foi fervida até que houvesse uma solução limpa no topo e uma pequena quantidade de resíduo oleoso que se solidificou após resfriamento. A fase metanólica foi filtrada utilizando-se filtro de papel número 1, para um frasco previamente

pesado de 150 mL. Resfriou-se a 0 °C e o conteúdo foi filtrado com filtro de papel número 1 em um sistema previamente pesado. O frasco e o resíduo foram lavados com 25 mL de metanol frio. Depois de secas em temperatura ambiente, as amostras foram armazenadas em um dessecador, até que se fixasse em uma massa constante. A massa de cera de cada amostra foi determinada por diferença⁽¹⁹⁾.

II.4.4 – Cinzas

O conteúdo de cinzas das amostras foi determinado segundo o procedimento do XXII encontro da Farmacopéia dos Estados Unidos⁽²⁹⁾ da América em 1990.

Dois gramas de própolis foram pesados em cadinho seco e tarado e levados ao fogo até que aparecesse uma cor rubra ou que estivesse bem queimado (é comum que se forme grande quantidade de fumaça). O cadinho foi novamente tarado antes de se levar a mufla a 600°C por 1 h. Deixou-se esfriar por 1 h dentro da mufla. Levou-se ao dessecador até peso constante e então calculou-se o teor de cinzas em função da massa seca de própolis.

O peso seco de própolis foi feito através de aquecimento de 10 g de amostra pulverizada em estufa a 105 °C por 5 h e, então, deixou-se em dessecador até peso constante.

II.4.5 - Determinação dos componentes voláteis

A extração dos componentes voláteis da amostra foi feita no sistema de Clevenger, com massa em torno de 2 g e 750 mL de água bidestilada. O sistema permaneceu em refluxo por 6 h. A fase orgânica foi extraída com éter etílico, seca e analisada em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massa CG/MS QP 5000 da Shimadzu. O programa "voláteis" utilizado na cromatografia tem as seguintes características: coluna DB1 de 30m e $\phi = 0,25$ mm;

Programa de temperatura : coluna 50-250 °C (8 °C / min.), 250 °C (25 min.); Temperatura do injetor e detetor a 250 °C.

II.4.6 - Resíduo seco das substâncias voláteis

Dez gramas da amostra de própolis foram aquecidos num forno a 105 °C por cinco horas, resfriados à temperatura ambiente e armazenados em um dessecador. A massa de substâncias voláteis foi avaliada por diferença a peso constante. O vidro de relógio foi previamente pesado a frio.

II.4.7 - Determinação dos componentes não voláteis

II.4.7.1 – Da própolis

Para a caracterização dos componentes não voláteis presentes na amostra de própolis foram utilizadas as seguintes técnicas de cromatografia em coluna e de permeação em gel:

II.4.7.1.1 - Cromatografia de coluna

Foram empregadas duas colunas:

Coluna 1: 0,5 g de extrato metanólico seco foi carregado na coluna de sílica gel em ciclohexano. Os solventes utilizados para a eluição foram:

Solvente	Número d e frações
Clorofórmio	4
Acetona	1
Metanol	3

O número de frações necessárias para cada solvente foi avaliado por espectrometria de ultravioleta num intervalo comprimento de onda entre 200 e 550 nm. Para cada solvente foi feito um espectro de ultravioleta prévio para que se pudesse avaliar a presença de contaminantes.

Coluna 2: o procedimento de extração e separação dos compostos foi realizado conforme descrito por Banskota⁽¹⁷⁾. Aproximadamente 24,0 g de própolis foram tratados com água destilada por 2,0 h a 80 °C. Foram utilizados 2,0 L de água e o processo foi repetido (uma vez); a parte insolúvel foi separada por filtração. O filtrado foi parcialmente evaporado para que se conseguisse concentrar o extrato aquoso. A porção insolúvel em água foi extraída com metanol (2 L por 2 h, duas vezes em refluxo) e então tratada com clorofórmio (2 L, temperatura ambiente, por duas vezes) para que se obtivessem o extrato metanólico e o extrato clorofórmico.

O extrato metanólico foi seco em um rotaevaporador a 38 °C e fracionado em duas partes; uma solúvel e a outra insolúvel em acetato de etila. A fração solúvel foi separada em uma coluna de sílica gel em clorofórmio com os seguintes gradientes de eluente : 5 % MeOH – CHCl₃ , 10 % MeOH – CHCl₃ , 10 % MeOH – CHCl₃ , 20 % MeOH – CHCl₃ , 20 % MeOH – CHCl₃, 30 % MeOH – CHCl₃, 30 % MeOH – CHCl₃, 40% MeOH – CHCl₃, 50 % MeOH – CHCl₃, 60% MeOH – CHCl₃, 100 % MeOH. Todas as frações foram recolhidas, secas e analisadas por CG/MS após a derivatização.

As técnicas de derivatização foram as seguintes:

Metilação: adicionam-se cinco gotas do hidróxido de tetrametil amônio na amostra a ser analisada por cromatografia gasosa, em meio metanólico e deixa-se em repouso por cinco minutos.

Sililação: À amostra sempre seca, adicionam-se três gotas de piridina e cinco gotas de BSTFA. O sistema fica em repouso por 15 minutos; e, em seguida a amostra é injetada no cromatógrafo. Agentes de sililação são comumente utilizados em CG/EM.

Programa de Temperatura do cromatógrafo gasoso

Método - Flavonoi

Temperatura do forno: 100 °C

Tempo de equilíbrio: 1 minuto

Temperatura do injetor: 250 °C

Temperatura da interface: 270 °C

Comprimento da coluna: 30 m

Diâmetro da coluna: 0,25 mm

II.4.7.1.2 –Cromatografia de permeação em gel (GPC):

Uma massa de 0,1g de própolis foi acetilada com piridina e anidrido acético (1:1) para, então, ser analisada por cromatografia de permeação em gel, nas seguintes condições:

Fluxo: 0,8 mL/min

Detetor de ultra violeta a $\lambda = 265$ nm

Solvente : THF

Colunas : 100 a 1000 A, RP-18 (250 mm x 4 mm) de 5 micrômetros de tamanho de partícula. A curva de calibração utilizada foi: $y = -0,1387x + 8,6569$ com $R^2 = 0,9811$.

A análise foi feita no aparelho de CPG Merck-Hitachi D2520.

Acetilação

A acetilação do resíduo final da extração da própolis foi feita com 0,5 g de amostra e 1,0 mL de piridina e 1,0 mL de anidrido acético. Depois de 12 h, à temperatura ambiente, foram adicionados 5,0 mL de água ao meio e filtrou-se o produto acetilado, lavando-o com água até desaparecer o odor de piridina e ácido acético.

II.4.7.2 – Da resina

Cerca de 1,0 g de resina bruta foi extraída com a seguinte sequência de solventes: clorofórmio, acetato de etila, metanol, água/metanol (1:1, v/v). Os extratos foram secos em rotaevaporador, sililados e analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa.

II.4.8 - Técnicas espectroscópicas

II.4.8.1-Infravermelho

A amostra seca foi triturada com KBr (brometo de potássio) na proporção de 1:99. O aparelho utilizado foi um FTIR da Shimadzu, modelo 8101.

II.4.8.2 - Ultravioleta

As amostras em solução foram analisadas em um espectrofotômetro de ultra violeta marca Hitachi U-2000.

II.4.8.3 – Ressonância Magnética Nuclear de C^{13}

O resíduo insolúvel de própolis foi analisado no aparelho de RMN da UFMG. Condições de análise: rotação - 5000Hz; programa de pulso-CP; sonda-7mm multinuclear MAS; TD - 4096; NS - 640; SWH - 50251,258Hz; AQ - 0,0408 s.; DW - 9.95 us. ; D1 - 5,00 s. ; temperatura - 300K ; p1 - (- 2,00 dB) (potência do pulso no canal do ^{13}C - F1); PL2 - (0,00 dB) (potência do pulso no canal do 1H); P3 - (5,50 us.) (pulso de alta potência no canal F2, canal do 1H); P15 - 5000,00 us. (tempo de contado entre os núcleos dos canais F1 e F2); PL12 - (-3,00 dB) (potência do desacoplador no canal F2). Parâmetros de processamento: SI - 32K; WDW - EM LB = 10,00Hz.

II.4.9 - Análise Elementar - CHN

A análise elementar foi feita no laboratório de microanálise do Instituto de Química da USP - São Paulo. O aparelho utilizado foi um Analisador de Elementos da Perkin Elmer modelo 2400 CHN da série II.

II.4.10 – Análise de raio-X

As amostras, na forma de pó, foram analisadas num difratômetro de raios X da SIEMENS, modelo D5005; foi empregada radiação de CuK_{α} a $\lambda = 1,54056$ nm.

III- Resultados

III.1 – Análise da amostra natural:

A amostra no seu estado bruto passou por três tipos de determinações: teor de cinzas, teor de resíduos voláteis (umidade) e teor de resíduo seco (não-voláteis). Estes são os teste feitos com a amostra no estado natural e que constituem as determinações utilizadas rotineiramente para se atestar a qualidade da própolis no mercado⁽¹⁹⁾.

Os resultados encontrados nesta etapa foram:

- teor de substâncias voláteis : 5,07%
- cinzas : 2,54%
- resíduo seco livre dos voláteis: 94,93%

Os resultados acima indicam que a amostra é semelhante à amostra de Santa Catarina analisada por Woisky⁽¹⁹⁾, quanto ao teor de resíduo seco livre de voláteis; que o teor de cinzas é compatível com uma amostra de Ribeirão Preto, sendo que o teor de substâncias voláteis se encontra acima do valor encontrado para amostras de Ribeirão Preto, Piracicaba, Nova Petrópolis e Sombrio que foram analisadas também por Woisky⁽¹⁹⁾. A tabela 3 (pág. 9) apresenta os resultados encontrados por Woisky⁽¹⁹⁾.

III.2 – Análise dos extratos

III.2.1 – Extrato clorofórmico

O extrato clorofórmico foi utilizado para a determinação do teor de cera contido na amostra. Duas técnicas foram empregadas nesta etapa, além do cálculo do teor de cera: análise por espectroscopia de infravermelho da cera obtida e análise por CG/EM do extrato clorofórmico utilizado na determinação. Para a cromatografia gasosa o extrato foi seco e derivatizado por metilação ou por sililação.

O teor de cera encontrado na amostra crua foi de 29,35 %, tendo sido citado por Asís⁽³⁰⁾ em "Apiterapia para todos" como sendo uma quantidade normal de cera em própolis, este valor é justificado pelo fato da amostra ter sido coletada em uma caixa que havia sido limpa a pouco tempo. A seguir serão apresentados os resultados obtidos pela cromatografia em duas tabelas.

A Figura 5 e a Tabela 4 apresentam os resultados da amostra derivatizada por metilação e a Figura 2 e a Tabela 5 os resultados da derivatização por siliilação.

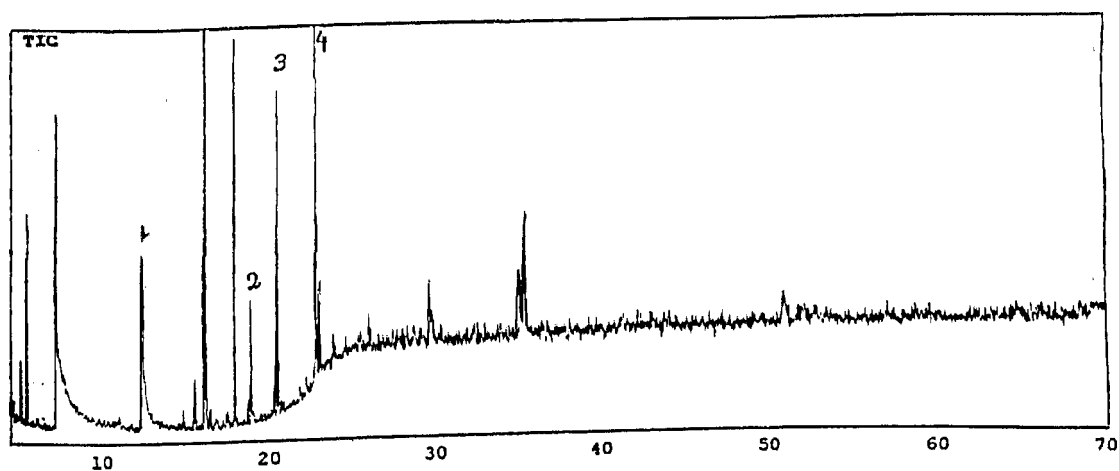


Figura 5. Cromatograma gasoso do resíduo seco do extrato clorofórmico metilado

Tabela 4. Compostos identificados no extrato clorofórmico metilado.

Pico número	Tempo de retenção	Nome do composto
1	12.517	Ácido cinâmico
2	19.050	3,4-dihidroxi-benzaldeído
3	20.567	Ácido palmítico
4	22.933	Ácido oleico

O cromatograma referente à Tabela 4 apresentou 20 picos bem definidos dos quais o aparelho só identificou 4 com um índice de similaridade maior ou igual a 80 %. Marcucci⁽³¹⁾ relatou a existência destes quatro compostos como constituintes químicos da própolis.

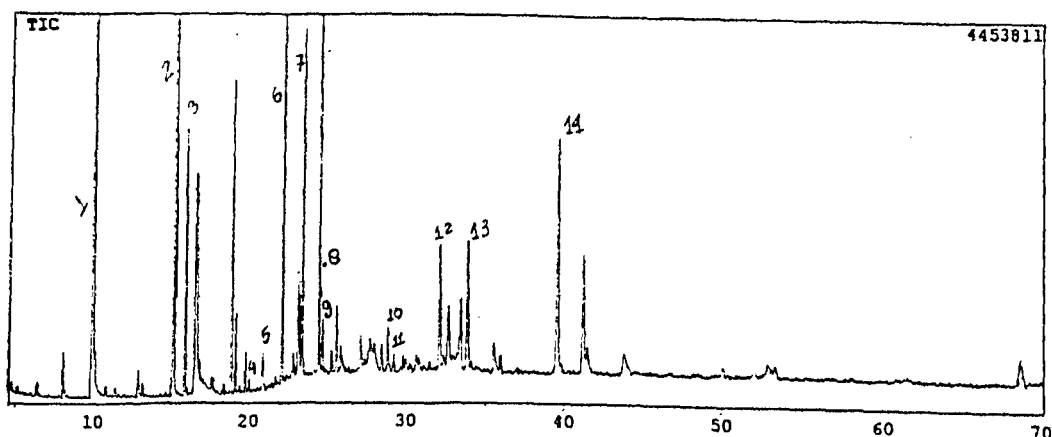


Figura 6. Cromatograma do resíduo seco do extrato clorofórmico sililado

Tabela 5. Compostos identificados no extrato clorofórmico sililado.

Pico número	Tempo de retenção (min.)	Nome do composto
1	9.892	Ácido benzóico
2	15.125	Ácido cinâmico
3	16.533	2,2-dimetil-3,5-decadieno
4	20.050	Bis – metil – propil éster do ácido 1,2-benzeno-dicarboxílico
5	20.883	Pinocembrina
6	22.100	Ácido palmítico
7	23.367	Cinamato de benzila
8	24.417	Ácido oleico
9	24.692	Ácido esteárico
10	28.758	Nonacosanol
11	28.783	11,20-didecil-triacontano
12	32.050	1-trimetil-silóxi-2-(3'-metóxi-4'-trimetil-silioxipentil)- etano
13	33.792	Bis – tms – éter do 1-o-heptadecil – glicerol
14	39.525	Ácido tetracosanóico

Os resultados apresentados na Tabela 4 correspondem à mesma amostra da Tabela 5. O fato de ter sido possível uma maior identificação dos compostos na análise onde foi feita sililação(Figura 6) se deve ao fato de que a amostra metilada se encontrava muito diluída. Nesta análise, dos 54 picos apresentados pelo cromatograma somente 15 compostos foram identificados, o que mostra a dificuldade de se lidar com uma mistura natural complexa como a própolis ou na necessidade de se ter mais padrões para a composição de uma melhor biblioteca. Marcucci⁽³¹⁾ relatou também a existência de ácido benzóico, pinocembrina, ácido esteárico, ácido lignocérico e tetracosanóico na própolis européia. Como o trabalho de Marcucci⁽³¹⁾ é uma revisão sobre os principais componentes já encontrados na própolis de diversas amostras, não se pode levar em consideração a quantidade de compostos citados mas seu trabalho é um poderoso guia quanto à descoberta de novos componentes.

Na Figura 7 e na Tabela 6 estão apresentados respectivamente, o espectro no infravermelho e as bandas mais características da cera analisada.

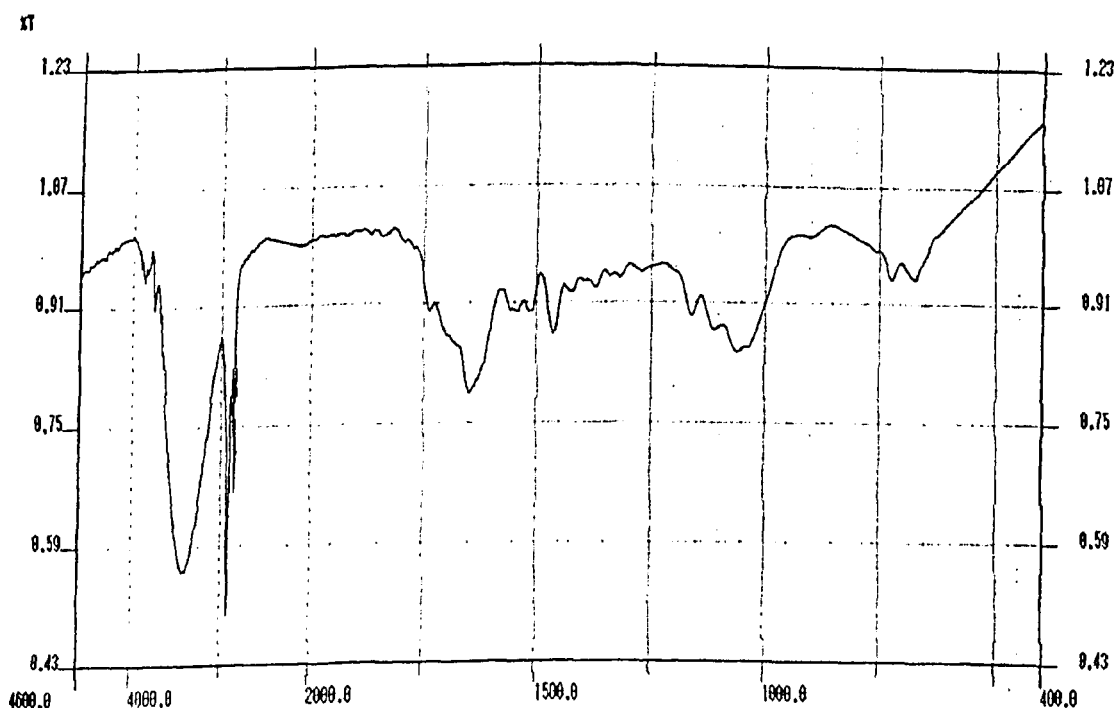


Figura 7 – Espectro no infravermelho da cera extraída com clorofórmio.

Tabela 6 – Principais bandas observadas na cera da própolis.

Frequência, cm^{-1}	Grupos característicos
3746,2	Estiramento O-H
3421,2	
2918,7	Estiramento C-H
2851,1	
1735,2	Estiramento C=O de ésteres saturados alifáticos
1647,4	Vibrações do esqueleto aromático
1465,1	Deformação C-H
1374,4	Deformação C-H de CH_3
1163,2	Estiramento C-O
1111,1	
721,0	Deformação de grupos CH_2

Segundo Bianchi⁽³²⁾, os constituintes das ceras derivados biossinteticamente dos ácidos graxos são os alcanos, os ésteres e as cetonas, todos solúveis em metanol a quente mas insolúveis em metanol a frio. Pode se observar, pela Tabela 6 e pela Figura 7, a evidência de bandas de absorção do espectro no infravermelho que corroboram a composição da cera como sendo composta por todos estes compostos.

A determinação do conteúdo de cera numa amostra de própolis é importante para a determinação do controle de qualidade porque alta porcentagem de cera (compostos biologicamente inertes) está relacionada com baixas quantidades de compostos biologicamente ativos⁽¹⁹⁾.

III.2.2 – Extrato metanólico

III.2.2.1 – Fenólicos Totais e Flavonóides

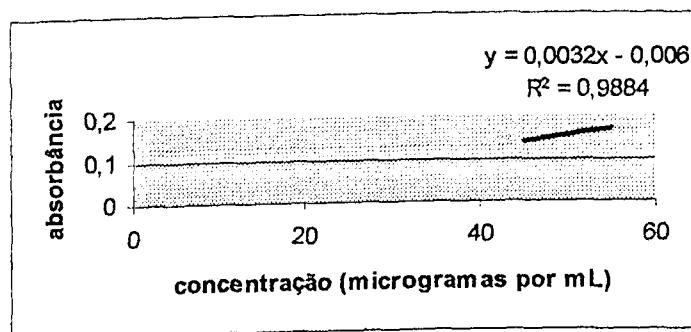


Figura 8 – curva de calibração para leitura de fenóis totais em equivalentes de ácido gálico segundo o método de Folin-Ciocalteu

A figura 8 mostra a curva de calibração feita para o ácido gálico. Pode-se calcular o teor de 3,38 g de fenóis em equivalentes de ácido gálico por 100 g de própolis, utilizando-se a equação da reta obtida para os padrões de ácido gálico. O teor encontrado por Woisky⁽¹⁹⁾ foi aproximadamente de três vezes este valor para a própolis de eucalipto conforme pode ser observado na tabela, contudo a amostra analisada por ele foi colhida no período entre outubro e fevereiro, enquanto que a amostra utilizada neste trabalho foi colhida em fim de fevereiro. Esta diferença pode ter contribuído para a redução de compostos fenólicos. Outro fator pode ser a diferença da espécie de eucalipto ou o clima da região que é diferente do cerrado de onde vem a própolis considerado no presente trabalho.

Uma outra medida do teor de polifenóis foi realizada segundo o método do azul da prússia e o valor encontrado foi de 3,126 g de fenóis totais por 100 g de própolis. Os dois métodos apresentaram valores bem próximos.

O teor de flavonóides totais foi avaliado em equivalentes de quercetina pelo método do formação de complexo dos flavonóides com alumínio (Figura 9). Foi encontrado um valor de 0,121 g de

flavonóides para cada 100 g de própolis. Este valor também se encontra abaixo dos valores encontrados por Woisky⁽¹⁹⁾ para a amostra da plantação de eucalipto (tabela 2). Valores três a seis vezes maiores do que os encontrados para amostras brasileiras foram encontrados por Bankova⁽³³⁾ e Bonvehí e Coll⁽³⁴⁾ utilizando técnica de CLAE para quantificação de flavonóides. A explicação para isso se deve ao fato de que diferentes classes de flavonóides se comportam de forma diferenciada em relação ao cloreto de alumínio. Segundo Markham⁽²⁴⁾, o alumínio provoca deslocamentos diferentes para cada classe de flavonóide. Um segundo motivo pode ser o fato de que na própolis de Eucalipto do cerrado a quantidade de flavonóides seja realmente menor . Bankova⁽³⁵⁾ obteve por cromatografia gasosa de alta resolução e alta temperatura-espectrometria de massas, dados que confirmam o alto teor de flavonóides em amostras de própolis européias contrastando com os baixos teores encontrados para amostras de própolis brasileiras. Maia⁽²³⁾ provou que, por HPLC, encontram-se maiores teores de concentração de quercetina, o que justifica o alto valor da própolis no mercado internacional.

A validade do método de formação de complexos flavonóide-alumínio reside no fato de que, apesar de não apresentar os valores reais do conteúdo de flavonóides, constitui uma técnica que pode ser utilizada como rotina na qualificação de amostras para o mercado de própolis, já que não requer instrumental sofisticado⁽¹⁹⁾.

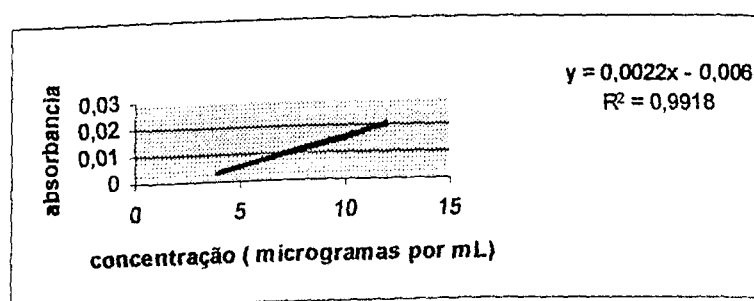


Figura 9 - curva de calibração dos padrões de quercetina

Tabela 7 – Resultados de fenóis totais e flavonóides encontrados para o extrato metanólico da própolis.

	Flavonóides (%)	Fenóis totais (método Folin-Ciocalteu) (%)	Fenóis totais (método azul da prússia) (%)
Extrato metanólico	0,121	3,38	3,126

III.2.2.2 – Cromatografia de coluna

A terceira investigação a que foi submetido o extrato metanólico foi a separação dos seus constituintes por uma coluna de sílica gel e posterior análise por CG/EM. Esta coluna foi preparada com sílica suficiente para uma carga de 0,53 g de material seco do extrato metanólico.

A Tabela 8 apresenta os solventes utilizados nesta separação.

Tabela 8. Eluentes utilizados na cromatografia de coluna.

Eluente	Número de Frações
Clorofórmio	4
Acetona	1
Metanol	3

Cada fração foi analisada por CG/EM e TLC na tentativa de se identificar e separar os compostos ali presentes. Os cromatogramas de cada fração encontram-se no apêndice. A Tabela 9 apresenta os compostos identificados com um índice de semelhança maior ou igual a 80 %.

Tabela 9. Compostos identificados por CG/EM das frações separadas por cromatografia de coluna

Fração	Tempo de retenção (min.)	Composto	Solvente utilizado na separação
1	19,750	Pentadecano	Clorofórmio
	21,875	Heptadecano	Clorofórmio
	12,608	Benzoato de benzila	Clorofórmio
1	9,908	Ácido trans cinâmico	Acetona
	15,158	Ácido benzóico	Acetona
4	25.5	Ácido behênico	Clorofórmio
6	22.783	Benzil-fenil-metanona	Clorofórmio
17	25.475	Ácido tetracosanóico	
2	13.567	Ácido isobutírico	Metanol
	6.042	Glicerol	
	3.325	Ácido láctico	

Dos compostos mostrados na Tabela 9, só o ácido behênico pode ser separado por cromatografia preparativa. Ele apresentou ponto de fusão de 78 °C e estrutura confirmada por I.R.. O ácido behênico ou ácido docosanóico é um dos ácido graxos que constam na relação dos compostos que Marcucci⁽³¹⁾ citou como presentes na própolis européia. As demais frações continham muitos componentes. Após a análise dos cromatogramas que constam no apêndice deste trabalho pode-se verificar que a maior parte dos componentes obtidos nesta separação não puderam ser isolados.

III.2.3 – Extrato aquoso

III.2.3.1 –Estudo dos componentes voláteis

A Tabela 10 apresenta os resultados da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas dos componentes voláteis extraídos no sistema de Clevenger. O cromatograma obtido está

mostrado na Figura 10 e dos oito picos principais somente cinco foram identificados com um índice de similaridade superior a 80 %. O dois constituintes principais de tempo de retenção igual a 5 e 7 minutos respectivamente, não puderam ser identificados por espectrometria de massas conforme pode ser visto pela figura 10 e analisado na tabela 10.

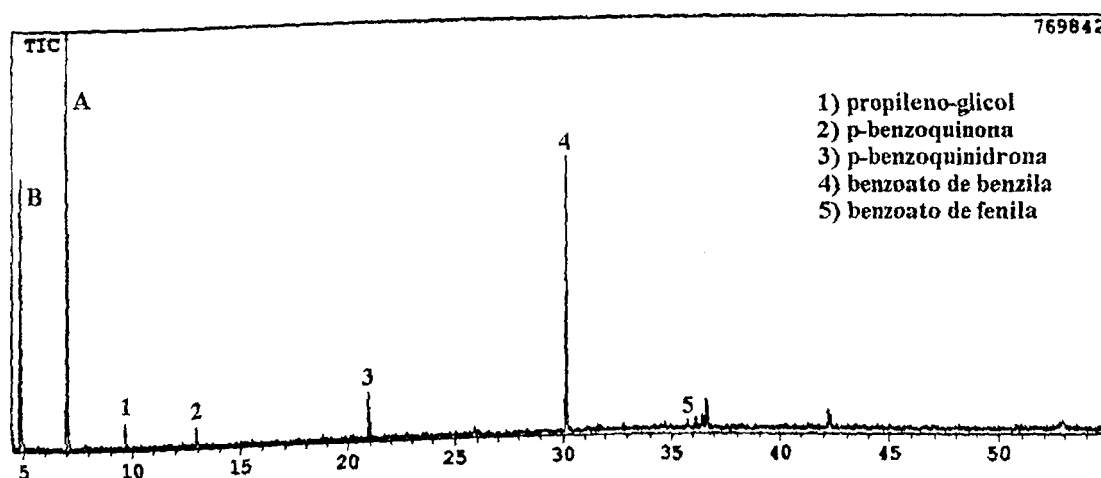


Figura 10. Cromatograma dos compostos voláteis do extrato aquoso do própolis

Tabela 10. Compostos voláteis encontrados na amostra do própolis

Pico	Tempo de retenção (min.)	Nome do composto
1	9.692	Propileno glicol
2	12.950	p-benzoquinona
3	20.983	p-benzoquinidrona
4	30.142	Benzoato de benzila
5	36.192	Benzoato de fenila

Alguns trabalhos relatam a identificação dos voláteis de própolis por CG/EM. O benzoato de benzila foi relatado por Bankova⁽⁹⁾ em seu trabalho sobre os componentes voláteis da própolis européia mas não o benzoato de fenila. Não foram citados em trabalhos anteriores o propileno glicol, a p-benzoquinona e a p-benzoquinidrona.

III.2.4 – Rota extrativa de Banskota

O fluxograma apresentado na Figura 11 ilustra a extração de Banskota e as massas que foram trabalhadas em cada etapa.

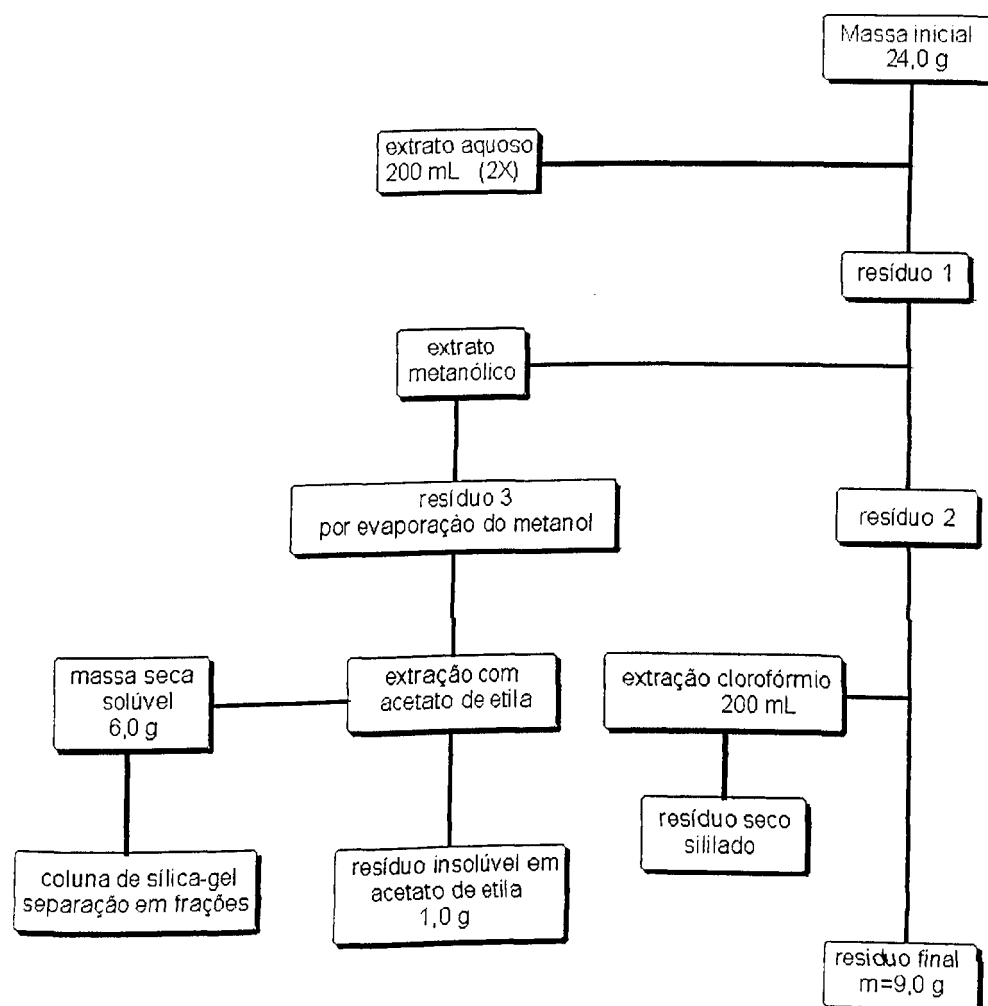


Figura 11. Fluxograma da extração dos compostos segundo Banskota

O objetivo do método proposto por Banskota era isolar um grande número de compostos. Ele iniciou a extração com 2,0 Kg de própolis recolhidos em diversas regiões e utilizou para a eluição cerca de 400 L de solventes. Isto não foi possível neste trabalho visto que a quantidade de material de partida, 25,0 g, era muito pequena e então as frações não forneciam quantidades de compostos suficientes após a secagem do solvente para se fazer um trabalho de isolamento.

Nenhuma fração obtida da cromatografia de coluna apresentou por cromatografia de camada delgada, a possibilidade de se separar um constituinte por cromatografia. Cada fração eluída continha muitos componentes. A Figura 12 mostra o cromatograma do extrato clorofórmico e a Tabela 11 mostra os compostos identificados no extrato clorofórmico desta sequência extrativa (vide Figura 11).

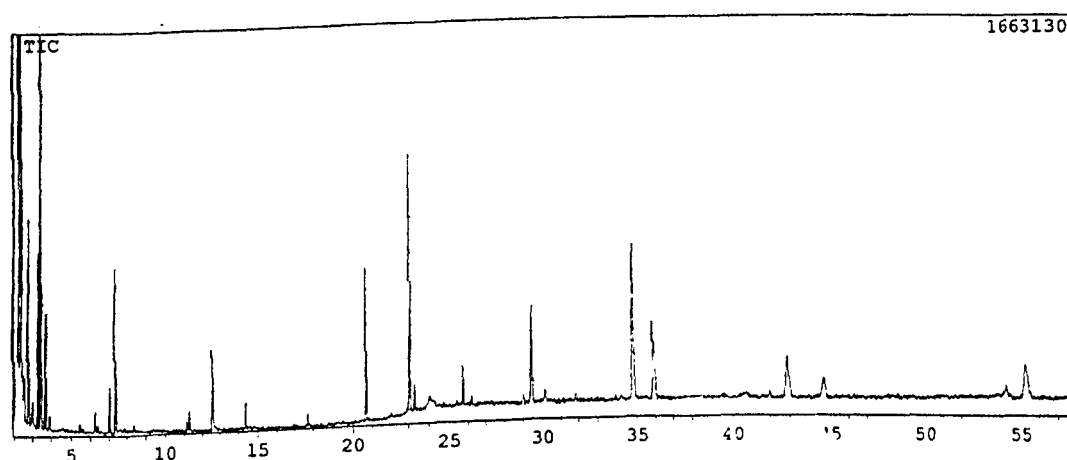


Figura 12. Cromatograma do extrato clorofórmico de própolis após extração com água e metanol

Tabela 11 – Compostos encontrados no extrato clorofórmico de própolis

Composto	Tempo de retenção (min.)
3-metóxi-3-metil-2-butanona	3.467
Ácido cinâmico	12.583
Trieicosano (C ₂₃)	29.450
Ácido elaidico	23.050
Hexadecano	25.733
Ácido palmítico	20.675

Comparando-se a Tabela 11 com as Tabelas 4 e 5, que também apresentam os resultados de cromatogramas de extratos clorofórmicos, os dois compostos que aparecem nas duas situações

são os ácidos palmítico e cinâmico. É importante ressaltar que o cromatograma mostrado na Figura 12 foi obtido após os compostos solúveis em água e metanol terem sido extraídos da amostra, o que explica o número menor de compostos encontrados no cromatograma da Figura 12 que foi obtido da análise do extrato clorofórmico sem prévia extração dos compostos solúveis em água e metanol.

Os resultados obtidos após a cromatografia em coluna da fração solúvel em acetato de etila serão apresentados a seguir, os respectivos cromatograma encontram-se no apêndice deste trabalho.

A identificação tornou-se possível a partir de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa. A fração 1 (5% de metanol) foi eluída em 3 sub-frações e foram caracterizados os seguintes ácidos: elaídico, palmítico, 3-fenil-2-propenóico, 12-metil-tetradecanóico, tridecanóico, heptadecanóico, undecanóico, araquidônico, benzóico, trans-cinâmico e cis-cinâmico; os álcoois isooctanol, 2-etil-1-hexanol, benzílico, cinamílico e neopentílico; benzaldeído, benzoato de benzila, dibutil éster do ácido carbônico, vanilina, azetidina, n-octacosano, 7-hexil-eicosano, dimetoximetano, 1,4-difenil-1,4-butanediona, trans-cariofileno, etil-butil-éter. Na fração 2 (10 % de metanol) também foi caracterizado o ácido benzóico. Na fração 3, uma cetona (4-metil-2-pentanona) e o ácido benzóico. Na fração 5 (20% de metanol) foram caracterizados os alcanos: 2,4-dimetil-pentano, tetratetracontano, dotriacontano, tritetracontano e 2,6,10,15 -tetrametilheptadecano e o ácido benzóico. Na fração 6 isobutil-etil-éter; os ácidos heptanóico, nonanóico e o capróico, o álcool neopentílico, o benzaldeído e a cetona: 2-metil-1-fenil-1-propanona. Na fração 7 também foram caracterizados o ácido benzóico e o láurico. Na fração 11 o ácido benzóico e a miricetina. Nas frações 8,9 e só o ácido benzóico. A tabela 12 apresenta os compostos identificados na fração solúvel em acetato de etila e respectivos tempos de retenção.

Tabela 12 - Compostos encontrados na fração de acetato de etila após sililação e seus tempos de retenção.

Composto	Tempo de retenção, min.
Ácido elaidico	22.992
Ácido palmítico	20.617
Ácido undecanóico	11.092
Ácido araquidônico	35.708
Ácido benzóico	7.317 (metilado); 9.950 (sililado); 8.3 (sem derivatização)
Ácido cis cinâmico	12.608
Ácido láurico	20.608
Ácido capróico	20.617
Ácido 12-metil-tetradecanóico	17.733
Ácido tridecanóico	14.558
Ácido heptadecanóico	20.692
Ácido-3-fenil-2-propenóico	15.150
Ácido nonanóico	23.233
Ácido heptanóico	20.6
Ácido trans cinâmico	13.092
Álcool benzílico	6.258
Álcool cinamílico	11.158
Isooctanol	12.4
2-etil-1-hexanol	5.983
Álcool neopentílico	5.6
Vanilina	12.842
Benzaldeído	5.2
Dibutil éster do ácido carbônico	8.408
Benzoato de benzila	18.933
Azetidina	5.550
2,4-dimetil-pentano	5.6
Dotriacontano	24.758

Tritetracontano	28.742
n-octacosano	25.742
7-hexil-eicosano	34.783
Tetratetracontano	33.258
2,6,10,15 –tetrametilheptadecano	18.317
Miricetina	19.217
Butil-etil-éter	3.792
Isobutil-etil-éter	6.375
1-fenil-2-metil-1-propanona	14.317
1,4-difenil-1,4-butanediona	23.267
Trans cariofileno	13.642

A vanilina foi o único composto comum entre os que Banskota⁽¹⁶⁾ isolou e os que foram identificados na amostra de *Eucalyptus Urophilla* estudada no presente trabalho. A metodologia de extração seguida foi a mesma mas não foi possível, no presente trabalho, identificar os mesmos compostos. Banskota isolou derivados prenilados do ácido cinâmico, neste trabalho foi possível encontrar, em muitas frações, o próprio ácido cinâmico e alguns de seus derivados não prenilados(compostos prenilados não constam do banco de dados do aparelho utilizado).

Algumas frações não apresentaram pico que não fosse do eluente e dos reagentes utilizados na derivatização . A alternativa para estas frações pode ser a utilização de CLAE.

III.2.4.3 – Estudo do resíduo insolúvel após extração com água, metanol e clorofórmio

Um fato que mereceu atenção foi uma porção razoável de amostra que permaneceu insolúvel nos solventes extratores utilizados.

O resíduo final, da extração de massa igual a 9,0 g e aparência de um pó marrom muito fino apresentou um teor de cinzas de 5,70 % e teor de umidade de 3.94 %.

- **Análise por cromatografia de permeação em gel, após acetilação:**

A Figura 13 mostra o resultado obtido da distribuição de massas molares do resíduo analisado. O cromatograma mostra que a maior parte das moléculas deste resíduo correm entre 35 e 45 minutos e têm uma massa molar média (Mw) de 1283 Da.

Uma pequena fração das moléculas elui antes de 35 minutos e tem Mw igual a 3802 Da. Outra fração elui após 45 minutos e tem baixa massa molar. Ghisalberti⁽⁵⁾ faz referência à existência de uma fração insolúvel em água e solventes orgânicos formada por material polimérico.

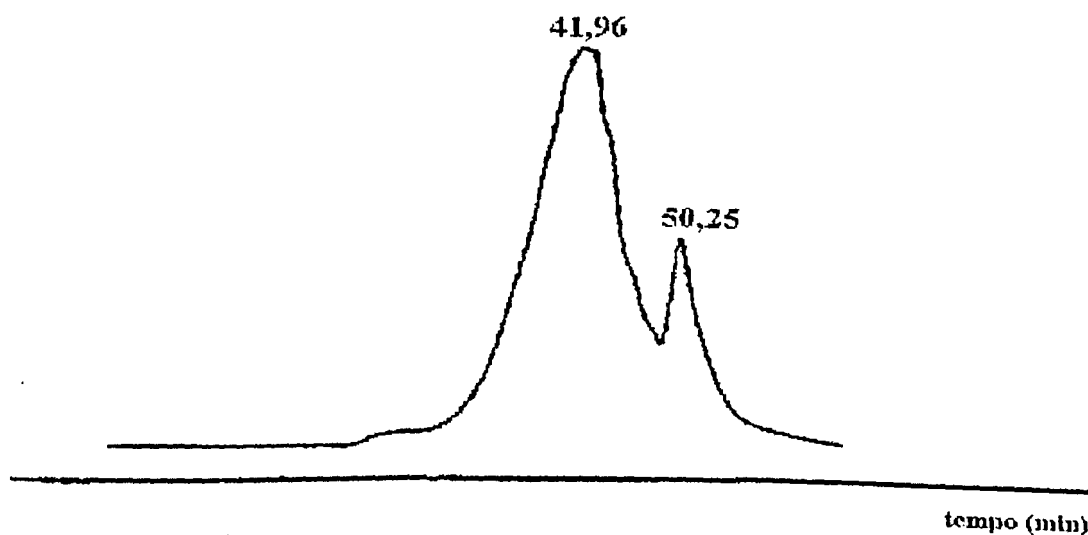


Figura 13 - Cromatograma de GPC do resíduo acetilado

- **Espectroscopia no infravermelho**

O espectro no infravermelho do resíduo está apresentado na Figura 14; as bandas mais importantes são apresentadas na Tabela 13.

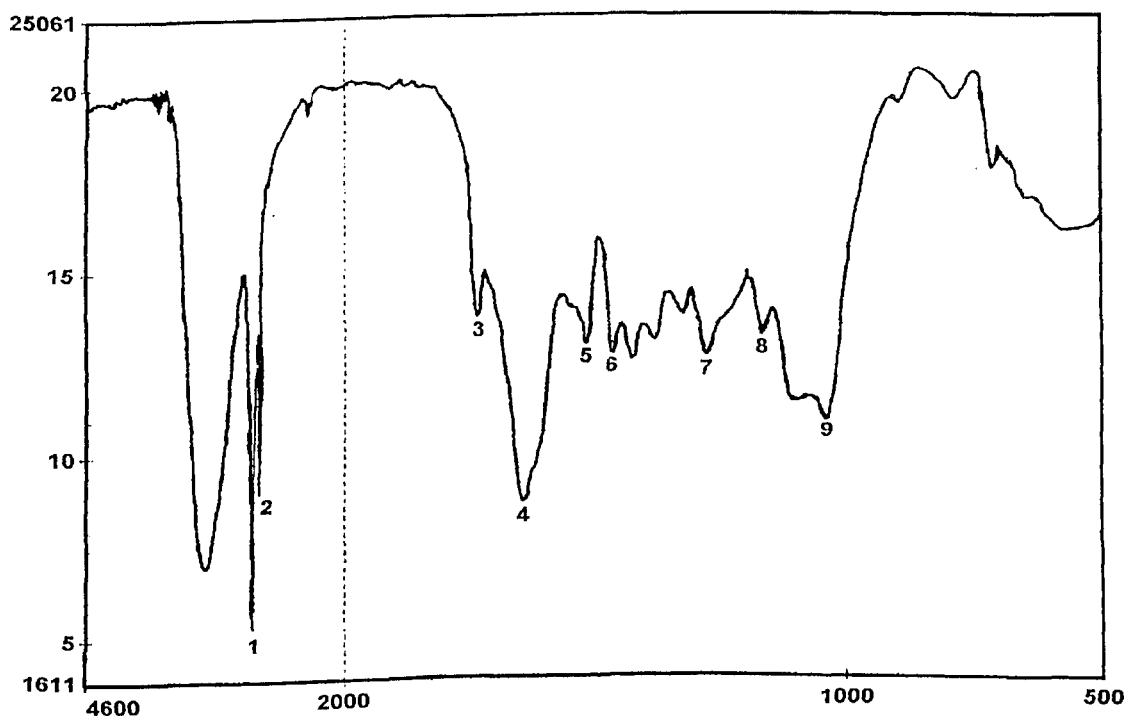


Figura 14. Espectro no infravermelho do resíduo final da extração

Tabela 13 – Bandas mais características do espectro da Figura 14

Frequência, cm^{-1}	Grupos característicos
3380.14	Estiramento de OH
2918.2	Estiramento C-H
2849.49	
1736.73	Estiramento C=O de ésteres saturados alifáticos
1644.16	Vibrações do esqueleto
1517.04	Aromático
1463.19	Deformação antissimétrica do grupo CH_3 e CH_2 (degenerada)
1425.37	Deformação CH_2
1378.42	Deformação CH_3
1238.6	Estiramento C-O
1114.34	
1040.35	Estiramento C-O de álcoois

A espectroscopia no infravermelho sugere pelas bandas apresentadas na figura 14 que o resíduo contém grupos fenólicos e alcoólicos, ésteres e compostos alifáticos.

Além de Ghisalberti⁽⁵⁾, nenhum outro autor fez referência ao estudo de caracterização deste resíduo. A técnica de infravermelho dá sua contribuição para que junto com as outras técnicas empregadas seja possível uma aproximação da constituição deste resíduo.

- Ressonância Magnética Nuclear de Carbono¹³

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear do C^{13} no estado sólido (figura 15) confirma os resultados da espectroscopia no infravermelho. Assim, abaixo de 35 δ se observam os sinais de carbono alifáticos, entre 55 e 80 δ estão os sinais de carbonos oxigenados, entre 105 e 145 δ estão os sinais de C=C e entre 160 e 175 δ se vêem os sinais de C=O de ésteres. Além destes grupos, a RMN do C^{13} mostra outros grupos não observados na espectroscopia no IV, que são os devidos aos C-N de aminoácidos e proteínas (~50 δ), aos C-1 de carboidratos (por volta de 100 δ) e C=O de amidas e ácidos (entre 165 e 175 δ). A RMN permite garantir também que não há OH fenólico pois há ausência de sinais entre 145 e 155 δ do carbono quaternário ligado a OH.

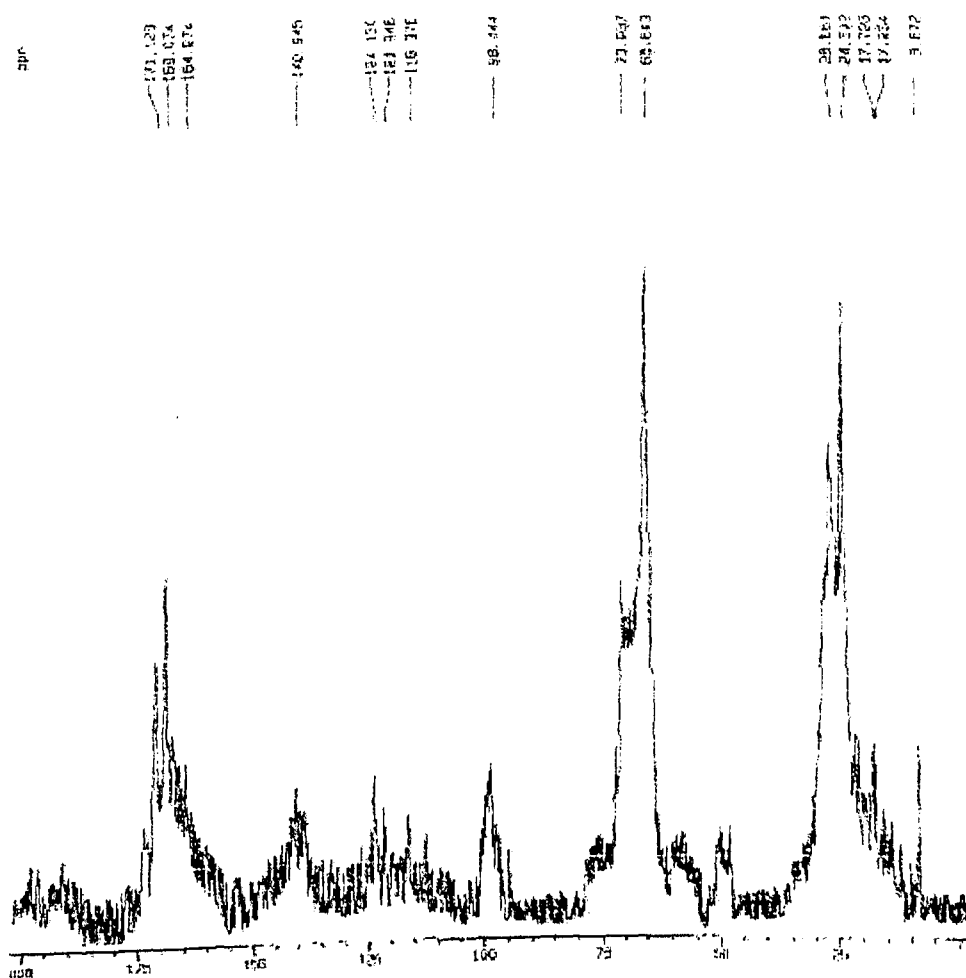


Figura 15 – RMN de C^{13} do resíduo insolúvel.

- Análise Elementar

A análise elementar apresentou os valores de C,H,N e O mostrados na tabela 14. O teor de nitrogênio pode indicar a presença de aminoácidos na amostra, Marcucci⁽¹⁰⁾ determinou e quantificou 18 aminoácidos em 4 amostras de própolis brasileiras, sendo que uma delas é de eucalipto reflorestado de outra espécie que não o *Urophilla*. Os dezoito aminoácidos estavam presentes nas quatro amostras. Nenhum aminoácido foi identificado por CG/EM durante a execução deste trabalho. Carboidratos apresentam um teor de carbono por volta de 50%, flavonóides entre 60 e 70%. Desta forma, os dados obtidos das análises para este resíduo não são

concludentes quanto à sua constituição. Segundo Charkov⁽³⁶⁾, o teor de proteína, se todo o nitrogênio corresponder a proteínas, é dado pela porcentagem de nitrogênio obtido na análise elementar multiplicado por 6,24. Desta forma o resíduo final apresentaria uma quantidade de proteínas e aminoácidos num total de 11,94% .

Tabela 14 - Resultados da análise elementar do resíduo final

	1	2	Média (%)
C	51,78	52,36	52,07
H	7,57	7,56	7,56
N	1,80	2,03	1,91
O	38,85	38,05	38,45

Difração de raios X

As cinzas que foram analisadas eram oriundas da amostra de própolis em duas situações distintas. A primeira foi obtida da amostra no estado natural e continha fundamentalmente cálcio e silício, segundo análise de difração dos raios X (Figura 16) .

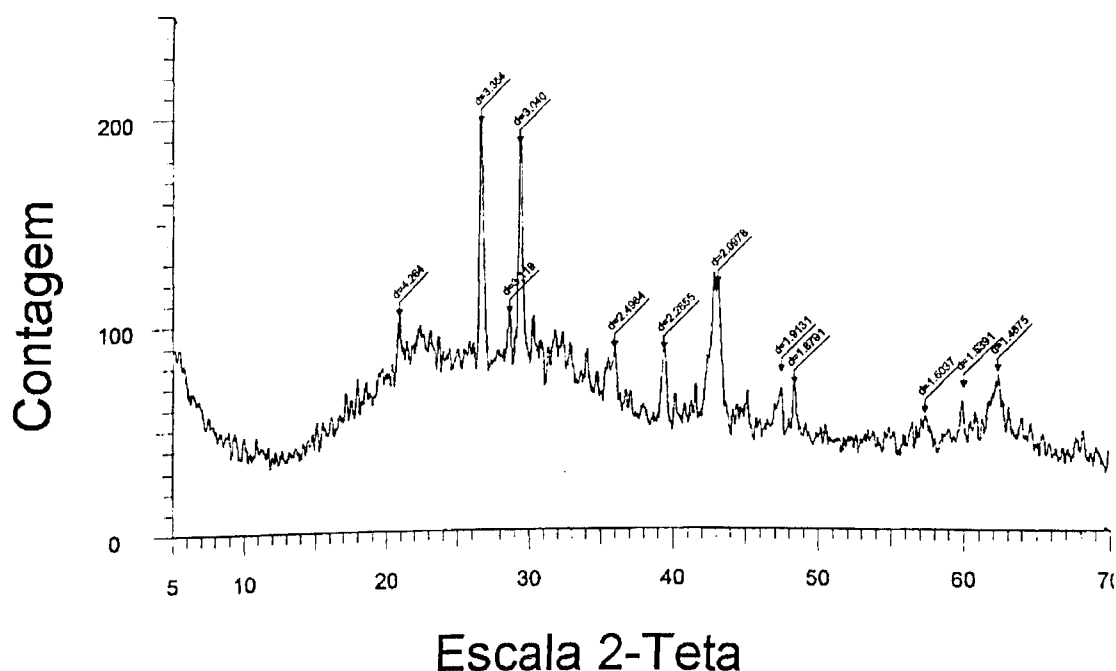


Figura 16 . Espectro de difração de raio x da cinza obtida da amostra no estado natural

A segunda cinza analisada foi obtida do resíduo final da extração de Banskota e neste estágio, a amostra continha somente silício. Observava-se que as etapas extrativas retiraram os componentes inorgânicos que continham cálcio (Figura 17).

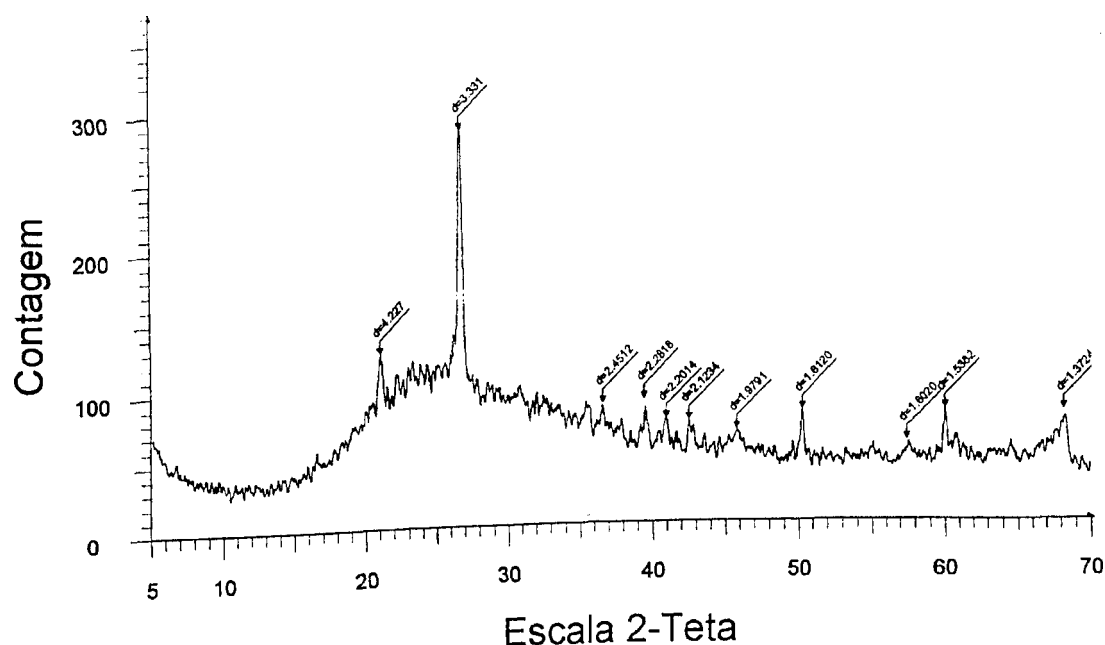


Figura 17. Espectro de difração de raios X da cinza obtida do resíduo final

Stafilov e Kulevanov⁽³⁷⁾ já haviam encontrado cálcio e silício em amostras de própolis utilizando técnica de absorção atômica. Marcucci⁽³¹⁾ cita outros elementos inorgânicos como constituintes da própolis: cobre, manganês, ferro, alumínio e vanádio.

III.2.5 – Análise da resina

III.2.5.1 – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

A tabela 15 apresenta os resultados da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa dos extratos sililados e os respectivos cromatogramas podem ser vistos no apêndice deste trabalho. Os compostos identificados não foram encontrados na própolis, com exceção dos flavonóides que aparecem em ambas as amostras. Este fato confirma a importância dos flavonóides para as abelhas e por outro lado, mostra que a análise do extrato aquoso da

resina (não realizada) é muito importante para efeito de comparação.

Tabela 15 – Componentes identificados nos extratos da resina

Solvente	Tempo de Retenção (min.)	Composto
	3,733	hidroxiacetona
Clorofórmio		
Clorofórmio	5,825	1-metil-dietilamina
Clorofórmio	21,125	ácido tânico
Acetato de etila	5,792	N-acetil-glicina
Acetato de etila	4,167	α -D-galactopiranosídeo
Acetato de etila	15,142	Flavonóide (?)
Metanol	3,225	Etil éster da L-alanina
Metanol	4,625	1-amino-2-propanol
Metanol/água	3,167	Neopentanediol
Metanol/água	4,167	α -D-galactopiranosídeo
Metanol/água	4,625	N,N-dimetil-formamida
Metanol/água	5,167	Flavonóide (?)
Metanol/água	8,025	ácido butanóico
Metanol/água	21,100	ácido tânico

O açúcar encontrado na resina não foi detectado na amostra de própolis. Como o primeiro solvente da rota extrativa foi água, os açúcares que normalmente se encontram na própolis e não foram detectados na amostra analisada provavelmente se encontravam no extrato aquoso que não foi estudado.

O ácido tânico detectado na resina não foi encontrado nos extratos da própolis.

O éster etílico da L-alanina, um aminoácido já citado pela literatura como componente da própolis, também não foi detectado na amostra estudada mas encontra-se presente na resina e pode ser detectado por CG/EM. A análise elementar do resíduo final da

extração de Banskota detectou a presença de nitrogênio em pequena quantidade. O espectro no infravermelho, tabela 13, deste mesmo resíduo, também apresentou uma banda característica da ligação carbono-nitrogênio, o que pode sugerir a presença de aminoácidos na amostra de própolis estudada, além de outros grupos de compostos que contém este tipo de ligação.

III.2.5.2 – Teores de fenóis totais e flavonóides no extrato metanólico

Para a determinação do teor de fenóis totais da resina foi utilizado o método de Folin-Ciocalteu. A figura 18 apresenta a curva de calibração obtida para o ácido gálico. Utilizando a equação da reta apresentada na figura 18, foi calculado um teor de 9,87 g de fenóis expressos como equivalentes de ácido gálico por 100 g de resina.

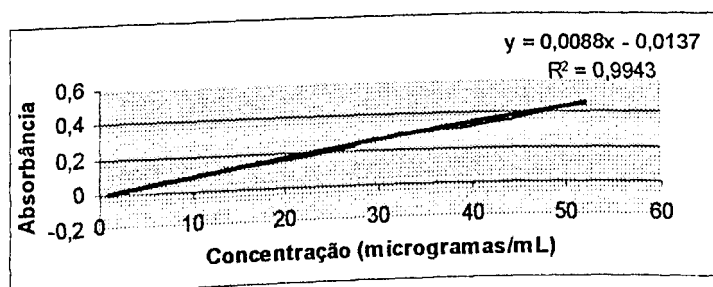


Figura 18 – curva de calibração para o ácido gálico

O teste de determinação do teor de flavonóides foi feito utilizando-se o método do complexo alumínio – quercetina. A figura 19 apresenta a curva de calibração obtida para este complexo. O teor de flavonóides determinado como equivalentes de quercetina encontrado foi de 10,94 g de flavonóides por 100 g de resina.

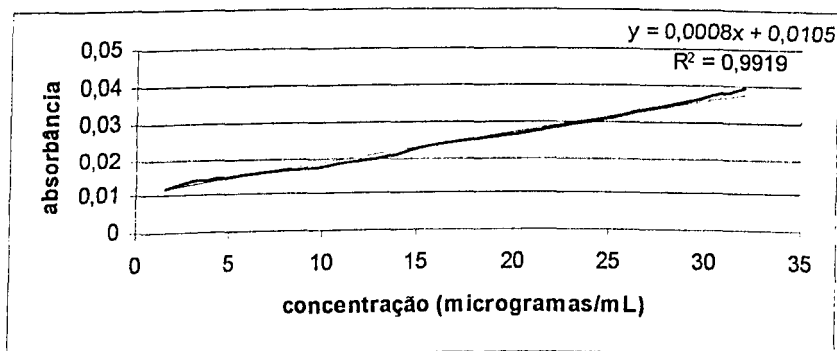


Figura 19 – curva de calibração para o complexo alumínio quercetina.

IV- Discussão dos Resultados

A amostra de própolis analisada pode ser considerada como uma amostra peculiar. Os dados obtidos até a presente data a colocam como uma amostra que reúne características de muitas outras amostras de diversas regiões do País e do mundo. Os dados que confirmam esta afirmação são os componentes encontrados como constituintes químicos da própolis e os teores de cinza = 2,54%, resíduo seco livre de voláteis = 94,93%, de voláteis = 5,07% e de cera = 29,35%. Estes dados já foram citados para outras amostras de própolis.

Um dado curioso na avaliação dos teores de fenóis totais e de flavonóides é o fato destes teores estarem abaixo dos teores encontrados para amostras de própolis de Eucalipto do Estado de São Paulo. Talvez se a avaliação do teor de quercetina for feita por HPLC como sugere Maia⁽²²⁾, o teor de flavonóides encontrado possa ser um valor mais próximo do real, outros autores como Bankova⁽³⁵⁾ afirmam que realmente o teor de flavonóides em amostras de própolis brasileiras é realmente um valor baixo.

Uma particularidade que vem sendo encontrada na própolis brasileira em relação a própolis européia é a predominância dos ácidos fenólicos nas amostras brasileiras. Talvez seja este o fato que desperte tanto interesse do mercado internacional em relação a própolis produzida no Brasil.

Na determinação de flavonóides não é possível contar com os dois mil compostos conhecidos nesta classe, até o momento, como padrões. Por isso a análise torna-se extremamente complexa e ou até mesmo impossível. Durante o desenvolvimento deste trabalho foram injetados cerca de cinquenta padrões de compostos fenólicos no cromatógrafo gasoso acoplado à um espectrômetro de massa do laboratório de química da madeira do Instituto de química desta universidade. A tabela 16 apresenta os padrões adicionados ao aparelho utilizado durante a execução deste trabalho e os tempos de retenção de cada padrão.

Tabela 16 – padrões adicionados ao cromatógrafo gasoso e seus respectivos tempos de retenção

Nome	Tempo de retenção (min)
Citronela	15,4
L(+) Arabinose	16,1
D(+) galactose	19,7
Siringaldeído	17,7
Ácido siríngico	20,3
Ácido gálico	20,9
Robinetina	21,1
Flavanona	22,3
Crisina	23,4
Rutidina	24,6
Canferol	28,9
Pinocembrina	30,7
Quercetina	33,3
Ácido elágico *	35,0
Crisina	35,2
(iso)Sakuranetina	38,9
Flavona	39,9

Naringina (crisina)	40,4
Sakuranetina	40,8
Epicatequina	42,1
Naringenina	42,3
Catequina	43,1
Prunetina	45,5
Apigenina	56,1
Ácido Clorogênico	60,5
Quercetina	65,1
Miricetina	71,8
Fisetina *	30.0
Crisina *	23.0
Flavona *	18.0
Ácido tânico *	15.0

* coluna DB1

Existe, contudo, a limitação inerente a própolis de eucalipto. Apesar do eucalipto ter sido citado como fonte de própolis na América do Sul e de ser conhecido como um bom pasto apícola, Bankova e colaboradores⁽²⁰⁾, em um recente trabalho, compararam que compostos ácidos aromáticos presentes na resina de *Eucalypto citriodora* não são os ácidos aromáticos presentes na própolis, com exceção do ácido p-cumárico e do ácido cinâmico. Na amostra analisada neste trabalho foi verificada a presença de outros composto existentes na madeira de eucalipto como: ácido benzóico, vanilina e o ácido cinâmico. Ainda foi detectada a presença dos ácidos palmítico, oleico, elaídico, esteárico, tetracosanóico, behênico, isobutírico, lático, undecanóico, araquidônico, capróico, 12-metil-tetradecanóico, heptadecanóico, 3-fenil-2-propenóico, nonanóico e heptanóico.

A amostra estudada não apresentou uma boa variedade de compostos voláteis se comparada com outras amostras estudadas por Bankova⁽¹²⁾. Deve-se observar, contudo, que ela não estudou amostras brasileiras e que a amostra estudada no presente trabalho se encontra compatível com as amostras brasileiras estudadas, originadas de pasto apícola semelhante, por Woisky⁽¹⁹⁾ quanto aos teores de voláteis.

A amostra estudada apresentou um resíduo insolúvel que corresponde à 38% da massa total da amostra. Constituído de carbonos alifáticos e oxigenados, duplas ligações e ésteres caracterizados por infravermelho e confirmados por RMN de C^{13} . Além de ligações C-N, C-1 de carboidratos e grupos carboxilas de amidas e ácidos que não puderam ser observados pela espectroscopia no infravermelho. A RMN de C^{13} permitiu ainda dizer com certeza que não há OH fenólico na constituição deste resíduo.

V – Conclusões

A amostra de própolis, proveniente de uma floresta artificial de *Eucalyptus Urophylla* situada nas proximidades de Uberlândia, no Triângulo Mineiro, mostrou-se altamente complexa. Através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa foi possível identificar os seguintes compostos:

Ácidos: cinâmico, trans cinâmico, palmítico, oleico, benzóico, esteárico, tetracosanóico, behênico, isobutírico, lático, elaídico, undecanóico, araquidônico, láurico, capróico, tridecanóico, heptadecanóico, 3-fenil-2-propenóico (ciscinâmico), nonanóico e heptanóico.

Álcoois: nonacosanol, heptadecilglicerol, glicerol, propileno glicol, benzílico, neopentílico, cinamílico, isooctanol e 2-etil-1-hexanol.

Aldeídos: 3,4-diidróxibenzaldeído (protocatecualdeído) e vanilina.

Ésteres: cinamato de benzila, benzoato de benzila, benzoato de fenila e dibutil éster do ácido carbônico.

Hidrocarbonetos: 2,2-dimetil-3,5-decadieno, 11,20-dideciltriacontano, pentadecano, heptadecano, triecosano, hexadecano, 2,4-dimetil-pentano, dotriacontano, tritetracontano, 2,6,10,15-tetrametilheptadecano, 7-hexil-heicosano, noctacosano, tetratetracontano e trans-cariofileno.

Cetonas: benzil-fenil-metanona, 3-metóxi-3-metil-2-butanona, 2-metil-1-fenil-1-propanona e 1,4-difenil-1,4-butanediona.

Éteres: butil-etil-éter e isobutil-etil-éter.

O resíduo insolúvel que corresponde à 38% da massa total da amostra está constituído fundamentalmente por polímeros alifáticos e aromáticos que contêm as funções álcool e éter. Esta caracterização foi feita utilizando as técnicas de infravermelho e ressonância

magnética nuclear de C^{13} no estado sólido. Pouco se encontrou na literatura a respeito da caracterização deste resíduo que não fosse quanto ao tamanho de suas partículas.

O presente estudo, tentando relacionar exsudato da madeira e própolis foi o que forneceu o maior número de constituintes identificados além de ser o pioneiro neste tipo de caracterização.

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa não é a técnica mais indicada para análise de flavonóides, embora a técnica de injeção direta no espectrômetro de massas esteja evoluindo muito nos últimos anos. Contudo, foi possível identificar os flavonóides pinocembrina e miricetina (cujos espectros de massas foram adicionados juntamente com os de outros padrões à biblioteca do aparelho).

O extrato aquoso, onde seguramente se encontram alguns flavonóides, será analisado por cromatografia líquida numa outra dissertação como continuidade deste trabalho.

Considerando-se os componentes acima mencionados, muitos não constam de artigos que servem de referência ao estudo da própolis. São eles ácidos láctico, eláidico, undecanóico, capróico, tridecanóico, nonanóico e heptanóico; álcoois heptadecilglicerol, propileno glicol, neopentílico, isooctanol e 2-etil-1-hexanol; dos ésteres benzoato de fenila e carbonato de dibutila; alcanos 2,2-dimetil-3,5-decadieno, 11,20-dideciltriacontano, pentadecano, heptadecano, hexadecano, 2,4-dimetilpentano, tritetracontano, 2,6,10,15-tetrametilheptadecano, 7-hexil-heicosano, n-octacosano e tetracontano; cetonas benzil-fenil-metanona, 3-metóxi-3-metil-2-butanona, 2-metil-1-fenil-1-propanona e 1,4-difenil-1,4-butanediona; e éteres: butil-etil-éter e isobutil-etil-éter.

A análise quantitativa tradicional da própolis aqui estudada apresentou os seguintes resultados: substâncias voláteis = 5,0688%, cinzas = 2,54%, resíduo seco livre de voláteis = 94,9312%, cera = 29,35%, fenóis totais: 3,4g por 100g de própolis e flavonóides 0,121

g por 100 g de própolis. Estes resultados indicam que a amostra estudada se encontra dentro dos parâmetros que qualificam a própolis como de boa qualidade. O teor de cera encontra-se acima dos teores encontrados para amostras brasileiras do interior de São Paulo e sul deste País, mas dentro de parâmetros citados por Asis⁽³⁰⁾ para amostras de própolis da América Central. A baixa quantidade de flavonóides encontrada pelo método adotado no presente trabalho não justifica o alto preço da própolis mineira no mercado internacional. No entanto, concentrações de flavonóides obtidas por cromatografia líquida têm sido maiores⁽²²⁾. Isto sugere que a análise da fração aquosa, não realizada neste trabalho, pode dar uma resposta definitiva a esta questão.

A análise dos extratos em clorofórmio, acetato de etila, metanol e metanol/água da resina permitiu a identificação dos seguintes compostos: hidroxiacetona, 1-metil-dietilamina, ácido tânico, α -D-galactopiranosídeo, dois flavonóides não identificados, N-acetilglicina, estil éster da L-alanina, 1-amino-2-propanol, neopentanediol, N,N-dimetilfomamida e ácido butanóico.

Não houve concordância entre os compostos da própolis e da resina, a não ser alguns flavonóides que não puderam ser identificados. Os teores de fenóis totais e flavonóides obtidos para a resina são muito superiores aos encontrados para a amostra de própolis, muito provavelmente estes compostos passam por um processo degradativo durante a elaboração da própolis pelas abelhas.

VI - BIBLIOGRAFIA

- 1- Vanhaelen, M. and Vanhaelen-Fastré, R.; Propolis I. Origine, micrographie, compositio chimique et activité therapeutique. J. Pharm. Belg. 34, pp 253-269, 1979 a.
- 2-Rohwedder,D; Hausteen, B.H.; Propolis. Taschenbuch Verlags Gmbh , Berlim, 1987
- 3-Markham, K. R.; Mitchell, K. A.; Wilkins, A. L.; Daldy, J. A.; LU, Y.; HPLC and CG-MS identification of the major organic constituents in New Zeland propolis. Phytochemistry, vol. 42, n1, pp. 205-211, 1996.
- 4-Miyataka, H.; Nishiki, M.; Matsumoto, H.; Fijimoto, T.; Matsuka, M.; Satoh,T. Evaluation of propolis. I. Evaluation of Brazilian and physico-chemical methods. Biol. Pharm. Bull.; vol.20, n.5, p.496-501, 1997
- 5-Ghisalberti, E. L. Propolis: a review. Bee World, v.60,n.2, p.59-84, 1979.
- 6-Ackermann, T. Fast chromatographic study of propolis crudes. Food Chem., v.42, n.2,p.135-8, 1990
- 7-Walker,P.; Crane, E.; Constituents of propolis. Apdologie, v.18, n.4, p.327-334, 1987.
- 8-Garcia-Viguera, C.; Ferreres, F.; Tomás - Barberán, F. A.; Study of canadian propolis by CG-MS and HPLC. z.Naturforsch. 48c, 731-735 (1993).

- 9-Christov,R.; Bankova,V.; Popov,S.; Volatile constituents of propolis. *Z.Naturfosch.* 49c, 6-10,1994.
- 10 – Marcucci, M. C.; De Camargo, F. A.; Lopes, C.M. A.; *Z.Naturfosch.* 1996, 51C, 000.
- 11-Greenaway,W.;May,J;Scaysbrook,T.; Whatley, F.R. Identification by Gas-Chromatography-Mass spectrometry of 150 coumpounds in Propolis. ,*Z.Naturfosch.* 46c, 111-121 (1991).
- 12-Christov,R.;Bankova,V.; Gas chromatographic analysis of underivatized phenolic constituents form propolis using na electron-capture detector. *Journal of Chromatography*,623 (1992)182-185,Amsterdam
- 13-Kinsella, J. E.; Frankel, E.; German, B., Kanner, J.; Possible mechanisms for the protetive role of antioxidants in wine and plant foods. *Food Tecnology*, 85-89, abril,1993.
- 14-Maia, A. B. R. A.; Nelson, D. L.; Alcici, N. M. F. Estudo dos flavonóides da própolis. III. Separação por cromatografia em camada delgada. In: *ENCONTRO REGIONAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA*, 11, 1997 c , Lavras. Livro de resumos
- 15-Maia, A. B. R. A.; Nelson, D. L.; Alcici, N. M. F. Estudo dos flavonóides da própolis. I. Comparação de métodos e dosagem. In: *ENCONTRO REGIONAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA*, 11, 1997 a, Lavras. Livro de resumos.

- 16-Maia, A. B. R. A.; Nelson, D. L.; Alcici, N. M. F. Estudo dos flavonóides da própolis. II. Seleção de solventes extratores. In: ENCONTRO REGIONAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 11, 1997 b , Lavras. Livro de resumos.
- 17-Banskota,H.A.; Tezuka, Y.; Prassain, J. K.; Matsushige,K.; Saiki,I.; Kadota,S.; Chemical constituents of Brazilian Propolis and their cytotoxic Activities. J.Nat.prod., 1998, 61, 896-900.
- 18-Maia, A. B. R. A.; Nelson, D. L.; Mattos, L. M.; Alcici, N. M. F.; Hidrólise ácida de extratos de própolis. livro de Resumos do 12º Encontro Regional da SBQ – MG realizado em Ouro Preto de 28 a 30 de outubro/98.
- 19-Woisky, R. G.; Salatino, A .; Analysis of propolis and procedure for chemical quality control. J. Apic. Res., 1998, 37(2): 99-105.
- 20 - Mattos, L. M.; Métodos de análise de flavonóides e atividade antioxidante da própolis. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia UFMG, 2000. 87p. (Dissertação, Mestrado em ciência de alimentos).
- 21-Matsuno,T.A.; Matsumoto Y; A New Benzopyrano derivative isolated from propolis. Z. Naturforsch. 53c,103 D 1039 (1998).
- 22-Bankova,V; Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from São paulo state. Z. Naturforsch 54c, 401D405 (1999).
- 23-Pereira, A S; Ramos, M. F. S; Poças, E. S. C; Dias, P. C. M; Santos, E. P; Silva, J. F. M; Cardoso, J. N; Neto, F. R.A; study of

propolis by high temperature high resolution gas cromathography – mass spectrometry. Z. Naturforsch. 54c 395D400 (1999).

24-Maia, A. B. R. A.; Nelson, D. L.; Mattos, L. M.; Dosagem de quercetina em própolis. Trabalho apresentado no Simpósio Brasileiro sobre própolis e apiterápicos. Franca, SP, 1999

25-Markham, K. R.; Techniques of Flavonoid identification. , Academic Press, 1982

26-Price, M.L.; Butler, L.G.; Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. J. Agric. Food Chemistry , vol 25, No 6, 1977

27 – Allinger, N. L. et al.; Química Orgânica, Guanabara Dois, Segunda edição, 1985.

28-Waterman, P.G.; Mole, S.; Analysis of phenolic plant metabolites. Blackwell Scientific Publications; London, UK, 1994.

29-Deutscher Apotheker Verlag; Deutsches Arzneibuch. Gorgivelag GmbH; Stuttgart, Germany, 1978.

30-Procedings of The XXII Meeting of The United States Pharmacopeia , United States Pharmacopeial Convention Inc; Rockville, USA, 1990.

31-Asís, M.; Apiterapia para todos. Colecion Behique. Editorial Científico-técnica. La Habana, Cuba

- 32-Marcucci, M.C.; Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. Química nova , v.19, n.5, p.529-536, **1996**
- 33 - Bianchi, G; Waxes: chemistry, molecular biology and functions. Oily Press; Dundee, UK.
- 34-Bankova, V; Popov, S; Marekov, N.L; High-performance liquid chromatographic analysis of flavonoids from propolis. Journal of chromatography 242 (1):135-143, **1982**.
- 35-Bonhevi, J.S; Coll, F. V.V; Phenolic composition of propolis from China and South America. Zeitschrift fur Naturforschung, section C 49 (11/12): 712-718, **1994**.
- 36 – Przytyk, E.; Pereira, A. S.; Castro, S. L.; Bankova, V.; Neto, F. R. A.; Estudo sistemático de flavonóides em própolis Búlgara por cromatografia gasosa de alta resolução e alta temperatura – espectrometria de massas. Livro de resumos da 23^a reunião anual da Sociedade Brasileira de Química. Poços de Caldas, maio de **2000**.
- 37 - Charkov, V.I.; Sapotnick, S. A. ; Dmitrieva, O. P. e Tumanov, I.S. ; Tecnologia das indústrias de hidrólise. Moscou, Ed. Ind. Florestal, **1973**
- 38 - Stafilov, T.; Kulevanova, S.; Determination of some trace elements in propolis by atomic absorption spectrometry. Anal. Lab., V.3, n. 4, p. 270-274, **1994**.

VI - Apêndice

VI.1 – Figura 01. Espectro de raio x das cinzas obtidas da amostra natural

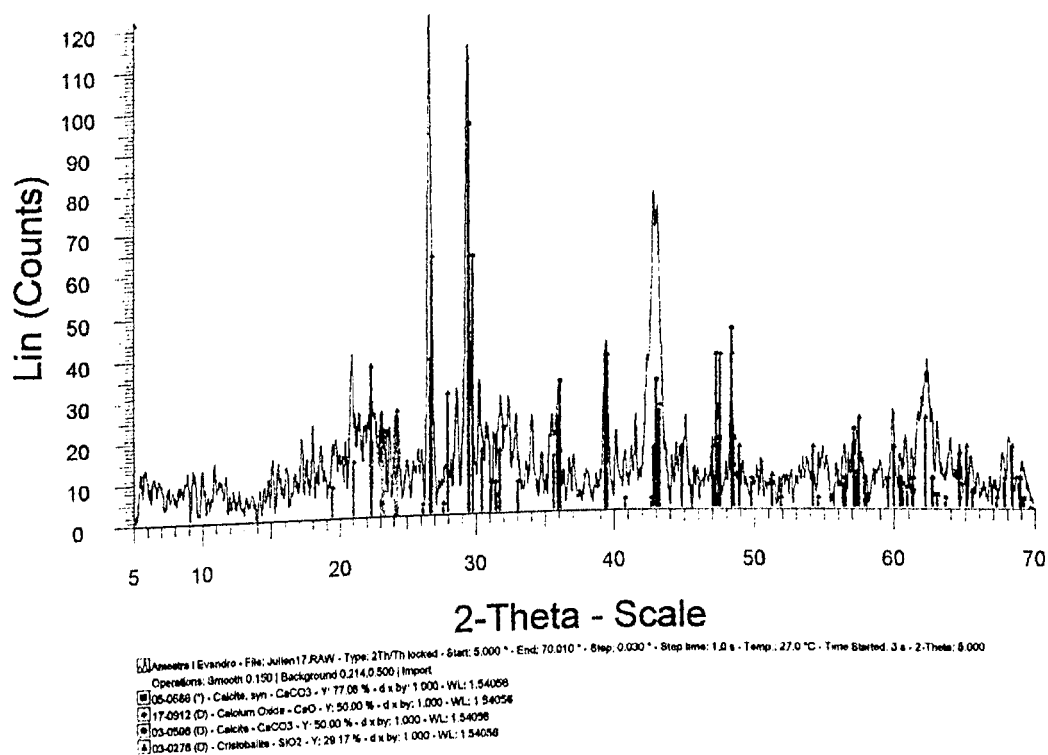
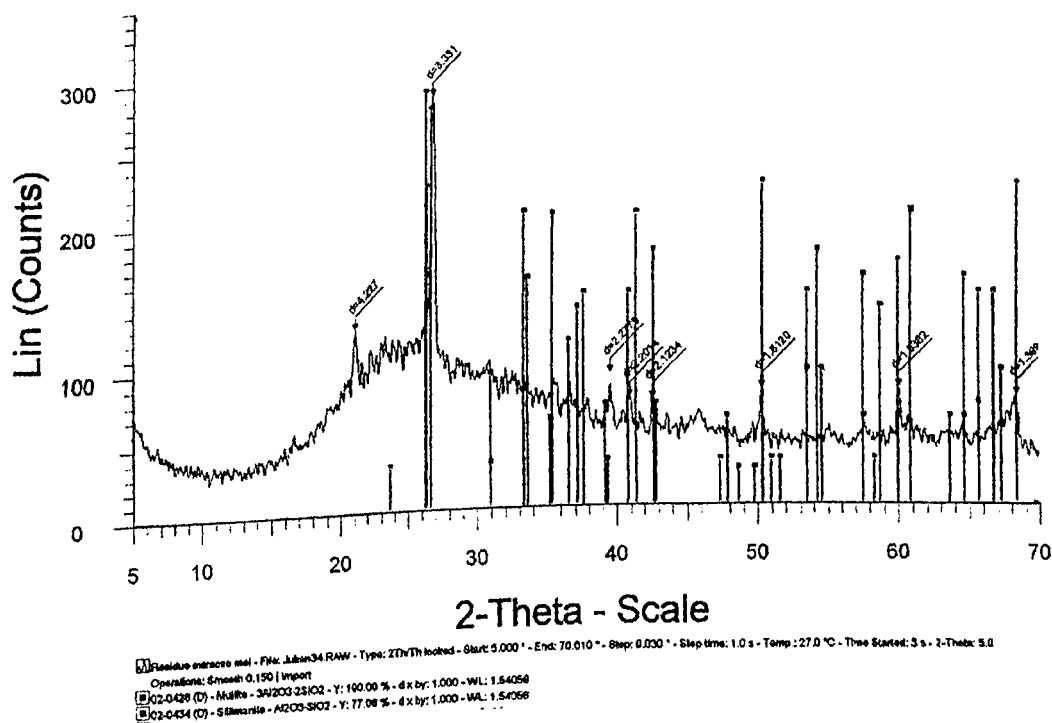


Figura 02. Espectro de raio x das cinzas obtidas do resíduo final da amostra natural



VI.2 – Cromatogramas das frações recolhidas após separação dos compostos do extrato metanólico seco em coluna de sílica gel

Figura03. Cromatograma da fração 1 em clorofórmio

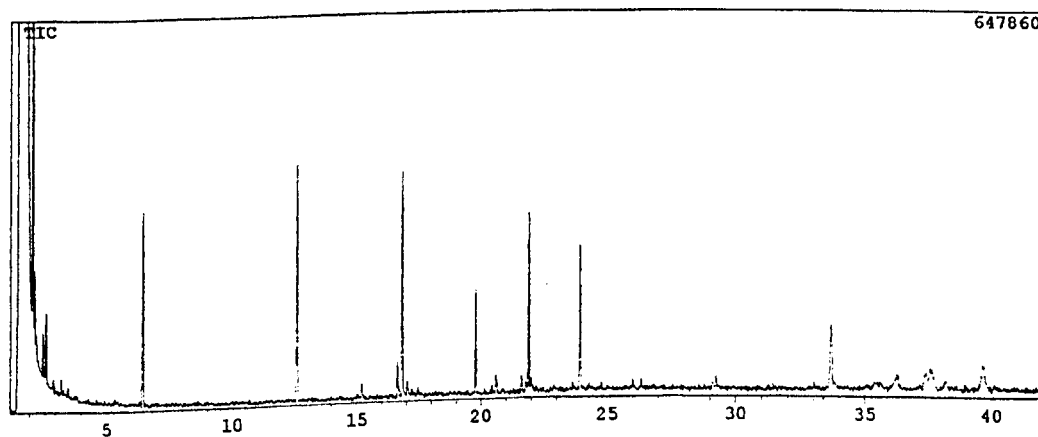


Figura04. Cromatograma da fração 6 em clorofórmio

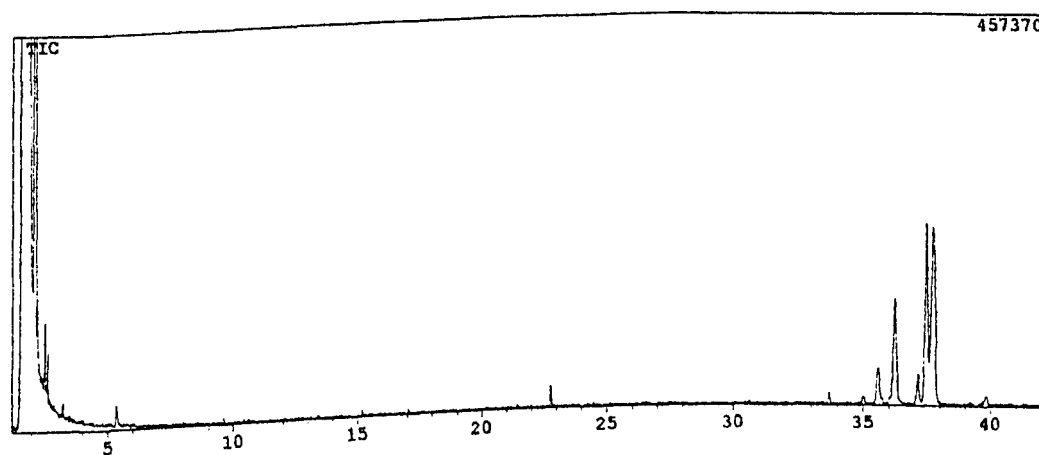


Figura05. Cromatograma da fração 10 em clorofórmio

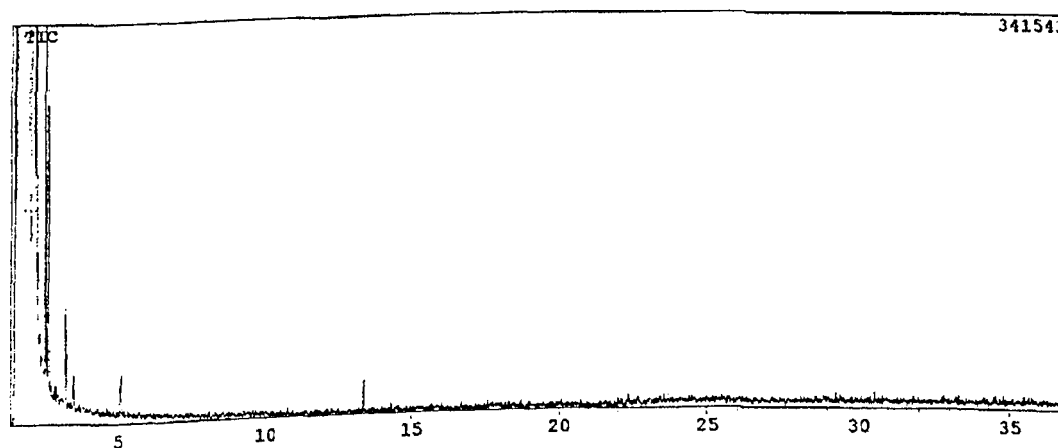


Figura06. Cromatograma da fração 17 em clorofórmio

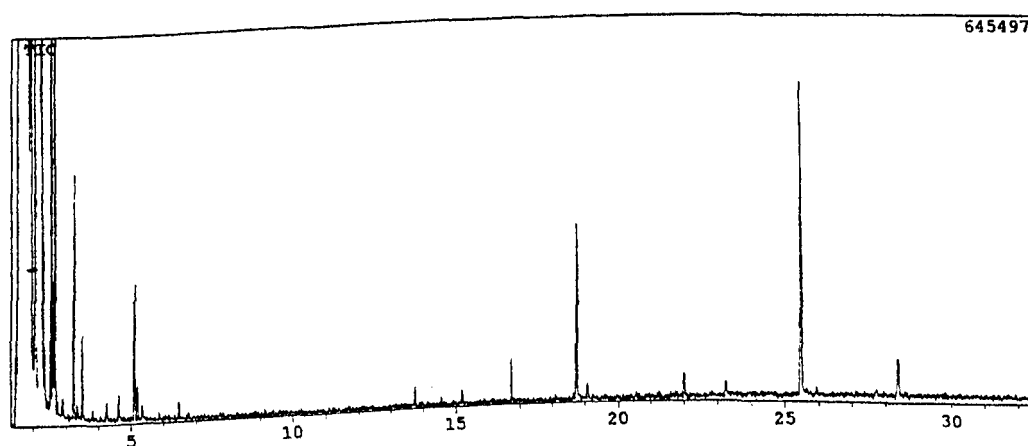


Figura07. Cromatograma da fração 3 em acetona

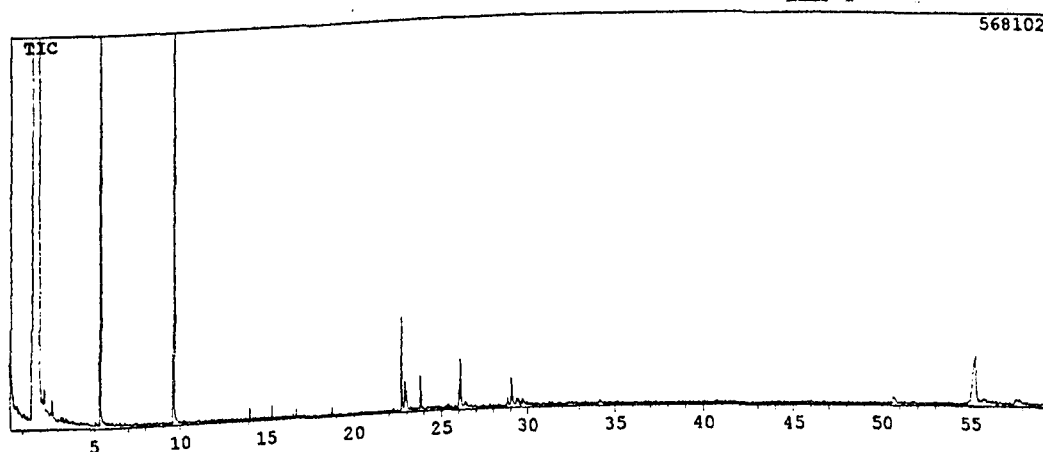


Figura08. Cromatograma da fração 2 em metanol

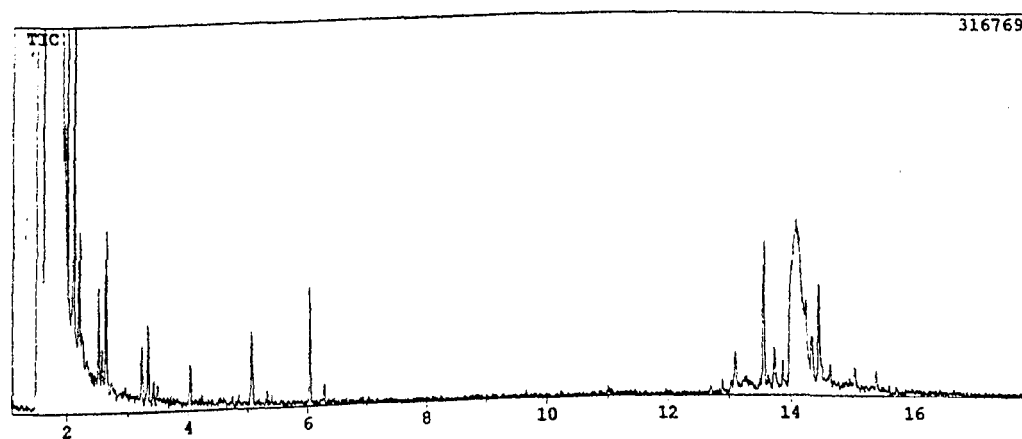


Figura09. Cromatograma da fração 7 (final) recolhida em metanol

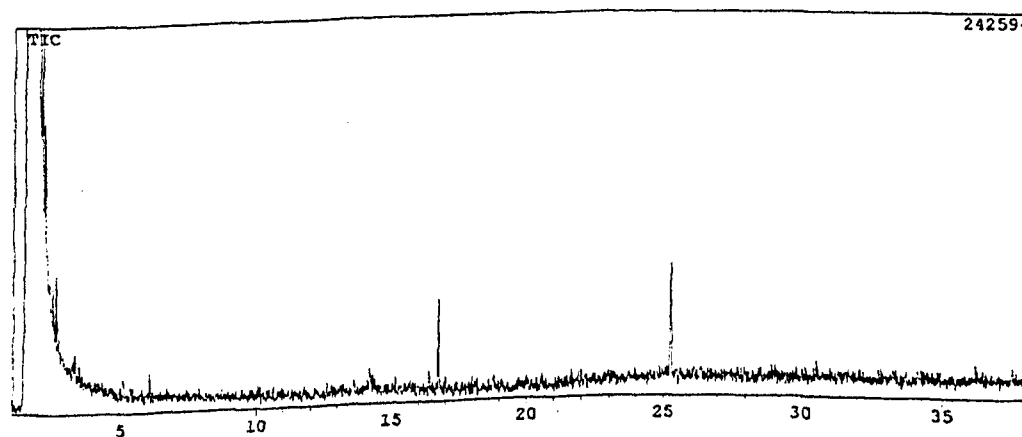


Figura10. Cromatograma do produto isolado da fração 17 em clorofórmio

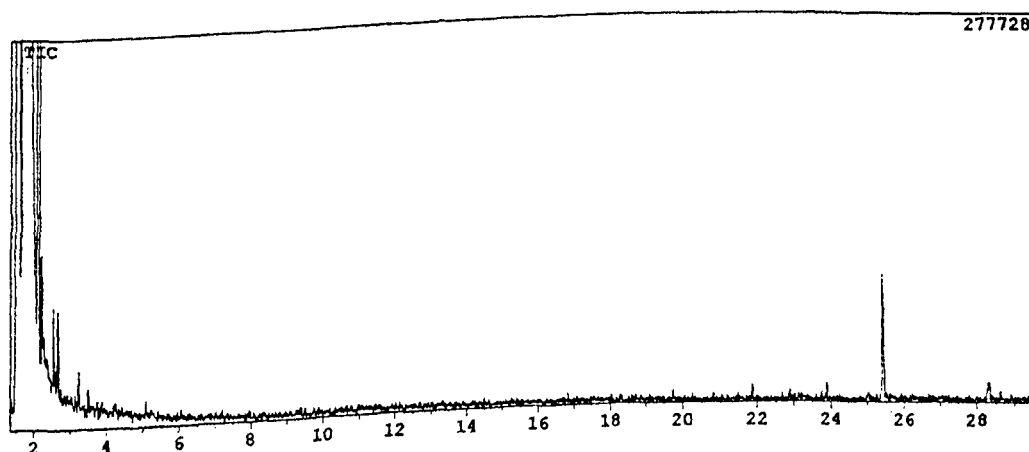


Figura11. Cromatograma do precipitado da fração 3 em acetona

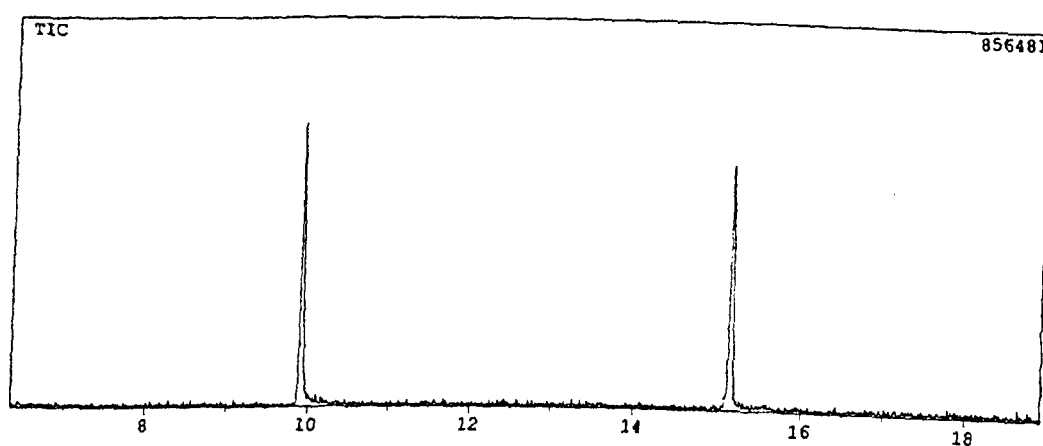


Figura12. Precipitado da fração 1 em clorofórmio

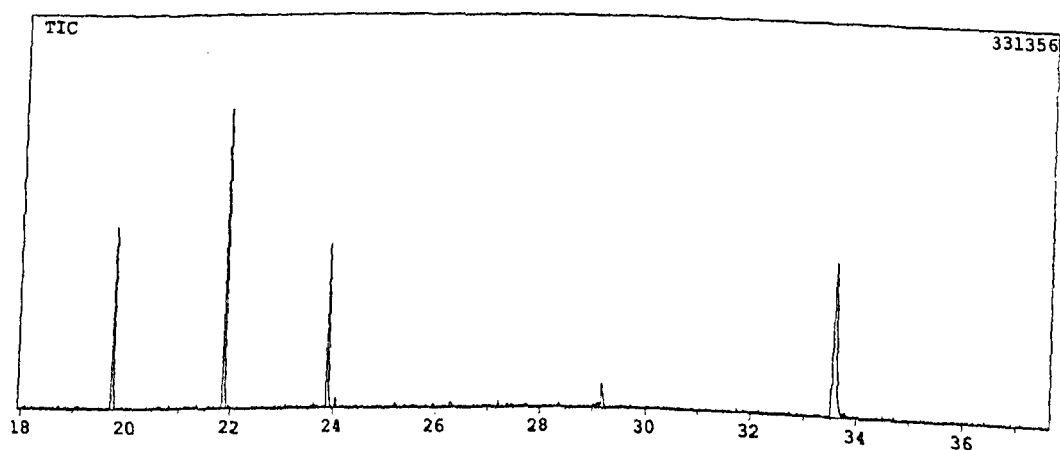
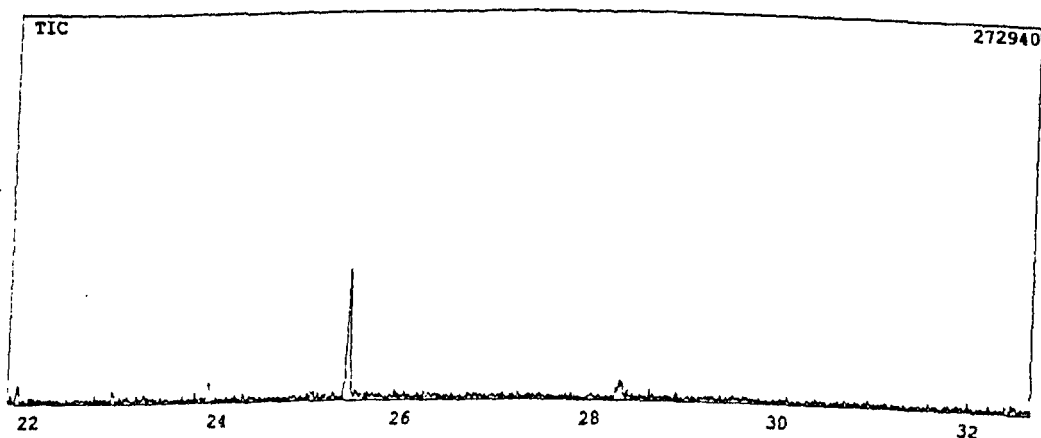


Figura13. Cromatograma do produto isolado da fração 17 (em clorofórmio)



VI.3 – Cromatogramas das frações recolhidas após separação dos compostos do extrato metanólico solúveis em acetato de etila

Figura14. Cromatograma da fração 1; gradiente de eluição 5% de metanol em clorofórmio.

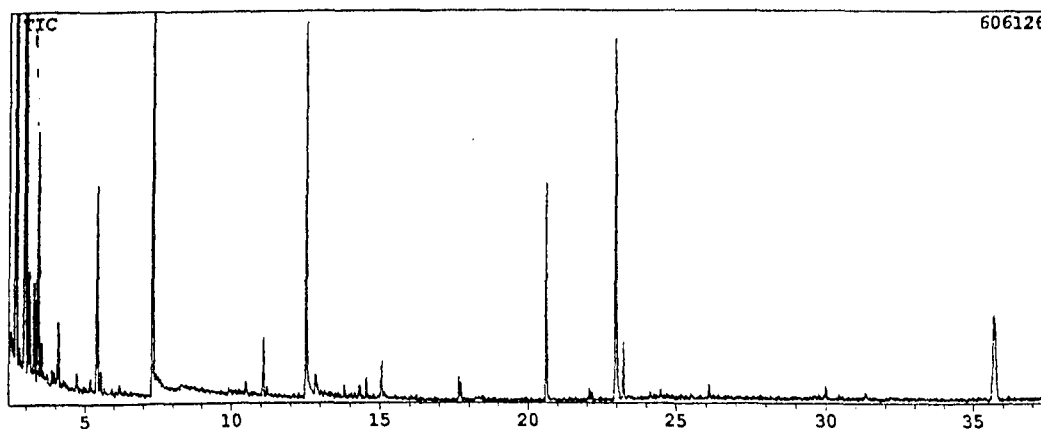


Figura15. Cromatograma da fração 1.1; gradiente de eluição 5% de metanol em clorofórmio.

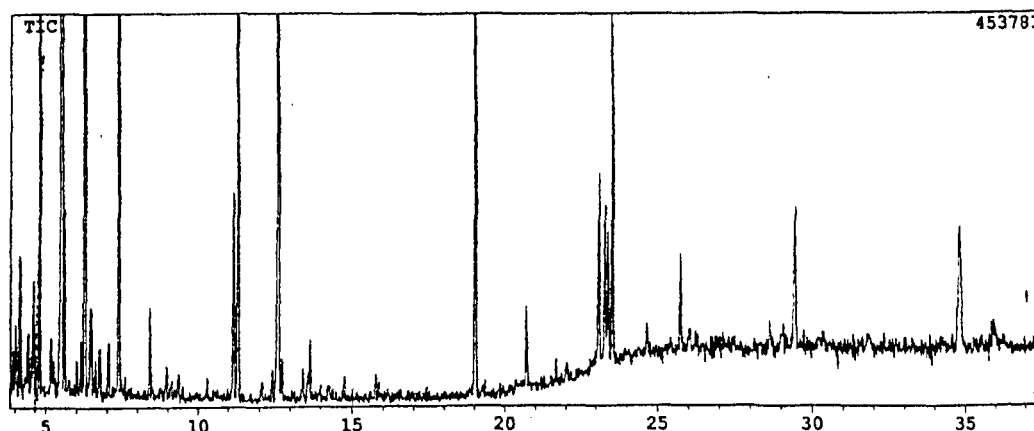


Figura16. Cromatograma da fração 1.2; gradiente de eluição 5% de metanol em clorofórmio.

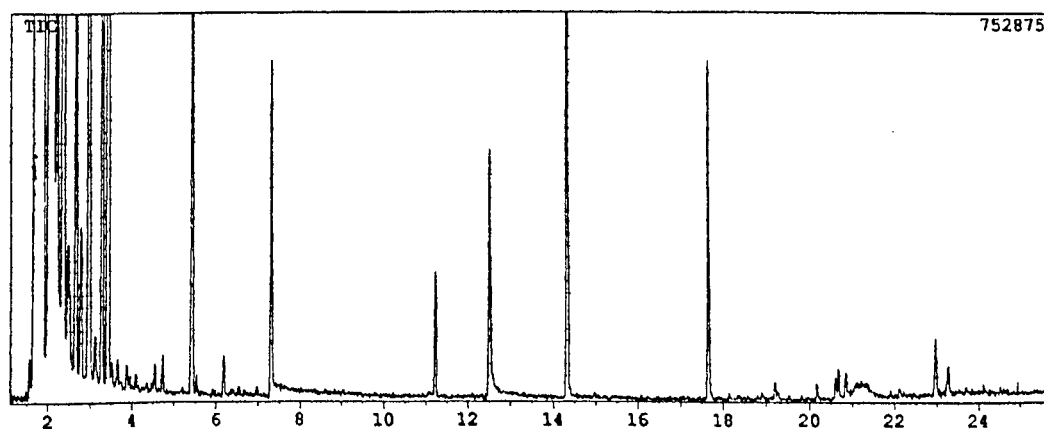


Figura17. Cromatograma da fração 2; gradiente de eluição 10% de metanol em clorofórmio.

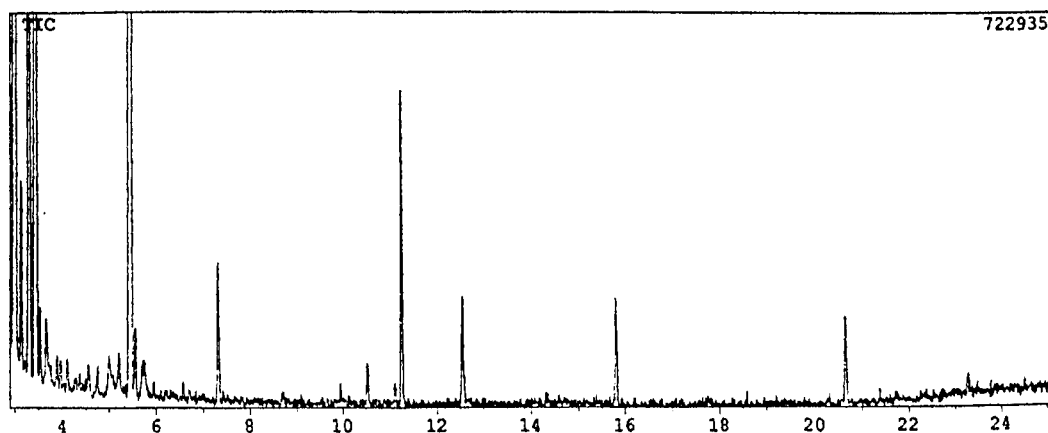


Figura18. Cromatograma da fração 3; gradiente de eluição de metanol em clorofórmio.

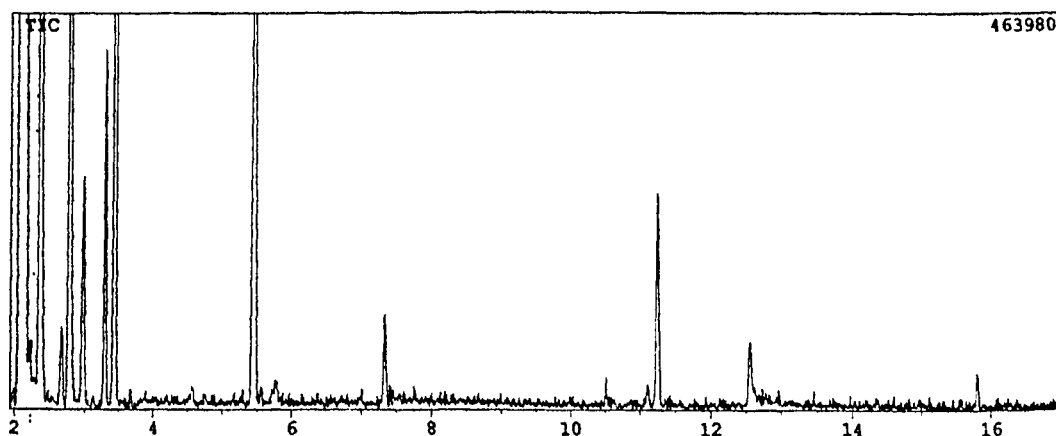


Figura19. Cromatograma da fração 4; gradiente de eluição de metanol em clorofórmio.



Figura20. Cromatograma da fração 5; gradiente de eluição 20% de metanol em clorofórmio.

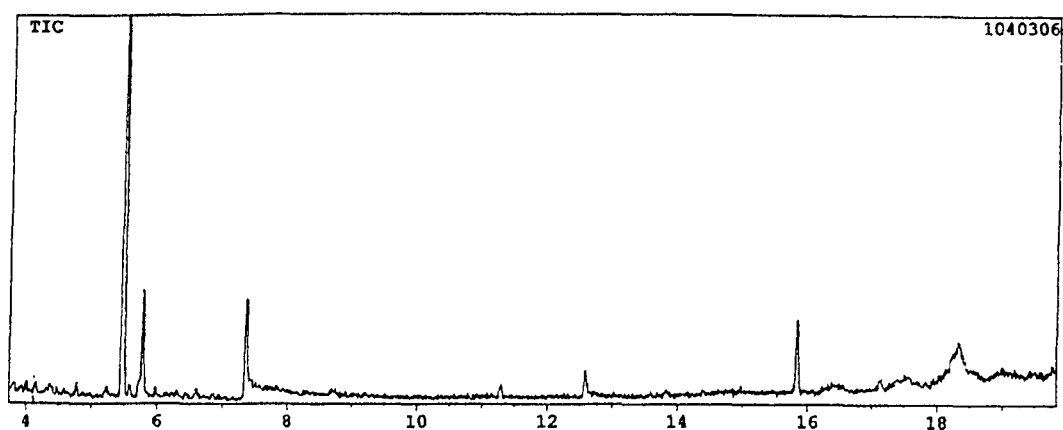


Figura21. Cromatograma da fração 6; gradiente de eluição 20% de metanol em clorofórmio.

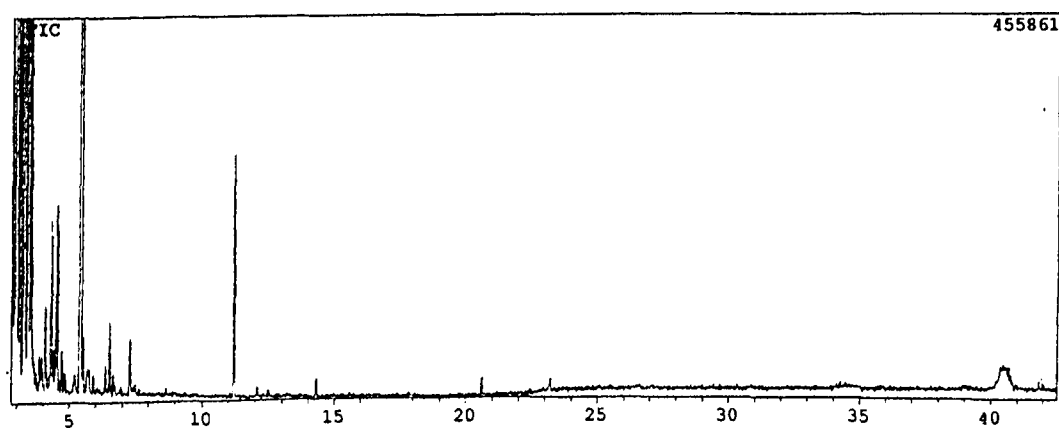


Figura22. Cromatograma da fração 7; gradiente de eluição 30% de metanol em clorofórmio.

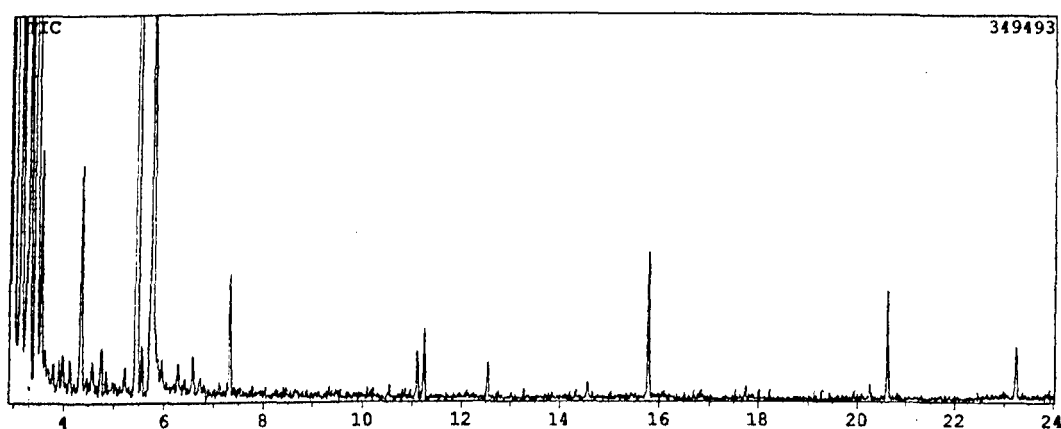


Figura23. Cromatograma da fração 8; gradiente de eluição 40% de metanol em clorofórmio.

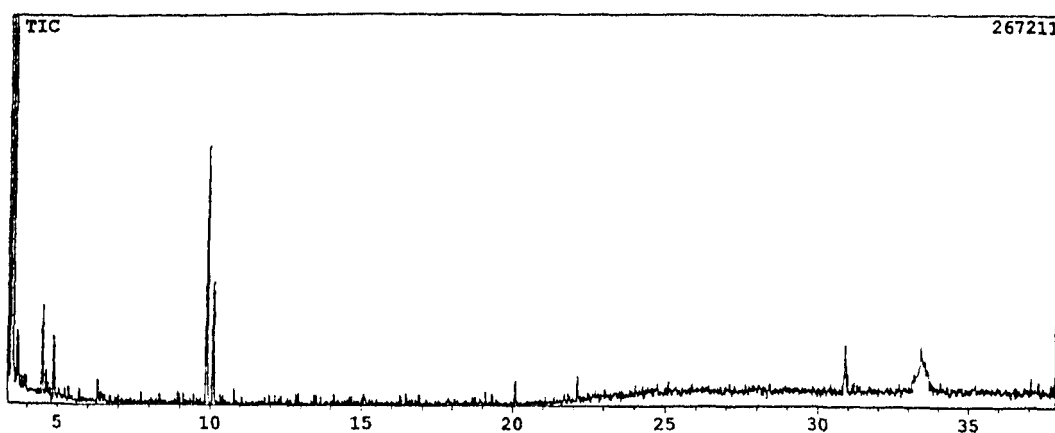


Figura24. Cromatograma da fração 9; gradiente de eluição 50% de metanol em clorofórmio.

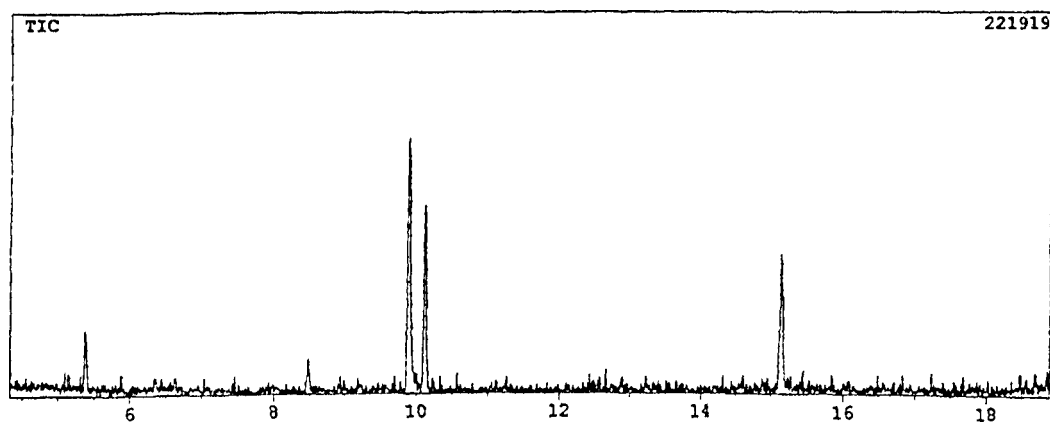
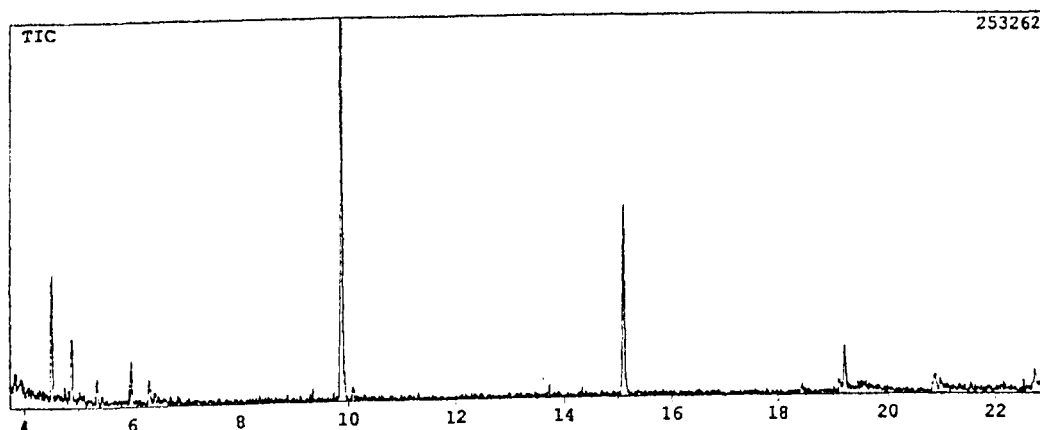


Figura25. Cromatograma da fração 11; 100% em metanol



VI.6 – Cromatogramas das análises da resina

Figura26. Cromatograma da extração da resina em clorofórmio

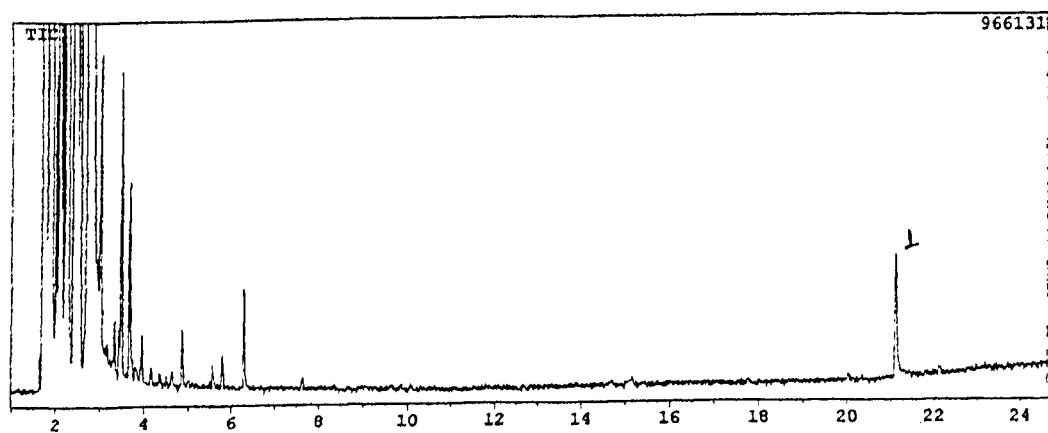


Figura27. Cromatograma da resina extraída em acetona

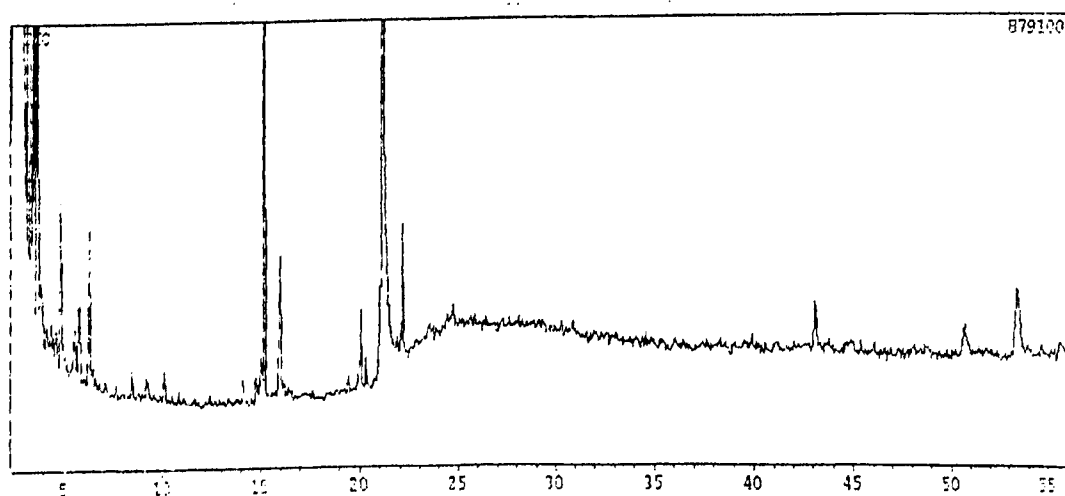


Figura28. Cromatograma da resina extraída em metanol

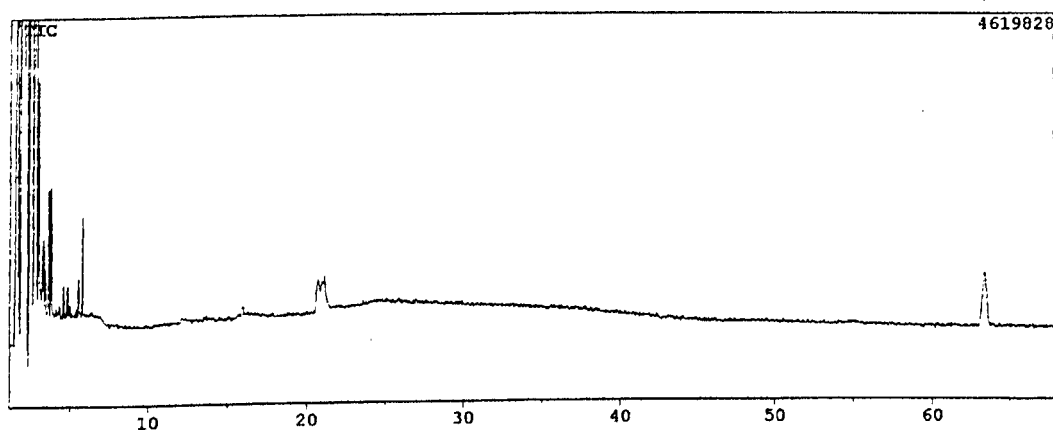


Figura29. cromatograma da resina extraída em metanol/água 1:1

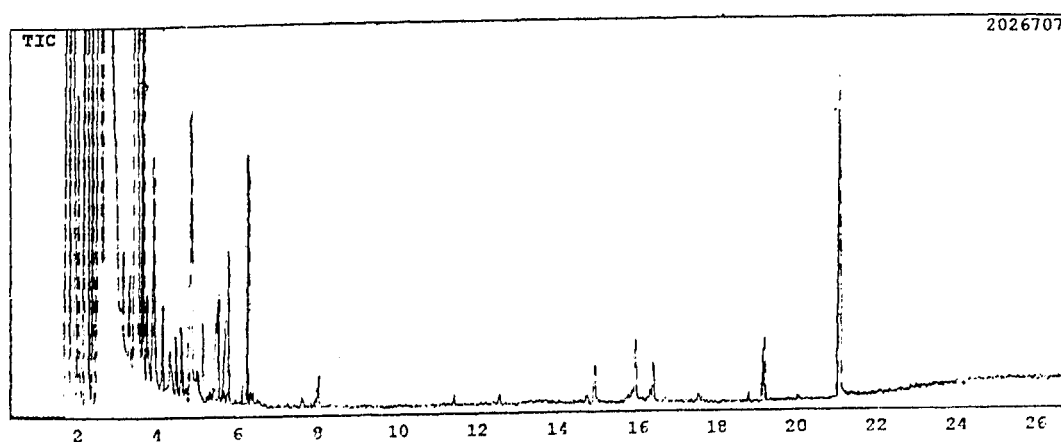


Figura30. Cromatograma da resina extraída em acetato de etila

