

Juliano Souza Mariano

***EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE DOIS TIPOS DE PRÓPOLIS:
VERDE (MINEIRA) E VERMELHA (ALAGOANA)***

*Escola de Engenharia da UFMG
Belo Horizonte, MG
Janeiro 2014*

Juliano Souza Mariano

**EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE DOIS TIPOS DE PRÓPOLIS:
VERDE (MINEIRA) E VERMELHA (ALAGOANA)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Engenharia Química.

Orientadora: Prof^ª.Dra. Tânia Lúcia Santos Miranda

*Escola de Engenharia da UFMG
Belo Horizonte, MG
Janeiro 2014*

Aos meus pais, Pedro e Antônia,
pelo incentivo e confiança.
À minha esposa, pela
compreensão.
Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir mais esta conquista, que além de uma realização profissional é também pessoal.

Aos meus pais, Pedrinho e Antônia, por sempre me mostrarem a importância da qualificação acadêmica.

Aos meus irmãos, Breno e Gustavo, sempre presentes na minha vida, torcendo por mais esta vitória.

À minha esposa, Renata Noronha, que esteve comigo lado a lado, desde o primeiro dia, tanto nos momentos de alegria como na superação dos obstáculos.

À minha orientadora, professora Tânia, pela paciência e compreensão nos momentos em que tive dificuldades para lhe trazer os resultados, e que soube com muita propriedade e responsabilidade orientar este trabalho.

Aos professores Ricardo Geraldo de Sousa e Roberto Fernando de Souza Freitas, em especial, por me mostrarem o prazer em estudar mecânica dos fluidos e transferência de massa de forma real e com aplicabilidade.

Ao professor Marcelo Cardoso, que me incentivou a integrar o grupo de mestrandos desta Universidade, orientando-me em todos os passos com a coordenação e etapas da seleção.

A todo o corpo docente da Engenharia Química da UFMG, que, de alguma forma, me acolheu e respeitou a minha capacidade de desenvolver este trabalho.

À Néctar Farmacêutica, onde trabalhei por 06 anos, que me proporcionou conhecimentos profundos de produtos apícolas, de gestão de qualidade, de gestão de negócios, e me mostrou a riqueza dos produtos naturais para a saúde humana.

Ao Laboratório de análises em alimentos, HIDROCEPE, por ser parceiro na realização das análises em HPLC, principalmente ao Diretor, Dr. Jorge Barquete, e a analista de laboratório Cíntia Souza Ribeiro.

À UNIS-FABE, Faculdade de Betim, por me apoiar e disponibilizar seu laboratório para a realização de análises físico-químicas.

Ao aluno Raphael Filipe, por se dedicar junto comigo neste trabalho na busca de informações e coerência de resultados.

Aos participantes da banca examinadora, pela presença.

E a todos os amigos, que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	19
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1 A origem das abelhas	22
3.2 Abelhas africanizadas no brasil	22
3.3 Produtos produzidos ou beneficiados pelas abelhas	24
A Geleia real	24
B Pólen	25
C Cera	26
D Mel	28
E Própolis	30
3.4 Propriedades biológicas e farmacológicas da própolis	32
A Propriedade antimicrobiana	33
B Propriedade antifúngica	34
C Propriedade antiprotozoária	35
D Propriedade antiviral	35
E Atividade antitumoral	35
3.5 Instalação do apiário	36
3.6 Produção de própolis	38
3.7 Própolis verde	44
3.8 Própolis vermelha	48
4. METODOLOGIA	55
4.1 Produção e coleta da própolis bruta nos apiários	55
4.2 Metodologia geral para obtenção de extratos líquidos de própolis	57
4.3 Caracterização física e química das própolis verde e vermelha	59
4.3.1 Teor de umidade	59
4.3.2 Percentual de ceras	60

4.3.3	Identificação e quantificação da formononetina presente na própolis vermelha	61
4.3.4	Identificação e quantificação dos flavonóides presentes na própolis verde	62
4.3.5	Estudo da influência da concentração de álcool na extração de formononetina	63
4.4	Determinação da quantidade de sólidos solúveis totais presentes nos extratos de própolis (verde e vermelha)	64
4.5	Extração em dois estágios, em corrente cruzada, para os dois tipos de própolis: verde e vermelha	67
5.	RESULTADOS	69
5.1	Caracterização física da própolis vermelha bruta	69
5.2	Identificação e quantificação da formononetina presente em própolis vermelha	71
5.3	Determinação do rendimento de extração em diferentes concentrações de solução alcoólica	76
5.4	Caracterização da própolis verde bruta	77
5.5	Avaliação do efeito da variação da relação massa de própolis bruta/massa de solvente sobre a massa de sólidos solúveis totais (SST), para extrações realizadas com etanol 90° GL e com água deionizada a 60 °C....	78
6.	CONCLUSÕES	85
7.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	87
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	XX

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 3.1	INTERIOR DE UMA COLMEIA COM A ABELHA RAINHA MOSTRADA NO CENTRO DA FOTO	20
FIGURA 3.2	PÓLEN DE FLORES	25
FIGURA 3.3	CERA DE ABELHAS	27
FIGURA 3.4	FAVO DE MEL	29
FIGURA 3.5	APIÁRIO	37
FIGURA 3.6	ABELHA <i>Apis mellifera</i> COLETANDO PRÓPOLIS DO BACCHARIS DRACUNCULIOFOLIA	39
FIGURA 3.7	ABELHA <i>Apis mellifera</i> CARREGANDO A PRÓPOLIS PARA A COLMEIA	39
FIGURA 3.8	ABELHA <i>Apis mellifera</i> FECHANDO A COLMEIA COM A PRÓPOLIS	40
FIGURA 3.9	COLMEIA COMPLETAMENTE FECHADA COM A PRÓPOLIS	40
FIGURA 3.10	PRÓPOLIS SENDO COLETADA	40
FIGURA 3.11	CPI – COLETOR DE PRÓPOLIS INTELIGENTE	41
FIGURA 3.12	ESTRUTURA DO ARTEPELIN C	44
FIGURA 3.13	RENDIMENTO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS (E) E AQUOSOS (W) DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS EXTRAÍDOS A 45 °C OU À TEMPERATURA AMBIENTE (EXTRAÇÃO SEQUENCIAL 24 E 48 HORAS)	47
FIGURA 3.14	DALBERGIA ECASTOPHYLLUM (L) TAUB. (FABACEAE), O "RABO-DE-BUGIO". PRÓPOLIS VERMELHA	48
FIGURA 3.15	COLETA DA PRÓPOLIS VERMELHA	50
FIGURA 3.16	ESTRUTURA DA FORMONONETINA	53
FIGURA 3.17	CROMATOGRÁFICO DA PRÓPOLIS VERMELHA	53
FIGURA 3.18	AMOSTRA DE PRÓPOLIS COM MUITOS PONTOS DE CERA	54

FIGURA 3.19	AMOSTRA DE PRÓPOLIS COM POUCOS PONTOS DE CERA ..	54
FIGURA 4.1	FLUXOGRAMA GERAL DO PROCESSO DE MACERAÇÃO (EXTRAÇÃO) DE PRÓPOLIS (VERDE E VERMELHA)	65
FIGURA 5.1	AMOSTRA DE PRÓPOLIS VERMELHA <i>IN NATURA</i> MOÍDA	69
FIGURA 5.2	AMOSTRA DE PRÓPOLIS VERMELHA APÓS SECAGEM EM ESTUFA	69
FIGURA 5.3	EXTRATO OBTIDO EM MISTURA CLOROFÓRMIO-ACETONA (2:1)	71
FIGURA 5.4	RESÍDUO SÓLIDO INSOLÚVEL, APÓS EXTRAÇÃO COM MISTURA CLOROFÓRMIO-ACETONA (2:1)	71
FIGURA 5.5	EXTRATO DE PRÓPOLIS VERMELHA, APÓS EXTRAÇÃO EM ÁGUA DEIONIZADA	71
FIGURA 5.6	RESÍDUO SÓLIDO INSOLÚVEL, APÓS EXTRAÇÃO EM ÁGUA ..	71
FIGURA 5.7	CROMATOGRAMAS, EM HPLC. (A) PADRÃO DE FORMONONETINA, (B) EXTRATO DE PRÓPOLIS EM SOLVENTE ÁLCOOL HIDRATADO 90 °GL, (C) EXTRATO DE PRÓPOLIS EM SOLVENTE ÁLCOOL HIDRATADO 80 °GL	72
FIGURA 5.8	CROMATOGRAMAS, EM HPLC. (A) PADRÃO DE FORMONONETINA, (B) EXTRATO DE PRÓPOLIS EM SOLVENTE ÁLCOOL HIDRATADO 70 °GL, (C) EXTRATO DE PRÓPOLIS EM SOLVENTE ÁLCOOL HIDRATADO 60 °GL	73
FIGURA 5.9	RELAÇÃO ENTRE A MASSA DE SÓLIDOS SOLÚVEIS TOTAIS OBTIDAS NOS EXTRATOS LÍQUIDOS E A PROPORÇÃO MASSA DE PRÓPOLIS BRUTA/MASSA DE SOLVENTE UTILIZADA.....	82

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1	NUTRIENTES ENCONTRADOS NA GELEIA REAL	25
TABELA 3.2	COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL TÍPICA DO PÓLEN	26
TABELA 3.3	COMPOSIÇÃO DA CERA DE ABELHAS.....	28
TABELA 3.4	PADRÕES DE QUALIDADE DO MEL	30
TABELA 3.5	RESULTADOS DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA DE EFICIÊNCIA DA PRÓPOLIS VERMELHA	52
TABELA 4.1	CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS UTILIZADAS PARA A EXTRAÇÃO DE PRÓPOLIS VERDE E VERMELHA VISANDO À DETERMINAÇÃO DAS MELHORES CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO	66
TABELA 4.2	CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS UTILIZADAS PARA EXTRAÇÃO EM UM ESTÁGIO	68
TABELA 5.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA DA PRÓPOLIS VERMELHA BRUTA	75
TABELA 5.2	PERCENTUAL DE RESÍDUO SECO TOTAL E RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO DE PRÓPOLIS VERMELHA EM ESTÁGIO ÚNICO, EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SOLUÇÃO ALCOÓLICA, MANTENDO-SE CONSTANTE A MASSA TOTAL DA MISTURA (PRÓPOLIS BRUTA + SOLVENTE) EM 1000g E RELAÇÃO MASSA DE PRÓPOLIS/MASSA DE SOLVENTE EM 15%	76
TABELA 5.3	CARACTERIZAÇÃO DA PRÓPOLIS VERDE BRUTA	78
TABELA 5.4	EFEITO DA VARIAÇÃO DA RELAÇÃO MASSA DE PRÓPOLIS BRUTA/MASSA DE SOLVENTE, PARA EXTRAÇÃO DE PRÓPOLIS VERDE COM SOLUÇÃO ALCOÓLICA A 90 °GL, EM ESTÁGIO ÚNICO, MANTENDO-SE CONSTANTE A MASSA DA MISTURA (PRÓPOLIS BRUTA + SOLVENTE) EM 1.000g	80

TABELA 5.5	EFEITO DA VARIAÇÃO DA RELAÇÃO MASSA DE PRÓPOLIS BRUTA/MASSA DE SOLVENTE, PARA EXTRAÇÃO DE PRÓPOLIS VERDE COM ÁGUA DEIONIZADA, A 60 °C, EM ESTÁGIO ÚNICO, MANTENDO-SE CONSTANTE A MASSA DA MISTURA (PRÓPOLIS BRUTA + SOLVENTE) EM 1.000g	81
TABELA 5.6	EXTRAÇÃO DE PRÓPOLIS VERDE, EM ÁGUA E EM SOLUÇÃO ALCOÓLICA 90 °GL E DE PRÓPOLIS VERMELHA EM SOLUÇÃO ALCOÓLICA 90 °GL, EM DOIS ESTÁGIOS, EM CORRENTE CRUZADA	83

RESUMO

Neste trabalho, foram estudadas algumas condições operacionais para extração de própolis verde em água e em solução alcoólica (etanol), e de própolis vermelha em solução alcoólica (etanol), visando ao melhor aproveitamento da própolis bruta. A própolis verde utilizada foi considerada de excelente qualidade, pois foram encontrados baixos percentuais de umidade (5,1%) e de cera (14,2%) e uma elevada concentração de flavonoides (3.500mg/100g de própolis bruta), o que lhe conferiu a classificação de própolis bruta Ultra Green. A própolis vermelha apresentou baixo teor de umidade (4,5%), mas um elevado percentual de ceras (38,4%), que, apesar de alto, é considerado comum para este tipo de própolis. A presença de formononetina na própolis vermelha foi identificada e sua concentração foi estimada após extração realizada em quatro diferentes concentrações alcoólicas (60, 70, 80, 90 °GL), sendo o melhor resultado (6,2mg/g de própolis bruta), obtido para a extração realizada em solução alcoólica 80 °GL. Por outro lado, a maior quantidade de sólidos solúveis totais (SST), 69,8 g, foi obtida para a extração de própolis vermelha em solução a 90 °GL, levando a um percentual de resíduo seco igual a 8,39% e a um rendimento de extração de 46,6%. Na extração de própolis verde, as relações massa de própolis bruta/massa de solvente que levaram à obtenção das maiores quantidades de SST foram a de 35% para a extração em solução alcoólica 90 °GL e a de 15% para a extração em água. Nessas condições, foram obtidos, respectivamente, 80,64 g de SST e um percentual de resíduo seco igual a 21,0%, e 40,56 g de SST e percentual de resíduo seco igual a 6,8%. Observou-se, ainda, que a extração em dois estágios em corrente cruzada, leva a um melhor aproveitamento da própolis bruta, visto que houve um aumento na massa de SST de 60% para a própolis verde em

solução alcoólica (38,62g), 54% para própolis verde em água (12,58g) e de 16% para própolis vermelha em etanol 90 °GL (11,02g)

Palavras chave: Própolis verde, Própolis Vermelha, Formononetina, Flavonoides.

ABSTRACT

In this work, some operating conditions for the extraction of propolis in water and alcohol solution, and propolis in alcoholic solution, to maximize the use of raw propolis were studied. The propolis used was considered of excellent quality because low percentage of moisture (5.1%) and wax (4.2%) and a high concentration of flavonoids (3,500 mg/100g) were found, which will confered the rank of crude propolis Ultra Green. The propolis showed low moisture content (4.5%), but a high percentage of waxes (38.4 %), that is, although high, considered common for this type of propolis. The presence of formononetin in red propolis were identified and their concentration was estimated after for the extraction carried out in four alcohol concentrations (60, 70, 80, 90 °GL), the best result obtained (6.2 mg/g) for extraction performed at 80 °GL alcohol solution. On the other hand, the larger amount of total soluble solids (TSS) (69.8 g) was obtained for the extraction of propolis with the solution at 90 °GL, leading to an average dry matter percentage equal to 8.39% and one average extraction yield of 46.6%. The extraction of propolis in operating conditions used, the mass of crude propolis/mass of solvent that led to obtaining larger quantities of soluble solids relationships were 35% for the extraction solution in alcohol 90 °GL and 15 % for extraction in water, obtaining 80.64 g of total soluble solids (TSS) and dry matter percentage equal to 21.08%, for the extraction solution in alcohol 90 °GL, and 40.56 g of total soluble solids (TSS) and percent dry weight equal to 6.8% for extraction in water. It was observed also that the extraction conditions used in this work, with the two-stage extraction in cross- current, there is a better use of raw propolis, since there was an increase in the mass of total soluble solids of 60% for green propolis alcoholic solution 54% in water for green propolis and 16% to 90 °GL alcohol solution for red propolis.

Keywords: green propolis, red propolis, formononetin, flavonoids

.

1. INTRODUÇÃO

A própolis é uma mistura complexa, formada por material resinoso e balsâmico coletado dos ramos, flores, pólen, brotos e exudatos de árvores, o qual, nas colmeias, é transformado pelas abelhas por meio de enzimas e de suas secreções salivares (PEREIRA *et al.*, 2002). É usada pelas abelhas como proteção contra insetos e microrganismos, para recobrir as paredes da colmeia, reforçar os favos, preencher as fissuras, restringir a entrada de estranhos na colmeia, para embalsamar animais, atuando como um desinfetante e no preparo de locais assépticos para a postura da abelha rainha. Funciona como um antibiótico natural e evita infecções e epidemias entre as abelhas.

A composição química da própolis é muito complexa, sendo constituída, basicamente, por resinas (50%), ceras (30%), óleos vegetais (10%), pólen (5%) e componentes orgânicos (5%) (Gómez-Caravaca *et al.*, 2006). É formada por mais de 150 compostos, destacando-se entre eles, os flavonoides, grupo de substâncias ao qual são atribuídas propriedades antibióticas. Apresenta propriedades medicinais como anestésico, analgésico, cicatrizante, anti-inflamatório, antibacteriano, antifúngico, antiviral, antigripal, bioestimulante, dentre outras.

O uso da própolis na medicina popular vem dos tempos antigos. Os egípcios, gregos e romanos relataram o uso de própolis com finalidades curativas em geral, e para a cura de algumas lesões da pele há mais de 5.000 anos. Na Europa, desde o século XII, a própolis tem ocupado um lugar importante na medicina popular. A própolis é constituída por mais de 300 componentes químicos, mas somente nos últimos 20 anos que os cientistas têm conseguido provar suas propriedades terapêuticas (CASTRO, 2001).

A própolis brasileira é uma das melhores em qualidade, se comparada aos demais países produtores, representando uma importante fonte de renda para o apicultor (BREYER, 1996). A própolis produzida em Minas Gerais tem como principais destinos os mercados do Japão, Coreia do Sul, Taiwan, Omã, Tailândia, China e Estados Unidos. Cerca de 90% da produção são voltados para o mercado externo. Os preços da própolis bruta para exportação estão em patamares rentáveis, variando de US\$ 90 a US\$ 140 o quilo, dependendo da qualidade final da própolis (DIÁRIO DO COMÉRCIO, 2012). No mercado interno, o valor pago ao produtor por quilo do produto varia de R\$ 90,00 a

R\$140,00, dependendo da origem e da qualidade do produto (PRODUTORES DE PRÓPOLIS, 2013).

A própolis do Brasil é disputada por importadores internacionais, especialmente na Ásia, para consumo direto e para a produção de medicamentos. O Brasil exporta 70 toneladas de própolis por ano para fins medicinais (dado estatístico, segundo avaliações de produtores e exportadores brasileiros). O Japão é o principal mercado importador da própolis brasileira, absorvendo cerca de 80% da produção, tendo, ainda, Estados Unidos, Alemanha e China como fortes compradores.

Sabe-se hoje, que a própolis verde, uma qualidade produzida pelas abelhas a partir da resina do *Baccharis dracunculifolia* - conhecido como alecrim do campo, é a mais comercializada devido aos mais de 70 compostos químicos diferentes encontrados, alguns isolados e testados com sucesso no tratamento de câncer. O alecrim do campo é encontrado principalmente no nordeste do estado de São Paulo e sul do estado de Minas Gerais (BASTOS, 1998; OLIVEIRA & BASTOS, 1998; BANKOVA *et al.*, 1999; BASTOS & OLIVEIRA, 2000; PARK *et al.*, 2002, PARK *et al.*, 2004).

Um novo tipo de própolis está sendo pesquisada no Brasil, uma própolis com tonalidade avermelhada, produzida em colmeias localizadas ao longo da orla do mar e costas de rios no nordeste brasileiro, com alta atividade antimicrobiana e antirradical livre. As abelhas dessa região foram observadas coletando exudato resinoso vermelho de *Dalbergia ecastophyllum* (L) Taub. (*Leguminosae*), uma planta encontrada próximo a manguezais, para produção de própolis. Denominada de Própolis Vermelha, ela apresenta propriedades antioxidante, anti-inflamatória e antibiótica e, por isso, vem sendo procurada por indústrias farmacêuticas de diversos países (DONNELLY *et al.*, 1973; MATOS *et al.*, 1975; DAUGSCH *et al.*, 2006; KAMINSKI & ABSY, 2006; SAWAYA *et al.*, 2006).

No Japão, por exemplo, o produto brasileiro é utilizado em tratamento bucal, produção de solução para bochecho, balas, chocolates, cápsulas, entre outros. Para que a própolis possa ser utilizada, seja como alimento, ou em procedimentos terapêuticos, seus constituintes solúveis devem ser extraídos por meio da utilização de um solvente adequado. Diversos tipos de solvente podem ser utilizados na extração de própolis. A definição do solvente a ser utilizado se dá em função das substâncias que se desejam extrair. A própolis bruta contém substâncias solúveis em óleo, em água e, também, aquelas que são solúveis tanto em óleo quanto em água (APACAME, 2008).

Quando a própolis é destinada para a área alimentícia, medicinal ou aplicações em cosméticos, o solvente mais comumente utilizado é o etanol, que pode ser utilizado em extração em base oleosa, a partir de uma elevada concentração alcoólica e extrações em base hidroalcoólica, com extratos feitos com baixa concentração de álcool 100°GL. Podem ser feitas, também, extrações em água, tomando-se os cuidados de manter sua estabilidade aparente, minimizando a contaminação dos extratos obtidos (MALASPINA & PALMA, 2000). De uma maneira geral, os processos de produção de extrato de própolis não são padronizados. As empresas trabalham com as condições que consideram mais convenientes ao seu orçamento operacional, mas, nem sempre, essas condições proporcionam um bom aproveitamento da própolis bruta, pois uma quantidade considerável dos constituintes solúveis da própolis pode ser perdida na borra após a separação do extrato líquido. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho consistiu em avaliar os efeitos que algumas condições operacionais exercem sobre a extração das própolis verde e vermelha, buscando um melhor aproveitamento das amostras brutas. O trabalho aqui apresentado encontra-se dividido em 07 capítulos, distribuídos conforme apresentado a seguir. No capítulo 1, encontra-se uma breve introdução sobre o assunto, destacando a importância da própolis tanto no mercado brasileiro como no internacional. Em seguida, no capítulo 2, são apresentados os objetivos gerais e específicos do trabalho. No capítulo 3, revisão bibliográfica, são abordados os principais aspectos relativos à reprodução e organização das abelhas dentro das colmeias, bem como sua origem e a raça predominante no Brasil, os principais produtos fabricados pelas abelhas, sua importância econômica, suas principais características medicinais e sua composição nutricional e química. São abordados, também, os processos normalmente utilizados para a extração da própolis. Na metodologia, apresentada no capítulo 4, encontram-se descritos os procedimentos utilizados na condução dos experimentos, bem como os materiais, reagentes e equipamentos utilizados. Os resultados obtidos são apresentados e discutidos no capítulo 5. As conclusões encontram-se no capítulo 6. No capítulo 8 estão listadas todas as referências bibliográficas utilizadas na realização deste trabalho.

2 . OBJETIVOS

O objetivo geral do presente trabalho consistiu em fazer uma avaliação do efeito que algumas variáveis operacionais exercem sobre a extração das própolis verde e vermelha, buscando um melhor aproveitamento das amostras brutas.

Os objetivos específicos do trabalho foram:

- Caracterizar física e quimicamente os dois tipos de própolis investigadas;
- Avaliar o efeito que a concentração da solução alcoólica exerce sobre a extração de própolis vermelha;
- Investigar o efeito da relação massa de própolis bruta/massa de solvente sobre a extração de própolis verde em água e em solução aquosa;(?)
- Estudar a operação em dois estágios, em corrente cruzada, para a extração da própolis vermelha em solução alcoólica e da própolis verde, tanto em água, quanto em solução alcoólica.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os povos mais antigos já conheciam as abelhas e se utilizavam do mel. Mesopotâmicos, egípcios, gregos e romanos já conheciam as abelhas e a arte de criá-las: a apicultura. As abelhas do gênero *Apis mellifica* são insetos sociais (existem abelhas agressivas, como as africanas, inadequadas para a apicultura tradicional). Vivem em grandes famílias, chamadas colônias, constituídas de uma única rainha, centenas de zangões e milhares de operárias (WINSTON, 2003). Na FIGURA 3.1 observa-se o interior de uma colmeia, contendo os favos de mel.



FIGURA 3.1 – Interior de uma colmeia com a abelha rainha mostrada no centro da foto.
Fonte: <http://biologiadapri.blogspot.com/p/relacoes-ecologicas.html>

A abelha apresenta uma combinação de características individuais e de cooperação social não encontrada no restante do reino animal. O modo como a abelha consegue se adaptar ao mundo que a rodeia é uma das mais ricas fontes de estudo e de conhecimento dentre os organismos, e que se torna mais rica ainda pelos benefícios econômicos trazidos por ela. Dentro da colmeia, vivem mais de 60.000 indivíduos, orientados por uma única abelha rainha, que põe cerca de 1.000 ovos por dia.

A estrutura do ninho, favos perfeitamente uniformes e funcionais, é constituída de cera, produzida pelas operárias e construída em uma série repetida de alvéolos

hexagonais quase perfeitos. Individualmente, os três tipos de membros, rainha, zangões e operárias, possuem cada um, suas especializações dentro da sociedade das abelhas.

A rainha, cuja principal função é a postura de ovos, é a mãe de todas as abelhas componentes da colônia e reina sobre o enxame, cercada pelas assistentes e alimentada com uma comida rica, necessária para as cruciais tarefas dentro da colônia. Os zangões, alimentados pelas operárias, cumprem apenas a função de fecundar a rainha, que após o ato de fertilidade custa-lhe a vida. As operárias executam diversas tarefas no enxame, sendo que algumas delas pagam com a própria vida quando ferem os invasores. Elas atendem a cria, operculam alvéolos, isto é, fecham as células que contêm mel maduro, retiram detritos do ninho, aquecem o ninho, colhem e levam alimentos para a colônia, elaboram e armazenam o mel e defendem as colônias de seus inimigos (formigas e outros insetos).

A operária nasce de um ovo fecundado, colocado no fundo de um alvéolo hexagonal, e seu desenvolvimento dura cerca de 21 dias. Durante os três primeiros dias de sua vida adulta, a abelha trabalha de faxineira. Por volta do terceiro dia, desenvolvem-se suas glândulas hipofaríngeas, produtoras de geleia real, e elas passam, então, à função de nutriz - primeiramente das larvas mais velhas e, depois, das mais novas. É a nutriz que fornece geleia real para a rainha. Por volta do 9º dia, se desenvolvem as glândulas cerígenas, produtoras de cera. Ela passa à nova tarefa de produzir cera, construir favos e opercular alvéolos. Nova mudança glandular habilita a abelha a fazer mel, transformando o néctar das flores, colhido e transportado pelas abelhas campeiras. Por volta da 3ª semana de vida, a abelha assume tarefas de guarda, circulação de ar e sinalização odorífera. Por esse tempo, começam seus vôos de orientação, preparando-se para os trabalhos no campo. Sua última tarefa será como campeira, encarregada de trazer alimentos: néctar, pólen e água. Nesse trabalho, ela também deverá encontrar, colher e trazer a própolis, uma resina vegetal usada para desinfetar e vedar o interior de sua habitação.

A primavera é a estação do ano mais favorável às abelhas, que sucede a mais desfavorável, o inverno. Quando chega a primavera, os dias se tornam cada vez mais longos e a temperatura ambiental aumenta gradativamente, fazendo com que as operárias se sintam estimuladas a darem mais geleia real à rainha e esta passa a produzir mais ovos. A flora produz um número cada vez maior de flores e as abelhas são favorecidas a sair para serviços externos, em número cada vez maior a cada dia que

passa. Como os dias são maiores, elas trabalham por maior número de horas, colhendo maior quantidade de alimentos (WINSTON, 2003).

3.1 A ORIGEM DAS ABELHAS

O mais antigo fóssil conhecido de abelhas data do período Eoceno, 40 milhões de anos atrás, classificado em um gênero próprio, o *Electrapis* (CULLINEY, 1983). Todas as abelhas atuais (*Apidae: apini*) são classificadas em um único gênero *Apis*, que inclui cinco espécies: a abelha comum (*A. mellifera*), a abelha gigante (*A. dorsata* e *A. laboriosa*), a abelha índia (*A. cerana*) e a abelha anã (*A. florea*).

A distribuição geográfica natural do gênero *Apis* apresenta a maior diversidade de espécies na Índia e regiões adjacentes, e todas as espécies, com exceção da *A. mellifera*, são encontradas nessa região.

Entre 1840 e 1850, as abelhas melíferas do gênero *Apis* foram trazidas pelos imigrantes europeus com o objetivo de propiciar um melhoramento genético para aumentar a produção de mel no Brasil. Em 1956, ocorreu a enxameação de algumas famílias, devido a problemas na manipulação, o que levou ao início de um processo de cruzamentos naturais com essas abelhas de origem europeia (SOARES, 2004).

A mansidão e a docilidade dessas abelhas permitiram que sua criação fosse uma prática comum nas fazendas e muitas pessoas as possuíam em suas residências, mesmo na cidade.

3.2 ABELHAS AFRICANIZADAS NO BRASIL

De 1950 a 1956, o Ministério da Agricultura esteve sob constante pressão de apicultores que desejavam uma abelha mais ativa e mais adaptada aos trópicos. Chegaram aqui os artigos de Virgílio de Portugal Araújo dizendo da enorme produção da abelha africana (*Apis mellifera adansonii*) feita a adaptação às condições tropicais. Com o propósito de desenvolver uma raça de abelha que melhor se adaptasse às condições brasileiras do que as abelhas pretas ou alemãs (*Apis mellifera mellifera*) e as italianas (*Apis mellifera linguistica*), em 1956, o Ministério da Agricultura autorizou a importação de rainhas de abelhas africanas (*Apis mellifera scutellata*). A introdução dessas abelhas

africanas no Brasil é o marco de um novo momento na história da apicultura brasileira. Segundo o relato de KERR (1984), o principal protagonista desse episódio, os fatos se deram da seguinte maneira:

*“ Em 1956, ganhei o 1º Prêmio Nacional de Genética André Dreyfus. Com o dinheiro ganho comprei uma máquina fotográfica, um ótimo microscópio Zeiss Standard, com equipamento fotográfico no qual se adaptava a câmara comprada, e uma passagem para a África. Fui então procurado pelo meu amigo Prof. Walter Jardim, Secretário de Agricultura do Estado de São Paulo, que, em nome do Ministério da Agricultura, pediu-me que trouxesse um certo número de rainhas de *Apis mellifera adansonii*. Por causa disso, tive meu passaporte comum transformado em passaporte especial e recebi 06 cartas de apresentação do Itamaraty. Essas rainhas foram coletadas em número ao redor de 100 em 04 países: Angola, Tanzânia, Moçambique e África do Sul. Vivas e que deixaram descendentes foram apenas: 01 de Tabora (Tanzânia) – a mais forte e da qual foram feitas mais rainhas do que das outras – e 35 da região de Pretória e Joannesburgo (África do Sul). Da Cidade do Cabo até o Rio de Janeiro vim de navio, trazendo 70 rainhas, às quais dava uma gota de água diariamente. No Rio de Janeiro esperava-me o Dr. Aristóteles Godofredo de Araújo e Silva, em nome do Ministério da Agricultura. A ele informei que achava a subespécie muito brava e que precisava de um cuidadoso exame individual para não haver introdução de pragas. Recomendou-se então que fizesse a quarentena em Piracicaba – SP, em Camaquã (pequena vila a poucos quilômetros de Rio Claro – SP)” (KERR, 1984).*

Considerando a forte agressividade da abelha africana *Apis mellifera adansonii*, o Prof. Kerr planejou efetuar, após o período de quarentena, uma série de cruzamentos com as abelhas italianas *Apis mellifera ligustica*, conhecida por seu comportamento amistoso, de modo a obter, na 3ª ou 4ª geração, uma linhagem de alta produtividade e de fácil manejo. Porém, antes do final do período de quarentena, de forma acidental, ocorreu a fuga de parte das abelhas africanas. Pelo relato de Gonçalves, começa assim o processo de africanização das abelhas brasileiras. “Após as abelhas africanas terem sido transportadas para Camaquã, em 1956, para permanecerem em quarentena, em um horto florestal próximo a Rio Claro – SP, houve o já conhecido acidente provocado por um apicultor, ou seja, a retirada, inadvertidamente, das telas excludoras que estavam na entrada das colmeias com rainhas importadas. Isso permitiu que rainhas africanas puras descendentes das importadas enxamenassem antes de ser realizado o programa de

melhoramento genético planejado por KERR (1984). Dessa maneira, as rainhas novas fecundaram com zangões da região, iniciando-se uma hibridização, o que vem ocorrendo até os dias atuais. Desde o início, os híbridos mantiveram sempre as características morfológicas e comportamentais das abelhas puras importadas e gradualmente ocorreu a africanização das abelhas *Apis mellifera* de toda a América do Sul e, posteriormente, na América Central” (GONÇALVES, 1986).

Com a importação dessas poucas rainhas, uma grande mudança na apicultura do Brasil estava se iniciando, considerado hoje um dos mais fascinantes experimentos ocorridos na biologia e na significativa dominação dos caracteres herdados para adaptação de certos ambientes. As abelhas africanas livres no ambiente se expandiram e, após 20 anos, praticamente toda a América do Sul teve suas abelhas africanizadas. Portanto, as abelhas que existem no Brasil e vários países da América do Sul são híbridos entre as abelhas alemãs (*Apis mellifera mellifera*), italianas (*Apis mellifera linguistica*), caucasianas (*Apis mellifera caucasica*) e africanas (*Apis mellifera scutellata*). Já que os híbridos apresentam características mais próximas às características da abelha africana, são denominados por essa razão, de abelhas africanizadas. No Brasil, as abelhas africanizadas são excelentes produtoras de própolis.

3.3 PRODUTOS PRODUZIDOS OU BENEFICIADOS PELAS ABELHAS

Os produtos produzidos pelas abelhas são, principalmente, a geleia real, o mel, a cera e a própolis. A seguir, serão apresentadas as principais características e usos de cada um desses produtos.

(A) – Geleia Real

A Geleia Real é conhecida como o mais nobre produto produzido pelas abelhas, caracterizada como uma substância viscosa, amarelada, que tem importância crucial para a alimentação inicial dos embriões (até o 3º dia) e para a alimentação da Rainha durante todo seu ciclo vital. Enquanto a Rainha, por se alimentar ininterruptamente com Geleia Real, amplia sua vida em até 4 anos ou mais, a abelha normal vive em torno de 6 semanas. Devido a inúmeras propriedades da geleia real, ela tem sido usada como um tônico energético para retardar os efeitos da idade, amenizar sofrimentos de doenças

crônicas degenerativas, no tratamento para ataques epiléticos, hepatites, cirroses, artrites, reumatismo e distúrbios da menopausa. Na TABELA 3.1 são apresentados os principais constituintes da geleia real.

TABELA 3.1 – NUTRIENTES ENCONTRADOS NA GELEIA REAL

COMPONENTES	COMPOSIÇÃO
Água	70%
Carboidratos	11%
Proteínas	12%
Vitaminas em grandes quantidades	B1, B2, B5, B6, B12
Vitaminas em pequenas quantidades	A, C, D, E

Fonte: Japan Food Research Laboratories

(B) - Pólen

O Pólen, apresentado na FIGURA 3.2, é o plasma do germe masculino das plantas. É importante na reprodução das plantas e, para as abelhas, eles são atrativos e comestíveis. Na verdade, é um trabalho incondicional e vantajoso para ambos, abelhas e plantas, uma vez que as abelhas precisam do pólen para seu crescimento e desenvolvimento e muitas plantas necessitam das abelhas para polinização entre as flores.



FIGURA 3.2– PÓLEN DE FLORES

Fonte:<http://www.h2hlatino.org/UserFiles/ImageArticulos%20alimentacion/superalimentos/polen.jpg>

O constituinte mais importante do pólen é a proteína, que nele se encontra, normalmente, em elevadas concentrações, variando de 10 a 28% em massa, sendo esta a única fonte natural de proteínas para as abelhas. Na TABELA 3.2, é apresentada uma composição nutricional típica para o pólen.

TABELA 3.2 –COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL TÍPICA DE PÓLEN

COMPONENTES	COMPOSIÇÃO
<i>Água</i>	30% (m/m)
<i>Proteínas</i>	10 a 36% (m/m)
<i>Glucídeos</i>	20 a 40% (m/m)
<i>Açúcares (carboidratos): formados por açúcares reduzidos, glicose, frutose, rafinose e amido</i>	29% (m/m)
<i>Fibras</i>	3 a 5% (m/m)
<i>Gorduras</i>	1 a 20% (m/m)
<i>Minerais</i>	1 a 7% (m/m)
<i>Vitaminas</i>	A,B,C,D,E

Fonte: Instituto de Zootecnia/APTA/SAA

Existe uma variabilidade considerável no valor nutritivo dos pólenes de plantas diferentes, em parte, por causa das quantidades diferentes de proteína. Quando o pólen é depositado na colmeia, as operárias trabalham para evitar o processo de germinação. Assim, elas iniciam o processo digestivo e preparam o pólen para o armazenamento por longo tempo. O processo de coleta e armazenamento faz do pólen um produto beneficiado pelas abelhas, tornando-o mais fácil para comercialização (WINSTON, 2003).

(C) - Cera

O Regulamento Técnico do Ministério da Agricultura, que fixa a identidade e a qualidade de cera de abelhas, define a mesma como um produto de consistência plástica, de cor amarelada, muito fusível, secretado pelas abelhas para formação dos favos nas colmeias.

A cera é secretada pelas abelhas operárias, entre 14 e 18 dias de vida adulta, por meio de quatro pares de glândulas gordurosas ou cerígenas, localizadas na parte inferior do seu abdômen, sendo sua principal utilidade na colmeia, a construção dos favos. A cera tem uma coloração variável, do branco ao amarelo, dependendo do pólen encontrado no mel. Na FIGURA 3.3, observa-se cera alveolada pelas abelhas e cera em barra, após processamento no derretedor de cera. As glândulas ceríferas secretam a cera na forma líquida, dissolvida em uma substância volátil, que na superfície externa do tegumento se evapora, deixando as placas de cera. Para a secreção da cera, é imprescindível a ocorrência de certos fatores, tais como: temperatura no grupo de abelhas de 33 a 36°C, em média; presença de abelhas operárias com idade de 14 a 18 dias; alimentação abundante, e a necessidade da construção de favos (colmeia em desenvolvimento).



FIGURA 3.3– CERA DE ABELHAS

Fonte: <http://www.revistatvs.com.br/cera.htm>

A cera possui características sensoriais muito peculiares, como aspecto sólido amorfo, aroma característico (lembra mel), cor branca a amarelada, consistência macia e friável. Possui também, alguns requisitos físico-químicos, como ponto de fusão de 61 a 65° C, insolúvel em água, solúvel em óleos voláteis, éter, clorofórmio e benzeno, índice de acidez entre 17 e 24 mgKOH/g e ponto de saponificação máximo de 65°C (INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 3, DE 19 DE JANEIRO DE 2001 do Ministério da Agricultura, 2001). Na TABELA 3.3 são apresentados os percentuais dos principais constituintes da cera.

TABELA 3.3 –COMPOSIÇÃO DA CERA DE ABELHAS

COMPONENTES	COMPOSIÇÃO (% m/m)
Monoésteres	35
Hidrocarboneto	14
Diésteres	14
Ácidos livres	12
Hidroxipoliésteres	8
Hidroximonoésteres	4
Triésteres	3
Ácidos poliésteres	2
Ácidos monoésteres	1
Material não identificado	7

Fonte: Apiário Barbirotto

(D) - Mel

Mel é um fluido viscoso, produzido a partir do néctar recolhido de flores e processado pelas enzimas digestivas das abelhas. Somente 2% das espécies de abelhas são sociais e produzem mel. Entre as espécies produtoras de mel, as do gênero *Apis* são as mais conhecidas e difundidas. É um alimento ácido, possuindo na sua composição, os seguintes ácidos orgânicos:

- ácido glucônico, que está presente em grande quantidade;
- ácidos tânico e fosfórico;
- ácido fórmico, que conserva o mel.

Esses ácidos realçam o sabor e preservam o mel do ataques de microrganismos. A doçura do mel deve-se à doçura de dois monossacarídeos, frutose e glicose, com aproximadamente a mesma relação de doçura do açúcar granulado (97% da doçura da sacarose, um dissacarídeo).

As abelhas podem produzir dezenas de variedades de mel, dependendo de fatores tais como a floração, os terrenos de obtenção (maior oferta de uma florada específica

localizada nas mediações do apiário, no raio de vô das operárias) ou, ainda, segundo as técnicas de preparação (podendo alterar a variedade do mel se as abelhas forem alimentadas em cocheiras no apiário). Na FIGURA 3.4 é mostrado um quadro de cera alveolada, retirado de uma colmeia após a fabricação de mel.



FIGURA 3.4– FAVO DE MEL

Fonte: Apiário Felix dos Santos

O mel é obtido principalmente dos néctares das flores, podendo ser diferenciado em monofloral e plurifloral. O mel monofloral é obtido quando a origem botânica é predominantemente da origem de flores de uma mesma família e o mel plurifloral, quando o produto procede da origem de flores de várias famílias. Dessa forma, dependendo da origem da florada, o mel varia em cor, aroma e sabor. O padrão de qualidade do mel natural pode ser distinguido por essas propriedades. De maneira geral, o mel escuro tem mais sais minerais do que o mel claro, conseqüentemente seu sabor e aroma mais fortes. Pesquisas mostram que os méis mais escuros podem ter de quatro a seis vezes mais sais minerais que os claros, com destaque para o manganês, potássio, sódio e ferro (COUTO & COUTO, 2002).

O mel é um alimento muito higroscópico, podendo facilmente absorver água, conforme as condições de armazenamento, manejo e região. Méis com teores mais elevados de umidade fermentam com certa facilidade (RODRIGUES, 1998).

De acordo com o MAPA – Ministério do Abastecimento, Pecuária e Agricultura (2000), o mel deve atender aos padrões estabelecidos pelo controle de qualidade, apresentados na TABELA 3.4.

TABELA 3.4 – PADRÕES DE QUALIDADE DO MEL

Umidade g/100 g	Fermentação	Acidez meq/Kg	Hidroximetilfurfural mg/kg
< 20	Ausência de indícios	< 50	<60

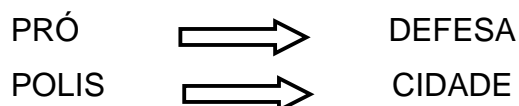
Fonte: INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 11, DE 20 DE OUTUBRO DE 2000 DO MINISTÉRIO DA AGRICULTURA

Os vários tipos de mel são ácidos, com valores de pH variando de 3,95 a 4,09 para as abelhas *Apis mellifera*, e neles se encontram ácidos orgânicos e inorgânicos. O pH pode ser influenciado pelas diferenças na composição do solo ou de espécies vegetais. Além de ser utilizado como adoçante, o mel apresenta várias propriedades terapêuticas, sendo considerado um alimento e medicamento dos mais completos e nutritivos que a humanidade conhece. De um modo geral, é constituído, na sua maior parte (cerca de 75% em massa), por carboidratos simples (glicose e frutose), água (cerca de 20%), minerais (cálcio, cobre, ferro, magnésio, fósforo, potássio, entre outros), ácidos orgânicos (ácido acético, ácido cítrico, dentre outros), vitaminas do complexo B, vitaminas C, D e E, possui cerca de metade dos tipos de aminoácidos existentes e, ainda, um teor considerável de antioxidantes (flavonoides e compostos fenólicos).

(E) - Própolis

As abelhas têm a necessidade de fechar orifícios que possam servir de entrada para insetos invasores ou para se proteger do frio. Assim, elas utilizam as resinas das plantas como matéria-prima para formar uma massa maleável, resistente e com forte cheiro, chamada própolis.

A própolis é um subproduto fabricado pelas abelhas e conhecida há milhões de anos. Sua definição se baseia em uma substância grudenta, formada pela resina de diversas plantas, coletada pelas abelhas e utilizada para proteger a colônia. Etimologicamente, a palavra própolis, de origem grega, significa:



Isto evidencia a sua importância para a colônia, que a utiliza para vedar frestas, recobrir superfícies irregulares, evitando o ataque de insetos e eventuais invasores.

É um material lipofílico, duro e quebradiço quando mantido a baixas temperaturas, mas suave, flexível e muito pegajoso quando mantido a temperaturas iguais ou superiores à do ambiente. Possui um cheiro forte e sua coloração depende da origem botânica das resinas coletadas.

Entre os tipos de substâncias químicas encontrados na própolis estão (THOMSON, 1990; BANSKOTA *et al.*, 2001):

- 55% de resinas e bálsamos;
- 30% de ceras;
- 10% de óleos voláteis;
- 5% de pólen e impurezas mecânicas .

Sua proporção varia e depende de vários fatores tais como o tipo de vegetação da região em que é produzida, assim como de influências geológicas e temporais.

Tem propriedades medicinais como diversas atividades biológicas comprovadas, tais como antiviral, anti-inflamatória, antioxidante, anticancerígena. A consagração do uso popular é justificada pelo seu consumo no mundo inteiro como auxiliar no tratamento das mais diversas doenças, tendo relatos do seu uso no tratamento auxiliar de problemas cardíacos, diabetes, câncer e processos inflamatórios (LIMA, 2006).

3.4 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS E FARMACOLÓGICAS DA PRÓPOLIS

Diferentes própolis podem apresentar diversas propriedades químicas e farmacológicas (BANKOVA, 2005). Por isso, a padronização da própolis é necessária. Em alguns países, as autoridades sanitárias consideram a própolis apenas um alimento ou um suplemento alimentar, em outros, a própolis tem grande aplicação terapêutica e industrial. Suas principais propriedades são antibiótica, cicatrizante, antiviral, anti-inflamatória, antioxidante, bactericida, analgésica, anestésica, entre outras. As propriedades biológicas da própolis estão diretamente ligadas à sua composição química, que varia com a flora da região e época da colheita, com a técnica empregada, assim como com a espécie da abelha. No caso brasileiro, o grau de "africanização" da *Apis mellífera* também pode influenciar a sua composição. Essa variação é facilmente explicada pela grande biodiversidade brasileira. No Brasil, mais de 300 compostos químicos têm sido descritos em própolis de diferentes origens (CASTALDO & CAPASSO, 2002; PEREIRA *et al.*, 2002). Já na Europa, região temperada, a variação na composição química da própolis é menor, sendo os flavonoides seus principais compostos bioativos.

Muitas outras propriedades biológicas e farmacêuticas da própolis foram relatadas nos trabalhos realizados por GHISALBERTI (1979) e MARCUCCI (1995), tais como propriedades anestésicas, regeneração de tecido cartilaginoso, de tecido ósseo e de polpa dental; propriedades imunogênicas; agente hepatoprotetor; ação desintoxicante do fígado; atividade antiúlcera *in vitro*; agente antioxidante; anticânceres em ratos e ação imunomoduladora.

A própolis possui propriedades anti-inflamatórias que foram descritas, principalmente, contra doenças do sistema muscular/articular e outros tipos de inflamações, infecções, reumatismos e torções. Foi utilizada na dermatologia para cicatrização de ferimentos, regeneração de tecidos, tratamento de queimaduras, neurodermites, eczemas, dermatite de contato, pruridos e dermatófitos (GHISALBERTI, 1979; MARCUCCI, 1995). Demonstrou ser efetiva contra doenças do aparelho digestivo, indicando uma potente atividade hepatoprotetora e uma agente antiúlcera (KABANOV *et al.*, 1989).

Alguns trabalhos descritos na literatura relatam o sucesso clínico da própolis no tratamento de doenças respiratórias (MARCUCI, 1995). Na odontologia, foi utilizada como anestésico, empregada em creme dental e preparações para lavagem bucal,

tratamento de gengivites, quelite e na pós-extração dentária (DRAGANOVA *et al.*, 1989). Seu uso no tratamento de tumores foi descrito e são também conhecidas as suas propriedades antissépticas, adstringentes, hipotensivas e citostáticas (capacidade de destruir células malignas) (GHISALBERTI, 1979; MARCUCCI, 1995).

Com respeito à atividade antitumoral, em experimentos envolvendo diferentes métodos de cultura de células, foi constatada a ação citotóxica da própolis sobre células HeLa (carcinoma cervical humano). Em concentrações de 3,2 mg/mL de própolis, essas células cessaram completamente sua divisão depois de 48 horas. Experimentos de dose-resposta como estes e outros relatados na literatura científica estimulam o desenvolvimento de pesquisas nessa área. Os resultados descritos por BAN *et al.* (1983) mostraram que as células HeLa foram bastante sensíveis a alguns flavonoides testados, como quercetina e ramnetina, mas foram duas vezes menos sensíveis à galangina. Por esses resultados, os autores concluíram que a ação tóxica da própolis pode ser atribuída à presença dos três compostos mais ativos na própolis por eles testada (oriunda da Iugoslávia), a galangina, a quercetina e a ramnetina.

A seguir, será apresentada uma breve revisão acerca de algumas das principais propriedades biológicas descritas para a própolis.

(A) Propriedade antimicrobiana

LINDENFELSER (1967) testou a PRÓPOLIS em 39 espécies de bactérias e obteve sucesso na inibição de 25 delas. Muitos pesquisadores relataram que o potencial biológico da própolis se deve a um sinergismo que ocorre entre os muitos constituintes nela presentes (KEDZIA, 1990). Nos estudos realizados por KROL *et al.* (1993), esse sinergismo foi observado por meio da análise de várias frações de um extrato etanólico de própolis. Nenhuma fração separada foi capaz de inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus*. Entretanto, quando todas as frações foram juntadas, a atividade total foi recuperada. Esses resultados indicam que o potencial antibacteriano da própolis não é devido à presença de uma substância em particular, mas resultante de uma ação complexa de vários compostos.

Em outro estudo, realizado por HERNANDEZ& BERNAL (1990), observou-se que bactérias do gênero *Staphylococci*, isoladas de material biológico, apresentaram uma grande sensibilidade ao extrato, em 95% dos casos testados.

Nos trabalhos desenvolvidos por GHISALBERTI (1979), observou-se que extratos de própolis potencializavam a ação de vários antibióticos, ou seja, o efeito biomicina, tetraciclina, neomicina, polimixina, penicilina e estreptomicina para combater *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* foi aumentado pela adição de própolis ao meio nutriente. Em alguns dos casos, o efeito bacteriostático, que apesar de não produzir a morte das bactérias, mas que impede o seu crescimento populacional, foi aumentado de 10 a 100 vezes (GHISALBERTI, 1979).

Devido às suas propriedades antimicrobianas, atualmente, há relatos do emprego da própolis, em creme dental e enxaguatórios para a higiene bucal, pois foi demonstrado que ela age sobre microrganismos, inibindo o seu crescimento. Um destes microrganismos, o *Streptococcus mutans*, está relacionado ao aparecimento de processos cariogênicos em humanos (ROCHA, 2003).

Certamente, a atividade mais popularmente conhecida e comprovada cientificamente da própolis é a capacidade em destruir microrganismos. Entretanto, essa atividade varia consideravelmente entre própolis de diversas origens.

(B) Propriedade antifúngica

Alguns estudos já foram realizados com o objetivo de demonstrar a atividade antifúngica da própolis. HOLDERNA & KEDZIA (1987), em seus experimentos, observaram que drogas antimicóticas em combinações com própolis tiveram sua atividade sobre *Candida albicans* aumentada. Nos estudos realizados por VALDÉZ *et al.* (1987), extratos aquosos e alcoólicos de 30 amostras de própolis cubanas, com a mesma concentração, foram testados contra duas linhagens de *C. albicans*. Os extratos aquosos não exibiram nenhuma atividade antifúngica, enquanto os extratos alcoólicos apresentaram um pequeno efeito. Nesse mesmo trabalho, a própolis apresentou um importante potencial antifúngico contra *Trichophyton* e *Microsporum*, quando foi extraída em propilenoglicol, apresentando um grande sinergismo com o mesmo.

(C) Propriedade antiprotozoária

A atividade antiprotozoária da própolis foi confirmada em inflamações provocadas por *Trichomonas vaginalis*. Soluções de extrato de própolis exibiram um efeito letal, *in vitro*, contra esse protozoário, em concentrações de 150mg/mL, depois de 24 horas de crescimento em exposição. Em concentrações mais baixas, o tempo de sobrevivência das culturas foi prolongado (SCHELLER *et al.*, 1977). O efeito do extrato sobre o crescimento do parasita *Giardia lamblia* foi também verificado (TORRES *et al.*, 1990).

(D) Propriedade antiviral

DEBIAGGI *et al.* (1990) estudaram o efeito citotóxico dos flavonoides crisina, canferol, acacetina, galangina e quercetina, presentes na própolis, sobre a infectividade e replicação de algumas linhagens de vírus, tais como: herpes, adenovírus, coronavírus e rotavírus. Quando monocamadas de células foram infectadas com vírus do herpes e, subsequentemente, cultivadas em um meio contendo flavonoides, como crisina e canferol, houve uma redução de replicação intracelular do vírus, dependente da concentração da droga. Acacetina e galangina não apresentaram nenhum efeito sobre a replicação do vírus. A quercetina, entretanto, reduziu a replicação somente quando em elevadas concentrações. Nos estudos realizados por AMOROS *et al.* (1992a e 1992b) foi investigado o efeito *in vitro* da própolis sobre vários vírus como herpes simplex tipo 1 e 2, variante resistente a aciclovir, adenovírus tipo 2, vírus da estomatite vesicular e poliovírus tipo 2. A inibição do crescimento do poliovírus foi claramente observada. Na concentração de 30mg/mL de própolis, houve uma redução do título viral em 1000 vezes, entretanto, o vírus da estomatite vesicular e adenovírus foram menos susceptíveis. A atividade antiviral *in vitro* de ésteres de ácido cinâmico substituído, oriundos da própolis, foi estudada por SERKEDJIEVA *et al.* (1992). Nesses estudos, observou-se que um desses ésteres, o ferulato de isopentila, inibia significativamente a infectividade do vírus Influenza A.

(E) Atividade antitumoral

A tentativa de combater os diversos tipos de câncer tem levado os pesquisadores a isolar compostos contidos em amostras de própolis de diversas procedências. Vários compostos isolados da própolis apresentaram atividade inibitória no crescimento de

diversos tumores. MATSUNO (1997) constatou a atividade inibitória de um diterpeno (PMS-1) sobre hepatocarcinoma humano. MITAMURA *et al.* (1996), estudando o efeito do PMS-1 sobre tumor de pele sugeriram que essa atividade está relacionada com a inibição na síntese de DNA dessas células. O CAPE (cafeato de feniletila), descrito por GRUNBERGER *et al.* (1988) como um composto responsável pelas propriedades citotóxicas da própolis, isolado da mesma, apresentou atividade antiproliferativa sobre a linhagem de hepatocarcinoma Hep3B, mas mostrou-se inócuo quando adicionado a culturas primárias de hepatócito de camundongo (JIN *et al.*, 2005). Outro composto, a crisina, também isolada de própolis, mostrou-se efetiva em inibir o crescimento de culturas da linhagem de glioma C6 de rato; as células mantiveram-se estacionárias na fase G1 do ciclo celular (WENG *et al.*, 2005). Diversos outros compostos com atividade inibitória sobre crescimento de tumores foram isolados em outros estudos (TAKAI *et al.*, 1996; MATSUNO *et al.*, 1997; BANSKOTA *et al.*, 1998; KIMOTO *et al.*, 1998; WEYANT *et al.*, 2000, entre outros). SUZUKI *et al.* (1996) e ORSOLIC *et al.* (2005) isolaram compostos hidrossolúveis da própolis que, atuando sinergisticamente, potencializaram a atividade de drogas tumorícidas, inibindo, assim, o desenvolvimento de tumores acídicos de Ehrlich.

3.5 INSTALAÇÃO DO APIÁRIO

A própolis é obtida a partir de secreções de árvores, flores, folhas e pólen, recebendo, ainda, a adição de substâncias secretadas pelo metabolismo glandular das abelhas (BURDOCK, 1998).

A seguir, são listados os mais importantes cuidados que se deve ter, de uma maneira geral qualquer tipo de própolis.

Escolher o local para a instalação do apiário, que deve ser, antes de mais nada, uma área livre de contaminações, sejam elas resíduos industriais líquidos ou gasosos, e distanciado, no mínimo, 400 metros de casas, escolas, criações e qualquer outra construção habitada.

Conter no máximo 25 colônias de abelhas, fixadas em um local sombreado, para evitar o excesso de calor nas colmeias, que devem estar protegidas contra os ventos, pois estes podem provocar o resfriamento excessivo das mesmas. A proteção mais adequada seria uma barreira natural formada por arbustos.

Ter água disponível a uma distância não superior a 300 metros das colmeias, caso contrário, a utilização de bebedouros artificiais aumentaria o custo da produção.

Distância entre os apiários de, no mínimo, 3 km. Para buscar alimento, a operária voa até uma distância de 1,5 km. Assim, deve-se manter a distância mínima de 3 km para assegurar menor competição por alimento entre as colônias de outros apiários.

Na FIGURA 3.5 é mostrado um exemplo de como deve ser a disposição de um apiário.



FIGURA 3.5– APIÁRIO

Fonte: Apiário Roças Novas

Além dos cuidados já citados na instalação de um apiário, também é preciso:

Ter fácil acesso para facilitar o manuseio dos materiais apícolas necessários à produção e o trânsito dos apicultores.

Instalar os suportes com distância de 2 metros entre si e de 4 a 5 metros entre fileiras e a uma altura de aproximadamente 50 cm do solo.

Impermeabilizar as colmeias e mantê-las cobertas para que tenham uma vida útil maior.

3.6 PRODUÇÃO DE PRÓPOLIS

A própolis, tanto a verde quanto a vermelha, pode ser produzida pelas abelhas ao longo do ano, podendo sua atividade de coleta aumentar em certas épocas, dependendo da área disponível e condições climáticas favoráveis. O processo de produção da própolis envolve diversos fatores que se ligam diretamente à produtividade, tais como:

- a) estação do ano – as variações climáticas têm influência prática, pois alteram as concentrações dos componentes biologicamente ativos.
- b) variabilidade genética das rainhas – as diferenças genéticas, mesmo entre híbridos africanizados, afetam a produtividade e a composição química (ALMEIDA *et al.*, 2000).
- c) luminosidade – colmeias de abelhas africanizadas, expostas à sombra o dia todo, produzem mais própolis que abelhas expostas meio dia à sombra e a outra metade do dia ao sol ou expostas diretamente ao sol (ITAGIBA *et al.*, 1994).

A produção da própolis é favorecida pela floração das plantas, que proporcionam colônias mais fortes devido à grande oferta de alimentos. Nos meses mais frios, ocorre exatamente o contrário, a produção de própolis cai drasticamente, pois grande parte das

operárias disponibiliza a maior parte do seu tempo, dentro da colmeia, para manter a temperatura na colônia, e a produção fica prejudicada pelo número de indivíduos que saem para coletar resina e buscar alimento.

Por meio das FIGURAS 3.6 a 3.10 pode-se observar a sequência das etapas envolvidas na produção de própolis, neste caso, da própolis verde.



FIGURA 3.6 – ABELHA *Apis mellífera* COLETANDO PRÓPOLIS DO *Baccharisdracunculiofolia* (ALECRIM DO CAMPO)

Fonte: Serra da Piedade



FIGURA3.7– ABELHA *Apis mellífera* CARREGANDO A PRÓPOLIS PARA A COLMEIA

Fonte: Apiário Roças Novas



FIGURA 3.8 – ABELHA *Apis mellífera* FECHANDO A COLMEIA COM A PRÓPOLIS
Fonte: Apiário Roças Novas



FIGURA 3.9 – COLMEIA COMPLETAMENTE FECHADA COM A PRÓPOLIS
Fonte: Apiário Roças Novas



FIGURA 3.10– PRÓPOLIS SENDO COLETADA
Fonte: Apiário Roças Novas

Outro fator crucial para aumentar a produtividade da própolis é o tipo de coletor utilizado. Durante anos, vários modelos foram aprimorados, de acordo com a observação dos apicultores na rapidez com que a própolis era produzida, facilidade de manuseio e qualidade do produto. Atualmente, o modelo mais utilizado é CPI (coletor de própolis inteligente), idealizado pelo apicultor Adomar César de Carvalho, em 1995, mostrado na FIGURA 3.11. O CPI permite coletar a própolis de forma rápida, padronizada e sem contaminantes físicos, como por exemplo, lascas de madeira.



FIGURA 3.11 – CPI – COLETOR DE PRÓPOLIS INTELIGENTE
Fonte: Apiário Roças Novas

O coletor CPI possibilita uma abertura na colmeia nas suas partes laterais, podendo, de acordo com a época do ano, ter essa abertura aumentada (período de calor propício à produção de própolis) ou fechada por completo (período de frio, entressafra).

Minas Gerais, com 29 toneladas por ano, é líder na produção nacional de própolis, sendo responsável por cerca de 70% da produção no país, que alcança 40 toneladas anuais. A boa posição no “*ranking*” é explicada pela condição climática do Estado, com altitude média e temperaturas ideais para a produção da substância (Diário do Comércio, 2013).

Normalmente, a própolis é comercializada na forma de extrato líquido. Diversos tipos de solventes podem ser utilizados na extração de própolis. A definição do solvente a ser utilizado ocorre em função das substâncias que se desejam extrair. A própolis bruta contém substâncias solúveis em óleo, em água e, também, aquelas que são solúveis tanto em óleo quanto em água. Quando a própolis é destinada para a área alimentícia,

medicinal ou aplicações em cosméticos, o solvente mais comumente utilizado é o etanol (álcool etílico), na proporção 7:3 (volume/massa) para obtenção da concentração de 30% em massa de própolis do extrato (MALASPINA & PALMA, 2000).

Podem ser feitas, também, extrações em água (mantendo-se os cuidados para minimizar a facilidade de contaminação dos extratos obtidos), extrações com base oleosa, a partir de uma elevada concentração alcoólica e extrações em base hidroalcoólica, com extratos feitos com baixa concentração de álcool (MALASPINA & PALMA, 2000). No entanto, independentemente da natureza do solvente a ser utilizado, é preciso um cuidado muito especial com a sua procedência. Destacam-se, de acordo com APACAME (2000), os seguintes métodos de extração:

Método de extração por meio de álcool (etanol): É o método mais tradicional de extração da própolis, amplamente utilizado. A razão disso é a alta solubilidade da própolis em álcool devido à grande quantidade de componentes oleosos. Embora seja o método mais comum, a própolis produzida por esse método apresenta algumas inconveniências, tais como: o forte cheiro de álcool e a dificuldade de absorção pelo corpo humano devido à grande quantidade de componentes oleosos como resina e cera.

Método de extração por emulsão: Consiste na transformação da própolis de solução alcoólica em estado de emulsão, por meio da adição de substâncias emulsificantes (surfactantes) como ésteres de ácido graxo, glicerina, etc. A própolis em emulsão é do tipo óleo em água. Nesse estado, o cheiro forte da resina que caracteriza a própolis de solução alcoólica é menor, além disso, ela se solubiliza com maior facilidade na água, o corpo humano a absorve mais facilmente e a resina não adere ao recipiente.

Método de extração com gás carbônico liquefeito: Esse método utiliza o dióxido de carbono liquefeito. Em seu estado normal, o dióxido de carbono é um gás (gás carbônico), mas ao ser comprimido, com a aplicação de altas pressões, torna-se líquido. A própolis bruta é colocada no dióxido de carbono liquefeito e diluída. Após um determinado tempo, reduz-se a pressão até o valor inicial, fazendo com que o dióxido de carbono retorne ao estado gasoso. A substância residual desse processo é o componente útil da própolis dissolvida.

O gás carbônico liquefeito apresenta a propriedade de dissolver bem as substâncias oleosas. Por essa razão, em comparação com a própolis de solução alcoólica, esse produto contém maior quantidade desses componentes oleosos e não apresenta um cheiro muito forte, uma vez que o processo não utiliza o álcool, eliminando assim um dos problemas da própolis de solução alcoólica.

Método de extração em etanol hidratado:A extração é feita com o etanol contendo certa porcentagem de água destilada. Esse método apresenta a vantagem de poder extrair tanto os componentes solúveis em álcool quanto os solúveis em água. Em geral, a concentração de etanol empregada varia de 40°GL a 70 °GL.

Extração com água:A extração com água ainda é pouco utilizada, visto que, aproximadamente 80% das substâncias encontradas na própolis não são solúveis em água. As propriedades terapêuticas da própolis de solução aquosa não deixam nada a desejar em comparação com a de solução alcoólica. Ao lado dessas propriedades, a própolis de solução aquosa apresenta a vantagem de ser mais segura e fácil de ser absorvida pelo corpo humano e, além de não apresentar odor forte, a resina não forma camada nem fica impregnada no copo quando se toma a própolis com a água, facilitando muito sua ingestão.

O Ministério da Agricultura padronizou o extrato de própolis verde para uso comercial conforme Instrução Normativa N°3, de 19 de Janeiro de 2001 (Ministério da Agricultura, 2001). Segundo esta, o extrato de própolis compõe-se de elementos solúveis da própolis em solução hidroalcoólica, álcool e água. Alguns requisitos sensoriais do extrato de própolis vão do aroma característico, dependendo da origem botânica (balsâmico e resinoso); da cor, que varia dependendo da origem e da concentração (tons de âmbar, avermelhada e esverdeada); do sabor característico, de suave a forte, amargo e picante; do aspecto, líquido, límpido e homogêneo. Os requisitos físico-químicos são: (extrato seco: mínimo de 11% (m/v)), cera: (máximo 1% do extrato seco (m/m)), compostos flavonoides (mínimo de 0,25%(m/m)), compostos fenólicos (mínimo de 0,50% (m/m)); atividade de oxidação - máximo 22 s., teor alcoólico máximo de 70° GL (v/v) e metanol máximo 0,40 mg/L.

3.7 PRÓPOLIS VERDE

A própolis brasileira produzida no cerrado é elaborada a partir de resinas vegetais e exudatos e transportada para dentro da colmeia, onde as abelhas adicionam secreções próprias. A própolis é rica em derivados prenilados do ácido-p-cumárico (BANCOVA & MARCUCCI, 2000). É conhecida internacionalmente como própolis verde, green propolis, a qual tem como principal fonte vegetal, a espécie de *Baccharis dracunculifolia* D.C., possuindo uma coloração característica que é utilizada pelos japoneses para sua rápida identificação no processo de comercialização (PARK *et al.*, 2004). Trata-se de uma mistura de constituintes, e sua composição química varia de acordo com a flora da região onde é produzida e da época do ano em que é coletada (BASTOS, 1998; OLIVEIRA & BASTOS, 1998; BASTOS & OLIVEIRA, 2000; BANKOVA *et al.*, 2000; PARK *et al.*, 2002), isto dificulta a análise química da própolis.

Ultimamente, essa análise tem se concentrado nos extratos aquoso e etanólico, porque são os mais usados nos diversos tipos de aplicações terapêuticas (BANKOVA *et al.*, 1999, PARK *et al.* 2004; SOARES *et al.*, 2006; TAVARES *et al.*, 2006). A técnica mais utilizada para a identificação dos constituintes nesses extratos é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), acoplada a um detector UV/VIS, para identificar as moléculas que estão neles solubilizadas, principalmente o artepelin C, que é característica de própolis verdes, cuja estrutura encontra-se representada na FIGURA 3.12.



FIGURA 3.12– Estrutura do Artepelin C

Nos países asiáticos, a própolis verde é conhecida por suas propriedades antitumoral e atividade anticariogênica. O artepillin C, FIGURA 3.12, (ácido 3,5-diprenil-p-cumárico) é o composto presente em maior concentração na própolis verde. Sendo assim, o estudo das propriedades biológicas desse composto é de grande importância para determinar se as atividades observadas na própolis verde estão relacionadas com ele. Atualmente, próximo de 300 componentes, principalmente compostos fenólicos, foram identificados na própolis verde. A maioria desses compostos isolados pertence a três grandes grupos: flavonoides, ácidos fenólicos e ésteres, cujas concentrações também variam, dependendo da ecoflora da região de coleta (SIMÕES *et al.*, 2004). Alguns desses componentes estão presentes em, praticamente, todas as amostras de própolis verde descritas quimicamente, mas outros são exclusivos de própolis de determinadas regiões (LUSTOSA *et al.*, 2008).

A melhor forma de relacionar a origem botânica de determinada amostra de própolis é a análise de sua composição química comparada com a fonte vegetal mais provável. Essa identificação é necessária para que se obtenha algum controle de qualidade e de procedência da própolis, além da possível padronização do tipo de amostra utilizado (PARK, 2002). Já foram descritos 12 tipos de própolis brasileiras, caracterizada a partir de 500 amostras coletadas em todas as regiões do Brasil (exceto região norte). Dentre esses tipos, a própolis verde foi identificada como a do tipo 12 (PARK, 2000). DAUGSCH, (2007) sugeriu que a própolis vermelha fosse, então, adicionada nessa relação, como o 13º tipo de própolis encontrada no Brasil.

Muitos tipos de solvente podem ser utilizados para “extrair” a própolis, isto é, dissolver e separar a parte resinosa e balsâmica, que contém os princípios ativos, dos componentes insolúveis e com pequena ou nula atividade farmacológica, que formam a chamada borra da própolis. O solvente mais usado é o álcool etílico de grau alimentício, como é o caso do álcool de cereais.

O Anexo VII da Instrução Normativa nº 11, de 20/10/2000 da SDA/DIPOA, do Ministério da Agricultura, estabelece que o álcool do extrato para comercialização do extrato líquido de própolis para o consumidor final deve ter no máximo 70º GL (7 partes de álcool para 3 partes de água (v/v), o que equivale a 70% de álcool absoluto). A água para esse fim é preferivelmente destilada. Em sua falta, pode-se utilizar água filtrada e esterilizada. O regulamento do Ministério da Agricultura determina que o extrato deve ter, no mínimo, 11% de extrato seco (ES), também denominado sólidos solúveis totais (SST).

Isto quer dizer que podem ser preparados extratos com diferentes níveis de ES, contanto que o percentual dos mesmos sejam valor iguais ou superiores a 11%. Cerca de 50% de cada quilo de própolis é insolúvel em álcool, constituindo a chamada borra da própolis. Esse valor pode variar entre menos de 40 até quase 60% da própolis (APACAME, 2013). Denomina-se extrato seco de própolis a concentração de compostos solúveis em um determinado solvente após a evaporação do mesmo.

Apresentam-se, a seguir, a metodologia e os resultados de extração de própolis obtidos em um trabalho de dissertação de mestrado, desenvolvido no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, intitulado Própolis: variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana/antioxidante. As extrações foram realizadas utilizando-se água ou etanol, com ou sem aquecimento, sob agitação mecânica. Para padronização da metodologia de extração e demais ensaios biológicos, foram realizados extrações de oito amostras de própolis, utilizando 8 mL de etanol absoluto ou água destilada para cada 2g de própolis bruta. A incubação foi realizada de duas maneiras: (1) em agitador Polystat Model 1201-00 circulator da marca ColeParmer, à temperatura ambiente (21°C), com agitação recíproca de 170 ciclos por minuto e (2) em incubadora rotatória com banho-maria, Gyrotory Water Bath Shaker Model G76, da marca New Brunswick Scientific Co. Inc., a 45°C, com agitação orbital de 200 rpm. As amostras foram incubadas por 24 horas e o sobrenadante separado por centrifugação a 2000 rpm por 5 minutos. Com o resíduo obtido foi realizada uma segunda extração (denominada reextração), sob as mesmas condições, por mais 24 horas, perfazendo 48 horas de extração total. O sobrenadante foi separado nas mesmas condições. Para os extratos de 24 horas (primeira extração) e 48 horas (segunda extração), foram determinados rendimentos com base nas massas medidas e os resultados foram expressos em termos da razão da massa de sólidos solúveis totais presentes no extrato líquido por grama de amostra inicial de própolis bruta.

Várias literaturas descrevem procedimentos de extração diferenciados e utilizando diferentes solventes extratores, sendo comumente os extratos etanólicos de própolis mais utilizados para os ensaios biológicos. As principais diferenças entre as metodologias se referem aos parâmetros como tempo de extração, concentração de etanol utilizado, temperatura e agitação.

Devido à diversidade de formas utilizadas para se preparar os extratos de própolis, o procedimento de extração requer uma padronização. Dessa maneira, as qualidades de

diferentes amostras de própolis poderiam ser comparadas e não haveria variações nas suas propriedades biológicas devido à metodologia de extração. Para a padronização da metodologia, foram verificados o efeito do aquecimento, do tipo de solvente extrator e de uma segunda extração (duas extrações sequenciais de 24 horas, totalizando 48 horas) no rendimento de sólidos solúveis, composição (fenólicos e flavonoides totais) e atividades biológicas (antimicrobiana e antioxidante).

Nesses experimentos, foram utilizadas oito amostras de própolis, quatro de *Apis mellifera* e quatro de *Meliponíneos*. Por meio de uma análise visual dos extratos obtidos, observou-se que as amostras de própolis de diferentes origens levavam à obtenção de extratos com colorações diferenciadas, variando do incolor ao marrom escuro, devido a diferenças na flora da região e na metodologia utilizada. Os extratos obtidos com aquecimento se apresentaram mais turvos do que aqueles sem aquecimento. Com relação ao solvente utilizado, visualmente, os extratos etanólicos das amostras possuíam uma coloração mais intensa quando comparados aos extratos aquosos das respectivas amostras.

A determinação de rendimento em sólidos solúveis totais, conforme apresentado na trabalho, comprova que há uma grande variação no rendimento de sólidos totais entre as diferentes amostras de própolis, independentemente da variedade da abelha coletora. Diferenças na origem geográfica e, conseqüentemente, na composição das amostras podem explicar essas variações.

Observou-se, ainda, que a extração realizada com aquecimento aumenta o rendimento em 8,5%. Com relação à reextração, pode-se verificar que esse procedimento é indispensável, pois, possibilita um acréscimo significativo de até 50% da primeira extração, no rendimento final dos sólidos solúveis totais.

3.8 PRÓPOLIS VERMELHA

A própolis vermelha foi classificada de acordo com suas características físico-químicas como do tipo 13, (DAUGSCH *et al.* 2006), sendo 13 um número absoluto da sequência das descobertas das própolis, ou seja, nenhum outro tipo de própolis foi classificada desde então. Assumiu-se que o exudato vermelho resinoso de *Dalbergia ecastophyllum* (L) Taub. (*Fabaceae*), o "rabo-de-bugio", era a origem botânica da própolis

vermelha, pois foram observadas abelhas coletando-o dessa planta (DONNELLY *et al.* 1973; MATOS *et al.* 1975; SILVA *et al.* 2007), conforme se pode observar na FIGURA 3.13.



FIGURA 3.13—(a / b) *Dalbergia ecastophyllum* (L) Taub. (Fabaceae), o "rabo-de-bugio". (c) Própolis Vermelha

Fonte: http://faepapb.com.br/projetos_especiais.php?id=11

Por serem os isoflavonoidestípicos da família *Fabaceae*, alguns autores sugeriram que estes poderiam ser usados como marcadores da origem botânica desse produto (SILVA *et al.*, 2007). Comparações qualitativas e quantitativas dos flavonoides e outros constituintes químicos entre os perfis cromatográficos da própolis vermelha e dos exudatos resinosos da planta *D. ecastophyllum* indicaram similaridade nos padrões (DAUGSCH *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2007). Foi afirmado, também, que nas áreas onde *D. ecastophyllum* é rara ou não está presente, as abelhas coletam a resina vermelha de outras plantas, misturando-as, sendo que as elaboradas com essa mistura apresentaram uma menor atividade antimicrobiana (DAUGSCH *et al.*, 2006). Alguns pesquisadores (KAMINSKI & ABSY, 2006; SAWAYA *et al.*, 2006; ABSY & KERR, 1977) relacionam várias espécies de plantas encontradas no litoral nordestino capazes de produzir exudato avermelhado, tais como:

- *Anacardium occidentale* L. ("cajueiro", *Anacardiaceae*);
- *Clusia* sp. ("cebola-da-restinga", *Clusiaceae*);
- *Protium* sp. ("almécega, alméscar, breu vermelho", *Burseraceae*);
- *Schinus terebinthifolius* Raddi ("aroeira vermelha", *Anacardiaceae*);
- *Tapirira* sp. ("pau pombo, cupiúba", *Anacardiaceae*);
- *Vismia* ("lacre", *Clusiaceae*).

PARK *et al.* (2002) sugeriram que as principais fontes de resina para a própolis brasileira nordestina seriam as folhas jovens de *Hyptis divaricata* (*Lamiaceae*), enquanto que, no sudeste, seriam as de *Baccharis dracunculifolia* (*Asteraceae*) (BASTOS *et al.*, 2000). No sul do país, a principal fonte de resina seriam os botões florais de *Populus nigra* (*Salicaceae*) (PARK *et al.*, 2002). Os estudos ressaltaram, também, que não é possível assegurar a origem botânica de toda própolis comercializada no país apenas fazendo menção como sendo "própolis brasileira", pois isso não garante que as variáveis físico-químicas e biológicas sejam constantes de amostra para amostra (MARCUCCI *et al.*, 1999; PARK *et al.*, 2002). Na FIGURA 3.14, é mostrada a coleta de própolis vermelha por meio de CPI – Coletor de Própolis Inteligente.



FIGURA 3.14– COLETA DA PRÓPOLIS VERMELHA

Fonte: <http://maceioagora.com.br/noticias/noticias.asp?cod=33619>

A própolis vermelha natural, tipicamente alagoana, tem características que lhe conferem propriedades anticancerígenas, anti-inflamatórias e antioxidantes. Produzida a partir da resina do rabo-de-bugio, planta que fica localizada próxima a manguezais, tem chamado a atenção de pesquisadores e empresários por possuir muitas propriedades farmacológicas.

Atualmente, mais de 90% da própolis vermelha de Alagoas é enviada para o Japão, onde a matéria-prima é utilizada em produtos de tratamento bucal, balas, chocolates, cápsulas e solução de bochecho, por exemplo. O restante da matéria-prima produzida no Estado tem sido destinado a pesquisas. De acordo com o APL Apicultura no Litoral de Alagoas que abrange 22 municípios, de Penedo a Maragogi, com 140 produtores ao todo. Atualmente, a produção em Alagoas chega a 740 kg anuais de própolis vermelha. A expectativa para 2014 é de que a produção chegue a 1 tonelada (ASN – Agência SEBRAE de Notícias, 2013).

De acordo com o presidente da Cooperativa dos Produtores de Mel e Derivados do Estado, Reginaldo Lira (2013), atualmente têm sido produzidos cerca de 130 quilos mensais, sendo que cada quilo é vendido ao preço médio de R\$ 550,00 e toda a própolis produzida hoje, no Estado, é vendida *in natura*. Devido ao elevado valor comercial, alguns produtores do Estado do Alagoas já estão se dedicando a fazer o melhoramento genético dos enxames, com a transmissão de embrião da abelha rainha, para que outras abelhas rainhas capazes de produzir um produto de qualidade sejam criadas. Ele afirma, ainda, que o manejo também tem sido uma preocupação dos produtores, que estão se dedicando mais a desenvolver a produção (Associação dos Municípios Alagoanos).

Mais de 300 plantas são conhecidas por apresentarem atividade estrogênica pelo fato de possuírem isoflavonas (FAMSWORTH et al., 1975). As fontes alimentares de fitoestrogênios são, apenas, parcialmente conhecidas. A característica estrutural básica do isoflavonoides são dois anéis de benzeno ligados por meio de um anel heterocíclico pirano, na posição 3. As isoflavonas mais abundantes são a genisteína e daidzeína. Outros compostos desse grupo incluem a formononetina e a biochanina A que, nos seres humanos, podem ser metabolizados dando origem à daidzeína e à genisteína, respectivamente. A formononetina tem sido, frequentemente, utilizada para identificação e caracterização da própolis vermelha.

A metodologia a ser utilizada no presente trabalho para a quantificação da formononetina em própolis vermelha será baseada em um trabalho desenvolvido por DAUGSCH (2007), no Departamento de Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Nesse trabalho, foi preparado o extrato etanólico de própolis vermelha, na proporção de 500 mg de exudatos resinosos vermelhos, misturados com 5 mL de etanol a 80 (v/v), durante um período de 10 minutos, a 70 °C. Em seguida, o extrato obtido foi filtrado e analisado por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) utilizando-se um cromatógrafo equipado com uma coluna YMC Pack ODS-A (RP-18, coluna de tamanho 4,6 x 250 mm; com partículas de tamanho 5 µm) e detector DAD (dispositivo conectado na saída da coluna que percebe a presença de componentes e emite um sinal elétrico a ser registrado na forma de um pico, cuja área é proporcional à quantidade do componente analisado). Esse detecta o espectro total, além da intensidade da luz e tempo, conveniente para determinar o comprimento de onda mais adequado, (SPD-M10A, Shimadzu Co.). A coluna foi eluída por meio de um gradiente linear, composto de água (solvente A) e metanol (solvente B), iniciando com 30 % de B (0-15 min), aumentando até 90% B (15-75), parando em 90% de B (75-95 min) e diminuindo, novamente, até 30% de B (95-105 min). O fluxo de solvente era de 1 mL/min e a detecção dos compostos presentes na amostra era realizada a 268 nm, no detector DAD. Os padrões autênticos de flavonoides e outros compostos químicos foram obtidos da Extrasynthese Co. França. Os resultados da cromatografia do trabalho realizado por DAUGSCH(2007) são apresentados na TABELA 3.5.

TABELA3.5 –RESULTADOS DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA DE EFICIÊNCIA DA PRÓPOLIS VERMELHA

Pico	Tempo de retenção (min)	Compostos	Quantidade (mg/g)
1	13,42	Rutina	0,7
2	16,99	Liquiritigenina	1,8
3	20,63	Daidzeina	0,3
4	22,35	Pinobanksina	1,7
6	24,59	Quercetina	0,5
7	28,40	Luteolina	1,2
9	32,15	Dalbergina	0,4
10	34,62	Isoliquiritigenina	4,8
11	36,97	Formononetina	10,2
13	40,08	Pinocembrina	3,3
14	42,30	Pinobanksin-3-acetato	1,7
15	46,45	Biochanin A	0,5

Fonte: DAUGSCH(2007)

A formononetina, cuja estrutura pode ser visualizada na FIGURA 3.15, é um isoflavonoide, com atividade estrogênica e antifúngica. Quando mamíferos consomem essa isoflavona, ela é metabolizada, dando origem a outra isoflavona, a daidzeína, que é um dos isoflavonoides agliconas presente na soja. Esse último é utilizado na prevenção e tratamento dos sintomas da menopausa e no tratamento de câncer de próstata e de mama (DAUGSCH *et al.*, 2006).

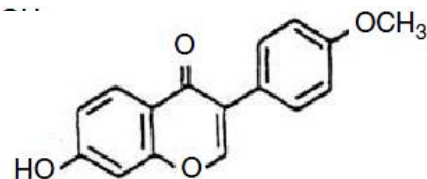


FIGURA 3.15– ESTRUTURA DA FORMONONETINA

Fonte: Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals – W. Jeffrey Hurst

Na FIGURA 3.16 é apresentado o perfil cromatográfico (CLAE-FR) dos flavonoides e outros constituintes químicos da própolis vermelha. A identificação dos compostos químicos foi realizada pela comparação direta com padrão autêntico e baseada no tempo de retenção. Por comparação entre o perfil cromatográfico da amostra de própolis e dos padrões utilizados, observa-se que, no tempo de retenção 36,97 min, ocorre o maior pico dos flavonoides, o que evidencia a formononetina como a principal substância encontrada até o presente momento na própolis vermelha.

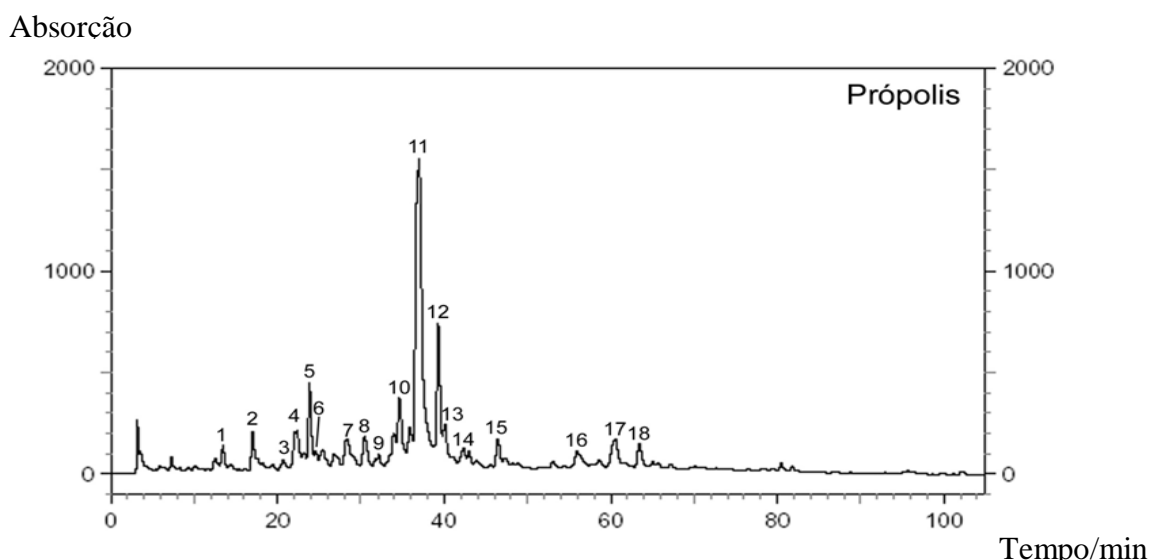


FIGURA 3.16 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DA PRÓPOLIS VERMELHA

Fonte: DAUGSCH (2007)

O percentual de ceras presente na própolis é um dos parâmetros utilizados na determinação da qualidade da amostra. Sua quantificação é feita por meio da diferença

de peso obtida em extrações realizadas com um solvente composto pela mistura clorofórmio-acetona, na proporção 2:1 (v/v) (misturas mecânicas) e da porcentagem de própolis solúvel em meio aquoso (insolúveis totais) (ADOLFO LUTZ,1985). Na FIGURA 3.17, observa-se uma amostra de própolis contendo muitos pontos de cera e, na FIGURA 3.18, outra amostra de própolis, contendo pouca cera.



FIGURA 3.17– AMOSTRA DE PRÓPOLIS COM MUITOS PONTOS DE CERA



FIGURA 3.18– AMOSTRA DE PRÓPOLIS COM POUCOS PONTOS DE CERA.

4. METODOLOGIA

Neste capítulo, será apresentada a metodologia utilizada no desenvolvimento do presente trabalho, bem como os métodos analíticos utilizados para determinação da qualidade da própolis produzida. Inicialmente, serão apresentados os métodos utilizados para a coleta, nos apiários, das amostras de própolis e a metodologia geral utilizada para obtenção de extratos alcoólicos de própolis. Em seguida, serão apresentados os procedimentos utilizados nos experimentos com a própolis vermelha, ou seja, caracterização física da própolis utilizada, o método analítico utilizado para a identificação e quantificação da formononetina presente na amostra e a metodologia adotada para estudo da influência da concentração de álcool na extração de formononetina, a partir de amostras de própolis vermelha bruta, em diferentes concentrações alcoólicas. Na sequência, serão apresentadas as condições experimentais de extração, utilizadas para o estudo dos parâmetros operacionais que levam à obtenção das maiores quantidades de sólidos solúveis totais, para as duas variedades de própolis investigadas, a verde e a vermelha. Finalmente, será apresentada a metodologia e as condições operacionais utilizadas para a extração de própolis, em dois estágios, para os dois tipos de própolis investigadas, a verde em água e em solução alcoólica (etanol) e a vermelha em solução alcoólica (etanol).

4.1 PRODUÇÃO E COLETA DA PRÓPOLIS BRUTA NOS APIÁRIOS

No desenvolvimento deste trabalho, foi possível acompanhar de perto a produção da própolis verde, desde a implantação dos apiários até a colheita da própolis. Foi observado que, inicialmente, é preciso ter conhecimento técnico do processo, como, por exemplo, a área de utilização do apiário, o número de colmeias instaladas em uma mesma região, seleção das rainhas, a área de pastagem e vários outros requisitos que devem ser atendidos para o sucesso da produção.

Os locais para a criação das abelhas foram escolhidos na região de Caeté-MG, cidade situada a 50 Km de Belo Horizonte, por ser uma área distante do grande centro e de vegetação densa em alguns locais. É imprescindível que a região escolhida tenha a presença da “vassourinha do campo”, nome popular dado ao *Baccharis dracunculifolia*,

principal fonte de coleta de resina pelas abelhas para a produção da própolis verde, devido ao Artepelin C, encontrado nessa espécie. A concentração do *Baccharis dracunculifolia* nessa região é abundante.

De um modo geral, ao se escolher um local para criação das abelhas, deve-se estar atento para que esta esteja distante de aglomerados de pessoas, como vilarejos, condomínios rurais e cidades pequenas, pois a *Apis mellífera* africanizada é muito brava, podendo atacar se o seu *habitat* for invadido por curiosos ou pessoas não autorizadas para manusear as colmeias. A intervenção do apicultor na criação das abelhas é fundamental para aperfeiçoar a produção e trazer mais lucros. Na criação das abelhas, é necessário que se tenha, no mínimo, um apicultor e um ajudante, sendo que, no período de safra, esse número de pessoas pode aumentar devido à necessidade de se visitar o apiário mais vezes e alimentar as abelhas, além da manutenção com capinas e troca dos quadros com cera alveolada.

Para que possa ser comercializada, a própolis deve apresentar algumas características, especificadas por meio de análises qualitativas e quantitativas que garantam a identificação do produto, assegurando a conservação das substâncias voláteis, como por exemplo, os flavonoides.

De maneira geral, as determinações que garantem a identificação e a qualidade da própolis são o percentual de flavonoides, ceras, umidade, índice de oxidação e, a quantidade de formononetina, exclusiva da própolis vermelha.

As análises do teor de umidade foram realizadas utilizando-se o método convencional de perda de massa em estufa a 105 °C, durante 04 horas (ADOLFO LUTZ, 2005), conforme descrito mais à frente na metodologia (item 4.3.1, página xx).

O teste da quantidade de ceras é um indicador que representa o percentual de resinas de plantas. Quanto maior o percentual de ceras, pior será a qualidade da própolis, o que quer dizer própolis com baixa concentração de Artepelin C (própolis verde) ou de formononetina (própolis vermelha).

As amostras de própolis foram selecionadas após a coleta nos apiários, passando por um processo de pré-tratamento, em que foram retiradas sujidades do tipo insetos mortos, pedaços de madeiras, entre outras. Além da limpeza prévia, respeitou-se a metodologia do quarteamento do material coletado e amostragem de 1% (m/m) do produto coletado.

Após a realização dos testes iniciais e de qualificação da própolis, foi dado início ao estudo da influência que algumas condições operacionais exercem sobre a extração de própolis vermelha em solução alcoólica no caso etanol, e de própolis verde em água e em solução alcoólica, também etanol.

4.2 METODOLOGIA GERAL PARA OBTENÇÃO DE EXTRATOS LÍQUIDOS DE PRÓPOLIS

Para utilizar os constituintes da própolis por meio das suas propriedades farmacológicas, ela é submetida a extrações em meios alcoólicos e aquosos. De forma a orientar o processo de extração, foi utilizado o padrão oficial para o extrato de própolis verde pela INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 3, DE 19/01/2001 do Dep. de Inspeção de Produtos de Origem Animal, do Ministério da Agricultura. O anexo VII dessa Instrução fixa e descreve a composição, propriedades físicas e químicas, características sensoriais, acondicionamento e demais condições que um extrato deve obedecer para ser considerado apto para a comercialização e o consumo. As etapas do processo de extração de própolis utilizadas no presente trabalho são descritas a seguir. Ressalte-se que este é o processo convencionalmente utilizado pelas empresas para obtenção de extratos alcoólicos de própolis.

I - Ambiente de produção

Para garantir a qualidade do produto, as instalações externas e internas precisam atender às boas práticas de fabricação. A parte interna de uma fábrica deve ser bem dividida, possuindo dependências separadas, a fim de evitar a contaminação cruzada. Por esse motivo, os setores de beneficiamento da própolis *in natura*, os setores de extração, de produtos acabados e de controle de qualidade não possuíam comunicação direta, a não ser para dar sequência ao fluxograma. Todos os equipamentos eram construídos em aço inox 310, pisos e tetos com revestimento em epóxi e rigoroso controle de invasores biológicos.

II - Preparo da própolis bruta para a extração

No momento de se colher a própolis das colmeias, foram tomados todos os cuidados para não embolar ou compactar os fragmentos, pois isto dificultaria sua limpeza e classificação. O transporte até o setor de beneficiamento na fábrica era feito em embalagens plásticas, devidamente higienizadas. Preparar a própolis para extração significa retirar fragmentos e eventuais impurezas, como abelhas, pedaços de madeira, de favo, folhas, traças e outras inclusões. Após a limpeza, foram enviadas amostras para o laboratório, para que fosse realizado o teste de flavonoides, garantindo a qualidade do produto, sendo feita uma reclassificação da própolis, quando necessário. A própolis obtida com o auxílio de coletores é, geralmente, mais limpa e pura do que aquela obtida por raspagem, o que facilita bastante esta etapa do trabalho e propicia a obtenção de extratos de excelente qualidade. Finalmente, a própolis bruta era pesada, homogeneizada, triturada e separada para utilização (amostra utilizada para realização dos ensaios subsequentes).

III - Solvente

Os solventes são utilizados para “extrair” a própolis, isto é, solubilizar os princípios ativos contidos nas partes resinosa e balsâmica. Após essa extração e separação do extrato líquido, sobra a borra de própolis, constituída pelos componentes insolúveis naquele determinado solvente. Quando se utiliza o etanol como solvente, a borra de própolis que sobra apresenta atividade farmacológica pequena ou nula. Deve-se ficar claro que outros solventes podem ser utilizados, como por exemplo, a água, o propilenoglicol e a glicerina, sendo os dois últimos utilizados com equipamentos de extração mais robustos. A extração na base alcoólica extrai da própolis verde mais quantidade de flavonoides, comparado aos demais solventes. Porém, algumas substâncias extraídas na base aquosa contribuem para o combate de radicais livres. No presente trabalho, foram utilizadas soluções alcoólicas à base de etanol (tanto para a própolis vermelha quanto para a verde) e água deionizada (somente para própolis verde).

IV - Mistura da própolis

Tanto na fábrica quanto nos ensaios realizados em laboratório, na etapa de mistura, também chamada de maceramento, o produto era colocado em contato direto com o solvente, em uma usina de extração, contendo duas pás acopladas a um motor para misturar o produto. Ao se utilizar a solução alcoólica, essa mistura era agitada três vezes ao dia, durante três dias. Após a última agitação, a mistura era mantida em repouso para decantar e, em seguida, era filtrada, obtendo-se, assim, o extrato alcoólico de própolis.

4.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA DAS PRÓPOLIS VERDE E VERMELHA

A caracterização da própolis é feita por meio da determinação de alguns parâmetros físicos, tais como, teor de umidade, percentual de ceras e pela presença de alguns flavonoides específicos. No caso da própolis vermelha, o flavonoide em maior abundância é a formononetina. Serão descritos, a seguir, os procedimentos adotados para a caracterização física e química das duas espécies de própolis utilizadas no presente trabalho.

4.3.1 – Teor de umidade

A metodologia de análise utilizada foi baseada na diferença de massa, antes e após a secagem da amostra em estufa, conforme descrito por ADOLFO LUTZ (2005). Na realidade, a perda de massa não é devida somente à água removida, mas, também, a outras substâncias que se volatilizam nessas condições.

Foram pesados, em duplicata, aproximadamente 5 g das amostras de própolis bruta, em cadinho previamente tarado, os quais foram levados imediatamente para a estufa, a uma temperatura constante de 105 °C, durante 4 horas. Após a secagem, os cadinhos foram retirados da estufa e transferidos para o dessecador, até atingirem a

temperatura ambiente. Em seguida, foram realizados os cálculos do percentual de água presente nas amostras de própolis, utilizando-se a EQUAÇÃO (4.1).

$$\text{Umidade(\%)} = 100 - \frac{(B - A) \times 100}{p} \quad (4.1)$$

B = massa do cadinho mais amostra após secagem em estufa (gramas)

A = massa do cadinho sem amostra (gramas)

p = massa inicial da amostra (gramas)

4.3.2 PERCENTUAL DE CERAS

A determinação do percentual de ceras presente em própolis é feita por meio da diferença de massa obtida em extrações realizadas com um solvente composto pela mistura clorofórmio-acetona na proporção 2:1 (v/v), denominado misturas mecânicas, que consiste no percentual de aproveitamento da própolis, e a extração em água (insolúveis totais) (ADOLFO LUTZ, 1985). A seguir, são descritas as metodologias utilizadas para as análises de Insolúveis Totais e Misturas Mecânicas, sendo o percentual de ceras obtido pela diferença entre eles.

A - Misturas Mecânicas

Em um béquer de 50 mL, eram adicionados aproximadamente 1g da amostra de própolis e 15 mL de um solvente composto por clorofórmio-acetona, na proporção 2:1 (v/v). A mistura era agitada durante 5 minutos, utilizando-se um bastão de vidro e, em seguida, deixada em repouso à temperatura ambiente, por 1 hora. Após esse intervalo, a solução era filtrada em papel de filtro qualitativo de 3 micras, previamente tarado. Pequenas porções da mistura clorofórmio-acetona eram utilizadas para retirar todo o resíduo do béquer e para lavar o papel de filtro, concentrando, assim, todo o resíduo no fundo do papel. O papel de filtro era, então, levado a estufa, a 80 °C, por 2 horas. Após a secagem em estufa e resfriamento, em dessecador, até atingir a temperatura ambiente, a amostra era pesada e os cálculos do percentual de cera presente na amostra de própolis eram realizados por meio da EQUAÇÃO (4.2).

$$\% \text{ misturas mec\^ancicas} = \frac{100 \times (A1 - A2)}{p} \quad (4.2)$$

p

Sendo:

A1 = massa do papel + res\^duo (gramas)

A2 = massa do papel sem amostra (gramas)

p = massa da amostra (gramas)

B - Insol\^uveis Totais

Em um b\^equer de 250 mL era pesado, aproximadamente, 1 g da amostra de pr\^opolis e adicionados 100 mL de \u00e1gua deionizada. A mistura era colocada em banho-maria, \u00e0 temperatura de 40 \u00b0C, por 30 minutos, agitando com bast\~ao. Ap\^os esse intervalo, a solu\~cao era filtrada em papel de filtro qualitativo de 3 micras, previamente tarado. Pequenas por\~oes de \u00e1gua deionizada eram utilizadas para retirar todo o res\^duo do b\^equer e para lavar o papel filtro, concentrando assim todo o res\^duo no fundo do papel. O papel de filtro era levado \u00e0 estufa, a 80 \u00b0C, durante 4 horas. Ap\^os o per\^odo de secagem, em estufa, e resfriamento, em dessecador, at\^e atingir a temperatura ambiente, a amostra era pesada e os c\u00e1culos do percentual de insol\^uveis totais eram realizados por meio da EQUA\~C\u00c3O (4.2), descrita acima.

Ap\^os a certifica\~ao da qualidade das amostras de pr\^opolis, baseada nas an\u00e1lises do percentual de umidade e do percentual de cera, foram realizados os ensaios de identifica\~ao e quantifica\~ao de formononetina (pr\^opolis vermelha) e flavonoides (pr\^opolis verde). A determina\~ao do percentual de ceras era obtido pela diferen\~ca entre os valores encontrados para as misturas mec\^ancicas e insol\^uveis totais.

4.3.3 IDENTIFICA\~AO E QUANTIFICA\~AO DA FORMONONETINA PRESENTE NA PR\^OPOLIS VERMELHA

As an\u00e1lises para identifica\~ao e quantifica\~ao da formononetina presente na

própolis vermelha eram feitas pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), em equipamento do tipo Varian Pró-star 210 UV, em coluna RP 18 nº 07 Merck, com fase móvel constituída pela mistura metanol:água (75:25) v/v. Na realização dos ensaios, eram injetados 20 µL do extrato de própolis em uma coluna (RP-18, 250 x 4,6 mm; tamanho de partícula 5 µm) instalada em um sistema de cromatografia líquida, com sistema isocrático. A vazão era de 1,0 mL.min⁻¹ e o tempo de corrida das amostras era de 20 minutos. O composto de interesse era identificado por meio da comparação com os espectros do padrão na região do ultravioleta (268 nm), obtido por meio do detector de UV, acoplado ao equipamento de HPLC, baseado no tempo de retenção. A quantidade de formononetina obtida em cada extrato era determinada por meio da determinação da área sob o pico, em comparação direta com padrão autêntico, por meio da EQUAÇÃO 4.3.

$$\text{Formononetina(mg/g de própolis)} = A*B*C*D/1000 \quad (4.3)$$

Nessa equação, tem-se que:

- (A) – Valor, em mg.L⁻¹, de formononetina presente na amostra a partir do cálculo da área;
- (B) – Dissolução de 1 g de própolis vermelha em 10 mL de solução;
- (C) - Diluição de 1 mL da solução inicial em 10 mL de etanol;
- D) - Diluição de 0,2 mL do balão em (C) em 10 mL de etanol.

4.3.4 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS FLAVONOIDES PRESENTES NA PRÓPOLIS VERDE

Eram pesadas amostras de 0,1 gramas de propolis bruta em um béquer de 50 mL em uma solução de etanol a 80 °GL. Para a determinação dos flavonoides presentes na amostra, eram realizados ensaios em triplicata, conforme descrito a seguir. Um mL do extrato de própolis obtido era transferido para um balão volumétrico de 10 mL, contendo uma solução de 0,1 mL de uma solução de nitrato de alumínio 10 w/w e 0,1 mL de uma solução de acetato de potássio 1mol.L⁻¹, completando-se os volumes dos balões com solução de etanol 80 °GL. Para elaboração da curva de calibração padrão, foi utilizada quercetina nas concentrações de 5,0 a 50 µg/mL dissolvida em etanol. A leitura em espectrofotômetro Beckman DU-70 era feita após 40 minutos, em 415 nm. Esse

procedimento é padronizado e amplamente utilizado pelas indústrias para para a determinação da qualidade da própolis.

A determinação da concentração de flavonoides (mg/100g) presentes na amostra de própolis verde era feita por meio da Equação (4.4), apresentada a seguir.

$$\text{Flavonoides (mg/100g)} = (\text{ABS} \times \text{C} \times 50) / m \quad (4.4)$$

Nessa equação, tem-se que:

ABS = valor da leitura da absorbância em espectrofotômetro;

C = constante de calibração obtida na curva de calibração com quercetina ;

m = massa da amostra de própolis bruta (g)

O princípio dessa reação baseia-se na formação de quelatos entre o metal (alumínio) e os flavonoides, principalmente os flavonols (3-hidroxiavonas) como a quercetina, em soluções alcoólicas, levando a um efeito batocrômico (aumento do comprimento de onda em que uma molécula, ou um grupo, absorve ou emite radiação), do espectro de absorção dos flavonoides, com alteração da coloração, (PARK *et al.*,1998).

4.3.5 ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE ÁLCOOL NA EXTRAÇÃO DE FORMONONETINA

Com o objetivo de se determinar a concentração de álcool que leva à maior extração de formononetina, foram realizadas extrações em quatro diferentes concentrações de etanol (90, 80, 70 e 60 °GL). Para tanto, pesava-se aproximadamente um grama da própolis vermelha e adicionavam-se 10 mL da solução de etanol, na concentração especificada. Agitava-se os frascos para promover a mistura dos cosntituíntes filtrados. Os extratos obtidos eram acondicionados em frascos de vidro âmbar e mantidos à temperatura ambiente, por até 30 dias. Os extratos assim obtidos eram submetidos à análise química, utilizando-se o método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para identificação e quantificação do principal flavonoide presente

na própolis vermelha, a formononetina.

4.4 DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE SÓLIDOS SOLÚVEIS TOTAIS PRESENTES NOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS (VERDE E VERMELHA)

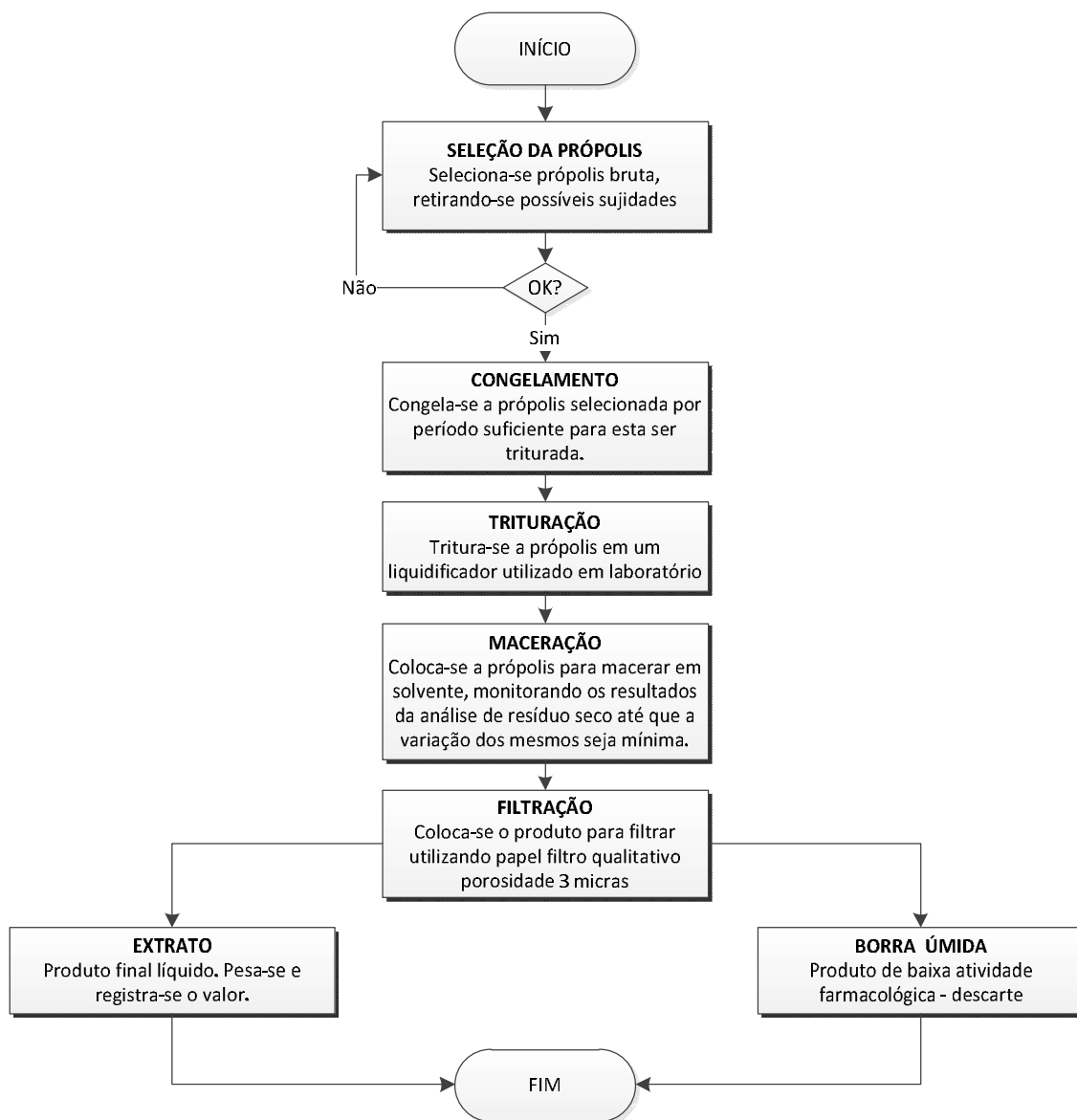
Outro objetivo deste trabalho era estabelecer uma relação quantitativa entre a concentração inicial de própolis, que é a proporção em massa de própolis bruta em relação ao solvente, e a quantidade de sólidos solúveis totais no extrato líquido filtrado, após a maceração (extração). Assim, foram utilizadas própolis de abelha da espécie *Apis mellifera*, sendo a verde oriunda da região de Minas Gerais e a vermelha da região de Alagoas. Ambas são comuns no comércio dessas regiões e apresentam composições químicas diferentes. A própolis verde foi submetida à extração (maceração) com dois tipos de solvente, solução alcoólica (etanol) e água deionizada. Porém, a extração da própolis vermelha foi realizada, somente, com solução alcoólica (etanol).

O processo de maceração era formado por 05 etapas:

- 1) **Seleção de própolis**- nessa etapa eram retiradas todas as sujidades da própolis bruta, como por exemplo; pedaços de madeira durante a coleta, insetos e até mesmo abelhas mortas. Era, também, realizada a classificação visual da qualidade da própolis, que posteriormente era confirmada pelas análises de controle de qualidade.
- 2) **Congelamento**- etapa à qual a própolis bruta era submetida, para tornar a sua trituração mais fácil. Sem o congelamento era impossível fragmentá-la em pequenas partículas para melhorar a extração.
- 3) **Trituração**- nessa etapa a propolis bruta era quebrada em partículas tão pequenas ao ponto de ser uma porção na forma de pó.
- 4) **Maceração** -etapa em que a própolis era colocada em contato com o solvente para ocorrer a extração dos constituintes solúveis .
- 5) **Filtração**- era a última etapa do processo, em que o extrato líquido de própolis e a borra residual, formada por ceras e resinas não extraídas pelo solvente, eram separadas.

O fluxograma do processo de maceração de própolis (verde e vermelha), Na FIGURA 4.1, é apresentado.

FIGURA 4.1 - FLUXOGRAMA GERAL DO PROCESSO DE MACERAÇÃO (EXTRAÇÃO) DE PRÓPOLIS (VERDE E VERMELHA)



A massa total para cada teste era de 1.000 g de mistura, própolis bruta mais solvente em que se variava de 10 a 60 (w/L) a massa de própolis verde em álcool

hidratado (etanol) 90 °GL; de 10 a 40 (w/w) a massa de própolis verde em água a 60°C e de 15 (w/w) massa de própolis vermelha com solução alcoólica (etanol) nas concentrações de 70, 80 e 90 °GL. As condições operacionais utilizadas para a condução dos experimentos encontram-se relacionadas na TABELA 4.1.

TABELA 4.1 – CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS UTILIZADAS PARA A EXTRAÇÃO DE PRÓPOLIS VERDE E VERMELHA VISANDO À DETERMINAÇÃO DAS MELHORES CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO

Condições de extração	Própolis Verde	Própolis Verde	Própolis Vermelha
Região	<i>Minas Gerais</i>	<i>Minas Gerais</i>	<i>Alagoas</i>
Solvente utilizado	<i>Álcool</i>	<i>Água Deionizada</i>	<i>Álcool</i>
Graduação alcoólica (°GL)	<i>90</i>	<i>-</i>	<i>90, 80 e 70</i>
Temperatura de extração (°C)	<i>Ambiente</i>	<i>60 *</i>	<i>Ambiente</i>
Concentração própolis/solvente (w/w)	<i>10 a 60</i>	<i>10 a 40</i>	<i>15</i>
Tempo de extração (horas)	<i>72</i>	<i>02</i>	<i>72</i>

*Temperatura do ponto de fusão da maioria das própolis: 60 a 70°C (MARCUCCI, 1996).

Foram realizados 13 ensaios, todos em triplicata. A temperatura utilizada para a extração da própolis verde em água (60 °C) foi baseada no trabalho de MARCUCCI (1996), sendo esta a temperatura máxima que deve ser utilizada, de maneira a garantir que não haja mudanças na composição química dessa própolis. Os experimentos com a própolis verde foram realizados com uma única concentração de álcool (90 °GL) devido aos conhecimentos práticos previamente adquiridos, por meio de uma extensa vivência na produção de própolis em escala industrial, quando foi constatada que essa era a condição que levava aos maiores percentuais de extração de flavonoides.

Decorrido o tempo especificado para o contato entre o solvente e a própolis bruta de cada amostra, a mistura era deixada em repouso por 12 horas ou pelo tempo suficiente para que ocorresse a decantação. Era, então, filtrada e o preparado era reservado (extratos de própolis) para as análises de perda de massa em estufa (determinação do percentual de resíduo seco, o qual, permite calcular a quantidade de sólidos solúveis totais no extrato líquido), conforme descrito a seguir.

Foram pesados, em triplicata, aproximadamente 5 g de cada amostra de extrato de própolis obtida nos ensaios realizados, em cadinho previamente tarado, os quais foram levados imediatamente para a estufa, a uma temperatura constante de 105 °C, durante 4 horas. Após a retirada dos cadinhos da estufa, estes foram transferidos para o dessecador, até atingirem a temperatura ambiente. Em seguida, foram realizados os cálculos do percentual de resíduo seco presente nas amostras dos extratos de própolis, utilizando-se a EQUAÇÃO (4.5).

$$\% (\text{Resíduo seco}) = \frac{(B - A) \times 100}{p} \quad (4.5)$$

Nessa equação, tem-se:

B = massa do cadinho mais amostra após secagem em estufa (gramas);

A = massa do cadinho sem amostra (gramas);

p = massa inicial da amostra (gramas).

4.5 EXTRAÇÃO EM DOIS ESTÁGIOS, EM CORRENTE CRUZADA, PARA OS DOIS TIPOS DE PRÓPOLIS: VERDE E VERMELHA.

Para a realização desses experimentos, primeiramente, a própolis bruta era colocada em contato com o solvente, nas condições especificadas na TABELA 4.2 (condições utilizadas para a extração em um estágio). A escolha da concentração da solução alcoólica, bem como da relação entre as massas de própolis bruta e solvente foi baseada nos resultados obtidos previamente neste trabalho.

TABELA 4.2 – CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS UTILIZADAS PARA EXTRAÇÃO EM UM ESTÁGIO

<i>Número de extrações</i>	<i>Condições de extração</i>	<i>Extração de própolis verde em etanol 90 (v/v)</i>	<i>Extração de própolis verde em água</i>	<i>Extração de próp. vermelha em álcool 90 (v/v)</i>
Extração em um único estágio	<i>Tempo de extração</i>	<i>72 horas</i>	<i>2 horas</i>	<i>72 horas</i>
	<i>Temperatura de extração (°C)</i>	<i>Ambiente</i>	<i>60</i>	<i>Ambiente</i>
	<i>Massa de própolis bruta (g)</i>	<i>350</i>	<i>150</i>	<i>150</i>
	<i>Massa de solvente (g)</i>	<i>650</i>	<i>850</i>	<i>850</i>

Terminada a extração do primeiro estágio, a mistura era filtrada em papel de filtro qualitativo de 3 micras. O resíduo (borra) obtido na primeira extração era contatado novamente com solvente fresco, utilizando-se mesma quantidade de solvente estabelecido para o primeiro estágio (extração em corrente cruzada).

Amassa total utilizada em cada experimento era de 1.000g (tanto para o primeiro quanto para o segundo estágio), somando-se solvente e soluto. Ao final da segunda extração, os dois extratos eram reunidos, homogeneizados e encaminhados para determinação do percentual de sólidos solúveis totais, por meio da análise de resíduo seco, conforme descrito no item 4.4 (páginas 66 e 67).

5.RESULTADOS

Neste capítulo, a apresentação dos resultados será dividida em três partes, sendo a primeira destinada à própolis vermelha, a segunda, referente aos resultados obtidos com a própolis verde e, na terceira parte, serão apresentados os resultados obtidos para extração em dois estágios em corrente cruzada, tanto para a própolis vermelha quanto para a verde.

Parte I – Própolis Vermelha

5.1– CARACTERIZAÇÃO FÍSICA DA PRÓPOLIS VERMELHA BRUTA

A amostra de própolis vermelha bruta, antes do processo de secagem, apresentava uma cor laranja, como se pode se observar na FIGURA 5.1, passando a apresentar a cor vermelha, após a secagem (FIGURA 5.2). Essa mudança se deve à exposição da amostra a uma temperatura elevada (105 °C) durante a secagem.



FIGURA 5.1 – AMOSTRA DE PRÓPOLIS VERMELHA *IN NATURA* MOÍDA.
Fonte: Laboratório Unis – Betim/MG



FIGURA 5.2 – AMOSTRA DE PRÓPOLIS VERMELHA APÓS SECAGEM EM ESTUFA.
Fonte: Laboratório Unis – Betim/MG

O teor de umidade encontrado na própolis vermelha bruta foi de 4,5% (w/w). Esse valor está dentro da faixa dos valores normalmente encontrados para própolis de elevada qualidade, que, de uma maneira geral, encontra-se abaixo de 7,0%. É importante que a própolis bruta apresente um baixo teor de umidade, evitando assim, sua possível degradação. Própolis com alto teor de umidade sofre oxidação com facilidade, fica susceptível ao ataque de fungos, além de causar perdas consideráveis de suas propriedades, podendo ter o seu valor comercial muito reduzido.

Conforme apresentado na metodologia, item 4.3.2, a determinação do percentual de ceras é realizada por meio da diferença de massa obtida em extrações realizadas com um solvente composto pela mistura clorofórmio-acetona, na proporção 2:1 (v/v) (misturas mecânicas), e a extração em água (insolúveis totais). O extrato obtido a partir da extração com água, a 60 °C, se apresentou mais turvo do que o extrato obtido com a mistura mecânica (extração realizada com mistura a clorofórmio-acetona), sendo que, este último apresentava uma coloração amarelada mais intensa. É provável que a turbidez no extrato aquoso, esteja associada à extração de alguns compostos orgânicos, pouco solúveis em água. A cor mais intensa obtida na mistura mecânica deve-se aos flavonoides, presentes em maior concentração quando extraídos em clorofórmio/acetona.

O percentual de ceras encontrado na própolis vermelha bruta foi de 38,4%. Esse percentual é considerado elevado, pois própolis de outras origens botânicas, com elevada qualidade, geralmente, apresentam percentuais inferiores a 30%, sendo que, própolis de excelente qualidade, apresentam percentuais de cera abaixo de 20%. O elevado percentual de ceras encontrado na própolis vermelha deve-se, provavelmente, à escassez da planta *Dalbergia ecastophyllum*, de onde as abelhas retiram a resina responsável pela qualidade da própolis. Dessa forma, as abelhas coletam resinas de outras plantas, que apenas agregam cera à própolis.

Os extratos e os resíduos obtidos na extração com a mistura clorofórmio-acetona são mostrados nas FIGURAS 5.3 e 5.4. Nas FIGURAS 5.5 e 5.6, são apresentados, respectivamente, os extratos e os resíduos obtidos na extração com água deionizada.



FIGURA 5.3 - EXTRATO OBTIDO EM MISTURA CLOROFÓRMIO-ACETONA (2:1).

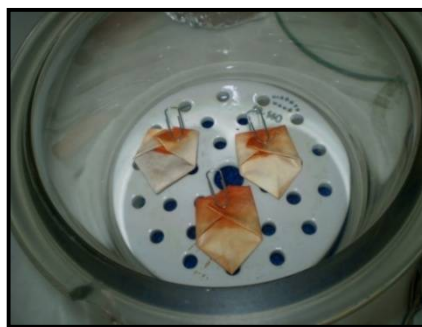


FIGURA 5.4 – RESÍDUO SÓLIDO INSOLÚVEL, APÓS EXTRAÇÃO COM MISTURA CLOROFÓRMIO-ACETONA (2:1).



FIGURA 5.5 – EXTRATO DE PRÓPOLIS VERMELHA, APÓS EXTRAÇÃO EM ÁGUA DEIONIZADA.

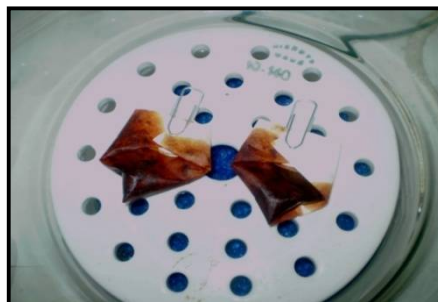


FIGURA 5.6 – RESÍDUO SÓLIDO INSOLÚVEL, APÓS EXTRAÇÃO EM ÁGUA

5.2 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA FORMONONETINA PRESENTE EM PRÓPOLIS VERMELHA

Nas análises de formononetina da própolis vermelha, por HPLC, foram realizadas extrações com diferentes concentrações alcoólicas (60, 70, 80 e 90 °GL), na relação de 1 g de própolis bruta com adição de 10 mL de solução de etanol, nas concentrações especificadas, conforme metodologia descrita no item 4.3.3 deste trabalho, para identificação e quantificação da formononetina presente nos diferentes extratos alcoólicos obtidos. Os cromatogramas do padrão de formononetina utilizado e dos extratos, bem

como, as condições experimentais utilizadas em cada análise são apresentadas nas FIGURAS 5.7 e 5.8.

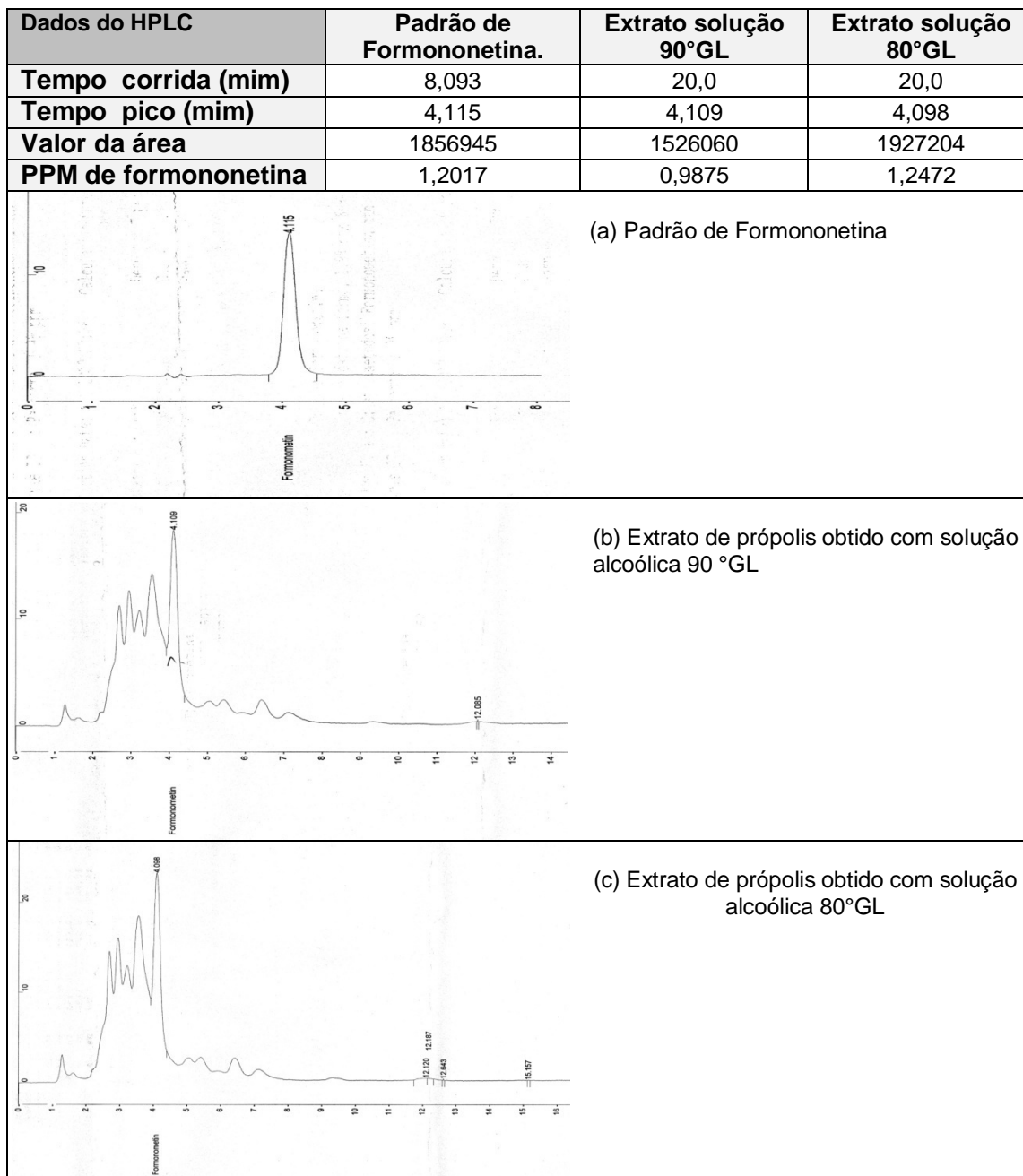


FIGURA 5.7– CROMATOGRAMAS, POR HPLC. (A) PADRÃO DE FORMONONETINA, (B) EXTRATO DE PRÓPOLIS EM SOLVENTE ÁLCOOL HIDRATADO 90 °GL, (C) EXTRATO DE PRÓPOLIS EM SOLVENTE ÁLCOOL HIDRATADO 80 °GL.

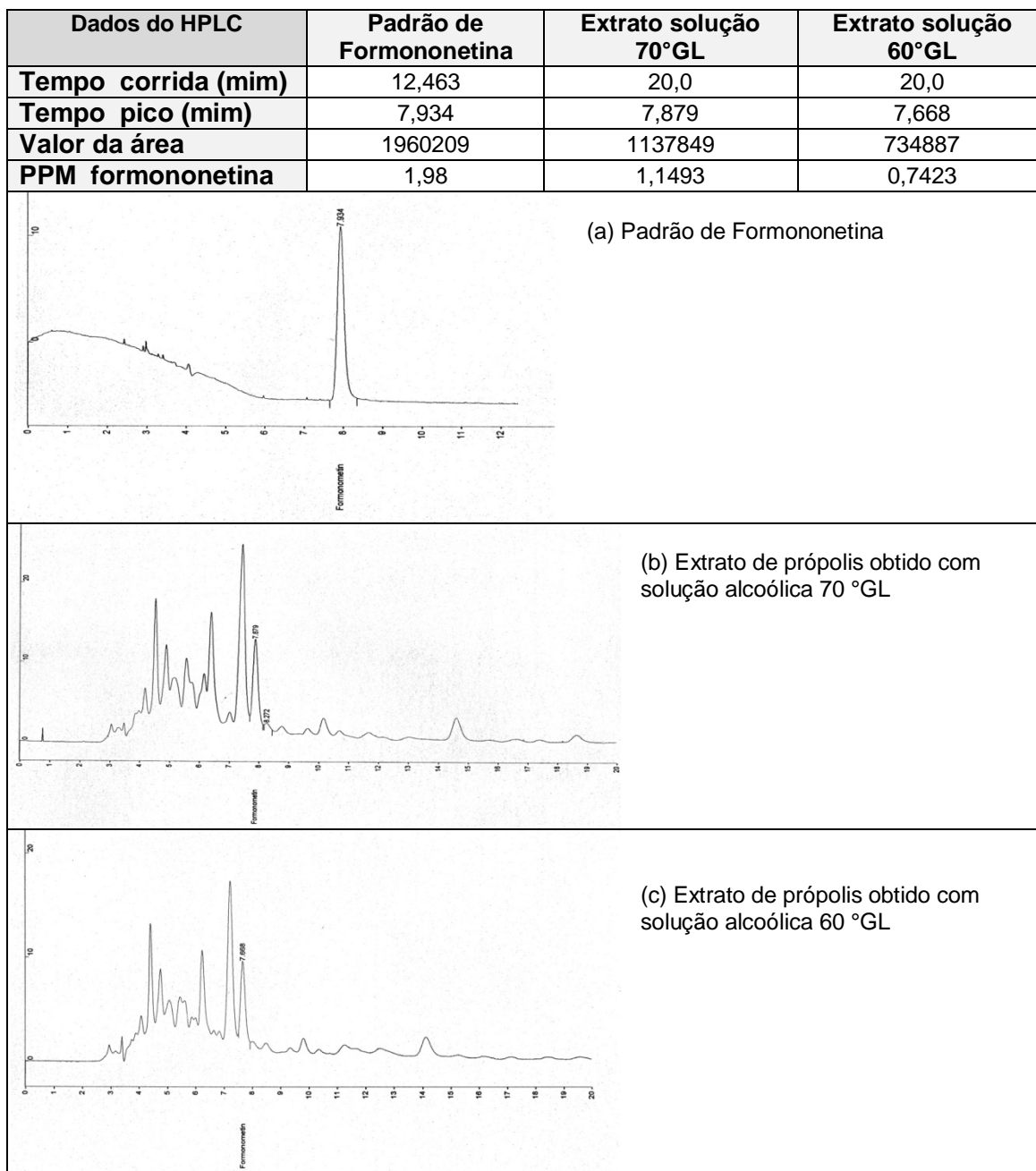


FIGURA 5.8– CROMATOGRAMAS, POR HPLC. (A) PADRÃO DE FORMONONETINA, (B) EXTRATO DE PRÓPOLIS EM SOLVENTE ÁLCOOL HIDRATADO 70 °GL, (C) EXTRATO DE PRÓPOLIS EM SOLVENTE ÁLCOOL HIDRATADO 60 °GL.

Conforme se observa nas figuras apresentadas, os cromatogramas obtidos nas extrações da própolis vermelha com diferentes concentrações alcoólicas são muito semelhantes. É importante ressaltar que as análises foram feitas em dois momentos distintos (extratos a 80 °GL e 90 °GL em um primeiro momento e, os outros dois, 60 °GL e

70 °GL, no segundo momento), tendo-se utilizado condições experimentais distintas na análise por HPLC, para os dois momentos. Por esse motivo, são apresentados dois cromatogramas para o padrão de formononetina, conforme se observa nas FIGURAS 5.7(a) e 5.8(a). Observa-se, ainda, que, em função das diferentes condições de corrida utilizadas nos dois momentos, o tempo de retenção característico para o pico de formononetina é diferente, sendo de 4,12 minutos para o primeiro cromatograma (FIGURA 5.7(a)) e de 7,93 minutos para o segundo (FIGURA 5.8(a)).

Com relação aos cromatogramas das extrações realizadas com diferentes concentrações alcoólicas, observa-se que foi obtida uma melhor resolução para o pico correspondente ao da formononetina, ao se utilizar as condições de corrida da análise feita no segundo momento. Ou seja, nos cromatogramas obtidos para as extrações com 60 °GL e 70 °GL (FIGURA 5.7 (b) e (c)), o pico da formononetina tem início e fim, aproximadamente, na mesma altura, que apesar de não corresponder à linha de base, confere uma maior resolução para esse pico, comparado aos picos obtidos nas extrações realizadas com as soluções alcoólicas a 80 °GL e 90 °GL.

Em função de não se ter obtido uma boa resolução dos picos de formononetina, principalmente para as extrações realizadas com 80 °GL e 90 °GL de álcool, sua quantificação ficou prejudicada, visto que, normalmente, o método utilizado para essa quantificação consiste na determinação da área sob o pico obtido e a utilização de uma curva de calibração, na qual estão representadas as variáveis área versus concentração da substância a ser quantificada. Assim, em função de não se ter conseguido uma resolução adequada dos picos, que permitisse o cálculo das concentrações de formononetina por meio da área sob os picos e por não ter sido realizada uma curva de calibração com o padrão de formononetina, os resultados apresentados correspondem, apenas, a uma estimativa da concentração de formononetina obtida nas diferentes soluções alcoólicas.

Na TABELA 5.1 são apresentadas as concentrações de formononetina (análise semiquantitativa) obtidas para as extrações realizadas nas diferentes concentrações alcoólicas. Conforme se pode observar, a maior concentração de formononetina foi obtida para a extração realizada com 80 °GL de álcool, conforme o gráfico 5.7 (b).

DAUGSCH (2007), trabalhando em condições semelhantes às utilizadas no presente trabalho, ou seja, utilizando o mesmo tipo de solvente (etanol 80°GL) e a mesma relação massa de própolis bruta/massa de solvente, obteve uma maior

concentração de formononetina (10,2 mg/g própolis bruta) na amostra investigada do que o valor encontrado no presente trabalho (6,2 mg/g). Deve-se ressaltar, entretanto, que os valores aqui apresentados para a concentração de formononetina, são, apenas, estimativos, sendo utilizados, principalmente, para comparação entre as quantidades extraídas nas diferentes soluções alcoólicas utilizadas. Adicionalmente, tem-se que DAUGSCH (2007), utilizou uma temperatura bem superior (70 °C) nas extrações, comparada à temperatura utilizada no presente trabalho (temperatura ambiente), que pode ter proporcionado uma maior extração de formononetina. É importante destacar, ainda, que a amostra de própolis vermelha bruta utilizada no presente trabalho era diferente da amostra investigada por DAUGSCH (2007). Como a concentração de formononetina pode variar entre amostras coletadas de diferentes regiões, esse fator pode ter sido a principal causa para as diferenças encontradas entre os resultados.

TABELA 5.1 – CARACTERIZAÇÃO FÍSICA E QUÍMICA DA PRÓPOLIS VERMELHA BRUTA

Parâmetro	Própolis verde	Própolis Vermelha
Umidade	5,1%	4,5%
Ceras	14,2 %	38,4%
Flavonoides	3.500 mg/100g	-
Formononetina		
Extração a 60 °GL	-	3,7 mg/g
Extração a 70 °GL	-	5,7 mg/g
Extração a 80 °GL	-	6,2 mg/g
Extração a 90 °GL	-	4,9 mg/g

5.3 DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO DE EXTRAÇÃO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SOLUÇÃO ALCOÓLICA.

A metodologia utilizada na determinação da massa de sólidos solúveis totais (SST), do percentual de resíduo seco e dos rendimentos de extração foi baseada na perda de massa do extrato líquido quando aquecido a 105 °C, durante 04 horas. Após a evaporação do solvente e de possíveis constituintes voláteis presentes na própolis, foram determinadas as massas de sólidos solúveis totais (massa de sólidos obtidas após a evaporação completa do solvente e de outros compostos voláteis contidos nos extratos de própolis) e os percentuais de resíduo seco (razão entre massa de SST e a massa do extrato de própolis correspondente). Todos os ensaios foram realizados em triplicata, com as soluções alcoólicas a 70, 80 e 90 °GL, à temperatura ambiente. Na TABELA 5.2 são apresentados, também, os rendimentos da extração obtidos para as três concentrações de solução alcoólica (etanol) utilizadas.

TABELA 5.2 – PERCENTUAL DE RESÍDUO SECO TOTAL E RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO DE PRÓPOLIS VERMELHA EM ESTÁGIO ÚNICO, EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SOLUÇÃO ALCOÓLICA, MANTENDO-SE CONSTANTE A MASSA TOTAL DA MISTURA (PRÓPOLIS BRUTA + SOLVENTE) EM 1000 G E RELAÇÃO MASSA DE PRÓPOLIS/MASSA DE SOLVENTE EM 15m/m.

<i>[Etanol]</i>	<i>Massa de extrato líquido (g)</i>	<i>Massa de SST (g)</i>	<i>Resíduo Seco Total (%)</i>	<i>Resíduo seco médio (%)</i>
<i>°GL</i>				
70	790	55,70	7,05	7,06
	820	53,30	6,50	
	740	56,61	7,65	
80	810	64,40	7,95	7,87
	830	62,67	7,55	
	775	62,78	8,10	
90	840	69,22	8,24	8,39
	860	69,14	8,04	
	800	71,12	8,89	

Os rendimentos foram calculados com base nas massas determinadas e os resultados foram expressos em termos da razão da massa de sólidos solúveis totais presentes no extrato líquido em relação à massa de amostra inicial de própolis bruta

expressa em porcentagem (razão entre a massa de SST obtida e a massa de própolis bruta utilizada multiplicada por 100).

Por meio dos resultados apresentados na TABELA 5.2, observa-se que há um aumento no resíduo seco ao se aumentar a concentração da solução alcoólica utilizada na extração. Ressalte-se que a concentração inicial de própolis vermelha em álcool (massa inicial de própolis bruta) foi mantida constante em 150 g, variando-se, apenas, a proporção entre água e álcool nas soluções de extração. Como a massa total da mistura (própolis bruta + solvente) era mantida constante em 1.000 g, ao se aumentar a concentração da solução alcoólica, uma maior quantidade de álcool era disponibilizada para realizar a extração. Quanto maior o percentual de resíduo seco obtido maior é a quantidade extraída de sólidos solúveis totais. Como a maior parte dos constituintes da própolis consiste em compostos orgânicos, com baixa solubilidade em água e mais solúveis em álcool, a maior quantidade de sólidos solúveis totais, 69,8 g, foi obtida para a extração realizada com a solução alcoólica de concentração mais elevada (etanol 90°GL), levando a um percentual médio de resíduo seco igual a 8,39%.

Parte II – Própolis Verde

5.4 -CARACTERIZAÇÃO DA PRÓPOLIS VERDE BRUTA

A caracterização da própolis verde bruta foi feita por meio da determinação do teor de umidade, do percentual de ceras e da concentração de flavonoides presentes na amostra, conforme metodologia descrita no item 4.3. De acordo com os resultados obtidos, apresentados na TABELA 5.3, observa-se que a amostra de própolis verde utilizada apresentava excelente qualidade, pois foram encontrados baixos percentuais de umidade e de cera (valores abaixo dos normalmente encontrados para própolis de elevada qualidade, que, de uma maneira geral, devem apresentar umidade abaixo de 7% e percentual de ceras inferior a 20%).

A concentração de flavonoides presente em própolis é um parâmetro que certifica a qualidade da própolis, pois quanto maior é a sua concentração, melhor é a qualidade da amostra. A própolis bruta é classificada no mercado de acordo com a concentração de flavonoides (mg/100g) presente na amostra (*in natura*), conforme a seguir: própolis *in natura* Marrom (Brown) - cerca de 2.250 mg/100g; Verde (Green) - cerca de 3.300

mg/100g e Ultra Green aproximadamente - 3.500 mg/100g (CONAP/2013). A quantidade de flavonoides foi analisada por espectrofotometria, por meio da quantificação de antioxidantes ativos que impedem a peroxidação de enzimas (YOYOGI-MACHI & SHIBUIA-KU,1980). Por meio dos resultados obtidos, pode-se afirmar que a própolis utilizada é de excelente qualidade, pois, além de apresentar baixos teores de cera e de umidade, contém uma elevada concentração de flavonoides. Quanto mais elevada for esta concentração, melhor é a qualidade da própolis bruta.

TABELA 5.3– Caracterização da própolis verde bruta.

<u>Análise</u>	<u>Amostra</u>	<u>Resultado</u>
Umidade	Padrão	5,1 %
Ceras	Padrão	14,2 %
Flavonoides	Padrão	3.500 mg/100g

5.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA VARIAÇÃO DA RELAÇÃO MASSA DE PRÓPOLIS BRUTA/MASSA DE SOLVENTE SOBRE A MASSA DE SÓLIDOS SOLÚVEIS TOTAIS (SST), PARA EXTRAÇÕES REALIZADAS COM ETANOL 90 °GL E COM ÁGUA DEIONIZADA A 60 °C.

Apresentam-se, a seguir, as massas de sólidos solúveis totais, as massas de extrato líquido filtrado e os percentuais de resíduo seco total obtidos para as extrações realizadas com solução alcoólica 90°GL (TABELA 5.4) e com água deionizada a 60 °C (TABELA 5.5), nas diferentes relações massa de própolis bruta/massa de solvente investigadas. Na condução desses experimentos, a massa total da mistura (própolis bruta + solvente) era mantida constante em 1.000g, variando-se tanto a massa inicial de própolis bruta quanto a massa do solvente.

De acordo com os resultados apresentados na TABELA 5.4, observa-se que a massa de sólidos solúveis totais aumenta com o aumento da relação massa de própolis bruta/massa de solvente até a relação de 35% m/m. Acima desse valor, há uma diminuição na massa de sólidos solúveis totais (SST) apesar do aumento da massa inicial de própolis bruta. Isto pode ser explicado pelo fato de, paralelamente a esse aumento da massa de própolis, haver uma diminuição da massa de solvente utilizado, de modo a se manter a massa da mistura (própolis bruta + solvente) constante. Dessa forma, até se atingir a relação massa de própolis bruta/massa de solvente de 35% m/m, pode-se dizer que há solvente em quantidade suficiente para garantir que o aumento da massa de própolis possa levar a um aumento da massa de sólidos solúveis totais, mas a partir desse percentual, a massa cada vez menor de solvente para uma massa crescente de própolis bruta faz com que a massa de solução alcoólica utilizada seja insuficiente para manter em solução a mesma quantidade de SST.

Adicionalmente, observa-se que, com a diminuição da quantidade de solvente, há um aumento perceptível da interação matriz sólida/solvente, que leva a uma grande perda de solvente nessa matriz. Não foram encontrados, na literatura, registros acerca da natureza dessas interações. Com isso, apesar da massa inicial de própolis bruta ir aumentando, a massa de sólidos solúveis totais vai diminuindo. No entanto, pode-se dizer que nas condições estudadas, em que se mantém a massa da mistura (própolis bruta + solvente) constante, há uma saturação do solvente na relação de 35% m/m.

Com relação aos percentuais de resíduo seco, verifica-se que estes vão sempre aumentando. Sendo o percentual de resíduo seco total, a relação entre a massa de SST e a massa correspondente de extrato líquido filtrado ou extrato alcoólico, tem-se que até a relação massa de própolis bruta/massa de solvente utilizada de 35% m/m, isto era de se esperar, pois há um aumento da massa de SST e uma diminuição da massa de extrato alcoólico. Acima dessa relação, o percentual de resíduo seco total continua a aumentar, pois, apesar de ter sido observada uma diminuição na massa de SST, a massa de extrato líquido filtrado diminui muito mais, pelo uso de uma quantidade de solvente cada vez menor, que fica cada vez mais retido na matriz sólida.

TABELA 5.4 – EFEITO DA VARIAÇÃO DA RELAÇÃO MASSA DE PRÓPOLIS BRUTA/MASSA DE SOLVENTE, PARA EXTRAÇÃO DE PRÓPOLIS VERDE COM SOLUÇÃO ALCOÓLICA A 90 °GL, EM ESTÁGIO ÚNICO, MANTENDO-SE CONSTANTE A MASSA DA MISTURA (PRÓPOLIS BRUTA + SOLVENTE) EM 1.000 G.

<i>Relação Massa de Própolis Bruta/ Massa de Solvente (% m/m)</i>	<i>Massa de Sólidos Solúveis Totais (gramas)</i>	<i>Massa de Extrato Líquido Filtrado (gramas)</i>	<i>Resíduo Seco Total (%)</i>
10	52,46	870	6,03
15	64,44	720	8,95
20	72,48	600	12,08
25	78,10	520	15,02
30	79,16	440	17,99
35	80,64	380	21,22
40	77,85	330	23,59
45	75,94	280	27,12
50	72,07	240	30,03
55	69,55	210	33,12
60	61,05	170	35,91

Analisando-se os resultados obtidos para as extrações realizadas com água deionizada a 60 °C, nas diferentes relações massa de própolis bruta/massa de solvente investigadas (TABELA 5.5), verifica-se que, dentre as condições estudadas, a relação massa de própolis bruta/massa de solvente igual a 15% m/m foi a que levou à obtenção da maior quantidade de sólidos solúveis totais (40,6 g). Comparando esses resultados com os obtidos com o uso da solução alcoólica 90 °GL, nas mesmas relações massa de própolis bruta/massa de solvente, observa-se que a solubilidade da própolis é menor na água deionizada do que na solução alcoólica 90°GL. Esse comportamento já era

esperado, uma vez que, a própolis apresenta elevados percentuais de substâncias orgânicas, com baixa solubilidade em água.

TABELA 5.5 – EFEITO DA VARIAÇÃO DA RELAÇÃO MASSA DE PRÓPOLIS BRUTA/MASSA DE SOLVENTE, PARA EXTRAÇÃO DE PRÓPOLIS VERDECOM ÁGUA DEIONIZADA, A 60 °C, EM ESTÁGIO ÚNICO, MANTENDO-SE CONSTANTE A MASSA DA MISTURA (PRÓPOLIS BRUTA + SOLVENTE) EM 1.000G.

Relação Massa de Própolis Bruta/ Massa de Solvente (% m/m)	Massa de Sólidos Solúveis Totais (gramas)	Massa de Extrato Líquido Filtrado (gramas)	Resíduo Seco Total (%)
10	37,80	820	4,61
15	40,56	600	6,76
20	38,32	440	8,71
25	34,02	320	10,63
30	31,50	220	14,32
35	21,16	130	16,28
40	10,82	60	18,04

Analogamente à discussão dos resultados das extrações realizadas com a solução alcoólica 90°GL, houve um aumento nos sólidos solúveis totais quando a relação massa de própolis bruta/massa de solvente passou de 10 para 15% m/m. A partir de então, com o aumento da massa inicial de própolis bruta e, paralelamente, com a redução na massa de solvente, observou-se uma queda na extração de sólidos solúveis totais, pelos mesmos motivos apresentados anteriormente. O mesmo raciocínio anterior explica o aumento do percentual de resíduo seco com o aumento da relação massa de própolis bruta/massa de solvente.

Para uma melhor visualização do efeito que a variação da relação massa de própolis bruta/massa de solvente exerce sobre a quantidade de sólidos solúveis totais

obtidos a partir dos extratos líquidos correspondentes, foram construídas as curvas, apresentadas na FIGURA 5.9. Estas evidenciam a saturação do solvente, tanto com o uso da solução alcoólica 90°GL quanto da água deionizada, mostrando, conforme já apresentado anteriormente, as condições em que foram maximizadas as massas de sólidos solúveis totais para cada um dos solventes. Na extração alcoólica, a maior massa de SST, 80,64g, foi obtida para a relação massa de própolis bruta/massa de solvente de 35% m/m. E para a extração em água, a maior massa de SST, 40,6 g, foi obtida para a relação massa de própolis bruta/massa de solvente de 15% m/m.

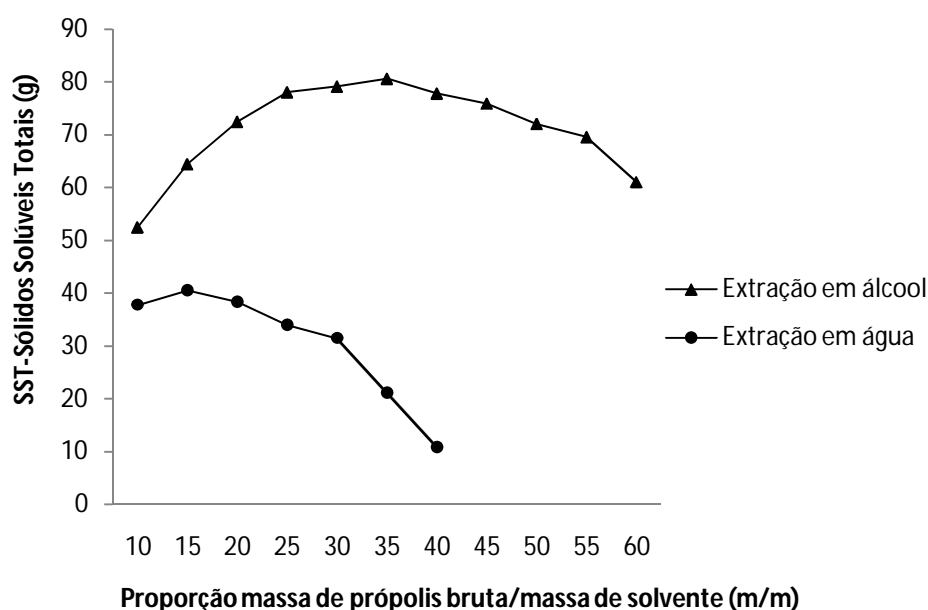


FIGURA 5.9 - RELAÇÃO ENTRE A MASSA DE SÓLIDOS SOLÚVEIS TOTAIS OBTIDAS NOS EXTRATOS LÍQUIDOS E A PROPORÇÃO MASSA DE PRÓPOLIS BRUTA/MASSA DE SOLVENTE UTILIZADA.

Parte III – Extração de própolis verde e vermelha em dois estágios – corrente cruzada

Os resultados obtidos para extração em dois estágios, em corrente cruzada, das própolis verde (extração em água e em solução alcoólica 90 °GL) e vermelha (extração

em solução aquosa 90 °GL) são apresentados na TABELA 5.6. Ressalte-se que os dois estágios de extração foram realizados sob as mesmas condições operacionais.

TABELA 5.6 – EXTRAÇÃO DE PRÓPOLIS VERDE, EM ÁGUA E EM SOLUÇÃO ALCOÓLICA 90 °GL E DE PRÓPOLIS VERMELHA EM SOLUÇÃO ALCOÓLICA 90 °GL, EM DOIS ESTÁGIOS EM CORRENTE CRUZADA.

<i>Extrações</i>	<i>Condições de extração</i>	<i>Própolis verde em etanol 90 °GL</i>	<i>Própolis verde em água</i>	<i>Própolis vermelha em etanol 90 °GL</i>
Primeiro Estágio	<i>Tempo de extração (horas)</i>	72	2	72
	<i>Temperatura de extração (°C)</i>	<i>Ambiente</i>	60	<i>Ambiente</i>
	<i>Concentração Inicial de própolis bruta (%)</i>	35	15	15
	<i>Sólidos Solúveis Totais (g)</i>	64,37	23,79	70,80
Segundo Estágio	<i>Tempo de extração cada estágio (horas)</i>	72	2	72
	<i>Temperatura de extração (°C)</i>	<i>Ambiente</i>	60	<i>Ambiente</i>
	<i>Concentração Inicial de própolis bruta(%)</i>	35	15	15
	<i>Sólidos Solúveis Totais (g)</i>	102,99	36,37	81,87

Conforme se pode observar, as massas de sólidos solúveis totais aumentaram com a segunda extração, para as três amostras investigadas, sendo esse aumento de aproximadamente 60% para a própolis verde em solução alcoólica (SST 102,99g), 53% para própolis verde em água (SST 36,37g) e de 16% para própolis vermelha em etanol 90°GL(SST 81,87g). Nota-se que, sob as condições operacionais utilizadas, quando a extração é realizada em um único estágio, grande parte dos sólidos solúveis permanece

retida na borra, seja no extrato líquido, que não se conseguiu separar durante a etapa de filtração, devido a prováveis interações entre o solvente e a borra, ou que ainda não tenham sido solubilizados, permanecendo na matriz sólida.

A mistura dos extratos obtidos nos dois estágios resultará em um extrato mais diluído, porém haverá um melhor aproveitamento da própolis bruta. De acordo com as exigências do mercado, esse extrato resultante poderá ser diluído ainda mais, por meio de adição de solução alcoólica ou água, ou ser submetido a um processo de evaporação do solvente, de maneira a se obter um extrato mais concentrado.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos na caracterização da amostra de própolis vermelha demonstram que o percentual de umidade encontrado (4,5%) está dentro dos parâmetros que definem uma própolis de boa qualidade, porém ela apresenta um elevado percentual de ceras (38,4%), valor acima do estabelecido (30%) na definição de qualidade da própolis, de uma maneira geral.

Por meio de análises realizadas por HPLC, foi possível identificar a presença de formononetina, principalmente constituinte da própolis vermelha e fazer uma estimativa de sua concentração para extrações realizadas em três concentrações alcoólicas.

Nos estudos realizados para avaliar as condições operacionais que levavam aos melhores resultados na extração de própolis vermelha, foi possível observar que a maior concentração de formononetina (6,2 mg/g) foi obtida para a extração realizada com a solução de etanol 80 °GL. Porém, a maior quantidade de sólidos solúveis totais (69,8 g) foi obtida para a extração de própolis vermelha realizada com etanol 90 °GL, levando, nesse caso a um percentual médio de resíduo seco igual a 8,39% e a um rendimento médio de extração de 46,55%.

Por meio da caracterização realizada na amostra de própolis verde, observou-se que esta era considerada de excelente qualidade, pois foram encontrados baixos percentuais de umidade (5,1%) e de cera (14,2%) e uma elevada concentração de flavonoides (3.500,00 mg/g), o que lhe conferiu a classificação de própolis bruta Ultra Green.

Na avaliação dos efeitos de alguns parâmetros operacionais sobre a extração de própolis verde foi possível concluir que a relação massa de própolis bruta/massa de solvente igual a 35%(m/m) foi a que proporcionou o melhor resultado para a extração em solução alcoólica 90 °GL, sendo obtidos 80,64 g de sólidos solúveis totais e um percentual de resíduo seco igual a 21,08%. Por outro lado, na extração aquosa, os melhores resultados foram obtidos para a relação massa de própolis/massa de solvente igual a 15%(m/m), com 40,6 g de sólidos solúveis totais e percentual de resíduo seco igual a 6,8%. Deste forma, conclui-se que a solução alcóolica 90 °GL foi o melhor solvente para a extração de sólidos solúveis totais.

Por meio dos resultados obtidos, observou-se que a extração realizada em dois estágios, nas melhores condições de extração encontradas no presente trabalho, proporciona um melhor aproveitamento da própolis bruta, visto que, houve um aumento na massa de sólidos solúveis totais de 60% para a própolis verde em solução alcoólica, 53% para própolis verde em água e de 16% para própolis vermelha em etanol 90 °GL.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABSY, M.L.; KERR, W.E. **Algumas plantas visitadas para obtenção de pólen por operárias de *Melipona seminigra merrillae* em Manaus.** Acta Amazonica, 7(3):309-315, 1977.

ADELMANN, J. **Própolis variabilidade composicional correlação com a flora e a bioatividade antimicrobiana/antioxidante.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -Setor de Ciências da Saúde. Paraná: Universidade Federal do Paraná, 2005.

ALENCAR, S.M.; OLDONI, T.L.C.; CASTRO, M.L.; CABRAL, I.S.R.; COSTA-NETO, C.M.; CURY, J.A.; ROSALEN, P.L.; IKEGAKID, M. **Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis.** Journal of Ethnopharmacology. 113(2), 278-283, 2007

ALMEIDA, R.; MANRIQUE, A.J.; SOARES, A.E.E. **Seleção e melhoramento genético para aumentar a produção de mel e própolis.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, Florianópolis, 2000.

AMOROS, M.; SIMÕES C.M.O; GIRRE L.; SAUVAGER F.; CORMIER M. **Synergistic effect of flavones and flavonols against Herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis.** J. Nat. Prod. ed. 55, 1732-170, 1992.

APACAME, Associação Paulista de Apicultores Criadores de Abelhas Melificas Europeias. **A Própolis de Solução Aquosa.** Palestra Dr.Ikukatsu Suzuki, 26 de Julho 2000. Disponível em <<http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/58/palestra.htm>>, acessada em 20 de março de 2013.

APACAME, Associação Paulista de Apicultores Criadores de Abelhas Melíferas Europeias. **Preparo do extrato de própolis legal** . Artigo Etelvina Conceição Almeida da Silva. Disponível em <<http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/70/artigo2.htm>>. Acessado em 20 de outubro de 2014.

AMA, Associação dos Municípios Alagoanos. **O mundo de olho na própolis vermelha de Alagoas**. Disponível em <<http://portal.cnm.org.br/ama-al/constitucional/noticia.asp?ild=114311>>. Acessado em 07 de novembro de 2013.

BAN, J.,POPOVIC, S.,MAYSINGER, D. **Cytostatic effects of propolis in vitro**.Acta Pharm.Jugosl.,v.33,p.245-255,1983.

BANKOVA, V. **Chemical diversity of propolis and the problem of standardization**. Journal of Ethnopharmacology, v.100, p.114-117, 2005.

BANKOVA, V. **Recent trends and important developments in propolis research**. e CAM 2: 29-32, 2005b.

BANKOVA, V.; KRASTEVA, G.B.; SFORCIN, J.M.; FRETE, X.; KUJUMGIEEV, A.; RODELLA, R.M.; POPOV, S. **Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from São Paulo State**. Z Naturforsch 54c: 401-405, 1999.

BANKOVA, V.S.; CASTRO, S.L.; MARCUCCI, M.C. **Propolis: recent advances in chemistry and plant origin**. Apidologie, v.31, p.3-15, 2000.

BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; ADNYANA, I.K.; ISHII, E.; MIDORIKAWA, K.; MATSUSHIGE, K.; KADOTA, S. **Hepatoprotective and anti-Helicobacter pylori activities of constituents from Brazilian propolis**. Phytomedicine, v.8, p.16-23, 2001.

BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; P RASAIN, J.K.; M ATSUSHIGE, K.;SAIKI, I.; KADOTA, S. **Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activity**. Journal of Natural Products, v.61, p.896-900, 1998.

BASTOS, E.M.A.F . **Indicadores de la calidad y del origen botánico del propóleo producido por abejas Apis mellifera en áreas del cerrado del Estado de Minas Gerais.** In: VI Congresso Ibero-Americano de Apicultura. Mérida, México, 1998.

BASTOS, E.M.A.F.; OLIVEIRA, V.D.C.; SOARES, A.E.E. **Microscopic characterization of the green propolis, produced in Minas Gerais State, Brazil.** Honeybee Sci 21: 179-180, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 42, de 20 de outubro de 2000. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel.** Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/sda/dipoa/anexo>>. Acesso em: 2 de outubro 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel.** Disponível em: <<http://www.sfdk.com.br/imagens/lei/MA%20-%20Inst%20Norm%2011.htm> . >. Acesso em: 17 de janeiro de 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa nº3, Aprova os regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis, conforme consta dos Anexos desta Instrução Normativa, 19 de janeiro de 2001.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 42 de 05 de julho de 2002.** Disponível em: <<http://www.cda.sp.gov.br/www/legislacoes/popup.php?action=view&idleg=325>>. Acesso em: 15 de julho 2013.

BREYER, H. **Própolis: produção com Apis mellifera L.** In: XI CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 5, , Teresina, 1996.

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

CABRAL, I.S.R.; OLDONI, T. L. C.; PRADO, A.; BEZERRA, R.M.N.; ALENCAR, S.M. **Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira.** Química Nova. XY(00), 1-5, 2009.

CAPASSO, F.,CASTALDO, S. **Propolis, an old remedy used in modern medicine.** Fitoterapia 73: S1-6, 2002.

CASTRO, S. L., Propolis:biologycal and pharmacological activities. Therapeutic uses of this bee-product. **Annual Review of Biomedical Science**, v.3, p. 48-93, 2001.

COUTO, R.H.N. & COUTO, L.A. **Apicultura: Manejo e produtos. 2. ed. Jaboticabal:** FUNEP, 191 p., 2002.

CULLINEY, T.W. **Origem and evolutionary history of the honeybees Apis.** Bee World 64:29-37.1983.

DAUGSCH,Andreas. **A própolis vermelha do nordeste do Brasil e suas características químicas e biológicas.**133 f.Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

DAUGSCH, A., MORAES, C.S., FORT, P., PACHECO, E.,LIMA, I.B., ABREU J.A., PARK, Y.K. **Própolis Vermelha e sua origem botânica, Mensagem Doce**, 2006, nº 89, disponível em: <http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/89/msg89.htm>, acessada em junho 2008.

DEBIAGGI, M. et al. **Effect of propolis flavonoids on virus infectivity and replication.** Microbiologia, v.13, p.207-213, 1990.

DIÁRIO DO COMÉRCIO, 24 de Junho de 2013. **Produção de mel em Nova Lima avança.** Disponível em <<http://issuu.com/diariodocomercio/docs/22418>> Acessado em 16/09/2014.

DONNELLY, D.M.X.; KEENAN, P.J.; PRENDERGAST, J.P. **Isoflavonoids of Dalbergia ecastophyllum.** Phytochemistry 12: 1157-1161, 1973.

DRAGANOVA, L. et al. **In vitro and in vivo studies of drugs on the basis of propolis for local application.** In: 33rd International Congress of Apiculture Rio de Janeiro, Brazil. Apimondia, Bucharest, Romania, 221, 1989.

FOUNDATION OF JAPANESE FOOD ANALYSIS CENTER, No 398040072-001 52-1, Yoyogi-Machi, Shibuya-Ku, Tokyo, Japan. 1980.

GHISALBERTI, E.L. **Propolis: a review.** Bee World, v60, n.2, p.59-84, 1979.

GÓMEZ-CARAVACA, A. M.; GÓMEZ-ROMERO, M.; ARRÁEZ-ROMÁN, D. et al. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. **Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 41:1220-34, 2006.

GONÇALVES, L.S. **Africanização das abelhas nas Américas, impactos e perspectivas de aproveitamento do material genético.** In: ENCONTRO BRASILEIRO DE ABELHAS E OUTROS INSETOS SOCIAIS. HOMENAGEM AOS 70 ANOS DE WARWICK ESTEVAM KERR, p.126-134, 1992.

GONÇALVES, L.S. **TRINTA ANOS APÓS A INTRODUÇÃO DAS ABELHAS AFRICANAS NO BRASIL.** In: Anais do VII Congresso Brasileiro de Apicultura. Confederação Brasileira de Apicultura, 1986.

GRUNBERGER, D.; BANERJEE, R.; EISINGER, K.; OLTZ, E.M.; EFROS, L.; CALDWELL, M.; ESTEVEZ, V.; NAKANISHI, K. **Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis.** Experientia 44, 230-232, 1988.

HAVSTEEN, B. **Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency.** Biochemical Pharmacology, v. 32, p. 1141-1148, 1983.

HAVSTEEN, B. H. **The biochemistry and medical significance of the flavonoids.** Pharmacology & Therapeutics, v. 96, p. 67-202, 2002.

HERNANDEZ, N.M.R.;BERNAL, K.C. **Efecto antibiotico del propoleo frente a cepas de Staphylococcus aureus de origem clinico humano.** VER.Cub. Fram.,v.24,n.1,p.45-50,1990.

HOLDEMA, E.,KEDZIA, B. **Investigations upon the combined action of propolis and antimycotic drugs on Candida albicans.** Herba Pol., v. 33, n.2,p.145-151,1987.

INOUE, H.T.; SOUSA, E.A.; ORSI, R. O.; FUNARI, S.R.C.; BARRETO, L.M.R.C.; DIB, A.P.S. **Produção de própolis por diferentes métodos de coleta.** Asociación Latinoamericana de Producción Animal. 15 (2), 65-69, 2007.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas: métodos químicos e físicos para análises de alimentos.** 3.ed. São Paulo, v.1, 533p, 1985.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas: métodos químicos e físicos para análises de alimentos.** 4.ed. São Paulo, 2005.

ITAGIBA, M.G.O.R. et al. **Estudo da produção de própolis em colônias de abelhas africanizadas.** In: ENCONTRO SOBRE ABELHAS, 2., 1994, Ribeirão Preto. Anais... Ribeirão Preto: p. 272, 1994.

JIN, U.; CHUNG, T.; KANG, S.; SUH, S.; KIM, J.; CHUNG, K.; GU, Y.; SUZUKI, I.; KIM, C. **Caffeic acid phenyl ester in propolis is a strong inhibitor of matrix metalloproteinase-9 and invasion inhibitor: isolation and identification.** Clin. Chim. Acta 362, 57–64, 2005.

KABANOV, A.N; SUVOROV, A.M.;LESNYKH, F.;KONONOV, A.V.; LOPUSHANSKI, V.G. **Endoscopic treatment of duodenal ulcers with proposal.** Sov. Med., v.6, p.92-94,1989.

KAMINSKI, A.C; ABSY, M.L. **Bees visitors of three species of Clusia (Clusiaceae) flowers in Central Amazonia.** Acta Amazonica 36: 259-264, 2006.

KEDZIA, A. **Sensitivity of anaerobic bacteria to the ethanol extract of propolis.** Phytoterapie, v.6,p.4-6,1990.

KERR, W. E. **Biologia geral, comportamento e genética de abelhas**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 5 e CONGRESSO LATINO-IBERO-AMERICANO DE APICULTURA, 3., 1984, Viçosa-MG. Anais... Viçosa: UFV, p. 109-116,1984.

KIMOTO, T.; ARAI, S.; KOHGUCHI, M. **Apoptosis and suppression of tumor growth by artemisinin C extracted from Brazilian propolis**. Cancer Detection and Prevention, v.22, p.506-515, 1998.

KOO, M. H. E PARK, Y. K. **Investigation of flavonoid aglycones in propolis collected by two different varieties of bees in the same region**. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, v. 61, p. 367-369, 1997.

KROL, W.,SCHELLER, S.,SHANI, J.;PITSZ, G.,CZUBA, Z. **Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on the growth of Staphylococcus aureus**. Arzneim. Forsch. Drug Res., v.43,n.5,p.607-609,1993.

KUJUMGIEV, A., TSVETKOVA, I., SERKEDJIEVA, Y., BANKOVA, V., CHRISTOV, R. E POPOV, S. **Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin**. Journal of Ethnopharmacology, v. 64, p. 235-240, 1999.

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

LIMA, M.G. **A produção de própolis no Brasil**. São João da Boa Vista: São Sebastião Editora e Gráfica, 2006.

LINDENFELSER, L.A. **Antimicrobial activity of propolis**, Am Bee J., v.107, n.3 p. 90-92,1967.

LONGHINI, R.; RAKSA, S.; OLIVEIRA, A.C.P.; SVIDZINSKI, T. I. E.; FRANCO, S. L. **Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica**. Revista Brasileira de Farmacognosia. João Pessoa, p. 388-395. July/Sept. 2007.

LOPEZ, A.M.Q, et al. “**Normas de produção da Própolis Vermelha de Alagoas**”, Mimeo, Documento enviado ao INPI para solicitação da Indicação Geográfica, modalidade Denominação de Origem - Mista, Maceió, 2011.

LUSTOSA, S.R.; GALINDO, A.B.; NUNES, L.C.C.; RANDAU, K.P.; ROLIM NETO, P.J. **Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia**. Rev Bras Farmacogn 18:447-454, 2008.

MALASPINA, O.; PALMA, M.S. The Brazilian Propolis: Types and Distribution. Honeybee Science, 19(2):68-72, 1998.

MALASPINA, O.; PALMA, M. S. (2000). **Própolis brasileira: controle de qualidade e legislação**. Congreso International de Propoleos. Argentina. Disponível em: </WWW.culturalapicola.com.ar>. Acesso em: novembro de 2006.

MATOS, F.J.A.; GOTTLIEB, O.R.; ANDRADE, C.H.S.. **Flavonoids from *D. ecastophyllum***. Phytochemistry 14: 825-826, 1975.

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

MARCUCCI, M.C. **Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da propólis**. Química Nova, 19(5): 529-536, 1996.

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

MARCUCCI, M.C., WOISKY, R.G.E; SALATINO, A. **Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis**. Mensagem doce, v. 46,p. 1998.

MATSUNO, T.; MATSUMOTO, Y.; SAITO, M.; MORIKAWA, J.; SAITO, M. **Antitumor benzopyran derivative of propolis**. *Chemical Abstracts*, v.127, p.39814j, 1997.

MITAMURA, T.; MATSUNO, T.; SAKAMOTO, S. **Effects of a new clerodane diterpenoid isolated from propolis on chemically induced skin tumours in mice.** Anticancer Research.v.16, p.2669-2672, 1996.

OLIVEIRA, V.D.C.; BASTOS, E.M. **Aspectos morfo-anatômicos da folha de Baccharis dracunculifolia DC. (Asteraceae) visando a identificação da origem botânica da própolis.** Acta Bot Bras 12: 431-439, 1998.

ORSOLIC, N.; KOSALEC, I.; BASIC, I. **Synergistic antitumor effect of polyphenolic components of water soluble derivative of propolis against Ehrlich ascites tumour.** Biological and Pharmaceutical Bulletin, v.28, n.4, p.694-700, 2005.

PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M.; MOURA, F.F. **Evaluation of Brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity.** Honeybee Sci 21:85-90, 2000.

PACKER, J.F.; LUZ, M. M.S. **Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural.** Revista Brasileira de Farmacognosia, João Pessoa, n.1, p.102-107, mar. 2007.

PARK, Y.K., KOO, M.H., IKEGAKI, M.E; CONTADO, J. L. **Comparison of the flavonoid aglycone contents of Apis mellifera propolis from various regions of Brazil.** Arquivos de biologia e tecnologia, v. 40, p. 97-106, 1997.

PARK, Y.K.; ABREU, J.A.S.; IKEGABI, M.; CURY, J.A.E; ROSALEN, P.L. **Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms.** Current Microbiology, v. 36 (1), p. 24-29, 1998a.

PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.; AGUIAR, C.L. **Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis.** J Agr Food Chem 50: 2502-2506, 2002.

PARK, Y.K.; KOO, M.H.; SATO, H.H.; CONTADO, J.L. **Estudo de alguns componentes da própolis coletada por Apis mellifera no Brasil.** Arq. Biol. Tecnol., v.38, p.1253-1259, 1995.

PARK, Y.K.; KOO, M.H.; SATO, H.H.E; CONTADO, J.L. **Estudo de alguns componentes da própolis coletada por Apis mellifera no Brasil.** Arquivos de biologia e tecnologia, v. 38, p. 1253-1259, 1995.

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 Agr Food Chem 52: 1100-1103, 2004.

PARK, Y.K; KOO, M.H.; IKEGAKI, M.; CONTADO, J.L. **Comparison of the flavonoid aglycone contents of Apis mellifera propolis from various regions of Brazil.** Arq. Biol. Tecnol., v.40, p.97-106, 1997.

PARK, Y.P.; IKEGAKI, M.; ABREU, J.A.D.S.; ALCICI, N.M.F. **Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.18 (3), p. 1998b.

PEREIRA, A.D.S.; SEIXAS, F.R.M.S.; NETO, F.R.D.A. **Propolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras.** Quimica Nova, v. 25, p. 321-326, 2002.

ROCHA, L; SANTOS, LR; ARCENIO, F.; CARVALHO, E.S.; LÚCIO, E.; ARAÚJO, G.L.; TEIXEIRA, L.A; SHARAPIN, N. **Otimização do processo de extração de própolis através da verificação da atividade antimicrobiana.** Rev Bras Farmacogn 13: 71-74, 2003.

RODRIGUES, S.W.A.C.L., et al. **Análises de mel Apis mellifera L., 1758 e Tetragonisca Angustula (LATRELLE, 1811)** Editado em Piracicaba – SP. Revista de Agricultura, São Paulo, fasc, 3, vol. 73:254- 261, dez 1998.

SAWAYA, A.C.H.F.; CUNHA, I.B.S.; MARCUCCI, M.C.; OLIVEIRA-RODRIGUES, R.F.; EBERLIN, M. **Brazilian propolis of *Tetragonisca angustula* and *Apis mellifera*.** Apidologie 37: 398-407, 2006.

SCHELLER, S.; SZAFLARSKI, J.; TUSTANOWSKI, J.; NOLEWAJKA, E.; STOJKO, A. **ARZNEIM-FORSH Drug Resistance.** 27-889, 1977.

SERKEDJIEVA, J.; MANOLOVA, N.; Bankova, V. **Anti-influenza vírus effect of some própolis constituents and their analogues (esters of substituted cinnamic acids).** Journal of Natural Products v. 53, n. 3, p. 294-302, 1992;

SILVA, R.A.; RODRIGUES, A.E.; RIBEIRO, M.C.M.; CUSTÓDIO A. R.; ANDRADE, N.E.D.; PEREIRA, W.E. **Características físico-químicas e atividade microbiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil.** Ciência Rural, Santa Maria, v.36, n.6, p.1842-1848, 2006.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5° ed. ver. ampl. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004.

SOARES, A.E.E. **Captura de enxames com caixas iscas e sua importância no melhoramento de abelhas africanizadas.** IN: XVI Congresso Brasileiro de Apicultura, 2004, Natal. Anais... Natal: CBA, 2004.

SOARES, A.K.A.; CARMO, G.C.; QUENTAL, D.P.; NASCIMENTO, D.F.; BEZERRA, F.A.F.; MORAES, M.O.; MORAES, M.E.A. **Avaliação da segurança clínica de um fitoterápico contendo *Mikania glomerata*, *Grindelia robusta*, *Copaifera officinalis*, *Myroxylon toluifera*, *Nasturtium officinale*, própolis e mel em voluntários saudáveis.** Rev Bras Farmacogn 16: 447-454, 2006.

SUZUKI, I.; TAKAI, H.; KOIDE, M.; YSMAMOTO, H. **Anti tumoreffect of immunologically active fractions obtained from Brazilian propolis, given in combination with anticancer drug in Ehrlich carcinoma bearing mice.** Mitsubachi Kagaku, v.17, p.1-6, 1996.

TAKAI, H.; YAMAMOTO, H.; SUZUKI, I. **The effect against antitumor and recovery of leukopenia by combined use of water soluble propolis and antitumor drug (5-FU).** Igaku to Seibutsugaku, v.132, p.311-316, 1996.

TAVARES, J.P.; MARTINS, I.L.; VIEIRA, A.S.; LIMA, F.A.V.; BEZERRA, F.A.F.; MORAES, M.O.; MORAES, M.E.A. **Estudo de toxicologia clínica de um fototerápico a base de associações de plantas, mel e própolis.** Rev Bras Farmacogn 16: 350-356, 2006.

THOMSON, W. **Propolis.** Med. J. Aust. 153:65, 1990.

TORRES, D., HOLLANDS, I; PALACIOS, E. **Efecto de un extracto alcohólico de propoleos sobre el crecimiento de Giardia lamblia in vitro.** Rev. Cubana Cienc. Vet. 21-1, 1990.

VALDEZ, G.;ROJAS, N.M.;MORALES, C. **Ensayo preliminar de la accion antifúngica de extractos de propoleo sobre Candida albicans.** Cienc Tec Agric, Apicultura, v.3,p.41-49,1987.

WENG, M.S.; HO, Y.S.; LIN, J.K. **Chrysin induces G1 phase cellcycle arrest in C6 glioma cells through inducing p21Waf1/Cip1 expression: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase.** Biochemical Pharmacology, v.69, n.12, p.1815-1827, 2005.

WEYANT, M.J.; CAROTHERS, A.M.; BERTAGNOLLI, M.E.; BERTAGNOLLI, M.M. **Colon cancer chemo preventive drugs modulate integrin-mediated signaling pathways.** Clinical Cancer Research, v.6, p.949-956, 2000.

WISNTON, M.L. **A biologia da abelha.** Livraria e Editora Magister. Porto Alegre – RS.276 p. 2003.