

**Estudo Químico de
Própolis do Estado de
Minas Gerais**

**ROBERTO CHANG
(2005)**

UFMG-ICEx/DQ.619

T. 238^a

ROBERTO CHANG

*Estudo Químico de Própolis do Estado de Minas
Gerais*

- Tese apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Doutor em Ciências – Química.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Belo Horizonte
2005**

Chang, Roberto
DQ.0619 Estudo Químico de Própolis do Estado de Minas Gerais. Belo
2005 Horizonte: UFMG/ICEx/Química, 2005.
T238^a 126f.:il.

Orientador: Evandro Afonso do Nascimento
Co-orientadora: Dorila Piló-Veloso
Tese UFMG/ICEX/Química

1 – Própolis verde.
2 – Análise química.
3 – Marcador Químico.
I-Título II-Autor III-Orientador

Obs:

Número fornecido pela biblioteca
Pontos de acesso: produzido em conjunto com o usuário/pesquisador.

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Evandro Afonso do Nascimento, por seu raciocínio científico, perseverança, boa vontade e ajuda, sem a qual este trabalho não teria sido possível.
- À Profa. Dorila Piló-Veloso por sua ajuda nos questionamentos referentes a este trabalho, pela oportunidade e confiança.
- Ao Prof. Sérgio Afonso de Moraes por sua ajuda e conselhos na execução dos ensaios.
- Aos Apiários Mackllani (Santa Bárbara), Girassol e Santa Rita (Uberlândia), Alecrim Dourado (Perdões), Naturapis (Divinópolis), Santinha (São Gotardo) e Cia da Abelha (Contagem) e aos apicultores Ana Paula Veiga (Nepomuceno), João Batista de Almeida (Carrancas), Júnior Reis Souto (Coromandel), pelas amostras fornecidas.
- Ao Prof. Francisco Radler de Aquino Neto (UFRJ) pelas análises de CGAR-AT-EM.
- Ao Prof. Edson Rodrigues Filho e ao colega Rodrigo Facchini Magnani (UFSCAR) pelas análises de CLAE/EM.
- Ao Prof. Carlos Fontana (UFPR) pelas análises microbidas.
- À María Concepción García-Vallejo e ao INIA (Madri) pelas análises de CG/EM e CLAE.
- Ao Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia pela infra-estrutura para a parte experimental.
- Ao técnico Ildo Borges do IQUFU pela ajuda nas análises.
- À minha esposa Jacqueline e minha filha Maria Clara pela paciência e compreensão.
- Às alunas de iniciação Débora Costa Reis e Rafaela Karin, aos colegas da equipe e do laboratório, e a todos que colaboraram de alguma maneira neste trabalho.
- Ao CNPq por minha bolsa durante as disciplinas que cursei.
- À minha família e a Deus que sempre me guiou.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	IV
SUMÁRIO	V
ABREVIATURAS.....	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	X
ÍNDICE DE TABELAS	XIII
RESUMO	XVI
ABSTRACT	XVII
INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 1 - VISÃO GERAL SOBRE A PRÓPOLIS E SEUS ESTUDOS QUÍMICOS.....	2
CAPÍTULO 2 - MATERIAIS E APARELHAGEM	13
2.1. Reagentes utilizados	13
2.2. As amostras de própolis	14
2.3. Descrição de aparelhos e condições de análise CG/EM	15
2.4. Extrator do tipo SDE (“Simultaneous Distillation Extractor”).....	16
2.5. Cromatografia Gasosa de Alta Resolução em Altas Temperaturas acoplada à Espectrometria de Massas (CGAR-AT-EM).....	18
2.6. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	18
2.6.1. CLAE (UFU).....	19
2.6.2. CLAE (INIA).....	19
2.6.3. CLAE/EM com ionização química à pressão atmosférica (HPLC-APCI-MS/MS).....	20
2.7. Análise Elementar CHN.....	21
2.8. Análise por Infravermelho	21
2.9. Análise por Ultravioleta	22

CAPÍTULO 3 – METODOLOGIA	22
3.1. A rota de extração da própolis	22
3.2. Preparação dos extratos de própolis	24
3.3. Separação dos constituintes da própolis por cromatografia em coluna	24
3.4. Análise da própolis bruta.....	25
3.4.1. Determinação da quantidade de cera	25
3.4.2. Determinação da quantidade de cinzas.....	26
3.4.3. Determinação dos componentes voláteis.....	26
3.4.4. Resíduo seco das substâncias voláteis	27
3.5. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) e Cromatografia gasosa de alta resolução em altas temperaturas acoplada à espectrometria de massas (CGAR-AT-EM).....	27
3.5.1. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM)	27
3.5.1.1. Preparação das amostras	27
3.5.2. Cromatografia Gasosa de Alta Resolução em Altas Temperaturas acoplada à Espectrometria de Massas (CGAR-AT-EM).....	29
3.5.2.1. Preparação das amostras e derivatização	29
3.5.2.2. Derivatização das frações cromatográficas	29
3.6. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	30
3.6.1. Preparação das amostras de própolis	31
3.6.2. Preparação dos padrões de isoflavonas	31
3.6.3. Identificação dos compostos.....	31
3.6.4. Comparação com banco de dados de compostos fenólicos.....	32
3.7. Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com ionização química à pressão atmosférica (HPLC-APCI-MS/MS)	36
3.7.1. Preparação das amostras.....	36
3.8. Ensaio de atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos de própolis em bactérias patogênicas.....	36
3.9. Análise elementar CHN do resíduo final da rota de Banskota	37
3.10. Análises Espectrofotométricas	37
3.10.1. Ensaio de determinação do teor de fenóis totais.....	38
3.10.2. Ensaio para determinação do teor de flavonóides em equivalentes de quercetina.....	38
3.10.3. Determinação de atividade antioxidante com DPPH	39
3.10.4. Espectroscopia no Infravermelho do resíduo final da rota de Banskota	39

3.11. Comparação dos perfis cromatográficos obtidos por CG/EM dos extratos em diclorometano da folha e broto de alecrim-do-campo (<i>Baccharis dracunculifolia</i>) e de diversas amostras de própolis brasileiras.....	40
3.11.1. Coleta e Preparação das amostras.....	40
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES	40
4.1. Análise da própolis bruta.....	41
4.1.1. Determinação da quantidade de cera	41
4.1.2. Cinzas	41
4.1.3. Porcentagens dos óleos essenciais das amostras PSB e PSG	42
4.1.4. Resíduo seco das substâncias voláteis	42
4.2. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) e Cromatografia Líquida de alta Eficiência (CLAE) da Própolis Marrom (ME) e a Resina de Eucalipto (RE)	42
4.2.1. CG/EM	43
4.2.2. CLAE.....	45
4.3. Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas	49
4.3.1. Análise do óleo essencial da amostra PSB	49
4.3.2. Análise do óleo essencial da amostra PSG.....	51
4.3.3. Análise do óleo essencial da flor de assa-peixe.....	52
4.3.4. Análise do óleo essencial da flor de eucalipto.....	54
4.3.5. Análise do óleo essencial da folha de maria-preta	55
4.3.6. Análise do extrato em diclorometano das folhas de alecrim-do-campo.....	55
4.3.7. Análise do extrato em diclorometano do broto do alecrim-do-campo	57
4.3.8. Análise do extrato clorofórmico da amostra PSB	64
4.3.9. Análise da fração em acetato de etila da amostra PSB.....	64
4.3.10. Análise do extrato em diclorometano da amostra PSB	65
4.4. Cromatografia a gás de alta resolução em altas temperaturas acoplada à espectrometria de massas (CGAR-AT-EM) das amostras PSB e PSG.....	67
4.4.1. Extratos em diclorometano.....	67
4.4.2. Extratos em acetona.....	73
4.4.3. Extratos em metanol	75
4.5. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	77
4.5.1. Extratos aquosos	77
4.5.2. Extratos etanólicos.....	80
4.5.3. Comparações com bancos de dados	90
4.5.4. Comparações com padrões de flavonas.....	91
4.6. Cromatografia líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas com Ionização Química à Pressão Atmosférica - CLAE-IQPA-EM/EM (HPLC-APCI-MS/MS)	94

4.7. Ensaio Biológico.....	99
4.7.1. Teste da atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos de própolis em bactérias patogênicas.. ..	99
4.8. Análise Elementar CHN do resíduo final da própolis PSB	104
4.9. Análises Espectrofotométricas	104
4.9.1. Teor de fenóis totais	105
4.9.2. Teor de flavonóides em equivalentes de quercetina.....	107
4.9.3. Atividade antioxidante com DPPH.....	109
4.10. Espectroscopia no Infravermelho do Resíduo Final da amostra PSB na rota de Banskota	110
4.11. Comparação dos cromatogramas em diclorometano da folha e broto de alecrim-do-campo (<i>Baccharis dracunculifolia</i>) e de diversas amostras de própolis brasileiras obtidos por CG/EM	112
CONCLUSÕES.....	120
BIBLIOGRAFIA.....	123

Abreviaturas

CG/EM = Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

CGAR-AT-EM = Cromatografia Gasosa de Alta Resolução e Altas Temperaturas acoplada à Espectrometria de Massas

CHN = Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio (Análise Elementar)

CLAE = Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLAE-IES-EM = Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Ionização por Electrospray acoplada a Espectrômetro de Massas

CLAE-IQPA-EM/EM = Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Ionização Química à Pressão Atmosférica - Espectrometria de Massas/ Espectrometria de Massas

INIA = Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (Madri-Espanha)

IVTF = Infravermelho com Transformada de Fourier

MQ = Marcador Químico

PSB = Própolis Santa Bárbara

PSG = Própolis São Gotardo

SDE = Simultaneous Distillation Extractor ou Extrator de Destilação Simultânea

UV = Ultravioleta

Índice de Figuras

Figura 1. Estrutura da artepilina.....	04
Figura 2. A numeração convencional e a estrutura básica de um flavonóide (A) e um flavan-3-ol (B).....	06
Figura 3. Formação do complexo de flavonóides com cloreto de alumínio.....	09
Figura 4. Estrutura do radical DPPH.....	10
Figura 5. Estrutura de padrões com propriedades antioxidantes (α -tocoferol, 2-catequina e 3-epicatequina).....	10
Figura 6. Desenho esquemático de um extrator do tipo SDE.....	17
Figura 7. Etapas da extração da própolis da amostra PSB com as respectivas massas e resumo das análises executadas (outras amostras vegetais e de própolis)...	24
Figura 8. Características dos padrões de isoflavonas analisados por CLAE.....	33
Figura 9. Cromatograma da própolis marrom (ME) sililada, obtido por CG/EM.....	44
Figura 10. Cromatograma da resina de eucalipto hidrolisada e sililada, obtido por CG/EM.....	45
Figura 11. Cromatograma do extrato aquoso da própolis marrom (ME) no gradiente 1, obtido por CLAE no canal 220 nm.....	47
Figura 12. Cromatograma do extrato metanol:água da resina (gradiente 1), obtido por CLAE no canal 220 nm.....	48
Figura 13. Cromatograma da solução hidrolítica da resina (gradiente 2), obtido por CLAE, no canal 220 nm.....	49
Figura 14. Cromatograma do óleo essencial da própolis Santa Bárbara, obtido por CG/EM.....	50
Figura 15. Expansão da região central do cromatograma do óleo essencial da própolis Santa Bárbara, obtido por CG/EM.....	51
Figura 16. Cromatograma do óleo essencial da própolis São Gotardo, obtido por CG/EM.....	52
Figura 17. Cromatograma do óleo essencial da flor do assa-peixe, obtido por CG/EM.....	54
Figura 18. Cromatograma do óleo essencial da flor do eucalipto, obtido por CG/EM.....	55
Figura 19. Cromatograma do óleo essencial da folha de maria-preta, obtido por CG/EM.....	56
Figura 20. Cromatograma dos constituintes do extrato em diclorometano das folhas de alecrim-do-campo, obtido por CG/EM.....	57
Figura 21. Cromatograma do extrato em diclorometano do broto do alecrim-do-campo, obtido por CG/EM.....	58
Figura 22. Cromatograma do extrato clorofórmico derivatizado com BSTFA, obtido por CG/EM.....	65
Figura 23. Cromatograma do extrato em diclorometano da própolis PSB, obtido por CG/EM.....	67
Figura 24. Cromatogramas dos extratos em diclorometano das amostras a) PSB e b) PSG obtidos por CGAR-AT-EM.....	69
Figura 25. Espectro de massas do pico 1 do extrato em diclorometano das amostras PSB e PSG.....	70
Figura 26. Espectro de massas do pico 2 do extrato em diclorometano das	

amostras PSB e PSG.....	70
Figura 27. Espectro de massas do pico 3 do extrato em diclorometano das amostras PSB e PSG.....	70
Figura 28. Espectro de massas do pico 4 do extrato em diclorometano das amostras PSB e PSG.....	70
Figura 29. Espectro de massas do pico 4a do extrato em diclorometano da amostra PSB.....	71
Figura 30. Espectro de massas do pico 5 do extrato em diclorometano das amostras PSB e PSG.....	71
Figura 31. Espectro de massas do pico 6 do extrato em diclorometano das amostras PSB e PSG.....	71
Figura 32. Espectro de massas do pico 7 do extrato em diclorometano das amostras PSB e PSG.....	71
Figura 33. Espectro de massas do pico 8 do extrato em diclorometano das amostras PSB e PSG.....	72
Figura 34. Espectro de massas do pico 9 do extrato em diclorometano das amostras PSB e PSG.....	72
Figura 35. Espectro de massas do pico 10 do extrato em diclorometano das amostras PSB e PSG.....	72
Figura 36. Espectro de massas do pico 11 do extrato em diclorometano das amostras PSB e PSG.....	73
Figura 37. Espectro de massas do pico 12 do extrato em diclorometano das amostras PSB e PSG.....	73
Figura 38. Espectro de massas do pico 13 do extrato em diclorometano das amostras PSB e PSG.....	73
Figura 39. Cromatograma do extrato acetônico da própolis PSB, obtido por CGAR-AT-EM.....	74
Figura 40. Cromatograma do extrato acetônico da própolis PSG, obtido por CGAR-AT-EM.....	74
Figura 41. Cromatograma do extrato em metanol da amostra PSB, obtido por CGAR-AT-EM.....	76
Figura 42. Cromatograma do extrato em metanol da amostra PSG, obtido por CGAR-AT-EM.....	76
Figura 43. Cromatograma do extrato aquoso da própolis Indianópolis (IN), obtido por CLAE.	79
Figura 44. Cromatograma do extrato aquoso da própolis do Norte de Minas (NM), obtido por CLAE.....	79
Figura 45. Cromatograma do extrato aquoso da própolis de Santa Bárbara (PSB), obtido por CLAE.....	80
Figura 46. Cromatograma do extrato aquoso da própolis de São Gotardo (PSG), obtido por CLAE.....	80
Figura 47. Cromatograma do extrato aquoso da própolis Salomon (SAL), obtido por CLAE.....	81
Figura 48. Cromatograma do extrato etanólico da própolis M3 (não- verde), obtido por CLAE.....	82
Figura 49. Cromatograma do extrato etanólico da própolis Vermelha (não-verde), obtido por CLAE.....	83
Figura 50. Cromatograma do extrato etanólico da própolis de São Gotardo PSG	

(verde), obtido por CLAE.....	83
Figura 51. Cromatograma do extrato etanólico da própolis Coromandel 1 (verde), obtido por CLAE.....	84
Figura 52. Cromatograma do extrato etanólico da própolis Perdões 2 (verde), obtido por CLAE.....	84
Figura 53. Cromatograma do extrato etanólico da própolis Marrom de Tripuí MT (não-verde), obtido por CLAE.....	85
Figura 54. Cromatograma do extrato etanólico da própolis de Santa Bárbara PSB (verde), obtido por CLAE.....	86
Figura 55. Cromatograma do extrato etanólico do broto de alecrim-do-campo, obtido por CLAE.....	86
Figura 56. Cromatograma do extrato aquoso PSB no canal 272±8 nm no eluente acetonitrila/água.....	94
Figura 57. Cromatograma do extrato aquoso PSG no canal 272±8 nm no eluente acetonitrila/água.....	94
Figura 58. Cromatograma dos padrões pesquisados no canal 260±8 nm no eluente acetonitrila/água.....	95
Figura 59. Espectro de massas do extrato etanólico da amostra PSB, obtido por CLAE-IQPA-EM/EM no modo positivo.....	97
Figura 60. Placa com ensaio de verificação de atividade microbica das própolis PSB (à esquerda) e PSG (à direita) em várias concentrações contra <i>S. aureus</i> , comparados com antibióticos de controle.....	101
Figura 61. Placa com ensaio de verificação de atividade microbica das própolis PSB (à esquerda) e PSG (à direita) em várias concentrações contra <i>Marsa</i> , comparados com antibióticos de controle.....	102
Figura 62. Placa com ensaio de verificação de atividade microbica das própolis PSB (à esquerda) e PSG (à direita) em várias concentrações contra <i>S. aureus</i>	103
Figura 63. Placa com ensaio de verificação de atividade microbica das própolis PSB (à esquerda) e PSG (à direita) em várias concentrações contra <i>Marsa</i>	104
Figura 64. Gráfico da curva de calibração obtida com os padrões de ácido gálico....	107
Figura 65. Gráfico da curva de calibração obtida com os padrões de quercetina.....	109
Figura 66. Gráfico da curva de calibração obtida com os padrões de catequina hidratada.....	110
Figura 67. Espectro no Infravermelho do resíduo final da própolis PSB.....	112
Figura 68. Cromatogramas dos extratos em diclorometano do broto de alecrim-do-campo (a), folha de alecrim-do-campo (b), óleo essencial do broto de alecrim-do-campo (c) e da amostra de própolis PSB (d).....	113
Figura 69. Cromatogramas dos extratos em diclorometano da própolis verde de Perdões (a), própolis verde de Coromandel (b), própolis verde de São Gotardo (c), própolis verde de Nepomuceno (d), própolis verde de Divinópolis (e), própolis verde de Betim (f).....	115
Figura 70. Cromatogramas do extratos em diclorometano da própolis marrom (ME) da região de Bom Jardim em Uberlândia (a), própolis M3 de Coromandel (b), própolis verde-marrom do Norte de Minas (c), própolis marrom-escuro de Indianópolis (d) e própolis marrom-escuro de Tripuí (e).....	117
Figura 71. Cromatograma obtidos por CG/EM de: extrato em diclorometano da própolis preta de Ouro Preto (a), extrato em diclorometano de uma própolis do Rio Grande do Sul (b), extrato em diclorometano da própolis avermelhada de	

Coromandel (c) e Espectro de massas do composto (1) marcador químico MQ das própolis de alecrim-do-campo (d).....	119
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Índice de Tabelas

Tabela 1. Faixas de absorção para diversos tipos de flavonóides na região do 07 UV/Visível.....	
----------------------------------------------------------------------------------------------------	--

Tabela 2. Ensaio espectrofotométrico utilizado no controle de qualidade da própolis e suas características.....	07
Tabela 3. Marca e grau dos reagentes utilizados.....	13
Tabela 4. Amostras inicialmente trabalhadas e algumas de suas características.....	14
Tabela 5. Amostras Vegetais analisadas por CG/EM.....	15
Tabela 6. Descrição do aparelho de CG/EM e das condições de análise. - Própolis ME e Resina de Eucalipto.....	16
Tabela 7. Descrição do aparelho de CG/EM e das condições de análise (óleos essenciais e extratos em diclorometano das amostras de própolis).....	16
Tabela 8. Descrição do aparelho de CGAR-AT-EM e das condições de análise.....	18
Tabela 9. Gradientes e solventes usados nas análises por CLAE na UFU.....	19
Tabela 10. Gradientes e solventes usados nas análises por CLAE no INIA.....	20
Tabela 11. Amostras etanólicas analisadas por CLAE.....	31
Tabela 12. Alguns compostos e suas bandas de absorção no ultravioleta.....	34
Tabela 13. Compostos identificados por CG/EM na própolis marrom (ME) sililada.	45
Tabela 14. Compostos identificados por CG/EM na amostra de resina hidrolisada sililada.....	46
Tabela 15. Compostos identificados no extrato aquoso da própolis marrom (ME)....	47
Tabela 16. Compostos identificados no extrato metanol:água da resina de eucalipto.....	48
Tabela 17. Compostos identificados na solução hidrolítica da resina de eucalipto....	49
Tabela 18. Constituintes do óleo essencial da PSB identificados por CG/EM.....	51
Tabela 19. Constituintes do óleo essencial da própolis PSG identificados por CG/EM.....	52
Tabela 20. Constituintes do óleo essencial da flor de assa-peixe identificados por CG/EM.....	54
Tabela 21. Constituintes no óleo essencial da flor de eucalipto identificados por CG/EM.....	55
Tabela 22. Constituintes do óleo essencial folha de maria-preta identificados por CG/EM.....	56
Tabela 23. Constituintes do extrato em diclorometano das folhas de alecrim-do-campo identificados por CG/EM.....	57
Tabela 24. Principais compostos identificados no extrato em diclorometano do broto de alecrim-do-campo identificados por CG/EM.....	59

Tabela 25. Tabela comparativa dos constituintes de cinco amostras vegetais e de duas amostras de própolis identificados por CG/EM.....	61
Tabela 26. Compostos identificados nas frações diclorometano advindas da cromatografia de coluna de sílica-gel, identificados por CG/EM.....	65
Tabela 27. Compostos identificados nas frações diclorometano advindas da cromatografia de coluna de sílica-gel, identificados por CG/EM.....	66
Tabela 28. Componentes do extrato em diclorometano da própolis PSB, identificados por CG/EM.....	67
Tabela 29. Constituintes do extrato em diclorometano da própolis PSB e PSG, identificados por CGAR-AT-EM.....	69
Tabela 30. Constituintes do extrato acetônico da própolis PSB identificados por CGAR-AT-EM.....	75
Tabela 31. Constituintes do extrato acetônico da própolis PSG identificados por CGAR-AT-EM.....	75
Tabela 32. Constituintes do extrato metanólico da própolis PSB identificados por CGAR-AT-EM.....	77
Tabela 33. Constituintes do extrato metanólico da própolis PSG identificados por CGAR-AT-EM.....	77
Tabela 34. Compostos identificados por CLAE e seus tempos de retenção.....	87
Tabela 35. Tabela comparativa dos espectros UV/Vis dos picos encontrados nas amostras etanólicas da própolis PSB, M3 e no broto de alecrim-do-campo.....	92
Tabela 36. Dados de alguns dos padrões e seus espectros no UV.....	96
Tabela 37. Compostos detectados no extrato etanólico da própolis PSB por CLAE-IQPA-EM/EM.....	97
Tabela 38. Valores obtidos por determinação de CHN do Resíduo Final da própolis PSB.....	105
Tabela 39. Valores das absorvâncias obtidas no ensaio de determinação de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu.....	106
Tabela 40. Teor de Fenóis Totais em equivalentes de ácido gálico.....	107
Tabela 41. Valores obtidos no ensaio de teor de flavonóides em equivalentes de quercetina em massa percentual	108
Tabela 42. Valores obtidos no ensaio de teor de flavonóides em equivalentes de quercetina em massa percentual.....	109
Tabela 43. Atividade anti-radicalar/antioxidante das amostras de própolis.....	111
Tabela 44. Área do pico do composto 1 (m/z 256).....	116
Tabela 45. Constituintes do extrato em diclorometano da própolis marrom de Coromandel (M3)	120

RESUMO

A própolis é um produto de constituição complexa elaborado pelas abelhas a partir de resinas de árvores, ceras, pólen, fragmentos de vegetais e as próprias secreções salivares. Ela é usada para vedar a colméia, facilitando o controle de umidade e temperatura, e protegê-la contra o ataque de insetos e microorganismos.

A própolis apresenta propriedades biológicas importantes como atividade antibiótica, microbicida, anti-cariogênica, antifúngica, antioxidante, antitumoral e cicatrizante.

A composição da própolis depende da flora local e pode ter coloração marrom, avermelhada, preta, branca e verde.

A própolis verde se distingue das demais porque é feita fundamentalmente da resina do broto do alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*), arbusto endêmico de diversas regiões do Brasil.

Neste trabalho, amostras de própolis verde foram analisadas por métodos cromatográficos (CG-EM, CGAR-AT-EM, CLAE e CLAE-IQPA-EM/EM), espectrofotométricos (fenóis totais, teor de flavonóides e atividade antioxidante) e químicos. Outras amostras de própolis (marrons e preta) e amostras vegetais foram analisadas também, para a caracterização e verificação de similaridades de seus constituintes.

As técnicas que forneceram melhores informações sobre a composição química das amostras de própolis foram a CLAE-EM e CG-EM. Foram identificados o ácido cinâmico e derivados, flavonóides, alcanos e álcoois de cadeia longa, ácidos carboxílicos e seus derivados (principalmente ésteres), compostos aromáticos não-hidroxilados e terpenóides. Vários compostos não puderam ser identificados, com destaque para os quatro isômeros de massa molar 270 e um composto de massa molar 256 u.

Todas as amostras de própolis coletadas em regiões onde existe alecrim-do-campo apresentaram um marcador químico, que é o composto de massa molar 256 u mencionado acima. Este composto está presente

também no alecrim-do-campo mas não foi encontrado em amostras de outros vegetais nem de própolis de regiões onde não há alecrim.

Os testes biológicos mostraram que as amostras de própolis PSG e PSB possuem considerável atividade microbica, embora a concentração mínima inibitória não tenha sido determinada.

ABSTRACT

Propolis is a complex product elaborated by bees from tree resins, waxes, pollen, plant fragments and bee salivary secretions. It is used to seal and protect the hive against insects and microorganism attacks, and to improve the temperature and moisture controls.

Propolis has good biologic properties like antibiotic, microbicide, anti-cariogenic, antifungic, antioxidant, antitumoural and cicatrization activities.

Propolis composition varies accordingly to the local flora and can have brown, red, black, white or green color.

The green propolis distinguish itself from the others, because in its constitution, there is a resin extracted from “*alecrim-do-campo*” buds (*Baccharis dracunculifolia*), an endemic bush in certain regions from Brazil.

At this work, green propolis samples were analyzed by chromatographic (GC-MS, HT-HRGC-MS, HPLC and HPLC-APCI-MS/MS), spectrophotometric (total phenols, flavonoids levels in quercetin equivalents and antioxidant activity) and gravimetric assays. Other propolis and plants samples were analyzed for identification and verification of similarities in their constituents.

The HPLC/MS and GC/EM techniques furnished the best information about the chemical composition of the propolis samples. Cinnamic acid and derivatives, flavonoids, high chain alkanes and alcohols, carboxylic acids and derivatives (mainly esthers), non-hydroxilated aromatic compounds and terpenoids were identified. Many compounds could not be identified specially the four isomers with MW 270 and one compound with MW 256.

All the propolis samples collected in areas where *Baccharis dracunculifolia* was native, showed a chemical marker, a non-identified compound with MW of 256 Da. This compound was found in this plant, but not in other plants samples neither in propolis samples collected where this plant was not present.

The biological tests with PSB and PSG samples showed reasonable bactericide activity, although the minimum inhibitory concentration could not be determined.

Introdução

Nesta tese foram estudadas a composição química de várias amostras de própolis do Estado de Minas Gerais, com ênfase especial na própolis verde de Santa Bárbara. Foram ainda estudadas a composição química de seis amostras vegetais que poderiam servir de pasto apícola para a produção de própolis.

A própolis verde, geralmente exportada, é um produto genuinamente brasileiro, sendo o Estado de Minas Gerais, um dos principais produtores. A fonte básica de matéria-prima da própolis verde é a resina encontrada no broto do alecrim-do-campo. Não existe um marcador químico que permita a classificação de uma amostra de própolis como verde com facilidade e rapidez.

O uso de aparelhagem, no atual estado da arte no qual a química se encontra, permite a separação de misturas complexas e a identificação de seus constituintes, a partir de pequenas quantidades de amostra.

O presente trabalho, é constituído de um primeiro capítulo versando sobre uma visão geral das questões relativas à própolis quanto às suas utilizações, atividades biológicas e aos diferentes tipos de estudos relatados na literatura a respeito de sua composição química. O segundo capítulo relata os materiais e equipamentos utilizados para o desenvolvimento das análises das diferentes própolis. No Capítulo 3 são apresentadas as metodologias utilizadas. No Capítulo 4 são apresentados os Resultados e Discussões, e por fim, as Conclusões.

Capítulo 1 - Visão Geral sobre a Própolis e seus Estudos Químicos

O homem sempre soube utilizar os recursos naturais em prol de seu bem estar e sua comodidade. O mel de abelha foi inicialmente o produto mais comercializado e conhecido, enquanto a própolis era considerada um produto secundário.

Com o advento da apicultura como uma atividade industrial extrativista (embora ainda exista como uma atividade familiar e de subsistência) e a difusão do uso de extratos alcoólicos de própolis no combate a várias enfermidades, a própolis e outros produtos apícolas (pólen de flores, geléia real, cera e o veneno de abelha) passaram a ter um maior destaque entre os apicultores.

A própolis é um produto de constituição complexa elaborado pelas abelhas a partir de resinas de troncos de árvores, ceras, pólen, fragmentos de vegetais e as próprias secreções salivares. Ela é usada para vedar a colméia, possibilitando o controle da temperatura, umidade e ventilação, e protegê-la contra o ataque de insetos e microorganismos¹.

A própolis depende da flora local e pode ter coloração marrom, avermelhada, preta, branca e verde.

A própolis verde se distingue das demais porque é feita fundamentalmente da resina do broto do alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*), arbusto endêmico de diversas regiões do Brasil².

A palavra própolis tem origem grega e é formada pela combinação de "pro" (defesa) e "polis" (cidade), o que explica bem a utilização da própolis pela colméia³.

Referências sobre a utilização da própolis datam do Egito Antigo e da civilização grega².

Vários trabalhos sobre a própolis foram publicados em revistas internacionais e nacionais e muitas patentes foram feitas sobre seus compostos e suas propriedades. Em 2002, Neto *et al.* fizeram uma

revisão dos 100 anos de pesquisas da própolis e da tendência para o aumento destas pesquisas e dos efeitos biológicos da própolis³.

A própolis apresenta propriedades biológicas importantes relatadas por pesquisadores como por exemplo, a atividade microbicida, anticariogênica, antifúngica, antiprotozoária, antioxidante, antiviral, antiinflamatória, antiúlcera, hepatoprotetora, antitumoral, estimulante do sistema imunológico e cicatrizante, dentre outras^{2,3,4,5,6,7}.

O homem poderia utilizar estas notáveis propriedades em seu favor, não apenas as já conhecidas desde épocas anteriores, mas em enfermidades contemporâneas como o câncer e a AIDS. Por outro lado, além do uso terapêutico e alimentar, a indústria cosmética apresenta vários produtos que têm a própolis em sua constituição como cremes, loções, sabonetes, pasta dental, etc.

Atualmente, o Japão e outros países asiáticos são responsáveis pela compra de quase toda a produção nacional de própolis¹. O preço de mercado para a própolis verde "in natura", gira em torno de 120,00 (cento e vinte) Reais, cotado em dezembro de 2005.

O Sudeste brasileiro é a principal (senão única) região produtora de própolis verde existente. Na Ásia, a própolis é empregada no desenvolvimento de medicamentos hepatoprotetores ou ainda para a inibição de tumores cancerígenos³.

Já foram identificados centenas de compostos na própolis^{8,9}.

A composição química da própolis se diferencia conforme a vegetação e clima de cada região, sendo que comumente a própolis do Estado de Minas Gerais tem uma coloração verde, preta ou marrom². O controle de qualidade da própolis muitas vezes é feito em função dessa coloração, que pode ter até um tom avermelhado. A própolis verde recebe atenção especial por ser exportada em sua totalidade.

O pasto apícola ou o conjunto das espécies vegetais que possam fornecer néctar e/ou pólen para a manutenção das colônias e para a produção de mel e própolis, em particular o da região sul do Estado de Minas Gerais, apresenta uma espécie conhecida como alecrim-do-campo

(*Baccharis dracunculifolia*). Esther Bastos², Kumazawa *et al.*¹⁰ e Park *et al.*¹¹ demonstraram que o alecrim-do-campo é a principal fonte vegetal da própolis brasileira comumente chamada de verde. As própolis de outras colorações (não-verdes) não exibem uma planta principal ou um pasto apícola rigidamente constituído, em função da grande diversidade da flora brasileira.

Os pesquisadores Grange e Davey¹² (1990) pesquisaram a atividade antibacteriana da própolis européia frente a bactérias *gram*-positivas e negativas e atribuíram esta atividade à maior quantidade de flavonóides presentes na própolis européia, diferentemente de Neto *et al.*^{2,13}, Pereira *et al.*¹⁴ e Park¹⁵ que confirmam a menor quantidade de flavonóides na própolis brasileira e maior abundância de ácidos fenólicos. Vários compostos fenólicos como os ácidos *p*-cumárico, caféico, ferúlico e ésteres destes ácidos foram descritos por Kadota *et al.*¹⁶ e por Takaisi-Kikuni e Schilcher¹⁷.

Recentemente, Park *et al.*¹⁸ analisou mais de 600 amostras de própolis brasileiras, classificando-as em 12 grupos de acordo com seus perfis cromatográficos. As amostras de própolis do grupo 12 apresentaram perfis cromatográficos semelhantes aos do alecrim-do-campo, sendo que essas amostras foram coletadas no Mato Grosso do Sul, Goiás, São Paulo, Paraná e sul do Estado de Minas Gerais.

A artepilina, mostrada na Figura 1, foi identificada como sendo um composto com grande potencial antitumoral e antibacteriano, presente na própolis verde.

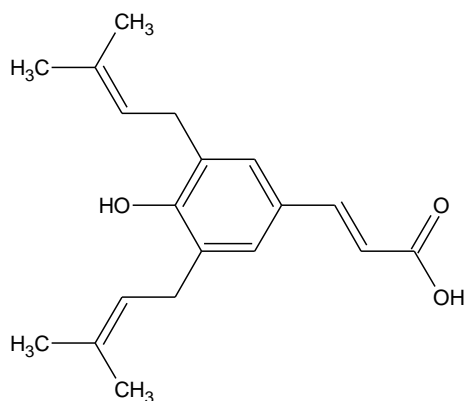


Figura 1. Estrutura da artepilina.

Várias técnicas modernas, como a CLAE/EM, foram utilizadas por diversos pesquisadores no estudo dos extratos etanólicos, mais comumente usados na medicina popular. Kadota *et al*¹⁹ identificaram muitos compostos com o uso de padrões com tempos de retenção conhecidos, para investigar amostras de própolis brasileiras por CLAE-ESI-MS no modo negativo. Eberlin *et al*²⁰ também utilizaram esta técnica para identificar oito marcadores em amostras de própolis brasileiras. Ainda com esta técnica, Kumazawa *et al.*¹⁰ identificaram os principais constituintes de extratos etanólicos de amostras de própolis de quatorze países, pela comparação dos seus perfis cromatográficos.

Contudo, existe uma limitação na aplicação desta técnica, uma vez que apenas os compostos que absorvem radiação ultravioleta serão detectados, em função do detector ultravioleta utilizado por estes pesquisadores.

Neto *et al.*¹³ utilizaram a CGAR-AT-EM em extratos de própolis brasileira para identificar compostos de menor volatilidade e maior massa, com o uso de altas temperaturas. Contudo, esta técnica dá relevância a compostos de maior massa em detrimento daqueles que normalmente são identificados em temperaturas mais baixas.

O governo brasileiro instituiu normas para a industrialização e comercialização da própolis. A legislação brasileira descrita na Instrução Normativa nº 3 de 19 de Janeiro de 2001 nos seus anexos VI e VII²¹, prevêem os valores considerados válidos para a própolis e seus extratos hidroalcoólicos.

Esta legislação regulamenta uma série de características como a classificação da própolis de acordo com a quantidade de flavonóides existentes (baixo teor: até 1,0 %; médio teor: entre 1,0 e 2,0 %; alto teor: acima de 2,0 % em massa), a quantidade máxima de cinzas (5%) e ceras (25%) e a quantidade mínima de flavonóides (0,5% em massa) e compostos fenólicos (5,0% em massa). Essa legislação ainda regulamenta o teor de resíduo seco (mínimo de 11%) e a perda máxima por

dessecação (8% em massa). Os ensaios são descritos na Farmacopéia Brasileira²².

O controle de qualidade da própolis, em muitas ocasiões, ainda é feito através de análise sensorial como cor, cheiro, aparência e viscosidade. Pode-se ainda, fazer uso de técnicas mais sofisticadas como os ensaios espectrofotométricos e os ensaios cromatográficos, baseados na cromatografia gasosa e na cromatografia líquida.

Os ensaios de menor complexidade usados no controle de qualidade são a determinação de ceras, de cinzas, água e a determinação do teor de voláteis²³.

O espectro ultravioleta (UV) de flavonóides é geralmente determinado em metanol. Ele consiste de duas bandas de absorção nas faixas entre 300-550 nm (banda I) e entre 240-285 nm (banda II). A posição precisa e as intensidades relativas destes máximos fornecem informações acerca da natureza do flavonóide e de seu padrão de substituição. As duas bandas são formadas de acordo com as duplas ligações existentes nos anéis A e B do flavonóide²⁴, mostrado na Figura 2.

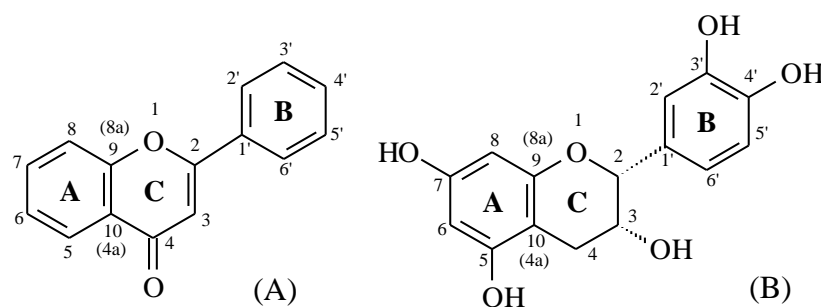


Figura 2. A numeração convencional e a estrutura básica de um flavonóide (A) e um flavan-3-ol (B)²⁴.

A Tabela 1 mostra as faixas de absorção de algumas classes de flavonóides e as suas faixas de absorção na região do ultravioleta²⁴.

Tabela 1 - Faixas de absorção para diversos tipos de flavonóides na região do UV/Visível²⁴

Banda II (nm)	Banda I (nm)	Tipo de flavonóide
250-280	310-350	Flavona
250-280	330-360	Flavonóis (3-OH substituídos)
250-280	350-385	Flavonóis (3-OH livres)
245-275	ombro 310-330	Isoflavonas
245-275	pico em 320	Isoflavonas (5-deoxi-6,7-dioxigenadas)
275-295	ombro 300-330	Flavanonas e diidroflavonols
230-270 (baixa intensidade)	340-390	Chalconas
230-270 (baixa intensidade)	380-430	Auronas
270-280	465-560	Antocianidinas e antocianinas

O uso dos ensaios espectrofotométricos para o controle de qualidade da própolis se baseia na diferença entre as quantidades de radiação de luz ultravioleta emitidas pelo aparelho e absorvidas pelos analitos presentes em uma amostra, em um dado comprimento de onda. A concentração de um dado analito é quantificada com o uso de um padrão externo. Os espectros no UV/Vis podem ser comparados com os de outros compostos em bancos de dados de espectros.

Os ensaios espectrofotométricos mais usados na certificação da qualidade de amostras de própolis²¹ (com exceção do ensaio com DPPH) são mostrados na Tabela 2, a seguir, com os respectivos dados e padrões.

Tabela 2. Ensaio espectrofotométricos utilizados no controle de qualidade da própolis e suas características

Ensaio	Reagente	Tipo de reação	Padrão usado	Comprimento de onda observado no UV/Vis (nm)
Fenóis Totais	Folin-Ciocalteu	Formação de complexo	Ácido gálico	760
Teor de	Cloreto de	Formação de	Quercetina	425

flavonóides	alumínio	complexo		
Atividade		Decaimento	Catequina	
Antioxidante	DPPH	de coloração	hidratada	517
		por consumo		

Embora estes ensaios utilizem uma determinação indireta com o uso de padrões externos de compostos fenólicos e flavonóides, eles permitem uma comparação direta entre os potenciais de amostras diferentes e a comparação com outras amostras já analisadas.

Os ensaios espectrofotométricos mais comumente usados para se determinar a qualidade da própolis são: o ensaio de fenóis totais com o reagente de Folin-Ciocalteu²⁵, teor de flavonóides em quercetina^{21,23}, e o ensaio de atividade anti-radicalar com o composto DPPH²⁶ (1,1-difenil-2-picrilhidrazila).

O ensaio para a determinação de fenóis totais emprega o reagente de Folin-Ciocalteu, que nada mais é que uma solução ácida de complexos poliméricos dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstístico. Este reagente de cor amarela oxida os fenolatos e reduz os ácidos deste reativo formando um complexo de molibdênio-tungstênio de cor azul. A natureza destes complexos foi parcialmente explicada por Singleton e Rossi²⁷.

Este reagente, mais conhecido com “reagente para fenóis”, forma um complexo que pode ser detectado espectrofotometricamente por causa de um grupo cromóforo que exhibe absorção máxima em 760 nm. Pode ainda ser usado na forma de spray em certos procedimentos cromatográficos²⁸.

O ensaio de determinação de flavonóides em teor de quercetina foi adaptado a partir do ensaio de plantas da farmacopéia alemã²⁹ por Woisky e Salatino²³ que passaram a utilizar este método para quantificar os constituintes naturais da própolis e utilizar os resultados para fazer um controle de qualidade químico para tinturas e amostras cruas de própolis. A solução de cloreto de alumínio (AlCl_3) em metanol disponibiliza o cátion alumínio para formar complexos estáveis com os

flavonóides em metanol, ocorrendo na análise espectrofotométrica um desvio para maiores comprimentos de ondas (deslocamento batocrômico de 50 a 60 nm da Banda I) e uma intensificação da absorção do grupo cromóforo, mostrado na Figura 3.

Assim, é possível a quantificação dos flavonóides, impedindo-se a interferência das outras substâncias fenólicas, principalmente dos ácidos fenólicos presentes na própolis. Nestas condições, o complexo flavonóide-alumínio absorve em comprimentos de ondas maiores do que o flavonóide sem a presença do complexante. A quantificação é feita geralmente com o uso de um padrão externo, geralmente a quercetina.

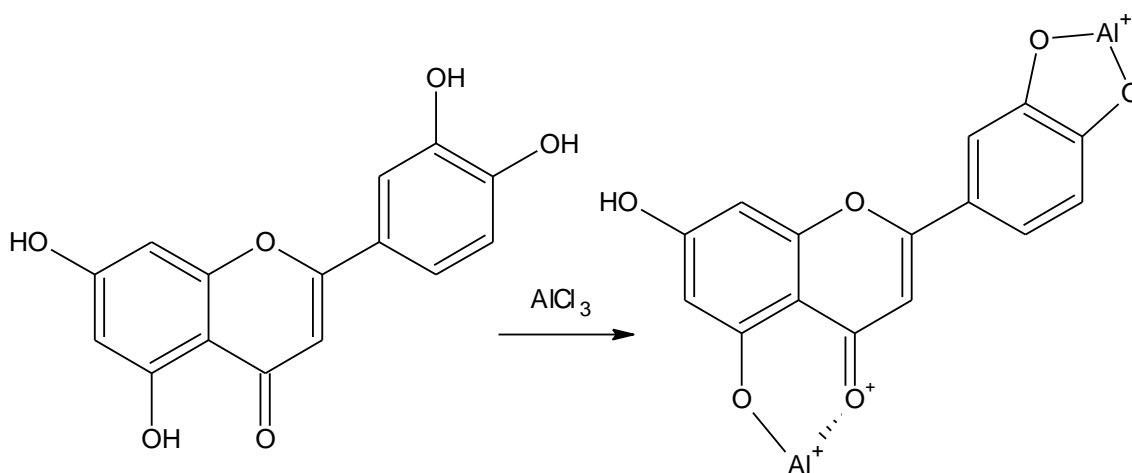


Figura 3. Formação do complexo de flavonóides com cloreto de alumínio^{23,24}.

O ensaio de atividade antioxidante e/ou anti-radicalar com DPPH é um método que utiliza um radical para se estimar a atividade antioxidante. Este composto³⁰ mostrado na Figura 4, possui um radical livre estável de coloração violeta, que ao entrar em contato com alguma substância que possua atividade antioxidante, sofre descoloração e diminuição da tonalidade violeta. O decaimento da coloração é proporcional à diminuição da concentração do DPPH, que é acompanhada pela medição da absorvância deste composto em 517 nm.

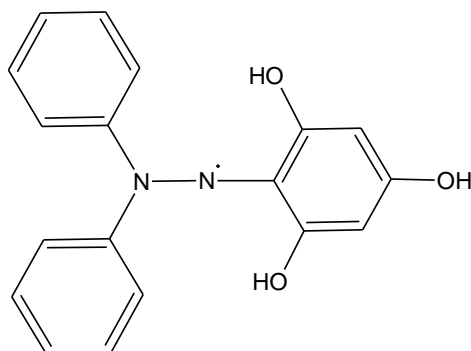


Figura 4. Estrutura do radical DPPH.

Os padrões externos geralmente usados nas determinações de atividade antioxidante são a epicatequina, a catequina e o alfa-tocoferol, mostrados na Figura 5. São compostos com propriedades antioxidantes comprovadamente reconhecidas, como os utilizados por Chen *et al.*²⁶, quando investigaram a atividade antioxidante de isoflavonas da soja com DPPH.

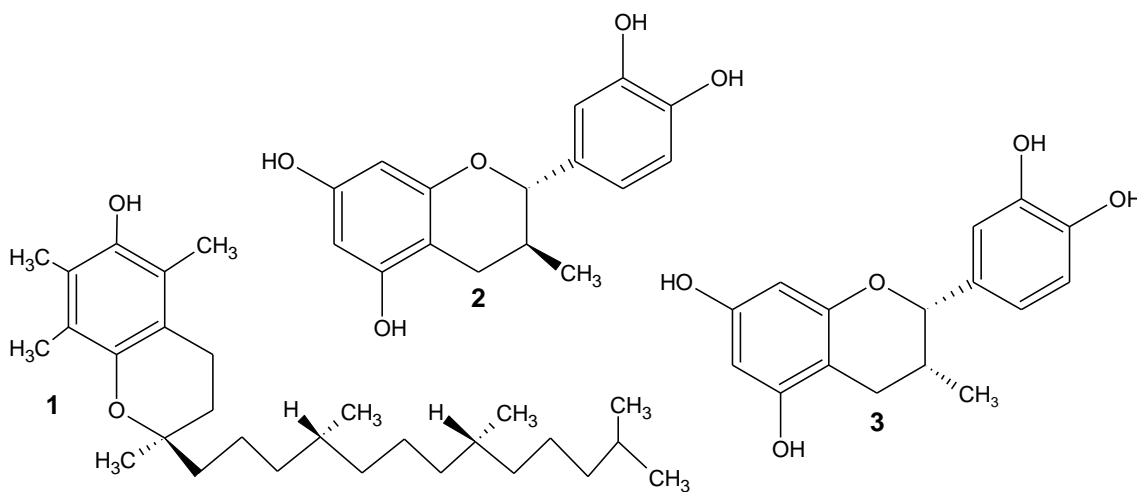


Figura 5. Estrutura de padrões com propriedades antioxidantes (1. α -tocoferol, 2. catequina e 3. epicatequina).

Arts *et al.*^{31,32} quantificou a catequina em uma grande variedade de produtos alimentares como chás, vinhos, frutas e sucos, chocolate, etc., o que possibilitou uma comparação do potencial antioxidante em teor de catequina existente nestes alimentos com as amostras de própolis, embora estas amostras possam não ter catequina em sua composição.

Além dos ensaios espectrofotométricos, os ensaios de identificação dos constituintes da própolis são facilitados com o uso da cromatografia. A cromatografia pode ser líquida ou gasosa³³.

A cromatografia apenas separa os constituintes da mistura e a identificação destes constituintes é feita com a ajuda de um detector. Um dos detectores utilizados foi o do tipo espectrômetro de massas, tendo sido muito utilizado em conjunto com a cromatografia gasosa, e/ou com inserção direta "on-column" em altas temperaturas, ou interfaceada com a cromatografia líquida, todos na tentativa de se identificar os compostos existentes na própolis.

A análise por cromatografia líquida com detector do tipo *diode-array*, apresenta boa separação e detecção de compostos presentes em produtos naturais. Contudo, alguns compostos podem não absorver energia na faixa do UV e desta forma não serão detectados com esta técnica. As colunas de fase reversa com empacotamentos de sílica geralmente são capazes de separar compostos de polaridades e tamanhos diferentes, mas isômeros presentes em produtos naturais não são facilmente separados, quando detectados. O uso de padrões analíticos para a identificação de compostos é de grande valia e devem ser utilizados sempre que possível, em conjunto com bancos de dados.

Alguns perfis cromatográficos de extratos etanólicos da própolis foram investigados e comparados com padrões de isoflavonas (existentes na soja) para a verificação de sua presença³⁴.

Na análise de produtos naturais, a separação dos constituintes foi melhorada com o uso de métodos cromatográficos. Aliada a estes métodos, técnicas de identificação como a espectrometria de massas³⁵, o uso de detectores de ultravioleta^{24,36} e a Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono³⁷ permitiram a identificação de milhares de compostos presentes em produtos naturais.

Mas o aparecimento de misturas complexas e de amostras sazonais em quantidades limitadas, como no caso da própolis, podem esbarrar em problemas na identificação pela não existência em bancos de dados de

espectros de massas e ultravioleta, assim como pela dificuldade de separação de isômeros com propriedades físico-químicas semelhantes.

Bezzan³⁸ estudou uma própolis marrom (colhida entre uma pastagem de *Brachiaria decumbens* e um reflorestamento de eucalipto da espécie *Eucalyptus urophylla*) da região de Uberlândia, Minas Gerais.

Kadota *et al.*²⁰ e Timmermann *et al.*³⁹ utilizaram a Cromatografia Líquida acoplada a Espectrômetro de Massas, no estudo de amostras de própolis, em função da grande complexidade dos compostos existentes na própolis.

O objetivo do presente trabalho é estudar amostras de própolis de várias partes de Minas Gerais, com ênfase especial na própolis verde. Para tanto serão utilizadas as técnicas tradicionais de caracterização de própolis, a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (muito sensível, permite maior visualização da origem botânica produtos vegetais) e a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, que evoluiu muito ultimamente graças à possibilidade de detectar moléculas de alta massa molar.

Capítulo 2 - Materiais e Aparelhagem

2.1. Reagentes utilizados

Os solventes utilizados possuíam grau de pureza analítico (P.A.) ou grau cromatográfico/espectroscópico e são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3. Marca e grau dos reagentes utilizados

Nome do Produto	Marca do Produto	Grau do produto
Acetona	Isofar e Quimex	P.A.
Acetonitrila	Proquimios	UV/HPLC Espectroscópico
Ácido Acético Glacial	Quimex	P.A.
Ácido Clorídrico	Quimex	P.A.
Ácido Fosfórico	Synth	P.A.
Ácido Gálico	Sigma-Aldrich	P.A.
Álcool Etílico	Proquimios	UV/HPLC
Álcool Metílico	Proquimios	UV/HPLC
BSTFA	Sigma-Aldrich	P.A.
Butanol	Vetec	P.A.
Carbonato de sódio	Reagen	P.A.
Catequina Hidratada	Sigma-Aldrich	P.A.
Cloreto de Alumínio	Vetec	P.A.
Clorofórmio	Reagen e Vetec	P.A.
Diclorometano	Vetec	P.A.
DPPH	Sigma-Aldrich	P.A.
Quercetina	Sigma-Aldrich	P.A.
Reagente de Folin	Sigma-Aldrich e Vetec	P.A.

2.2. As amostras de própolis

A Tabela 4 abaixo mostra a procedência e a época da colheita das amostras analisadas.

Tabela 4. Amostras inicialmente trabalhadas e algumas de suas características

Denominação da amostra	Cor	Região	Época da colheita
ME	Marrom	Uberlândia	2000
PSG	Verde	São Gotardo	Set/2001
PSB	Verde	Santa Bárbara	Set/2001
M3	Marrom	Coromandel	Mai/2005
VE	Vermelha	Coromandel	Mai/2005
Verde de Perdões	Verde	Perdões	2005
Verde de Coromandel	Verde	Coromandel	2005
Verde de Nepomuceno	Verde	Nepomuceno	2005
Verde de Divinópolis	Verde	Divinópolis	2005
Verde de Betim	Verde	Betim	2005
Norte de Minas	Verde/marrom	Minas	2005
Indianópolis (IN)	Marrom escura	Indianópolis	2001
Tripuí	Marrom escura	Tripuí	2005
Preta de Ouro Preto	Preta	Ouro Preto	2005
RGS	Marrom	Rio Grande do Sul	2005
Salomon	n.i.	Dinamarca	2000

A amostra ME foi coletada ao lado de um reflorestamento de eucalipto, numa região situada a 40 Km de Uberlândia-MG, com pasto apícola constituído por uma floresta de *Eucalyptus urophylla*, capim *Brachiarea decumbens* e vegetação típica do cerrado. Todas as demais amostras foram obtidas a partir de colméias comerciais, sendo que a amostra de própolis PSB foi fornecida pelo apiário Santa Bárbara. O tipo de flora das amostras (com exceção da amostra ME) foi classificado como silvestre pelos apicultores que as forneceram. As amostras foram

lacradas em sacos plásticos e acondicionadas apropriadamente sob refrigeração.

Além dessas, algumas amostras vegetais também foram analisadas e estão apresentadas na Tabela 5:

Tabela 5. Amostras vegetais analisadas por CG/EM

Planta	Região	Época da colheita
Assa peixe	São Gotardo	2000
Broto de alecrim- do-campo	Perdões	Set/2001
Folha de alecrim- do-campo	Perdões	Set/2001
Flor de eucalipto	Uberlândia	Maio/2002
Resina de Eucalipto (RE)	Uberlândia	Maio/2002
Folha de Maria preta	Coromandel	Maio/2005

2.3. Descrição de aparelhos e condições de análise CG/EM

As condições de análise dessas amostras por CG/EM são mostradas nas Tabelas 6 e 7:

Tabela 6. Descrição do aparelho de CG/EM e das condições de análise. - Própolis ME e Resina de Eucalipto

HP modelo 5890, série II	
Equipamento	Acoplado a um espectrômetro de massas (30 metros x 0,25 mm de diâmetro interno)
Condições de análise	
Coluna DB-5 (30 metros x 0,25 mm de diâmetro interno)	Temperatura inicial de 75°C com razão de aquecimento de 10°C por minuto até 325°C por 10 minutos com tempo total de corrida de total de corrida de 30 minutos.
Injetor (°C)	325
Interface (°C)	300

A faixa de massa analisada foi de 40 a 400 Daltons com ionização por impacto de elétrons (70 eV).

Tabela 7. Descrição do aparelho de CG/EM e das condições de análise (óleos essenciais e extratos em diclorometano das amostras de própolis)

Shimadzu GC-17/ QP-5000	
Equipamento	
Condições de análise	
Coluna DB-5 (30 metros x 0,25 mm de diâmetro interno)	Temperatura inicial de 60°C e razão de aquecimento de 3°C/minuto até 240°C por 20 minutos, com tempo total de corrida de 100 minutos.
Injetor (°C)	220
Interface (°C)	240

A faixa de massa analisada foi entre 40 e 400 Daltons com ionização por impacto de elétrons (70 eV).

Todas amostras de própolis foram analisadas nestas condições com exceção das amostras analisadas por CGAR-AT-EM e CLAE-IQPA-EM/EM.

2.4. Extrator do tipo SDE (“Simultaneous Distillation Extractor”)

As amostras do pasto apícola analisadas por CG/EM foram preparadas a partir de flores (ou folhas) extraídas em um extrator do tipo SDE, mostrado na Figura 6.

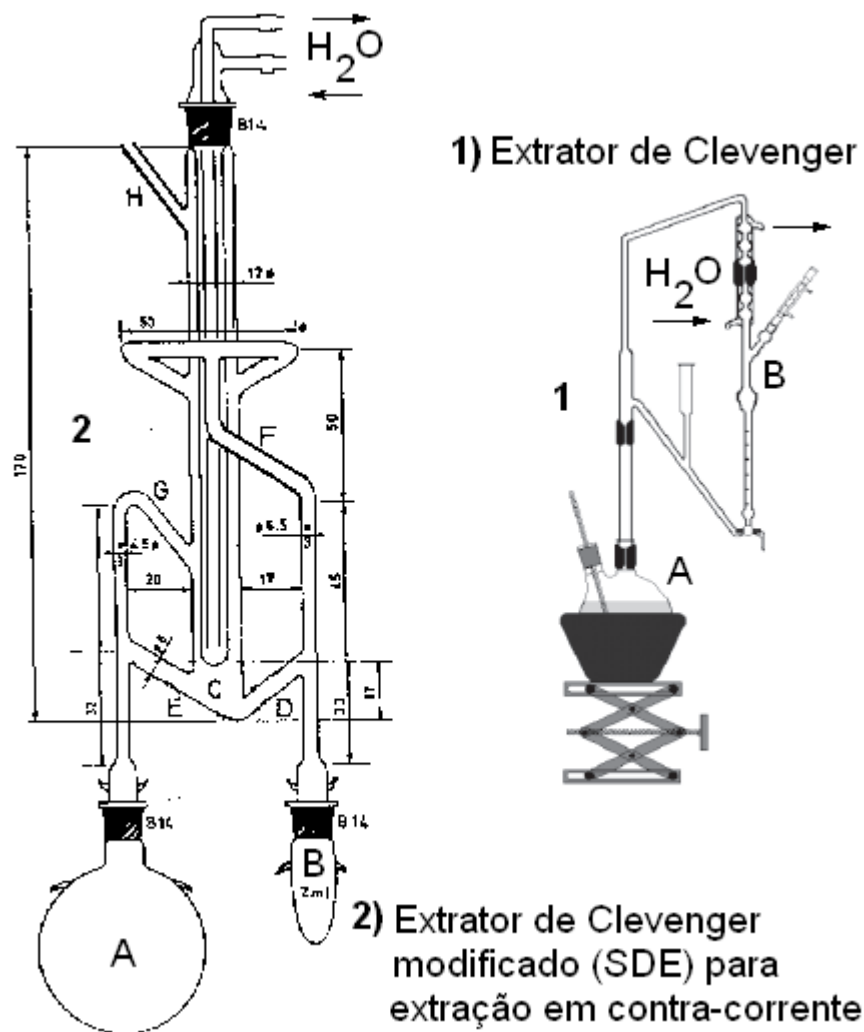


Figura 6. Desenhos esquemáticos de extratores de óleo essencial: 1) Extrator de Clevenger e 2) Clevenger modificado (SDE).

Os extratores do tipo Clevenger ou SDE são extratores de destilação que funcionam pelo arraste de vapor. No SDE, aquece-se o balão A com a amostra e o balão B com um solvente orgânico (geralmente diclorometano). Os compostos voláteis da amostra são arrastados e condensados, passando para o balão B, que é posteriormente removido e seu conteúdo é concentrado em um evaporador rotatório, seco com material secante (como por exemplo, cloreto de cálcio anidro) e analisado por CG/EM. Um procedimento semelhante é feito com o aparato do tipo Clevenger, com a diferença que a frações arrastadas são retiradas pela torneira abaixo do ponto B.

2.5 Cromatografia Gasosa de Alta Resolução em Altas Temperaturas acoplada à Espectrometria de Massas (CGAR-AT-EM)

Esta técnica utiliza altas temperaturas para detectar substâncias pouco voláteis, termolábeis e de alto ponto de ebulição. As condições de análise são mostradas na Tabela 8.

Tabela 8. Descrição do aparelho de CGAR-AT-EM e das condições de análise

Equipamento e Condições de análise (° Celsius)	GC HP-5890 II com coluna DB-5HT (15 metros x 0,25 mm)	HP-5972 (EM) CGAR-AT-EM
Coluna	Inicial a 40 °C com razão de aquecimento de 10°/min. até 390° por 10 minutos com tempo total de corrida de 42 minutos.	-
Injetor	-	400
Interface	390	390

A faixa de massa analisada foi de 40 a 400 Daltons com ionização por impacto de elétrons (70 eV).

A quantificação foi feita em um cromatógrafo HP-5890-II com injeção do tipo “on-column”, com volume injetado de 1 µL de amostra e H₂ como gás carreador.

Utilizou-se detector por ionização em chama (DIC) a 400°C para a quantificação.

2.6 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Descrição dos aparelhos e condições de análise

2.6.1. CLAE (UFU)

Algumas amostras foram analisadas por CLAE em um cromatógrafo líquido da marca Shimadzu modelo SCL-10A VP equipado com detector SPD-M10A VP do tipo *diode-array* (leitura na faixa de 190 a 600 nm), localizado no Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Este aparelho possui um sistema de bombeamento quaternário LC-10AD VP e uma estação de tratamento de dados. Foram usados dois gradientes, sendo um para a investigação de compostos fenólicos e comparação com uma tabela de padrões (gradiente 1) e outro para a investigação de isoflavonas (daidzina, daidzeína, genistina e genisteína) e os padrões de flavanona e flavona (gradiente 2). Estes gradientes são mostrados na Tabela 9.

Tabela 9. Gradientes e solventes usados nas análises por CLAE na UFU

Eluente	Gradiente 1 (min)				
Metanol/água (com 0,1 % de H ₃ PO ₄)	0	40	45	50	55
	20/80	100/0	100/0	20/80	20/80
Eluente	Gradiente 2 (min)				
Acetonitrila/água (com 0,1 % de CH ₃ COOH)	0	30	33	35	36
	20/80	55/45	20/80	20/80	20/80

A coluna utilizada foi de fase reversa CDC-ODS (R18). O volume injetado em cada corrida foi de 20 µL com um fluxo de 1 mL/min. Antes de se efetuar a corrida, as amostras e os padrões foram passados por um filtro em seringa de polipropileno descartável de celulose regenerada de porosidade 0,45 µm.

2.6.2. CLAE (INIA)

A Descrição do aparelho e condições de análise

A CLAE foi realizada em um cromatógrafo líquido HP modelo 1050 M, provido de um sistema de bombeamento quaternário, detector do tipo *diode-array* modelo 1040 M (leitura na faixa de 190 a 600 nm) e estação de tratamento de dados. Essas análises foram feitas no INIA (Instituto de Investigações Agrárias) na cidade de Madri (Espanha). A coluna utilizada era do tipo Hypersil ODS (fase reversa) de 200 x 4 mm. de diâmetro interno, com partículas de 5 μm . A Tabela 10 mostra os gradientes que foram usados:

Tabela 10. Gradientes e solventes usados nas análises por CLAE no INIA

Eluente	Gradiente 1 (min)		
Metanol/água (com 0,1 % de H ₃ PO ₄)	0/100	80	90
	20/80	60/40	100/0
Eluente	Gradiente 2 (min)		
Metanol/água (com 0,1 % de H ₃ PO ₄)	0	40	45
	20/80	100/0	100/0

Os eluentes que propiciaram os melhores resultados foram: A: MeOH-H₃PO₄ (999:1) e B: H₂O-H₃PO₄ (999:1) combinados em dois gradientes: 1: A:0 e B:100 (0 min); A:60 e B:40 (80 min); e A:100 e B:0 (90 min); 2: A:20 e B:80 (0 min); A:100 e B:0 (40 min); e A:100 e B:0 (5 min). A vazão foi de 1 mL/min, a temperatura do forno, 30 °C e foram injetados 20 μL . A biblioteca do aparelho continha 114 padrões de compostos fenólicos mais comuns.

2.6.3. CLAE/EM com ionização química à pressão atmosférica (HPLC-APCI-MS/MS)

Foi usado um cromatógrafo líquido da marca Shimadzu modelo SCL-10A VP equipado com detector SPD-M10A VP do tipo “*diode-*

array” (leitura na faixa de 190 a 600 nm), equipado com autosampler SIL-10ADvp e uma estação de tratamento de dados. Foi usada uma coluna de fase reversa CDC-Fenil de 25 cm x 4,6 mm d.i., com um fluxo total de 1,0 mL/minuto e volume injetado de 20,0 µL. Estas análises foram feitas no Instituto de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). O gradiente foi feito com metanol e acetonitrila 1:1 com 1,0% de ácido fórmico (Solvente B) e água com 1,0% de ácido fórmico (Solvente A). Os solventes passaram por um desgaseificador modelo DGU-14A.

A amostra PSB foi injetada com o seguinte programa: Metanol acetonitrila a 20% inicialmente, indo a 100% após 40 minutos em uma corrida total de 50 minutos.

O espectrômetro de massas da marca Micromass modelo Quattro LC foi conectado à saída do cromatógrafo líquido. O espectrômetro de massas foi usado no modo positivo com ionização no modo APCI.

As condições experimentais usadas neste experimento com o probe APCI no modo positivo (AP+) foram: Tuning Parameters: AP+, Source Page (APCI), Corona 2,32 kVolts, Cone 41 Volts, Extractor 4 Volts, RF Lens 0,60 Volts, Source Block Temp 150 °C.

2.7. Análise Elementar CHN

O aparelho utilizado foi um Analisador de Elementos da Perkin-Elmer modelo 2400 CHN da série II da Universidade de São Paulo (USP).

2.8. Análise por Infravermelho

A análise foi feita em um aparelho da marca Shimadzu modelo FTIR 8101 do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

2.9. Análise por Ultravioleta

Os ensaios foram feitos em um espectrofotômetro da marca Hitachi U-2000 do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

Capítulo 3 – Metodologia

3.1. A rota de extração da própolis

A rota básica de extração foi a rota proposta por Banskota⁵. Esta rota tem especial importância uma vez que a fração solúvel em acetato de

etila da própolis brasileira por ele estudada, apresentou notável atividade citotóxica.

A esta rota foram incorporadas diversas técnicas de análise (Espectrofotométricas, Gravimétricas, Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM), Cromatografia Gasosa de Alta Resolução em Altas Temperaturas (CGAR-AT-EM), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrômetro de Massas com Ionização Química à Pressão Atmosférica/Eletrospray (HPLC-APCI-ESI-MS/MS).

As diversas etapas de extração são mostradas na Figura 7, a seguir.

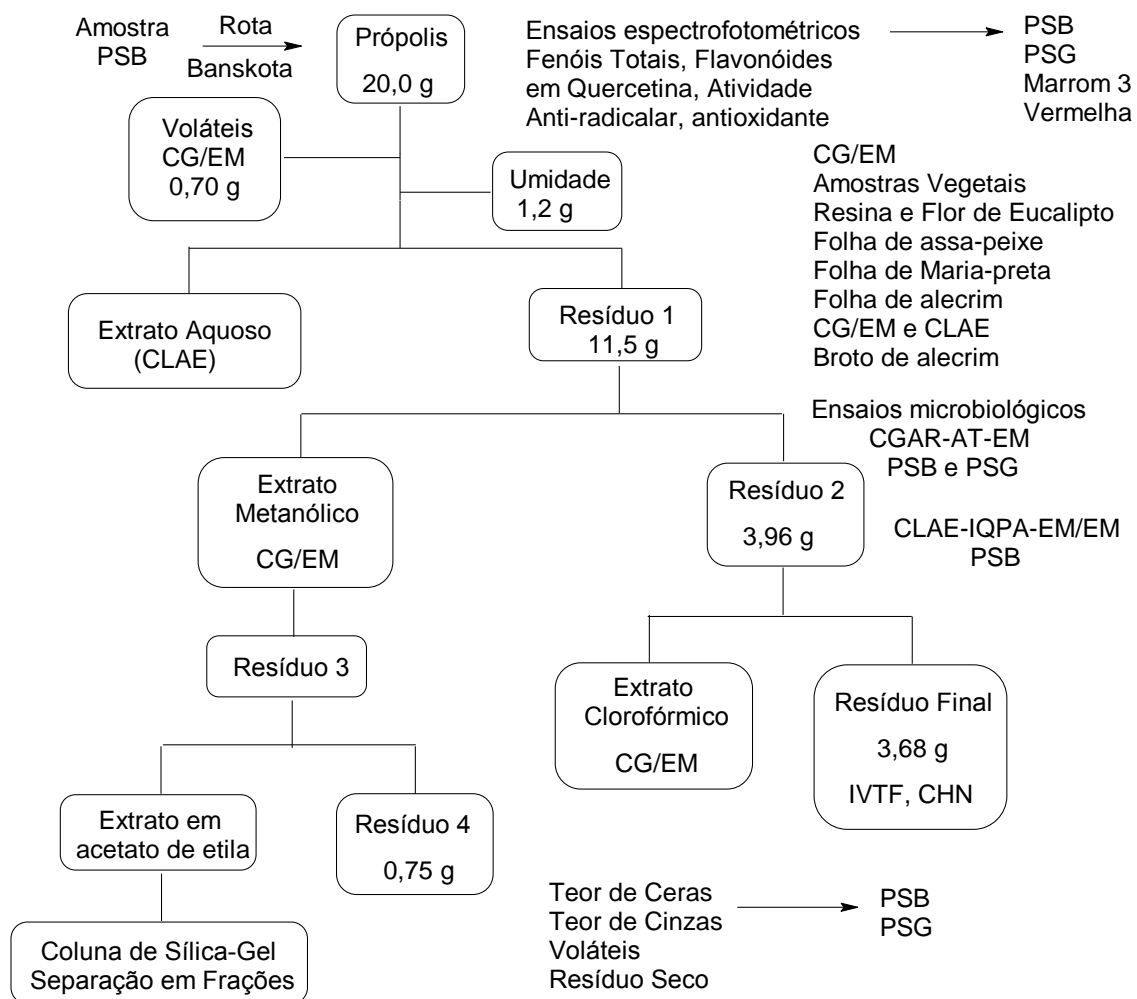


Figura 7. Etapas da extração da própolis da amostra PSB com as respectivas massas e resumo das análises executadas (outras amostras vegetais e de própolis).

3.2. Preparação dos extratos de própolis

Os procedimentos de preparação dos extratos foram os mesmos para todas as amostras de própolis, com um dado solvente.

O extrato metanólico foi obtido a partir de 5,0 g de amostra em 400,0 mL de metanol sob refluxo em Soxhlet por 5 horas.

O extrato aquoso (com exceção da amostra comercial Salomon SAL) foi obtido a partir de 20,0 g de amostra em 400,0 mL de água destilada, aquecida por duas horas a 80 °C.

O extrato etanólico foi obtido a partir de 5,0 g de amostra em 100,0 mL de etanol 95 % à temperatura ambiente, no escuro, com eventual agitação por uma hora. Todos os extratos foram filtrados com papel de filtro quantitativo (d.i. 12,5 cm) e mantidos sob refrigeração.

Os extratos em diclorometano das amostras de própolis foram obtidos dissolvendo-se aproximadamente 100 mg de própolis em 1,0 mL de solvente, por 1 hora, com agitação periódica, filtrados e analisados por CG/EM. O extrato de folha de alecrim-do-campo foi feito com uma massa aproximada de 30 gramas de folha em 20 mL de diclorometano, em repouso à temperatura ambiente, por uma hora, filtrado e analisado por CG/EM.

3.3. Separação dos constituintes da própolis por cromatografia em coluna

O extrato da própolis PSB e seus resíduos foram obtidos segundo a metodologia proposta por Banskota⁵, mostrado na Figura 7.

À 20,0 g de própolis foram adicionados 400,0 mL de água destilada, em um béquer de 1,0 L, com agitação, por duas horas a 80°C; filtrou-se e repetiu-se a extração mais uma vez. A porção insolúvel em água, denominada de resíduo 1, foi em seguida extraída por duas vezes sob refluxo com 800,0 mL de metanol por duas horas, obtendo-se o extrato metanólico após filtração em papel de filtro. A parte insolúvel

em metanol, denominada de resíduo 2, foi extraída por duas vezes com 800,0 mL de clorofórmio à temperatura ambiente, obtendo-se o extrato clorofórmio após filtração e a porção insolúvel foi denominada resíduo final (RF).

O extrato metanólico foi concentrado em evaporador rotativo a 40 °C, resultando em um resíduo seco denominado resíduo 3 que foi extraído com acetato de etila e a parte insolúvel em acetato de etila foi denominada de resíduo 4. O extrato em acetato de etila foi cromatografado em uma coluna (70 x 10 cm) de sílica gel empacotada com clorofórmio, e eluída com 2,0 L dos seguintes eluentes: 3 x 5 % MeOH:CHCl₃, 2 x 10 % MeOH:CHCl₃, 3 x 20 % MeOH:CHCl₃, 30 % MeOH:CHCl₃, 40% MeOH:CHCl₃, 50 % MeOH:CHCl₃, 60 % MeOH:CHCl₃ e 100 % MeOH. Igual procedimento foi feito com a fração insolúvel em acetato de etila. Foram coletadas frações de 10 mL e todo o procedimento foi acompanhado por cromatografia em camada delgada e gasosa para se verificar se havia a possibilidade de separação de algum componente.

Todos os extratos relevantes foram submetidos às cromatografias gasosa e líquida e o resíduo final, insolúvel nos solventes empregados, foi caracterizado por espectroscopia no Infravermelho.

3.4. Análise da própolis bruta

3.4.1 Determinação da quantidade de cera

3,0000 g de amostra pulverizada em almofariz foram extraídos em um balão de 500,0 mL com clorofórmio em um extrator do tipo Soxhlet por 6 horas²⁰. Os extratos foram concentrados em um evaporador rotativo e 120,0 mL de metanol a quente foram adicionados ao resíduo. Essa mistura foi levada à ebulição até que houvesse uma solução limpa no topo e uma pequena quantidade de resíduo oleoso. A fase metanólica foi filtrada a quente, utilizando-se filtro de papel nº 1, para um frasco

previamente pesado de 150,0 mL. Este frasco e o seu conteúdo foi resfriado a 0 °C e novamente filtrado com outro filtro de papel nº 1 quantitativo previamente pesado. O frasco e o resíduo foram lavados com 25 mL de metanol gelado. Depois de secadas em temperatura ambiente, o frasco e o papel de filtro com o resíduo, foram armazenados em um dessecador até massa constante. As amostras foram armazenadas em dessecador até massa constante. As massas de ceras do frasco e do papel de filtros foram somados e calculou-se por diferença, o percentual de cera na amostra bruta²³.

3.4.2 Determinação da quantidade de cinzas

O conteúdo de cinzas das amostras foi determinado segundo o procedimento recomendado pela farmacopéia dos Estados Unidos da América XXII⁴⁰. Em um cadinho de porcelana previamente levado ao rubro, seco e tarado, colocou-se uma amostra com massa de 2,0000 g de própolis. O cadinho com a amostra foi aquecido em uma mufla a 560 °C por 1 hora. O cadinho foi deixado resfriar na mufla por 1 hora e então foi levado a um dessecador até que sua massa estivesse constante. O teor de cinzas foi dado pelo valor percentual determinado pela diferença da massa inicial de própolis com a massa seca da seção 3.4.4. p. 27. Este é o resíduo mineral fixo.

3.4.3 Determinação dos componentes voláteis

A extração dos componentes voláteis das amostras PSB e PSG foi feita em um extrator de Clevenger, utilizando-se em cada caso massa de amostra em torno de 2,0 gramas e 750,0 mL de água bidestilada. O sistema permaneceu em refluxo por seis horas. A fase orgânica foi extraída com éter etílico, secada com sulfato de magnésio anidro e analisada por CG/EM, com as respectivas condições de análise da Tabela 7, p. 16.

3.4.4 Resíduo seco das substâncias voláteis

10,00 g de cada amostra de própolis foram colocadas em um vidro de relógio e aquecidas em um forno a 105 °C por cinco horas, resfriadas à temperatura ambiente e armazenadas em um dessecador. A massa das substâncias voláteis foi determinada por diferença de massa das amostras antes e após o aquecimento.

3.5. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) e Cromatografia gasosa de alta resolução em altas temperaturas acoplada à espectrometria de massas (CGAR-AT-EM)

3.5.1. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM)

Na espectrometria de massas empregou-se energia de impacto de 70 eV e foram coletados fragmentos de 40 a 650 Da. Para a identificação dos compostos foi usada uma biblioteca de espectros de massas acoplada ao aparelho (Wiley 239) e índices de Kovat. Foram considerados apenas compostos com porcentagem média acima de 1,0 %.

O volume injetado de amostra foi de 1,0 µL.

3.5.1.1. Preparação das amostras

Os extratos da própolis Marrom (ME) e da resina de eucalipto (RE) foram preparadas agitando-se 1 g da amostra em 5 mL do solvente, filtradas após 30 minutos e analisadas por CG/EM e CLAE.

A hidrólise da resina de eucalipto foi feita em um tubo fechado contendo 0,1 g da amostra em 2 mL de butanol-HCl (5 % em volume de HCl concentrado), durante 1 h a 95 °C. Depois filtrou-se. Para se proceder à derivatização, evaporaram-se todos os solventes à baixa pressão e à temperatura de 40 °C, em uma estufa à vácuo. Adicionou-se 0,2 mL do reagente de derivatização (BSTFA) e após 5 minutos,

procedeu-se a análise por CG/EM. As condições estão descritas na Tabela 6, p. 16.

Os extratos analisados por CG/EM foram os componentes voláteis (descritos na seção 3.4.3. p. 27); a fração solúvel em acetato de etila foi eluída com diclorometano; o extrato metanólico e o extrato clorofórmico, todos estes pertencentes à rota de Banskota. Ainda foram analisados os extratos das amostras do pasto apícola dentre os quais: a flor de assapeixe (*Vermonia polyanthes*), a folha e o broto de alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*), a flor de eucalipto (*Eucalyptus citriodora*) e a folha de maria-preta (*Solano nigrum*).

As amostras do pasto apícola analisadas por CG/EM foram preparadas a partir de 3,0000 g de flor (ou folha) extraídas em um extrator do tipo SDE mostrado na Figura 6, ou por extrações sucessivas em um banho de ultra-som por 30 minutos à temperatura ambiente com 3 frações de 20 mL de diclorometano. As alíquotas das 3 extrações sucessivas foram recombinadas e concentradas em um evaporador rotativo. Os extratos onde não se encontrou boa resolução foram derivatizados com BSTFA (Sigma) e analisados por CGAR-AT-EM.

Os extratos em diclorometano das amostras PSB, PSG, Marrom e Vermelha que foram analisados por este método, foram obtidos a partir de uma massa media de 3,0000 em 10,0 mL de diclorometano, para a identificação dos compostos e a verificação de similaridades em seus perfis cromatográficos. Os espectros de massas obtidos foram comparados com aqueles existentes na biblioteca do aparelho (Wiley 239).

As amostras do broto e folha de alecrim-do-campo foram coletadas na região de Perdões. As amostras de própolis analisadas foram coletadas em Santa Bárbara, Perdões, Coromandel, São Gotardo, Nepomuceno, Divinópolis, Betim, Uberlândia, Norte de Minas, Indianópolis, Tripuí, Ouro Preto e Rio Grande do Sul e armazenadas a uma temperatura de -10,0 °C. Os extratos em diclorometano foram obtidos dissolvendo-se aproximadamente 100 mg de própolis em 1,0 mL de solvente, por 1 hora,

com agitação periódica, e filtração com filtro de papel. Os extratos da folha e broto de alecrim foram obtidos com uma massa aproximada de 50 gramas em 50 mL de diclorometano. Todos os extratos em diclorometano foram filtrados uma vez com filtro de papel.

3.5.2. Cromatografia Gasosa de Alta Resolução em Altas Temperaturas acoplada à Espectrometria de Massas (CGAR-AT-EM)

Além da técnica usual de CG/EM, foi utilizado um aparelho da marca Hewlett-Packard modelo HP-5890 II com espectrômetro HP-5972 do Instituto de Química da UFRJ que permite injeções diretas a frio do tipo "on-column" da amostra. Esta técnica utiliza altas temperaturas para detectar substâncias pouco voláteis, termolábeis e de alto ponto de ebulição. Para a identificação dos compostos foi usada uma biblioteca de espectros de massas acoplada ao aparelho (Wiley 275). A ionização foi por impacto de elétrons (70 eV).

3.5.2.1. Preparação das amostras e derivatização

As amostras PSB e PSG analisadas por CGAR-AT-EM foram preparadas a partir de 3,0000 g de própolis extraídas seqüencialmente em um banho de ultra-som por 30 minutos à temperatura ambiente com 3 x 20 mL de diclorometano, 3 X 20 mL de acetona e 3 X 20 mL de metanol. As alíquotas das 3 extrações sucessivas de cada solvente foram combinadas e concentradas sob vácuo. Os extratos crus foram secados em um dessecador a vácuo com P₂O₅, pesados, derivatizados com BSTFA (Sigma) e analisados por CGAR-AT-EM. Os espectros de massas obtidos foram comparados com aqueles existentes na biblioteca do aparelho (Wiley 275).

3.5.2.2. Derivatização das frações cromatográficas

O solvente das alíquotas de cada fração cromatográfica foi evaporado em um evaporador rotativo a 40 °C, e à aproximadamente 10 mg do resíduo seco foram adicionadas três gotas do reagente de metilação (hidróxido de tetrametilamônio); para a sililação foram adicionadas cinco gotas do reagente de sililação (BSTFA) e cinco gotas de piridina, para melhorar a solubilidade, quando necessário. As misturas foram deixadas em repouso por cinco minutos antes da injeção no Cromatógrafo Gasoso acoplado ao Espectrômetro de Massas.

3.6. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Foram analisados vários extratos aquosos PSB e PSG (Minas Gerais), Salomon (Dinamarca) e etanólicos das amostras PSB e PSG (Minas Gerais) e Marrom e Vermelha da região de Coromandel, no Cromatógrafo Líquido descrito na seção 2.6.1, p. 19). Foram também analisadas as amostras de própolis ME e a resina de eucalipto (RE), preparadas conforme descrição na seção 2.6.2. na p. 20.

Esses materiais foram analisados com um gradiente composto por metanol ou acetonitrila (de grau cromatográfico) com água deionizada acidificada. O metanol ou acetonitrila, além de eluentes clássicos, permitem boa separação dos picos. A acetonitrila é o eluente mais apropriado para a verificação da presença de isoflavonas, flavonas e flavanonas.

As características dos extratos aquosos e etanólicos são mostradas na Tabela 11.

Tabela 11. Amostras etanólicas analisadas por CLAE

Amostra e Denominação	Aparência	Região	Tipo de extrato
Broto de Alecrim-do-campo	Verde	Perdões	Etanólico
Coromandel 1	Verde	Coromandel M.G.	Etanólico

Perdões 2	Verde	Perdões	Etanólico
Marrom de Tripuí (MT)	Marrom	Tripuí M.G.	Etanólico
Marrom3 (M3)	Marrom	Coromandel	Etanólico
Indianópolis (IN)	Marrom escura	Indianópolis M.G.	Aquoso e Etanólico
Santa Bárbara (PSB)	Verde escura	Santa Bárbara M.G.	Aquoso e Etanólico
São Gotardo (PSG)	Verde escura	São Gotardo M.G.	Aquoso e Etanólico
Salomon (SAL*)	Marrom	Dinamarca	Aquoso
Norte de Minas (NM)	Verde escura	Norte de Minas M.G.	Aquoso e Etanólico

* amostra comercial

3.6.1. Preparação das amostras de própolis

As amostras dos extratos foram preparadas conforme descrito na seção 3.2., p. 24.

3.6.2. Preparação dos padrões de isoflavonas

Os padrões de isoflavonas (daidzina, daidzeína, genistina, genisteína), flavanona e flavona foram preparados a partir de massas próximas a 3,0 mg com metanol/água deionizada 50 % em um balão volumétrico de 5,0 mL.

Foram construídas curvas de calibração com os dados obtidos com os padrões de genistina (BioChemika 99 % TLC), daidzina (BioChemika 97%), genisteína, daidzeína, flavanona e flavona (Sigma-Aldrich).

3.6.3. Identificação dos compostos

A identificação dos compostos foi feita por comparação com uma biblioteca de espectros UV de compostos fenólicos e o uso dos padrões mencionados na seção 3.6.4. p. 33.

Foram observados os tempos de retenção e os espectros de UV.

A fórmula e a massa molecular, assim como a estrutura dos padrões analíticos analisados por CLAE são mostradas na Figura 8.

ISOFLAVONAS E FLAVONÓIDES

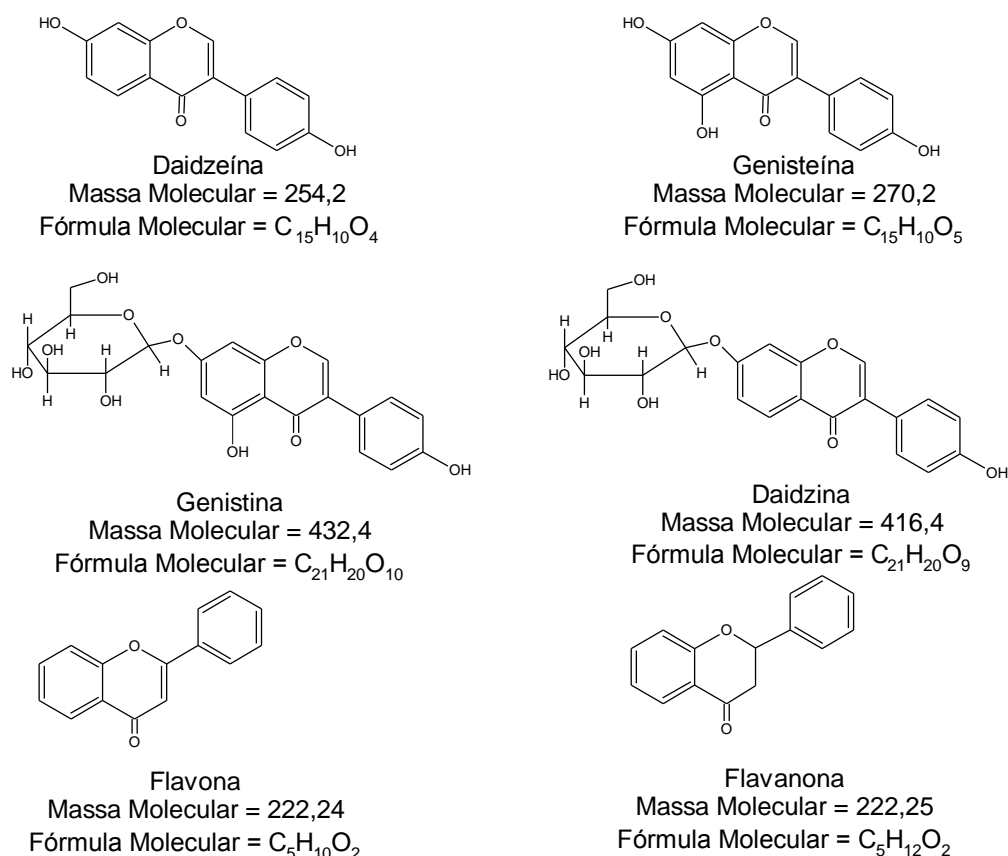


Figura 8. Características dos padrões de isoflavonas analisados por CLAE.

3.6.4. Comparação com banco de dados de compostos fenólicos

A Tabela 12⁴¹ mostra vários padrões com os seus respectivos comprimentos de onda (λ) de absorção na região do ultravioleta.

Tabela 12. Alguns compostos e suas bandas de absorção no ultravioleta

Nome do composto	λ II (nm)	λ I (nm)
α -naftol	293	359
β -naftol	264	339
2,6-dimetoxifenol	259	-
3,4-diidroxibenzaldeido	291	313
Aldeído 4-hidroxi-benzóico	295	-
Ácido 2,4,6-triidroxibenzóico	257	293
Ácido 2,5-diidroxifenilacético	293	-
Ácido 2,6-diidroxibenzóico	245	309
Ácido 3-(4-hidroxi-fenil)propanóico	277	-
Ácido 3,4,5-trimetoxibenzóico	265	-
Ácido 3,4-diidroxibenzóico	261	293
Ácido 3,4-diidroxicinâmico	321	-
Ácido 3,5-diidroxibenzóico	249	309
Ácido 4-hidroxi-3-metoxicinâmico	325	-
Ácido 4-hidroxi-benzóico	257	-
Ácido caféico	325	-
Ácido clorogênico	325	-
Ácido elágico	253	365
Ácido gálico	273	-
Ácido <i>p</i> -cumárico	309	-
Ácido rosólico	269	309
Ácido salicílico	305	-
Ácido sinápico	325	-
Ácido sirínico	273	-
Ácido vanilínico	261	293
Aldeído coniferílico	341	-
Apigenidina	277	477

Apigenina	265	337
2,4-diidroxibenzoato de butila	257	297
3,4-diidroxibenzoato de butila	261	297
3,5-diidroxibenzoato de butila	253	309
Butil-éster do ácido gálico	273	-
Butil-éster do ácido sirínico	277	-
Butil-éster-do ácido vanilínico	261	293
Canferol	265	365
Canferol-7-neohesperídeo	265	365
Catequina	277	-
Cianidina	273	537
Cianidina-3-galactosídeo	273	541
Cianidina-3-rutinosídeo	281	531
Crisina	269	313
Delfinidina	277	533
Dicranolomina	257	345
Epicatequina	277	-
Eriodictiol	299	-
Escopoletina	253/297	345
Esculetina	257/297	345
Filonotisflavona	257	345
Fisetina	249/321	361
Fisetinidina	277	513
Flavanona	253	321
Flavona	253	297
Guaiazuleno	245	295
Hesperetina	299	-
Hesperidina	265	-
Hidroquinona	299	-
Hiperosídeo	257	357
Isoquercitrina	257	353
Isosakuranetina	299	-

Kuromanina	281	521
Luteolina	253	349
Luteolina-7-glucosídeo	257	349
Miricetina	253	373
Naftaleno	273	-
Naringenina	299	-
Pelargonidina	269/429	521
Peonidina	277	533
Pinocembrina	299	-
Prunetina	261	-
Quercetina	253	369
Quercetina-3-arabinosídeo	257	357
Quercitrina	257	349
Robinetinidina	277	521
Rutina	257	353
Sakuranetina	299	-
Siringaldeído	309	-
Taxifolina	299	-
Tectocrisina	269	309
<i>Trans</i> -resveratrol	217	305/317
Umbeliferona	325	-
Vanilina	291	309
Vanilol	277	-
Vitexina	269	337

3.7. Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com ionização química à pressão atmosférica (HPLC-APCI-MS/MS)

A amostra PSG foi analisada apenas por inserção direta da amostra no Espectrômetro de Massas devido à grande similaridade do seu perfil cromatográfico com a amostra PSB.

3.7.1. Preparação das amostras

O extrato etanólico da própolis da amostra PSB (EEP) foi preparado a partir de 3,0000 g em 10,0 mL de etanol 95%. A amostra foi mantida no escuro e sob agitação por 24 horas. Depois foi filtrada em filtro de papel, colocada no freezer e posteriormente filtrada novamente para remoção de ceras. As condições de análise são descritas na seção 2.6.3, p. 21.

3.8. Ensaio de atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos de própolis em bactérias patogênicas

Este ensaio foi realizado no Departamento de Biologia da Universidade Federal do Paraná, com apenas duas amostras de própolis, a PSB e a PSG.

Em discos de papel de filtro Whatman n° 3 (5 x 1 mm de diâmetro) foram aplicados 10 µL dos extratos de própolis de diferentes concentrações. Os discos foram colocados em dessecador com sílica à temperatura ambiente por 24 horas. Depois foram mantidos em estufa a 60 °C por 2 horas para eliminação de qualquer resíduo do solvente. A análise da atividade microbicida dos extratos de própolis foi feita com a bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus* e MARSA (*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina e aminoglicosídeo), de acordo com o método descrito por Blair *et al.*⁴². Estas culturas ativas foram inoculadas

por espalhamento com “swabs” estéreis em placas de Petri contendo ágar nutriente. Os discos com extratos foram colocados sobre as placas inoculadas e incubadas a 37 °C por 24 horas. A atividade microbicide foi determinada pela formação de halo inibitório ao redor dos discos.

Foram testadas várias concentrações dos extratos de própolis PSB e PSG para verificar a quantidade mínima para inibição e estes resultados foram comparados com antibióticos de controle conhecidos (gentamicina, oxacilina, vancomicina e clindamicina).

3.9. Análise elementar CHN do resíduo final da rota de Banskota

Esta técnica é muito acurada e permite verificar as composições das amostras com relação às quantidades de carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio. O princípio da análise elementar se baseia na combustão completa do composto a uma temperatura de 925 °C em presença de oxigênio puro, obtendo-se no final do processo, os produtos da combustão (CO_2 , H_2O e N_2O_2 ou NO_2) que passam por uma coluna de separação com um detector (detector de condutividade térmica - TCD) onde os dados são transformados em impulsos elétricos e finalmente o resultado é obtido em porcentagens em um registrador ou impressora. O oxigênio é obtido pela diferença dos valores obtidos.

Inicialmente, ocorre a preparação da amostra (pesagem) e a calibração do aparelho com uso de padrões. A massa de amostra analisada do resíduo final da amostra PSB foi de 1,0 a 1,5 mg. Foi feito em triplicata no Analisador de Elementos da marca Perkin-Elmer modelo 2400 CHN Série II do Instituto de Química da USP, localizado em São Paulo.

3.10. Análises Espectrofotométricas

3.10.1. Ensaio de determinação do teor de fenóis totais

Em um tubo de ensaio, adicionou-se 0,5 mL do extrato aquoso, 2,5 mL de uma solução aquosa a 10 % do reativo de Folin-Ciocalteu e 2,0 mL de uma solução recém preparada de carbonato de sódio a 7,5 %. Manteve-se esta mistura em um banho-maria a uma temperatura de 50°C por 5 minutos. Esfriou-se a amostra e fez-se a medida de sua absorvância a 760 nm contra um branco contendo os reagentes e água no lugar da amostra. Juntamente com estas medidas, fez-se a construção de uma curva padrão com soluções aquosas de ácido gálico nas concentrações compatíveis com as determinações a serem feitas. As soluções para a construção da reta passaram pelas mesmas condições das amostras. A leitura foi feita contra um branco.

A massa inicial de ácido gálico foi de 0,0200 gramas diluídas em 50 mL de etanol 95%. Uma alíquota de 1,0 mL foi levada a um balão volumétrico de 50,0 mL e este volume foi completado com etanol 95%. Uma nova diluição foi feita com 5,0 mL desta solução para 50,0 mL, de onde foram retiradas as alíquotas de 0,1 a 0,5 mL com incrementos de 0,1 e um ponto extra de 0,25 mL, retirados com um pipetador de volume ajustável.

3.10.2. Ensaio para determinação do teor de flavonóides em equivalentes de quercetina

A 2,0 mL de amostra etanólica adicionaram-se 1,0 mL de cloreto de alumínio hidratado (VETEC) a 5 % (em metanol) e 2,0 mL de metanol de grau espectroscópico. Após 30 minutos, lêu-se a absorvância da solução no comprimento de onda de 425 nm. A curva de calibração foi feita com soluções de quercetina em metanol em diversas concentrações, onde se variou o volume de amostra, mantendo-se o volume final de 5,0 mL. A leitura foi feita contra um branco contendo apenas os volumes de metanol e a solução de cloreto de alumínio.

3.10.3. Determinação de atividade antioxidante com DPPH

A cada 0,25 mL de amostra, adicionaram-se 2,0 mL de uma solução recém-preparada de 75 μ M de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila, massa molecular 394,24; $3,1 \times 10^{20}$ spin/g, número CAS 1898-66-4, com fórmula molecular $C_{18}H_{12}N_5O_6$), preparado com 0,030 mg em 100,0 mL de metanol de grau cromatográfico e um volume de metanol para completar um volume de 5,0 mL. Cada amostra foi deixada na ausência da luz por 90 minutos e após este tempo, as absorvâncias foram lidas no comprimento de onda de 517 nm. O cálculo da atividade antioxidante relativa (AA) é dado pela equação $AA \% = [Aa - (Ab - Ac)]/Aa \times 100$, onde Aa é a absorvância da solução de incubação de DPPH sem a adição da amostra; Ab é a absorvância da mistura de incubação contendo o DPPH e a amostra a ser analisada e Ac é a absorvância da solução em branco sem o DPPH²⁴. Preparou-se uma curva de calibração com uma solução de 7,2 microgramas/mL de catequina hidratada em metanol (grau cromatográfico), com pontos de 1,8 a 10,8 microgramas de catequina.

3.10.4. Espectroscopia no Infravermelho do resíduo final da rota de Banskota

A espectroscopia no infravermelho possibilita a determinação dos grupos funcionais, principalmente em substâncias orgânicas, em função da absorção de energia na região do infravermelho, de 4000 e 650 cm^{-1} . O resíduo final seco foi misturado com KBr (brometo de potássio de grau espectroscópico) na proporção de 1:99 do sal. Depois de misturada e triturada em um cadinho de ágata, a amostra foi prensada em uma prensa manual com 1,5 mil kg de pressão por 20 segundos. Imediatamente a seguir, a amostra foi colocada em um suporte e fez-se a leitura com o aparelho.

3.11. Comparação dos perfis cromatográficos obtidos por CG/EM dos extratos em diclorometano da folha e broto de alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*) e de diversas amostras de própolis brasileiras.

3.11.1. Coleta e Preparação das amostras

As amostras do broto e folha de alecrim-do-campo foram coletadas na região da cidade de Perdões (MG) e as amostras de própolis analisadas foram coletadas em Santa Bárbara, Perdões, Coromandel, São Gotardo, Nepomuceno, Divinópolis, Betim, Uberlândia, Norte de Minas, Indianópolis, Tripuí, Ouro Preto (todas cidades do Estado de Minas Gerais) e uma do Estado do Rio Grande do Sul. Foram armazenadas a uma temperatura de $-10,0\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Os extratos em diclorometano das amostras de própolis foram obtidos dissolvendo-se aproximadamente 100 mg de própolis em 1,0 mL de solvente, por 1 hora, com agitação periódica, filtrados e analisados por CG/EM. O extrato de folha de alecrim-do-campo foi feito com uma massa aproximada de 30 gramas de folha em 20 mL de diclorometano, por uma hora, filtrado e analisado por CG/EM.

O óleo essencial do broto de alecrim-do-campo foi extraído num aparelho de Clevenger modificado para extração em contra-corrente. Foram usadas aproximadamente 5,0 g de amostra e o arraste de vapor se prolongou por 1,5 horas. A média de rendimento foi de 3,0 %.

Capítulo 4 - Resultados e Discussões

Pela rota de Banskota, pode-se perceber que água e metanol são suficientes para extrair quase 80 % dos compostos existentes na própolis PSB, restando apenas 20 % em massa na forma de resíduo final e extrato clorofórmico. Isso explica, por um lado, por que as soluções comerciais de própolis usam mistura de água e álcool; por outro lado, é de importância estudar a composição do resíduo final porque ele constitui quase 20 % da massa inicial de própolis (vide Figura 7, p. 24).

Algumas amostras apresentaram massas percentuais solúveis em diclorometano ou etanol 95% dentro de uma faixa de 30 a 40%, em função da complexidade e da grande diversidade de pastos apícolas possíveis.

4.1. Análise da própolis bruta

4.1.1. Determinação da quantidade de cera

O valor máximo de ceras permitidas na própolis segundo a legislação brasileira¹⁹, não deve ultrapassar o valor de 25%.

Obtiveram-se os valores de 12,98 % para a amostra PSB e 17,46 % para a amostra PSG. Os valores estão abaixo do máximo permitido pela legislação. O fato de a amostra PSG possuir maior quantidade de ceras implica em uma menor concentração dos extratos analisados, e este fato é evidenciado nos ensaios de CG/EM, espectroscópicos e de CLAE.

A determinação de ceras em própolis é um importante critério no controle de qualidade, uma vez que uma massa maior de cera implica em uma massa menor de constituintes bioativos e conseqüentemente uma menor concentração de compostos em uma certa massa.

4.1.2. Cinzas

Os teores de cinzas encontrados para as amostras PSB, PSG, Marrom e Vermelha foram de 2,52; 3,18; 2,95 e 1,47 %, respectivamente, na forma de resíduo mineral fixo.

Desta forma, os valores encontrados para as quatro amostras se encontram abaixo da quantidade máxima de cinzas (5%) exigida pela legislação¹⁹. Os teores de cinzas encontrados para estas amostras estão próximos do valor de cinzas reportado na literatura³⁶.

A amostra PSG apresentou o maior e a vermelha (VE) o menor teor de cinzas.

4.1.3. Porcentagens dos óleos essenciais das amostras PSB e PSG

As porcentagens dos óleos essenciais para PSB e PSG foram aproximadamente de 3,5 %. Este valor é inferior ao valor de 5,0 % obtido para uma amostra de própolis de Uberlândia³⁶ citada anteriormente, mas se encontra na faixa de valores pesquisados por Woisky²³.

4.1.4. Resíduo seco das substâncias voláteis

Os voláteis somados com a umidade das amostras PSB e PSG se encontram em torno de 6 %, dentro da faixa de valores pesquisados para amostras de própolis^{28,29} e dentro dos valores permitidos pela legislação¹⁹ (máximo de 8%).

4.2. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) e Cromatografia Líquida de alta Eficiência

(CLAE) da Própolis Marrom (ME) e a Resina de Eucalipto (RE)

4.2.1. CG/EM

O cromatograma da Figura 9, obtido por CG/EM do extrato aquoso seco e sililado da própolis ME, mostrou a presença de monossacarídeos e dissacarídeos, destacando-se a frutose. Os monossacarídeos aparecem mais de uma vez por causa da sililação parcial dos grupos hidroxila. Os picos de tempo de retenção até 10 min correspondem a contaminantes resultantes da sililação. A Tabela 13 apresenta os componentes identificados por CG/EM.

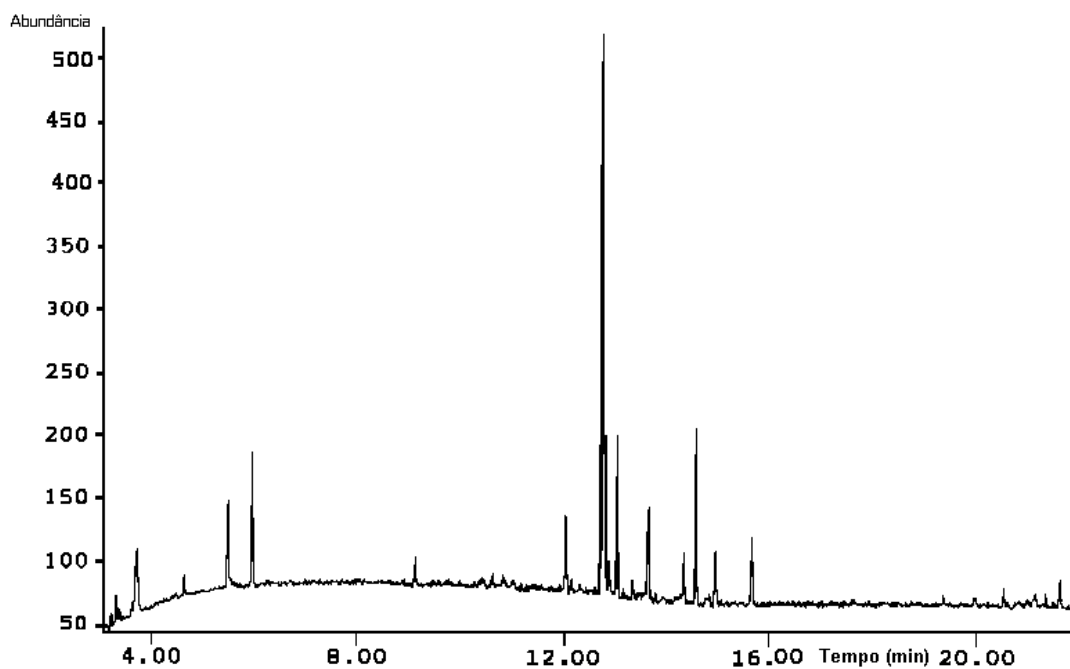


Figura 9. Cromatograma da própolis marrom (ME) sililada, obtido por CG/EM.

Tabela 13. Compostos identificados por CG/EM na própolis marrom (ME) sililada

Composto	Tempo de retenção (min.)
Contaminantes	3,6 – 9,2
Inositol	12,0; 13,0; 14,3 e 15,6
Frutose	12,7 e 12,9
Glicose	13,6 e 14,6
Ácido glucárico	14,9
Sacarose	20,5
Maltose	21,1

No caso da resina hidrolisada (Figura 10 e Tabela 14), sobressaem-se também os carboidratos, com destaque para a ramnose. Em pequenas quantidades foram observados também derivados dos ácidos benzóico e cinâmico e ácidos graxos, os quais não foram detectados na cromatografia a gás da própolis marrom (ME).

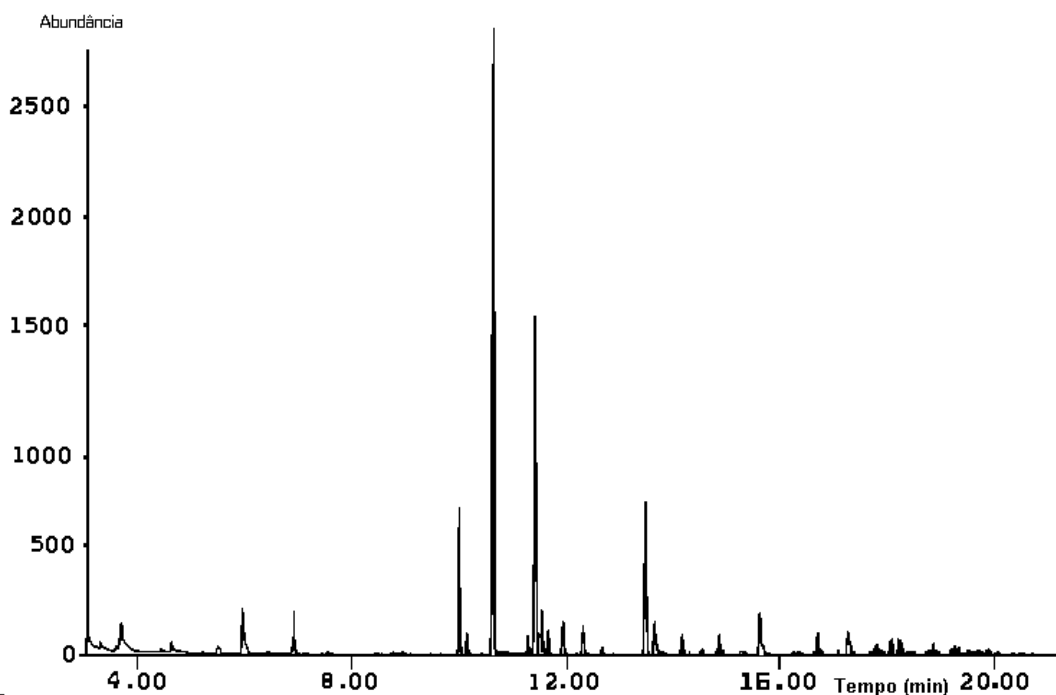


Figura 10. Cromatograma da resina de eucalipto hidrolisada e sililada obtido por CG/EM.

Tabela 14. Compostos identificados por CG/EM na amostra de resina hidrolisada sililada

Composto	Tempo de retenção (min.)
Derivados dos ácidos benzóico e cinâmico	6,9; 11,5 e 12,3
Contaminantes	3,6 - 6,0
Açúcares	10,0; 10,2; 11,4; 11,6 e 11,9
Ramnose	10,6
Ácidos graxos de cadeia longa	13,6; 14,9; 15,7; 16,7 e 17,7
Glicose	13,6 e 14,6
Ácido gálico	14,2

4.2.2. CLAE

A análise por CLAE do extrato aquoso da própolis marrom ME (seção 2.6.2 p. 20) indicou a presença em pequenas quantidades de ácido 3,4-diidroxibenzóico, 3,4-diidroxibenzaldeído e ácido vanílico; vanilina e derivados do ácido benzóico e do benzaldeído. A Figura 11 apresenta o cromatograma correspondente e a Tabela 15 os respectivos componentes e seus tempos de retenção. Os compostos mais abundantes de tempo de retenção entre 26 e 36 min não puderam ser identificados individualmente. Pelos espectros no UV e os tempos de retenção, pode-se inferir, no entanto, que são derivados do ácido benzóico e do benzaldeído. Estes resultados mostram que o extrato aquoso da própolis marrom (ME) não possui taninos ou flavonóides, confirmando os dados obtidos anteriormente^{13,14}.

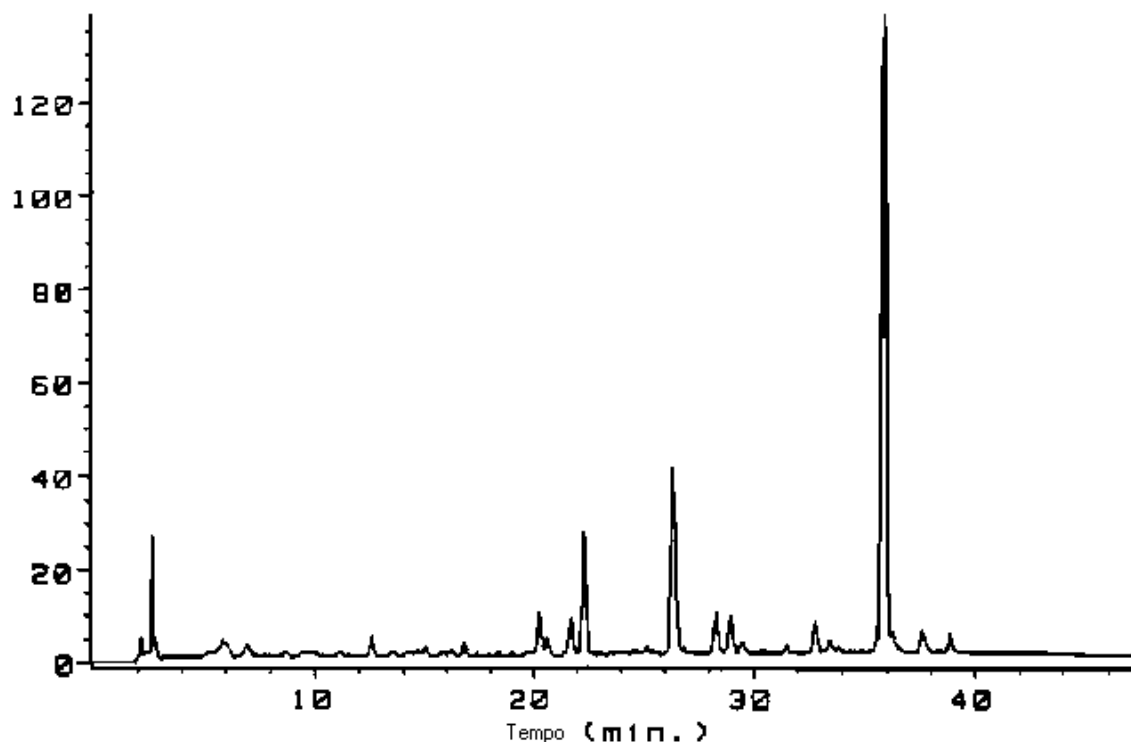


Figura 11. Cromatograma do extrato aquoso da própolis marrom (ME) no gradiente 1, obtido por CLAE no canal 365 ± 150 nm.

Tabela 15. Compostos identificados no extrato aquoso da própolis marrom (ME)

Composto	Tempo de Retenção (min.)
Ácido 3,4-diidroxibenzóico	12,5
Aldeído 3,4-diidroxibenzóico	16,7
Ácido vanílico	20,2
Vanilina	22,2
Derivados do ácido benzóicos e do benzaldeído	26-39

A análise do extrato metanol:água (80:20) da resina por CLAE, indicou a presença dos ácidos gálico e elágico, de um elagitanino, um provável derivado do vanilol e uma grande quantidade de polímeros complexos. A Figura 12 apresenta o cromatograma do extrato metanol:água da resina e a Tabela 16 os compostos identificados.

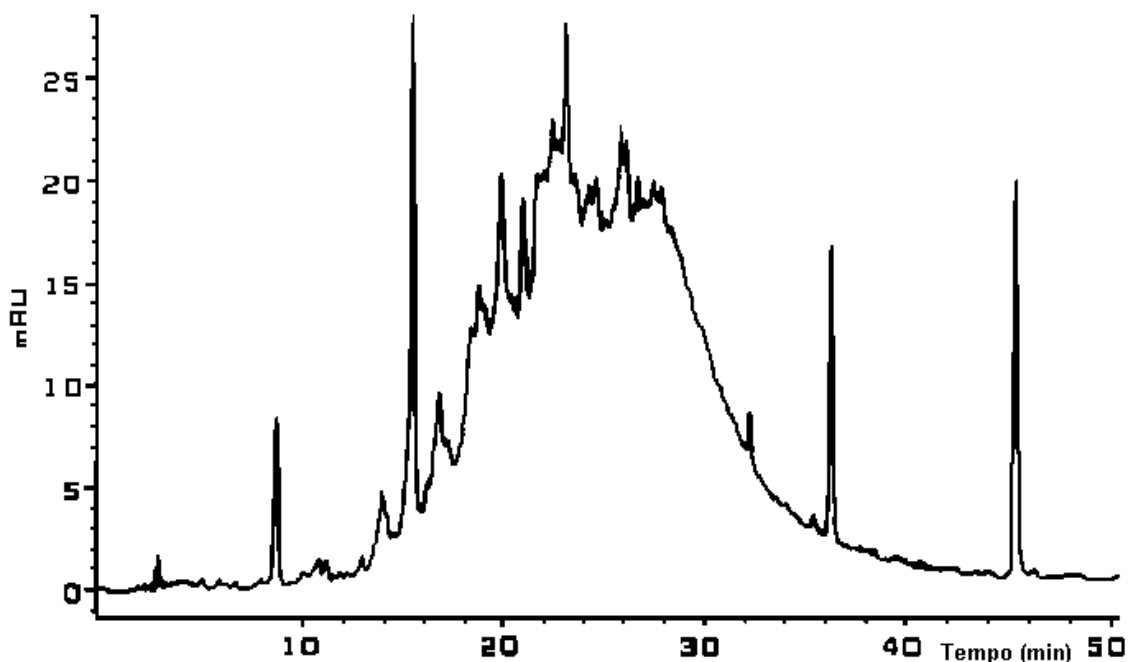


Figura 12. Cromatograma do extrato metanol:água da resina (gradiente 1) obtido por CLAE, no canal 365 ± 150 nm.

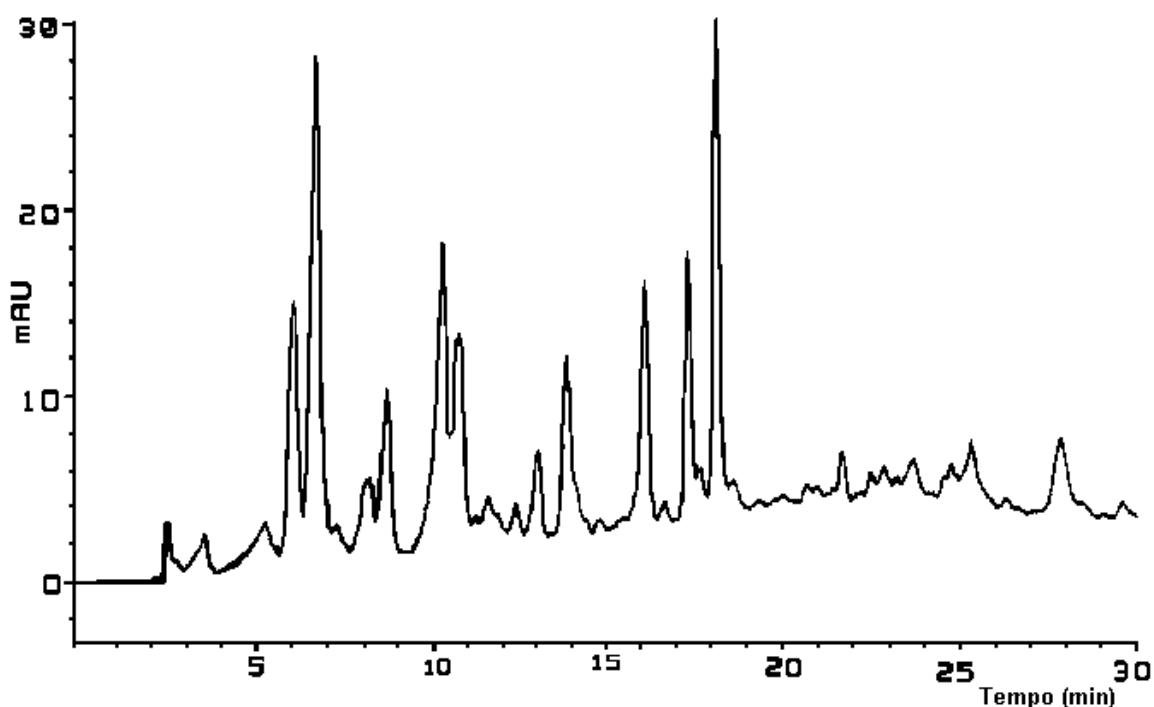
Tabela 16. Compostos identificados no extrato metanol:água da resina de eucalipto

Composto	Tempo de retenção (min.)
Ácido gálico	8,8
Elagitanino	15,5
Polímeros complexos	17-34
Ácido elágico	36,2
Derivado do vanilol (?)	45,5

O cromatograma dos produtos de hidrólise ácida da resina (Figura 13), obtido por CLAE revelou, além dos constituintes mencionados anteriormente, os ácidos benzóico, cinâmico e derivados deles, bem como outros elagitaninos (Tabela 17). A comparação das Figuras 12 e 13 sugere que a hidrólise degradou os polímeros complexos resultando nos compostos citados na Tabela 17. Além disso, a hidrólise ácida da resina revelou os compostos aromáticos (entre 12 e 39 minutos) na própolis. Este resultado é muito importante porque reforça a idéia de que estes compostos seriam os responsáveis pelo alto valor da própolis brasileira.

Tabela 17. Compostos identificados na solução hidrolítica da resina de eucalipto

Composto	Tempo de retenção (min.)
Ácido gálico	3,5
Derivados dos ácidos benzóico e cinâmico	5-15
Elagitanino	16,1 e 17,5
Ácido elágico	18,3
Derivado do vanilol (?)	28,0

Figura 13. Cromatograma da solução hidrolítica da resina (gradiente 2), obtido por CLAE, no canal 365 ± 150 nm.

Comparando-se a Tabela 13 (p. 45) com a Tabela 14 (p. 46), verifica-se que em ambas sobressaem os açúcares (que não poderiam ter sido detectados por CLAE). Causa estranheza a ausência dos componentes observados na Tabela 15. Entretanto, eles não foram observados nos cromatogramas obtidos por cromatografia a gás porque existem em quantidades muito menores que os açúcares e não puderam ser detectados nas condições empregadas. Portanto, os carboidratos constituem a maior parte dos constituintes do extrato aquoso da própolis

marrom ME. Estes resultados mostram que diversas técnicas de análise devem ser utilizadas neste tipo de estudo porque elas se complementam e dão uma visão mais ampla da totalidade.

4.3. Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas

4.3.1. Análise do óleo essencial da amostra PSB

O cromatograma do óleo essencial da própolis PSB é mostrado na Figura 14.

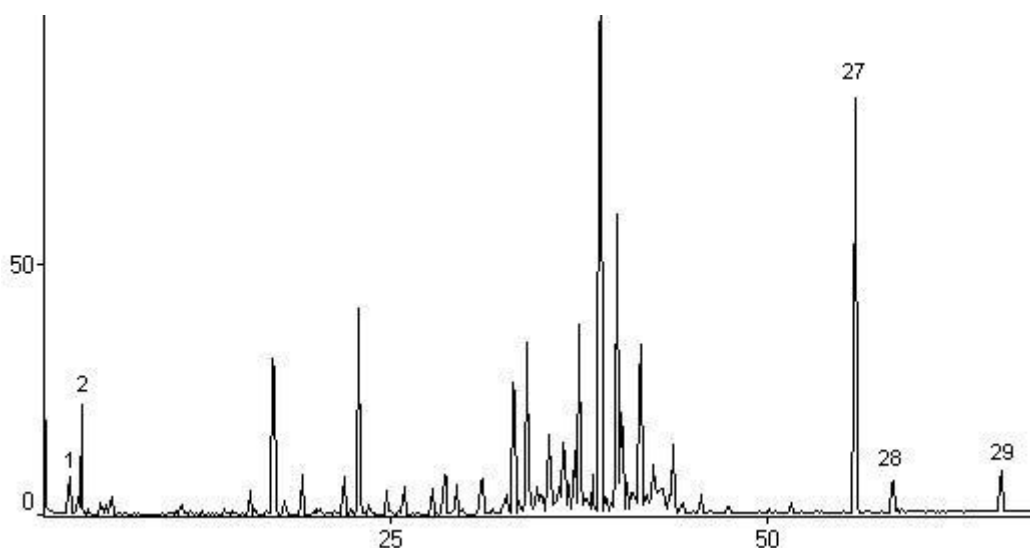


Figura 14. Cromatograma do óleo essencial da própolis Santa Bárbara, obtido por CG/EM.

A Figura 15 mostra uma expansão da região central da Figura 14.

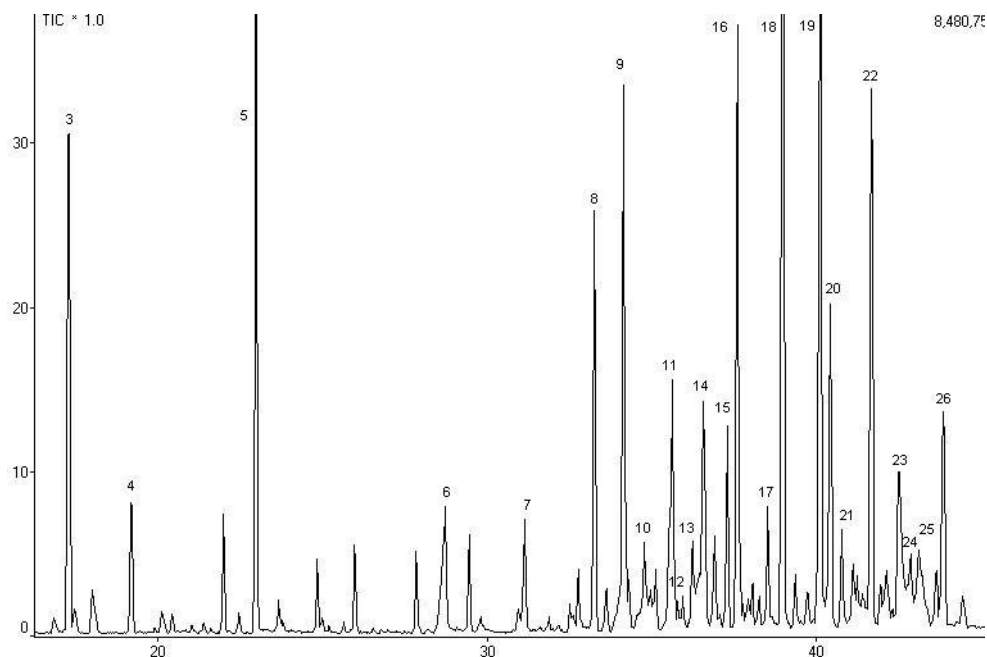


Figura 15. Expansão da região central do cromatograma do óleo essencial da própolis Santa Bárbara, obtido por CG/EM.

Os compostos encontrados neste óleo são mostrados na Tabela 18.

Tabela 18. Constituintes do óleo essencial da PSB identificados por CG/EM

Número do pico	Tempo de retenção (min)	Composto	Área %
1	3,79	Ácido isobutírico	1,29
2	4,62	Diclorometano (contaminação)	1,37
3	17,29	Linalol	3,69
4	21,99	α -Terpineol	0,96
5	22,98	2,3-diidrobenzofurano	5,35
6	28,74	Ácido hidrocinâmico	2,46
7	31,15	α -Copaeno	1,27
8	33,27	<i>Trans</i> -cariofileno	3,89
9	34,15	Aromadendreno	4,92
10	34,79	α -Humuleno	0,94
11	35,63	Germacreno-d	2,81
12	36,24	n.i.	0,98
13	36,57	Viridifloreno	3,33
14	36,94	n.i.	1,19
15	37,31	γ -Cadineno	1,87
16	37,61	δ -Cadineno	5,51
17	38,54	n.i.	1,24
18	39,00	Nerolidol	15,00
19	40,13	(+)-Espatulenol	9,41
20	40,44	n.i.	3,25
21	40,79	n.i.	1,15
22	41,68	5-(2,5-dimetilfenil)-2(3H)-furanona	4,86

23	42,52	(-)-Espatulenol	2,74
24	42,88	n.i.	1,14
25	43,13	n.i.	1,20
26	43,86	Aromadendrenoepóxido	2,35
27	55,96	m/z 256	13,44
28	58,43	Icosano	0,96
29	65,65	Tricosano	1,93

n.i. = não identificado.

4.3.2. Análise do óleo essencial da amostra PSG

O cromatograma do óleo essencial da própolis PSG é mostrado na Figura 16.

Os compostos identificados por CG/EM na amostra PSG são mostrados na Tabela 19.

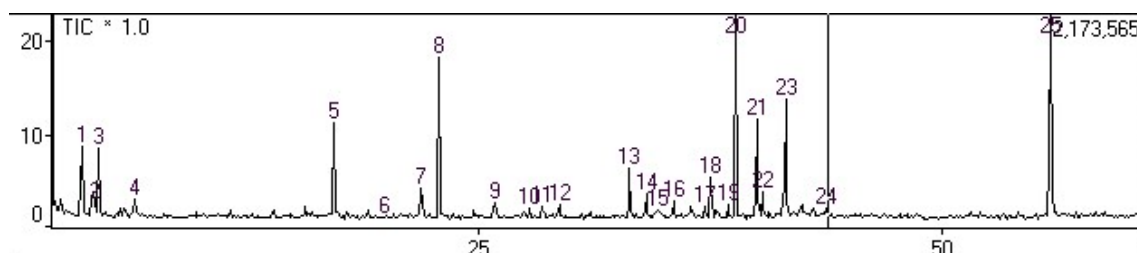


Figura 16. Cromatograma do óleo essencial da própolis São Gotardo obtido por CG/EM.

Tabela 19. Constituintes do óleo essencial da própolis PSG identificados por CG/EM

Número do pico	Tempo de retenção (min)	Composto	Área %
1	3,67	Ácido isobutírico	3,15
2	4,41	Ácido butanóico	1,10
3	4,60	Diclorometano (contaminação)	2,24
4	6,56	Álcool furfurílico	1,09
5	17,24	Linalol	5,55
6	19,98	n.i.	1,12
7	21,93	α -Terpineol	2,33
8	22,90	2,3-diidrobzofurano	11,68
9	25,94	Hidrocínâmato de metila	1,63
10	27,80	n.i.	1,17
11	28,48	Ácido hidrocínâmico	1,62
12	29,42	n.i.	1,41
13	33,21	Trans-cariofileno	3,42
14	34,10	Aromadendreno	1,94
15	34,75	α -Humuleno	1,28

16	35,58	Germacreno-d	1,42
17	37,26	δ -Cadineno	1,25
18	37,55	Δ -Cadineno	2,84
19	38,49	n.i.	1,20
20	38,91	Nerolidol	18,96
21	40,06	(+)-Espatulenol	6,76
22	40,36	n.i.	2,07
23	41,61	Ácido 2,5-dimetil- γ -oxo-fenil- butanóico	8,64
24	43,81	Aromadendrenoepóxido	1,23
25	55,88	m/z 256	14,90

n.i. = não identificado.

A análise dos constituintes dos dois óleos essenciais das amostras PSB e PSG, mostra que eles são muito semelhantes e ricos, principalmente, em nerolidol, um composto de massa 256 não identificado, 2,3-diidrobenzofurano, *trans*-cariofileno, aromadendreno, ácido hidrocinâmico, (+)-espatulenol, cadineno, linalol, aromadendreno epóxido e alcanos de cadeia longa.

4.3.3. Análise do óleo essencial da flor de assa-peixe

O cromatograma do óleo essencial da flor de assa-peixe é mostrado na Figura 17. Os compostos identificados por CG/EM no óleo essencial da flor de assa-peixe são mostrados na Tabela 20.

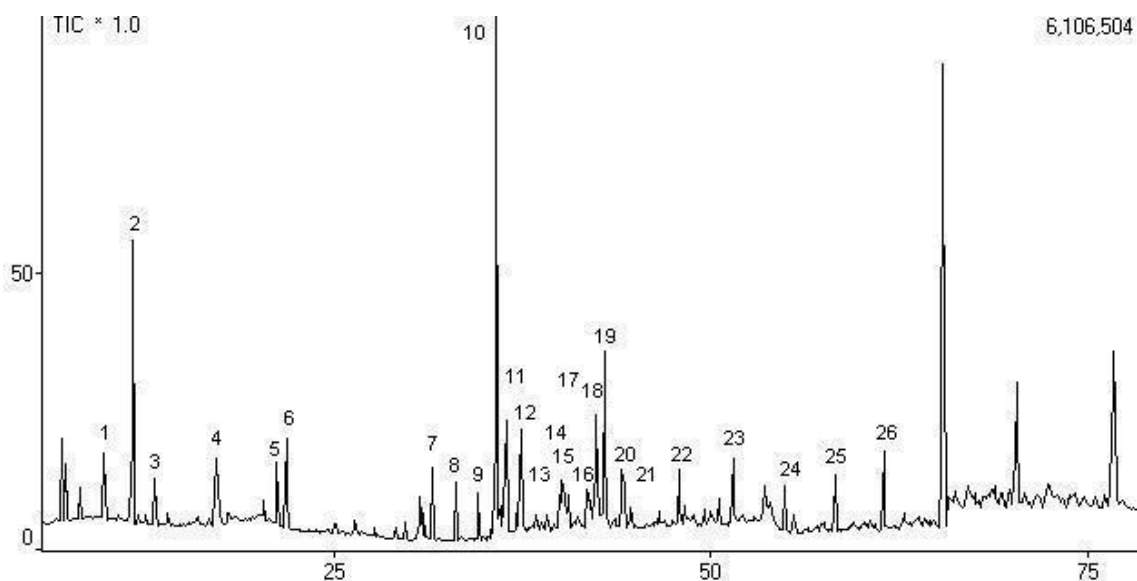


Figura 17. Cromatograma do óleo essencial da flor do assa-peixe obtido por CG/EM.

Tabela 20. Constituintes do óleo essencial da flor de assa-peixe identificados por CG/EM

Número do Pico	Tempo de retenção (min)	Compostos	Área %
1	9,79	α -pineno	2,28
2	11,67	β -pineno	4,79
3	13,18	1,4-diclorobenzeno	1,71
4	17,17	Linalol/ α -terpinoleno	2,20
5	21,27	4-terpineol	1,47
6	21,88	α -terpineol	1,75
7	31,56	Tetradecano	1,98
8	33,13	<i>Trans</i> -cariofileno	1,34
9	34,64	α -Humuleno	1,45
10	35,85	Germacreno-d	10,63
11	36,50	Biciclogermacreno	3,26
12	37,47	δ -cadineno	2,68
13	40,18	Hexadecano	1,72
14	40,64	Óxido de cariofileno	1,52
15	41,80	Veridiflorol	1,32
16	41,98	n.i.	1,46
17	42,48	δ -cadinol	4,39
18	42,63	Epi- α -cadinol	1,78
19	43,00	α -cadinol	4,72
20	44,00	Heptadecano	1,85
21	44,31	14-hidroxi-9-epi-(E)-cariofileno	2,04
22	47,95	Octadecano	1,71
23	51,60	Nonadecano	2,01
24	55,00	Isômero do Icosano	1,40
25	58,30	Icosano	1,71

26	61,55	Docosano	2,30
27	65,45	Tricosano	18,67
28	70,40	Tetracosano	6,29
29	76,80	Pentacosano	10,58

n.i. = não identificado.

4.3.4. Análise do óleo essencial da flor de eucalipto

A Figura 18 mostra o cromatograma do óleo essencial da flor de eucalipto obtido por CG/EM.

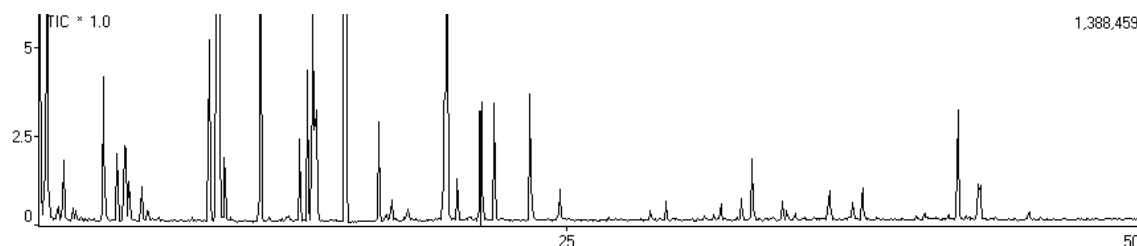


Figura 18. Cromatograma do óleo essencial da flor do eucalipto obtido por CG/EM.

A Tabela 21 relaciona os principais compostos identificados no óleo essencial da flor de eucalipto.

Tabela 21. Constituintes no óleo essencial da flor de eucalipto identificados por CG/EM

Número do pico	Tempo de retenção (min)	Composto	Área %
1	9,44	α -tujeno	2,16
2	9,81	α -pineno	44,94
3	11,68	β -pineno	3,34
4	13,38	α -terpineno	1,08
5	13,72	<i>p</i> -cimeno	1,82
6	13,96	L-limoneno	3,23
7	14,12	1,8-cineol (eucaliptol)	1,96
8	15,37	γ -terpineno	24,07
9	16,84	α -terpinoleno	1,35
10	19,69	Isopulegol	1,53
11	19,81	Citronelal	5,02
12	21,28	4-terpineol	3,23
13	21,88	α -terpineol	1,87
14	23,43	β -citronelol	1,70
15	33,12	<i>Trans</i> -cariofileno	0,96
16	42,09	Junipeno	1,75

4.3.5. Análise do óleo essencial da folha de maria-preta

A Figura 19 mostra o cromatograma do óleo essencial da folha de maria-preta e a Tabela 22 relaciona os compostos identificados por CG/EM.

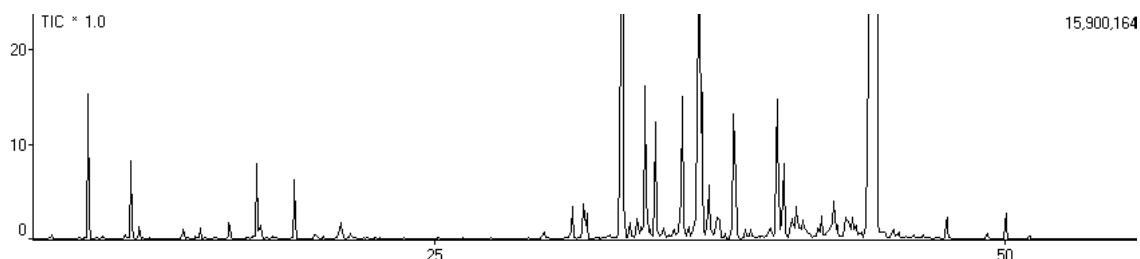


Figura 19. Cromatograma do óleo essencial da folha de maria-preta, obtido por CG/EM.

Tabela 22. Constituintes do óleo essencial da folha de maria-preta identificados por CG/EM

Número do pico	Tempo de retenção (min)	Composto	Área %
1	9,81	α -pineno	2,38
2	11,69	β -pineno	1,45
3	17,20	Linalol	1,37
4	18,87	Dióxido de Limoneno	1,22
5	33,24	<i>Trans</i> -cariofileno	17,59
6	34,25	(<i>E</i>)- β -farneseno	3,16
7	34,70	α -humuleno	2,66
8	35,88	Germacreno-d	3,21
9	36,58	Biciclogermacreno	6,93
10	36,73	β -bisaboleno	3,17
11	37,03	n.i.	1,34
12	38,12	β -selineno	2,63
13	38,23	Nerolidol	1,05
14	40,03	(+)-Espatulenol	3,37
15	40,33	Óxido de cariofileno	2,21
16	44,29	Acetato de (<i>E</i>)-nerolidol	37,81
17	44,40	n.i.	8,45

4.3.6. Análise do extrato em diclorometano das folhas de alecrim-do-campo

A Figura 20 mostra o cromatograma do extrato em diclorometano das folhas de alecrim-do-campo obtido por CG/EM e a Tabela 23 relaciona os constituintes identificados.

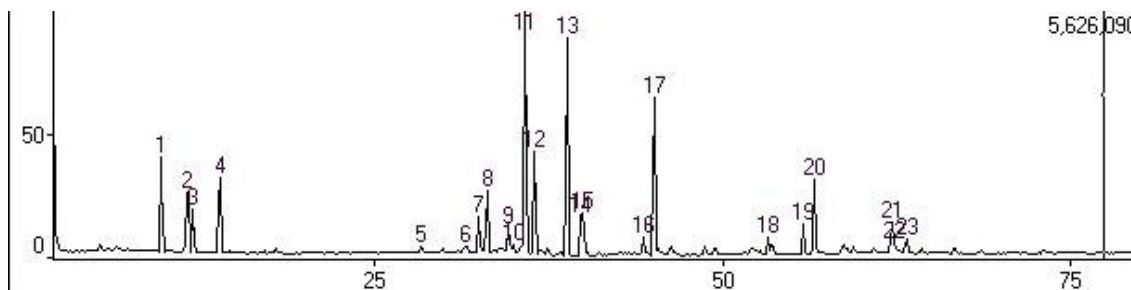


Figura 20. Cromatograma dos constituintes do extrato em diclorometano das folhas de alecrim-do-campo obtido por CG/EM.

Tabela 23. Constituintes do extrato em diclorometano das folhas de alecrim-do-campo identificados por CG/EM

Número do pico	Tempo de retenção (min)	Composto	Área %
1	9,82	α -pineno	4,64
2	11,70	β -pineno	3,28
3	12,07	β -mirceno	2,12
4	13,99	L-limoneno	3,97
5	28,46	Ácido hidrocinâmico	0,93
6	31,67	α -Copaeno	1,04
7	32,55	Ácido hidrocinâmico sililado	2,81
8	33,17	Trans-cariofileno	6,32
9	34,70	α -humuleno	2,07
10	35,04	Aloaromadendreno	1,01
11	35,89	Germacreno-d	18,48
12	36,56	Biciclogermacreno	7,15
13	38,91	Nerolidol	14,63
14	39,91	Germacreno-d-4-ol	2,72
15	40,03	(+)-Espatulenol	2,69
16	44,37	n.i.	1,56
17	45,16	Farnesol	11,29
18	53,31	Ácido 4-hidroxi-cinâmico di-TMS	1,28
19	55,84	m/z 256	2,17
20	56,63	Ácido palmítico	5,12
21	62,18	Henicosano	2,49
22	62,36	n.i.	1,05
23	63,26	n.i.	1,18

n.i. = não identificado.

A comparação dos constituintes do óleo essencial de assa-peixe e do extrato em diclorometano das folhas de alecrim-do-campo indica que

eles são ricos em terpenóides, principalmente em germacrenos; o extrato das folhas de alecrim-do-campo apresentou grande concentração de nerolidol, farnesol e dos ácidos cinâmico, 4-hidroxi-cinâmico, e palmítico, que não apareceram no óleo essencial de assa-peixe, talvez pelo fato deste estar na forma de extrato e não como óleo essencial.

Os compostos encontrados em comum nas amostras de própolis e nas espécies vegetais estudadas, levam a inferir que estas espécies podem fazer parte do pasto apícola das colméias de onde as amostras foram retiradas, com menor probabilidade, a flor de eucalipto, que apresentou poucos compostos em comum. Outras espécies que ainda não foram estudadas, podem contudo, possuir compostos encontrados na própolis.

4.3.7. Análise do extrato em diclorometano do broto do alecrim-do-campo

A Figura 21 mostra o cromatograma do extrato em diclorometano do broto de alecrim-do-campo obtido por CG/EM.

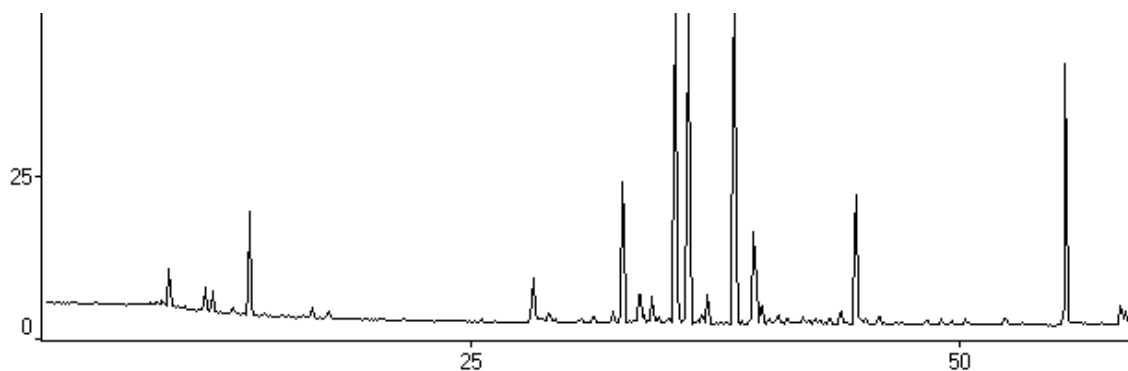


Figura 21. Cromatograma do extrato em diclorometano do broto do alecrim-do-campo, obtido por CG/EM.

A Tabela 24 relaciona os principais compostos identificados no extrato em diclorometano do broto de alecrim-do-campo.

Tabela 24. Principais compostos do extrato em diclorometano do broto de alecrim-do-campo identificados por CG/EM

Número do pico	Tempo de retenção (min)	Composto	Área %
1	9,57	α -pineno	1,27
2	11,43	β -pineno	1,14
3	11,80	β -mirceno	0,89
4	13,69	limoneno	3,53
5	28,22	ácido hidrocinâmico	2,83
6	32,78	<i>Trans</i> -cariofileno	5,86
7	33,66	Aromadendreno	1,42
8	34,29	α -Humuleno	1,30
9	35,48	Germacreno-d	16,20
10	36,16	Biciclogermacreno	16,82
11	37,12	δ -cadineno	1,21
12	38,51	Nerolidol	24,50
13	39,48	Guaiol ou Cadinol	3,84
14	39,61	(+) Espatulenol	1,68
15	39,91	n.i.	1,06
16	44,72	Acetato de (E)-nerolidol	5,82
17	55,43	m/z 256	10,65

n.i. = não identificado.

Pode-se perceber com base nas tabelas acima apresentadas, que o alecrim-do-campo, é sem dúvida uma das plantas que participam do pasto apícola das colméias nas quais as amostras de própolis PSB e PSG foram coletadas.

Tanto o broto quanto a folha de alecrim-do-campo, apresentaram constituintes em comum com as duas amostras de própolis verde. Embora tenham sido encontrados apenas traços de α e β -pineno nas amostras de própolis, elas estão em maior concentração na folha e no broto de alecrim-do-campo. Certamente durante o processo de elaboração da própolis eles se volatilizam.

A flor de eucalipto e a folha de maria-preta também podem contribuir para a formação da própolis, mas vale ressaltar que o fato dos compostos serem encontrados na própolis somente implica na coincidência dos compostos estarem presentes na amostra e nas plantas, e não implica necessariamente que estes compostos tenham sido retirados

destas plantas. Pode haver degradação de compostos ou serem produtos do metabolismo secundário em comum.

Entretanto, chama a atenção o pico de m/z 256 referente ao composto com tempo de retenção por volta de 55 minutos, da Figura 21, cujo espectro de massas é apresentado na Figura 71 (p. 119). Tal composto foi detectado em várias amostras de própolis e também no broto e na folha de alecrim-do-campo, não tendo sido encontrado em nenhum banco de dados de espectros de massas ou em outra espécie vegetal ou extrato analisado. Apesar disso, o seu espectro de massas (Figura 71, p.119), sugere tratar-se de um composto que poderia possuir núcleo aromático (fragmento de m/z 91, característico do íon tropílio), e também ramificação insaturada devido aos picos da série característica de fragmentos oriundos deste tipo de cadeia carbônica (m/z 69, 55 e 41).

Muitos dos compostos encontrados na folha de maria-preta foram encontrados nas amostras de própolis PSB e PSG, o que reforça a idéia que essa espécie pode integrar o pasto apícola das colméias que produziram estas própolis.

A Tabela 25 relaciona os principais compostos encontrados em comum nos cinco extratos vegetais e nas duas amostras de própolis de Santa Bárbara (PSB) e São Gotardo (PSG).

Tabela 25. Tabela comparativa dos constituintes de extratos em diclorometano de cinco amostras vegetais e de duas amostras de própolis, identificados por CG/EM

Pico	Tempo de retenção (min)	Composto	Áreas %						
			PSB	PSG	Broto de alecrim -do- campo	Folha de Alecrim -do- campo	Flor de Eucalipto	Flor de assa peixe	Folha de Maria preta
1	3,79	Ácido isobutírico	1,29	3,15	-	-	-	2,28	-
2	4,41	Ácido butanóico	-	1,10	-	-	-	4,79	-
3	4,62	Diclorometano (contaminação)	1,37	2,24	-	-	-	-	-
4	5,79	contaminante	-	-	-	-	1,11	-	-
5	9,44	α -tujeno	-	-	-	-	2,14	-	-
6	9,81	α -pineno	traços	traços	1,27	4,64	44,44	-	2,38
7	11,68	β -pineno	traços	traços	1,14	3,28	3,30	-	1,45
8	12,07	β -mirceno	-	-	0,89	2,12	-	-	-
9	13,18	1,4-diclorobenzeno	-	-	-	-	1,71	-	-
10	13,38	α -terpineno	-	-	-	-	1,07	-	-
11	13,72	p-cimeno	-	-	-	-	1,80	-	-
12	13,99	L-limoneno	-	-	3,53	3,97	3,19	-	-
13	14,12	1,8-cineol (eucaliptol)	-	-	-	-	1,94	-	-
14	15,37	γ -terpineno	-	-	-	-	23,80	-	-
15	16,84	α -terpinoleno	-	-	-	-	1,33	-	-
16	17,29	Linalol	3,69	5,55	-	-	-	-	1,37
17	18,87	Dióxido de Limoneno	-	-	-	-	-	-	1,22
18	19,69	Isopulegol	-	-	-	-	1,51	-	-
19	19,81	citronela	-	-	-	-	4,96	-	-
20	19,98	n.i.	-	1,12	-	-	-	-	-

21	21,27	4-ternipeol	-	-	-	-	3,19	1,47	-
22	21,99	α -Terpineol	0,96	2,33	-	-	1,85	1,75	-
23	22,98	2,3-diidrobenzofurano	5,35	11,68	-	-	-	-	-
24	25,94	Hidrocinamato de metila	-	1,63	-	-	-	-	-
25	27,80	n.i.	-	1,17	-	-	-	-	-
26	28,74	Ácido hidrocinâmico	2,46	1,62	2,83	0,93	-	-	-
27	31,15	α -copaeno	1,27	-	-	1,04	-	-	-
28	31,56	Tetradecano	-	-	-	-	-	1,98	-
29	33,27	<i>trans</i> -cariofileno	3,89	3,42	5,86	2,81	0,95	1,34	-
30	34,15	Aromadendreno	4,92	1,94	1,42	-	-	-	17,59
31	34,79	α -Humuleno	0,94	1,28	1,30	2,07	-	1,45	2,66
32	35,04	Alloaromadendreno	-	-	-	1,01	-	-	-
33	35,63	Germacreno-d	2,81	1,42	16,20	18,48	-	10,63	3,21
34	36,24	n.i. (m/z 204)	0,98	-	-	-	-	-	-
35	36,50	Biciclogermacreno	3,33	-	16,82	7,15	-	3,26	6,93
36	36,73	β -bisaboleno	-	-	-	-	-	-	3,17
37	36,94	n.i. (m/z 202)	1,19	-	-	-	-	-	-
38	37,03	n.i. (m/z 204)	-	-	-	-	-	-	1,34
39	37,31	γ -Cadineno	1,87	1,25	-	-	-	2,68	-
40	37,61	δ -Cadineno	5,51	1,20	1,21	-	-	-	-
41	38,12	β -selineno	-	-	-	-	-	-	2,63
42	38,54	n.i.	1,24	1,20	-	-	-	-	-
43	39,00	Nerolidol	15,00	18,96	24,50	14,63	-	-	1,05
44	39,48	Guaiol ou Cadinol	-	-	3,84	-	-	-	-
45	39,91	Germacreno-d-4-ol	-	-	-	2,72	-	-	-
46	40,13	(+)-Espatuleno	9,41	6,76	1,68	2,69	-	-	3,37
47	40,18	Hexadecano	-	-	-	-	-	1,72	-
48	40,44	n.i.	3,25	2,07	1,06	-	-	-	-
49	40,64	Óxido de cariofileno	-	-	-	-	-	1,52	2,21

50	40,79	n.i.	1,15	-	-	-	-	-	-
51	41,68	Ácido 2,5-dimetil- γ - oxo-fenil-butanóico 2(3H)-furanona	4,86	m/z 188	-	-	-	-	-
52	41,80	Veridiflorol	-	-	-	-	-	1,32	-
53	41,98	n.i.	-	-	-	-	-	1,46	-
54	42,09	Junipeno	-	-	-	-	1,73	-	-
55	42,48	δ -cadinol	-	-	-	-	-	4,39	-
56	42,52	(-)-Espatuleno	2,74	-	-	-	-	-	-
57	42,63	(-)- δ -cadinol	-	-	-	-	-	1,78	-
58	42,88	n.i.	1,14	-	-	-	-	-	-
59	43,00	α -cadinol	-	-	-	-	-	4,72	-
60	43,13	n.i.	1,20	-	-	-	-	-	-
61	43,86	Aromadendrenoepóxido	2,35	1,23	-	-	-	-	-
62	44,00	Heptadecano	-	-	-	-	-	1,85	-
63	44,29	Acetato de (E)- nerolidol	-	-	5,82	-	-	-	37,81
64	44,31	1,4-hidroxi-9-epi-(E)- cariofileno	-	-	-	-	-	2,04	-
65	44,37	n.i.	-	-	-	1,56	-	-	-
66	44,40	Isomero do nerolidol	-	-	-	-	-	-	8,45
67	47,95	Octadecano	-	-	-	-	-	1,71	-
68	55,96	m/z 256 *	13,44	14,90	10,65	2,17	-	-	-
69	56,63	Ácido palmítico mono-TMS (contaminado)	-	-	-	5,12	-	-	-
70	58,30	Henicosano	-	-	-	-	-	1,71	-
71	58,43	Icosano	0,96	-	-	-	-	-	-
72	61,55	Docosano	-	-	-	-	-	2,30	-
73	62,18	Ácido de cadeia longa	-	-	-	2,49	-	-	-

74	62,36	Ácido de cadeia longa	-	-	-	1,05	-	-	-
75	63,17	Ácido de cadeia longa	-	-	-	1,18	-	-	-
76	65,65	Tricosano	1,93	-	-	-	-	18,67	-
77	70,40	Tetracosano	-	-	-	-	-	6,29	-
78	76,80	Pentacosano	-	-	-	-	-	10,58	-

n.i = não-identificado

* O composto de m/z 256 não foi identificado.

4.3.8. Análise do extrato clorofórmico da amostra PSB

O cromatograma do extrato clorofórmico da amostra PSB não forneceu outros constituintes além de alcanos e ácidos de grande massa molar. No entanto, após derivatização com BSTFA obtiveram-se melhores resultados, mostrados na Figura 22. Os compostos identificados são apresentados na Tabela 26.

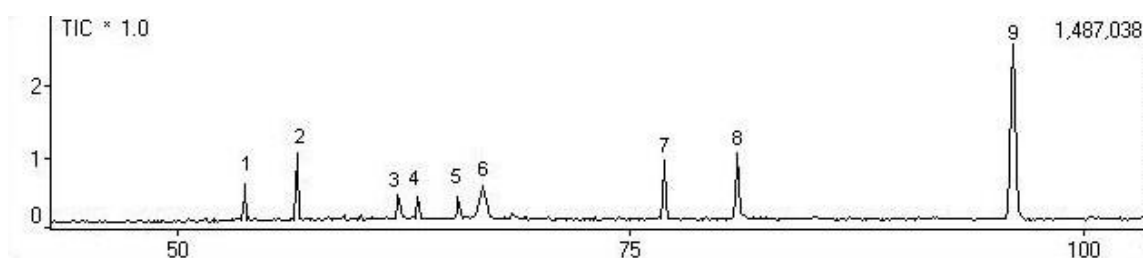


Figura 22. Cromatograma do extrato clorofórmico derivatizado com BSTFA obtido por CG/EM.

Tabela 26. Constituintes do extrato clorofórmico da amostra PSB identificados por CG/EM

Número do pico	Tempo de Retenção	Nome do composto
1	53,77	Hexadecanol TMS
2	56,65	Ácido palmítico TMS
3	62,20	Ácido linoléico TMS
4	63,30	Ácido esteárico TMS
5	65,50	Dodecosano
6	66,94	Tricosano
7	76,92	Pentacosano
8	80,96	1,1-dioctil-ftalato (contaminante)
9	96,17	Nonacosano

4.3.9. Análise da fração em acetato de etila da amostra PSB

A fração em acetato de etila da amostra PSB (vide Figura 7, p. 24) foi eluído com diclorometano pela coluna cromatográfica de sílica-gel e as cem frações coletadas foram analisadas por CG/EM, à medida que o perfil espectrofotométrico se alterava. Os principais produtos identificados e seus respectivos tempos de retenção nestas frações são mostrados na Tabela 27.

Tabela 27. Compostos identificados nas frações diclorometano advindas da cromatografia de coluna de sílica-gel, identificados por CG/EM

Número da fração	Tempo de retenção (min)	Nome do Composto
09	34,17	9-epi-(E)-14-hidroxi-cariofileno
09	50,00 a 80,00	Alcanos de cadeia longa (14 a 25 C)
10	55,98	m/z 256
11	25,92	Hidrocinamato de metila
13	52,61	Palmitato de metila
13	58,54	Elaidato de metila
13	58,38	Linoleilaidato de metila
26	61,81	álcool de grande massa molecular
28	38,94	Nerolidol
35	62,68	Ácido linoléico
57	61,60	álcool de grande massa molecular

Dos compostos apresentados na Tabela 26, os cinco primeiros e o composto de massa 256, referente à fração 10, já foram detectados nos óleos essenciais e em alguns dos extratos acima estudados. Com exceção do nerolidol, todos são componentes comuns de própolis. Este composto foi identificado, porém, nas análises do extrato da folha e do broto de alecrim-do-campo.

4.3.10. Análise do extrato em diclorometano da amostra PSB

A Figura 23 mostra o cromatograma do extrato em diclorometano da própolis de Santa Bárbara (PSB) e a Tabela 28 relaciona os constituintes identificados com seu tempo de retenção, massa e porcentagem.

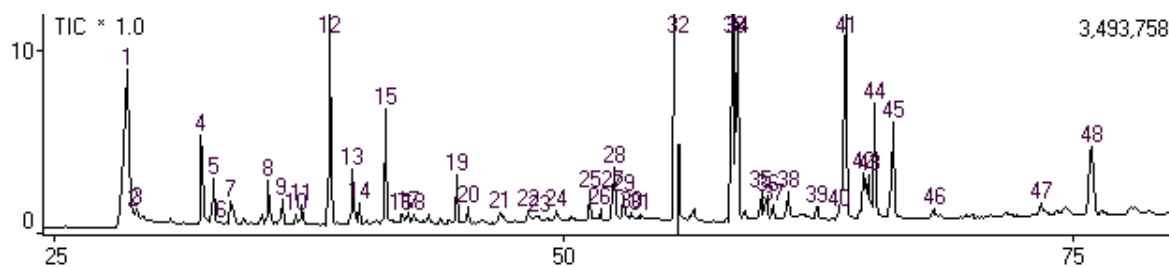


Figura 23. Cromatograma do extrato em diclorometano da própolis PSB, obtido por CG/EM.

Tabela 28. Componentes do extrato em diclorometano da própolis PSB, identificados por CG/EM

Pico	Tempo de Retenção (min)	Massa Molar	Composto	% TIC
1+2	28,76	150	Ácido diidrocinâmico	7,55
3	29,05	178	Etil éster do ácido diidrocinâmico	0,56
4	32,22	222	Éster do ácido diidrocinâmico TMS (contaminação com BSTFA)	2,14
5	32,82	204	<i>Trans</i> -cariofileno	0,94
6	33,18	204	<i>Trans-α</i> -bergamoteno	0,39
7	33,69	204	Aromadendreno	0,54
8	35,51	204	Germacreno-D	0,75
9	36,19	204	Biciclogermacreno	0,58
10	36,87	204	<i>α</i> -muuroleno	0,30
11	37,15	204	<i>γ</i> -cadineno	0,39
12	38,54	204	<i>Trans</i> -nerolidol	3,64
13	39,68	220	(+)-Espatuleno	0,93
14	39,97	222	Globulol	0,40
15	41,23	188	5-(2,5-dimetilfenil)-2(3H)-furanona	2,26
16	42,07	220	(-)-Espatuleno	0,41
17	42,38	202	Desmethoxy enecalina	0,33
18	42,68	222	<i>α</i> -cadinol	0,34
19	44,75	222	2- <i>cis</i> ,6- <i>trans</i> -farnesol	0,87
20	45,29	220	14-hidroxi- <i>α</i> -humuleno	0,39
21	46,86	164	Ácido <i>p</i> -coumárico	0,59
22	48,21	236	n.i.	0,33
23	48,86	218	Xanthorizol	0,29
24	49,70	220	Álcool sesquiterpeno	0,40
25	51,27		n.i.	0,75
26	51,83		n.i.	0,34
27	52,31	220	álcool sesquiterpeno	0,72
28	52,52	230	n.i.	1,19
29	52,95	308	di-TMS éster do ácido <i>p</i> -coumárico (contaminado com BSTFA)	0,65
30	53,30	256	Ácido Palmítico	0,28
31	53,74		n.i.	0,36
32	55,53	256	m/z 256	40,31
33	58,34	270	m/z 270	5,36

34	58,59	270	Isômero m/z 270	3,47
35	59,72		n.i.	0,58
36	59,97	270	Isômero m/z 270	0,74
37	60,31		n.i.	0,34
38	61,03	272	n.i.	1,13
39	62,47	268	n.i.	0,35
40	63,56		n.i.	0,31
41	63,88	270	Isômero m/z 270	6,32
42	64,74		n.i.	1,16
43	64,98	310	Docosano	1,06
44	65,32		n.i.	2,80
45	64,24		n.i.	3,08
46	68,19		n.i.	0,27
47	73,50	338	Tetracosano	0,62
48	75,90		Pentacosano	2,46

4.4. Cromatografia a gás de alta resolução em altas temperaturas acoplada à espectrometria de massas (CGAR-AT-EM) das amostras PSB e PSG

Foram obtidos seis cromatogramas com a técnica CGAR-AT-EM para as amostras PSB e PSG extraídas seqüencialmente com os solventes: diclorometano, acetona e metanol (vide item 3.5.2. p. 30).

4.4.1. Extratos em diclorometano

Os cromatogramas das amostras PSB e PSG em diclorometano são mostrados na Figura 24. Os compostos identificados nos cromatogramas dos extratos em diclorometano das amostras PSB e PSG estão relacionados na Tabela 29.

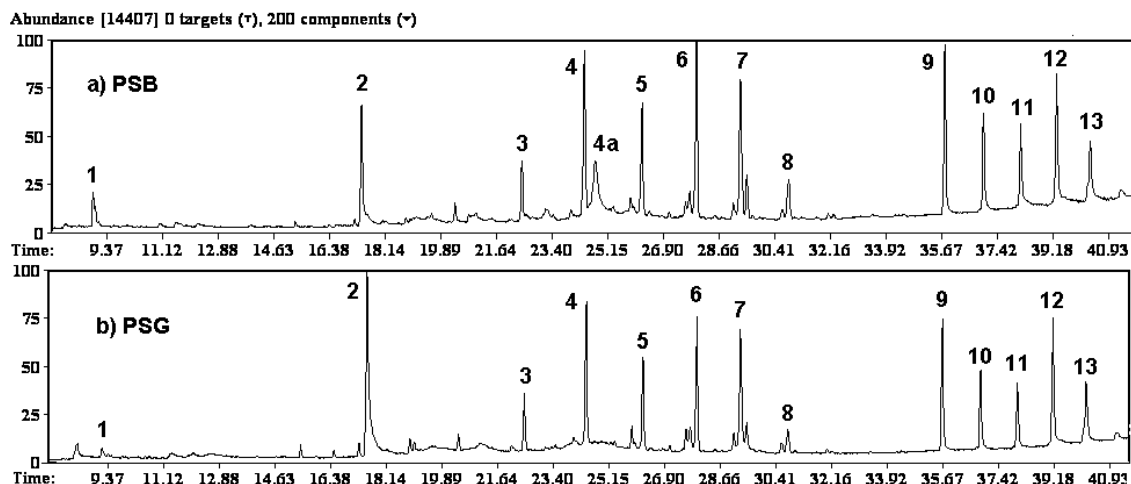


Figura 24. Cromatogramas dos extratos em diclorometano das amostras a) PSB e b) PSG obtidos por CGAR-AT-EM.

Tabela 29. Constituintes do extrato em diclorometano da própolis PSB e PSG, identificados por CGAR-AT-EM

Número do Pico	Tempo de Retenção (min)	Nome do Composto	Área %	
			PSB	PSG
1	8,96	Ácido hidrocínâmico TMS	1,86	1,24
2	17,19	m/z 256	7,36	14,98
3	22,45	Alcano de cadeia longa	2,93	2,68
4	24,42	Alcano de cadeia longa	7,94	8,68
4a	24,76	n.i.	8,55	-
5	26,23	Alcano de cadeia longa	5,25	4,77
6	27,95	Alcano de cadeia longa	8,84	6,39
7	29,33	Alcano de cadeia longa	8,49	-
8	30,84	Alceno ou álcool de cadeia longa	2,46	7,37
9	35,76	Etil éster do Ácido palmítico	8,48	6,41
10	36,98	Butil éster do Ácido palmítico	5,14	4,37
11	38,15	Éster do Ácido palmítico	4,98	3,69
12	39,28	Éster do Ácido palmítico	8,44	7,48
13	40,34	Éster do Ácido palmítico	4,12	4,22

n.i. = não identificado.

Os espectros de massas dos principais constituintes analisados por CGAR-AT-EM nas amostras PSB e PSG são mostrados nas Figuras 25 a 38. As duas amostras exibem os mesmos espectros de massa com exceção do pico 4a da amostra PSB (T.R. 24,76 minutos), não encontrado na amostra PSG.

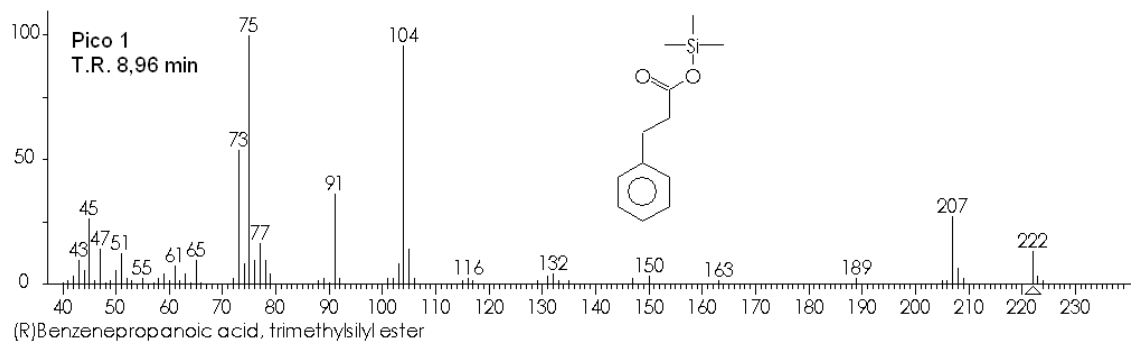


Figura 25. Espectro de massas do pico 1 do extrato em diclorometano das amostras PSB e PSG.

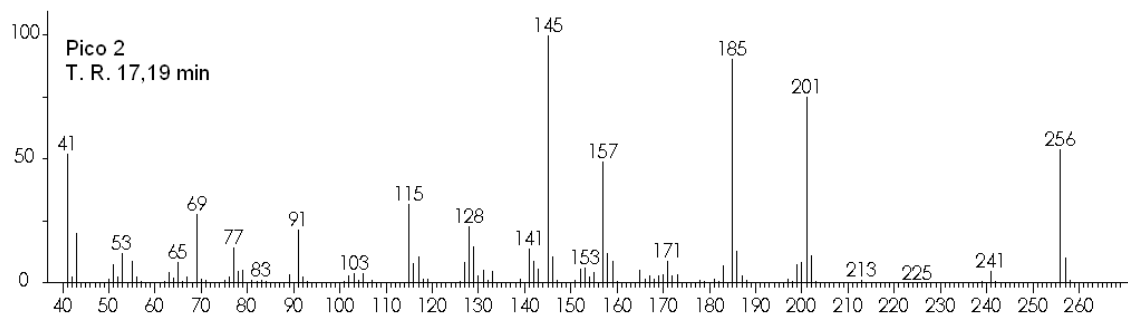


Figura 26. Espectro de massas do pico 2 do extrato em diclorometano das amostras PSB e PSG.

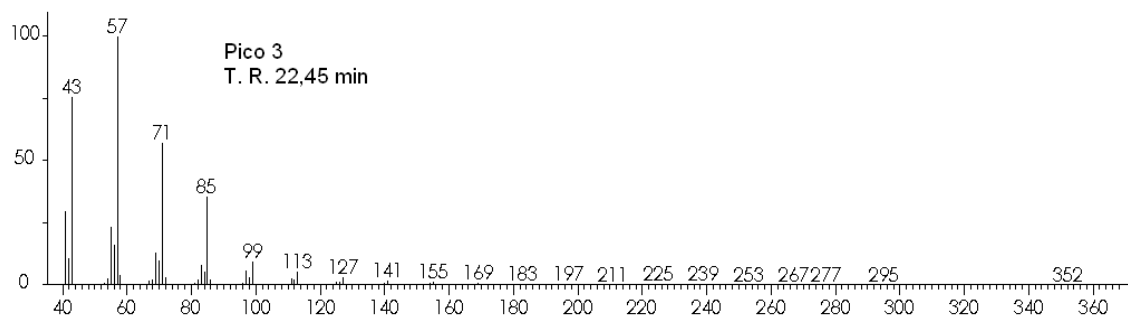


Figura 27. Espectro de massas do pico 3 do extrato em diclorometano das amostras PSB e PSG.



Figura 28. Espectro de massas do pico 4 do extrato em diclorometano das amostras PSB e PSG.

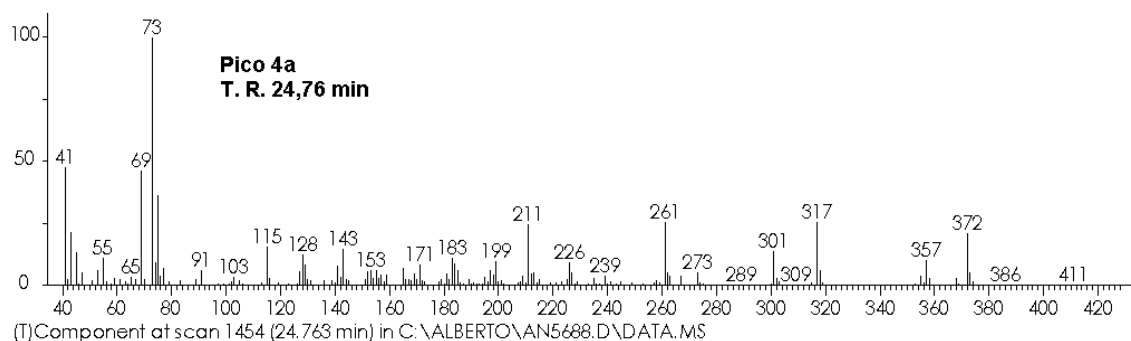


Figura 29. Espectro de massas do pico 4a do extrato em diclorometano da amostra PSB.



Figura 30. Espectro de massas do pico 5 do extrato em diclorometano das amostras PSB e PSG.

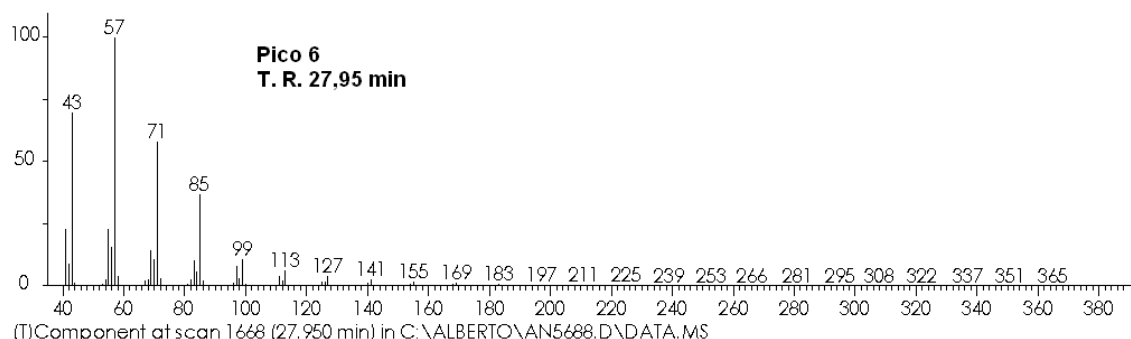


Figura 31. Espectro de massas do pico 6 do extrato em diclorometano das amostras PSB e PSG.

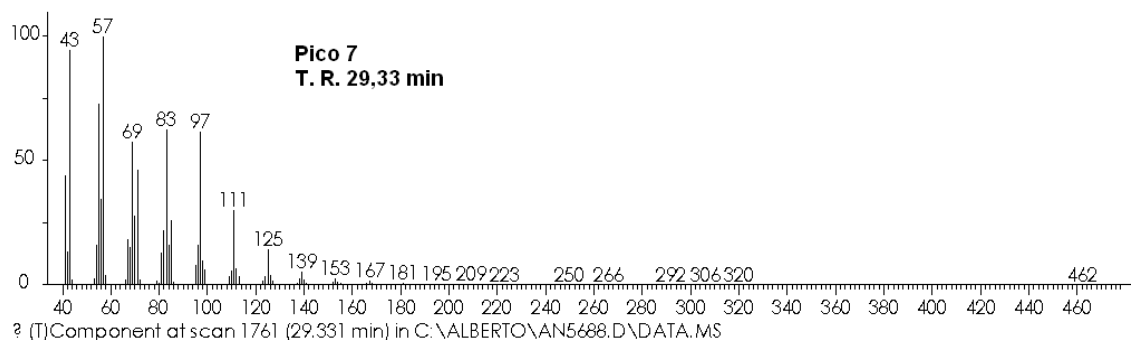


Figura 32. Espectro de massas do pico 7 do extrato em diclorometano das amostras PSB e PSG

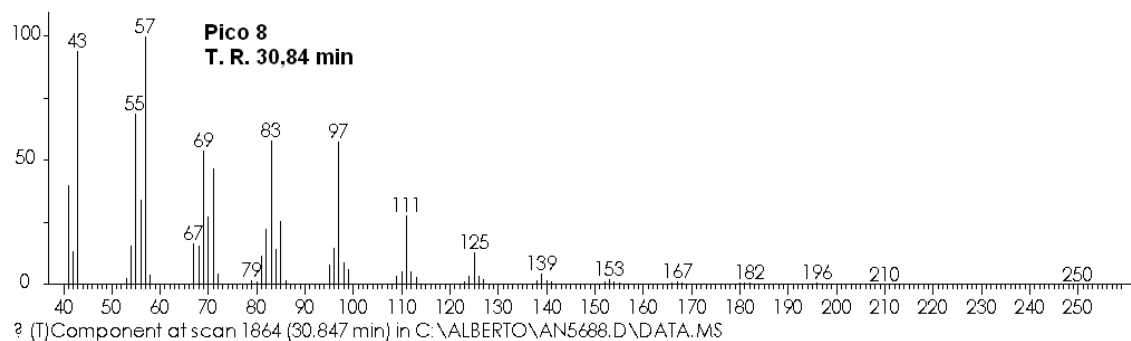


Figura 33. Espectro de massas do pico 8 do extrato em diclorometano das amostras PSB e PSG.

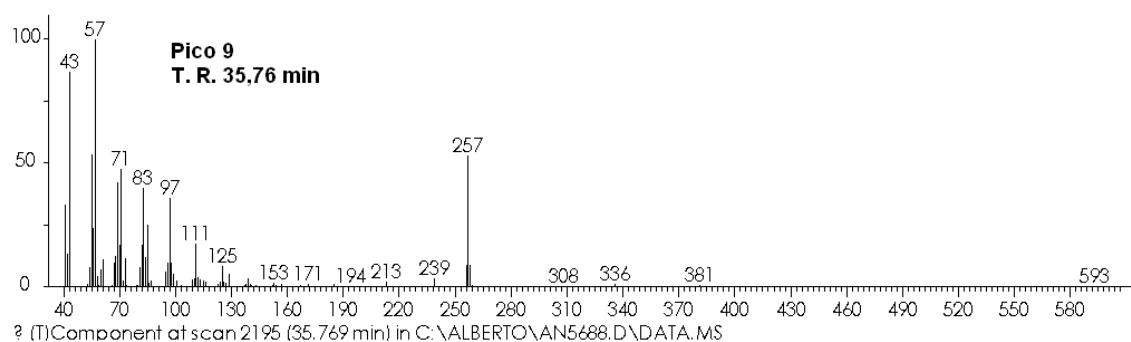


Figura 34. Espectro de massas do pico 9 do extrato em diclorometano das amostras PSB e PSG.

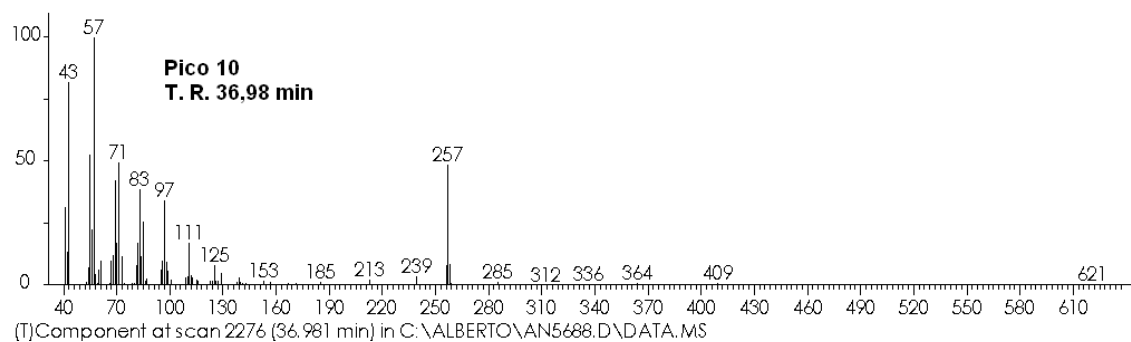


Figura 35. Espectro de massas do pico 10 do extrato em diclorometano das amostras PSB e PSG.

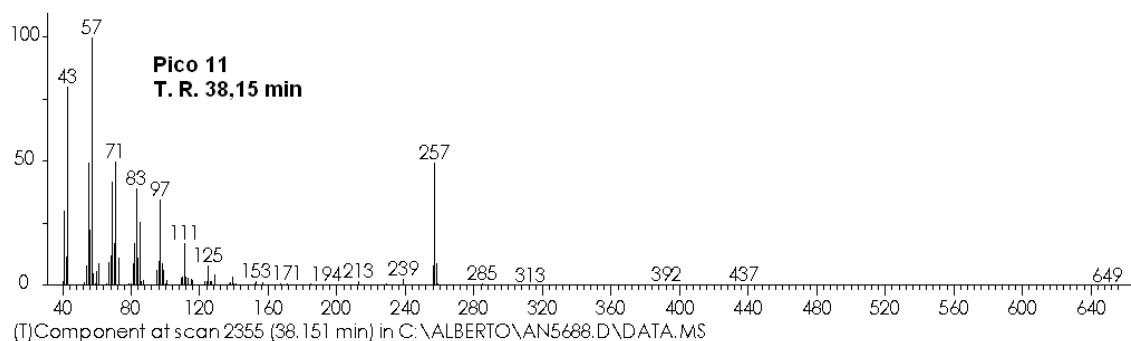


Figura 36. Espectro de massas do pico 11 do extrato em diclorometano das amostras PSB e PSG.

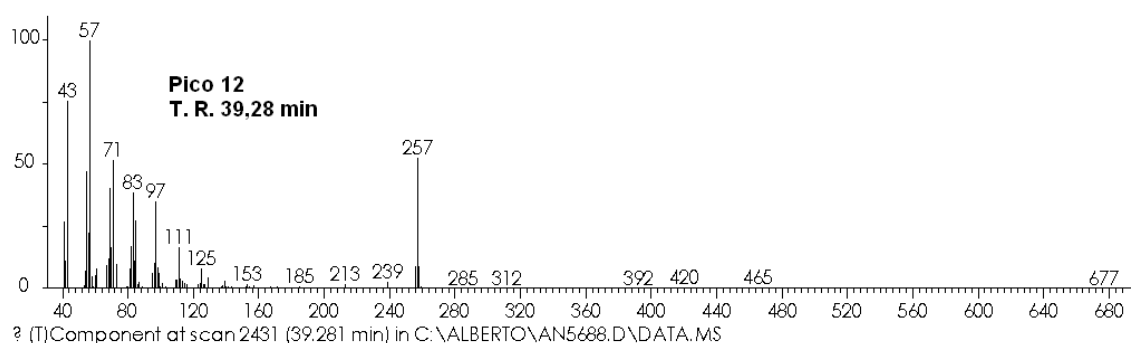


Figura 37. Espectro de massas do pico 12 do extrato em diclorometano das amostras PSB e PSG.

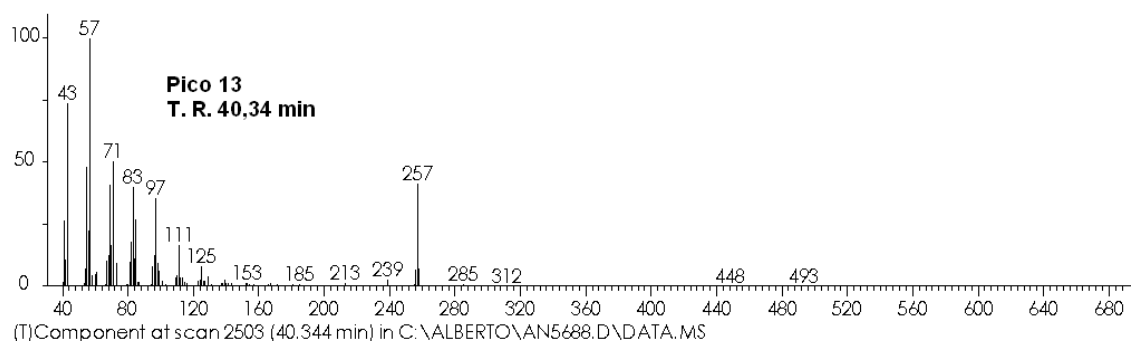


Figura 38. Espectro de massas do pico 13 do extrato em diclorometano das amostras PSB e PSG.

A biblioteca do aparelho sugere pelo padrão de fragmentação que os compostos seriam álcoois, alcanos e alcenos de cadeia longa, mas não permite a identificação com segurança.

A comparação dos perfis cromatográficos da Figura 24 e os constituintes detectados e relacionados na Tabela 29, sugerem que os dois extratos têm constituição similar, com diferenças nas abundâncias encontradas.

Os picos de número 2 das amostras PSB (17,19 min) e PSG (17,39 min) são do composto não identificado, de massa m/z 256. O componente associado ao pico com m/z 270 aparece em baixíssima concentração nos tempos de 18,81 e 18,93 min, respectivamente, sendo mais visível no cromatograma da amostra PSG.

A amostra PSG apresentou maior teor de ceras em massa, o que certamente aumenta a quantidade de compostos de cadeia longa.

O perfil cromatográfico semelhante confirma os constituintes em comum encontrados para as amostras de própolis PSB e PSG.

4.4.2. Extratos em acetona

As Figuras 39 e 40 mostram os cromatogramas obtidos para as amostras PSB e PSG em acetona, respectivamente.

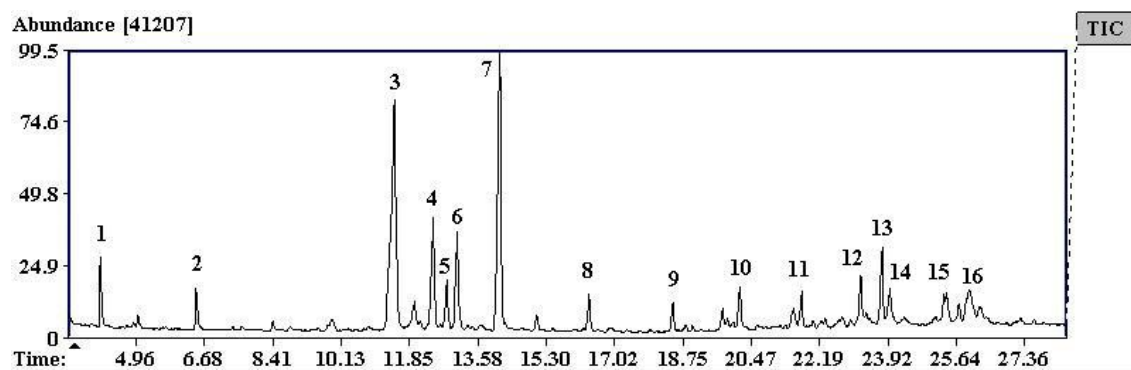


Figura 39. Cromatograma do extrato acetônico da própolis PSB obtido por CGAR-AT-EM

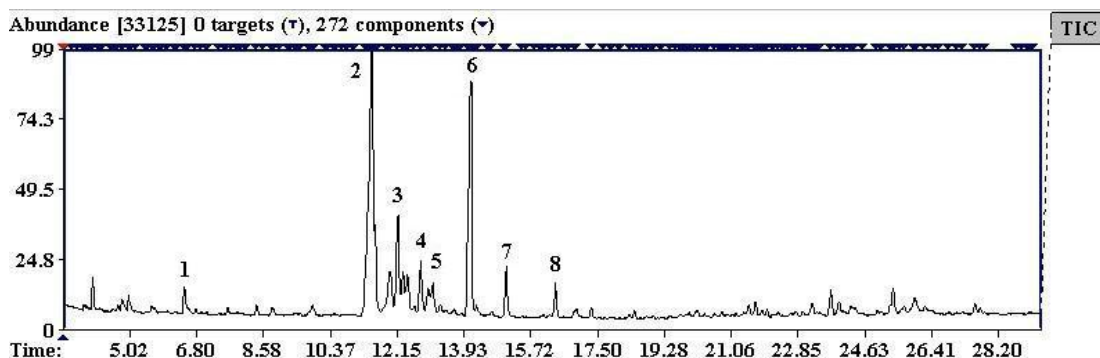


Figura 40. Cromatograma do extrato acetônico da própolis PSG, obtido por CGAR-AT-EM.

As Tabelas 30 e 31 relacionam os compostos identificados por CGAR-AT-EM nos extratos acetônicos das própolis PSB e PSG.

Tabela 30. Constituintes do extrato acetônico da própolis PSB identificados por CGAR-AT-EM

Número do Pico	Tempo de Retenção (min)	Nome do composto	Área %
1	4,07	n.i.	2,13
2	6,47	Ácido hidrocínâmico TMS	1,57
3	11,48	Açúcar desconhecido	19,43
4	12,45	α -D-Manopiranoose, 1,2,3,4,6-pentakis-TMS	6,24
5	12,79	Arabitol 5-TMS	2,34
6	13,06	Açúcar desconhecido	5,18
7	14,13	Ácido <i>p</i> -hidroxicinâmico-TMS-éster	16,40
8	16,38	Ácido 3,4-diidroxí-cinâmico TMS-éster	1,50
9	18,49	n.i.	1,31
10	20,17	Açúcar desconhecido	2,24
11	21,73	n.i.	1,70
12	23,22	n.i.	0,50
13	23,76	n.i.	0,73
14	23,96	n.i.	2,93
15	25,31	n.i.	1,92
16	25,97	Açúcar desconhecido	4,39

n.i. = não identificado.

Tabela 31. Constituintes do extrato acetônico da própolis PSG identificados por CGAR-AT-EM

Número do Pico	Tempo de Retenção (min)	Nome do composto	Área %
1	6,47	Ácido hidrocínâmico TMS	1,37
2	11,47	Açúcar desconhecido	27,89
3	12,18	Açúcar desconhecido	6,42
4	12,79	Arabitol 5 TMS	3,42
5	13,10	Açúcar desconhecido	2,49
6	14,11	Ácido (<i>p</i> -hidroxicinâmico)- <i>p</i> -TMS-éster	16,60
7	15,06	Ácido palmítico TMS	2,66
8	16,38	Ácido 3,4-diidroxí-cinâmico TMS-éster	1,70

A biblioteca do aparelho permite identificar a classe de um composto, por isso alguns compostos foram classificados como açúcares, mas não foi possível determinar exatamente qual açúcar estava presente. Outros compostos não são identificados de maneira alguma.

A semelhança do perfil cromatográfico é vista até os 17,00 minutos. Ao se analisar os constituintes das amostras, nota-se que a amostra PSG possui maior concentração de açúcares, e que a amostra PSB possui picos pouco abundantes na amostra PSG, após o tempo de retenção de 18,00 minutos.

Os extratos acetônicos possuem compostos mais polares, como os açúcares, que não aparecem no extrato em diclorometano. O composto de massa 256 Da não foi observado nos extratos acetônicos.

4.4.3. Extratos em metanol

As Figuras 41 e 42 mostram os cromatogramas obtidos para as amostras PSB e PSG em metanol, respectivamente.

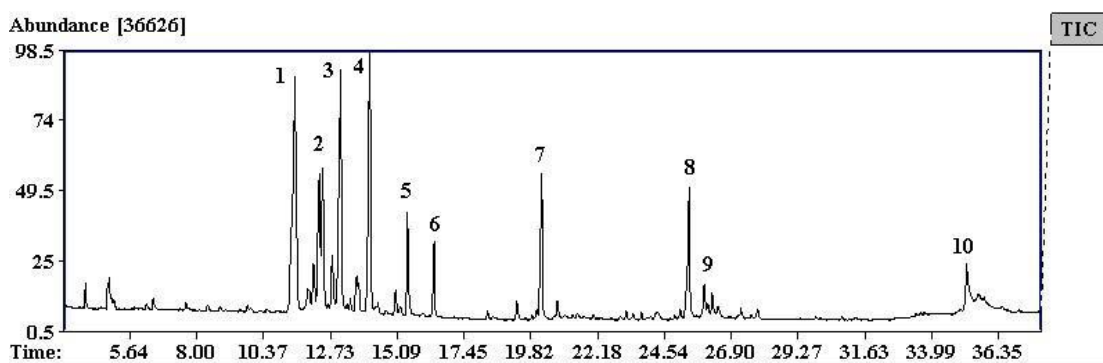


Figura 41. Cromatograma do extrato em metanol da amostra PSB, obtido por CGAR-AT-EM.

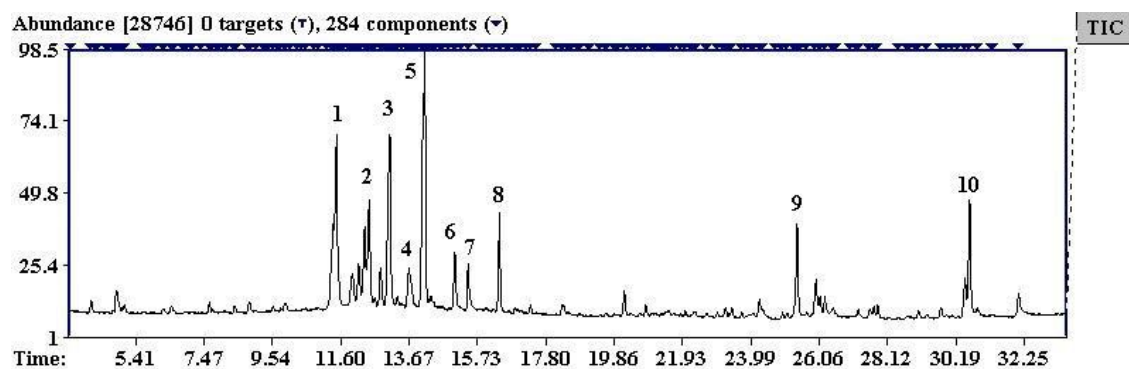


Figura 42. Cromatograma do extrato em metanol da amostra PSG, obtido por CGAR-AT-EM.

As Tabelas 32 e 33 relacionam os compostos encontrados nas análises por CGAR-AT-EM das amostras PSB e PSG em metanol, respectivamente.

Tabela 32. Constituintes do extrato metanólico da própolis PSB identificados por CGAR-AT-EM

Número do Pico	Tempo de Retenção (min)	Nome do composto	Área %
1	11,50	n.i.	15,97
2	12,46	β -D-Glucopiranoose, 1,2,3,4,6-penta TMS	5,82
3	13,10	Inositol, 1,2,3,4,5,6-hexakis-O-TMS	12,37
4	14,14	Glicose 5-TMS	11,76
5	15,46	Açúcar desconhecido	3,47
6	16,40	Ácido 3,4-diidroxii-cinâmico TMS-éster	2,23
7	20,20	n.i.	5,46
8	25,40	n.i.	5,87
9	25,95	n.i.	1,49
10	35,22	n.i.	3,59

n.i. = não identificado.

Tabela 33. Constituintes do extrato metanólico da própolis PSG identificados por CGAR-AT-EM

Número do Pico	Tempo de Retenção (min)	Nome do composto	Área %
1	11,45	n.i.	9,35
2	12,45	beta-D-Glucopiranoose, 1,2,3,4,6-pentakis	5,38
3	13,07	Inositol, 1,2,3,4,5,6-hexakis-O-TMS	9,53
4	13,67	Açúcar desconhecido	3,23
5	14,14	Glicose-5-TMS	15,46
6	15,05	Açúcar desconhecido	2,97
7	15,45	Açúcar desconhecido	2,18
8	16,40	Ácido 3,4-diidroxii-cinâmico TMS-éster	3,57
9	25,40	n.i.	4,57
10	30,62	n.i.	5,18

n.i. = não identificado.

A semelhança dos cromatogramas dos extratos metanólicos de PSB e PSG obtidos por CLAE é também muito grande, principalmente até o tempo de retenção de 17 minutos. No extrato metanólico predominam os compostos polares, notadamente açúcares. Vários compostos não

puderam ser identificados. O composto não-identificado de massa m/z 256 também não foi encontrado neste extrato.

Os cromatogramas dos extratos em diclorometano, acetona e metanol das amostras PSB e PSG obtidos por CGAR-AT-EM permitem inferir que as amostras PSB e PSG possuem alcanos, ácidos e álcoois de cadeia longa, ácidos cinâmico, *p*-hidroxi-cinâmico, hidrocínâmico, 3,4-diidroxí-cinâmico e açúcares diversos.

4.5. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Os extratos aquosos e etanólicos de algumas amostras de própolis foram analisadas por CLAE para a verificação de similaridades de constituintes e perfis cromatográficos. As condições experimentais estão na seção 2.6. p. 19.

4.5.1. Extratos aquosos

São mostrados nas Figuras 43, 44, 45, 46, e 47, os cromatogramas dos extratos aquosos das amostras de própolis Indianópolis (IN), Norte de Minas (NM), Salomon (SAL), Santa Bárbara (PSB) e São Gotardo (PSG) respectivamente, no canal λ 272 nm, referentes à metodologia descrita em 2.6.1. p. 19.

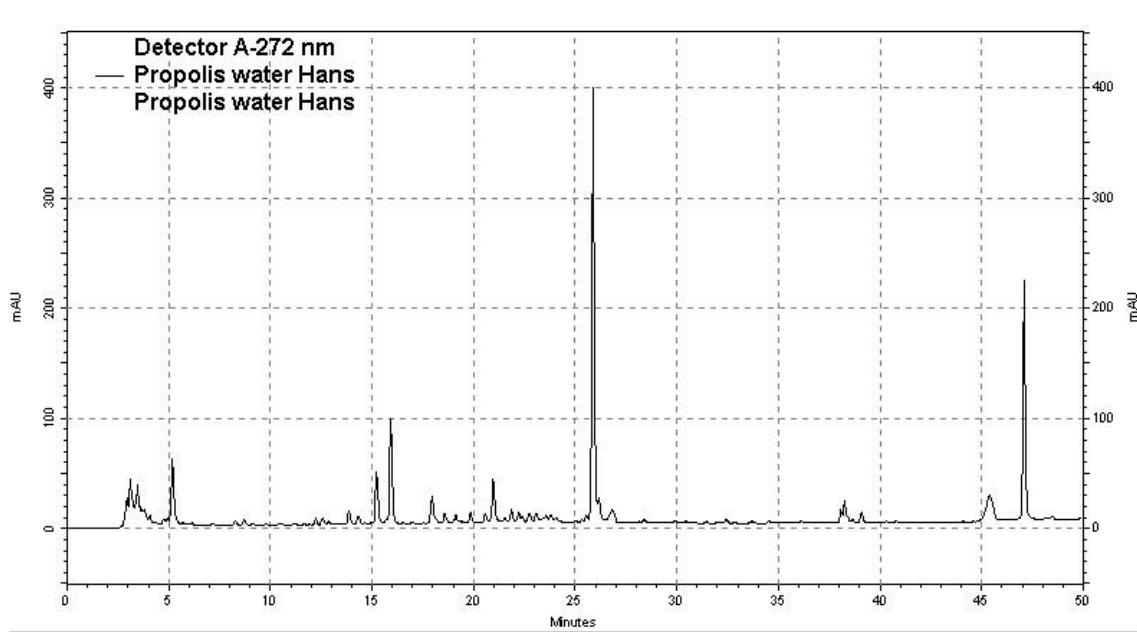


Figura 43. Cromatograma do extrato aquoso da própolis Indianópolis (IN), obtido por CLAE.

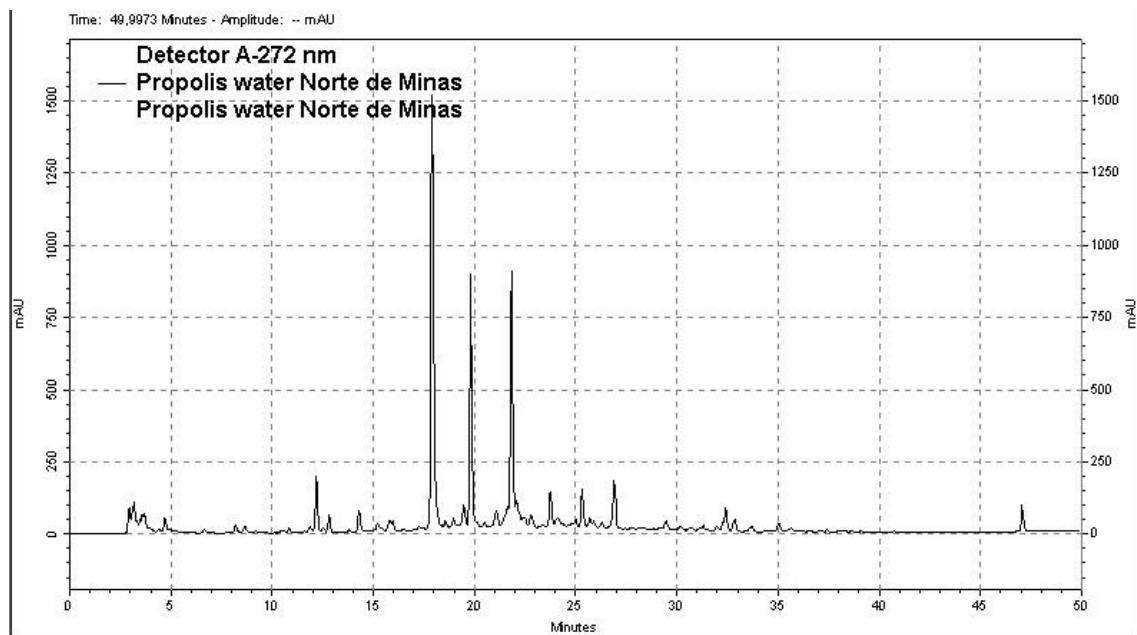


Figura 44. Cromatograma do extrato aquoso da própolis do Norte de Minas (NM), obtido por CLAE.

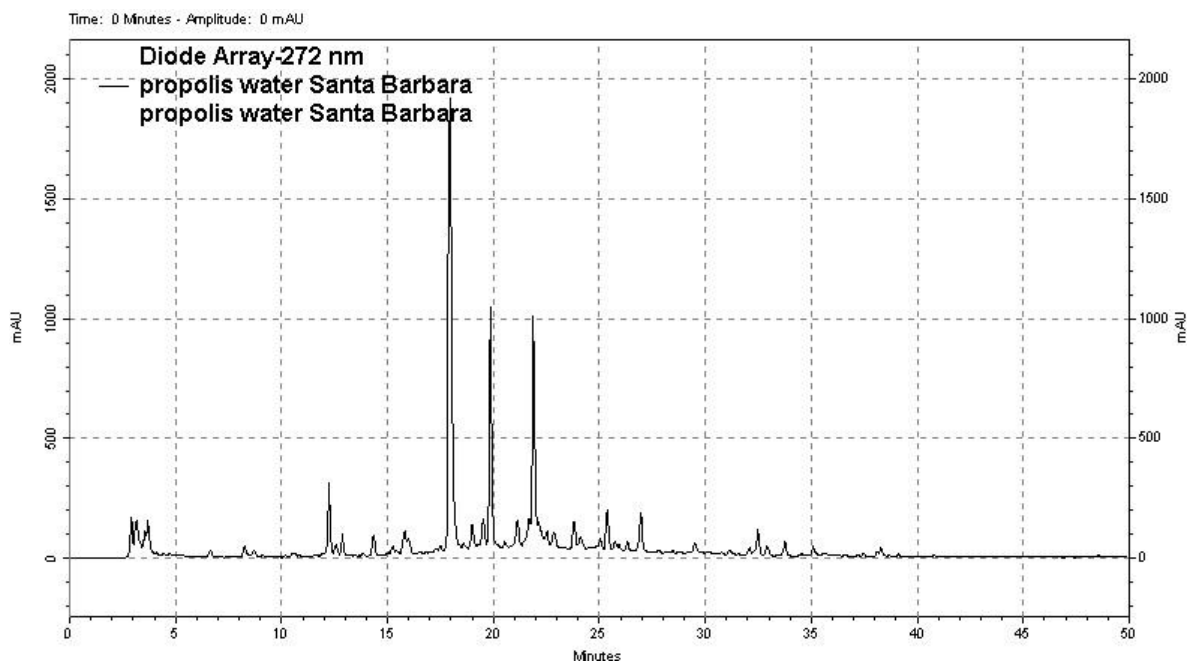


Figura 45. Cromatograma do extrato aquoso da própolis de Santa Bárbara (PSB), obtido por CLAE.

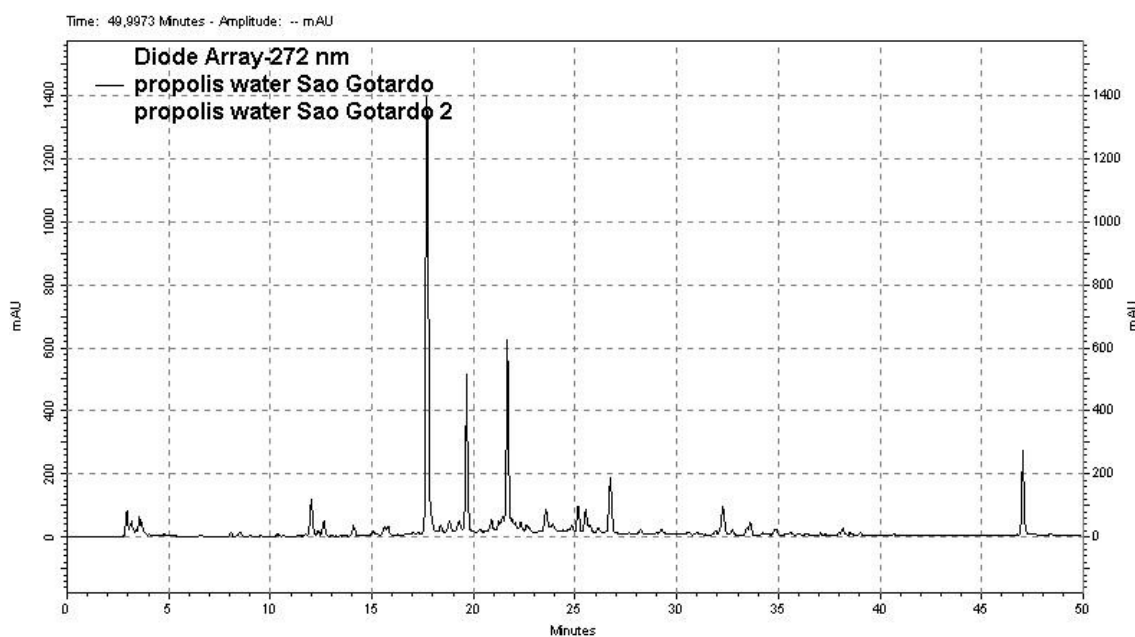


Figura 46. Cromatograma do extrato aquoso da própolis de São Gotardo (PSG), obtido por CLAE.

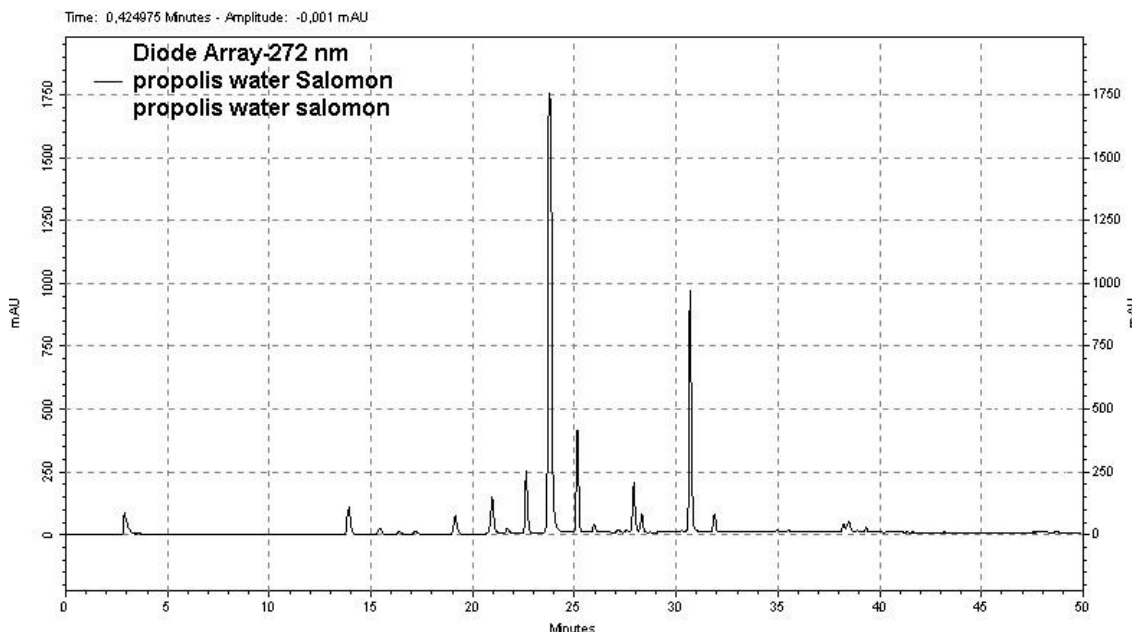


Figura 47. Cromatograma do extrato aquoso da própolis Salomon (SAL), obtido por CLAE.

Os extratos aquosos das própolis PSB, PSG e NM possuem perfis cromatográficos semelhantes, o que permite inferir que as três amostras possuem constituintes em comum.

A amostra aquosa Indianópolis (IN) apresentou poucos constituintes quando comparado com as outras amostras PSG e PSB e a amostra SAL da Dinamarca mostrou um perfil característico de extratos aquosos de própolis européias.

4.5.2. Extratos etanólicos

Seguem nas Figuras 48, 49, 50, 51, 52, e 53, os cromatogramas dos extratos etanólicos de diversas amostras de própolis e do broto de alecrim, respectivamente, detectados no canal 272 nm, obtidos por CLAE, e listadas na Tabela 11, seção 3.6. juntamente com suas procedências. (p. 31).

Ao serem comparados os diversos cromatogramas, percebemos que as amostras de própolis classificadas como verdes têm perfil cromatográfico semelhante. Por outro lado, a amostra Marrom de Tripuí, classificada como marrom, tem um perfil completamente diferente das

amostras verdes, o que sugere que a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) seja capaz de diferenciar os extratos etanólicos de própolis marrons das verdes em um possível controle de qualidade da própolis.

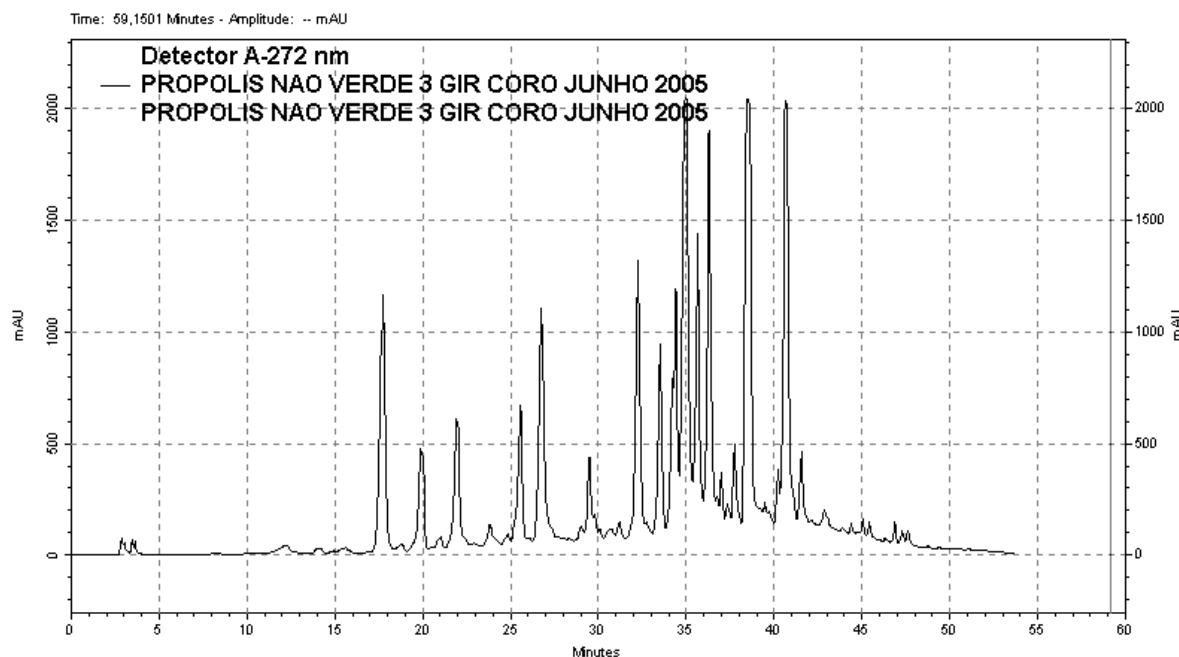


Figura 48. Cromatograma do extrato etanólico da própolis M3 (não-verde), obtido por CLAE.

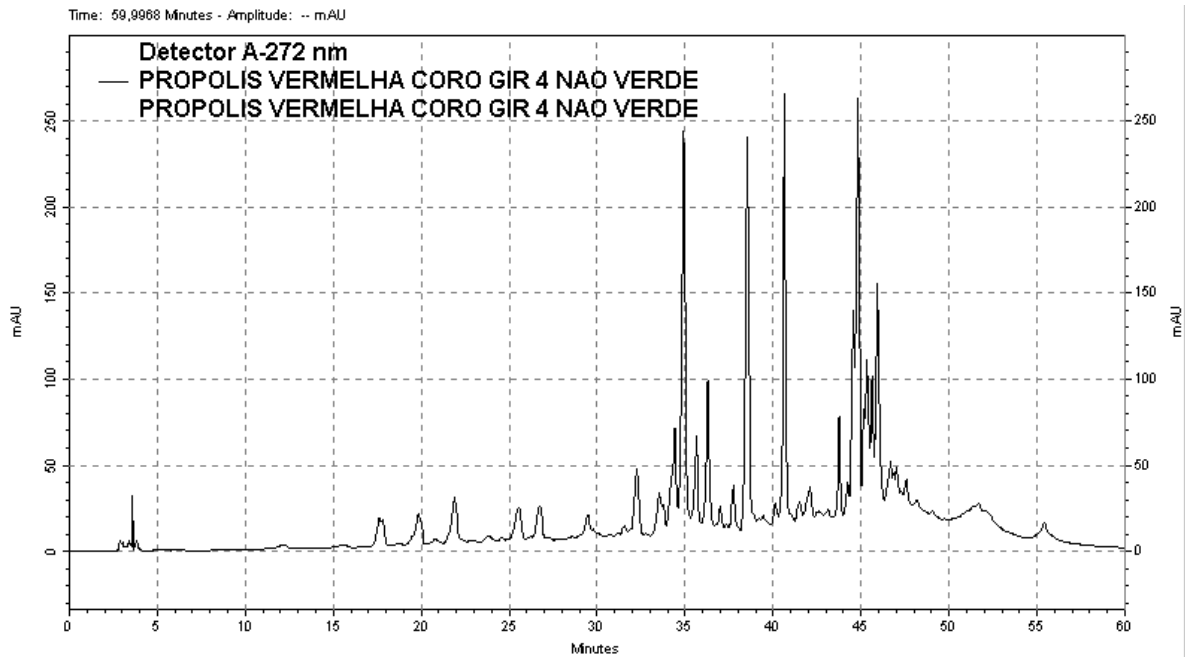


Figura 49. Cromatograma do extrato etanólico da própolis Vermelha (não-verde), obtido por CLAE.

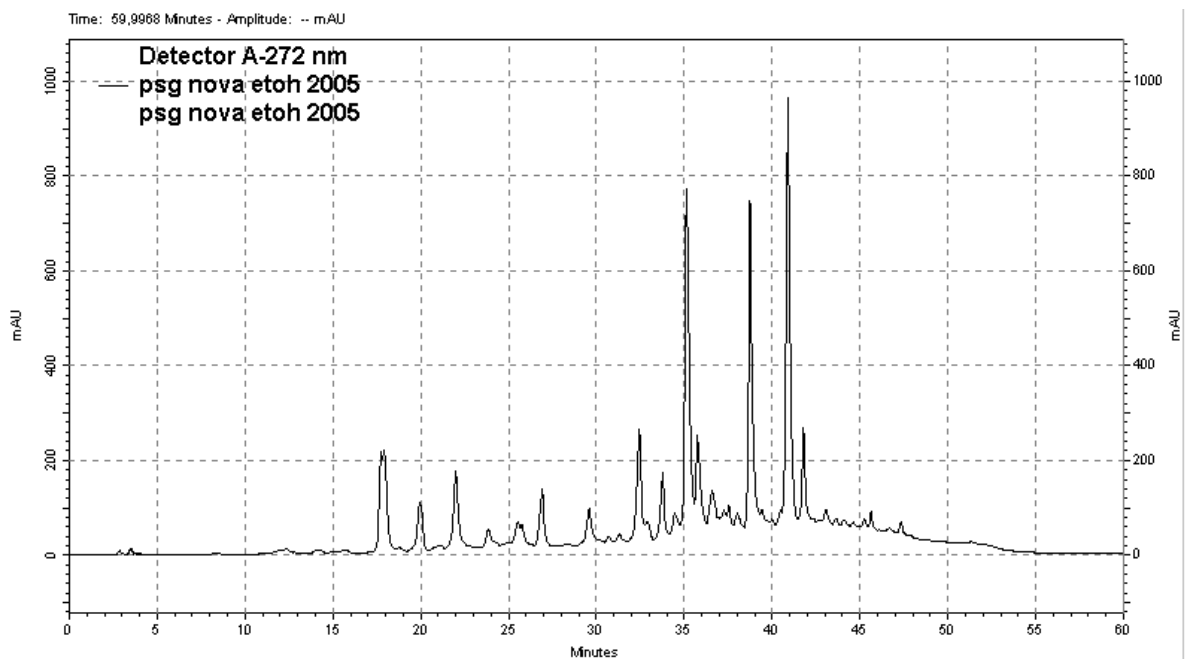


Figura 50. Cromatograma do extrato etanólico da própolis de São Gotardo PSG (verde), obtido por CLAE.

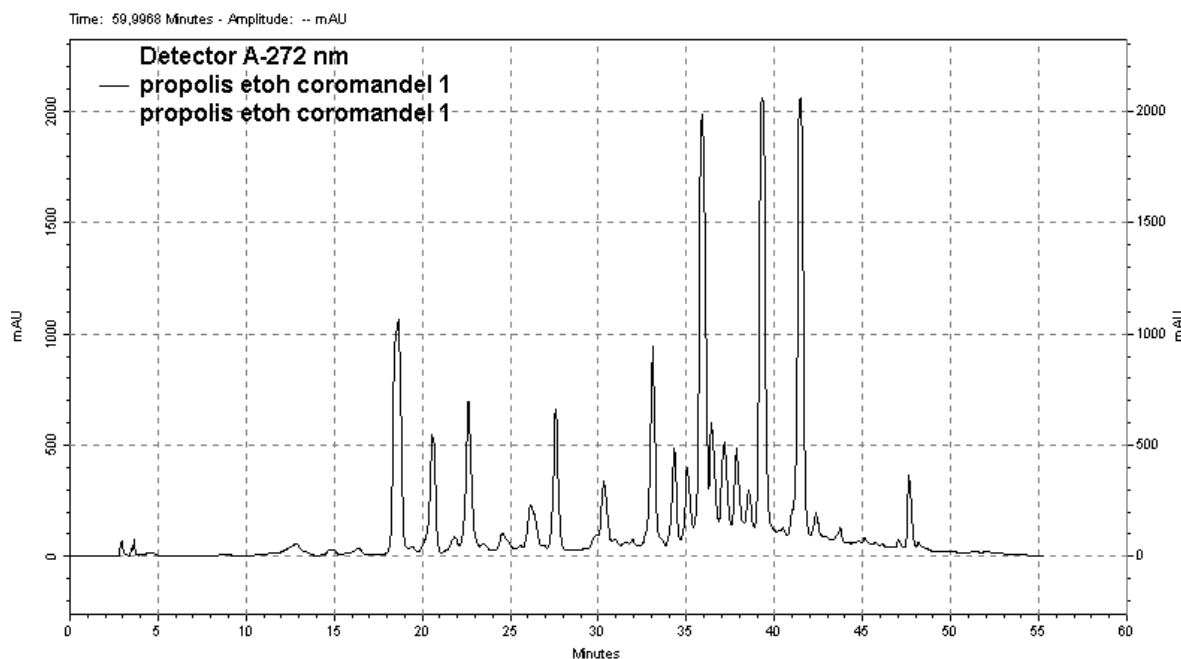


Figura 51. Cromatograma do extrato etanólico da própolis Coromandel 1 (verde), obtido por CLAE.

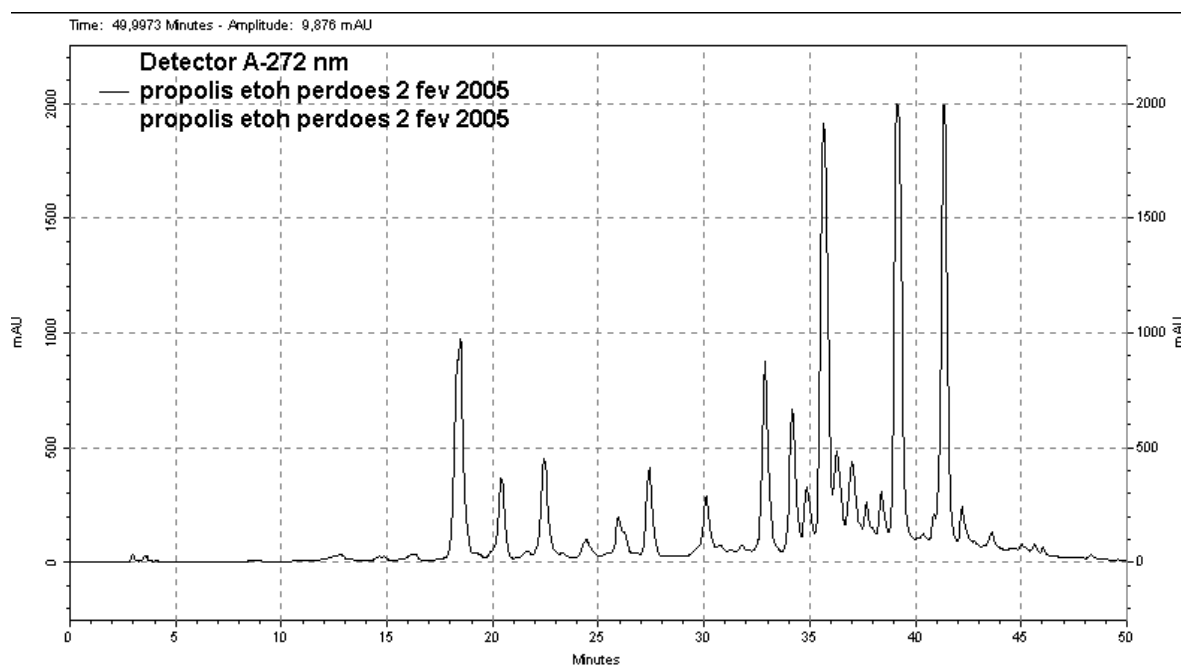


Figura 52. Cromatograma do extrato etanólico da própolis Perdões 2 (verde), obtido por CLAE.

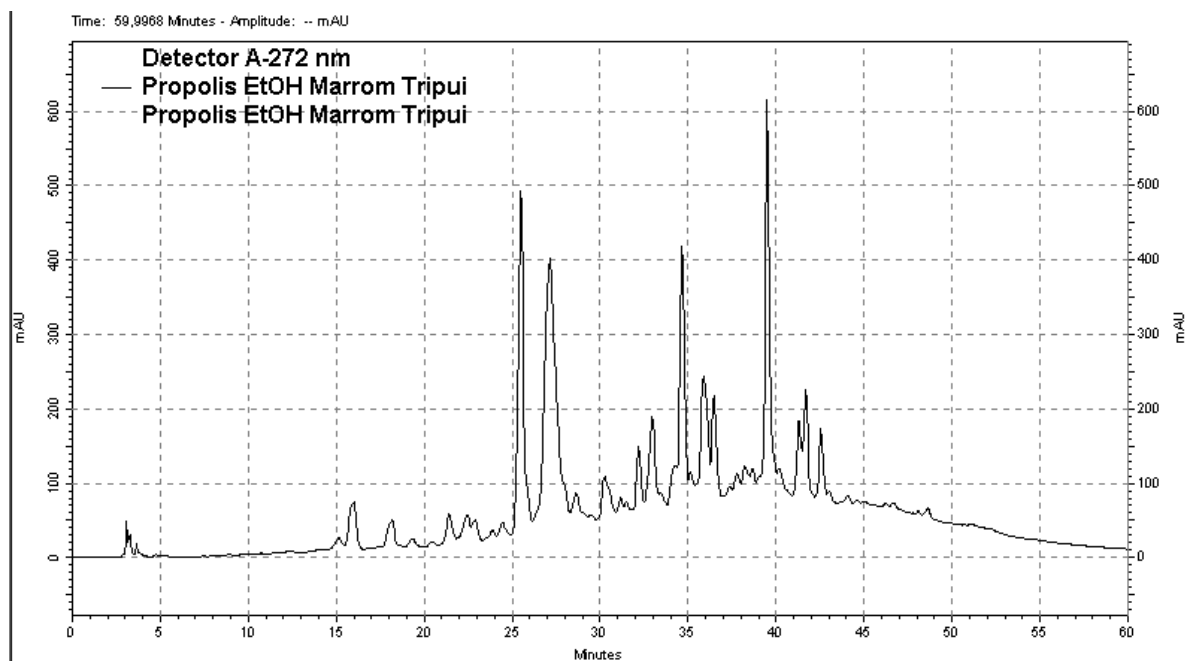


Figura 53. Cromatograma do extrato etanólico da própolis Marrom de Tripuí MT (não-verde), obtido por CLAE.

Mas ao se analisar o cromatograma etanólico da amostra M3, classificada como uma própolis marrom, verifica-se que o seu perfil cromatográfico não segue o padrão da amostra Marrom de Tripuí (MT), o que mostra claramente que a CLAE não serve para o controle de qualidade para se classificar a própolis como verde e/ou marrom.

As Figuras 54 e 55 mostram os cromatogramas dos extratos etanólicos da própolis PSB e do extrato etanólico do broto de alecrim-do-campo. Os picos foram analisados para verificação de similaridades nos espectros no ultravioleta de seus constituintes.

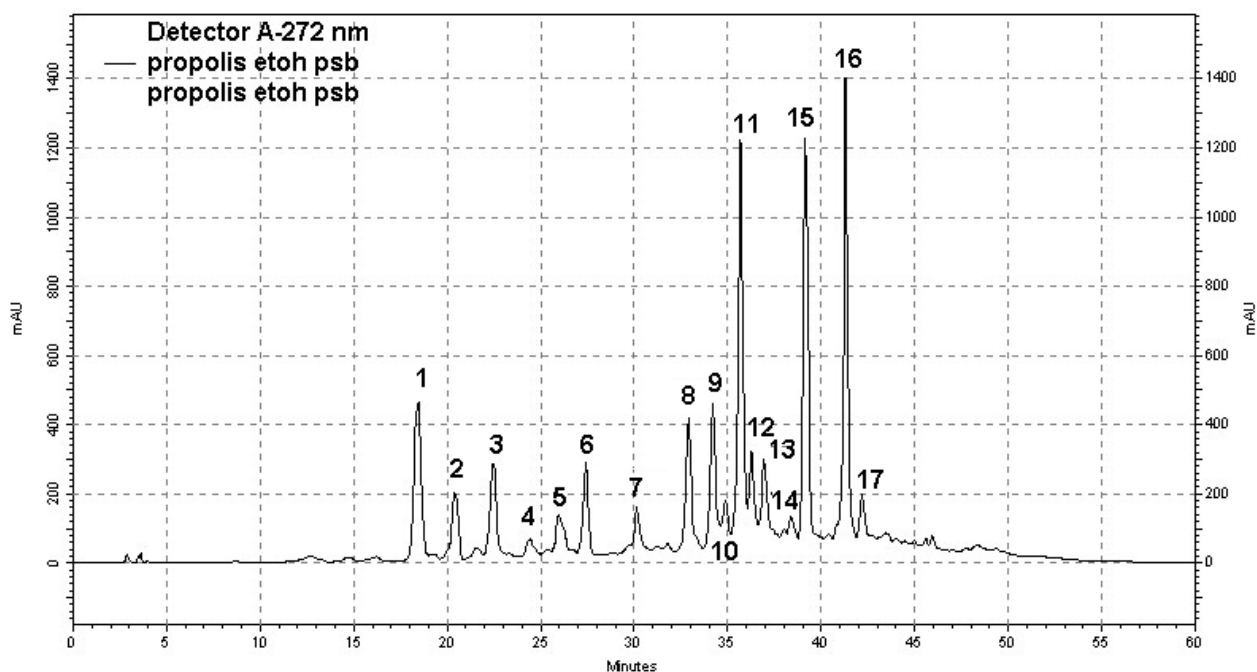


Figura 54. Cromatograma do extrato etanólico da própolis de Santa Bárbara PSB (verde), obtido por CLAE.

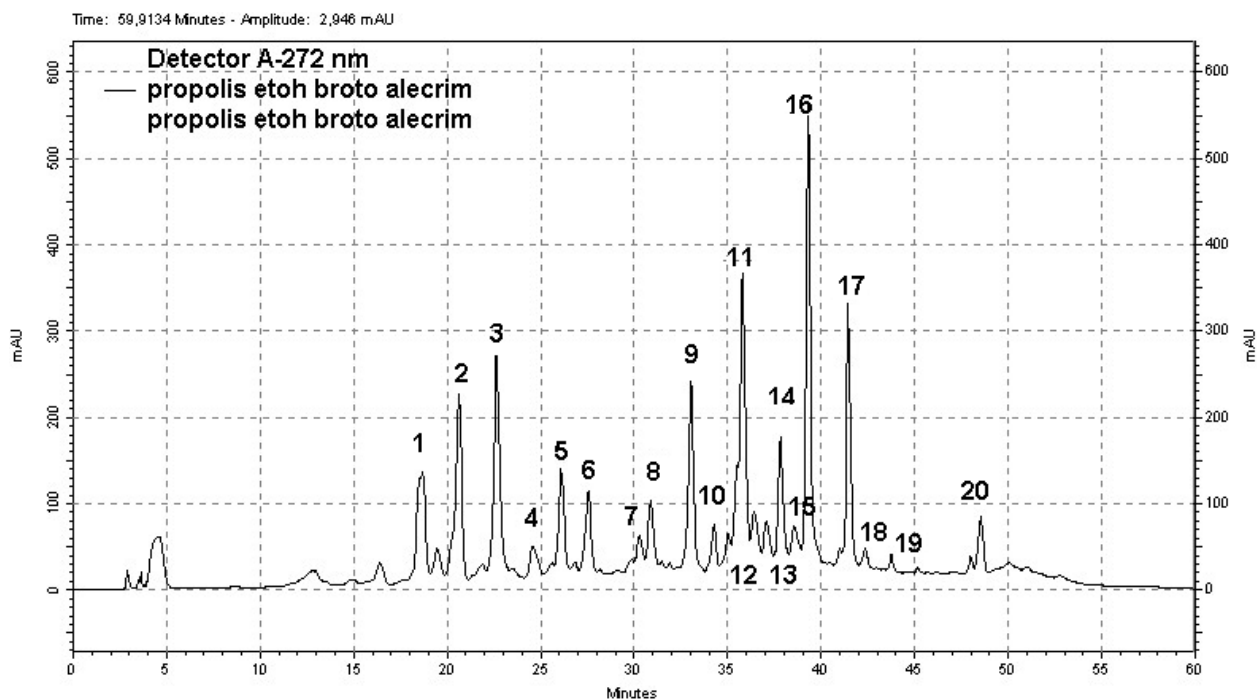
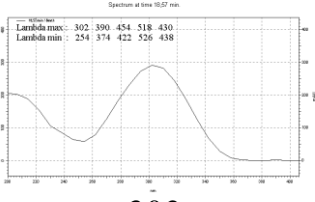
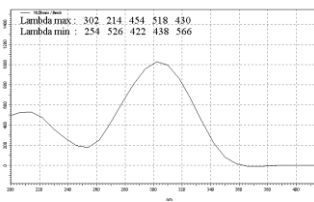
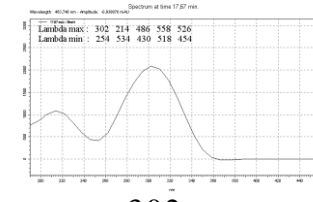
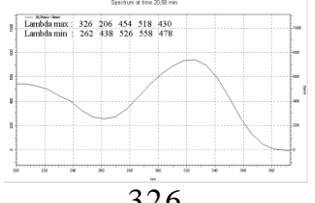
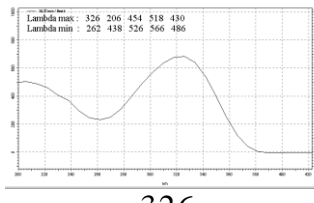
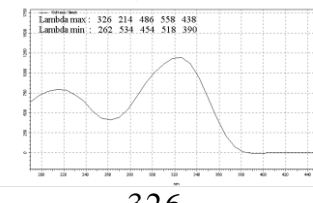
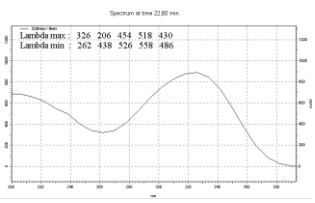
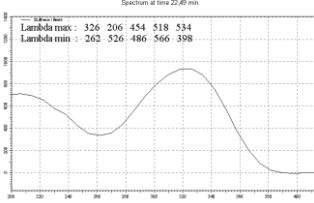
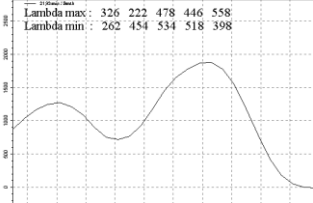
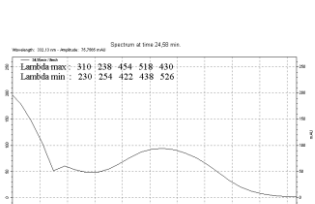
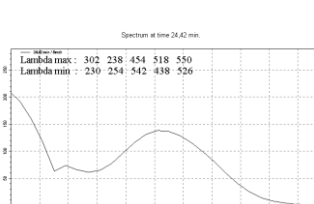
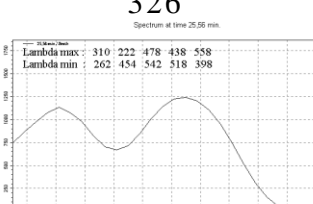
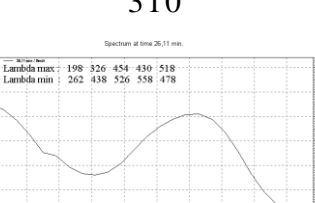
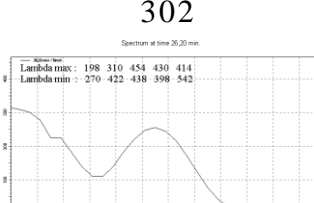
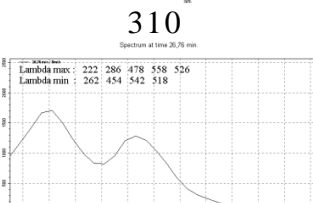
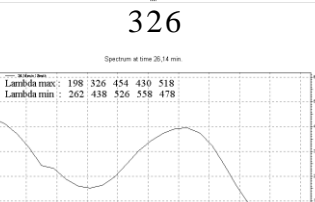
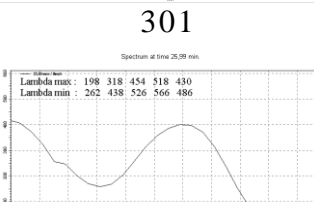
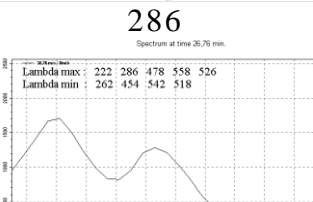


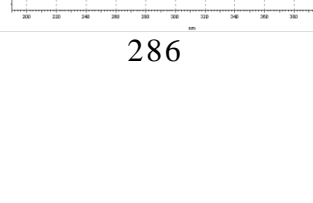
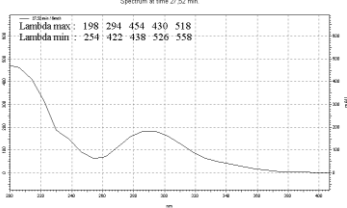
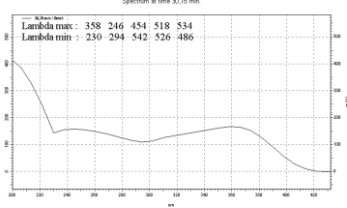
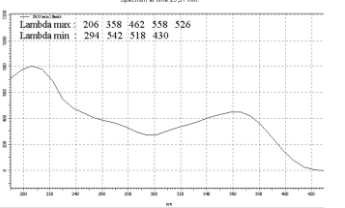
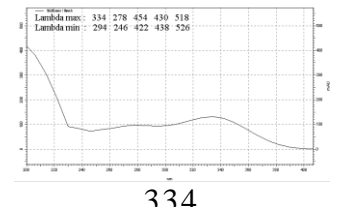
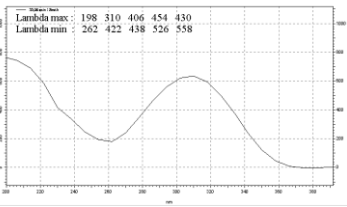
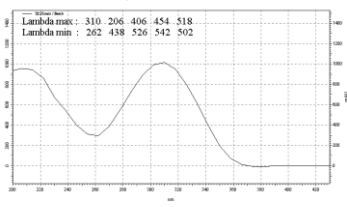
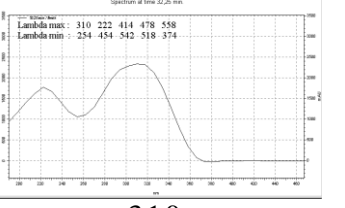
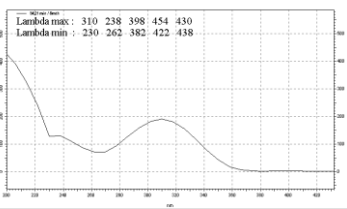
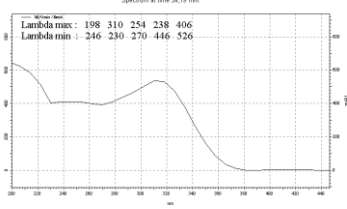
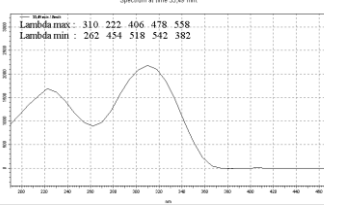
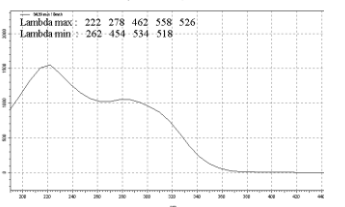
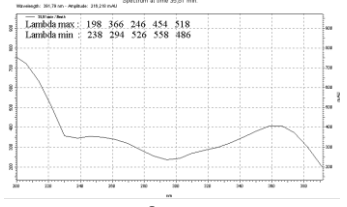
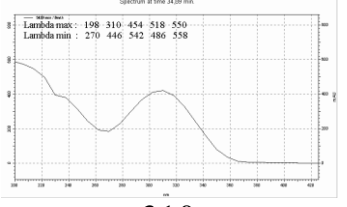
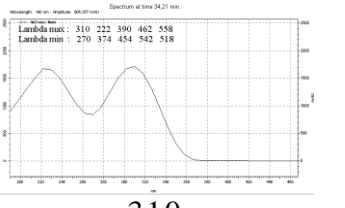
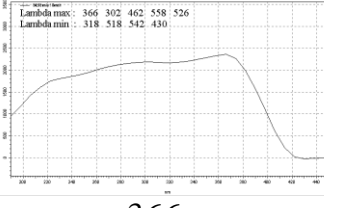


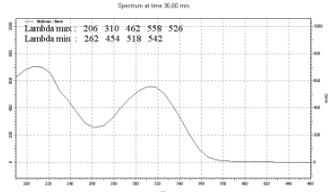
Figura 55. Cromatograma do extrato etanólico do broto de alecrim-do-campo, obtido por CLAE.

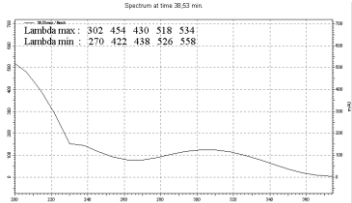
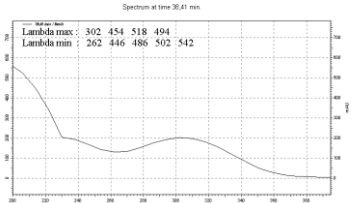
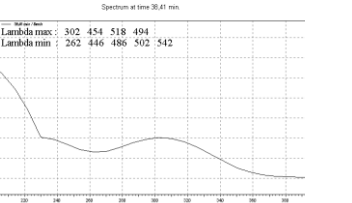
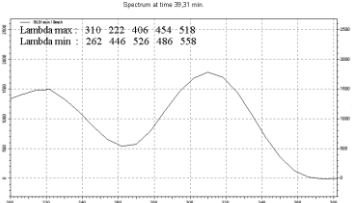
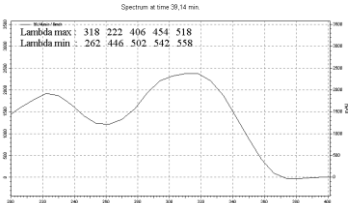
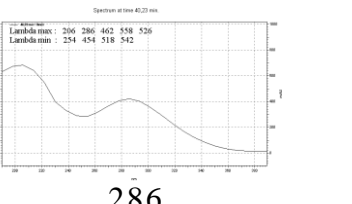
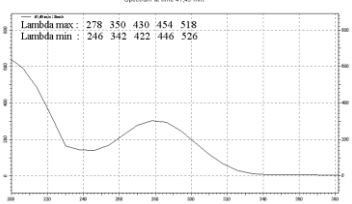
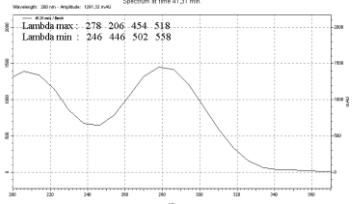
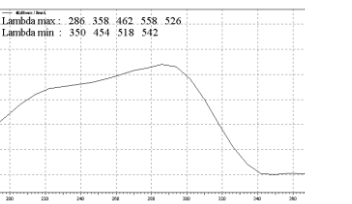
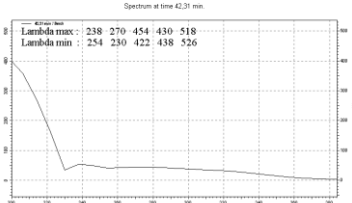
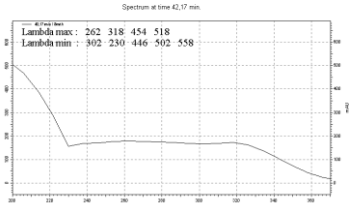
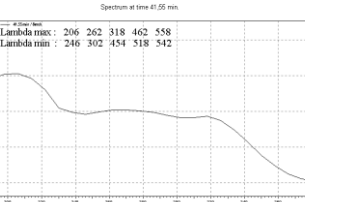
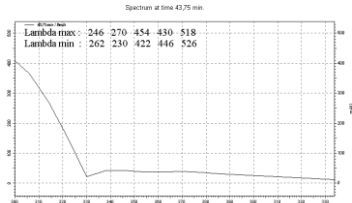
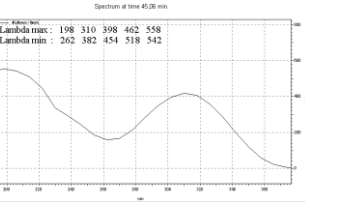
A Tabela 34 relaciona os espectros no ultravioleta dos extratos etanólicos da própolis PSB, M3 e do broto de alecrim-do-campo.

Tabela 34. Tabela comparativa dos espectros UV/Vis dos picos encontrados nas amostras etanólicas da própolis PSB, M3 e no broto de alecrim-do-campo

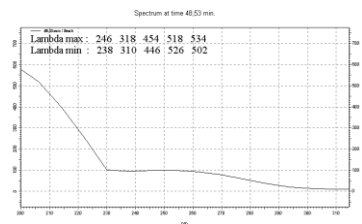
p.	T.R. Broto	T.R. PSB e M3	UV (nm) (Broto)	UV (nm) (PSB)	UV (nm) (M3)
1	18,57	18,47	 <p>302</p>	 <p>302</p>	 <p>302</p>
			 <p>326</p>	 <p>326</p>	 <p>326</p>
3	22,61	22,43	 <p>326</p>	 <p>326</p>	 <p>326</p>
			 <p>310</p>	 <p>302</p>	 <p>310</p>
5	26,11	26,20	 <p>326</p>	 <p>301</p>	 <p>286</p>
			 <p>326</p>	 <p>318</p>	 <p>286</p>
6	27,55	27,42	 <p>326</p>	 <p>318</p>	 <p>286</p>

7	30,29	30,15	 <p>294</p>	 <p>358</p>	 <p>358</p>
8a	30,88	-	 <p>334</p>	-	-
8 e 9	33,04	32,92	 <p>310</p>	 <p>310</p>	 <p>310</p>
10	34,24	34,19	 <p>310</p>	 <p>310</p>	 <p>310</p>
11	-	34,40	-	-	 <p>278</p>
12	35,79	34,89	 <p>366</p>	 <p>310</p>	 <p>310</p>
13	-	34,93	-	-	 <p>366</p>

14	-	-	-	-	 <p>310</p>
15	35,80	35,64	366	366	-
16	36,45	36,26	310	294	-
17	-	36,60	-	-	310
18	37,09	36,96	310	318	318
19	-	37,73	-	-	310
20	37,81 (14a)	-	286	-	310

21	38,52 (14b)	38,41	 <p>302</p>	 <p>302</p>	 <p>302</p>
22	39,30	39,19	 <p>310</p>	 <p>310</p>	-
23	-	40,23	-	-	 <p>286</p>
24	41,44	41,28	 <p>278</p>	 <p>278</p>	 <p>278</p>
25	42,35	42,17	 <p>270</p>	 <p>262</p>	 <p>262</p>
26	43,75	-	 <p>270</p>	-	-
27	-	45,05	-	-	 <p>310</p>

28 48,50 -



246

Os cromatogramas dos extratos etanólicos da própolis PSB e do broto de alecrim, exibem perfis semelhantes. A análise dos espectros ultravioleta com os respectivos tempos de retenção permitem afirmar que estes extratos possuem a muitos constituintes em comum, com exceção de alguns picos que apresentaram alguma divergência ou sobreposição.

Os cromatogramas e os espectros ultravioleta dos picos obtidos nos extratos etanólicos das própolis PSB e M3 são semelhantes, embora uma amostra tenha coloração marrom e a outra verde. A própolis PSB apresenta praticamente os mesmos picos presentes na própolis M3, embora mais abundantes nesta amostra. Apesar do cromatograma ter sido coletado no comprimento de onda 272 nm, houve absorção em outros comprimentos de onda, o que poderia explicar a diferença nas tonalidades entre as amostras PSB e M3 e o broto de alecrim-do-campo.

Ao se comparar os extratos aquosos com os extratos etanólicos, percebe-se que os extratos etanólicos apresentam maior abundância de seus constituintes que os extratos aquosos, em função da solubilidade.

A riqueza de um extrato aquoso ou alcoólico dependerá principalmente da disponibilidade e da diversidade vegetal do pasto apícola. Muitos extratos aquosos são vendidos comercialmente e mesmo os extratos etanólicos podem ter concentrações e composições diferentes, conforme observados nos cromatogramas obtidos por CLAE.

4.5.3. Comparações com bancos de dados

A comparação dos espectros no ultravioleta dos componentes mostrados nos cromatogramas dos extratos aquosos e etanólicos das amostras de própolis analisadas por CLAE com os apresentados no banco

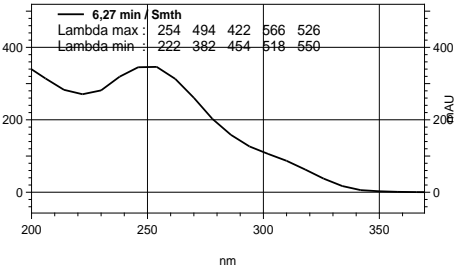
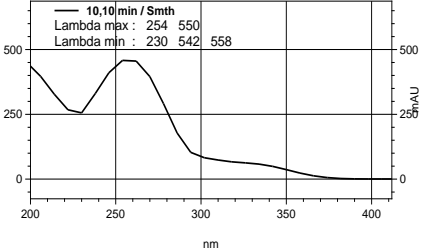
de dados de espectros de ultravioleta de padrões de compostos fenólicos, introduzidos (na seção 3.6.4 p.33) mostrou que vários componentes apresentavam espectros no UV característicos dos ácidos cinâmico e caféico (309 a 326 nm). Este resultado confirma os resultados obtidos até o momento nas análises anteriores, particularmente aqueles obtidos com a cromatografia gasosa à alta temperatura. Deve-se destacar que os açúcares detectados nesta técnica, não puderam ser detectados pela cromatografia líquida, em função do detector utilizado.

Por outro lado, a cromatografia gasosa e a líquida não detectaram a presença de outros compostos existentes no banco de dados dos aparelhos.

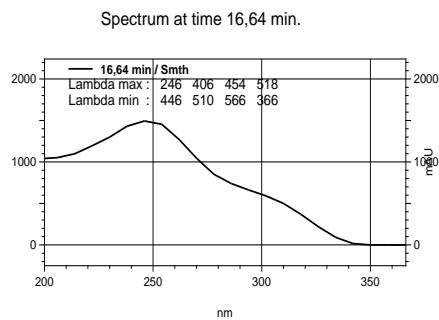
4.5.4. Comparações com padrões de flavonas

Os espectros de ultravioleta obtidos pela injeção dos padrões são mostrados na Tabela 35.

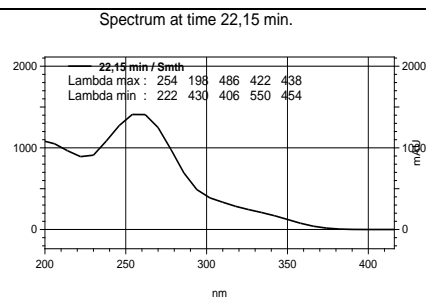
Tabela 35. Dados de alguns dos padrões e seus espectros no UV

Nome do padrão	Tempo de Retenção (min)	Absorção Max.(nm)	Espectro no UV
Daidzina	6,26	254	<p>Spectrum at time 6,27 min.</p> 
Genistina	10,11	254	<p>Spectrum at time 10,10 min.</p> 

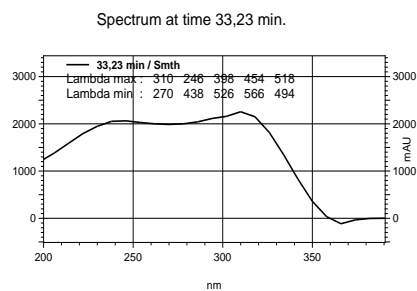
Daidzeína 16,26 246



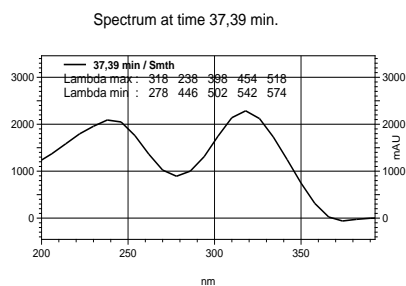
Genisteína 22,15 254



Flavona 33,25 310



Flavanona 37,39 238 e 318



Os cromatogramas dos extratos aquosos PSB e PSG com o eluente acetonitrila/água são mostrados nas Figuras 56 e 57.

As condições de análise são descritas na seção Tabela 9 na p. 19.

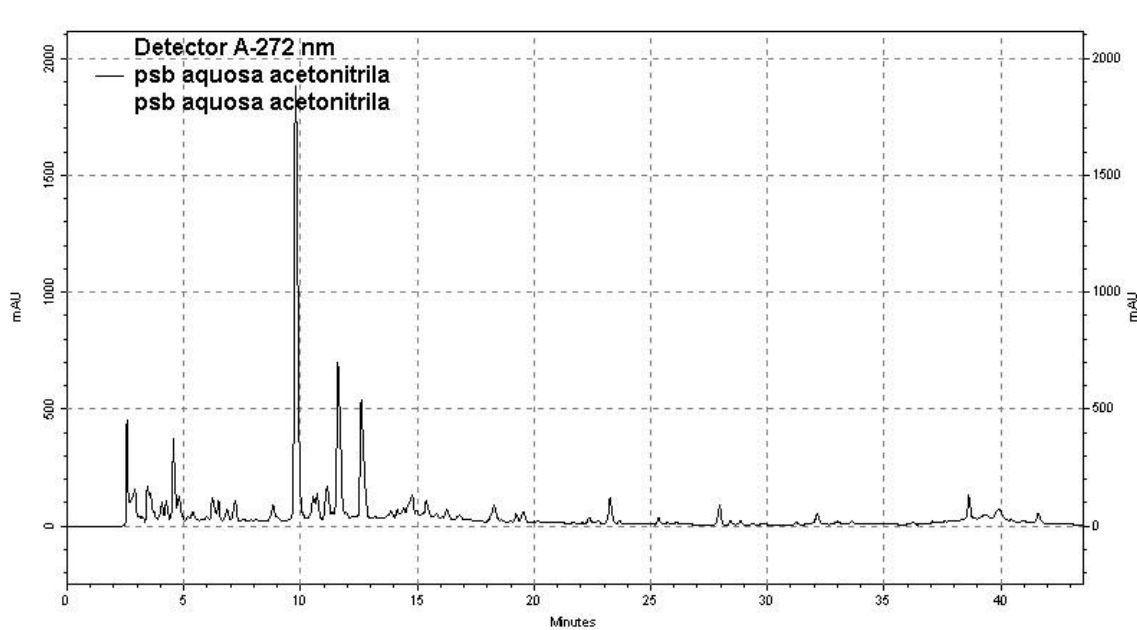


Figura 56. Cromatograma do extrato aquoso PSB no canal 272 ± 10 nm no eluente acetonitrila/água.

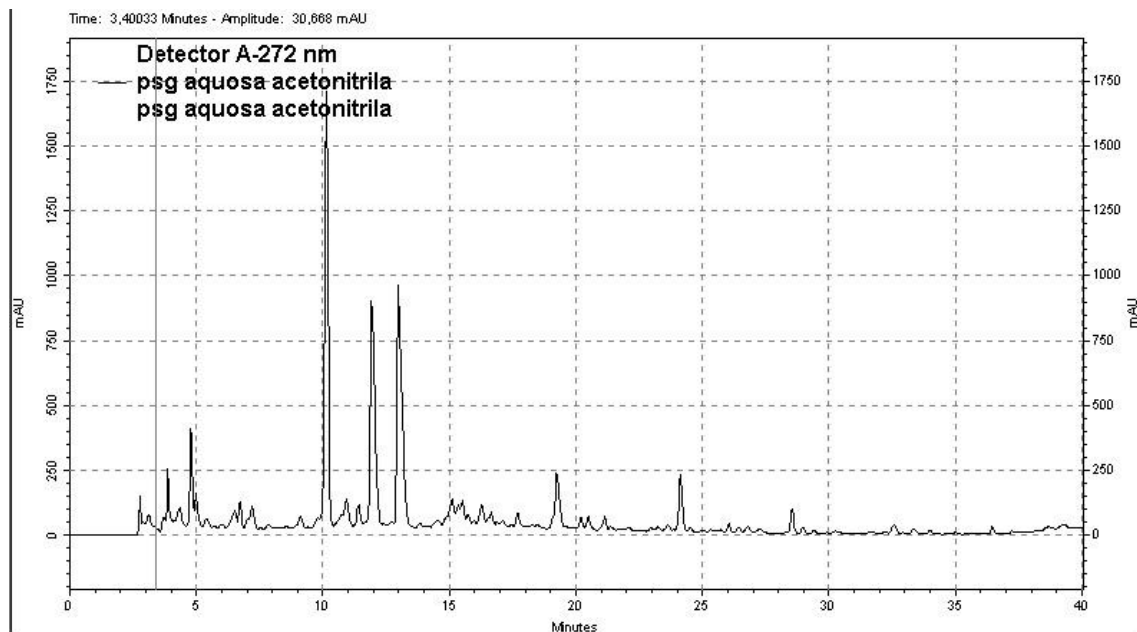


Figura 57. Cromatograma do extrato aquoso PSG no canal 272 ± 10 nm no eluente acetonitrila/água.

O perfil cromatográfico das duas amostras é muito semelhante, (apesar da escala) da mesma forma que os cromatogramas etanólicos e aquosos destas duas amostras.

A Figura 58 mostra o cromatograma dos padrões de isoflavonas, flavona e flavanona, analisados por CLAE em acetonitrila no canal 260 ± 8 nm.

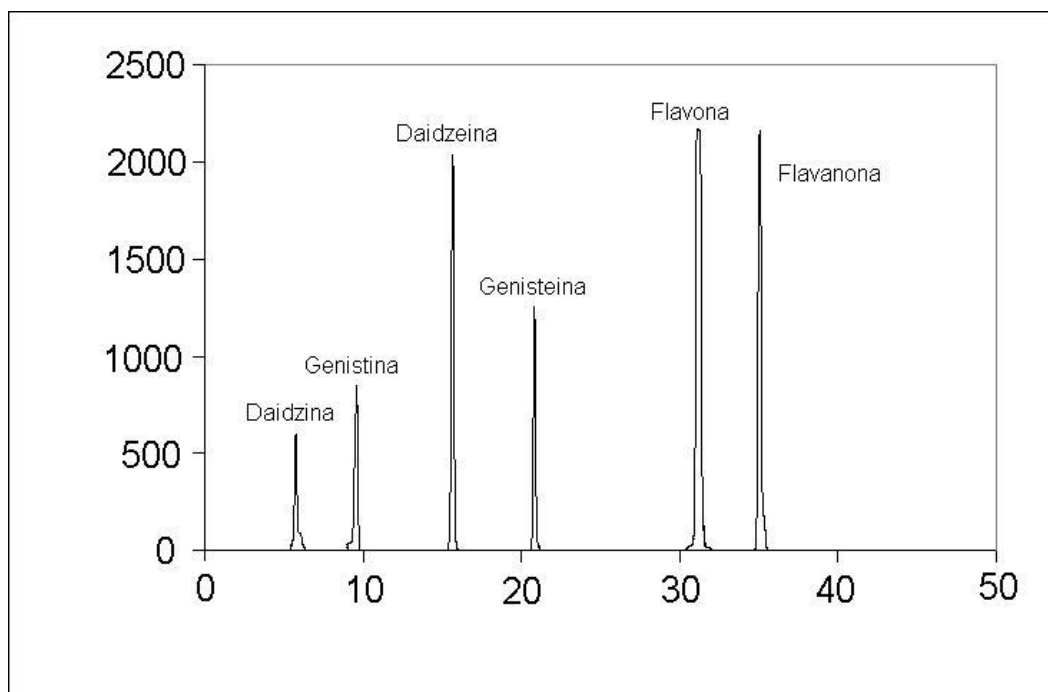


Figura 58. Cromatograma dos padrões pesquisados no canal 260 ± 8 nm no eluente acetonitrila/água.

Comparando-se a Figura 58 com as Figuras 56 e 57 (p. 94), pode-se perceber que os extratos aquosos de PSB e PSG eluídos com acetonitrila/água não têm isoflavonas, flavanona ou flavona em sua composição.

4.6. Cromatografia líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas com Ionização Química à Pressão Atmosférica - CLAE-IQPA-EM/EM (HPLC-APCI-MS/MS)

A Tabela 36 apresenta os compostos detectados por CLAE com detector ultravioleta do extrato etanólico da própolis PSB. Estes compostos são os que absorvem na região do ultravioleta, em função do detector utilizado. Eles representam apenas uma fração dos constituintes totais, uma vez que muitos compostos não absorvem a radiação

ultravioleta. Estes compostos foram identificados após sua fragmentação no espectrômetro de massas.

Tabela 36. Compostos identificados por CLAE e seus tempos de retenção

Tempo de Retenção (min)	Composto
18,3	Cinamato de etila
20,2	Cafeato de benzila
22,1	Cafeato de cinamila
24,0	Cumarato de cinamila
25,8	Ferulato de diidrocinaamila
27,1	Pinobanksina
29,6	Camferol
32,8	Ácido-2,2-dimetil-6-cromeno-6-propenóico
34,0	2,2-dimetil-6-cromeno-6-propenoato de metila
34,6	Cumarato de diprenila e n.i. (λ 238, 318 nm)
35,5	Betuletol, camferida, diidrocamferida
36,0	Ermanina
36,6	Capillartemisina A
37,3	Ácido (E)-3-[2,3-diidro-2-(1-metiletênil)-7-prenil-5-benzofuranil]-2-propenóico
38,2	Ácido (E)-3-[2,3-diidro-2-(1-hidroxi-1-metiletênil)-7-prenil-5-benzofuranil]-2-propenóico
38,9	Artepilina C
41,0	n.i. (λ 220, 286 nm) e n.i. (λ 235, 278 nm)
41,9	n.i. (λ 235, 318 nm)

A Tabela 37 mostra os compostos identificados por CLAE-IQPA-EM/EM. As atribuições foram baseadas em publicações e em estudos próprios^{9,10,11,37,38}.

A Figura 59 mostra o espectro de massas molares do extrato etanólico da amostra PSB, obtido por CLAE-IQPA-EM/EM, no modo positivo.

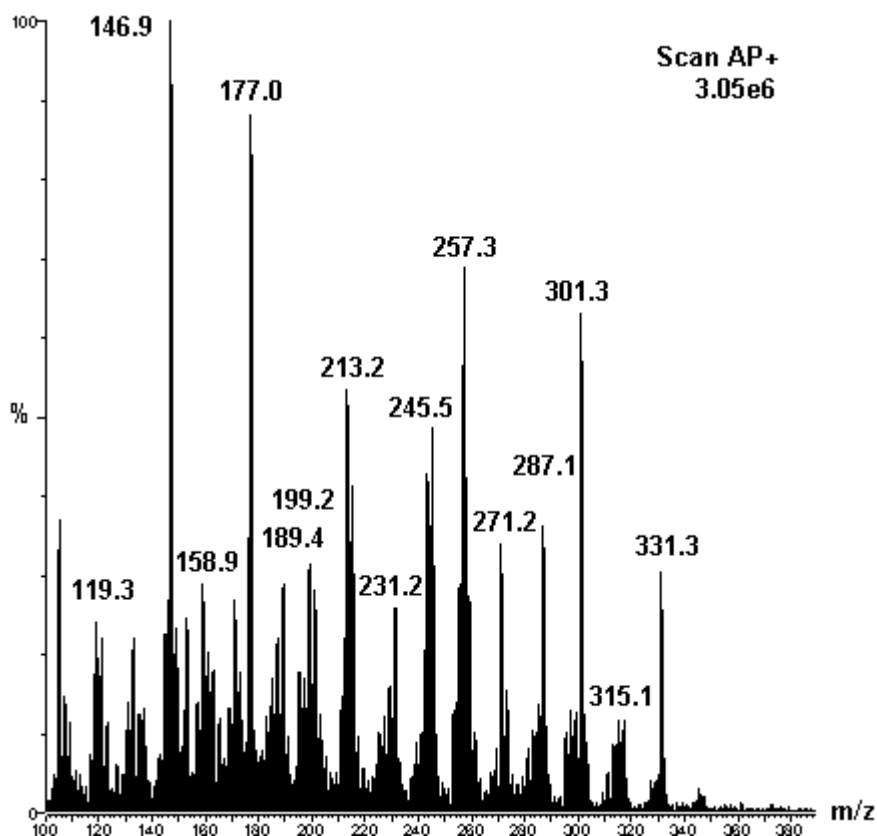


Figura 59. Espectros de massas do extrato etanólico da amostra PSB, obtido por CLAE-IQPA-EM/EM no modo positivo.

Tabela 37. Compostos detectados no extrato etanólico da própolis PSB por CLAE-IQPA-EM/EM, no modo positivo

N.	Massa	Composto	% pico base
1	330	Betuletol	30
2	316	ácido (E)-3-[2,3-diidro-2-(1-hidróxi-1-metiletil)-7-prenil-5-benzofuranil]-2-propenóico	12
3	314	Ermanina	12
4	312	ferulato de diidrocinamila	9
5	302	Diidrocamferida	9
6	300	artepillina C, camferida, cumarato de diprenila	63
7	298	ácido (E)-3-[2,3-diidro-2-(1-metiletenil)-7-prenil-5-benzofuranil]-2-propenóico	12
8	296	cafeato de cinamila	13
9	294	linoleato de metila	10
10	286	camferol	35
11	284	acacetina, ácido esteárico	14
12	282	ácido oléico	10

13	280	ácido linoléico	7
14	272	pinobanksina (chalcona)	16
15	270	cafeato de benzila, isômeros de massa 270 Da	33
16	268	cumarato de cinamila	7
17	260	14-acetoxi-trementona	10
18	258	2',4',6'-trihidroxi-chalcona	27
19	256	ácido palmítico, n.i. de massa 256 Da	68
20	254	cumarato de benzila	29
21	252	metil-flavonol	13
22	244	2,2-dimetil-6-cromeno-propenoato de metila	48
23	242	miristato de metila	42
24	240	Hidroxi-flavanona	10
25	238	flavonol	9
26	232	ácido-3-prenil- <i>p</i> -cumárico	7
27	230	ácido-2,2-dimetil-6-cromeno-6-propenóico	26
28	228	ácido mirístico	17
29	226	benzoato de feniletila	13
30	224	flavanona	10
31	218	carboxilato de 2,2-dimetil-6-cromeno-metila	6
32	216	n.i.	10
33	214	laurato de metila	42
34	212	n.i.	53
35	210	diidrochalcona	15
36	204	ácido 2,2-dimetilcromeno-6-carboxílico, sesquiterpenos	7
37	202	trementona	13
38	200	ácido láurico	28
39	198	galato de etila	31
40	196	veratrato de metila	16
41	194	ácido ferúlico	17
42	190	n.i.	9
43	188	5-(2,5-dimetilfenil)-2(3H)-furanona	28
44	186	decanoato de metila	22
45	184	galato de metila	17
46	182	ácido verátrico	12
47	180	ácido caféico	8
48	178	4-hidróxi-3-metoxicinamaldeído	7
49	177	n.i.	10
50	176	cinamato de etila	87
51	174	ácido 5-fenil-pentadien-2,4-óico	8
52	172	ácido decanoico	17

53	170	ácido gálico	27
54	168	ácido vanílico	13
55	166	ácido diidrocumárico	6
56	164	ácido p-coumaric acid	11
57	162	cinamato de metila	17
58	160	ácido pimélico, glutarato de etila	20
59	158	isobutirato de isopentila, butanoato de isopentila, ácido pelargônico	28
60	156	n.i.	13
61	152	ácido 4-metoxi-benzóico	24
62	150	ácido diidrocinâmico	8
63	148	ácido cinâmico	23
64	146	succinato de etila	100
65	144	ácido octanoic, isobutirato de isobutila, butirato de isobutila	22
66	142	n.i.	7
67	136	benzoato de metila	13
68	134	ácido málico	12
69	132	ornitina	23
70	130	acetato de isopentila, acetato de 2-metilbutila	13
71	126	6-metil-hept-5-en-2-ona	6
72	122	ácido benzóico	12
73	120	acetofenona, 2,3-benzofurano	23
74	118	ácido succínico	25
75	116	acetato de isobutila	7
76	108	álcool benzílico	12
77	106	benzaldeído	15
78	104	estireno	37

n.i. = não identificado

Os compostos desta tabela vêm somar aos compostos já identificados por outras técnicas de cromatografia. A vantagem desta técnica está na detecção de todos os compostos eluídos na CLAE, independentemente se absorve luz UV-VI ou não.

Esta análise fornece uma inédita impressão digital do extrato etanólico da amostra de própolis verde PSB, captando os compostos que não absorvem e os compostos que absorvem radiação na região do

ultravioleta/visível. Assim, a exata caracterização de um extrato não poderia estar melhor reproduzida.

4.7. Ensaio Biológicos

4.7.1. Teste da atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos de própolis em bactérias patogênicas

As placas com os ensaios de atividade microbiana com antibióticos de controle e as amostras de própolis PSB e PSG são mostradas nas Figuras 60 e 61, frente a *Staphylococcus aureus* e *Marsa*, respectivamente. As placas com o teste de concentração inibitória mínima (CIM) com antibióticos de controle e as amostras de própolis PSB e PSG são mostradas nas Figuras 62 e 63, frente *S. aureus* e *Marsa*, respectivamente. Os antibióticos de controle foram colocados na parte central da placa, circundados pelas amostras PSB, à esquerda e PSG à direita.

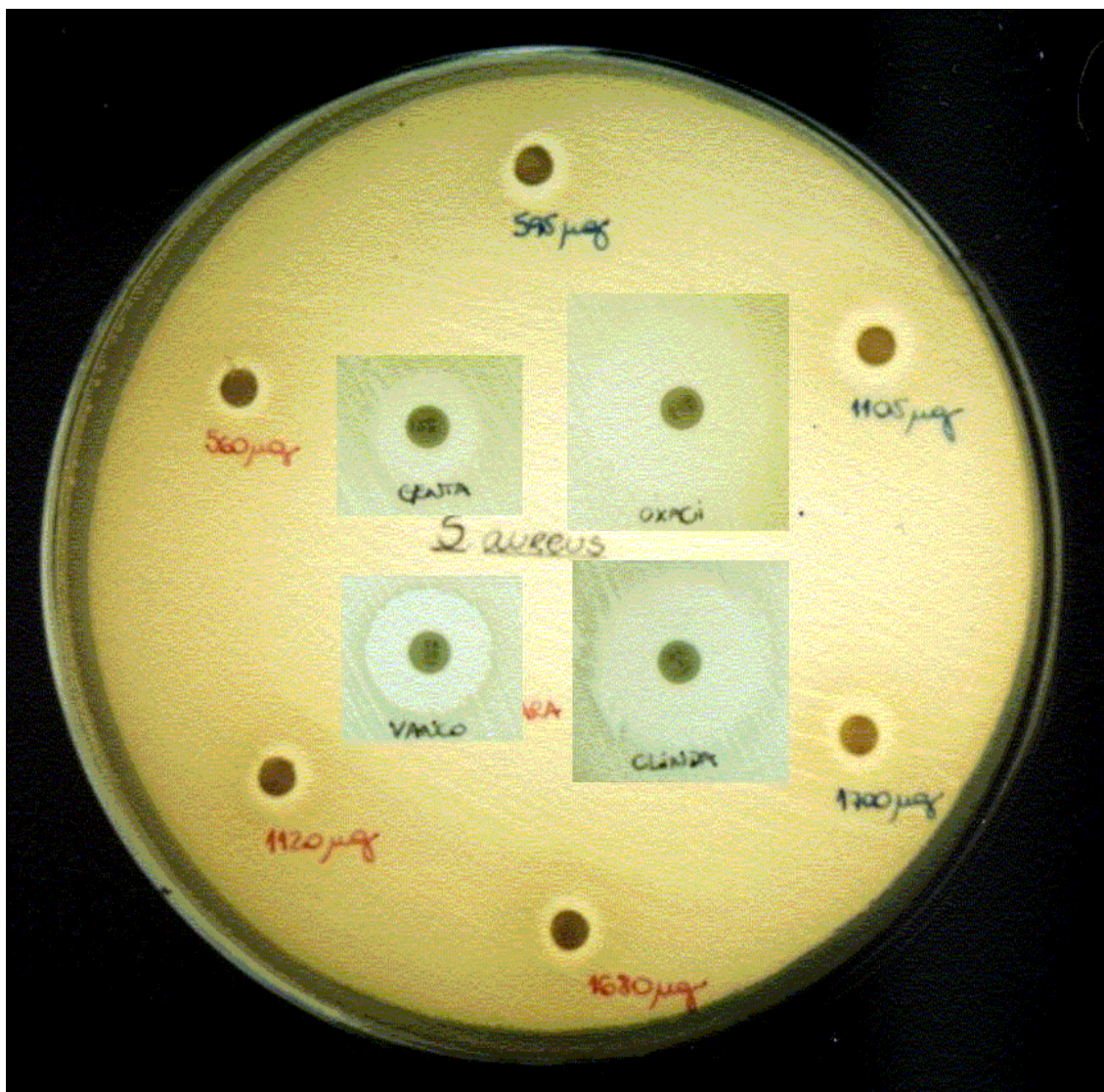


Figura 60. Placa com ensaio de verificação de atividade microbicida das própolis PSB (à esquerda) e PSG (à direita) em várias concentrações contra *S. aureus*, comparados com antibióticos de controle.

Os quatro antibióticos de controle mostraram eficácia frente ao *S. aureus*, principalmente a vancomicina. As amostras de própolis mostraram halos de inibição muito pequenos, quando comparados aos produzidos pelos antibióticos de controle. Os halos de inibição das duas amostras são semelhantes, e nota-se que o aumento da concentração acarreta um aumento no diâmetro do halo de inibição.

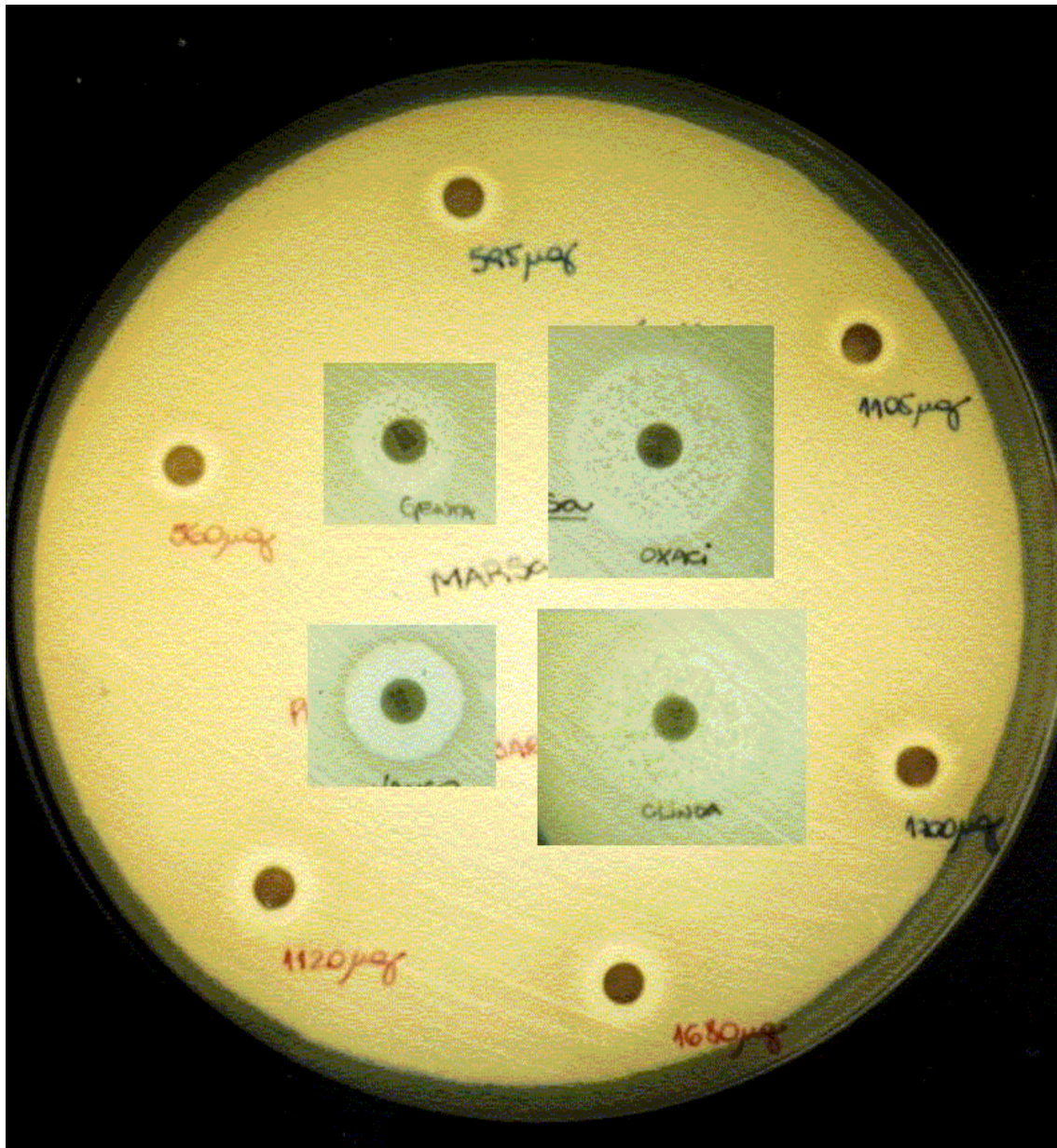


Figura 61. Placa com ensaio de verificação de atividade microbicida das própolis PSB (à esquerda) e PSG (à direita) em várias concentrações contra Marsa, comparados com antibióticos de controle.

Percebe-se que a vancomicina foi mais eficaz que os outros antibióticos frente a Marsa (resistente). Nota-se que o aumento da concentração aumentou e melhorou as medidas dos halos de inibição frente a Marsa.

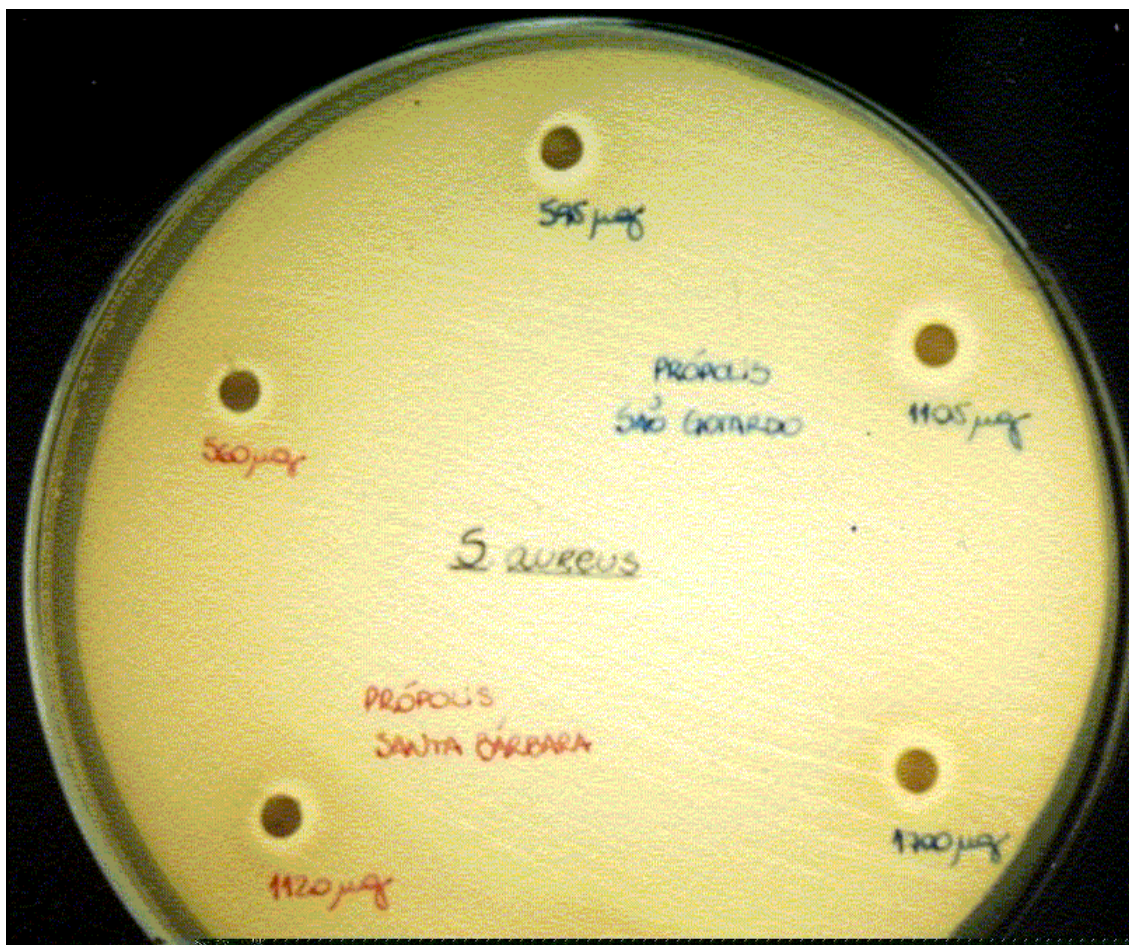


Figura 62. Placa com ensaio de verificação de atividade microbica das própolis PSB (à esquerda) e PSG (à direita) em várias concentrações contra *S. aureus*.

Nota-se que a concentração mínima inibitória não pode ser determinada com esse experimento, porque todas as placas apresentaram halo de inibição. Chen *et al.*⁴³ relatou concentrações inibitórias mínimas na faixa entre 3,75 e 60 µg/mL, e concentrações bactericidas mínimas entre 60 e 120 µg/mL de extratos etanólicos de própolis taiwanesas frente a *S. aureus*.



Figura 63. Placa com ensaio de verificação de atividade microbica das própolis PSB (à esquerda) e PSG (à direita) em várias concentrações contra Marsa.

Os halos parecem não ter boa definição quando comparados aos halos obtidos frente a Marsa. Nota-se contudo, que o aumento da concentração acarreta um aumento do halo de inibição e que os dois extratos etanólicos de própolis exibem atividade microbica apreciável acima da concentração de média de 600 µg/mL.

As ceras presentes nos extratos poderiam atrapalhar a difusão da própolis nas placas de cultura de ágar-ágar. A remoção das ceras poderia aumentar a atividade microbica desses extratos.

4.8. Análise Elementar CHN do resíduo final da própolis PSB

A análise elementar de CHN do resíduo final da própolis PSB forneceu os seguintes resultados mostrados na Tabela 38.

Tabela 38. Valores obtidos por determinação de CHN do Resíduo Final da própolis PSB

AMOSTRA	% C	% H	% N
Resíduo PSB	48,51	7,07	5,71
Resíduo PSB	48,41	6,85	5,61
Valor Médio	48,46	6,96	5,66

O teor de nitrogênio pode ser considerado alto quando comparado com o teor de nitrogênio em amostras de eucalipto⁴¹ (0,17 %) e de outras madeiras⁴⁴ (0,2%) mas não se encontraram dados comparativos na literatura.

Na análise de produtos naturais, Jones⁴⁵ encontrou um fator de conversão entre as porcentagens de nitrogênio em alimentos e vegetais e de proteínas. Em média, as proteínas contêm aproximadamente 16 % de nitrogênio. Assim, cada 100 g. de proteína contêm aproximadamente 16 g. de nitrogênio. O fator de conversão é obtido dividindo-se 100 por 16, de onde se obtém o valor 6,25 (fator de conversão).

A porcentagem de nitrogênio (5,66%) encontrada no resíduo final da amostra PSB multiplicado por 6,25 nos indica que no resíduo final da própolis PSB poderia haver até 35 % desta massa na forma de proteínas. Estas proteínas seriam insolúveis em água, metanol e clorofórmio, em função da rota seguida.

Este resíduo que muitas vezes é descartado pelos apicultores (apenas hidroalcoólico) ainda é usado na produção de tintas e vernizes à base de própolis, mas ainda pode ser utilizado com fins nutricionais (para ruminantes⁴⁶) ou ainda farmacêuticos.

4.9. Análises Espectrofotométricas

4.9.1. Teor de fenóis totais

A Tabela 39 contém os valores das absorvâncias obtidas e dos equivalentes de ácido gálico encontrado para as amostras de própolis. A Figura 64 mostra a curva de calibração obtida com os padrões de ácido gálico.

Tabela 39. Valores das absorvâncias obtidas no ensaio de determinação de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu

		Absorvância	Equivalentes de ac.gálico
Amostras	PSB	0,254	139,40
	PSG	0,206	114,16
	M3	0,354	192,05
	VE	0,058	36,26
Padrão de ácido gálico	0,10	0,010	0,80
	0,20	0,027	1,60
	0,25	0,037	2,00
	0,30	0,044	2,40
	0,40	0,061	3,20
	0,50	0,160	4,00
	0,10	0,068	40,00
	0,20	0,140	80,00
	0,25	0,181	100,00
	0,30	0,221	120,00
	0,40	0,303	160,00
	0,50	0,372	200,00

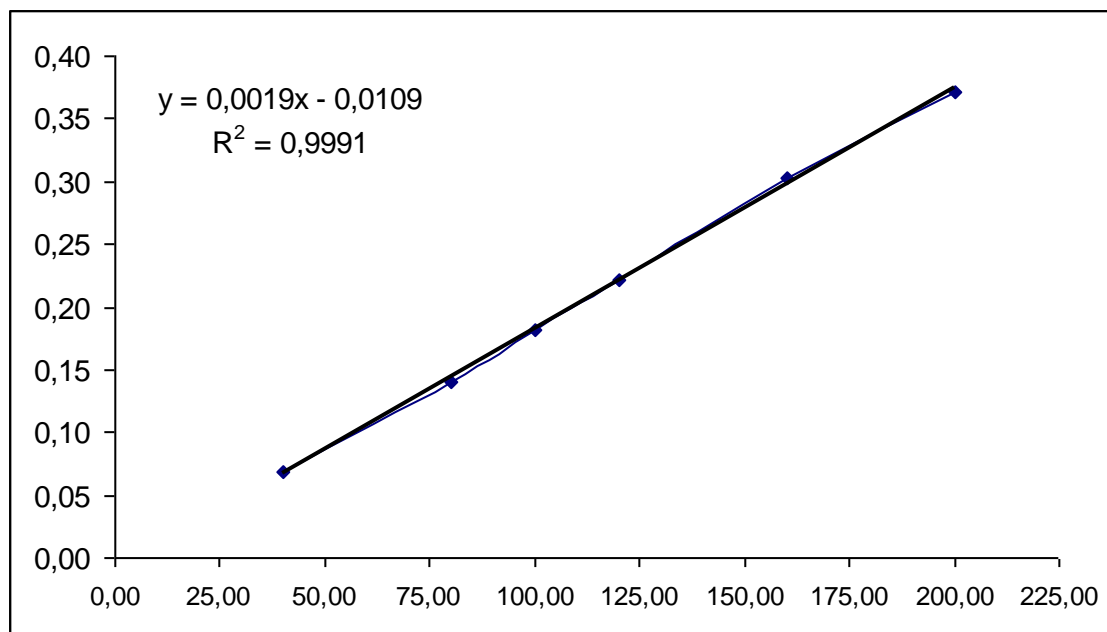


Figura 64. Gráfico da curva de calibração obtida com os padrões de ácido gálico.

A Tabela 40 contém os valores de equivalentes de ácido gálico obtidos pelo ensaio de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu em massa percentual.

Tabela 40. Teor de Fenóis Totais em equivalentes de ácido gálico

Amostras	Teor de Fenóis Totais em equivalentes de ácido gálico (referente à massa de 5 g.) (%)
PSB	11
PSG	9
M3	15
VE	2,9

Esses valores estão dentro dos valores encontrados por Woisky e Salatino²³, que relataram concentrações totais entre 8,8 e 13,7% (massa/massa) de compostos fenólicos. Eles ainda relataram que o uso de etanol 70% e sua maceração por 30 dias aumentariam o valor de compostos fenólicos. Como foi usado etanol 95% em extrações relativamente curtas, o potencial fenólico destas amostras pode ser ainda maior.

A amostra M3 exibiu o maior potencial e a amostra Vermelha (VE) o menor, inclusive abaixo do valor permitido pela legislação (mínimo de 5% m/m).

4.9.2. Teor de flavonóides em equivalentes de quercetina

A Tabela 41 contém os valores das absorvâncias obtidas no ensaio.

Tabela 41. Valores obtidos no ensaio de teor de flavonóides em equivalentes de quercetina

	Massa em microgramas	Absorvância
Amostras	PSB	0,173
	PSG	0,140
	M3	0,230
	VE	0,063
Padrão de quercetina	4,79	0,102
	9,58	0,166
	14,37	0,221
	18,00	0,268
	19,16	0,270
	23,95	0,325
	27,00	0,379
	36,00	0,482
	54,00	0,696
	72,00	0,910

A Figura 65 mostra o gráfico obtido com os valores das leituras das absorvâncias e as respectivas concentrações em equivalentes de quercetina.

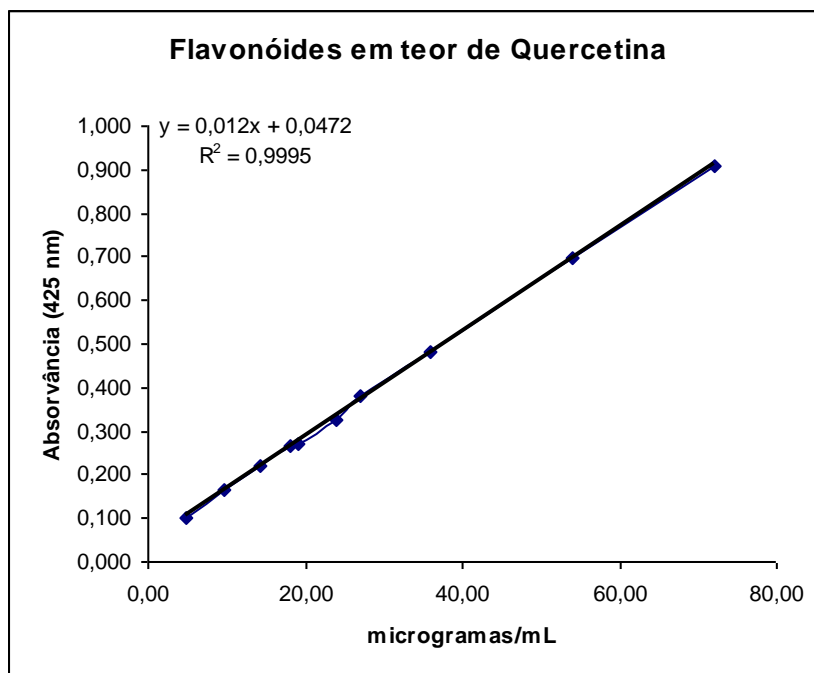


Figura 65. Gráfico da curva de calibração obtida com os padrões de quercetina.

A equação da reta obtida é $y = 0,012x + 0,0472$ e os valores encontrados em microgramas de equivalentes de quercetina nessa equação com as respectivas amostras foram: 10,48 para a amostra PSB; 7,73 para a PSG; 15,23 para a amostra M3 e 1,32 microgramas para a amostra Vermelha, para as alíquotas de 1,0 mL usadas no ensaio. O valor da absorvância da solução em branco foi de 0,037. As massas equivalentes de quercetina encontradas por massa de própolis são mostrados na Tabela 42.

Tabela 42. Valores obtidos no ensaio de teor de flavonóides em equivalentes de quercetina em massa percentual

Amostras	Absorvância (425 nm)	Porcentagem (%)	Teor pela Legislação ¹⁹
PSB	0,140	2,10	Alto
PSG	0,173	1,50	Médio
M3	0,230	3,05	Alto
VE	0,063	1,70	Médio

Os valores encontrados estão acima dos valores mínimos (0,5% m/m) estabelecidos pela legislação²¹ para o teor de flavonóides em

quercetina. As amostras analisadas tiveram teores classificados como médio e alto.

Convém lembrar que a amostra M3 exibiu maior atividade que as amostras verdes, com um valor ainda não relatado na literatura. A amostra Vermelha (VE) foi a que exibiu menor teor.

4.9.3. Atividade antioxidante com DPPH

Os valores das absorvâncias obtidas para as amostras PSB e PSG foram de 0,180 e 0,066. O valores das absorvâncias do DPPH com metanol e do branco com metanol foram de 0,336 e -0,033.

A Figura 66 mostra o gráfico da curva de calibração obtida com os padrões de catequina hidratada.

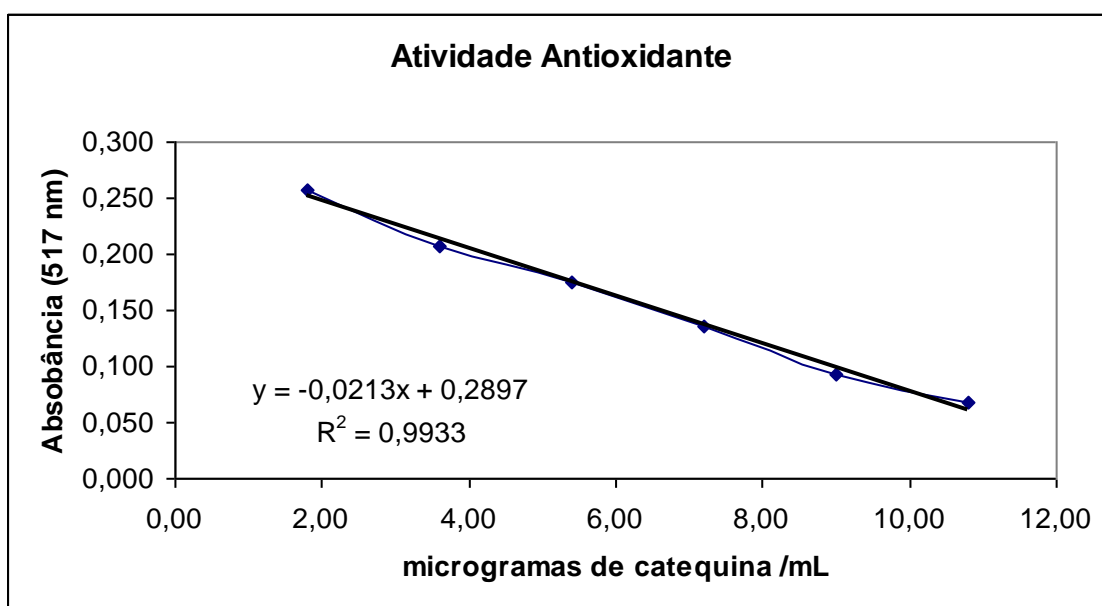


Figura 66. Gráfico da curva de calibração obtida com os padrões de catequina hidratada.

A Tabela 43 mostra as atividades percentuais das quatro amostras de própolis analisadas.

Tabela 43. Atividade anti-radicalar/antioxidante das amostras de própolis

Amostra	Absorvância	Atividade (%)	Equivalentes de catequina	
			µg por mL	em massa %
PSB	0,200	50,31	842	6,74
PSG	0,231	40,74	552	4,42
M3	0,145	67,28	1358	10,86
VE	0,304	18,21	134	1,07

Os valores encontrados para as amostras PSB, PSG e Vermelha se encontram dentro dos valores normalmente encontrados na literatura por Chen *et al.*⁴⁷, na faixa entre 10 e 50%, que investigou a atividade antioxidante de amostras de própolis de Taiwan. A amostra M3 mostrou uma atividade superior às outras amostras analisadas. Esse valor acima de 60%, já foi observado em amostras de própolis da China, Hungria e Nova Zelândia, em condições semelhantes⁴⁸.

A própolis M3 mostrou maior atividade que as amostras de própolis verde como a própolis de Santa Bárbara PSB e a própolis de São Gotardo (PSG). Estas duas últimas amostras apresentaram atividades próximas. A própolis VE mostrou a menor atividade antioxidante.

Estes valores de equivalentes em catequina hidratada são muito expressivos quando comparados com os encontrados por Arts *et al.*^{31,32}, em alimentos como o chá verde, chá, frutas, kiwi, vinhos brancos e tintos, chocolates, etc, o que faz os extratos de própolis uma melhor alternativa como aditivo alimentar.

Os resultados dos ensaios espectrofotométricos para fenóis totais e flavonóides (Tabelas 40 e 42, respectivamente) mostraram que há uma relação de proporcionalidade entre as amostras analisadas. A amostra M3 foi a que mostrou maiores teores e atividade e a amostra VE foi a apresentou menores valores.

4.10. Espectroscopia no Infravermelho do Resíduo Final da amostra PSB na rota de Banskota

Após várias extrações, o resíduo final mostrou-se um pó amorfo fino. O espectro no infravermelho é mostrado na Figura 67, a seguir.

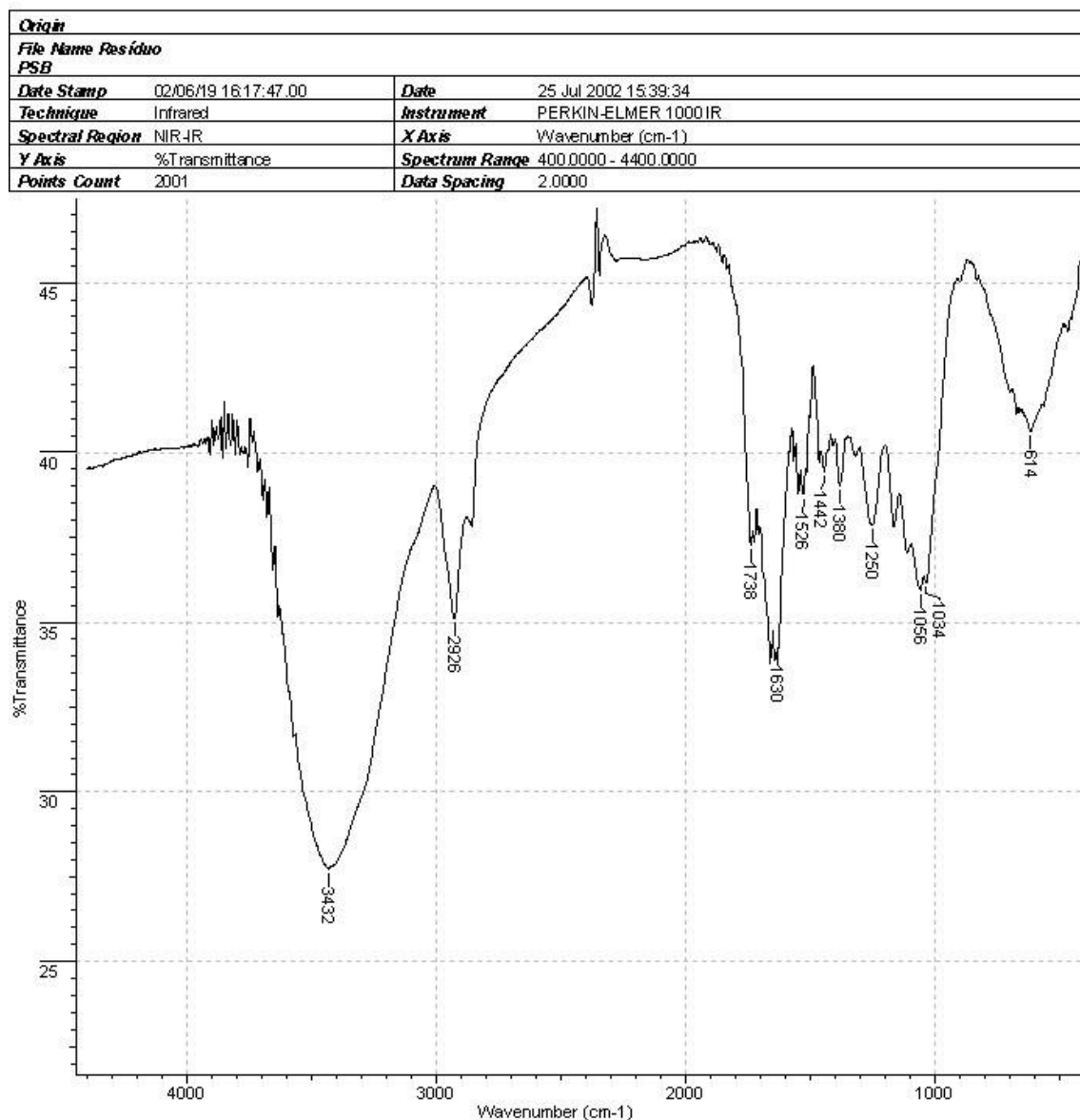


Figura 67. Espectro no Infravermelho do resíduo final da própolis PSB.

O espectro no infravermelho mostra que grupos amídicos de proteínas estão presentes pois as bandas em $1650-1630\text{ cm}^{-1}$ são características de bandas $\text{C}=\text{O}$ conjugadas (estiramento) e $\text{N}-\text{H}$ (deformação), além da banda larga em 614 cm^{-1} (deformação fora do plano de $\text{N}-\text{H}$). Além disso, há absorção da ligação $\text{O}-\text{H}$ em 3432 cm^{-1} (sobrepota à da vibração de estiramento $\text{N}-\text{H}$). Provavelmente este OH é de álcool pois há absorção forte pouco acima de 1000 cm^{-1} . Finalmente, há uma banda devido ao grupo carbonila de éster em 1738 cm^{-1} .

4.11. Comparação dos cromatogramas em diclorometano da folha e broto de alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*) e de diversas amostras de própolis brasileiras obtidos por CG/EM

Os cromatogramas mostrados na Figura 68 são referentes ao extrato em diclorometano do broto do alecrim-do-campo (a), extrato em diclorometano da folha de alecrim-do-campo (b), óleo essencial do broto de alecrim-do-campo (c) e do extrato em diclorometano da própolis PSB (d).

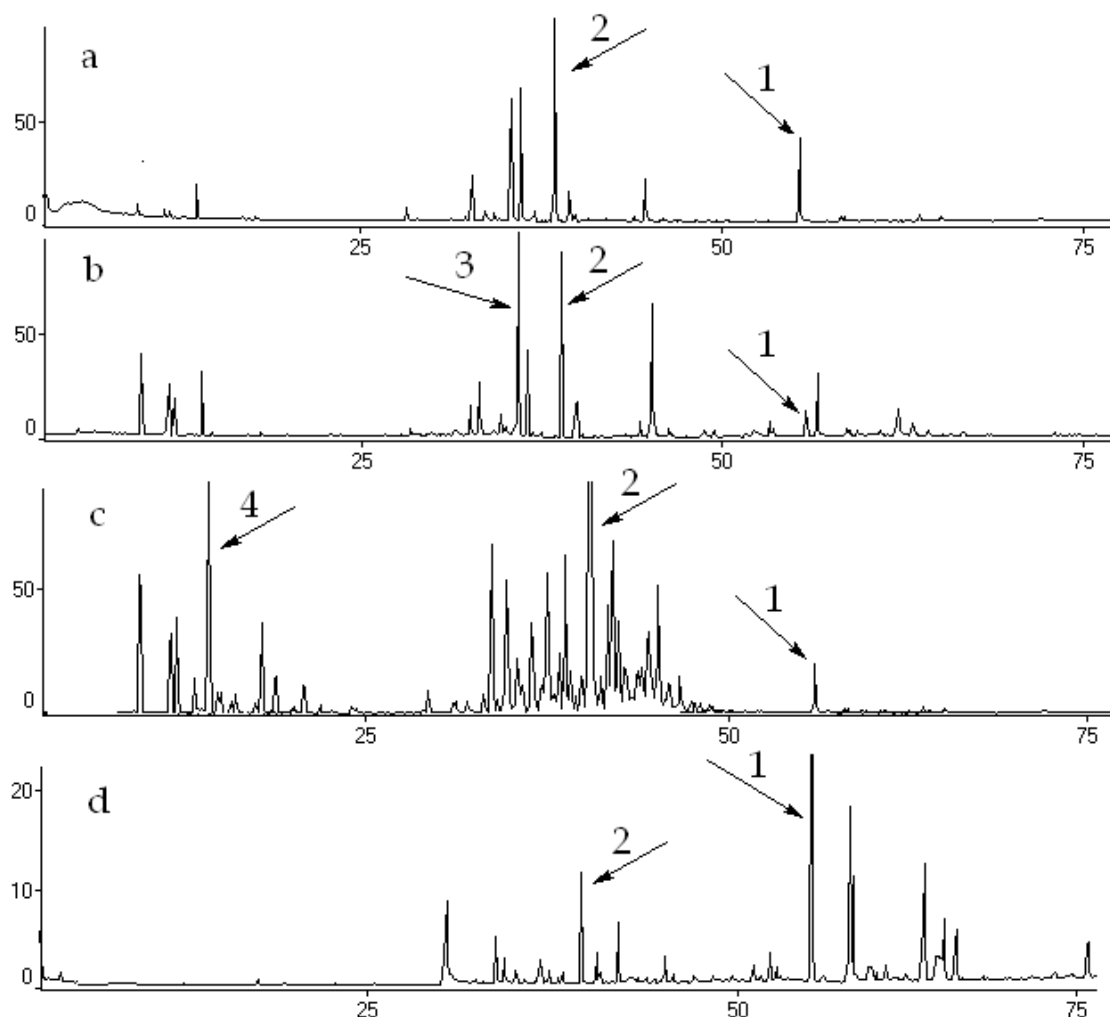


Figura 68. Cromatogramas dos extratos em diclorometano do broto de alecrim-do-campo (a), folha de alecrim-do-campo (b), óleo essencial do broto de alecrim-do-campo (c) e da amostra de própolis PSB (d).

O cromatograma (a) da Figura 68 corresponde ao cromatograma do extrato em diclorometano do broto de alecrim-do-campo. O composto

mais abundante indicado pela seta (2) com tempo de retenção 38 minutos, é o nerolidol. A outra seta (1) com tempo de retenção 55 minutos destaca o composto não-identificado de massa 256.

O cromatograma (b) da Figura 68 corresponde ao cromatograma do extrato em diclorometano da folha de alecrim-do-campo. O composto mais abundante já não é o nerolidol (2) e sim o germacreno-D (3) com tempo de retenção de 36 minutos e que também está presente no extrato do broto de alecrim-do-campo, só que em menor concentração. Neste cromatograma, o pico (1) também está presente, mas em menor abundância.

O cromatograma (c) da Figura 68 corresponde ao cromatograma do óleo essencial do broto de alecrim-do-campo obtido por CG/EM. Os compostos em destaque são o limoneno (4), nerolidol (2) e aquele correspondente ao pico de massa 256 (1), que é encontrado em baixa concentração no óleo essencial.

O cromatograma (d) da Figura 68 corresponde ao cromatograma do extrato em diclorometano da própolis verde PSB obtido por CG/EM. O composto mais abundante neste extrato agora é o (1); o nerolidol (2) é apenas o quarto mais abundante.

A Figura 69 apresenta seis cromatogramas de extratos em diclorometano de outras amostras de própolis do Estado de Minas Gerais. A análise da Figura 69 permite inferir que o pico 1 é o mais abundante em todas as própolis classificadas como verdes, provenientes de regiões onde há alecrim-do-campo (cromatogramas a até f da Figura 69, p. 115).

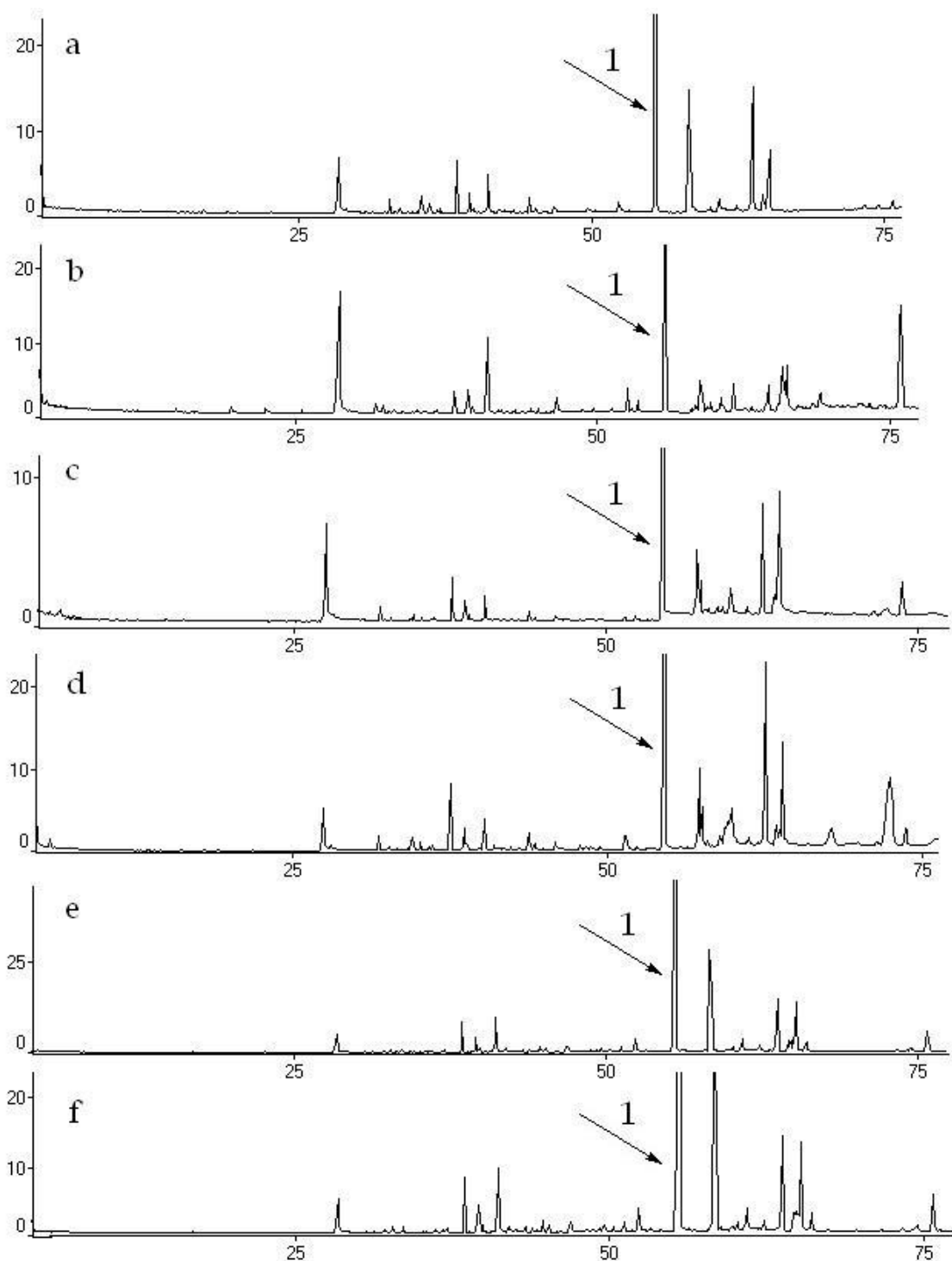


Figura 69. Cromatogramas dos extratos em diclorometano da própolis verde de Perdões (a), própolis verde de Coromandel (b), própolis verde de São Gotardo (c), própolis verde de Nepomuceno (d), própolis verde de Divinópolis (e), própolis verde de Betim (f).

A análise dos extratos em diclorometano das diferentes própolis verdes (Figura 69, cromatogramas a até f) mostra uma grande semelhança no perfil cromatográfico. Deve haver uma seletividade nos compostos procurados pelas abelhas para compor a própolis, independente da região onde ela vai ser coletada. Todos os cromatogramas de própolis verde possuem o pico (1) (m/z 256) como o pico de maior abundância. O fato deste composto não ser o mais abundante nos extratos de alecrim-do-campo, mas sê-lo nas própolis de alecrim-do-campo, sugere que durante o processo de elaboração da própolis pelas abelhas, substâncias como nerolidol, germacreno-D, etc. seriam parcialmente decompostas.

Outra observação interessante que se pode tirar da análise dos cromatogramas a até f é que elas são semelhantes, mas não exatamente iguais. A Tabela 44 mostra, por exemplo, a concentração do composto de massa 256, nos extratos em diclorometano, obtida pela integração do pico correspondente nas respectivas figuras e nos cromatogramas das outras própolis. A variação da concentração deste composto sugere que a composição das diferentes própolis verdes pode mudar, possivelmente porque contêm diferentes quantidades de resina do broto de alecrim-do-campo, fragmentos do broto, pólen, variações ambientais, sazonalidade, etc.

Tabela 44. Área do pico do composto 1 (m/z 256)

Região	Área do pico do composto 1 de m/z 256 (% TIC)
Santa Bárbara - PSB (certificada)	48,06
Perdões 2	54,59
Coromandel (M3)	40,30
São Gotardo - PSG	36,01
Nepomuceno (certificada)	34,69
Divinópolis (certificada)	66,72
Betim (certificada)	56,45
Carrancas	50,36
Itaúna	39,47
Coromandel (certificada)	50,21
Patrocínio (certificada)	35,64

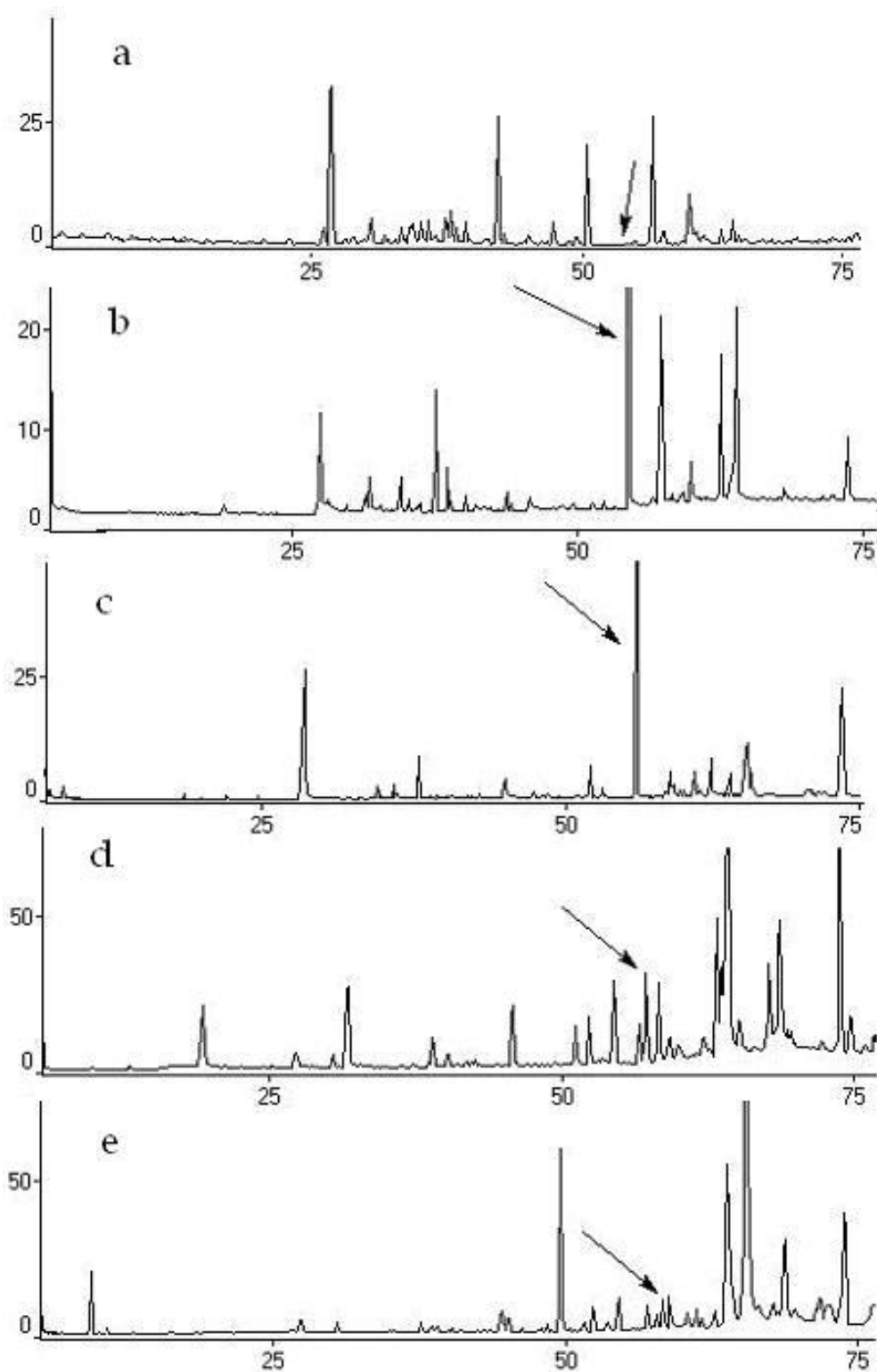


Figura 70. Cromatogramas do extratos em diclorometano da própolis marrom (ME) da região de Bom Jardim em Uberlândia (a), própolis M3 de Coromandel (b), própolis verde-marrom do Norte de Minas (c), própolis marrom-escuro de Indianópolis (d) e própolis marrom-escuro de Tripuí (e).

A Figura 70 apresenta os cromatogramas dos extratos em diclorometano das própolis de cor marrom da região de Bom Jardim (ME) de Uberlândia (a), própolis M3 de Coromandel (b), própolis verde-marrom do Norte de Minas (c), própolis marrom-escura de Indianópolis (d) e própolis marrom-escura de Tripuí (e), obtidos por CG/EM.

Os cromatogramas (b) e (c) da Figura 70 mostram que as amostras de própolis marrom possuem também o pico de m/z 256, e os cromatogramas (d) e (e) mostram que esta quantidade pode variar.

O cromatograma (a) da Figura 70 apresenta a análise de uma própolis cujo pasto apícola era composto basicamente de eucalipto e pasto de braquiária, onde não havia o alecrim-do-campo³⁶. Neste cromatograma não é encontrado o pico 1 (m/z 256) no intervalo de tempo de retenção entre 50 e 55 minutos, conforme indicado por uma seta.

O cromatograma (b) da Figura 71 apresenta uma própolis do Rio Grande do Sul, região que também não possui alecrim-do-campo, e o pico 1 de m/z 256 também não é observado. O cromatograma (c) da Figura 71, corresponde ao cromatograma em diclorometano da própolis Vermelha, e se observa em pequena abundância o pico 1 (m/z 256). O interessante é que as amostras M3, na Figura 70 (b) e a amostra VE, Figura 71 (c), são amostras de Coromandel, de um mesmo apiário, de um mesmo local, e têm características muito distintas.

A Figura 71 ainda apresenta o cromatograma (a) do extrato em diclorometano da própolis preta de Ouro Preto (região rica em alecrim-do-campo), onde se evidencia o pico 1 (m/z 256), o que sugere que o pico 1 possa ser considerado como um marcador químico (MQ) para a própolis de alecrim-do-campo. Tal marcador seria de grande valia para a identificação digital das amostras com maior ou menor quantidade deste marcador.

Os ensaios espectrofotométricos indicaram que a amostra M3 possui considerável teor de fenóis totais, flavonóides e atividade antioxidante. O composto m/z 256, em boa concentração na amostra M3

(com 40% da área total), pode ser o composto responsável por este potencial.

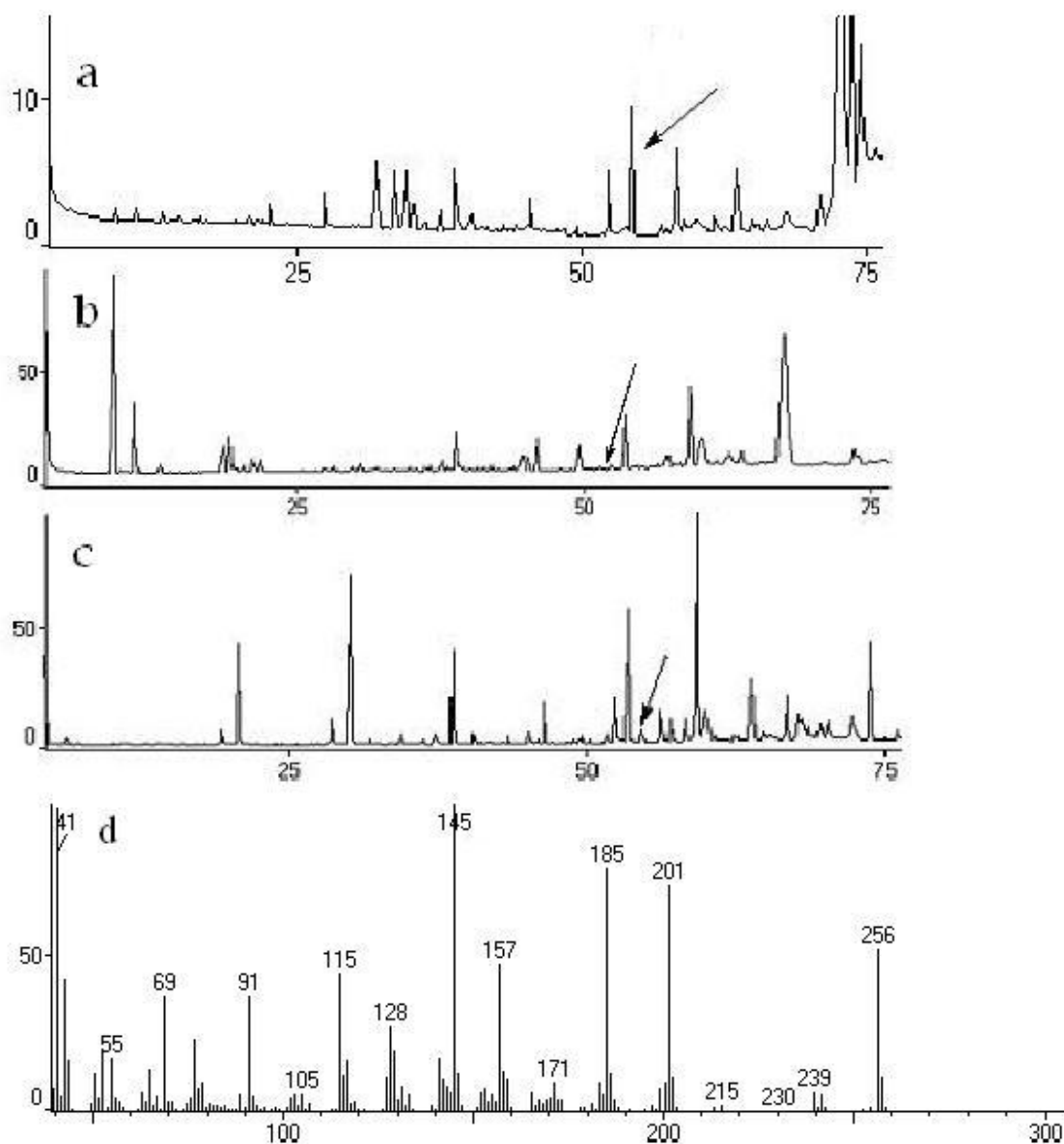


Figura 71. Cromatograma obtidos por CG/EM de: extrato em diclorometano da própolis preta de Ouro Preto (a), extrato em diclorometano de uma própolis do Rio Grande do Sul (b), extrato em diclorometano da própolis avermelhada de Coromandel (c) e Espectro de massas do composto (1) marcador químico MQ das própolis de alecrim-do-campo (d).

A Tabela 45, apresenta os constituintes identificados no extrato em diclorometano da amostra M3.

Tabela 45. Constituintes do extrato em diclorometano da própolis marrom de Coromandel (M3)

Número do pico	Tempo de retenção (min)	Composto	Área %
1	27,52	Ácido Hidrocinâmico	8,22
2	31,93	<i>Trans</i> -cariofileno	1,68
3	34,62	Germacreno-d	1,35
4	37,68	Nerolidol	4,82
5	38,74	(+)-Espatulenol	1,74
6	54,58	m/z 256 (MQ)	40,30
7	57,40	m/z 270	8,38
8	59,96	n.i.	2,59
9	60,20	n.i.	1,53
10	62,65	m/z 281	8,56
11	63,49	n.i.	2,14
12	63,76	alcano de cadeia longa	2,78
13	64,03	n.i.	10,96
14	73,82	alcano de cadeia longa	4,94

n.i. = não identificado.

Alguns compostos não identificados com tempos de retenção superiores a 55 minutos do pico com m/z 256, sugerem que haja outra ou outras espécies vegetais compondo o pasto apícola dessas amostras de própolis, juntamente com o alecrim-do-campo. Sem dúvida, este composto com m/z 256 pode ser considerado um marcador químico para a própolis de alecrim, uma vez que é possível se identificar as própolis com o alecrim-do-campo em sua constituição. Esse marcador químico ainda pode ser usado como controle de qualidade de origem da própolis verde do Estado de Minas Gerais. Não foi observada uma relação direta entre a concentração deste marcador e os resultados obtidos nos ensaios espectrofotométricos.

Conclusões

Os valores das análises gravimétricas como teor de cinzas e ceras encontrados neste estudo mostraram-se compatíveis com os encontrados em outras amostras de própolis e com os valores exigidos pela legislação (10 a 50 %).

Os valores de fenóis totais, teor de flavonóides em equivalentes de quercetina e a atividade antioxidante mostram que a própolis verde e as própolis que têm o alecrim-do-campo em seu pasto apícola apresentam grande potencial como aditivo alimentar.

Os ensaios de atividade antioxidante com DPPH forneceram resultados dentro do esperado para própolis, só que a própolis marrom de alecrim foi superior à própolis verde, surpreendentemente, uma vez que ela é recusada pelos exportadores de própolis verde de alecrim. A maior atividade antioxidante apresentada pela própolis marrom está certamente relacionada ao seu maior conteúdo de fenóis totais, o que é coerente.

As análises das frações em clorofórmio e acetato de etila por CG/EM mostraram que o diclorometano é o melhor solvente de extração para esta técnica, uma vez que os compostos destas frações também foram encontrados no extrato em diclorometano.

A massa do resíduo final analisado por CG/EM identificou alcanos, ácidos e um álcool, todos de cadeia longa. Este resíduo merece ser melhor estudado em função da quantidade de nitrogênio encontrado, que poderia significar um conteúdo de proteínas próximo a 35%. O espectro no infravermelho mostra que o resíduo final possui grupos amídicos de proteínas, álcoois e carbonilas, confirmadas pelas bandas presentes. Este resíduo pode ainda ser aproveitado em outras áreas como a farmacêutica ou na alimentação animal.

Foi demonstrado que as amostras de própolis PSB e PSG têm a resina do broto de alecrim-do-campo como matéria-prima básica. Das amostras vegetais analisadas, o alecrim-do-campo é a espécie que mais possui compostos em comum com as amostras PSB e PSG analisadas.

Foi demonstrado também que própolis de regiões que contêm alecrim do campo possuem um Marcador Químico (MQ - composto de massa 256) facilmente detectável pela CG do extrato diclorometano e que este marcador poderá servir de índice de pureza da própolis de alecrim do campo.

O MQ também foi encontrado em amostras de própolis não-verdes oriundas de regiões que contêm alecrim (como as amostras marrom M3 e a vermelha VE). Isto sugere que a denominação “própolis verde” seja trocada para “própolis de alecrim do campo”, ou ainda, “própolis verde de alecrim”, própolis marrom de alecrim, etc.

Desta forma, o critério da classificação “verde” deixaria de ser pela coloração, passando a ser pela coloração e composição (presença ou ausência do MQ do alecrim-do-campo).

A cromatografia gasosa da PSB, em condições suaves (até 240 °C), mostrou resultados completamente diferentes daqueles obtidos na CG à alta temperatura, evidenciando o quanto é difícil analisar própolis e, principalmente, quantificar os resultados valendo-se de somente uma técnica. Foram identificados nas amostras de própolis analisadas, o ácido cinâmico, terpenóides e flavonóides, alcanos e álcoois de cadeia longa, ácidos carboxílicos e seus derivados (principalmente ésteres) e compostos aromáticos não-hidroxilados.

A análise dos perfis cromatográficos obtidos dos extratos em diclorometano e acetona das amostras PSB e PSG, obtidos por CGAR-AT-EM, confirmam a composição semelhante destas amostras, apesar da discrepância apresentada nas concentrações de muitos constituintes. Os compostos com massas 256 e 270, que foram evidenciados nos extratos analisados, não puderam ser identificados por não constarem do banco de dados do aparelho (Nist 98). A CGAR-AT-EM fornece um cromatograma mais real do extrato em diclorometano que é complementado pelas análises por CG/EM, que trabalha com menores temperaturas.

A CLAE dos extratos de diversas própolis verdes e do broto de alecrim mostrou que elas têm perfil semelhante, ratificando os resultados obtidos anteriormente com a CG.

A cromatografia à gás e a líquida não detectaram a presença de isoflavonas (daidzina, daidzeína, genistina e genisteína), flavanona e flavona, embora os aparelhos possuíssem bancos de dados para referência.

As amostras PSB e PSG (e outras) possuem considerável semelhança em sua constituição e nas propriedades físico-químicas, embora pertençam à regiões geográficas distintas. A maioria das própolis estudadas por CG/EM possuem constituintes em comum, o que faz pensar que as abelhas têm um instinto comum, independente da região em que vivem, coletando apenas os compostos que lhes interessam.

A CLAE-IQPA-EM do extrato etanólico da PSB, no modo positivo, forneceu uma excelente impressão digital deste extrato, tornando-se até o momento a melhor técnica para diferenciar um extrato de outro. O alto preço do equipamento é uma das limitações desta técnica, tornando pouco viável seu uso em laboratórios como uso rotineiro.

Foi apresentada a composição química total do extrato etanólico da PSB, incluindo os compostos que absorvem luz UV/Vis e os demais que não absorvem luz nesta região do espectro.

O ensaio de atividade microbica mostrou que os extratos etanólicos das própolis verdes PSB e PSG têm atividade microbica considerável.

Bibliografia

- [1] Ghisalberti, E. L. **Propolis: a review**, *Bee World*, **1979**, *60*, p. 59-84.
- [2] Bastos, E. M., Oliveira, V. D. C., Soares, A. E. E. **Microscopic characterization of the green propolis, produced in Minas Gerais State**, *Honey Bee Sci.* **2000**, v. 21, 2(4), 179-180.
- [3] Neto, F. R. de A.; Pereira, A. dos S.; Seixas, Fernando R. M. S. **Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras**. *Química Nova*, Março/Abril de **2002**, Volume 25, número 2, p.321-326.
- [4] Marcucci, M. C.; Bankova, V. S. **Standardization of propolis: present status and perspectives**, *Bee World*, Editora IBRA, **2000**, 81(4), p. 182-188.
- [5] Banskota, A. H.; Tezuka, Y.; Prasain, J. K.; Matsushige, K.; Saiki, I.; Kadota, S. **Chemical Constituents of Brazilian Propolis and their Cytotoxic Activities**, *Journal of Natural Products*, **1998**, 61, p. 896-900.
- [6] Marcucci, M. C.; Ferreres, F.; García-Viguera, C.; Bankova, V. S.; De Castro, S. L.; Dantas, A. P.; Valente, P. H. M.; Paulino, N. **Phenolic Compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities**, *Journal of Ethnopharmacology*, 74, **2001**, p.105-112.
- [7] Park, Y. K.; Koo, M. H.; Abreu, J. A. S.; Ikegaki, M.; Cury, J. A.; Rosalen, P. L. **Antimicrobial Activity of Propolis on Oral Microorganisms**, *Current Microbiology*, vol. 36, **1998**, p. 24-28.
- [8] Marcucci, M. C., *Química Nova*, **1996**, 19, 529.

- [9] Greenaway, W., May, J., Scaysbrook, T., Whatley, F. R. **Identification by gas chromatography-mass spectrometry of 150 compounds in propolis**, *Z. Naturforsch.*, **1991**, 46, 111-121.
- [10] Kumazawa, S., Yoneda, M., Shibata, I., Kanaeda, J., Hamasaka, T., Nakayama, T. **Direct Evidence for the Plant Origin of Brazilian Propolis by the Observation of Honeybee Behavior and Phytochemical Analysis**, *Chem. Pharm. Bull.*, **2003**, 51, 740-742.
- [11] Park, Y. K., Paredez-Guzman, J. F., Aguiar, C. L., Alencar, S. M., Fujiwara, F. Y. **Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis**, *J. Ag. Food Chem.*, **2004**, 52, 1100-1103.
- [12] Grange, J. M., Davey, R. W. **Antibacterial properties of propolis**, *Journal of the Royal Society of Medicine*, Vol 83, **1990**, Issue 3 159-160.
- [13] Neto, F. R. de A., Pereira, A. dos S., Nascimento, E. A. do **Lupeol Alkanoates in Brazilian Própolis**, *Z. Naturforsch.*, **2002**, 57, 721-726.
- [14] 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.; Aquino Neto, F.R.; *Z. Naturforsch* **1999**, 54c, 117.
- [15] Park, Y. K., Ikegaki, M., Alencar, S. M., Moura, F. F. **Evaluation of Brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity**, *Honeybee Sci.*, **2002**, 21, 85-90.

- [16] Basnet, P., Matsushige, K., Hase, K., Kadota, S., **Potent antihepatotoxic activity of dicaffeoylquinic acids from propolis**, Biol. Pharm. Bull., **1996**, 19, 1479–1484.
- [17] Takaisi-Kikuni, N. B., Schilcher, H. **Electron-microscopic and Microcalorimetric Investigations of the Possible Mechanism of the Antibacterial Action of a Defined Propolis Provenance**, Planta Med., **1994**, (60-3):222-227..
- [18] Park, Y.K, Paredes-Guzmán, J., Aguiar, C.L., Fujiwara, F. **Estudo das própolis que contém Artepillin C**, Mensagem Doce, **2003**, 74, 9-16.
- [19] Midorikawa, K., Banskota, A. H., Tezuka, Y., Nagaoka, T., Matsushige K., Message, D., Huertas, A. A. G., Kadota, S. **Liquid chromatography-mass spectrometry analysis of propolis**, Phytochem. Anal., **2001**, 12, 366-373.
- [20] Sawaya, A. C. H. F., Tomazela, D. M., Cunha, I. B. S., Vassya S. Bankova, V. S., Marcucci, M. C., Custodio, A. R., and Marcos N. Eberlin, M. N., **Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis**, The Analyst, 2004, 129(8), 739 – 744.
- [21] Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento, SEcretaria de Defesa Agropecuária, Instrução Normativa nº 3, de 19 de Janeiro de **2001**, ANEXO VI - **Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Própolis**, DOU de 23/01/01, Seção I, págs. 18-23.
- [22] Farmacopéia Brasileira, 4. ed., São Paulo, Atheneu, **1988**, V.3.4.
- [23] Woisky, R. G.; Salatino, A. *J. Apic. Res.* **1998**, 37(2), 99.

[24] Markham, K. R. *Techniques of Flavonoid identification*; Academic Press, **1982**, Londres,.

[25] Fernandez, E. C., Tese de Doutorado, **Estudio de la Composicion Tanica de Madera, Corteza y Hojas de Eucaliptus camaldulensis, E. globulus y E. rudis**, INIA, Madri, **1995**, 284 p.

[26] Lee, C. H., Yang, L., Xu, J. Z., Yeung, S. Y. V., Huang, Y., Chen, Z. **Relative antioxidant activity of soybean isoflavones and their glycosides**, Food Chemistry, **2005**, 90,735–741.

[27] Singleton, V. L.; Rossi, J. A. *American Society for Enology and Viticulture*, **1965**, 16, 144.

[28] Waterman, P.G., Mole, S. *Analysis of phenolic plant metabolites*, Blackwell Scientific Publications, **1994**, Londres.

[29] Deutscher Apotheker Verlag, *Deutsches Arzneibuch*, Gogi-Verlag **1978**, GmbH; Stuttgart.

[30] Sykes, P. **A guidebook to Mechanism in Organic Chemistry**, 6th edition, Longman, London, **1986**, 416 pages.

[31] Arts, I. C., van De Putte, B., Hollman P. C. *Catechin Contents of Foods Commonly Consumed in The Netherlands. 1. Fruits, Vegetables, Staple Foods, and Processed Foods*, *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 1746-51.

[32] Arts, I. C., van De Putte, B., Hollman P. C. *Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 2. Tea, wine, fruit juices, and chocolate milk*, *J Agric Food Chem.*, **2000**, May;48(5):1752-7.

- [33] Reed, R., Holmes, D. Weyers J., Jones, A. **Practical Skills in Biomolecular Sciences**, 2nd Edition, Longman, Essex, **2003**, 552 pages.
- [34] Nurmi, T., Mazur, W., Heinonen, S., Kokkonen, J., Adlercreutz, H. **Isoflavone content of the soy based supplements**, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **2002**, 28, 1–11.
- [35] Adams, R. P., **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**, Allured Publ. Corp., **1995**, Carol Stream, Illinois USA.
- [36] Mabry, T. J., Markham, K. R., Thomas, M. B. **The Systematic Identification of Flavonoids**, Springer-Verlag, **1970**, New York.
- [37] Agrawal, Pavan K. *Carbon-13 NMR of flavonoids*; Elsevier, Londres, **1989**.
- [38] Bezzan, L.C. F. "**Contribuição ao Estudo dos Constituintes Químicos da Própolis de *Eucalyptus urophylla* da Região do Triângulo Mineiro**", dissertação de mestrado, maio de **2000**, Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia.
- [39] Timmermann, B. N., Valcic, S., Montenegro, G., Mujica, A., Avila, G., Franzblau, S., Singh, M. P., Maiese, W. M. **Phytochemical, Morphological, and Biological Investigations of Propolis from Central Chile**, Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, **1999**, 54, 406-416.
- [40] Proceedings of the XXII Meeting of The United States Pharmacopeia, United States Pharmacopeial Convention Inc., **1990**, Rockville, USA.

- [41] Chang, R. "Análise dos Compostos Fenólicos da Madeira de *E. grandis* e do *E. urophilla* do Triângulo Mineiro", Dissertação de Mestrado, novembro de 2000, Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia.
- [42] Blair, J. E.; Borman, E. K.; Bynoe, E. T.; Updyke, E. L.; Williams, R. E. O. *Hospital acquired staphylococcal disease, recommended procedures for laboratory investigation*, Atlanta, Ga., United States, Department of Health, Education and Welfare, Public Health Service.
- [43] Lu, L., Chen, Y., Chou, C. *Antibacterial activity of propolis against Staphylococcus aureus*, International Journal of Food Microbiology, 2005, 102, 213– 220.
- [44] Fengel, D.; Wegener, G. *Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reaction*; Walter de Gruyter; Berlim, 1983.
- [45] Jones, D.B. **Factors for converting percentages of nitrogen in foods and feeds into percentages of protein.** USDA Circ., Washington, 1931, 183: 1-21.
- [46] Júnior, D. S., De Queiroz, A. C., Lana, R. P., **A própolis na nutrição de ruminantes**, Revista Mensagem Doce, Setembro de 2001..
- [47] Chen, C., Weng, M., Wu, C., Lin, J. **Comparison of Radical Scavenging Activity, Cytotoxic Effects and Apoptosis Induction in Human Melanoma Cells by Taiwanese Propolis from Different Sources**, Evid Based Complement Alternat. Med., 2004, September, 1(2): 175–185.

- [48] Kumazawa, S., Hamasaka, T., Nakayama, T. **Antioxidant activity of propolis of various geographic origins**, Food Chemistry, **2004**, 84, 329-339.