

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DE ALIMENTOS**

**AVALIAÇÃO DE ALGUMAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E
BIOLÓGICAS DAS PRÓPOLIS PRODUZIDAS NO PERÚ.**

Julio Florencio Paredes Guzmán

Prof. Dr. Yong Kun Park

Orientador

**Tese apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas,
para a obtenção do título de Doutor em
Ciência de Alimentos.**

Campinas – São Paulo

2005

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

P214a Paredes Guzmán, Julio Florencio
Avaliação de algumas propriedades físico-químicas e
biológicas das própolis produzidas no Perú / Julio Florencio
Paredes Guzmán. – Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientador: Yong Kun Park
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Propole. 2.Alimentos - Composição. 3.Classificação.
I.Park, Yong Kun. II.Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA

Tese defendida e aprovada em de de 2005, pela banca
examinadora constituída pelos professores:

Prof. Dr. Yong Kun Park
Orientador

Prof. Dr. Severino Matias de Alencar
Membro

Prof. Dr. Marcelo Alexandre Prado
Membro

Profa. Dra. Márcia Nitschke

Membro

Prof. Dr. Rodrigo Ramos Catharino
Membro

Prof. Dr. Fred Yukio Fujiwara
Membro

Prof. Dr. Osmar Malaspina
Membro

A DEUS

Que me concedeu o Don da vida,
Que esta presente em todos momentos, y
Que em momentos de desanimo me mostro o melhor caminho a seguir.

A meus pais: Florencio e Amada

Que são minha fonte de incentivo, sempre me apoiando.
Acreditando em mim em todos os momentos de minha vida
Muito obrigado pelo amor que me deram e dão, pela confiança e amizade.

A minha familia

Andréa, Gerson e Benjamin por sempre acreditarem em mim.

Aos meus irmãos

Modesto, Matilde e Rocio pelo seu apoio, companheirismo e compreensão

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Yong K. Park pela oportunidade proporcionada para realização deste trabalho.

Aos professores da banca examinadora pela contribuição dada ao meu trabalho.

À Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy do Laboratório de Análise de Alimentos pelo seu apoio e incentivo durante todo o doutorado.

Aos apicultores peruanos, que gentilmente colaboraram na etapa de coleta do material.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica pela amizade e convívio durante o doutorado, em especial a Gisele Nobre, Luciana Fleury, Vânia, Fernanda, Haroldo, Cláudio, Cristina Lui, Milene e Alice.

Aos técnicos Dora, Bia e Guilherme do Laboratório de Bioquímica de Alimentos

A Carla técnica do Laboratório de Química Geral.

Ao pessoal da Secretaria do Departamento de Ciência de Alimentos.

À CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) programa PEC/PG pela concessão da bolsa de estudo e auxílio financeiro para a execução do presente trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho.

INDICE

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE QUADROS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
3.1. Própolis	6
3.2. Composição química da própolis	7
3.3. Propriedades biológicas da própolis	10
3.3.1. <i>Atividade antimicrobiana</i>	10
3.3.2. <i>Atividade antioxidante</i>	14
3.3.3. <i>Atividade antiinflamatória</i>	17
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
4.1. MATERIAL	18
4.1.1. Própolis	18
4.1.1.1. Coleta da amostra de própolis	18
4.1.1.2. Tratamento das amostras de própolis bruta	18
4.1.1.3. Preparo do extrato etanólico de própolis (EEP)	20
4.2. MÉTODOS	21
4.2.1. Análise físico-química dos extratos etanólicos de própolis	21
4.2.1.1. Determinação de flavonóides totais.....	21
4.2.1.2. Determinação de fenólicos totais.....	22
4.2.1.3. Espectrofotometria na região ultravioleta-vísivel.....	24
4.2.1.4. Cromatografia em camada delgada de alta eficiência em fase reversa	24
4.2.1.5. Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR)	24
4.2.1.6. Ionização por eletrospray (IES) acoplado a espectrometria de massas (EM)	25
4.2.2. Análise biológica dos extratos etanólicos de própolis.....	26

4.2.2.1. Atividade antimicrobiana dos extratos alcoólicos de própolis contra bactérias.....	26
4.2.2.2. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos etanólicos de própolis contra bactérias.....	27
4.2.2.3. Determinação da concentração bactericida mínima (CBM) dos extratos etanólicos de própolis contra bactérias.....	28
4.2.2.4. Atividade seqüestrante de radicais 1,1-difenil-2-picrilidrazil pelos extratos etanólicos de própolis.....	29
4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1. Análise físico-química do extrato etanólico de própolis	31
5.1.1. Preparação dos extratos etanólicos de própolis.....	31
5.1.2. Espectrofotometria na região ultravioleta-vível.....	32
5.1.3. Cromatografia em camada delgada de alta eficiência em fase reversa	34
5.1.4. Determinação de flavonóides totais com base em Quercetina.....	35
5.1.5. Determinação de fenólicos totais.....	38
5.1.6. Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR)	39
5.1.7. Ionização por eletrospray acoplado a espectrometria de massas (IES-EM).....	44
5.2. Análise biológica dos extratos etanólicos de própolis.....	47
5.2.1. Atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos de própolis contra bactérias.....	47
5.2.2. Concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos etanólicos de própolis contra bactérias.....	50
5.2.3. Concentração bactericida mínima (CBM).....	52
5.2.4. Atividade seqüestrante de radicais 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) pelos extratos etanólicos de própolis.....	53
6. CONCLUSÕES.....	56
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Mapa do Perú com as cidades onde foram coletas as amostras de própolis.....	19
FIGURA 2: Formação do complexo Flavonóide-Al, em solução metanólica de cloreto de alumínio	22
FIGURA 3: Aparência dos extratos etanólicos das própolis do litoral peruano	32
FIGURA 4: Espectros de absorção na região UV-visível, dos extratos etanólicos de própolis.....	33
FIGURA 5: Cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE) dos extratos etanólicos de própolis	36
FIGURA 6: Mapa da América do Sul	40
FIGURA 7: Cromatogramas obtidos por CLAE-FR das própolis peruanas..	41
FIGURA 8: Mapa do Perú mostrando as cidades de onde foram coletas as amostras para o presente estudo.	44
FIGURA 9: Espectro de massas IES(-) dos extratos etanólicos de própolis do Perú.	45
FIGURA 10: Atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos de própolis do Perú.....	49
FIGURA 11: Atividade seqüestrante de radicais DPPH pelos extratos alcoólicos de própolis.....	54

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Cor e teor de substancias solúveis dos EEP do Perú	32
TABELA 2: Teor de flavonóides totais com base em quercetina dos extratos etanólicos de própolis.....	35
TABELA 3: Teor de fenólicos totais com base em ácido gálico dos extratos etanólicos de própolis.....	38
TABELA 4: Atividade antimicrobiana das própolis peruanas.....	48
TABELA 5: Valores da concentração inibitória mínima (CIM) das própolis peruanas contra bactérias.....	51
TABELA 6: Valores da concentração bactericida mínima (CBM) das própolis peruanas contra bactérias.....	52
TABELA 7: Degradação do 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) pelos extratos etanólicos de amostras de própolis do Perú.....	54
TABELA 8: A atividade seqüestrante do radical livre DPPH das própolis peruanas.....	55

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1: Bandas de absorção de flavonóides e ácidos fenólicos em solução metanólica em presença de cloreto de alumínio (AlCl ₃).....	23
QUADRO 2: Teor de compostos fenólicos determinados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) nas própolis peruanas.	43
QUADRO 3: Compostos identificados em extratos etanólicos de própolis do Perú usando IES(-)-EM/EM.....	46

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar as propriedades físico-químicas, identificar e quantificar os compostos fenólicos presentes nas própolis do Perú produzidas por abelhas *Apis mellifera*. Os extratos etanólicos de própolis coletadas apresentaram uma coloração de amarelo claro a castanho escuro com um teor de substâncias solúveis que variam entre 56,21% a 67,35%. Por meio das análises por espectrofotometria na região UV-Visível e cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE) foi possível classificar as amostras de própolis em três grupos distintos. As amostras foram analisadas quanto ao teor de flavonóides totais e fenólicos apresentando diferenças significativas pelo teste “t” de student (probabilidade 5%). A amostra AQP apresentou o maior teor de flavonóides e fenólicos totais (28,62 mg/g e 100,26 mg/g, respectivamente), enquanto que a amostra PYO mostrou o menor valor (7,10mg/g e 62,39 mg/g, respectivamente). A análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) confirmou os mesmos compostos para as amostras LQE, PYO e PTA, sendo diferentes das amostras LIM e AQP. A espectrometria de massas revelou a presença do ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepillin C) em todas as amostras. O estudo da atividade antimicrobiana mostrou uma grande variação na inibição do crescimento dos microorganismos *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* e *Proteus mirabilis*, sendo a maior atividade observada na amostra LQE e a menor para a amostra LIM. A amostra LQE foi a que apresentou a menor concentração mínima inibitória (<25 µg/mL) para as bactérias *S. aureus* e *M. luteus*. Todas as amostras apresentam alta atividade seqüestradora de radicais livres. Esses resultados demonstraram uma grande variabilidade não somente quanto à composição química, mais também em relação às atividades biológicas.

ABSTRACT

The aim of this work was to analyse the physico-chemical properties, as well as, identify and quantify the phenolic compounds presented on the propolis collected by *Apis mellifera* in Perú. The ethanolic extract of propolis presented a variety from coloration of primrose to dark brown, with soluble substances that range between 56,21% to 67,35%. Using Ultraviolet-Visible Spectrophotometry and High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) was possible to classify the samples into three different kinds of propolis. The specimens were analysed as the total flavonoid and phenolic contents, showed significant differences at 5% of probability in the “t” student test. Sample LQE showing the greatest flavonoid and phenolic content (28,62 mg/g and 100,26 mg/g respectively) while sample PYO showed the lowest quantity (7,10 mg/g and 62,39 mg/g respectively). High Performance Liquid Chromatography (HPLC) detected the presence of the same compounds of the samples LQE, PYO, and PTA, but samples LIM and AQP were different. Mass Spectrometry identify the presence of 3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid (Artepillin C). The study of antibacterial activity demonstrated great variation of growth inhibition of the microorganisms *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, and *Proteus mirabilis* by the samples; the major potencial was observed in sample LQE and a weak activity in the sample LIM. Sample LQE showed the lowest minimal inhibition concentration (< 25 µg/mL) against *S. aureus* and *M. luteus*. All the samples presented high DPPH radical scavenging activity. The results demonstrated the great variety in chemical composition, and biological activity of the peruvian propolis samples analyzed.

1. INTRODUÇÃO

Um dos produtos naturais utilizados durante séculos pela humanidade tem sido a própolis, a qual é administrada sob diversas formas. Nas últimas décadas tem-se observado um interesse cada vez maior pelas medicinas alternativas e terapias naturais. Dentre elas, os produtos apícolas, como mel, própolis, geléia real e pólen, têm encontrado grande aceitação, originando assim, um novo ramo na medicina denominado Apiterapia.

Seu emprego já era descrito pelos assírios, gregos, romanos, incas e egípcios. No antigo Egito (1700 AC; “cera negra”) era utilizada como um dos materiais para embalsamar os mortos. A própolis foi reconhecida por suas propriedades medicinais pelos médicos gregos e romanos, Aristóteles, Dioscorides, Plínio e Galeno. A própolis foi empregada como um anti-séptico e cicatrizante em tratamento de ferimentos e como desinfetante bucal, uso perpetuado na idade média e entre médicos árabes. Também foi reconhecida por outros povos não relacionados a civilizações do velho mundo: os incas empregaram a própolis como um agente antipirético e, na farmacopéia de Londres do século XVII incluía a própolis como uma droga oficial. Entre os séculos XVII e XX a própolis se tornou muito popular na Europa devido as suas atividades antibacterianas (Castaldo & Capasso, 2002).

A própolis tem ganhado popularidade como alimento saudável em várias partes do mundo, incluindo Estados Unidos, Japão e a União Européia, onde é reconhecida como um produto que melhora a saúde humana e previne doenças tais como: inflamação, doenças do coração, diabetes e até mesmo câncer. Várias atividades biológicas como propriedades anticâncer, antioxidante, antiinflamatório, anti-séptico, antimicótico, bacteriostático,

adstringente, espasmolítico e anestésico tem sido atribuídas às própolis e seus constituintes (Marcucci, 1995; Burdock, 1998; Banskota *et al.*, 2001). Devido a esse efeito benéfico existe um renovado interesse na composição e atividades biológicas da própolis.

Própolis (CAS No. 9009-62-5) é o nome genérico de uma substância resinosa, de coloração e consistência variadas, coletada pelas abelhas das diversas partes da planta, como broto, botões florais e exsudados resinosos, que são misturados à cera (Koo & Park, 1996). O termo ‘própolis’ foi usado por autores na antiga Grécia: *pro* (por, em frente de, por exemplo, à entrada para) e *polis* (cidade ou comunidade), a substância que é por ou em defesa da cidade (no caso, da colméia). As abelhas aplicam própolis em uma capa fina sob as paredes internas das colméias sendo usado para selar rachaduras e buracos, reparar o favo, para reforçar os finos bordes do favo e para construir a entrada e assim ter uma defesa fácil. Também é usada como substância “embalsamente” para proteger a colméia de invasores que as abelhas tem matado mais não podem transportar para fora da colméia (Ghisalberti, 1979).

Apesar das possíveis diferenças na sua composição química (a coleta de própolis pelas abelhas usa resinas de diferentes fontes vegetais) as amostras de própolis são consideradas similares em toda sua natureza química. A própolis bruta está composta de 50% de resina (flavonóides e ácidos fenólicos relacionados considerados como uma fração de polifenóis), 30% de cera, 10% de óleos aromáticos e essenciais, 5% de pólen e 5% de por outros compostos orgânicos (Marcucci, 1995).

A composição química da própolis é muito complexa e 200 compostos já foram identificados em diferentes amostras de própolis, incluindo ácidos graxos e fenólicos e seus ésteres, ésteres fenólicos substituídos, flavonóides (flavonas, flavanonas, flavonois, dihidroflavonois, chalconas), terpenos, β -esteróides, álcoois e aldeídos aromáticos, sesquiterpenos, derivados do naftaleno e estilbeno (Greenaway *et al.*, 1990; Aga *et al.*, 1994; Bankova *et al.*, 1995; Marcucci, *et al.*, 1996). A composição química depende da ecologia vegetal de cada região, sendo que a quantidade e qualidade dos flavonóides dependem da variedade vegetal de onde a própolis é coletada além do tipo de abelha (Koo & Park, 1997). Devido às diferenças geográficas, amostras da Europa e China contém muitos tipos de flavonóides e ésteres de ácidos fenólicos (Bankova *et al.* 2000). Diferentemente, os maiores componentes das própolis brasileiras são terpenoides e derivados prenilados do ácido *p*-cumárico (Marcucci & Bankova, 1999).

No Brasil como em outros países tropicais, as própolis apresentam diferenças significantes em sua composição química pela grande biodiversidade vegetal. No Perú a própolis é usada de maneira caseira ou empírica sendo que a partir do ano de 2000 devido ao grande número de pesquisas ocorreu um certo interesse por fortalecer seu uso, mas mesmo assim, até hoje ainda não existem estudos da composição química e a origem botânica da própolis no Perú. A própolis peruana, pode ter uma origem botânica diferente do hemisfério norte devido ao fato que a flora peruana é única, principalmente por se encontrar entre a linha equatorial e o trópico de Capricórnio. Com um clima tropical e com chuvas abundantes, temperaturas altas e vegetação exuberante, têm estas características afetadas pela presença do sistema montanhoso dos Andes que o atravessa em sentido longitudinal, originando um clima diversificado e três regiões (Costa, Serra e Selva) (IGN,

1989), sendo ainda dividido por Pulgar-Vidal (1967) em oito regiões naturais, tendo o Oceano Pacífico banhando todo o litoral peruano.

Atualmente existem na literatura poucos trabalhos com relação às própolis do Perú. Midorikawa *et al.* (2001) não identificaram compostos diferentes na própolis peruana em comum com a própolis brasileira, já Banskota *et al.*, (2000) encontraram que a própolis peruana possui uma atividade seqüestrante fraca do radical livre DPPH, no entanto, Paredes-Guzmán *et al.* (2003) apresentaram um perfil cromatográfico de CLAE semelhante entre a própolis peruana e São Paulo, ressaltando a alta concentração do ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepillin C). Devido aos escassos trabalhos de pesquisa com as própolis peruanas existe concomitantemente uma desvalorização da mesma por parte dos apicultores devido ao desconhecimento de sua atividade biológica e composição química, bem como, também de seu potencial curativo. Sendo assim, este trabalho apresenta um estudo da composição química de diferentes amostras de própolis produzidas no Perú, bem como avaliar algumas de suas propriedades biológicas, auxiliando assim no conhecimento das potencialidades do produto.

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram: 1) Identificar e quantificar os compostos fenólicos presentes nas própolis coletadas do Perú e 2) Avaliar algumas propriedades biológicas como: atividade seqüestradora de radicais livres, atividade antimicrobiana, concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.

3.1. Própolis

Como definição, a própolis é uma substância resinosa que é coletada pelas abelhas melíferas de diferentes partes das plantas, como brotos, botões florais e exsudados resinosos. Esta resina de coloração e consistência variada é utilizada pelas abelhas para fechar pequenas frestas, embalsamar insetos mortos no interior da colméia e proteger contra o ataque de outros insetos e contra a proliferação de microorganismos, incluindo fungos e bactérias (Ghisalberti, 1979; Marcucci, 1995). A palavra própolis deriva do grego *pro-*, em defesa, e *polis-*, a cidade, significando, defesa da cidade (no caso, da colméia) (Burdock, 1998). Há evidências da utilização de própolis desde 300 A.C., como por exemplo, no Egito Antigo, onde era usada para embalsamar mortos, como medicamento e antisséptico. Na Itália, no século XVII, foi usada em vernizes, especialmente para violinos (Ghisalberti, 1979).

Dentre as substâncias biologicamente ativas presentes na própolis, os compostos fenólicos são os mais estudados. A maioria dos compostos fenólicos identificados pertence a dois grandes grupos: 1) fenilpropanóides (ácidos hidroxicinâmicos, flavonóides; lignanas, entre outros) e 2) terpenóides (mono, sesqui, di e triterpenóides), cuja composição varia de acordo com a flora da região estudada (Tomás-Barberán *et al.*, 1993; Bankova *et al.*, 1999), a variedade da abelha rainha (Koo & Park, 1997) e ainda, com a variação sazonal (Sforcin *et al.*, 2000). Diversos trabalhos já foram publicados ressaltando as propriedades biológicas desses compostos, principalmente, dos flavonóides das própolis européias, dos derivados do ácido cinâmico e dos terpenóides de própolis brasileiras. Entre os derivados do ácido

cinâmico um dos mais importantes e estudados tem sido o ácido 3,5-diprenil-hidroxicinâmico (comercialmente conhecido como Artepillin C) ao qual tem sido atribuídas inúmeras propriedades biológicas, com maior ênfase ao seu potencial antimicrobiano (Aga *et al.*, 1994) e a sua atividade antitumoral (Matsuno *et al.*, 1997; Kimoto *et al.*, 1998). Um outro grupo de compostos identificados em própolis e que já foi estudado devido a sua atividade citotóxica corresponde aos terpenóides (Matsuno, 1995; Rubio *et al.*, 1999). Um terceiro composto bastante citado devido a sua grande versatilidade de atividade biológica é o conhecido como CAPE (ácido caféico fenetil éster). Esse ácido já foi descrito por apresentar propriedades antivirais (Su *et al.*, 1994), antioxidantes (Ilhan *et al.*, 1999) e, principalmente, antitumorais (Chen *et al.*, 1996).

3.2. Composição química da própolis

A composição química da própolis é bastante complexa e variada, estando intimamente relacionada com a ecologia da flora de cada região visitada pelas abelhas. De modo geral, contém 50-60% de resinas e bálsamos, 30-40% de ceras, 5-10% de óleos essenciais, 5% de grãos de pólen, além de microelementos como alumínio, cálcio, estrôncio, ferro, cobre, manganês e pequenas quantidades de vitaminas B₁, B₂, B₆, C e E (Ghisalberti, 1979).

Na Europa, América do Norte e Oeste da Ásia, a fonte dominante de própolis é o exsudado do botão de álamo (*Populus* sp.) (Markham *et al.*, 1996; Wollenweber & Buchmann, 1997). Entretanto, na América do Sul a espécie vegetal do gênero *Populus* não é nativa, existindo uma grande diversidade vegetal para a retirada de resina, o que dificulta a correlação da própolis com a fonte produtora. A dependência geográfica e vegetal da

própolis é exemplificada nas análises de própolis da América do Sul, Europa, China, Egito, Turquia, Canadá e Espanha (König, 1985; Greenaway *et al.*, 1990; Garcia-Viguera *et al.*, 1992; Bonvehi & Coll, 1994; Christov *et al.*, 1998; Sorkun *et al.*, 2001; Park *et al.*, 1998; Park *et al.*, 2000b). A determinação da origem geográfica e, principalmente, a origem vegetal, aliada à fenologia da planta hospedeira, se faz importante no controle de qualidade e até mesmo na padronização das amostras de própolis para uma efetiva aplicação terapêutica. Koo & Park (1997) indicaram que a variedade de abelha tem a ver com a quantidade e qualidade da composição das própolis.

A própolis brasileira tem sido motivo de muitos estudos assim como a determinação da sua origem botânica. Muitos trabalhos já foram realizados com a caracterização da própolis nos estados de São Paulo, Paraná, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Bahia, Rio Grande do Sul e Santa Catarina (Bankova *et al.*, 1999; Kumazawa *et al.*, 2004; Marcucci *et al.*, 2000a; Tazawa *et al.*, 1998; Shimizu *et al.*, 2004; Boudourova-Krasteva *et al.*, 1997; Marcucci *et al.*, 1998a; Pereira *et al.*, 1999; Marcucci *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2002a; Pereira *et al.*, 2002a). Bankova *et al.* (1999) demonstraram que as espécies de *Baccharis* sp e *Araucaria* seriam as principais fontes de própolis no Estado de São Paulo. Park *et al.*, (2002a) e Park *et al.* (2002b) concluíram que a origem botânica das própolis G3 (Paraná), G6 (Bahia) e G12 (São Paulo) são as resinas da árvore de poplar, *Hyptis divaricata*, e *Baccharis dracunculifolia*, respectivamente. Posteriormente Kumazawa *et al.* (2003) também demonstraram com amostras do Estado de Minas Gerais que a origem vegetal da própolis brasileira é a espécie vegetal *Baccharis dracunculifolia* indicando a presença de Artepillin C nos extratos etanólicos da própolis e do *Baccharis dracunculifolia* por análise em CLAE. Posteriormente, Park *et al.* (2004) e Paredes-Guzmán *et al.* (2003) concluíram

que o *Baccharis dracunculifolia* é a principal fonte vegetal da própolis do Sudeste do Brasil.

Midorikawa *et al.* (2001) identificaram a presença de Artepillin C, ácido 4-hidroxi-3-prenilcinâmico, ácido *p*-cumárico e kamferide em amostras de própolis brasileira. Park *et al.* (2004) identificaram flavonóides e outros compostos fenólicos em extratos etanólicos de própolis (EEP) do Grupo 12 e exsudados resinosos de *Baccharis dracunculifolia*, tais como: ácido cumárico, ácido ferrúlico, ácido cinâmico, pinobanksina, kaemferol, isosakuranetina, crisina, acacetina, kaemferide e Artepillin C, estando presentes em maior quantidade Artepillin C (38,58 mg/g), Kaemferide (12,57 mg/g) e ácido cumárico (10,67 mg/g).

Dezoito diferentes compostos tem sido identificados e quantificados de diferentes amostras do Sul e Sudeste de Brasil, que incluem ácido cafeico e derivados, ácido *p*-cumárico e derivados, ácido ferúlico, pinobanksina, um derivado do kaemferol e cinco compostos fenólicos denominados: ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico (PHCA), 2,2-dimetil-6-carboxietil-2H-1-benzopirano (DCBEN), ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico e 6-propenoico-2,2-dimetil-8-prenil-2H-1-benzopirano (DPB) (Marcucci *et al.*, 2000a).

Obviamente, as diferenças na composição químicas das própolis promovem variação das suas propriedades biológicas e farmacológicas, exacerbando a necessidade de técnicas analíticas rápidas, simples e eficientes como apoio a estudos farmacológicos deste importante produto natural (Pereira *et al.*, 2000).

3.3. Propriedades biológicas da própolis

A própolis tem se destacado, tanto pelas suas diversas propriedades terapêuticas tais como atividade antimicrobiana, antiinflamatória, cicatrizante, anestésica (Ghisalberti *et al.*, 1979), anticariogênica (Koo *et al.*, 2000a) antitumoral (Frenkel *et al.*, 1993), citotóxica (Banskota *et al.*, 2000) e antiviral (Vynograd *et al.*, 2000); e como pela sua aplicabilidade nas indústrias de alimentos e cosméticos, sendo ingrediente em formulações de balas, chocolates, pasta de dente, xampus, creme para pele, entre outras (Matsuda, 1994).

3.3.1. Atividade antimicrobiana

A atividade antibacteriana da própolis é de grande importância para a comunidade das abelhas e independentemente da origem da própolis sempre possui atividade antibacteriana, especificamente contra bactérias Gram-positivas (Lindenfelser, 1967), isto devido a uma parte significativa dos constituintes das própolis, principalmente fenóis (flavonóides, ácidos fenólicos e seus ésteres presentes na resina) (Ghisalberti, 1979; Bankova *et al.*, 1995; Burdock, 1998), entretanto a relação entre a estrutura e atividade antibacteriana dos constituintes das própolis não é conhecida. Kedzia (1990) e Krol *et al.* (1993) reportaram que o mecanismo da atividade antimicrobiana é complexa e poderia estar atribuída ao sinergismo entre fenólicos e outros compostos da resina. No entanto, Aga *et al.* (1994) sugeriram que o Artepillin C é provavelmente um dos maiores compostos antimicrobianos nas própolis brasileiras, em comparação com a própolis européia, em que fenólicos como a pinocembrina, galangina e ésteres de ácidos fenólicos são os responsáveis pela atividade antibacteriana (Bankova *et al.*, 1996). Também foi confirmado que a própolis tem alta atividade antimicrobiana contra a bactéria *Staphylococcus aureus* 209 em

todos os extratos testados; assim como também Marcucci *et al.*, (2001), confirmaram as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus fecalis* (bactérias Gram-positivas) são suscetíveis ao Artepillin C, em contraste, a própolis é pouco ativa contra Gram-negativas como, por exemplo, *Escherichia coli*. Park *et al.* (1997), mostraram como própolis do sul e sudeste do Brasil inibiu o crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus* coagulase positiva, no entanto, não inibiu o crescimento da bactéria *Escherichia coli*. Mesmo assim, a classificação das própolis brasileiras feitas por Park, *et al.*, (2000a) foi demonstrado que nem todas as própolis têm a mesma atividade antimicrobiana contra os microorganismos patogênicos *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*.

Bankova *et al.* (1996) reportaram atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* de ácidos triterpenoicos de própolis brasileira, onde os ácidos comunico e imbricatoloico, como o metil éster isocupresico foram os compostos mais ativos contra *Staphylococcus aureus*. Miorin *et al.* (2003) também demonstraram que a própolis brasileira tem alta atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*.

Kartal *et al.* (2003) analisaram propolis de Kazan (Turquia) e acharam que os extratos etanólicos tinham atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. subtilis*, *C. diphtheriae*, *B. catarhalis* e *C. albicans*, no entanto, isolaram dois compostos, o 3,3-dimetilalil cafeato e o isopent-3-enil cafeato os quais apresentaram maior atividade antimicrobiana contra os mesmos microorganismos. A composição da própolis de Kazan esta diretamente relacionada a exsudados de brotos de *Populus* sp e seus híbridos ao redor de Kazan.

Aga *et al.*, (1994) avaliaram a atividade antimicrobiana do ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepillin C) comparando com o ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico e ácido 4-hidroxicinâmico e concluíram que a atividade antimicrobiana desta classe de compostos pode ser incrementada pelo número de resíduos prenilados ligados, portanto, estes derivados prenilados do ácido cinâmico e ácidos diterpênicos presentes em própolis brasileiras podem contribuir para a atividade antibacteriana destas própolis.

Koo *et al.* (2000a) sugeriram que a própolis pode prevenir as cáries dentárias e doenças periodontológicas, por ter demonstrado atividade antimicrobiana significativa contra microorganismos envolvidos em tais doenças e especialmente inibição da formação da placa dental *in vitro*. Koo *et al.* (2000b) reportaram uma nova variedade de própolis brasileira com um perfil químico diferenciado; pois não foram detectados nem flavonoides nem ácido *p*-cumárico (dois compostos comuns em própolis); em extratos etanólicos do Estado de Bahia (Nordeste de Brasil). O produto apresentou nove picos não identificados com tempos de retenção altos (entre 90 e 105 minutos), correspondentes a compostos pouco polares que foram identificados por CLAE-FR. Esse perfil foi similar a um tipo de própolis da Venezuela, que é caracterizado por ter benzofenonas poliprenilados, que tem ação contra o crescimento do *Streptococcus mutans* e inibem da atividade glicosiltransferase causadora da formação da placa dentária e de prevalência de cáries dental.

Os resultados apresentados por Kujumgiev *et al.* (1999) provaram que apesar das grandes diferenças na composição química da própolis de diferentes regiões geográficas, todas as amostras exibiram atividade antibacteriana e antifúngica. A atividade antimicrobiana de própolis coletadas de alguns países europeus contra *Staphylococcus*

aureus; *Escherichia coli* e *Candida albicans*, realizado por Hegazi *et al.*, (2000) apresentaram inibição do crescimento em todos os microorganismos patogênicos testados, mas a inibição variou de acordo com a origem da própolis. Park *et al.* (2000a) apresentaram diferentes comportamentos dos extratos etanólicos das própolis dos 12 grupos brasileiros contra os microorganismos patogênicos *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*, indicando a própolis do estado de Bahia como a mais potente como agente antimicrobiano.

A atividade antimicrobiana da própolis contra bactérias periodontopatogênicas (ATCC) foi investigada por Gebara *et al.* (2002) através de testes “*in vitro*” contra cepas bacterianas como: *Prevotella intermédia*, *Prevotella melaninogenica*, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Capnocytophaga gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum*, também microorganismos superinfectantes, como: *Cândida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (tipo selvagem), concluindo que todos os patógenos periodontais e microorganismos superinfectantes foram sensíveis ao extrato de própolis testado.

Extratos etanólicos de própolis, e extratos aquosos de própolis foram testados por Bianchini & Bedendo (1998) para se avaliar o efeito antibiótico do extrato aquoso de própolis, em várias concentrações. Os autores encontraram que as bactérias fitopatogênicas que foram completamente inibidas em meio de cultura contendo 10% de extrato de própolis foram *Agrobacterium tumefaciens*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, enquanto *Erwinia chrysanthemi* foi parcialmente inibida, já a *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* se mostrou insensível ao extrato, desenvolvendo colônias idênticas às aquelas observadas em meios livres de própolis. Além

disto, o fato de não ocorrer contaminantes nos meios onde o extrato não esterilizado foi adicionado ao meio, demonstrou que, provavelmente, a própolis poderia ter ação inibitória contra outros tipos de organismos, como fungos, por exemplo.

Santos *et al.* (2002), usaram própolis para avaliar a atividade inibitória contra bactérias causantes de periodontitis, sendo que *Peptostreptococcus anaerobius* ATCC 27337, *Porphyromonas gengivalis* ATCC33277, *Prevotella intermedia* ATCC 25611 as mais sensíveis para os extratos etanólicos de própolis. Nesse trabalho foram obtidas frações as quais também foram testadas contra as mesmas bactérias. Entretanto nenhuma fração foi mais ativa que os extratos etanólicos, sugerindo que a atividade antibacteriana é provavelmente causada pelo efeito sinérgico dos diferentes compostos, resultados corroborados previamente por Marcucci (1995).

Sforcin *et al.* (2000) verificaram que o *Staphylococcus aureus* é susceptível a baixas concentrações de própolis, por outro lado o crescimento de bactérias gram-negativas foi inibido somente em altas concentrações de própolis; os resultados foram semelhantes aos obtidos por Grange & Davey (1990) que observaram uma marcada ação das própolis contra bactérias gram-positivas e limitada atividade contra bactérias gram-negativas.

3.3.2. Atividade antioxidante

Existem evidências consideráveis de que os radicais livres induzem danos oxidativos às biomoléculas. Esses danos causam aterosclerose, anginas, câncer, hepatite, inflamação e muitas outras doenças crônicas. Os antioxidantes, que sequestram radicais

livres, são conhecidos por possuir um rol importante na prevenção dessas doenças induzidas pelos radicais livres (Elliott & Chase, 1991; Yamaguchi *et al.*, 1998). Os antioxidantes são compostos considerados capazes de retardar ou prevenir os processos de oxidação. De acordo com seu modo de ação, podem ser classificados como: seqüestradores de radicais livres, quelantes de íons metálicos que catalisam a oxidação dos lipídeos, ou seqüestradores de oxigênio. Os compostos polifenóis incluem-se principalmente na categoria de seqüestradores de radicais livres, embora também possam ter ação antioxidante através de outros mecanismos. A quercetina é um flavonóide que reúne as características de composto antioxidante natural mais potente (Sánchez-Moreno, 2002).

No entanto, existem poucos estudos avaliando as atividades antioxidantes das própolis de diferentes origens geográficas. Yamauchi *et al.* (1992) compararam as própolis do Japão, China, Brasil e Estados Unidos contra a inibição da auto-oxidação do metil linoelato e o benzil cafeato isolado, compostos antioxidantes das própolis coletadas na China. Banskota *et al.* (2000) relataram que extratos aquosos de própolis do Brasil e China possuem atividade seqüestradora de radicais livres contra o 1,1-difenil-2-picrilhidrasil (DPPH) maior que o correspondente extrato metanólico, enquanto extratos metanólicos de própolis da Suécia e Perú exibiram forte atividade seqüestradora de radicais livres contra o DPPH. Moreno *et al.* (2000) mostraram que as própolis da Argentina possuem atividade seqüestradora contra DPPH o que justifica seu uso como uma fonte natural de antioxidantes. Estudos realizados por Park *et al.* (2000a) mostraram que todos os grupos de própolis analisados apresentam atividade antioxidante acima de 80%, exceto o Grupo 10 (Ceará) que apresentou atividade menor que 80% e o Grupo 9 (Pernambuco) que não

apresentou atividade antioxidante, todos eles analisados pelo método da oxidação acoplada do β -caroteno e do ácido linoléico.

Hayashi *et al.* (1999), reportaram derivados do ácido cinâmico de extratos etanólicos de própolis brasileiras são potentes antioxidantes. Assim os extratos metanólicos podem também possuir atividade sequestrante do DPPH radical livre devido a presença de flavonóides e derivados do ácido cinâmico (Banskota *et al.*, 1998; Hayashi *et al.*, 1999). Shimizu *et al.* (2004) indicaram que o Artepillin C presente na própolis brasileira procedente de Minas Gerais foi um antioxidante biodisponível e que poderia ser usado em quimioprevenção de doenças degenerativas. Nakanishi *et al.* (2003) demonstraram a eficiente capacidade sequestrante de radicais do Artepillin C, que é uns dos maiores componentes das própolis brasileiras segundo Aga *et al.* (1994).

Basnet *et al.* (1997) determinaram o efeito de extrato aquoso, extrato metanólico e extrato clorofórmico de própolis sobre o radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH). Ao autores verificaram que o extrato aquoso de própolis apresentou atividade sequestrante do radical livre superior aos extratos metanólico e de clorofórmio com valores de 62, 50 e 42% respectivamente, a uma concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$. Também nesse mesmo trabalho o ácido 3-[4-hidroxi-3-(3-oxo-but-1-enil)-fenil]-acrílico (propol) composto isolado da própolis brasileira apresentou atividade sequestrante do radical livre mais potente quando comparado com a vitamina C, vitamina E, e ácido cafeico.

Astudillo *et al.* (2000) isolaram e identificaram, em amostra de própolis produzida nos Andes orientais da região do Maule (Chile), seis flavonoides. Os componentes ativos

majoritários na amostra, foram a 5,7-dihidroxi-flavona, 3,5,7-trihidroxi-flavona e 5,7-dihidroxi-flavanona, os que apresentaram maior efeito seqüestrador de radicais livres.

3.3.3. Atividade antiinflamatória

Muitos estudos têm demonstrado que a própolis pode agir como potente agente antiinflamatório contra inflamação aguda e crônica. Similarmente, a galangina e o éster fenetil do ácido caféico, compostos identificados como componentes majoritários da própolis, demonstrou inibição do desenvolvimento da inflamação induzida por uma ampla variedade de agentes patogênicos (Borrelli *et al.*, 2002). Park *et al.* (2000a) fizeram um estudo da atividade antiinflamatória das própolis brasileiras e encontraram que os Grupos 3, 5 e 6 (Paraná), 7 (Bahia), 8 (Pernambuco) e 12 (São Paulo) apresentaram alta atividade quando comparadas com os Grupos 1 e 2 (Rio Grande do Sul), 4 (Paraná), 9 (Pernambuco), 10 (Ceará), e 11 (Piauí). Algumas própolis do Brasil e China foram estudadas e demonstraram possuir efeito antiinflamatório, sendo que os extratos etanólicos se apresentaram mais potentes que os extratos aquosos, Além disso, foi demonstrado que o método enzimático, utilizando como medida da atividade de hialuronidase, foi superior ao método físico-químico (Miyataka *et al.*, 1997).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1. Própolis

4.1.1.1. Coleta da amostra de própolis

Foram coletadas vinte e sete amostras de própolis em localidades do litoral norte, centro e sul do Perú, nas cidades de Tumbes, Piura, Lambayeque, Pacasmayo, Pativilca, Lima, Huancayo, Huanta, Apurimac, Quillabamba, Arequipa, Moquegua e Tacna. A localização geográfica das cidades onde foram coletadas as amostras pode ser visualizado na figura 1.

O material foi coletado dos apiários pelo sistema de coleta de própolis por raspagem. Assim o material coletado foi acondicionado em sacos plásticos devidamente etiquetados e armazenados em refrigerador (4 °C), até o momento das análises.

4.1.1.2. Tratamento das amostras de própolis bruta

As amostras de própolis bruta foram limpas retirando-se a poeira, pedaços de madeira, traças e qualquer outro tipo de material estranho. Em seguida foram trituradas, peneirada em peneiras de 18 “mesh”, homogeneizadas, pesadas e armazenadas, a 4 °C.



FIGURA 1: Mapa do Perú com as cidades onde foram coletas as amostras de própolis

4.1.1.3. Preparo do extrato etanólico de própolis (EEP)

Os extratos etanólicos de própolis (EEP) foram preparados com pequenas variações no método descrito por Alencar (2002) e Park *et al.* (1998). Amostras de 14,0 gramas de própolis trituradas foram colocados em um Erlenmeyer de 250 mL, e a extração foi feita com 175 mL de metanol absoluto Merck P.A. em banho-maria a 70 °C, por 30 minutos, sob agitação constante. Em seguida as amostras foram colocadas em tubos de centrifuga de 250mL e centrifugadas a 7000 x g por 10 minutos a 5 °C, em centrífuga Beckman J2-21. Após isso, os sobrenadantes obtidos foram coletados em balão de 250 mL, e concentrados para eliminação do metanol em rota-evaporador a 50 °C, para obtenção dos extratos secos de própolis. O extrato etanólico de própolis (EEP) foi preparado pela pesagem de 540 mg do extrato seco em 18 mL de Etanol (96 %), correspondendo assim a uma concentração de 3 % (p/v). Os EEP foram armazenados em tubos de vidro (15 x 150 mm) com tampa de rosca, recobertos com uma camada de papel alumínio e armazenados a 5 °C, até o momento das análises.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Análise físico-química dos extratos etanólicos de própolis

4.2.1.1. Determinação de flavonóides totais

A determinação de flavonóides totais foi realizada pelo método colorimétrico do cloreto de alumínio com algumas modificações ao procedimento proposto por Chang *et al.* (2002). A reação colorimétrica foi feita pela mistura de 0,5 mL do EEP (1:20, v/v), preparado de acordo com o item 4.1.1.3, 1,5 mL de etanol 96 %, 0,1 mL de cloreto de alumínio (10 %), 0,1 mL de acetato de potássio 1 mol/L e 2,8 mL de água destilada. No tubo branco não foi adicionado o EEP adicionado-se etanol 96 % no lugar. Ao final de 30 minutos de reação, as absorbâncias das amostras foram medidas em um espectrofotômetro Beckman Coulter modelo DU 640, a 434 nm. A concentração de flavonóides totais foi determinada utilizando o método de padronização externa, sendo construída uma curva com diferentes concentrações de quercetina (12,5 a 200 µg/mL), diluídas em metanol absoluto (Merck Co.).

O princípio do método colorimétrico do Cloreto de Alumínio (AlCl_3) baseia-se na formação de complexos ácidos estáveis com o grupo ceto do C-4 e o grupo hidroxil do C-3 ou C-5 de flavonas e flavonois. Além disso, o AlCl_3 forma complexos sensíveis com grupos ortohidroxil no anel B, C-3' e C-4' dos flavonóides (Marby *et al.* 1970; Markham, 1982).

Pela formação destes complexos, a análise espectrofotométrica ocorre um desvio para comprimentos de onda maiores e uma intensificação da absorção. Dessa maneira, é possível determinar a quantidade de flavonóides, evitando-se a interferência de outras substâncias fenólicas, principalmente os ácidos fenólicos, que invariavelmente acompanham os flavonóides nos tecidos vegetais e nos extratos de própolis. A leitura é feita em espectrofotômetro a 425 nm, utilizando-se cloreto de alumínio a 5 % em metanol (Woisky & Salatino, 1998). Nessas condições, o complexo flavonoide-Al (Figura 2) absorve em comprimento de onda bem maior do que o flavonóide sem a presença do agente complexante (Quadro 1). Os ácidos fenólicos, mesmo os que formam complexos com AlCl_3 , absorvem em comprimentos de onda muito inferiores (Quadro 1), evitando-se dessa maneira interferências nas medidas de absorbância (Marcucci *et al.*, 1998b).

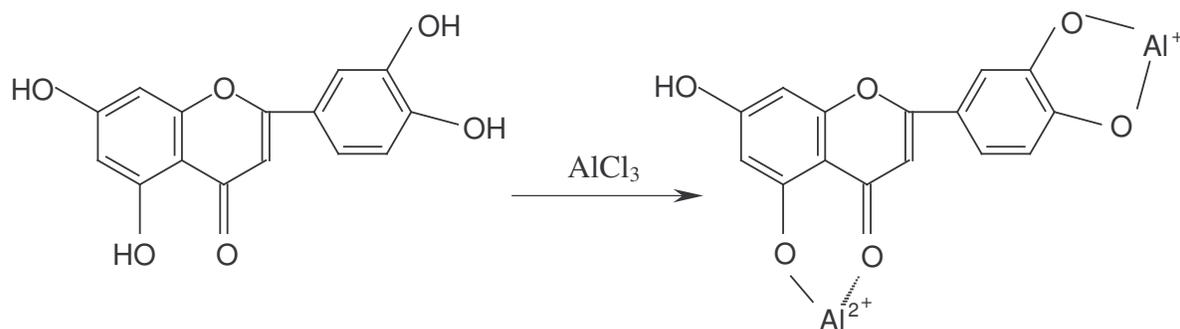


FIGURA 2: Formação do complexo Flavonóide-Al, em solução metanólica de cloreto de alumínio (Markham, 1982)

4.2.1.2. Determinação de fenólicos totais

A análise de compostos fenólicos totais dos EEP foi feita de acordo com o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu descrito por Woisky & Salatino (1998), utilizando ácido gálico como padrão. O reagente de Folin-Ciocalteu é uma solução de íons complexos poliméricos formados a partir de heteropoliácidos fosfomolibdicos e

fosfotungsticos. Esse reagente oxida os fenolatos, reduzindo os ácidos a um complexo azul Molibdênio-Tungstênio (Mo-W). A leitura no espectrofotômetro foi feita a 740 nm. Os EEP foram diluídos 1:100 e um alíquota de 0,5 mL da amostra diluída foi transferida para um tubo com tampa de rosca e adicionado 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu diluído em água 1:10. A mistura permaneceu em repouso por 3 a 8 minutos. Em seguida foi adicionado 2 mL de carbonato de sódio 4 % e os tubos deixados em repouso por 2 horas, ao abrigo da luz. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 740 nm. Uma amostra em branco foi conduzida nas mesmas condições e os resultados dos compostos fenólicos totais foram expressos como ácido gálico.

QUADRO 1: Bandas de absorção de flavonóides e ácidos fenólicos em solução metanólica em presença de cloreto de alumínio (AlCl₃). (Marham, 1982)

Tipo de flavonóide	Banda I (nm)	Banda II (nm)	Deslocamento provocado por complexação com AlCl ₃ (nm)**
Flavonas	310-350	250-280	+ 35-55*
Flavonois (3-OH substituído)	330-360	250-580	+ 50-60*
Flavonois (sem 3-OH)	350-385	250-280	+ 35-55*
Isoflavonas	310-330 ombro	245-275	+ 10-14
Isoflavonas (5-desoxi-6,7-dioxigenadas)	320 pico	275-295	+ 11-30
Flavonas e diidrofalvonóis	300-330 ombro	230-270	+ 20-26*
Chalconas	340-390	230-270	+ 48-64*
Auronas	465-560	270-280	+ 40* + 60-70*

* Têm um desvio batocrômico (para comprimentos de onda maiores)

** Em 425 nm, os ácidos fenólicos e outras substâncias fenólicas absorvem em presença de AlCl₃, por isso não há interferência destas substâncias no doseamento de flavonóides.

4.2.1.3. Espectrofotometria na região ultravioleta-vísivel

A determinação do espectro de máxima absorbância dos extratos etanólicos de própolis foi realizada segundo o método descrito por Park & Ikegaki (1998a), com pequenas modificações. Alíquotas de 9 µL de cada EEP foram diluídas em 15 mL de álcool etílico 80 % (Merck Co), e os espectros de absorção na região UV-Visível foram determinados na faixa de comprimento de onda de 200 a 600 nm, utilizando um espectrofotômetro Beckman Coulter modelo DU-640.

4.2.1.4. Cromatografia em camada delgada de alta eficiência em fase reversa (CCDAE-FR)

A cromatografia em camada delgada de alta eficiência dos EEP foi feita de acordo com o método descrito por Park *et al.* (1997) e Park *et al.* (1995). Alíquotas de 3 µL dos EEP foram aplicadas em placas de 0,2 mm de espessura (10 x 10 cm) RP18 F₂₅₄ S (Merck Co). O sistema eluente utilizado foi etanol:água (55:45, v/v) e o tempo de desenvolvimento das placas foi de aproximadamente 100 minutos. As placas desenvolvidas foram observadas sob luz ultravioleta, no comprimento de onda de 254 e 366 nm, utilizando-se um iluminador UV Cole Parmer, modelo UVP-UVGL-58.

4.2.1.5. Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR)

As análises por CLAE em fase reversa dos EEP foram feitas de acordo com o método de Park *et al.* (2002a). Neste método dez microlitros do EEP foram injetados em

uma coluna YMC-Pack ODS-A (RP-18, 250 x 4,6 mm; tamanho de partícula, 5 µm) instalada em um sistema de cromatografia líquida (Shimadzu Co.) composto por duas bombas (LCD-10AD) degasificador por hélio (DGU-2A), injetor automático (SIL-10AD) e forno de colunas (CTO-10AS) com temperatura de 30 °C. A fase móvel utilizada foi água/ácido acético (19:1 v/v) (solvente A) e metanol (solvente B), com vazão constante de 1,0 mL/min. O gradiente inicia-se com 30 % do solvente B até 40 % em 15 minutos, 50 % de B em 30 minutos, 60 % de B em 45 minutos, 75 % de B em 65 minutos, 90 % de B em 95 minutos e 30 % de B em 105 minutos. As substâncias foram determinadas pela comparação dos espectros na região ultravioleta obtidos por meio do detector de arranjo de diodos (SPD-M10A) como os obtidos para os padrões e para as amostras. Neste trabalho foram utilizados os seguintes padrões de flavonóides e ácidos fenólicos (Extrasynthese Co.): Quercetina, kamferol, apigenina, pinocembrina, crisina, acacetina, galangina, kaemferide, isosakuranetina, sakuranetina, ácido cumárico e ácido ferúlico. Adicionalmente, pinobanksina, pinobanksina-3-acetato e o éster do ácido dimetil dialil caféico que foram gentilmente cedidos pelo Dr. Eckhard Wollnweber, do Intitut für Botanik der Technischen, Hochschule, Alemanha.

4.2.1.6. Ionização por eletrospray (IES) acoplado a espectrometria de massas (EM)

A análise das amostras de própolis por IES-EM foi realizado de acordo com o método de Sawaya *et al.* (2004). Em 1 mL dos extratos etanólicos de própolis foram adicionados 5 µL de hidróxido de amônia (Merck, Darmstadt, Alemanha) e foram analisados por infusão direta na fonte de ionização por electrospray (IES) por meio de uma bomba tipo seringa (Harvard Apparatus) com fluxo de 15 µL/min. Os espectros ESI-EM e

IES-EM/EM (dissociação induzida por colisão com baixa energia) foram obtidos com alta-resolução e alta-exatidão (5 ppm) utilizando um espectrômetro de massas Q-TOF da Micromass. A energia aplicada nos capilares e no cone, foram de ± 3000 V e para ± 40 V, respectivamente, com uma temperatura de desolvatação de 100 °C. Para a dissociação induzida por colisão no modo negativo, a energia de colisão foi otimizada para cada íon, variando de 15 a 30 eV.

4.2.2. Análise biológica dos extratos etanólicos de própolis.

4.2.2.1. Atividade antimicrobiana dos extratos alcoólicos de própolis contra bactérias.

A análise da atividade antimicrobiana dos extratos de própolis foi realizada, utilizando as bactérias gram positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 21332, *Micrococcus luteus* ATCC 4698 e gram negativas *Proteus mirabilis* CDC 305, cultivadas na mistura de meio ágar nutriente e ágar-ágar, de acordo com o método descrito por Blair *et al.* (1958). Culturas ativas dessas bactérias foram inoculadas por espalhamento com “swabs” estéreis em placas contendo o meio de cultura, ágar nutriente e ágar-ágar (Merck). Os discos contendo os EEPs, preparados de acordo com o item 4.1.1.3, foram colocados sobre as placas inoculadas que, em seguida, foram incubadas a 37 °C por 24 horas para todas as bactérias testadas. A atividade antimicrobiana foi determinada pela formação de halo inibitório ao redor dos discos.

4.2.2.2. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos etanólicos de própolis contra bactérias.

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada de acordo com a técnica descrita por Koo *et al.* (2000b) e Duarte (2003), sendo utilizados tubos contendo meio de cultura líquido BHI. Os microorganismos *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 21332, *Micrococcus luteus* ATCC 4698 e *Proteus mirabilis* CDC 305, foram inicialmente reativados a partir das culturas estoque em meio BHI líquido por 18-24 h a 37 °C e posteriormente cultivados em placas com Agar BHI. Após o crescimento bacteriano, as colônias individuais foram removidas com auxílio de uma alça de platina e suspensas em uma solução de NaCl 0,89 % estéril. Após a homogeneização, as suspensões bacterianas foram ajustadas para o valor de transmitância de 75% a 660 nm em espectrofotômetro que equivale a aproximadamente a valores entre $1,1 \times 10^7$ - $1,2 \times 10^8$ UFC/mL.

Um volume de 100 µL das suspensões bacterianas foram inoculados em 100 mL do meio BHI, de modo a obter uma concentração bacteriana em torno de $1-2 \times 10^5$ UFC/mL, sendo a mistura homogeneizada através de um agitador magnético. Imediatamente após a homogeneização, um volume de 4950 µL do inoculo e 50 µL do EEP (concentrações finais variando entre 1600 µg/mL a 12,5 µg/mL, com diluição seriada de razão 2) foi acrescentado em cada tubo, resultando em um volume final de 5mL de solução. Em seguida, os tubos foram agitados e incubados em estufa á 37 °C, por 24 horas.

Após a incubação, os tubos foram agitados e foi feita a leitura através de um espectrofotômetro a 660 nm. Foram feitos três controles para todos os microorganismos: 1) meio de cultura inoculado de bactéria, 2) meio de cultura inoculado de bactéria acrescido de 50 µL de etanol 80 % (v/v) e 3) meio de cultura (sem inoculo) utilizado como branco para a espectrofotometria. A CIM foi considerada a menor faixa de concentração do EEP em que não houve crescimento bacteriano visível a uma leitura de absorbância a 660 nm, menor que 0,05.

4.2.2.3. Determinação da concentração bactericida mínima (CBM) dos extratos etanólicos de própolis contra bactérias.

Para a determinação da concentração bactericida mínima, segundo a técnica descrita por Phillips (1991) e Koo *et al.* (2000b), foram utilizadas placas petri contendo meio de cultura BHI Agar com 5 % de sangue de carneiro desfibrinado.

Baseando-se nos resultados obtidos no teste da CIM, utilizaram-se como inoculo as suspensões provenientes dos tubos que apresentaram um resultado de leitura de absorbância, a 660 nm, inferior a 0,05. As placas foram semeadas utilizando 50 µL de inoculo com auxilio de uma pipeta e espalhada com uma alça de Drigalsky, sendo posteriormente incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas. A CBM foi considerada a menor concentração dos EEP que apresentaram CIM em que não houve crescimento celular sobre a superfície do ágar inoculado, ou seja, 99,9 % de morte bacteriana.

4.2.2.4. Atividade seqüestrante de radicais 1,1-difenil-2-picrilidrazil pelos extratos etanólicos de própolis.

A medida da atividade seqüestrante de radicais 1,1-difenil-2-picrilidrazil (DPPH), foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Yen *et al.* (1999) e Chen *et al.* (2003). O DPPH é um radical livre estável que aceita um elétron ou um radical hidrogênio para tornar-se uma molécula diamagnética e desta forma, é reduzida na presença de um antioxidante.

Para avaliação da atividade antioxidante os EEP reagiram com o radical estável DPPH em uma solução de etanol P.A. Merck (96 %). Na forma de radical, o DPPH possui uma absorção característica a 517 nm, a qual desaparece após a redução pelo hidrogênio arrancado de um composto antioxidante. Foram adicionados 4,0 mL dos EEPs (a 200 µg . mL⁻¹) a serem testados em 1,0 mL da solução do radical DPPH (0,5 mmol/L). A redução do radical do DPPH foi medida através do monitoramento contínuo do declínio da absorbância a 517 nm por 30 minutos, ao abrigo da luz, até valores estáveis de absorção. A atividade anti-radical foi determinada em termos de porcentagem de inibição (PI), a qual foi calculada através da taxa de declínio da absorção da solução de DPPH dos extratos EEP, após 30 minutos de reação (fase estável), com a absorção da solução controle de acordo com a fórmula:

$$PI (\% \text{ inibição}) = \left[\frac{A(0) - A(t)}{A(0)} \right] \times 100$$

Onde: $A(0)$ = Absorbância da solução referência de DPPH-etanol (96 %)

$A(t)$ = Absorbância da solução DPPH-EEP após 30 minutos de reação.

4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. Os dados foram analisados pelo programa Statistic v. 5, para a determinação da análise de variância. A separação entre as médias dos tratamentos foi realizada usando-se o teste de “t” de student com um nível de confiança de 95%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análise físico-química do extrato etanólico de própolis

5.1.1. Preparação dos extratos etanólicos de própolis

Todos os EEP obtidos de acordo com o item 4.1.1.3 demonstraram uma coloração que variou do amarelo a castanho escuro, entretanto no “screening” inicial e seletivo somente as amostras do litoral é que apresentaram absorbância na região UV-Visível indicando assim a existência de possíveis compostos fenólicos de potencial antioxidante e biológico. Sendo assim, somente as própolis oriundas do litoral é que foram utilizadas para o prosseguimento dos estudos físico-químicos e ensaios biológicos. Os extratos etanólicos das própolis do litoral do Perú são ilustrados na Figura 3.

Tomás-Barberán *et al.* (1993) estudaram a relação entre a cor dos extratos metanólicos de própolis e sua composição, indicando que extratos avermelhados escuros continham grandes quantidades de fenólicos, enquanto os incolores não continham substâncias fenólicas. Os extratos amarelos apresentaram compostos fenólicos, mais em pequenas quantidades quando comparados com os extratos escuros.

Quanto à porcentagem de sólidos solúveis em etanol, estudos feitos por Ikegaki (2001) para a região sudeste de Brasil, apresentaram um teor que variou de 58,7 % a 62,0 %. Alencar (2002), indica que o grupo 12 (São Paulo) apresentou um valor de 61,0 % de substâncias solúveis. Neste estudo pode-se verificar que as substâncias solúveis obtidas variaram de 56,21 a 67,35 % (Tabela 1).



FIGURA 3: Aparência dos extratos etanólicos das própolis do litoral peruano

TABELA 1: Cor e teor de substâncias solúveis dos EEP do Perú

Amostras	Origem	Extrato etanólico de própolis	
		Cor	Substâncias solúveis (%)
LQE	Lambayeque (Chiclayo)	Castanho escuro	64,14
PYO	Pacasmayo (La Libertad)	Castanho claro	56,21
PTA	Pativilca (Lima)	Castanho claro	57,07
LIM	Lima (Lima)	Castanho claro	56,57
AQP	Arequipa (Arequipa)	Amarelo claro	67,35

5.1.2. Espectrofotometria na região ultravioleta-visível

Os espectros de absorção na região UV-visível dos extratos etanólicos de própolis foram realizados na faixa de comprimento de onda de 200 a 600 nm, de acordo com o item 4.2.1.3, e os espectros obtidos estão ilustrados na Figura 4.

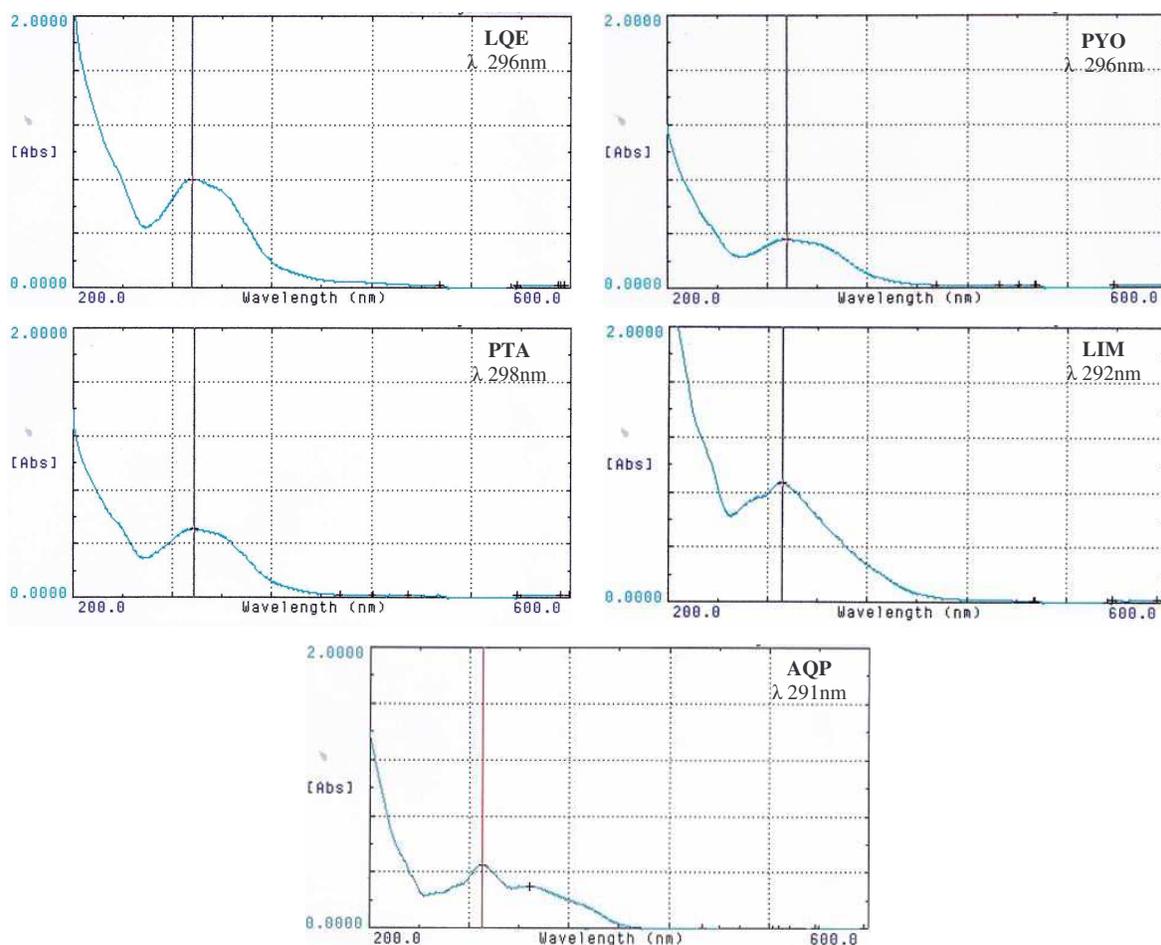


FIGURA 4: Espectros de absorção na região UV-visível, dos extratos etanólicos de própolis.

Cada EEP apresentou um valor máximo de absorbância nos comprimentos de onda que variaram de 291 a 298 nm. De um modo geral, os flavonóides também apresentam valores máximos de absorção na faixa de 250 a 350 nm (Markham, 1975). No entanto, a análise por espectrofotometria dos EEP fornece apenas uma característica geral de todos os compostos fenólicos presentes, indicando somente o perfil espectrofotométrico das amostras que é apenas um indicativo do tipo de própolis, pois de acordo com Alencar (2002) amostras de própolis com o mesmo comprimento de onda máximo apresentaram diferentes perfis químicos, como foi encontrado para as amostras do G3 (Paraná) e G8 (Pernambuco) com $\lambda_{\text{máx}}$ de 290 nm.

Em relação aos perfis apresentados na Figura 4 pode-se verificar a existência de dois tipos de própolis: tipo 1 com um $\lambda_{\text{máx}}$ entre 296 e 298 nm (LQE, PYO, PTA) e tipo 2 com um $\lambda_{\text{máx}}$ entre 291 e 292 nm (LIM, AQP). Os perfis apresentados e os comprimentos de onda das amostras LQE, PYO e PTA são semelhantes aos perfis das amostras de própolis de São Paulo (Pacheco, 2001) cuja origem botânica é a espécie vegetal de *Baccharis dracunculifolia* (Park *et al.* 2000a; Alencar, 2002). De fato, segundo Ikegali (2001) é possível encontrar um mesmo perfil de própolis em lugares distintos.

5.1.3. Cromatografia em camada delgada de alta eficiência em fase reversa (CCDAE-FR)

Os extratos etanólicos de própolis foram analisados por cromatografia de camada delgada de alta eficiência em fase reversa (CCDAE-FR) de acordo com o item 4.2.1.4. A CCDAE-FR foi visualizada sob a luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 255 e 366 nm o que permitiu se observar a intensidade e o número de frações de compostos fenólicos, sendo considerada uma técnica rápida e eficiente para a análise primária das própolis e como uma alternativa para a avaliação e classificação qualitativa das própolis.

Os cromatogramas dos EEP do Perú estão apresentados na Figura 5. Observa-se que as amostras LQE, PYO e PTA (tipo 1) já verificadas pelo espectro de absorção na região UV-Visível apresentaram o mesmo perfil cromatográfico. No entanto, as amostras LIM e AQP (tipo 2) apesar de apresentarem o mesmo comprimento de onda máximo (292 e 291 nm respectivamente) pela técnica de CCDAE-FR apresentam padrões cromatográficos diferentes, sendo possível diferenciá-las como dois tipos distintos de própolis, definindo

assim, três tipos própolis diferentes LIM (tipo 2) e AQP (tipo 3). De acordo com os resultados obtidos pelo espectro na região UV-visível e CCDAE-FR, verifica-se que essas técnicas podem ser ferramentas complementares, rápidas e eficazes para a identificação e classificação de diferentes tipos de própolis.

5.1.4. Determinação de flavonóides totais com base em Quercetina.

A determinação de flavonóides totais com base em quercetina foi realizada de acordo com o item 4.2.1.1 e os resultados apresentados na Tabela 2.

TABELA 2: Teor de flavonóides totais com base em quercetina dos extratos etanólicos de própolis.

Amostras de própolis	mg de flavonóides totais com base em quercetina/g própolis
Lambayeque (LQE)	14,86 ^b
Pacasmayo (PYO)	7,10 ^e
Pativilca (PTA)	9,07 ^d
Lima (LIM)	10,13 ^c
Arequipa (AQP)	28,62 ^a

Letras diferentes são significativas a nível de 5% (Teste “t”student $p \leq 0,05$)

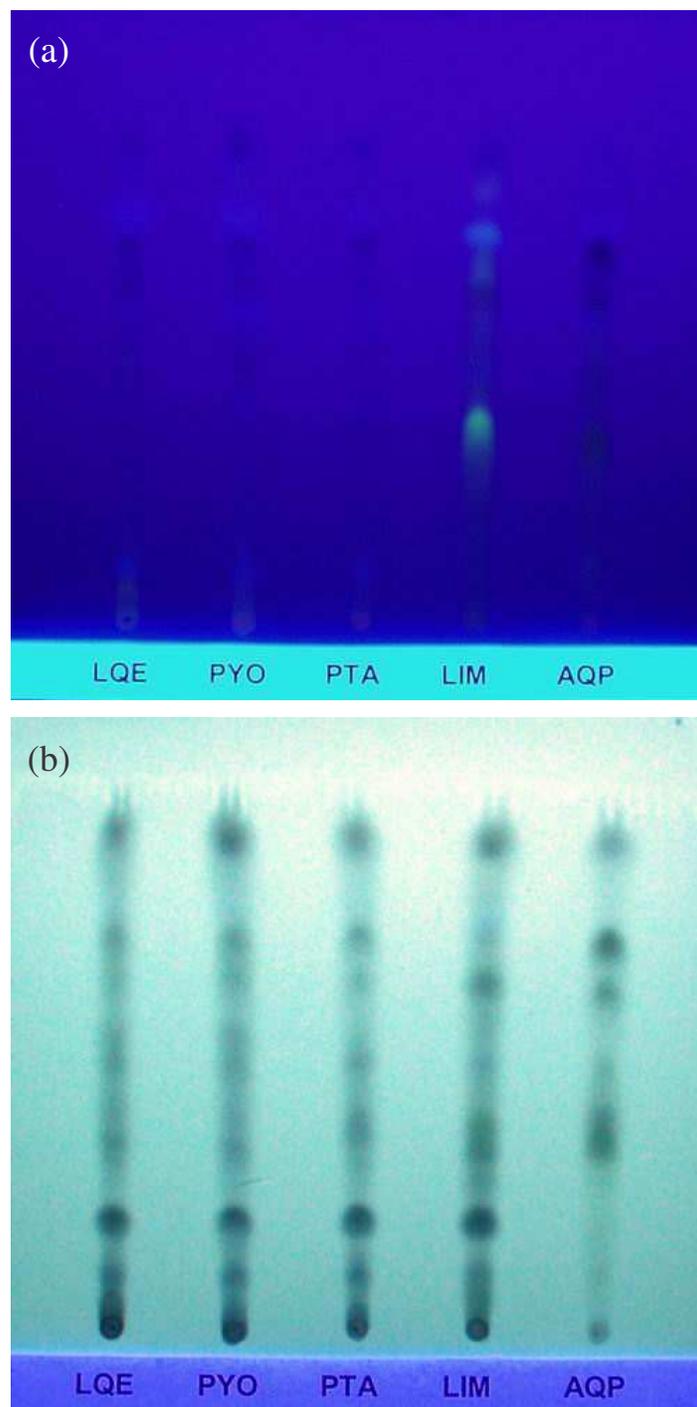


FIGURA 5: Cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE) dos extratos etanólicos de própolis irradiado a 366 (a) e 254(b) nm. Fase móvel Etanol: água (55:45 v/v)

Chang *et al.* (2002) determinaram o conteúdo de flavonóides em amostras de própolis por dois métodos colorimétricos complementares; as flavonas e flavonois por reação com AlCl_3 , e as flavanonas e flavononóis por reação com o 2,4-dinitrofenolhidrazina. Estes pesquisadores em experimentos prévios determinaram os comprimentos de onda máximos de soluções de rutina, quercetina, quercitrina e miricetina, obtendo valores entre 415 – 440 nm. Também observaram que os $\lambda_{\text{máx}}$ dos complexos formados com crisina e apigenina (que tem somente o grupo hidroxil no C-5) e a luteolina (que tem grupos hidroxil nos C-5, C-3' e C-4'), apresentaram uma absorbância máxima de 395, 385 e 415 nm, respectivamente, em ausência de ácido. Os autores concluíram que dos padrões de flavonóides analisados no experimento, a quercetina possui um máximo de absorbância a 415 nm, entretanto, o valor de comprimento de onda usado por Woisky & Salatino (1998), foi de 425 nm.

Neste trabalho foi usado o método descrito por Chang *et al.* (2002) e foi encontrado que o comprimento de onda máximo da solução de quercetina foi de 434 nm, motivo pelo qual foi utilizado este valor, e não o proposto por Woisky & Salatino (1998) e Chang *et al.* (2002). Para os valores de concentrações de quercetina (5 a 200 ppm) foi obtida uma curva padrão, com um coeficiente de regressão (R^2) de 0,99.

Pelos resultados apresentados na Tabela 2, observa-se que todas as amostras apresentaram diferenças significativas pelo teste “t” de student, quanto ao teor de flavonóides totais presentes nas amostras de própolis analisadas. A amostra AQP apresentou um valor de 28,62 mg/g, o maior teor de flavonóides totais encontrado; sendo similar a amostra de própolis do Rio de Janeiro (RJ15) encontrado por Ikegaki (2001). Os

valores obtidos no presente trabalho não podem ser comparados com outros valores de própolis peruanas, pois não existem trabalhos de pesquisa semelhante, além disso não existe uma cultura comum de coleta de própolis entre os apicultores peruanos, chegando-se inclusive a jogar a própolis no lixo depois da limpeza das colméias.

5.1.5. Determinação de fenólicos totais

Os fenólicos totais foram determinados de acordo com o método descrito no item 4.2.1.2 e os resultados são apresentados na Tabela 3. Esta técnica está baseada na reação do reagente Folin-Ciocalteu que oxida os fenolatos, reduzindo os ácidos a um complexo azul Molibdênio-Tungstênio, sendo a quantificação feita com base no padrão ácido gálico.

TABELA 3: Teor de fenólicos totais com base em ácido gálico dos extratos etanólicos de própolis.

Amostras de própolis	mg de fenólicos totais com base em ácido gálico/g própolis
Lambayeque (LQE)	82,74 ^b
Pacasmayo (PYO)	62,39 ^e
Pativilca (PTA)	74,72 ^d
Lima (LIM)	79,22 ^c
Arequipa (AQP)	109,26 ^a

Letras diferentes são significativas a nível de 5% (Teste “t” student $p \leq 0,05$)

Pelos resultados apresentados na Tabela 3, observa-se que todas as amostras apresentaram diferenças significativas pelo teste “t” de student, quanto ao teor de fenólicos

totais presentes nas amostras de própolis analisadas. A amostra AQP apresentou um valor de 109,26 mg/g, o maior teor de fenólicos totais encontrado, entre as amostras analisadas.

Quando se compara os teores de flavonóides totais (Tabela 2) com os de fenólicos totais das própolis (Tabela 3) pode-se verificar uma relação semelhante dos valores de fenólicos totais na faixa de 6,2 g/100g – 10,9 g/100g e dos flavonóides totais abaixo de 2,8 g/100g, como observada por Woisky & Salatino (1998), para amostras de São Paulo. Além disso, pode-se também verificar que a composição da própolis varia com a região de onde é coletada, corroborando com os estudos de Greenaway *et al.* (1990), Garcia-Viguera, *et al.* (1992), Tomas-Barberán, *et al.*, (1993), Bonvehi & Coll (1994); Park *et al.*, (2000b) e Park *et al.*, (2002a). O Perú encontra-se localizado entre a linha do Equador e o Trópico de Capricórnio (Figura 6), o que lhe assegura um clima eminentemente tropical com chuvas abundantes, temperaturas altas e vegetação abundante; no entanto, esta característica se vê afetada pelo sistema montanhoso dos Andes que cruza em sentido longitudinal, o que gera um clima muito diversificado (Pulgar-Vidal, 1967), e uma grande diversidade de vegetais produtores de resinas para a elaboração de própolis.

5.1.6. Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR)

Os extratos etanólicos das própolis do Perú foram analisados por CLAE-FR de acordo com o item 4.2.1.5. Esta análise feita permitiu confirmar e diferenciar os três tipos de própolis existentes e previamente classificados pelas técnicas de absorção máxima no UV-Visível e por CCDAE-FR.



FIGURA 6: Mapa da América do Sul

Quando se observa a Figura 7, verifica-se a similaridade no perfil de compostos fenólicos das amostras LQE, PYO e PTA, os quais são diferentes dos perfis das amostras LIM e AQP.

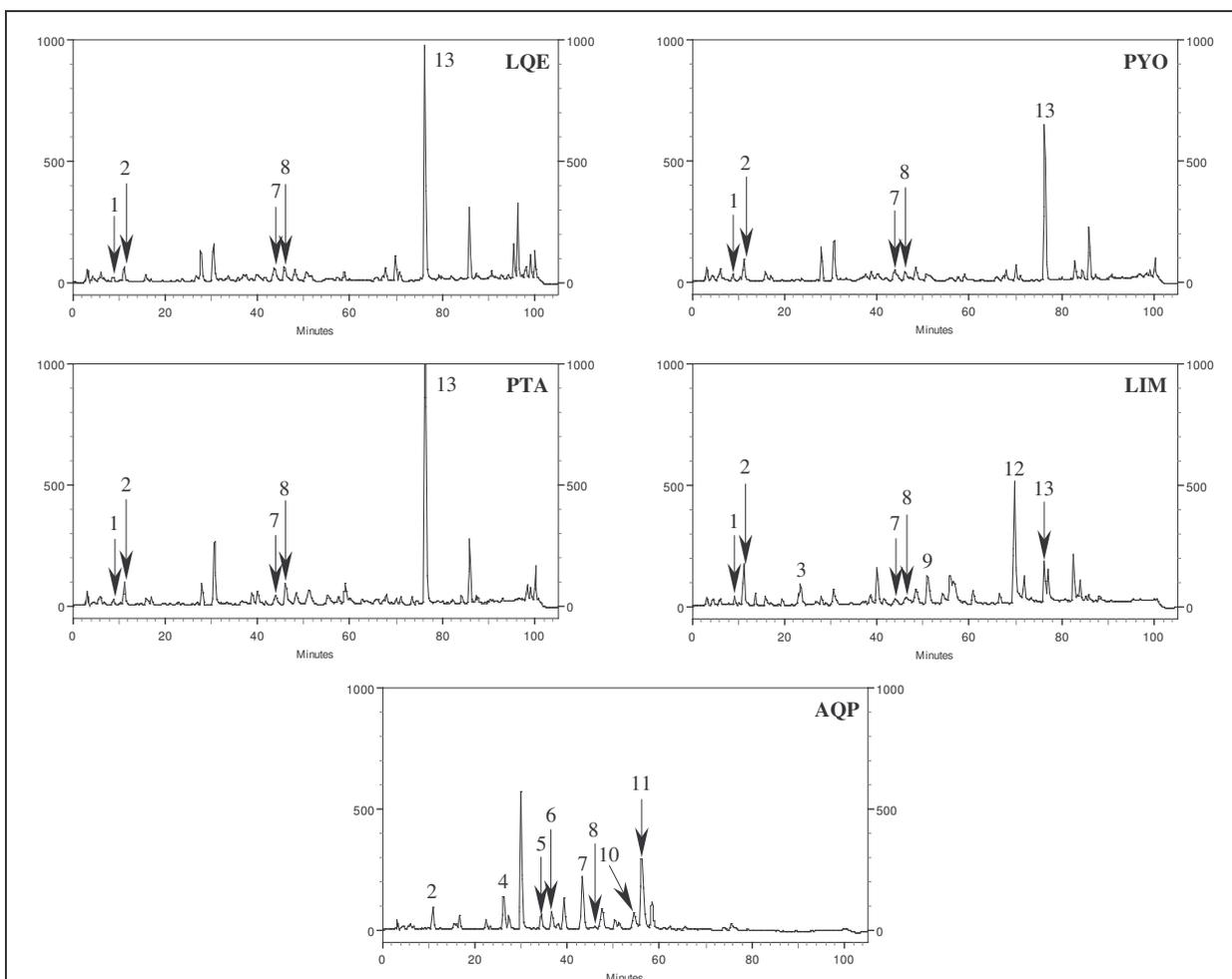


FIGURA 7: Cromatogramas obtidos por CLAE-FR das própolis peruanas. (Volume de amostra injetada: 10 μ L; detector utilizado: arranjo de fotodiodos a 254 nm; coluna: fase reversa YMC PACK ODS (250 x 4,6 mm) com tamanho de partícula de 5 μ m; fase móvel utilizada: água/ácido acético (19:1, v/v) (solvente A) e metanol (solvente B) em sistema de gradiente, iniciando com 30% do solvente B até 40% de B em 15 minutos, 50% de B em 30 minutos, 60% de B em 45 minutos, 75% de B em 65 minutos, 75% de B em 85 minutos, 90% de B em 95 minutos e 30% de B em 105 minutos; vazão: 1 mL/min; temperatura da coluna: 35°C).

1=ácido cumárico; 2=ácido ferrúlico; 3=pinobanksina; 4=quercetina; 5=kamferol; 6=isoramnetina; 7=sakuranetina; 8=pinobanksina-3-acetato; 9=crisina; 10=acacetina; 11=kamferide; 12=tectocrisina; 13=artepillin C

A própolis de AQP foi a que apresentou o maior número de flavonóides determinados (Figura 7 e o Quadro 2). O flavonóide sakuranetina (7) está presente em todas as amostras, porem com um maior teor na amostra AQP. Park *et al.* (1998c) e Koo *et al.*

(1999), também verificaram a presença de sakuranetina em amostras de própolis dos estados brasileiros do Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul. Outro flavonóide presente nos três tipos de própolis classificados foi a pinobanksina-3-acetato (8) o qual é um composto comumente encontrado em própolis de clima temperado, onde estão as resinas das árvores da espécie *Populus* sp. (Tomás-Barberán *et al.*, 1993; Bankova *et al.*, 1987; Wollenweber *et al.*, 1987). No entanto, as amostras que foram coletadas na região Costa ou Chala (LQE, PYO, PTA, PTA e LIM) e na região Yunga (AQP) que representam parte das 8 regiões em que é dividido o país (Figura 8). A região Costa é caracterizada pela ecorregião do deserto costeiro com uma altitude entre 0 a 500 m. e a região Yunga, é caracterizada por ter sol o ano todo e umidade relativamente baixa com temperatura entre 20 e 27°C com uma altitude variando entre 500 e 2300 m. Isto indica, que a pinobanksina-3-acetato também está presente em própolis de climas diferentes do clima temperado do hemisfério norte, não corroborando assim com os trabalhos de Tomás-Barberan *et al.* (1993), Aga *et al.* (1994) e Bankova *et al.* (1995). Outro composto presente em todas as amostras é o ácido ferúlico (2) que também está presente em amostras de São Paulo (Park *et al.*, 2004). A amostra de LIM apresentou os compostos crisina (9), pinobanksina (3) e tectocrisina (12), também encontrados nas própolis coletadas no estado do Rio Grande do Sul (Park *et al.*, 2000a; Alencar, 2002). No presente trabalho não foi determinada a presença do éster do ácido dimetil dialil caféico, que é um composto altamente alergênico e comumente encontrado em própolis de clima temperado (Wollenweber *et al.*, 1987).

As amostras de LQE, PYO e PTA se caracterizaram pela presença do ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepillin C) (13) em concentrações de 74,01, 39,18 e 62,53

respectivamente, além de apresentar um espectro de absorção máxima entre 296-298 nm, muito próximo de 300 nm que é característico das própolis de São Paulo, que possui um alto valor econômico no mercado externo, especialmente no Japão (Pereira *et al.*, 2002b). A grande procura tem se dado em função da presença de Artepillin C e por suas propriedades biológicas como atividade antimicrobiana (Aga *et al.*, 1994), antioxidante (Hayashi *et al.*, 1999) e cura da leucemia (Kimoto *et al.*, 2001).

QUADRO 2: Teor de compostos fenólicos determinados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) nas própolis peruanas.

No.	Compostos fenólicos identificados	Teor em mg/g de própolis				
		LQE	PYO	PTA	LIM	AQP
1	Acido cumárico	0,84	0,91	0,81	0,74	---
2	Acido ferúlico	2,05	2,52	3,64	4,64	3,62
3	Pinobanksina	---	---	---	9,83	---
4	Quercetina	---	---	---	---	2,93
5	Kaemferol	---	---	---	---	1,56
6	Isoramnetina	---	---	---	---	2,57
7	Sakuranetina	13,73	10,45	8,71	7,36	31,27
8	Pinobanksina-3-acetato	8,92	4,74	9,64	5,93	2,43
9	Crisina	---	---	---	4,12	---
10	Acacetina	---	---	---	---	12,53
11	Kaemferide	---	---	---	---	7,45
12	Tectocrisina	---	---	---	12,92	---
13	Artepillin C	74,01	39,18	62,53	10,25	---

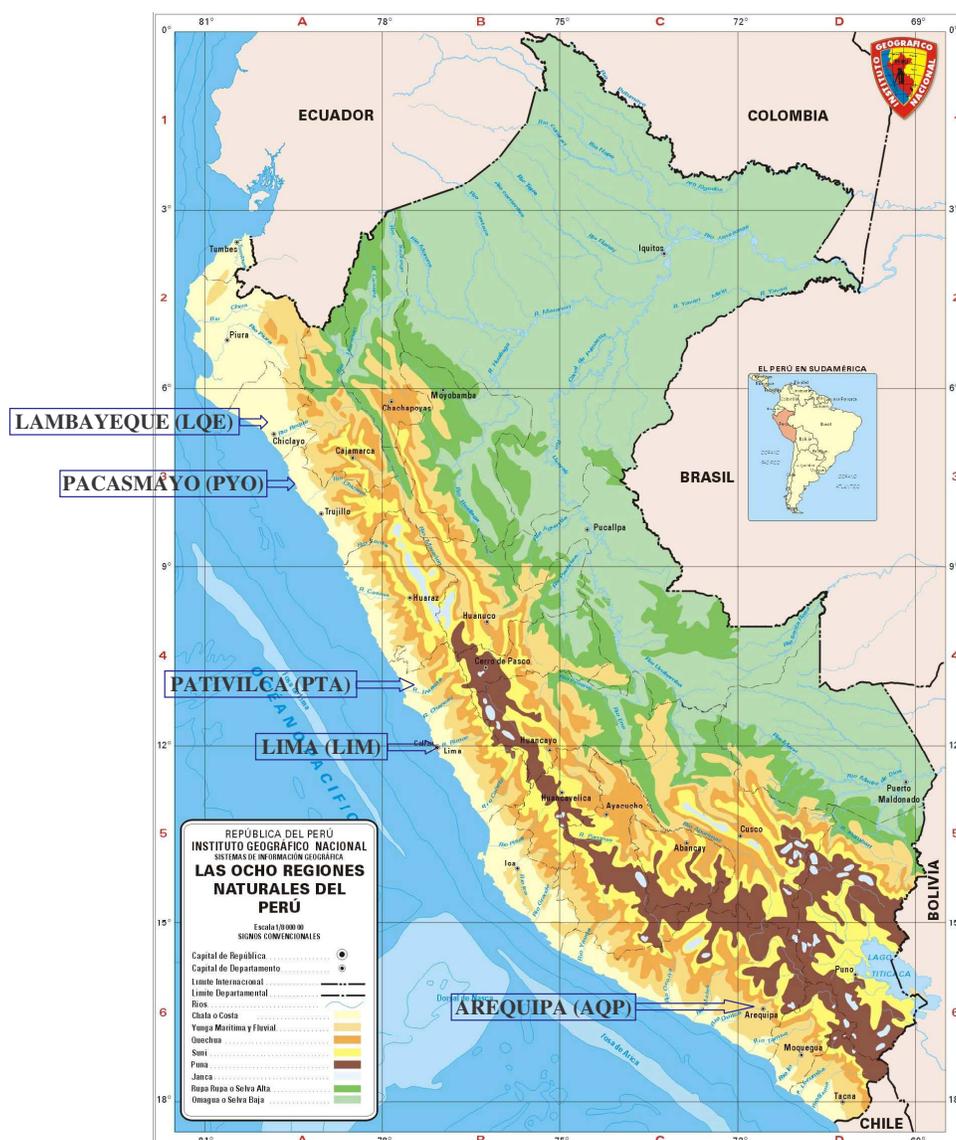


FIGURA 8: Mapa do Perú mostrando as cidades de onde foram coletas as amostras para o presente estudo.

5.1.7. Ionização por electrospray acoplado a espectrometria de massas (IES-EM)

Neste estudo, foi utilizado a técnica IES-EM de acordo com a metodologia descrita no item 4.2.1.6, modo negativo [IES(-) – EM modo negativo], com uso da técnica de fingerprinting para análise dos extratos etanólicos de própolis do Perú e caracterização dos componentes polares e ácidos existentes nos extratos. Estes EEPs por serem desconhecidos

quanto a seus componentes que o constituem foram comparados com componentes encontrados nas própolis brasileiras.

A maioria dos componentes principais dos EEPs são ácidos orgânicos e fenóis, devido a sua fácil ionização em soluções básicas por deprotonação, e portanto, são transferidos eficientemente à fase gasosa como $[M-H]^-$ - íons negativos. Os espectros de massas obtidos a partir de íons existentes nas amostras de própolis, estão apresentados na Figura 9.

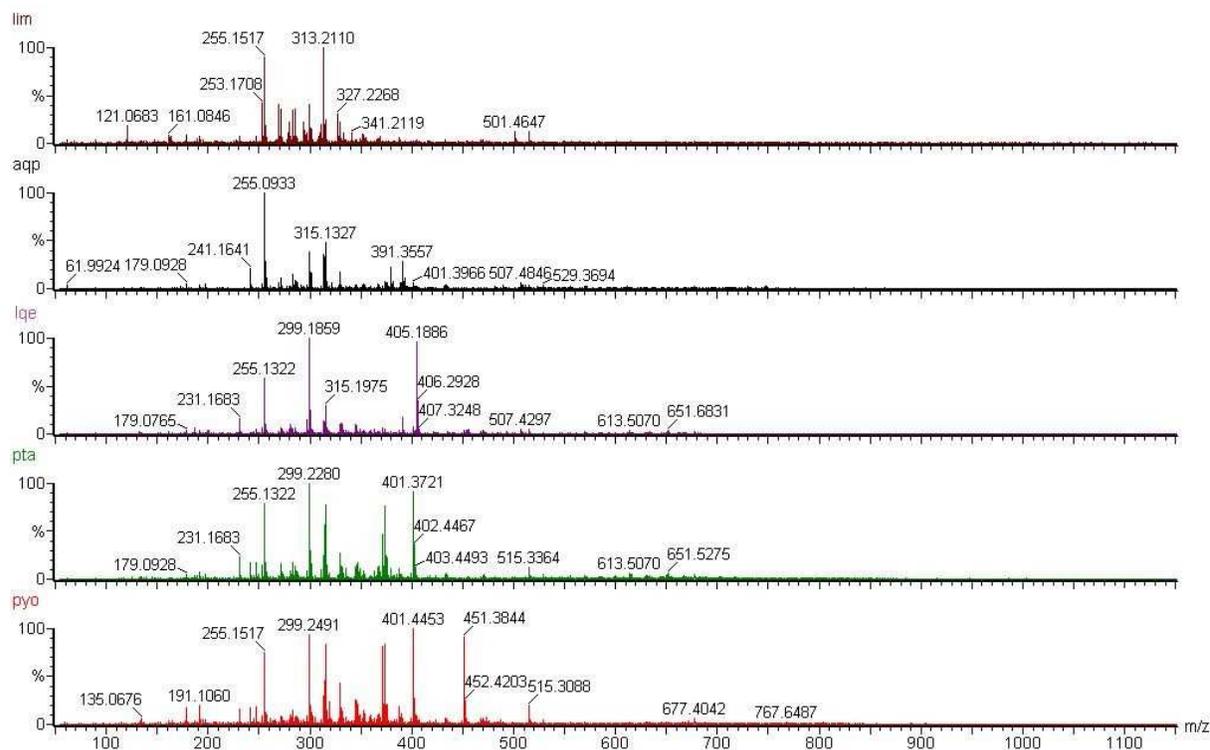


FIGURA 9: Espectro de massas IES(-) dos extratos etanólicos de própolis do Perú.

Os principais compostos identificados neste estudo (Quadro 3) foram os ácidos: *p*-cumárico e derivados (cinâmico, 3-prenilhidroxicinâmico, 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico), ferúlico, 3-cafeoilquinico, 3,5-dicafeoilquinico (Basnet *et al.*, 1996; Pereira *et al.*, 2003) e

3,4,5-tricafeoilquinico. Também foram identificados os flavonoides (crisina, pinocembrina, apigenina), 2,2-dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano, 3-metoxi-4-hidroxicinamaldeído (Marcucci & Bankova, 1999; Bankova *et al.*, 2000). Basnet *et al.* (1996) sugeriram que o grupo cafeoil tem um papel muito importante na atividade hepatoprotetora e que a presença do ácido quínico aumenta esta atividade.

QUADRO 3: Compostos identificados em extratos etanólicos de própolis do Perú usando IES(-)-EM/EM.

[M-H] ⁻	Compostos	Amostras	Energia de colisão (eV)	Principais fragmentos m/z (abundancia relativa, %)
147	Acido cinámico	LQE, PYO, PTA, LIM, AQP	15	147(20), 103(100)
163	Acido <i>p</i> -cumarico	LQE, PYO, PTA, LIM, AQP	25	163(10), 119(100), 93(5)
177	3-Metoxi-4-hidroxicinamaldeído	LQE, PYO, PTA, LIM, AQP	25	177(50), 162(100), 149(13), 134(8), 133(8), 121(5), 105(5)
179	Acido cafeico	LQE, PYO, PTA, LIM, AQP	20	179(20), 161(10), 135(100)
193	Acido ferúlico	LQE, PYO, PTA, LIM, AQP	25	193(30), 178(70), 149(30), 134(100)
229	2,2-dimetil-6-carboxietil, 2H-1 benzopirano	LQE, PYO, PTA, LIM, AQP	20	229(20), 201(11), 185(100), 174(18), 170(40), 160(40), 146(20)
231	Acido 3-prenil-4-hidroxicinâmico	PYO, PTA	20	231(20), 187(73), 176(5), 132(100), 119(3)
253	Crisina	PTA, LIM	30	253(70), 208(18), 145(40), 143(100), 119(42), 107(45)
255	Pinocembrina	LQE, PYO, PTA, LIM, AQP	20	255(100), 213(70), 171(30), 151(60), 145(40), 107(70), 83(20)
269	Apigenina	LQE, PYO, PTA, LIM, AQP	30	269(40), 241(10), 225(20), 201(10), 183(10), 159(15), 151(40), 149(38), 117(100), 107(40), 105(10)
299	Acido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepillin C)	LQE, PYO, PTA, LIM, AQP	27	299(10), 284(20), 255(65), 244(5), 200(100), 145(5)
353	Acido 3-cafeoilquínico	LIM	25	353(5), 191(100), 179(50), 173(15), 135(5)
515	Acido 3,5-dicafeoilquínico	LQE, PYO, PTA, LIM	20	515(10), 353(100), 335(5), 299(5), 191(25), 179(10), 173(8), 155(5), 135(5)
677	Acido 3,4,5-tricafeoilquínico	PYO	20	677(10), 515(100), 353(30), 179(10), 173(10), 155(5)

Segundo Park *et al.* (2000a) as amostras LQE, PYO e PTA poderiam ser classificadas como pertencentes ao grupo 12 (própolis do sudeste de Brasil) pelo perfil do espectro de absorção na região UV-Visível (Figura 4), que apresenta além de outros compostos o ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepillin C) em quantidades muito

semelhantes às própolis do grupo 12, especialmente a amostra LQE (Quadro 2). O Artepillin C também é encontrado no *Baccharis dracunculifolia* (Park *et al.*, 2004; Kumazawa *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2002a), e este composto foi confirmado pela técnica de IES-EM, como um dos principais compostos das amostras analisadas.

Marcucci (2000b), demonstrou que as própolis brasileiras contém compostos prenilados sendo o 3-metóxi-4-hidroxicinamaldeído um dos principais marcadores bioativos para a classificação das própolis brasileiras segundo a sua composição química.

Midorikava *et al.* (2001) indicaram que os extratos aquosos e metanólicos da própolis peruana exibiram diferente modelo de cromatograma de íons totais (TIC) em relação ao das própolis brasileiras e, portanto, nenhum dos compostos poderia ser definitivamente identificado. Entretanto, neste trabalho verificou-se que o perfil das amostras LQE, PYO, PTA são muito semelhantes às das amostras de própolis de São Paulo apresentado por Sawaya *et al.* (2004) quando é utilizada a técnica IES-EM.

5.2. Análise biológica dos extratos etanólicos de própolis.

5.2.1. Atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos de própolis contra bactérias.

A atividade antimicrobiana dos EEPs do Peru foi feita usando os microorganismos gram (+) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 21332, *Micrococcus luteus* ATCC 1332, *Streptococcus faecalis* ATCC 29122 e as bactérias gram (-) *Proteus mirabilis* CDC 305, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Salmonella choleraesuis*

ATCC 14028 e *Salmonella schwarzengrund*, de acordo com o método descrito no item 4.2.2.1. Os resultados dos testes estão apresentados na Tabela 4.

TABELA 4: Atividade antimicrobiana das própolis peruanas

Bactérias	Diâmetro da zona de inibição (mm)				
	LQE	PYO	PTA	LIM	AQP
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,5	1,0	1,5	1,0	1,5
<i>Bacillus subtilis</i>	4,0	1,0	1,0	< 1,0	1,5
<i>Micrococcus luteus</i>	2,0	1,0	< 1,0	< 1,0	2,0
<i>Streptococcus faecalis</i>	0	0	0	0	0
<i>Proteus mirabilis</i>	2,0	4,0	3,0	< 1,0	0
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0	0
<i>Salmonella choleraesuis</i>	0	0	0	0	0
<i>Salmonella schwarzengrund</i>	0	0	0	0	0

Todas as própolis inibiram moderadamente o crescimento do *Staphylococcus aureus* (Tabela 4 e Figura 10). Mas, todas as própolis não inibiram o crescimento do *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis* e *Salmonella schwarzengrund* (Tabela 4). A própolis LQE apresentou maior inibição contra o *Bacillus subtilis* quando comparado com às demais. O *Micrococcus luteus* foi mais suscetível a ação das própolis LQE e AQP enquanto PYO, PTA e LIM demonstraram pouca atividade. O *Proteus mirabilis* foi inibido pelas amostras LQE, PYO e PTA, entretanto, demonstrou resistência a ação da própolis AQP.

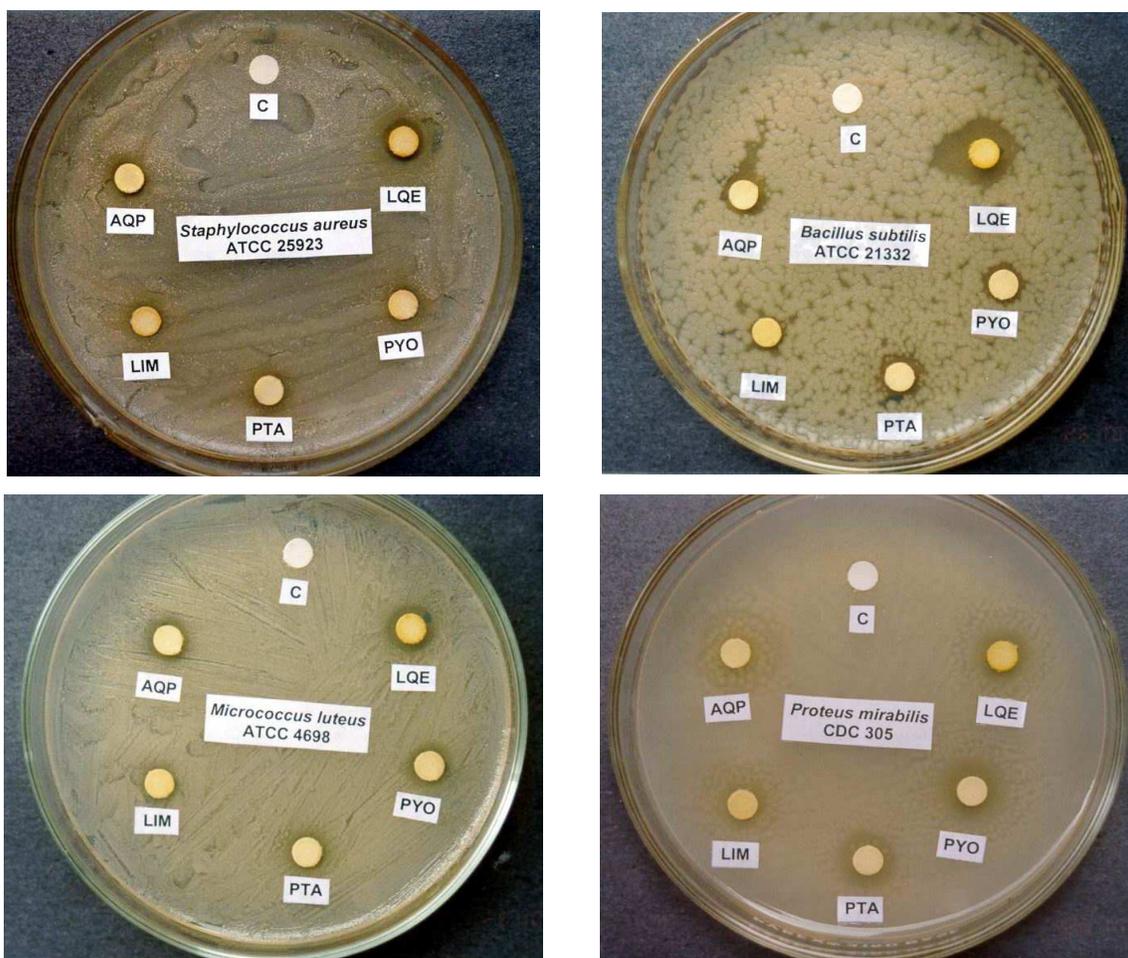


FIGURA 10: Atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos de própolis do Perú.

Os microorganismos testados neste experimento não podem ser comparados com outros resultados de própolis peruanas pelo fato de não existirem dados científicos disponíveis na literatura, mais em testes preliminares achou-se que das 4 bactérias gram (+) três foram inibidas em seu crescimento, no entanto, das 4 bactérias gram (-) somente uma foi inibida em seu crescimento. Portanto, pode-se afirmar que os resultados correspondem com a afirmação feita por Ghisalberti (1979), que indica que as bactérias gram (+) são mais sensíveis quando comparadas com bactérias gram (-) aos efeitos dos extratos etanólicos de própolis.

O comportamento dos diferentes EEPs segundo a Tabela 4, pode ser justificado segundo Hegazi *et al.* (2000) pela variação quantitativa da composição química das própolis, o que pode ter um efeito sinérgico diferente dos vários compostos fenólicos. As áreas geográficas de coleta das amostras diferem quanto à flora vegetal, o que reflete nos constituintes das própolis; por isso, tendo mesmo uma composição semelhante, as amostras LQE, PYO e PTA apresentaram comportamento antimicrobiano diferente entre si. Como pode ser observado na figura 8 as amostras foram coletadas de lugares muito distantes. Também pode-se verificar que a amostra LQE tem um melhor comportamento antimicrobiano, provavelmente devido à presença do ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepillin C), que segundo Aga *et al.* (1994) é um dos responsáveis pela alta atividade antimicrobiana das própolis brasileiras. Quando se compara com as própolis européias verifica-se que os compostos fenólicos como pinocembrina, galangina e ésteres de ácidos fenólicos são os maiores responsáveis pela atividade antibacteriana (Bankova *et al.*, 1996)

Kosalec *et al.* (2003) demonstraram em testes realizados em própolis da Croácia que todas as amostras apresentaram atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, bactéria gram (+), o que indica que a atividade antimicrobiana não depende da concentração de flavonóides em particular, mais sim do efeito sinérgico de todos os compostos fenólicos.

5.2.2. Concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos etanólicos de própolis contra bactérias.

Os resultados da Concentração Inibitória Mínima (Tabela 5), demonstram que o extrato etanólico de própolis LQ, é capaz de inibir o crescimento do *Staphylococcus aureus*

e *Bacillus subtilis* em baixas concentrações (12,5 – 50 µg/mL) em relação ao extrato etanólico de própolis AQP (200 – 800 µg/mL). Os dois extratos etanólicos inibiram o crescimento do *Micrococcus luteos* de forma semelhante. Em quanto, ao *Proteus mirabilis* precisaram-se de concentrações maiores dos extratos para produzir inibição do microorganismo indicando que as bactérias gram (-) são menos sensíveis a baixas concentrações de soluções antimicrobianas (Ghisalberti, 1979).

TABELA 5: Valores da concentração inibitória mínima (CIM) das própolis peruanas contra bactérias.*

Microorganismos	Amostras	
	LQE	AQP
<i>Staphylococcus aureus</i>	12,5 – 25	400 – 800
<i>Bacillus subtilis</i>	25 – 50	200 – 400
<i>Micrococcus luteus</i>	12,5 – 25	12,5 – 25
<i>Proteus mirabilis</i>	> 1600	400 – 800

* Os resultados apresentados em faixas de concentração em µg/mL

– indica que o valor da CIM esta entre as concentrações especificadas no intervalo.

Os valores da CIM dos extratos etanólicos mostrados na Tabela 5 indica que os extratos apresentam a seguinte potencia para a inibição das bactérias *S. aureus* e *B. subtilis*: LQE > AQP. Sforcin *et al.* (2000), verificaram que o *Staphylococcus aureus* é susceptível a baixa concentração de própolis, o que é corroborado também neste trabalho. Aga *et al.* (1994), demonstraram que o ácido 3, 5-diprenil-4-hidroxiâmico isolado de própolis de São Paulo inibe o crescimento do *Bacillus subtilis*, em baixa concentração podendo também ser esse o motivo da amostra LQE possuir um baixo valor de CIM contra esse microorganismo.

5.2.3. Concentração bactericida mínima (CBM)

Os resultados de CBM obtidos, expressos na Tabela 6, demonstram que a própolis LQE foi a que apresentou os menores valores de concentração bactericida mínima, de 4 a 8 vezes maior que os valores da CIM, para as bactérias Gram (+), dados esses que concordam com os apresentados por Fernandes Jr. *et al.* (1995), que demonstraram a diferença entre as concentrações inibitória e bactericida equivale de 8 a 10 vezes. No entanto, para a amostra AQP o CBM foi maior que 1600 µg/mL o que significa, de acordo com o teste, que a amostra AQP não possui efeito bactericida nas concentrações testadas neste estudo, contra *S. aureus*, *B. subtilis* e *M. luteus*. Entre tanto, para *P. mirabilis* os dois extratos etanólicos se comportaram de maneira semelhante.

Sawaya *et al.*, (2004) demonstraram que a atividade bactericida das amostras de própolis brasileiras foi devido ao efeito combinado de vários componentes. Outras substâncias que não foram completamente identificadas, mas que mostraram atividade bactericida e poderiam também estar contribuindo para o efeito observado.

TABELA 6: Valores da concentração bactericida mínima (CBM) das própolis peruanas contra bactérias*

Microorganismos	Amostras	
	LQE	AQP
<i>Staphylococcus aureus</i>	800 – 1600	> 1600
<i>Bacillus subtilis</i>	> 1600	> 1600
<i>Micrococcus luteus</i>	200 – 400	> 1600
<i>Proteus mirabilis</i>	> 1600	> 1600

* Os resultados apresentados em faixas de concentração em µg/mL

5.2.4. Atividade seqüestrante de radicais 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) pelos extratos etanólicos de própolis.

A atividade seqüestrante de radicais livres dos extratos etanólicos das própolis do Perú foi determinada pela perda de coloração da mistura da reação do radical livre DPPH com os extratos etanólicos de própolis, conforme descrito no item 4.2.2.3. O DPPH é um radical livre estável e tem sido amplamente usado para testes da capacidade seqüestrante do radical livre de varias amostras de própolis (Chen *et al.*, 2003; Ahn *et al.*, 2004; Banskota *et al.*, 2002; Basnet *et al.*, 1997). O sistema modelo de seqüestrar o radical livre DPPH é um método simples para avaliar a atividade antioxidante de compostos devido a sua capacidade doadora de hidrogênio (Kumazawa *et al.*, 2003).

Os resultados da atividade seqüestrante do radical livre DPPH estão ilustrados na Figura 11 onde a amostra LQE apresenta-se como a que tem maior força para seqüestrar o radical livre DPPH. A Tabela 7 demonstra que a amostra LQE foi significativamente diferente das amostras PYO e PTA mesmo tendo o mesmo perfil de compostos determinados pela técnica de CLAE-FR (Quadro 2). As amostras PYO, PTA e LIM não diferiram estatisticamente, apesar dos flavonoides identificados pela técnica CLAE-FR serem diferentes (Quadro 2). A amostra AQP foi estatisticamente diferente às demais amostras, com o menor efeito seqüestrante a uma concentração de 200 µg do extrato seco de própolis.

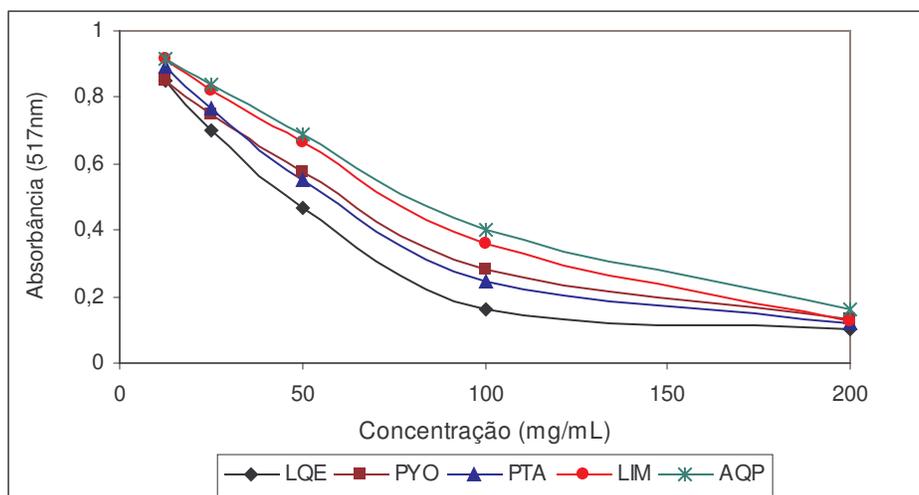


FIGURA 11: Atividade sequestrante de radicais DPPH pelos extratos alcoólicos de própolis.

TABELA 7: Degradação do 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) pelos extratos etanólicos de amostras de própolis do Perú.

Amostras	Degradação do DPPH*
Lambayeque (LQE)	89,5 ^a
Pacasmayo (PYO)	86,32 ^b
Pativilca (PTA)	87,38 ^b
Lima (LIM)	86,85 ^b
Arequipa (AQP)	82,82 ^c

* As concentrações dos EEPs em todos os casos foram 200µg/mL

Letras diferentes são significativas a nível de 5% (Teste “t” student $p \leq 0,05$)

As amostras de própolis do Perú apresentaram uma forte atividade sequestrante do radical livre DPPH, o que não corrobora com os estudos realizados por Banskota *et al.* (2000), que indicam que a própolis peruana tem uma fraca atividade sequestrante do radical livre. As baixas concentrações dos extratos etanólicos de própolis para sequestrar o DPPH sugere que as amostras de própolis foram efetivas sequestradoras de radicais livres. A

atividade seqüestrante tende a diminuir com a redução da concentração da amostra (Tabela 8).

Derivados do ácido cinâmico de extratos etanólicos de própolis brasileiras foram descritos como potentes antioxidantes (Hayashi *et al.*, 1999), e assim os extratos metanólicos também podem apresentar atividade seqüestrante do radical livre DPPH devido a presença de flavonóides e derivados do ácido cinâmico (Banskota *et al.*, 1998; Hayashi *et al.*, 1999).

TABELA 8: A atividade seqüestrante do radical livre DPPH das própolis peruanas. O efeito seqüestrante do radical livre DPPH foi medido pela absorbância do radical a 517 nm numa reação contendo a amostra teste e o DPPH 0,5 mM. Os resultados são expressos como a média \pm S.D (n=3).

Amostras	Concentração					
	100 μ g		50 μ g		25 μ g	
	Atividade	%	Atividade	%	Atividade	%
Controle	0,943 \pm 0,0002	0	0,943 \pm 0,0002	0	0,943 \pm 0,0002	0
LQE	0,163 \pm 0,004	82,7	0,466 \pm 0,012	50,6	0,699 \pm 0,008	25,9
PYO	0,284 \pm 0,004	69,9	0,574 \pm 0,003	39,1	0,751 \pm 0,008	20,4
PTA	0,247 \pm 0,002	73,8	0,552 \pm 0,005	41,5	0,769 \pm 0,002	18,5
LIM	0,359 \pm 0,015	61,9	0,664 \pm 0,009	29,6	0,820 \pm 0,008	13,0
AQP	0,399 \pm 0,005	57,7	0,691 \pm 0,012	26,7	0,839 \pm 0,010	11,0

6. CONCLUSÕES

As análises por Cromatografia de Camada Delgada de Alta Eficiência (CCDAE) e Espectrofotometria na região UV-Visível demonstraram que as própolis do litoral do Perú apresentam uma grande diversidade, podendo, portanto ser classificadas em três tipos distintos de própolis.

As técnicas de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Espectrometria de Massas possibilitaram a identificação e confirmação da presença do composto, ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepillin C), nas própolis do tipo 1 e 2.

Há diferenças dos EEP para a atividade antimicrobiana contra os microorganismos *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* e *Proteus mirabilis*. Entre as amostras analisadas, a amostra LQE apresentou o maior potencial antimicrobiano.

Para cada tipo de própolis pode ser atribuída uma origem particular, sendo possível, através de estudos obter-se a fonte vegetal da origem das própolis, assim como direcionar o uso da própolis para uma finalidade terapêutica específica, dado a diferença apresentada entre os testes biológicos.

Todas as amostras analisadas apresentaram alta atividade antioxidante.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGA, H.; SHIBUYA, T.; SUGIMOTO, T.; KURIMOTO, M.; NAKAJIMA, S. Isolation and Identification of Antimicrobial Compounds in Brazilian Propolis. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry** v. 58, n. 5, p. 945-946,1994.
- AHN, M-R.; KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; BANG, K-S.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 24, p. 7286-7292. 2004.
- ALENCAR, Severino Matias de. **Estúdio fitoquímico da origem botânica da própolis e avaliação da composição química de mel de *Apis mellifera* africanizada de diferentes regiões do Brasil**. Campinas, 2002, 120p. Dissertação (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- ASTUDILLO, L.; AVILA, F.; MORRISON, R.; GUTIERREZ, M.; BASTIDA, J.; CODINA, C.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Biologically active compounds from Chilean propolis. **Boletín de la Sociedad Chilena de Química**, v. 45, n. 4, p. 577-581, 2000.
- BANKOVA, V.S.; DE CASTRO, S.L.; MARCUCCI, M.C. Propolis: recent advances and plant origin. **Apidologie**. v. 31, p. 3-15, 2000.
- BANKOVA, V.; BOUDOUROVA-KRASTEVA, G.; SFORCIN, J. M.; FRETE, X.; KUJUMGIEV, A.; MAIMONI-RODELLA, R.; POPOV, S. Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from São Paulo state **Z. Naturforschung**, 54c, p. 401-405, 1999.

- BANKOVA, V.; MARCUCCI, M.C.; SIMOVA, S.; NIKOLOVA, N.; KUJUMGIEV, A.;
POPOV, S. Antibacterial diterpenic acids from Brazilian propolis. **Z. Naturforsch.** v. 51c, p. 277-280, 1996.
- BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; KUJUMGIEV, A.; MARCUCCI, M.C.; POPOV, S.
Chemical composition and antibacterial of Brazilian propolis. **Z. Naturforsch.** v. 50c, p. 167-172, 1995.
- BANKOVA, V.; DYULGEROV, A.; POPOV, S.; MAREKOV, N. A GC-MS Study of the propolis phenolic constituents. **Zeitschrift für Naturforschung**, 42c, n. 1-2, p. 147-151, 1987.
- BANSKOTA, A.H.; NAGAOKA, T.; SUMIOKA, L.Y.; TEZUKA, Y.; AWALE, S.; MIRODIKAWA, K.; MATSUSHIGE, K.; KADOTA, S. Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 80, n. 1, p. 67-73, 2002.
- BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Recent progress in pharmacological reasearch of própolis. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 7, p. 561-571, 2001
- BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; ADNYANA, I. K.; MIDORIKAWA, K.; MATSUSHIGE, K.; MESSAGE, D.; HUERTAS, A. A. G.; KADOTA, S. Cytotoxic hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Perú, the Netherlands and China. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, n. 1-2, p. 239-246, 2000.
- BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; PRASAIN, J.K.; MATSUSHIGE, K.; SAIKI, I.; KADOTA, S. Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activity. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 896-900, 1998.

- BASNET, P.; MATSUNO, T.; NEIDLEIN, R. Potent free radical scavenging activity of propolis isolated from Brazilian propolis. **Z. Naturforschung**, 52c, p. 828-833, 1997.
- BASNET, P.; MATSUSHIGE, K.; HASE, K.; KADOTA, S.; NAMBA, T. Four Di-O-caffeoyl quinic acid derivatives from propolis. Potent hepatoprotective activity in experimental liver injury models. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. v. 19, n. 11, p. 1479-1484. 1996.
- BIANCHINI, L.; BEDENDO, P. Efeito antibiótico da própolis sobre bactérias fitopatogênicas. **Sciencia Agrícola**, v. 55, n. 1, p. 149-152, 1998.
- BLAIR, J. E.; BORMAN, E. K.; BYNOE, E. T.; UPDYKE, E. L.; WILLIAMS, R. E. O. Hospital acquired staphylococcal disease, recommended procedures for laboratory investigation. Atlanta, G.A: United States Department of Health, education and Welfare, **Public Health Service**, 1958.
- BONVEHI, J.S.; COLL, F.V. Phenolic composition of propolis from China and from South-America. **Z. Naturforschung**, 49c, p. 712-718, 1994.
- BORRELLI, F.; MAFFIA, P.; PINTO, L.; IANARO, A.; RUSSO, A.; CAPASSO, F.; IALENTI, A. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. **Fitoterapia**, s. 1, p. S53-S63, 2002
- BURDOCK, G.A. Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis. **Food and Chemical Toxicology**. v. 36, p. 347-363, 1998.
- BOUDOUROVA-KRASTEVA, G.; BANKOVA, V.; SFORCIN, J.M.; NIKOLOVA, N.; POPOV, S. Phenolics from Brazilian propolis. **Z. Naturforschung**, 52c, p. 676-679, 1997.
- CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Própolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, v. 73, suppl. 1, p. S1-S6, 2002.

- CHANG, C-C.; YANG, M-H.; WEN, H-M.; CHERN, J-C. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 10, n. 3, p. 178-182, 2002.
- CHEN, C-N.; WU, C-L.; SHY, H-S.; LIN, J-K. Cytotoxic prenylflavanones from Taiwanese propolis. **Journal of Natural Products**. v. 66, n. 4, p. 503-506, 2003.
- CHEN, J. H.; SHAO, Y.; HUANG, M. T.; CHIN, C. K.; HO, C. T. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on human leukemia HL-60 cells. **Cancer Letters**, v. 108, n. 2, p. 211-214, 1996.
- CHRISTOV. R.; BANKOVA, V.; HEGAZI, A.; ABD EL HADY, F.; POPOV, S., Chemical composition of Egyptian propolis. **Z. Naturforschung**, 53c, p. 197-200, 1998.
- DUARTE, S.; KOO, H.; BOWEN, W.H.; HAYACIBARA, M.F.; CURY, J.A.; IKEGALI, M.; ROSALEN, P.L. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of *Mutans streptococci*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, n. 4, p. 527-531, 2003.
- ELLIOTT R.B. e CHASE H.P. Prevention or delay of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in children using nicotinamide. **Diabetologia**, v. 34, p. 362-365, 1991.
- FERNANDES Jr., A.; SUGIZAKI, M.F.; FOGO, M.L.; FUNARI, S.R.C.; LOPES, C.A.M. *In vitro* activity of propolis against bacterial and yeast pathogens isolated from human infections. **Journal Venom. Anim. Toxins**, v. 1, n. 2, p. 63-69, 1995.
- FRENKEL, K.; WEI, H.; BHIMANI, R.; YE J., ZADUNAISKY, J. A.; HUANG, M. T.; FERRARO, T.; CONNEY, A. H.; GRUNBERGER, D. Inhibition of tumor promoter-mediated processes in mouse skin and bovine lens by caffeic acid phenethyl ester. **Cancer Research**, v. 53, p. 1255-1261, 1993.

- GARCIA-VIGUERA, C.; GREENAWAY, W.; WHATLEY, F. R. Composition of propolis from 2 different Spanish regions. **Z. Naturforschung**, 47c, p. 634-637, 1992.
- GEBARA, E.C.E.; LIMA, L.A.; MAYER, M.P.A. Propolis antimicrobial activity against periodontopathic bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 4, p. 365-369, 2002.
- GHISALBERTI, E.L., Propolis: A review. **Bee World**, v. 60, p. 59-84, 1979.
- GRANGE, J.M.; DAVEY, R.W. Antibacterial properties of propolis (bee glue). **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 83, p. 159-160, 1990.
- GREENAWAY, W.; SCAYSBROOK, T.; WHATLEY, F.R. The composition and plant origins of propolis. **Bee World**, v. 71, n. 3, p. 107-118, 1990.
- HEGAZI, A.G.; ABD EL HADY, F.K.; ABD ALLAH, F.A.M. Chemical composition and antimicrobial activity of european propolis. **Z. Naturforschung**, 55c, p. 70-75, 2000.
- HAYASHI, K.; KOMURA, S.; ISAJI, N.; OHISHI, N.; YAGI, K. Isolation of antioxidative compounds from Brazilian propolis: 3,4-dihydroxy-5-prenylcinnamic acid, a novel potent antioxidant. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 47, p. 1521-1524, 1999.
- IKEGAKI, Masaharu, **Determinação de qualidade de própolis de *Apis mellifera* africanizada da região sul do Brasil: Avaliação de algumas propriedades físico-químicas e biológicas da própolis**. Campinas, 2001, 74p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- ILHAN, A.; KOLTUKSUZ, U.; OZEN, S.; UZ, E.; CIRALIK, H.; AKYOL, O. The effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on spinal cord ischemia/reperfusion injury in rabbits. **Eur. J. Cardio-Thoracic Sur.**, v. 16, n. 4, p. 458-463, 1999.

INSTITUTO GEOGRAFICO NACIONAL. 1989. Atlas del Perú. Lima.

KARTAL, M.; YILDIZ, S.; KAYA, S.; KURUCU, S.; TOPÇU, G. Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 86, p. 69-73, 2003.

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

KIMOTO, T.; AGA, M.; HINO, K.; KOYA-MIYATA, S.; YAMAMOTO, Y.; MICALLEF, M.J.; HANAYA, T.; ARAI, S.; IKEDA, M.; KURIMOTO, M. Apoptosis of human leukemia cells induced by artemillin C, an active ingredient of Brazilian propolis. **Anticancer Research**, v. 21, n. 1A, p. 221-228, 2001.

KIMOTO, T.; ARAI S.; KOGUCHI, M.; AGA, M.; NOMURA, Y.; MICALLEF, M. J.; KURIMOTO, M.; MITO, K. Apoptosis and suppression of tumor growth by Artemillin C extracted from Brazilian propolis. **Cancer Detect. Prev.**, v. 22, n. 6, p. 506-515, 1998.

KÖNIG, B. Plant sources of propolis. **Bee World**, v. 66, p. 136-139, 1994.

KOO, H.; GOMES, B.P.F.A.; ROSALEN, P.L.; AMBROSANO, G.M.B.; PARK, Y.K.; CURY, J.A. In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. **Archives of Oral Biology**, v. 45, n. 2, p. 141-148, 2000a.

KOO, H.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; AMBROSANO, G. M. B.; MURATA, R. M.; YATSUDA, R.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M.; PARK, Y. K. Effect of a new variety of *Apis mellifera* propolis on mutans streptococci. **Current Microbiology**, v. 41, p. 192-196, 2000b.

- KOO, H.; ROSALEN, P.L.; CURY, J.A.; PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; SATTLER, A.
Effect of *Apis mellifera* propolis from two Brazilian regions on caries development in desalivated rats. **Caries Research**. v. 33, n. 5, p. 393-400, 1999.
- KOO, M. H.; 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.
- KOO, M. H.; PARK, Y. K. Investigaç o do teor de flavon ides nas pr opolis comerciais. **Revista Brasileira de Apicultura**, p 6-11, Nov-Dez/1996.
- KOSALEC, I.; BAKMAZ, M.; PEPELJNJAK, S. Analysis of propolis from the continental and Adriatic regions of Croatia. **Acta Pharm.**, v. 53, n. 3, p. 275-285, 2003.
- KROL, W.; SCHELLER, S.; SHANI, J.; PIETSZ, G.; CZUBA, Z. Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on the growth of *Staphylococcus aureus*. **Arzneimittel-Forschung Drug Research**, v. 43, p. 607-609, 1993.
- KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJEIVA, Y.; BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, n. 3, p. 235-240, 1999.
- KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, v. 84, n. 3, p. 329-339, 2004.
- KUMAZAWA, S.; YONEDA, M.; SHIBATA, I.; KANAEDA, J.; MASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, n. 6, p. 740-742, 2003.
- LINDENFELSER, L.A. Antimicrobial activity of propolis. **American Bee Journal**, v. 107, p. 90-92, 1967.

- MARBY, T.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. The systematic identification of flavonoids. Springer-Verlag. New York, USA, 1970.
- MARCUCCI, M.C.; FERRERES, F.; GARCÍA-VIGUERA, BANKOVA, V.S.; DE CASTRO, S.L.; DANTAS, A.P.; VALENTE, P.H.M.; PAULINO, N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, n. 2, p. 105-112, 2001.
- MARCUCCI, M.C.; FERRERES, F.; CUSTÓDIO, A.R.; FERREIRA, M.M.C.; BANKOVA, V.S.; GARCÍA-VIGUERA, C.; BRETZ, W.A. Evaluation of phenolic compounds in Brazilian propolis from different geographic regions. **Z. Naturforschung**, 55c, p. 76-81, 2000a.
- MARCUCCI, M.C. Process typing natural products. Requested patent. Brazilian National Institute for Intellectual Property, INPI no. PI 0105471-6, 12/22/2000b.
- MARCUCCI, M.C.; BANKOVA, V.S. Chemical composition, plant origin and biological activity of Brazilian propolis. **Current Topics in Phytochemistry**. v. 2, p. 115-123, 1999.
- MARCUCCI, M.C.; RODRIGUEZ, J.; FERRERES, F.; BANKOVA, V.; GROTO, R.; POPOV, S. Chemical composition of Brazilian propolis from São Paulo State. **Z. Naturforschung**, 53c, p. 117-119, 1998a.
- MARCUCCI, M.C.; WOISKY, R.G.; SALATINO, A. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de propolis. **Mensagem Doce**, v. 46, p. 3-8, 1998b.
- MARCUCCI, M.C.; DE CAMARGO, F.A.; LOPES, C.M.A. Identification of amino acids in Brazilian propolis. **Z. Naturforschung** 51c, p. 11-14, 1996.

- MARCUCCI, M.C. Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**. v. 26, p. 83-99, 1995.
- MARKHAM, K.R. Ultraviolet and visible absorption spectroscopy. IN: **The Flavonoids**. Harborne, J.B.; Mabry, T.J.; Mabry, H. New York, Academic Press, p. 47-61, 1975.
- MARKHAM, K.R. **Techniques of flavonoid identification**. Academic Press Inc. London, Great Britain, 1982.
- MARKHAM, R. K.; MITCHELL, K. A.; WILKINS, A. L.; DALDY, J. A.; LU, Y. HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zealand propolis. **Phytochemistry**, v.42, n.2, p. 205-211, 1996
- MATSUNO, T.; JUNG, S. K.; MATSUMOTO, Y.; SAITO, M.; MORIKAWA, J. Preferential cytotoxicity to tumor cells of 3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid (Artepillin C) isolated from propolis. **Anticancer Research**, v. 17, n. 5A, p. 3565-3568, 1997.
- MATSUNO, T. A new clerodane diterpenoid isolated from propolis. **Z. Naturforschung** , v. 50c, p. 93-97, 1995.
- MATSUDA, S. H. Propolis – health care food. **Foods and Foods Ingredients Journal of Japan**, v. 160, p. 64-73, 1994.
- MIDORIKAWA, K.; BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; NAGAOKA, T.; MATSUSHIGE, K.; MESSAGE, D.; HUERTAS, A.A.G.; KADOTA, S. Liquid chromatography-mass spectrometry analysis of propolis. **Phytochemical Analysis**, v. 12, p. 366-373, 2001.
- MIORIN, P.L.; LEVY JUNIOR, N.C.; CUSTODIO, A.R.; BRETZ, W.A.; MARCUCCI, M.A. Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and

- Tetragonisca angustula* against *Satphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 913-920, 2003.
- MIYATAKA, H.; NISHIKI, M.; MATSUMOTO, H.; FUJIMOTO, T.; MATSUKA, M.; SATOH, T. Evaluation of propolis I. Evaluation of Brazilian and Chinese propolis by enzymatic and physico-chemical methods. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 20, n.5, p. 496-501, 1997.
- MORENO, M.I.N.; ISLA, M.I.; SAMPIETRO, A.R.; VATTUONE, M.A. Comparison of the radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, n. 1-2, p. 109-114, 2000.
- NAKANISHI, I.; UTO, Y.; OHKUBO, K.; MIYAZAKI, K.; YAKUMARU, H.; URANO, S.; OKUDA, H.; UEDA, J-I.; OZAWA, T.; FUKUHARA, K.; FUKUZUMI, S.; NAGASAWA, H.; HORI, H.; IKOTA, N. Efficient radical scavenging ability of artemillin C, a major component of Brazilian propolis, and the mechanism. **Organic Biomolecula Chemical**, v. 3, p. 1452-1454, 2003.
- PACHECO, Tatiana Andrade Rabello Carvalho. **Determinação das características físico-químicas e propriedades biológicas das própolis de *Apis mellifera* coletadas no Estado de São Paulo**. Campinas, 2001, 72p. Dissertação (Mestre em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- PAREDES-GUZMÁN, J.; AGUIAR, C.L.; FUJIWARA, F.; PARK, Y.K. Estudo das própolis que contem Artemillin C, **Mensagem Doce**, n. 74, p. 9-16, 2003.
- PARK, Y.K.; PAREDES-GUZMÁN, J.F.; AGUIAR, C.L.; ALENCAR, S.M.; FUJIWARA, F., Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main

- botanical origin of Southeastern Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 5, p. 1100-1103, 2004.
- PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.; AGUIAR, C.L. Botanical Origin and Chemical Composition of Brazilian Propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 50, n. 9, p. 2505-2506, 2002a.
- PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.; SCAMPARINI, A.R.P.; AGUIAR, C.L. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguay: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**, v. 32, n. 6, p. 997-1003, 2002b.
- PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M., Classificação das própolis brasileira através de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. **Mensagem Doce**, n. 58, p. 2-7, 2000a.
- PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M. *et al.* Evaluation of Brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. **Honeybee Science**, v. 21, n. 2, p. 85-90, 2000b.
- PARK, Y. K.; IKEGAKI, M. Preparation of water and ethanolic extracts of propolis and evaluation of the preparation. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 62, n. 11, p. 2230-2232, 1998.
- 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. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 40, n. 1, p. 97-106, 1997.
- PARK, Y.K.; KOO, M.H.; SATO, H.H.; CONTADO, J.L., Estudo de alguns componentes da própolis coletada por *Apis mellifera* no Brasil. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 38, n. 4, p. 1253-1259, 1995.

- PEREIRA, A. S.; PEREIRA A. F.M.; TRUGO, L.C.; NETO, F.R.A. Distribution of quinic acid derivatives and other phenolic compounds in Brazilian propolis. **Z. Naturforschung**, 58c, p. 590-593, 2003.
- PEREIRA, A.S.; NASCIMENTO, E.A.; NETO, F.R.A. Lupeol alkanates in Brazilian propolis. **Z. Naturforschung**, 57c, p. 721-726, 2002a.
- PEREIRA, A.S.; RODRIGUES, F.; SEIXAS, M.S.; NETO, F.R.A. Propolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 321-326, 2002b.
- PEREIRA, A.S.; NORSELL, M.; CARDOSO, J.N.; NETO, F.R.A. Rapid screening of polar compounds in Brazilian propolis by High-Temperature High-Resolution Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 11, p. 5226-5230, 2000.
- PEREIRA, A.S.; RAMOS, M.F.S.; POÇAS, E.S.C.; DIAS, P.C.M.; SANTOS, E.P.; SILVA, J.F.M.; CARDOSO, J.N.; NETO, F.R.A. Study of propolis by high temperature high resolution gas chromatography-mass spectrometry. **Z. Naturforschung**, 54c, p. 395-400, 1999.
- PHILLIPS, I. A guide to sensitivity testing. Report of the working on antibiotic sensitivity testing of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy, **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 27, p. 1-50, June 1991.
- PULGAR VIDAL, J. 1967. **Geografía del Perú: Las ocho regiones naturales**. Editorial Ausonia. Lima.
- RUBIO, O.C.; CUELLAR, A.C.; ROJAS, N.; CASTRO, H.V.; RASTRELLI, L.; AQUINO, R. A. Polyisoprenylated benzophenone from Cuban propolis. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 7, p. 1013-1015, 1999.

- SANCHEZ-MORENO, C. Compuestos polifenólicos: Efectos fisiológicos. Actividad antioxidante. **Alimentaria**. p. 29-40, Enero-Febrero, 2002.
- SANTOS, F.A.; BASTOS, E.M.A.; UZEDA, M.; CARVALHO, M.A.R.; FARIAS, L.M.; MOREIRA, E.S.A.; BRAGA, F.C. Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 80, n. 1, p. 1-7, 2002.
- SAWAYA, A.C.H.F.; TOMAZELA, D.M.; CUNHA, I.B.S.; BANKOVA, V.S.; MARCUCCI, M.C.; CUSTODIO, A.R.; EBERLIN, M.N. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis. **The Analyst**, v. 129, p. 739-744, 2004.
- SFORCIN, J. L.; FERNANDES JR, A.; LOPES, C. A. M.; BANKOVA, V.; FUNARI, S. R. C. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, n. 1-2, p. 243-249, 2000.
- SHIMIZU, K.; ASHIDA, H.; MATSUURA, Y.; KANAZAWA, K. Antioxidative bioavailability of artemisin C in Brazilian propolis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 424, p. 181-188, 2004.
- SU, Z.; LIN, J.; GRUNBERGER, D.; FISHER, P. B. Growth suppression and toxicity induced by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in type 5 adenovirus-transformed rat embryo cells correlate directly with transformation progression. **Cancer Research**, v. 54, p. 1865-1870, 1994.
- TAZAWA, S.; WARASHINA, T.; NORO, T.; MIYASE, T. Studies on the constituents of Brazilian propolis. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**. v. 46, n. 9, p. 1477-1479, 1998.

- TOMÁS-BARBEÁN, F.A.; GARCIA-VIGUERA, C.; VIT-OLIVIER, P.; FERRES, F.; TOMÁS-LORENTE, F., Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. **Phytochemistry**, v. 34, n. 1, p. 191-196, 1993.
- VYNOGRAD, N.; VYNOGRAD, I.; SOSNOWSKI, Z.A comparative multi-centre study of the efficacy of propolis, acyclovir and placebo in the treatment of genital herpes (HSV). **Phytomedicine**, v. 7, p. 1-6, 2000.
- WOISKY, R.G.; SALATINO A. Analysis of propolis some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**. v. 37, n. 2, p. 99-105, 1998.
- WOLLENWEBER, E.; BUCHMANN, S.L. Floral honey bees in the Sonoran Desert: Propolis sources other than poplars (*Populus* spp.) **Z. Naturforschung**, 52c, p. 530-535, 1997.
- WOLLENWEBER, E.; ASAKAWA, Y.; SCHILLO, D.; LEHMANN, U.; WEIGEL, H. A novel caffeic acid-derivate and other constituents of populus bud excretion and propolis (bee-glue). **Z. Naturforschung**, 42c, n. 9-10, p. 1030-1034, 1987.
- YAMAGUCHI, T.; TAKAMURA, H.; MATOBA, T.; TERAOKA, J. HPLC Method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 62, n. 6, p. 1201-1204, 1998.
- YAMAUCHI, R.; KATO, K.; OIDA, S.; KANAEDA, J.; UENO, Y. Benzyl caffeate an antioxidative compound isolated from propolis. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 56, p. 1321-1322, 1992.
- YEN, G-C.; WU, J-Y. Antioxidant and radical scavenging properties of extracts from *Ganoderma tsugae*. **Food Chemistry**, v. 65, p. 375-379, 1999.