

Caraterização química e biológica do própolis da “Serra de Bornes” por TLC.

Vanessa Marina Branco Paula

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança
para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar*

Orientado por

Professora Doutora Maria Leticia Miranda Fernandes Estevinho

Professor Doutor Luís Avelino Guimarães Dias

**Bragança
2012**

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço à minha orientadora Professora Doutora Letícia Estevinho, pela disponibilidade, conhecimentos transmitidos e amizade.

Ao Professor Doutor Luís Dias, pela dedicação e disponibilidade constantes na realização do trabalho laboratorial e escrito, pelos conhecimentos transmitidos, amizade e paciência.

À Professora Doutora Maria do Rosário Domingues, do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, pela disponibilidade e ajuda na análise de LC-MS.

Ao Eng.º Jorge Sá Morais, pela disponibilidade, ajuda e pelos conhecimentos transmitidos.

Ao pessoal do Laboratório de Microbiologia, D^a Arminda, D^a Fátima, Ana Paula, e alguns colegas de mestrado que por lá passaram, pela ajuda e disponibilidade prestadas no laboratório.

Ao Nuno, pela sua prontidão em ajudar, pelo apoio, boa disposição e amizade.

Às minhas amigas, Filipa e Patrícia, a quem agradeço a companhia em todos os momentos, os conselhos, o incentivo, apoio e amizade. Obrigado pelos bons momentos passados, que alegraram os nossos dias e ficarão guardados na memória.

À minha grande amiga Tânia, que mesmo longe, sempre me apoiou e interessou com a realização deste trabalho.

Ao Abel, pelo companheirismo e apoio em todos os momentos, paciência e compreensão nos momentos mais difíceis, pelo carinho e sobretudo por ser o meu melhor amigo.

Aos meus pais, pelo incentivo e apoio ao longo desta etapa, pelos conselhos, atenção, paciência, amor e carinho. À minha irmã, pelas conversas, apoio e momentos de descontração. Aos meus avós pela preocupação e constante interesse neste trabalho.

A todos os amigos e familiares que não foram citados, mas que torcem por mim e estão felizes por mais uma conquista.

E por fim, um muito obrigado a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

RESUMO.....	viii
ABSTRAT	xii
Capítulo 1: Introdução.....	1
1.1. Própolis.....	2
1.1.1. Origem do própolis.....	2
1.1.2. Composição química do própolis/ fatores que a modificam.....	3
1.1.3. Origem botânica	8
1.1.4. Propriedades bioativas do própolis	9
1.1.5. Aplicação na indústria farmacêutica e alimentar	12
1.2. TLC- Cromatografia em Camada Fina.....	13
1.2.1. Fundamentos de utilização	15
1.2.2. Fases estacionárias – interações	16
1.2.3. Fases móveis – alteração da polaridade	16
1.2.4. Métodos de visualização	17
1.2.5. Análise qualitativa/ quantitativa com TLC	22
1.3. Outros métodos analíticos	25
1.3.1. HPLC-DAD - Cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de Diodo-Array	26
1.3.2. MS – Espetrometria de massa	26
1.4. Objetivos.....	28
Capítulo 2: Material e Métodos.....	29
2.1. Amostragem	30
2.1.1. Tratamento da amostra	31
2.2. Análise polínica	31
2.2.1. Preparação da solução de própolis	32
2.2.2. Procedimento experimental.....	32
2.3. Extração de compostos fenólicos	32
2.4. Determinação de compostos fenólicos totais.....	33
2.4.1. Preparação da solução de própolis	34
2.4.2. Análise de fenóis totais	34

2.4.3. Determinação da curva padrão	34
2.5. Determinação de flavonoides totais.....	34
2.5.1. Preparação da solução de própolis	35
2.5.2. Análise de flavonoides totais.....	35
2.5.3. Determinação da curva padrão	35
2.6. Atividade antioxidante.....	35
2.6.1. Poder redutor	36
2.6.2. DPPH.....	36
2.7. Preparação das placas de TLC.....	37
2.8. Visualização dos compostos fenólicos na placa de TLC.....	39
2.8.1. Reagente de cloreto de alumínio	39
2.8.2. Reagente de cloreto de ferro.....	39
2.8.3. Reagente Folin-Ciocalteu.....	40
2.8.4. Reagente DPPH (2,2- difenil-1-picrilhidrazil)	40
2.8.5. Reagente de vanilina	40
2.9. Atividade antimicrobiana	40
2.9.1. Preparação do extrato de TLC.....	40
2.9.2. Microrganismos e condições de Cultura	41
2.9.3. Análise da atividade antimicrobiana	41
2.10. HPLC	43
2.10.1. Preparação da solução dos extratos de TLC.....	43
2.10.2. Análise por HPLC	43
2.10.3. Equipamento de HPLC	43
2.11. MS.....	44
2.11.1. Preparação do extrato	44
2.11.2. Análise por MS e equipamento	44
Capítulo 3: Resultados e Discussão.....	45
3.1. Análise polínica	46
3.2. Determinação de compostos fenólicos totais.....	47
3.3. Determinação de flavonoides totais.....	49
3.4. Atividade antioxidante.....	50
3.4.1. Poder redutor	50

3.4.2. DPPH.....	51
3.5. Preparação das placas de TLC.....	54
3.6. Visualização dos compostos fenólicos na placa de TLC.....	54
3.6.1. Reagente de cloreto de alumínio	55
3.6.2. Reagente de cloreto de ferro.....	55
3.6.3. Reagente Folin-Ciocalteu.....	56
3.6.4. Reagente DPPH.....	57
3.7. Atividade antimicrobiana	60
3.8. HPLC	62
3.9. MS	72
Capítulo 4: Conclusão	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Exemplos de compostos fenólicos encontrados em amostras de própolis.....	7
Tabela 2. Concentração (mg/mL) das amostras utilizadas para a análise da atividade antimicrobiana.	42
Tabela 3. Valores determinados para os fenóis, flavonoides totais e a atividade antioxidante para o própolis de Bornes e Lousã.....	53
Tabela 4. Reação dos reagentes com as manchas separadas na placa de TLC.....	59
Tabela 5. Atividade antimicrobiana de várias amostras de extratos de TLC analisadas.	61
Tabela 6. Tempo de retenção e possível família de composto fenólico dos picos obtidos da análise de casa mancha por HPLC.....	70
Tabela 7. Identificação dos compostos por MS presentes nos extratos de TLC com identificação do composto fenólico a que pertence.....	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Própolis a isolar a colmeia.	3
Figura 2. Aspeto do própolis na sua fase sólida.	4
Figura 3. Estrutura química dos ácidos fenólicos mais frequentes.	5
Figura 4. Estrutura geral dos flavonoides.	6
Figura 5. Estruturas das principais classes de flavonoides.	6
Figura 6. Localização das amostras de própolis no mapa de Portugal (Serra de Bornes e Serra de Lousã).	30
Figura 7. Extrato de própolis.	33
Figura 8. Amostra de própolis tratada com éter dietílico.	33
Figura 9. Extrato seco de própolis.	33
Figura 10. Solução de compostos fenólicos do própolis.	37
Figura 11. Placas de TLC e microseringa.	38
Figura 12. Sequência da análise bidimensional.	38
Figura 13. Luz ultravioleta.	39
Figura 14. Caraterização polínica da amostra de própolis de Bornes.	46
Figura 15. Reta de calibração dos compostos fenólicos totais para as amostras de própolis de Bornes e Lousã.	48
Figura 16. Reta de calibração dos compostos de flavonoides totais para as amostras de própolis de Bornes e Lousã.	49
Figura 17. Poder redutor do extrato seco da amostra de própolis de Bornes.	51
Figura 18. Efeito bloqueador do DPPH do extrato seco da amostra de própolis de Bornes.	52
Figura 19. Separação de compostos fenólicos na placa de TLC.	54
Figura 20. Resultado da pulverização da placa de TLC com o reagente cloreto de alumínio.	55
Figura 21. Resultado da pulverização da placa de TLC com o reagente cloreto de ferro.	56
Figura 22. Resultado da pulverização da placa de TLC com o reagente Folin-Ciocalteu.	57
Figura 23. Resultado da pulverização da placa de TLC com o reagente DPPH.	57
Figura 24. Resultado da pulverização da placa de TLC com o reagente vanilina.	58
Figura 25. Manchas separadas por TLC utilizadas para a atividade antimicrobiana. ...	60
Figura 26. Microplaca com os resultados da amostra A11.	62

Figura 27. Microplaca com os resultados da amostra A26.	62
Figura 28. Cromatogramas de HPLC dos extratos de acetonitrilo obtidos para as manchas de TLC de 1 a 4.	63
Figura 29. Cromatogramas de HPLC dos extratos de acetonitrilo obtidos para as manchas de TLC de 5 a 8.	64
Figura 30. Cromatogramas de HPLC dos extratos de acetonitrilo obtidos para as manchas de TLC de 9 a 12.	65
Figura 31. Cromatogramas de HPLC dos extratos de acetonitrilo obtidos para as manchas de TLC de 13 a 16.	66
Figura 32. Cromatogramas de HPLC dos extratos de acetonitrilo obtidos para as manchas de TLC de 17 a 20.	67
Figura 33. Cromatogramas de HPLC dos extratos de acetonitrilo obtidos para as manchas de TLC de 21 a 24.	68
Figura 34. Cromatogramas de HPLC dos extratos de acetonitrilo obtidos para as manchas de TLC de 25 e 26.	69

RESUMO

O própolis é uma substância resinosa, obtida pelas abelhas *Apis mellifera*, considerado como um produto “antibiótico natural” que desempenha um papel importante na defesa da colmeia, protegendo-a de microrganismos, fungos, bactérias e vírus. Este produto possui na sua composição uma grande variedade de compostos, salientando-se os compostos fenólicos, aos quais se atribuem forte poder antioxidante e atividade antimicrobiana.

Neste trabalho usaram-se duas amostras de própolis de origem geográfica diferente: Bornes e Lousã. Estudou-se a composição polínica, os teores totais de compostos fenólicos e flavonoides, bem como, as propriedades antioxidantes na amostra de Bornes. Da análise do extrato de própolis por TLC (cromatografia em camada fina), efetuaram-se estudos da atividade antimicrobiana usando-se extratos de manchas removidas da placa de TLC, selecionadas por terem grande concentração de compostos (manchas mais escuras). Os extratos das manchas separadas na placa de TLC foram analisados por HPLC e MS.

A amostra de Lousã foi analisada no seu conteúdo em teores de compostos fenólicos totais e flavonoides totais.

A análise polínica da amostra de própolis de Bornes mostrou que nesta predominavam os pólenes *Erica* sp. e *Castanea* sp. com valores de abundância de 41% e 32% , respetivamente.

A análise do perfil químico de amostras de própolis de Bornes e Lousã baseou-se nos teores de compostos fenólicos totais e flavonoides totais. Os teores de compostos fenólicos totais foram determinados pelo método de Folin-Ciocalteu, utilizando como padrão o ácido gálico. Os resultados obtidos foram de $91,5 \pm 0,7$ mg/L e de 117 ± 2 mg/L para as amostras de Bornes e Lousã, respetivamente. O doseamento de flavonoides totais baseou-se no método espectralométrico usando o reagente cloreto de alumínio e como padrão, a quercetina. Os resultados obtidos foram de $23,4 \pm 0,8$ mg/L e de $32,9 \pm 0,1$ mg/L para as amostras de Bornes e Lousã, respetivamente.

A atividade antioxidante foi avaliada pelo método do poder redutor e pelo efeito bloqueador de radicais livres de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) para a amostra de própolis de Bornes. Para o método do poder redutor os resultados evidenciaram valores de EC_{50} de $0,33 \pm 0,02$ mg/mL, e para o método de DPPH demonstraram valores mais baixos de EC_{50} , $0,072 \pm 0,003$ mg/mL.

O extrato de própolis de Bornes foi analisado por TLC (sílica gel 60 com fluorescência a 254 nm) usando a técnica bidimensional com o objetivo de obter uma primeira separação de compostos para posteriormente serem identificados por HPLC-DAD e MS. A separação dos compostos fenólicos na placa de TLC foi visualizada usando reagentes ou radiação UV 254 nm. Os reagentes usados na visualização das manchas referentes aos compostos fenólicos separados na placa de TLC, foram: cloreto de alumínio, cloreto de ferro, Folin-Ciocalteu, DPPH e vanilina.

Para analisar a atividade antimicrobiana selecionaram-se manchas de TLC com grande concentração de compostos (manchas mais escuras) provenientes do própolis de Bornes. A extração dos compostos da sílica gel da mancha selecionada foi efetuada usando-se o solvente dimetilsulfóxido (DMSO). Os compostos presentes nas manchas de TLC isoladas e testadas inibiram os microrganismos em estudo (*Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*).

O método de HPLC com detetor DAD foi usado com o objetivo de analisar os extratos da sílica gel de todas as manchas identificadas na placa de TLC, de forma a identificar a que família de compostos fenólicos pertencem os picos obtidos em cada cromatograma. Nos cromatogramas de cada extrato verificou-se sempre a presença de vários picos mostrando que a separação por TLC não permite um isolamento total dos compostos. A identificação da família do composto fenólico de cada pico presente nos cromatogramas foi feita por comparação com padrões puros, e só nos casos de se ter uma “semelhança elevada” nos espectros UV é que se avançou com a identificação do grupo a que pertence o composto fenólico. Dos identificados, a família de compostos fenólicos mais abundante foi a dos ácidos hidroxicinâmicos.

Neste trabalho faz-se uma breve apresentação de resultados preliminares obtidos com o método MS, com o objetivo de dar continuidade a este trabalho no futuro. Este método ainda está a ser estudado nas suas condições experimentais de forma a identificar todos os compostos fenólicos presentes nos extratos das manchas separadas na placa de TLC. Os primeiros resultados mostram que os compostos presentemente identificados são derivados do ácido cafeico e da pinobanksina.

Palavras-chave: própolis, análise polínica, fenóis totais, flavonoides totais, atividade antioxidante, TLC, atividade antimicrobiana, compostos fenólicos.

ABSTRAT

Propolis is a resinous substance obtained by honey bees *Apis mellifera*, a product considered "natural antibiotic" which plays an important role in defending the hive, protecting it from microorganisms, fungi, bacteria and viruses. This product has a large variety of compounds in its composition, giving greater emphasis to the phenolic compounds, which are attributed strong antioxidant and antimicrobial activities.

This work used two propolis samples of different geographical origin: Bornes and Lousã. It was studied the pollen composition, the total content of flavonoids and phenolic compounds, as well as the antioxidant properties of the Bornes sample. Analysis with propolis extracts separated by TLC (Thin-Layer Chromatography), were made in studies of antimicrobial activity by using extracts of stains removed from the TLC plate, selected for having large concentration of compounds (darker stains). The extracts of stains separated on TLC plate were analyzed by HPLC and MS.

The Lousã sample was analyzed in their content in phenolic compounds and total flavonoids.

Pollen analysis of the Bornes propolis sample showed that the predominant pollens *Erica* sp. and *Castanea* sp. had abundance values of 41% and 32%, respectively.

The analysis of the chemical profile of Bornes and Lousã propolis samples was based on the content of total phenolic compounds and flavonoids. The concentrations of total phenolics were determined by Folin-Ciocalteu, using gallic acid as standard. The results were $91,5 \pm 0,7$ mg/L and 117 ± 2 mg/L for the samples of Bornes and Lousã, respectively. The assay of total flavonoids was based on the spectrophotometric method using the reagent aluminum chloride and as standard compound, quercetin. The results were $23,4 \pm 0,8$ mg/L and $32,9 \pm 0,1$ mg/L for samples of Bornes and Lousã, respectively.

The Bornes sample antioxidant activity was evaluated by the method of reducing power and the blocking effect of free radicals of DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) for the sample. The assay of reducing power showed EC_{50} values of $0,33 \pm 0,02$ mg/mL, and the DPPH assay showed lower values of EC_{50} , $0,072 \pm 0,003$ mg/mL.

The Bornes propolis extract was analyzed by TLC (silica gel 60 with fluorescence at 254 nm) using the two-dimensional technique in order to obtain an initial separation of compounds for later identification by HPLC-DAD and MS. The separation of the phenolic compounds in the TLC plate was visualized using UV irradiation at 254 nm or chemical reagents. The reagents used in the visualization of

stains pertaining to phenolic compounds separated on TLC plate, were: aluminum chloride, iron chloride, Folin-Ciocalteu, DPPH and vanillin.

To analyze the antimicrobial activity were selected TLC stains with high concentrations of compounds (darker stains) from the Bornes propolis two-dimensional TLC analysis. The compounds extraction from the selected silica gel stain was carried out using the solvent dimethylsulfoxide (DMSO). The extracted compounds of the TLC spots isolated and tested inhibited the growth of the microorganisms under study (*Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*).

The HPLC method with DAD detector was used to analyze the extracts of silica gel of all stains identified on TLC plate in order to identify the family of phenolic compounds belonging to the peaks in each chromatogram obtained. In the chromatograms of each extract, it was verified the presence of several peaks showing that separation by TLC does not permit a total isolation of each compound. The identification of the phenolic compounds family in each peak in the chromatograms was done by comparison with pure standards. Only in cases of having a "high similarity" in the UV spectrum, it was possible to advance with the identification of the family to which compound phenolic belongs. Of the identified family of phenolic compounds, the most abundant was hydroxycinnamic acid.

This work makes a brief presentation of preliminary results obtained with the MS method, being a component of this work that remains to be completed, in order to identify all phenolic compounds present in the extracts of stains separated on TLC plate. Initial results show that the compounds identified are presently caffeic acid derivatives and pinobanksina.

Keywords: propolis, pollen analysis, total phenols, total flavonoids, antioxidant activity, TLC, antimicrobial activity, phenolic compounds.



Capítulo 1

Introdução

- 1.1. Própolis
- 1.2. TLC- Cromatografia em Camada Fina
- 1.3. Outros métodos analíticos
- 1.4. Objetivos

1.1. Própolis

1.1.1. Origem do própolis

A palavra própolis vem do grego, em que “pro” significa “em defesa de” e “polis” é “cidade”, ou seja, “em defesa da colmeia”. O própolis foi sempre considerado como um produto de propriedades especiais para a saúde humana [1-5]. Por exemplo, foi usado pelos egípcios para embalsamar os cadáveres devido à sua atividade antiputrefativa [1-6].

Os médicos romanos e gregos como Galeno, Aristóteles, Plínio e Dioscórides reconheceram as suas propriedades medicinais, tais como cicatrizante e antisséptico no tratamento de feridas e desinfecção bucal [1,3,7].

No tratamento de problemas de saúde começou a ser utilizado nos anos de 1950/1960 por alguns países do leste da Europa (Polônia e República Checa) e no ano de 1980 em países como o oeste da Europa, América do Sul e Norte e o Japão [1]. Foi na metade dos anos 80 que se tornou importante na medicina complementar e alternativa, sendo hoje em dia usado na indústria farmacêutica [1,4].

Devido à sua relevância, existem já estudos sobre o própolis em diversas áreas, desde a otimização dos processos de extração até ao controlo da qualidade [8].

Trata-se de uma substância resinosa, pegajosa e aromática, obtida pelas abelhas *Apis mellifera* a partir de líquidos secretados no desenvolvimento inicial de botões florais e foliares, pólen e exsudados de determinadas plantas [1-3,5,9,10-15]. As abelhas ainda adicionam enzimas das secreções salivares, nomeadamente a enzima β -glicosidase que hidrolisa os flavonoides glicosilados a agliconas, que depois de parcialmente digerido acrescentam cera, por elas produzida, que torna a substância moldável [1-3,5,9,10,11,13,16,17].

As abelhas utilizam este produto para reparar os alvéolos de criação, proteger a colmeia contra infeções, fechar pequenas frinchas (Figura 1) e embalsamar insetos mortos que não podem ser retirados da colmeia, impedindo assim que sofram a putrefação e propagação de doenças dentro da colmeia [3,5,6,18-21]. Na colmeia, a sua ação é importante contra bactérias e fungos, criando um ambiente estéril e mantendo a temperatura no seu interior praticamente constante [3,15]. Esta substância apresenta uma cor que depende da sua origem floral, geográfica e idade (tempo após colheita do produto), que vai desde o amarelo claro ao castanho-escuro, quase preto [1-4,10,13,22].



Figura 1. Própolis a isolar a colmeia (Fonte: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Própolis>).

Embora o própolis apresente várias propriedades benéficas para a saúde humana referidas em estudos de própolis de outros países, o produzido em Portugal ainda não é muito valorizado, estando-se numa fase inicial de conhecimento científico da sua composição química, origem botânica e propriedades biológicas [17,23]. Alguns dos estudos incidem sobre as avaliações dos compostos fenólicos totais e as propriedades antioxidantes, antitumoral, anti-inflamatória e antimicrobiana de própolis obtido em zonas do Nordeste, Centro e Sul de Portugal [23].

1.1.2. Composição química do própolis/ fatores que a modificam

A composição do própolis é complexa e varia consoante as características fitogeográficas de onde se situa a colmeia e a época de colheita da resina [1-3,5,9,16,24-30]. Silva *et al.* (2006) [15] comprovou que a composição química varia de acordo com o período de colheita da resina, verificando também diferenças significativas entre colmeias. Geralmente, da sua composição fazem parte resinas (50%), ceras (30%), óleos essenciais (10%), pólen (5%) e detritos (5%) [1-3,5,9,31].

Contudo esta percentagem dos constituintes do própolis pode variar conforme as espécies de plantas que as abelhas polinizam, o seu uso na colmeia, por exemplo, para reparar as células do mel é usada uma maior quantidade de cera para lhe conferir uma maior resistência, mas para reparar a superfície de outras células da colmeia empregam uma menor proporção de cera [2,3]. As abelhas adicionam mais cera no própolis em épocas em que as resinas vegetais são raras ou difíceis de recolher [2,3]. Ou seja, a consistência do própolis à temperatura ambiente depende da relação resina/cera presente na sua composição. Apresentando uma consistência mais rígida (Figura 2), indica que tem uma maior percentagem de resinas, o que se torna desejável uma vez que as atividades biológicas verificadas no própolis são atribuídas às substâncias presentes nas

resinas. Caso se apresente maleável indica que possui uma percentagem elevada de ceras [10].

Apesar desta relação resina/cera existente no própolis, este quando frio apresenta uma textura dura e quebradiça e quando quente apresenta-se brando e pegajoso [2,13].



Figura 2. Aspeto do própolis na sua fase sólida.

A análise ao aroma e sabor de uma amostra de própolis permitem verificar se esta foi produzida pelas abelhas há muito tempo ou recentemente. Quando produzido há muito tempo estas características tornam-se menos evidentes [10].

Existem fatores que modificam a composição do própolis, tais como a disponibilidade das resinas, a origem geográfica das substâncias nelas presentes, as variações sazonais (pluviosidade, variações de temperatura e pasto apícola) durante o ano e ainda a variabilidade genética da abelha rainha, uma vez que usam as substâncias secretadas pelo seu próprio organismo na preparação do própolis [1,3,4,18,32]. Própolis de regiões diferentes tem uma composição química distinta [4].

Relativamente às variações sazonais, alguns compostos biologicamente ativos como seja, os compostos fenólicos, diminuem verifica-se no entanto, o aumento de outros, como por exemplo os ácidos diterpênicos [18].

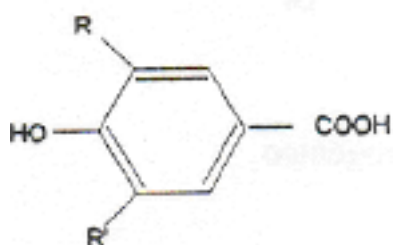
As variações na composição do própolis vão influenciar as suas propriedades farmacológicas, de facto, nas zonas tropicais a variação da composição é superior à das zonas temperadas devido à maior disponibilidade vegetal existente nos primeiros locais [7].

No própolis predominam as substâncias químicas dos grupos flavonoides (flavonas, flavanonas e flavonóis), terpenos, estilbenos, β -esteróides, aldeídos aromáticos, álcoois, vitaminas e sais minerais (cálcio, ferro, cobre, alumínio, manganês, vanádio e silício) [1,15,24,33-38].

Os compostos com maior relevância devido às suas propriedades biologicamente ativas são os compostos fenólicos (flavonoides, ácidos fenólicos, cumarinas e taninos), bem como os derivados do ácido cinâmico, seus ésteres e os diterpenos [6,20,26,39].

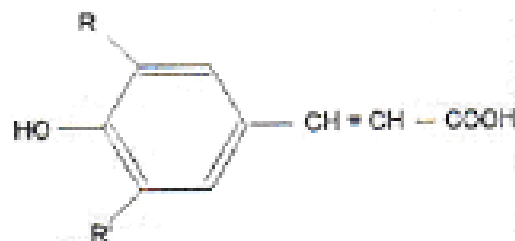
Os compostos fenólicos são metabolitos secundários de plantas, que podem surgir nas folhas, flores, frutos e outros tecidos de plantas. Os ácidos fenólicos dividem-se em duas classes, os ácidos cinâmicos com nove átomos de carbono (C_6-C_3) e os ácidos benzóicos com sete átomos de carbono (C_6-C_1) [39,40]. Na Figura 3 apresentam-se as estruturas gerais destes dois grupos de compostos, bem como, alguns exemplos de cada.

Derivados do ácido benzóico



$R=R'=H$; **ácido p-hidroxibenzóico**
 $R=R'=OH$; **ácido gálgico**

Derivados do ácido cinâmico



$R=R'=H$; **ácido p-cumárico**
 $R=OH, R'=H$; **ácido cafeico**
 $R=OCH_3, R'=H$; **ácido ferúlico**

Figura 3. Estrutura química dos ácidos fenólicos mais frequentes [39].

Os flavonoides são caracterizados pela presença de dois anéis aromáticos benzênicos ligados por uma cadeia com três átomos de carbono (que pode ou não formar um terceiro anel) com a estrutura geral $C_6-C_3-C_6$. Está representada (Figura 4) a estrutura geral dos flavonoides mais comuns, com os anéis designados por A, B e C e o sistema de numeração. Consoante a natureza da cadeia de ligação de três átomos de carbono e o nível de oxidação, surgem diferentes classes de flavonoides, como por exemplo flavonas, flavanonas, flavonóis e flavanóis (Figura 5) [39,40].

Alguns exemplos de compostos fenólicos encontrados em amostras de própolis de diferentes origens geográficas estão apresentados na Tabela 1.

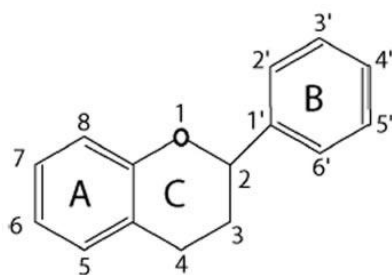
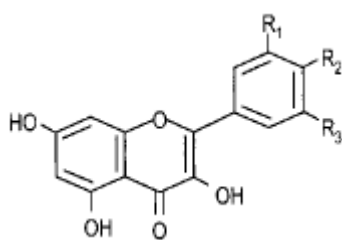


Figura 4. Estrutura geral dos flavonoides [41].

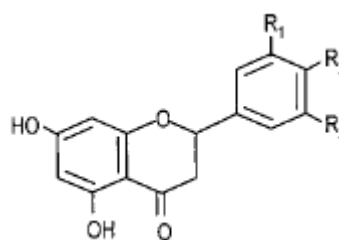
Flavonoides

Flavonóis



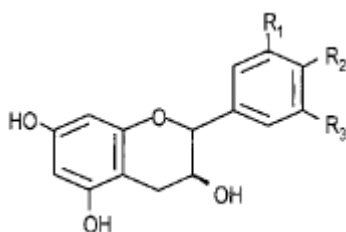
R₂=OH; R₁=R₃; **campferol**
 R₁=R₂=R₃=OH; **quercetina**

Flavanona



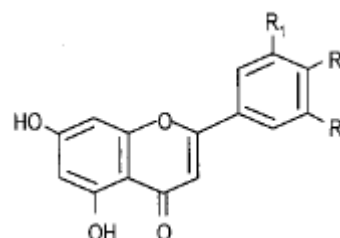
R₁=H; R₂=OH; **narigenina**
 R₁=OH; R₂=OCH₃; **hesperetina**

Flavanóis



R₁=R₂=OH; R₃=H; **catequina**

Flavonas



R₁=H; R₂=OH; **apigenina**
 R₁=R₂=OH; **luteonina**

Figura 5. Estruturas das principais classes de flavonoides [42].

Tabela 1. Exemplos de compostos fenólicos encontrados em amostras de própolis.

Origem da amostra	Família dos compostos	Compostos fenólicos
Própolis Europeu [43]	Ácidos fenólicos	Cafeato benzílico Cafeato fenetil
	Flavonoides	Pinocembrina Crisina Pinobanksina Pinobanksina <i>O</i> -acetato
Própolis da Croácia, Bósnia, Macedónia e Herzegovina [44]	Ácidos fenólicos	Ácido ferúlico Ácido p-cumárico
		Pinocembrina Crisina Apigenina Campferol
Própolis Brasileiro [43]	Ácidos fenólicos	Ácido cumárico Ácido ferúlico
		Apigenina Campferol Pinocembrina Pinobanksina Pinobanksina 3- acetato Crisina
	Flavonoides	
Própolis Turco [45]	Ácidos fenólicos	Ácido cinâmico Ácido cafeico Ácido p-cumárico Ácido benzóico Ácido ferúlico
		Crisina Pinocembrina Pinobanksina Pinobanksina 3- <i>O</i> -acetato
	Flavonoides	
Própolis do Iraque [46]	Ácidos fenólicos	Ácido cafeico Ácido cumárico Ácido ferúlico Ácido cinâmico Ácido cafeico fenetil éster
		Luteonina Apigenina Campferol Crisina Pinocembrina Pinobanksina Quercetina
	Flavonoides	

1.1.3. Origem botânica

A disponibilidade das fontes de resinas e exsudados vegetais é variável de região para região e vão depender do clima, solo e outros fatores onde elas se encontram [4].

O estudo das plantas que são utilizadas como fontes de resina pelas abelhas, é importante para garantir a sua presença em regiões onde se instalam novas colmeias, de modo que as abelhas tenham disponível a resina para produção do própolis [4,24]. A avaliação das melhores regiões para a produção do própolis e seleção dos melhores prazos para a sua recolha, deve ser também estudado para garantir um bom manejo apícola na sua produção [4,24,47].

O pólen existente no própolis é um constituinte valorizado na análise das características e na determinação da origem botânica do própolis [4,24]. Tem várias proveniências podendo ser introduzido como contaminante devido à aderência à resina das exsudações vegetais, pode ser transportado pelo vento ou pelas próprias abelhas que o recolhem para o armazenar dentro da colmeia [4,11].

Na análise polínica ao própolis a avaliação das estruturas morfológicas dos vegetais (tecidos epidérmicos, tricomas filamentosos, glândulas e estômatos) permitem, indicar as espécies de vegetação polinizadas pelas abelhas para a produção do própolis ou a percentagem da origem botânica nele presente [4,11,24,48]. Sendo assim, em quase todos os casos podemos definir a origem de uma amostra de própolis baseando-nos no respetivo espetro polínico [4,11,48].

Na América do Norte, Europa e oeste da Ásia a fonte vegetal predominante é a espécie *Populus* (Choupo) [1,3,47,50,51]. Amostras provenientes destas zonas têm uma composição química idêntica, tendo como principais constituintes os compostos fenólicos, agliconas de flavonoides, ácidos aromáticos e seus ésteres [3,6,30,52-54]. Amostras provenientes de diferentes zonas tropicais apresentam uma composição química distinta e podemos encontrar na sua constituição diferentes compostos fenólicos, ácido p-cumárico, flavonoides e benzofenonas, e terpenos [52-54].

Outras fontes de resina para a produção de própolis são a *Betula* (Bétula), *Ulmus* (Ulmeiro), *Pinus* (Pinheiro), *Quercus* (Carvalho), *Acaci* (Acácia) e *Salix* (Salgueiro) [1,3].

A composição química do própolis comparada com a sua possível fonte vegetal, é o melhor indicador da sua origem botânica [1,4,47,49,55]. O estudo da origem botânica e geográfica do própolis é essencial para o controlo da qualidade e

padronização das amostras (características típicas do própolis de determinada origem, assim como a sua composição química e as suas atividades biológicas) para posterior aplicação terapêutica [1,10,19,49].

1.1.4. Propriedades bioativas do própolis

Têm sido efetuados diversos estudos farmacológicos sobre o própolis devido às suas propriedades biológicas a referir, antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, antiviral, anticancerígena, entre outras [1,4,9,12,13,16,19,28,35,36,38,52,56-59]. Estas propriedades biológicas atribuídas ao própolis estão diretamente ligadas à sua composição química, principalmente aos teores em flavonoides e ácidos fenólicos [4,10,12,13,36,58,60,61].

1.1.4.1. Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana (antibacteriana e antifúngica) é a atividade biológica do própolis mais estudada [1,4,19,31,62].

Os compostos responsáveis pela atividade antimicrobiana do própolis são os flavonoides, bem como os ácidos fenólicos e ésteres, cetonas e aldeídos fenólicos [19,48,63].

Das substâncias químicas pertencentes ao grupo dos flavonoides, a flavanona pinocembrina, flavonol galagina e o éster feniletil do ácido cafeico, atuam na inibição da ARN-polimerase bacteriana [1,64-66]. Os elementos como os flavonoides quercetina, galangina e pinocembrina bem como, os ácidos fenólicos como os ácido cafeico, ácido benzóico e ácido cinâmico, causam danos funcionais e estruturais na membrana ou parede celular do microrganismo [1,31]. A quercetina aumenta a permeabilidade da membrana afetando o transporte, a capacidade de síntese de ATP e a sua mobilidade [36,64].

Vários estudos evidenciaram que o própolis tem uma ação inibitória contra bactérias: Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus* sp. e *Micobacterium* sp.); Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* e *Klebsiella*), entre muitos outros [4,5,12,19,32,38,67-69].

Verifica-se que o própolis apresenta uma maior atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas comparativamente às Gram-negativas, mas tal facto ainda não

foi bem explorado na bibliografia, sendo uma das hipóteses explicativas o facto das Gram-negativas possuírem uma parede celular mais complexa e terem um teor em lípidos maior que as Gram-positivas [1,19,38,55,63,70].

O própolis evidenciou também atividade fungicida em testes *in vitro* contra leveduras (não-dermatófitas) e fungos filamentosos (dermatófitos antropofílicos) reconhecidos como causadoras de onicomicoses e contra *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* [1,12,70-72]. Ao longo dos anos tem-se verificado uma atividade sinérgica do própolis com diversos antibióticos, tais como benzilpenicilina, tetraciclina e eritromicina, podendo assim ser uma alternativa terapêutica para combater microrganismos resistentes a drogas [1].

1.1.4.2. Anti-inflamatória

A atividade anti-inflamatória do própolis é atribuída à presença de compostos de ácidos fenólicos e flavonoides tais como, ácido cafeico, quercetina, narigenina, ácido cafeico fenetil éster (CAPE), ácido salicílico, apigenina, crisina, ácido ferúlico e galangina na sua composição [34,64,69]. Esta atividade tem-se verificado em doenças do sistema muscular-articular e outros tipos de inflamações, reumatismos, infeções e torções [5,34]. Dos compostos dos flavonoides, a galangina é importância na inibição da atividade da ciclo-oxigenase (COX) e da lipo-oxigenase (LOX), limitando a ação das enzimas poligalacturonase e reduzindo a expressão da isoforma induzível da COX-2 [1,64].

A ação anti-inflamatória do própolis deve-se também ao CAPE, pela inibição da libertação do ácido araquidónico a partir da membrana celular, resultando na supressão da atividade das enzimas COX-1 e COX-2, e também na inibição da ativação da expressão génica da enzima COX-2 [1,64]. A crisina exhibe também atividade anti-inflamatória, estando a sua ação relacionada com a supressão das atividades pró-inflamatórias da enzima COX-2 e da indução da síntese do óxido nítrico (iNOS) [64]. Outros trabalhos também referem a inibição da produção de óxido nítrico (NO) pelas células de macrófagos, associada à atividade anti-inflamatória do própolis [34,69].

1.1.4.3. Antioxidante

A atividade antioxidante deve-se principalmente à presença de compostos fenólicos (flavonoides, ácidos fenólicos e álcoois, estilbenos, tocoferóis e tocotrienóis) [73,74]. Viuda-Martos *et al.* (2008) [64] verificaram uma correlação positiva entre a presença destes compostos e a atividade antioxidante.

Esta atividade é importante por proteger os sistemas de defesa celulares contra os danos causados pelos radicais livres e outros agentes oxidantes que são os principais no mecanismo de ação de muitas toxinas [64,69].

Estes radicais induzem danos oxidativos nas biomoléculas, tais como os lípidos, hidratos de carbono, proteínas, e ácidos nucleicos, podendo provocar morte celular [64,74].

De facto, a atividade antioxidante do própolis pode contribuir para a prevenção de certas doenças provocadas pelos radicais livres produzidos no nosso organismo, tais como doenças cardiovasculares, reumáticas, neurológicas, psiquiátricas, envelhecimento precoce, neoplasias, osteoporose e diabetes. Evidencia também, efeitos benéficos no tratamento da pele danificada [1,64,74,75].

1.1.4.4. Antiviral

Os poucos estudos sobre a atividade antiviral do própolis referem que o própolis inibe em certas ocasiões a proliferação de vírus [1,11]. Esta atividade está relacionada com a presença de flavonoides e derivados dos ácidos aromáticos [30].

Verificou-se que dos flavonoides existentes no própolis, a crisina e o campferol inibiram o vírus do herpes, o adenovírus e o rotavírus, no entanto a galangina apesar de ser também flavonoide não evidenciou efeito inibidor contra estes vírus [5,30,64].

O ácido ferúlico isopentilo, constituinte do própolis, demonstrou ação inibitória contra o vírus da gripe A [30].

Viuda-Martos *et al.* (2008) [64] e Marcucci (1996) [5] em estudos realizados *in vitro* verificaram que o própolis danificou o ADN e ARN de vários vírus, tais como da estomatite vesicular (VSV), herpes simples (HSV) do tipo 1 e 2. A quercetina e a rutina foram os compostos responsáveis pela atividade antiviral.

Outros estudos *in vitro* efetuados por Lustosa *et al.* (2008) [1] e Gekker *et al.* (2005) [76] revelaram que o própolis tem atividade antiviral contra as variantes X4 e R5 do vírus HIV-1. Atividade idêntica foi observada com linfócitos CD4⁺.

1.1.4.5. Anticancerígena

A atividade anticancerígena do própolis está associada aos compostos fenólicos como, por exemplo, quercetina, luteonina, Artepillin C, ácido cafeico e CAPE. A atividade traduz-se num efeito protetor contra alguns tipos de cancro, tais como do pâncreas, pele, cervical, do pulmão, entre outros [33,77]. Os mecanismos associados à prevenção do cancro são a indução da apoptose e a inibição da proliferação das células tumorais [33].

São vários os estudos que relatam a atividade antitumoral do própolis quer *in vitro* quer *in vivo* [21,42,78]. Alguns dos compostos isolados do própolis tais como, o ácido cafeico, CAPE e a quercetina reduzem os nódulos do cancro do pulmão [21,77].

No própolis brasileiro para além dos compostos referidos anteriormente foram isoladas outras substâncias com propriedades biológicas a referir:

- ✓ O composto PMS-1 (diterpeno clerodânico), evidenciou capacidade de inibição do crescimento de células tumorais do fígado por imobilização na fase S do seu crescimento [21,73];
- ✓ O composto PRF-1 (perforina), mostrou atividade antioxidante e citotóxica para as células do carcinoma hepatocelular e do pulmão [21];
- ✓ O composto Artepillin C, demonstrou atividade antitumoral devido à fragmentação do ADN seguida de apoptose. Estes estudos quando efetuados *in vitro* demonstraram uma supressão do crescimento do cancro e quando conduzidos *in vivo* verificou-se um aumento da produção de células T CD4/CD8 pelo sistema imune [21,73].

1.1.5. Aplicação na indústria farmacêutica e alimentar

O própolis já era reconhecido desde a antiguidade como um poderoso antibiótico natural usado na medicina tradicional no tratamento de feridas, úlceras e infeções, como

por exemplo em problemas de pele, sendo posteriormente no final do século XIX utilizado como cicatrizante [7,21,24,33,38,79,80].

Esta substância tornou-se valorizada em tratamento medicinal tanto do ponto de vista económico como de eficácia farmacológica, uma vez que é de fácil obtenção e apresenta inúmeras propriedades farmacêuticas [8,12].

Dos constituintes presentes no própolis, são os compostos antioxidantes que têm um papel importante na saúde humana, na prevenção de diferentes doenças tais como, cancro, doenças inflamatórias, degeneração neurológicas, doenças coronárias, envelhecimento, entre outras. Ainda têm ação no aumento da resistência natural do organismo a infeções e baixar quer a pressão arterial, quer os níveis de colesterol [43].

O própolis aplicado externamente atenua vários tipos de dermatite [43]. Pode ser utilizado a nível dermatológico como, por exemplo, em tratamento de queimaduras, regeneração de tecidos, comichão, ardor, herpes simples e genitais; a nível odontológico como, por exemplo, em cremes dentais para prevenir cáries, tratar gengivites e estomatite; e também a nível cosmético, tais como cremes de rosto, pomadas, loções e soluções [2,13,43,82,83].

Além da sua aplicação na indústria farmacêutica este produto tem sido largamente utilizado desde a década de 1980 na indústria de alimentos, como alimento saudável, suplemento alimentar (conservação de alimentos, germicida e inseticida) e em bebidas que contêm flavonoides. Estes produtos melhoram a saúde e previnem certas doenças tais como, inflamações, doenças cardíacas, cancro e diabetes [1,13,24,29,33,37,77].

Atualmente é comercializado principalmente no Japão. Existem já rebuçados, chocolates, doces, cremes para a pele, champôs, condicionadores, soluções anti-sépticas, pastas de dentes, chás, sabonetes, batons, protetores solares, geis pós barba, e muitos outros à base do própolis [1,35,83].

1.2. TLC- Cromatografia em Camada Fina

Cromatografia é um método de análise onde uma fase móvel passa sobre uma fase estacionária, de modo que uma mistura de substâncias seja separada nos seus componentes [84-86].

Cromatografia em camada fina (TLC) trata-se de um método analítico, utilizado especialmente em estudos qualitativos [84,87].

O termo TLC (abreviatura do inglês, “Thin-Layer Chromatography”), foi introduzido por E. Stahl em 1956, e significa que a fase estacionária é constituída por uma camada fina aplicada a um suporte sólido [84,87].

Para a utilização do TLC é fundamental que as substâncias ou misturas de substâncias a serem analisadas sejam solúveis num solvente ou mistura de solventes. Este método é utilizado quando [84]:

- ✓ as substâncias não são voláteis ou são de baixa volatilidade;
- ✓ as substâncias são fortemente polares, de polaridade média, não polares ou iónicas;
- ✓ os solventes utilizados degradam os sorventes da coluna LC (cromatografia líquida);
- ✓ as amostras a analisar danificam as colunas de LC ou GC (cromatografia gasosa);
- ✓ quando é necessário analisar várias amostras simultaneamente ou grupos diferentes de compostos, com um custo-eficácia, e com um período de tempo limitado;
- ✓ quando as substâncias a analisar não são detetadas pelos métodos de LC ou GC ou só com grande dificuldade;
- ✓ no caso de não haver fonte de energia elétrica.

A técnica de cromatografia de camada fina, tanto pode ser empregue em substâncias orgânicas como inorgânicas, seja em derivados de fontes naturais ou sintetizados nos laboratórios, em quantidades que podem variar dos níveis do nano grama a microgramas [88].

Esta técnica pode ser usada em análise quantitativa e qualitativa e tem sido aplicada nas áreas da farmácia, química forense, bioquímica, cosmética, alimentar, ambiente, entre outras [84].

1.2.1. Fundamentos de utilização

O método de TLC abrange uma camada fina e uniforme de sorvente com, geralmente, 0,10 a 0,25 milímetros de espessura, aplicada num suporte de vidro, alumínio ou folha de plástico [87,88]. Dos três suportes o vidro é o mais vulgar, tendo o de alumínio e plástico as vantagens de serem mais flexíveis, podendo ser cortados facilmente em qualquer tamanho, sem que haja interrupção na camada de sorvente. Têm vários sorventes sido utilizados com êxito, nomeadamente sílica gel, celulose, óxido de alumínio, poliamida e géis de sílica quimicamente ligadas. O mais comum é o de sílica gel (64%) seguindo o de celulose (9%) e alumina (3%) [87].

As placas de TLC necessitam de ser ativadas antes de serem utilizadas e um dos métodos usados é a lavagem das placas de sílica gel com metanol na câmara cromatográfica, seguida de secagem durante 30 minutos a 120°C numa estufa. As placas são colocadas na horizontal com a superfície de sílica gel virada para cima. Seguidamente são retiradas da estufa e colocadas num exsiccador (até serem utilizadas) para arrefecerem e ficarem protegidas do contacto com o meio exterior [84,88]. Esta secagem faz com que a água fisicamente absorvida a partir da humidade presente na atmosfera seja evaporada. A temperatura de secagem não deve ser muito elevada pois pode causar alterações irreversíveis nas propriedades cromatográficas da superfície de sílica gel.

Antes de colocar a amostra na placa traça-se a linha de base com um lápis ao longo da qual se colocam as soluções a analisar. No caso de uma análise bidimensional coloca-se um ponto sobre a placa de sílica gel onde se aplica a amostra a analisar. Na placa de TLC, o primeiro (e último) ou único ponto assinalado não deve estar muito perto da borda da placa, uma vez que não se sabe como a amostra se vai deslocar [84].

A amostra é dissolvida num solvente adequado e é aplicada como manchas na placa de sorvente a uns centímetros da borda. O eluente (fase móvel), que pode ser um só solvente ou uma mistura deles, vai fluir por ação capilar através da placa de sorvente, onde foi já aplicada a amostra. Esta ação é possível usando uma câmara retangular de vidro onde se coloca o eluente depois de preparado em quantidades que permitem ter uma altura de 5 mm. A câmara é preferencialmente de vidro para permitir a visualização do movimento da fase móvel pela placa de TLC que deve estar pré-saturada com o vapor do solvente e também para poderem ser utilizados reagentes corrosivos. A placa de TLC é colocada na câmara cromatográfica sendo depois tapada com uma tampa. A frente do eluente vai migrando através do sorvente fazendo migrar também os

componentes da amostra, mas a níveis diferentes, resultando na separação dos mesmos. Logo que a frente de solvente esteja perto do topo da placa de TLC, a placa é retirada da câmara. Com um lápis traça-se a linha da frente do solvente e leva-se a secar. Posteriormente as manchas na placa de TLC poderão ser visualizadas diretamente (luz visível), sob a luz UV, por tratamento químico ou derivatização [87].

1.2.2. Fases estacionárias – interações

Escolher a fase estacionária é um processo importante pois deve-se selecionar uma com seletividade adequada aos compostos a analisar. Para a obtenção de uma separação aceitável, além da composição química da fase estacionária, deve-se ponderar o tamanho médio, a morfologia e a distribuição do tamanho da partícula [84].

Como já foi referido anteriormente o adsorvente mais eficaz em TLC é a sílica mais precisamente a "Sílica Gel 60". Trata-se de uma placa branca, porosa e amorfa, preparada por precipitação de ácido a partir de uma solução de silicato de sódio (Na_2SiO_3) [85,87]. Durante a formação do gel é importante controlar a temperatura e o pH uma vez que têm influência na qualidade do gel formado [87]. Para a placa de sílica gel ser uma boa superfície de suporte utiliza-se gesso, amido, ou ligantes orgânicos para fixar o gel. A sílica gel apresenta características de sorção devido à presença de grupos silanol (SiOH) na sua superfície, que são fracamente dipolares e têm ligações fortes de hidrogénio [85].

1.2.3. Fases móveis – alteração da polaridade

Os resultados cromatográficos podem ser influenciados por três fatores: a polaridade da fase estacionária; a seleção da fase móvel (composição) e a composição da fase de vapor em contacto com a placa. O fator com maior influência numa separação é a composição da fase móvel.

Para se obter uma eficaz separação em TLC é importante o equilíbrio entre a fase móvel e a estacionária. A fase móvel (solvente) só entra em contacto com a fase estacionária no início da separação. A composição da fase móvel raramente é constante ao longo de toda a separação. Alguns desses desvios são observados perto da linha de base (linha de aplicação da(s) amostra(s)) e da frente de solvente.

A composição da fase móvel é menos polar que a da fase estacionária. Por isso, as substâncias que apresentam baixa polaridade e, por isso, maior afinidade para a fase móvel migram juntas mais rapidamente ao longo da placa de TLC [85].

1.2.4. Métodos de visualização

Existem vários métodos de visualização das placas de TLC, pois nem todos os compostos são visivelmente coloridos. Alguns dos compostos são visualizados sob a luz UV ou por emitirem fluorescência quando excitado pela luz UV ou visível; outros, requerem visualização por pulverização ou imersão num reagente adequado. As reações químicas que podem ser realizadas sobre as placas de TLC, não afetam a placa de sorvente devido à constituição inativa dos sorventes, mesmo os que são bastante agressivos tais como, soluções de ácido clorídrico ou sulfúrico. Alguns reagentes são chamados de reagentes universais, uma vez que permitem visualizar uma vasta gama de compostos de diferentes estruturas moleculares. Dentro deste grupo de reagentes podemos incluir as soluções de ácidos, fluoresceína, diclorofluoresceína, vapor de amoníaco e iodo. Há também um grande grupo de reagentes que reagem com compostos com grupos específicos, que são utilizados para detetar classes de compostos, tais como aldeídos, cetonas, esterres, álcoois ou ácidos.

Os métodos de visualização podem ser combinados para se obter uma melhor seletividade e sensibilidade, podendo-se usar primeiro a irradiação UV, seguida de um reagente universal e por fim um grupo específico. Por vezes, para um determinado analito existem vários reagentes de visualização disponíveis, existindo algumas diferenças a nível do limite de sensibilidade e especificidade, devendo-se ter cuidado na sua seleção [85,87].

1.2.4.1. Técnicas não destrutivas

a) Detecção visível

Trata-se daqueles compostos que não necessitam de qualquer procedimento para a sua visualização por serem coloridos. Absorvem na parte visível do espectro eletromagnético, são exemplo os corantes naturais e sintéticos, e nitrofenóis [87].

b) Detecção Ultravioleta

Alguns compostos podem absorver a radiação eletromagnética em comprimentos de onda mais curtos, sendo detetados no intervalo UV de 200-400 nm. Da exposição à luz UV, a radiação no comprimento de onda 254 nm e a 365 nm são as necessárias para absorver ou serem observadas as substâncias fluorescentes. As zonas cromatográficas (manchas) normalmente aparecem escuras em um fundo mais claro ou se ocorre fluorescência, observam-se manchas com uma grande variedade de cores do espectro visível. Para ajudar na visualização, certas placas de TLC são pré-revestidas com um indicador fosforescente inorgânico, ou um indicador orgânico fluorescente [87]. As placas que contêm o indicador fluorescente, quando irradiadas com 254 nm ou 365 nm são designadas por placas “F” ou “UV”. Indicadores F254 (absorvem a 254 nm) podem dar verde (silicato de zinco) ou fluorescência azul (tungstato de magnésio); os indicadores F365 (absorvem a 365 nm) podem ser um abrilhantador, fluoresceína, rodamina ou um corante. Existem placas que têm ambos os indicadores para detetar os compostos que absorvem os dois tipos de comprimentos de onda [89].

1.2.4.2. Reações Reversíveis

a) Vapor de iodo

Este reagente é universal e torna-se útil na deteção de muitas espécies orgânicas, tais como gorduras, hidrocarbonetos, ceras, alguns ácidos gordos e ésteres, esteroides, detergentes, antioxidantes, antibióticos, emulsionantes, farmacêuticos, entre outros, visualizando-os de forma rápida e económica. A sua ação ocorre na presença de zonas lipofílicas na placa cromatográfica, originando uma reação de coloração amarelo-marrom num fundo amarelo mais claro.

A deteção de iodo tem uma boa funcionalidade sobre as placas de sílica gel 60 e nas de óxido de alumínio [87].

b) Vapor de amoníaco

Este reagente é frequentemente usado em conjunto com outros reagentes para se obter um bom resultado entre o contraste das zonas cromatográficas que foram

separadas e a placa de fundo. O vapor de amônia é mais usado na visualização de ácidos orgânicos que são indicadores de pH [87].

1.2.4.3. Reações não-reversíveis

a) Corantes fluorescentes

Alguns dos corantes fluorescentes são usados na detecção não destrutiva de substâncias lipofílicas. Incluem eosina, rodamina B e 6G, fluoresceína, diclorofluoresceína, a berberina, e pinacriptol amarelo. Tratam-se de reagentes universais que detetam compostos orgânicos. Após secagem ao ar, na placa cromatográfica aparecem manchas que têm brilho fluorescente sobre um fundo fluorescente mais claro, quando visualizados à luz ultravioleta de 254 nm.

Estes corantes são eficazes em placas de sílica gel e celulose, não tendo o mesmo resultado para placas de sílica gel de fase inversa. Os vapores de amoníaco permitem melhorar os seus resultados de sensibilidade [87].

b) Indicadores de pH

Os indicadores de pH são utilizados tanto para detetar substâncias ácidas como básicas. Existem indicadores primários tais como o verde de bromocresol, azul de bromofenol, azul de bromotimol e em menor extensão púrpura de bromocresol. Estes podem ser aplicados nas placas cromatográficas por imersão ou pulverização. Os ácidos orgânicos vão responder a esta aplicação com uma mudança de cor. Mais uma vez, nesta técnica de visualização a aplicação de vapor de amoníaco aumenta a sensibilidade [87].

1.2.4.4. Técnicas destrutivas

As técnicas destrutivas são aquelas em que ocorrem reações químicas na placa cromatográfica entre o reagente e os analitos separados que resultam numa derivação ou mudança total na espécie orgânica. As mais utilizadas são as técnicas de carbonização e ativação térmica [87].

1.2.4.5. Reações de derivatização

Existem dois tipos de visualização, uma antes do desenvolvimento da derivatização química e outra após o desenvolvimento com reagentes químicos. São vários os reagentes disponíveis para a visualização pós-cromatográfica comparativamente aos de detecção pré-cromatográfica. A coloração pós-cromatográfica por vezes é utilizada porque a coloração pré-cromatográfica introduz mais uma substância sobre a placa, podendo interferir na separação dos compostos [85,87].

a) Visualização pré-cromatográfica

A visualização pré-cromatográfica permite a derivatização dos compostos utilizando grupos de reagentes específicos que reajam diretamente com os analitos de interesse, derivatizando-os. O reagente é colocado na placa cromatográfica na zona em que a amostra foi aplicada. Pode também efetuar-se o procedimento inverso, isto é, colocar primeiro o reagente e só depois a amostra. Convém salientar que a aplicação do reagente de derivatização em primeiro lugar tem vantagens, de facto, quando o reagente é aplicado em toda a largura da placa absorvente assegurar a que quando amostra é aplicada nas margens da placa a reação de derivatização ocorra por completo [87].

As reações pré-cromatográficas permitem distinguir compostos com características semelhantes ou idênticas, mas com propriedades químicas diferentes. Esta derivatização pode melhorar a estabilidade dos compostos, evitando reações químicas durante a sua separação, permite:

- ✓ modificar os compostos voláteis em derivados estáveis;
- ✓ alterar as suas propriedades de extração;
- ✓ melhorar a absorção da luz ou induzir a fluorescência.

Detém como desvantagem o facto do reagente de derivatização contaminar a amostra [85].

b) Visualização pós-cromatográfica

A visualização pós-cromatográfica é a mais usada em detecção por TLC. As reações cromatográficas deste tipo de visualização são eficazes na análise qualitativa e

quantitativa com TLC [85]. A coloração da placa de TLC pode ser efetuada por pulverização ou imersão da placa num reagente do grupo específico ou universal [85]. A técnica de pulverização manual é o menos adequado para a quantificação, uma vez que o reagente não tem uma distribuição regular sobre a placa, porem permite a utilização de menor quantidade de reagente e requer menor tempo de aplicação [85,87].

Após pulverização numa placa, a reação de coloração ocorre, em geral, após secagem ou aquecimento da placa cromatográfica a uma dada temperatura, dando origem a manchas coloridas e visíveis à luz visível na placa cromatográfica [87]. São vários os reagentes de coloração conhecidos para esta aplicação, (mais de 300 diferentes) [85]. Neste trabalho serão abordados apenas alguns deles, descrevendo-se a sua preparação, procedimento de utilização e resultados esperados.

Reagente de cloreto de alumínio. O Al^{3+} e o Fe^{3+} são catiões que formam complexos com cetonas aromáticas. Os grupos de flavonoides, micotoxinas, colesterol, fosfolípidos e triglicéridos reagem com uma solução etanólica de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, formando áreas amarelas fluorescentes na placa cromatográfica quando submetida à luz UV de 365 nm. Por vezes, as placas têm que ser aquecidas até à temperatura de 80-100°C durante 10 minutos. Este reagente pode ser aplicado em todos os tipos de placas cromatográficas [85].

Reagente cloreto de ferro (III). O reagente é preparado a partir de uma solução de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e aplicado na placa cromatográfica. Os flavonoides vão reagir para formar áreas vermelhas ou azul-violeta; a catequina forma uma área verde; os taninos formam áreas azuis [85].

Reagente de Folin-Ciocalteu. O reagente de Folin-Ciocalteu é utilizado para a análise de compostos fenólicos totais e para a avaliação da redução da capacidade de uma amostra, especialmente para os antioxidantes dos compostos fenólicos. A aplicação deste reagente na placa é realizado em dois passos: primeiro aplica-se uma solução de 2% de carbonato de sódio; segundo pulveriza-se com uma solução de 1:10 de Folin-Ciocalteu diluída em água. A reação de coloração dos compostos redutores como os fenóis ou a vitamina C na presença do reagente vão formar áreas azuis num fundo amarelo [85].

Reagente DPPH. O reagente de DPPH (2,2- difenil-1-picrilhidrazil) é utilizado para a detecção de substâncias com propriedades antioxidantes. É muito útil na avaliação das propriedades antiradicalar de estudos farmacêuticos de substâncias ativas em plantas e organismos fúngicos. O reagente preparou-se medindo 25 mg de DPPH para posteriormente ser utilizado na pulverização da placa de TLC. Este reagente é estável e apresenta uma cor roxa, quando aplicado na placa, o composto é reduzido por um radical livre que fica amarelo [85].

Reagente de vanilina. O reagente vanilina quando combinado com ácidos reage com diversos compostos, como por exemplo, alcaloides, esteroides, glicosídeos, terpenos e fenóis. Este reagente quando aplicado na placa de TLC forma zonas de cor escura sobre um fundo branco [87,89].

1.2.5. Análise qualitativa/ quantitativa com TLC

O método de TLC permite efetuar estudos qualitativos e quantitativos embora a análise qualitativa seja a mais usual. O presente trabalho é exemplo de aplicação qualitativa, através de análise bidimensional [86].

1.2.5.1. Avaliação qualitativa

Na análise qualitativa, a utilização de TLC permite identificar elementos da amostra que sejam desconhecidos ou confirmar a identidade de compostos detetados por GC ou HPLC. A análise visual qualitativa está associada às características das cores obtidas usando um reagente de detecção seletivo e considerando os valores do fator de retenção (Rf). A identificação qualitativa pode ser feita usando mais do que um reagente de detecção seletivo, podendo ser aplicados sequencialmente numa placa cromatográfica [86].

Neste trabalho a avaliação qualitativa foi feita pela técnica de TLC de desenvolvimento Bidimensional. Neste desenvolvimento é necessário escolher duas fases móveis (2 eluentes), que proporcionem mecanismos de retenção complementares. A escolha correta das duas fases móveis deve ser de forma a distribuir os componentes da amostra sobre toda a área da placa cromatográfica, aumentando o poder de resolução

relativamente à da 1D. Após a colocação da amostra, num ponto da placa de TLC, o desenvolvimento da segunda dimensão é efetuado depois de realizada a corrida 1D e da secagem da placa para remoção de todo o vapor de solvente do primeiro eluente. Seguidamente é colocada outra fase móvel na câmara cromatográfica, composta por uma mistura de solventes diferentes da 1D, sendo igualmente polar mas de natureza ácida. A placa é colocada no interior da câmara cromatográfica na posição perpendicular à superfície ocorrendo assim a segunda corrida do eluente [87]. Leva-se a secar e posteriormente visualizam-se os resultados numa caixa escura com o auxílio da lâmpada de UV a 254 nm e 365 nm e fotografa-se a luz refletida.

1.2.5.2. Avaliação quantitativa

A análise quantitativa em TLC foi descoberta por Kirchner *et al.* em 1954, e a técnica de densitometria foi relatada em meados dos anos 1960 [86].

Na avaliação quantitativa, a análise por TLC é realizada usando a técnica Unidimensional (1D) [86].

Esta técnica consiste em selecionar o eluente (fase móvel), que será uma mistura de solventes polares de natureza básica, que irá correr na primeira dimensão ou seja, usando só uma direção de eluição [86].

Na análise quantitativa coloca-se na placa de TLC a linha de base (linha ténue feita a lápis) a uma distância de 1,5 cm das extremidades. As soluções padrão e as amostras são colocadas em posições equidistantes mas afastadas das extremidades por 1,5 cm de distância. A placa é colocada na câmara cromatográfica para ocorrer a eluição com o eluente selecionado. Após a corrida cromatográfica, a placa é seca e, posteriormente, analisada por densitometria para obter a informação quantitativa de cada mancha e estabelecer uma calibração entre áreas de picos obtidos em densitometria e as concentrações das soluções padrão. Com a reta de calibração determina-se a concentração de cada amostra. Por isso, neste tipo de análise é necessário, após a eluição da placa cromatográfica, o uso de técnicas instrumentais, para obter resultados precisos e exatos [87]. A densitometria é o método mais confiável e mais usado para a quantificação dos resultados de um cromatograma de TLC pois mede a densidade óptica das manchas da placa de TLC estando relacionada com a quantidade dos compostos presentes. Existem dois tipos de densitometria: densitometria clássica, em que se utiliza um espectrofotómetro UV-Vis e a densitometria fotográfica. Neste último, a placa é

observada com uma lâmpada de UV numa caixa escura sendo a luz refletida fotografada. Os resultados obtidos são tratados com o programa image J (metodologia usada neste trabalho).

Esta técnica é aplicada e usada para analisar:

- ✓ substâncias de polaridade média, forte e iónica;
- ✓ substâncias que não sejam voláteis ou tenham uma volatilidade baixa;
- ✓ substâncias que não são detetadas por HPLC e GC, uma vez que os podem deteriorar;
- ✓ os solventes utilizados que podem danificar a coluna de HPLC.

1.2.5.3. Influência da atmosfera na câmara

Para além da fase estacionária da placa e do sistema solvente, a atmosfera da câmara em TLC é um importante fator a considerar na separação dos compostos, pois influencia significativamente os resultados obtidos. A câmara deve ficar saturada, quando todos os elementos do sistema solvente antes e durante o desenvolvimento estão em equilíbrio com toda a área da câmara cromatográfica, para garantir reprodutibilidade nas separações.

Quando a placa cromatográfica está em equilíbrio com os componentes da amostra e o espaço de gás está saturado, designa-se por saturação de sorção [84].

1.2.5.4. Influência da temperatura na placa

Os diferentes tamanhos e tipos de câmaras, mudanças na composição da fase móvel, da temperatura e humidade durante o desenvolvimento podem causar alterações nas características de retenção dos compostos da amostra.

Normalmente em TLC o desenvolvimento é realizado à temperatura ambiente [84].

De todas as influências relacionadas com o método de TLC, a temperatura tem um efeito fraco na análise. A temperatura influencia a estabilidade da composição da fase móvel em contacto com a fase estacionária. Convém salientar que, a temperatura também depende do teor de água presente na fase de vapor que representa um papel importante na cromatografia de adsorção. Fatores dependentes da temperatura concorrem desigualmente entre si, o que torna difícil dizer com exatidão quais os efeitos

da temperatura nas separações por TLC. Quando temos uma humidade relativa estável, os valores de Rf aumentam com a diminuição da temperatura. Podemos concluir que quanto maior a temperatura, menor é a atividade da fase estacionária. A diminuição na viscosidade da fase móvel, a temperaturas elevadas, aumenta a velocidade constante, o que resulta numa maior separação e aumento no diâmetro das manchas [85].

1.2.5.5. Influência da humidade na placa

A humidade relativa é definida como a quantidade de vapor a uma dada temperatura.

Absorventes nas placas de TLC irão ajustar-se a um equilíbrio de concentração do vapor de água, que depende da humidade relativa (de água saturada no ar) existente no laboratório. As placas são aquecidas a 110°C durante aproximadamente 10 minutos para diminuir a humidade relativa presente no sorvente da placa cromatográfica (ativação) e obter uma atividade mais constante.

Por isso, é importante manter as caixas das placas bem fechadas num exsiccador após ativação, para que não haja adsorção de vapor de água e outros vapores presentes na atmosfera do laboratório. Sem estes cuidados, por exemplo, os vapores ácidos ou alcalinos existentes no laboratório vão ter influência na atividade do sorvente devido à sua adsorção nas placas de TLC. Por isso deve-se ter cuidado com a atmosfera do laboratório pois pode influenciar os valores de fator de retenção da separação (Rf), o limite de migração da frente do solvente e a seletividade onde um aumento da humidade acarreta uma menor retenção dos analitos durante o desenvolvimento e uma eluição mais rápida [87].

1.3. Outros métodos analíticos

Existem vários métodos analíticos para a análise qualitativa e quantitativa de compostos ativos do própolis (por exemplo, compostos fenólicos) como, por exemplo, TLC (cromatografia de camada fina), HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência), LC-MS (cromatografia líquida acoplada à espetrometria de massa), GC-MS (cromatografia gasosa acoplada à espetrometria de massa) e CE (eletroforese capilar)

[37,90]. O HPLC e o MS, foram outros dois métodos usados neste trabalho para além do TLC, referido anteriormente.

O HPLC, com detetor díodo-array, é bastante usado mas com grandes limitações na identificação dos compostos devido à falta de padrões puros e devido às limitações dos espectros UV na confirmação do composto.

Outro método usado para análise qualitativa dos extratos referentes às manchas de TLC isoladas é o MS. Os resultados deste método são preliminares pois, é um trabalho analítico ainda em execução.

1.3.1. HPLC-DAD - Cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de Díodo-Array

No estudo dos compostos fenólicos usou-se o HPLC com um detetor Díodo-Array (DAD) que permite obter a leitura de absorvâncias precisas fazendo o varrimento de um intervalo de comprimentos de onda, enquanto um pico de um dado composto está a passar na célula de fluxo. Assim, o detetor permite obter informação qualitativa para um dado pico (espectro UV) além de uma simples identificação pelo tempo de retenção que posteriormente é comparado com os obtidos com padrões puros. Outra vantagem deste detetor deve-se ao facto de permitir medir a absorvância a vários comprimentos de onda que são seleccionados de forma a corresponder á maior sensibilidade de medição para um dado composto.

A maior dificuldade encontrada na análise de compostos fenólicos por DAD deve-se à falta de padrões comerciais dos compostos fenólicos glicosilados para estabelecer uma comparação correta entre o espectro do composto a que se refere o pico e o do padrão puro. Considerando o aspeto visual do espectro UV é possível estabelecer a família do composto fenólico a que pertence mas, a sua identificação só é possível através de espetrometria de massa [91,92].

1.3.2. MS – Espetrometria de massa

A espetrometria de massa (MS) é uma técnica analítica utilizada para se obter informação da massa molecular e de características estruturais da amostra. Esta técnica tem capacidades analíticas quantitativas e qualitativas de grande sensibilidade e seletividade. Neste trabalho de aplicação qualitativa do MS, pretendeu-se identificar os compostos fenólicos de um extrato de própolis separados por TLC bidimensional.

Resumidamente, é uma metodologia que mede a razão massa/carga (m/z) de um íon, a composição elementar de uma molécula e elucidar a estrutura química das moléculas através da sua fragmentação. Os íons podem ser moleculares de cargas positivas ou negativas, adutos feitos a partir de uma combinação de íon-molécula e íons de fragmentação. Este instrumento tem como objetivo a formação de íons, seleção de íons de massas específicas e a deteção de íons para contagem. Após a deteção, o sinal é processado e apresentado sob a forma de espetros de massa [91,92].

1.4. Objetivos

O objetivo principal deste trabalho é otimizar a técnica de cromatografia em camada fina para analisar qualitativamente, usando a técnica bidimensional, os compostos fenólicos do própolis. Como objetivos específicos podem-se considerar os seguintes pontos:

- ✓ Estudo polínico da amostra de própolis de Bornes;
- ✓ Efetuar sobre os extratos secos de própolis a determinação dos teores em fenóis e flavonoides totais, bem como, a atividade antioxidante para a amostra de Bornes e Lousã;
- ✓ Efetuar a extração etanólica dos compostos fenólicos do própolis;
- ✓ Selecionar eluentes que permitam uma separação eficiente dos compostos extraídos do própolis por TLC bidimensional;
- ✓ Otimizar a separação dos compostos fenólicos do própolis para obter placas com separação representativa do própolis analisado;
- ✓ Selecionar o melhor reagente de visualização das manchas obtidas da separação bidimensional do própolis por TLC;
- ✓ Determinar a atividade antimicrobiana usando extratos das manchas mais concentradas, removidas das placas de TLC após análise bidimensional da amostra de própolis, contra bactérias Gram-negativas (*Salmonella* spp. e *Escherichia coli*), bactérias Gram-positivas (*Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*) e leveduras (*Candida albicans*);
- ✓ Analisar por HPLC-DAD e MS os compostos presentes nos extratos das manchas obtidas da análise bidimensional do própolis por TLC.



Capítulo 2

Material e Métodos

- 2.1. Amostragem
- 2.2. Análise polínica
- 2.3. Tratamento da amostra
- 2.4. Determinação de compostos fenólicos totais
- 2.5. Determinação de compostos de flavonoides totais
- 2.6. Atividade antioxidante
- 2.7. Preparação das placas de TLC
- 2.8. Visualização dos compostos fenólicos na placa de TLC
- 2.9. Atividade antimicrobiana
- 2.10. HPLC
- 2.11. MS

Neste capítulo apresenta-se a origem e o tratamento efetuado na preparação da amostra para analisar, os reagentes e os equipamentos usados no trabalho, bem como, os procedimentos e as condições experimentais usadas na avaliação de própolis.

2.1. Amostragem

As duas amostras de própolis utilizadas neste estudo foram recolhidas em duas zonas diferentes de Portugal; a amostra de própolis de Bornes foi obtida na Serra de Bornes localizada no Norte de Portugal; a amostra de própolis de Lousã foi adquirida na região de Lousã localizada na Beira Litoral no Centro de Portugal (Figura 6).

A amostra de própolis de Bornes foi utilizada em todas as análises efetuadas enquanto que a amostra de própolis de Lousã foi usada só em alguns testes como o desenvolvimento bidimensional nas placas de TLC e determinação de fenóis e flavonoides totais. Como o trabalho é extenso, optou-se por desenvolver o estudo de um só tipo de própolis, sendo neste caso o de Bornes o escolhido, que servirá posteriormente como referência para estudos com outros tipos de própolis.



Figura 6. Localização das amostras de própolis no mapa de Portugal (Serra de Bornes e Serra de Lousã) (Fonte:<http://geoapoio.files.wordpress.com/2009/04/serras5.jpg?w=197&h=300>).

O trabalho a seguir apresentado é referente a ensaios com a amostra de própolis de Bornes:

- ✓ a amostra original de própolis para a análise polínica;
- ✓ extrato seco de própolis purificado para testes como determinação de fenóis e flavonoides totais, atividade antioxidante;
- ✓ solução de compostos fenólicos para aplicação direta na placa de TLC como, por exemplo, para visualização de manchas através de reagentes, tais como, cloreto de alumínio, cloreto de ferro, Folin-Ciocalteu, DPPH (2,2- difenil-1-picrilhidrazil) e vanilina;
- ✓ manchas isoladas por TLC através de raspagem para tubos de ensaio (extratos de TLC) para efetuar testes como a atividade antimicrobiana, HPLC e MS.

A amostra de Lousã foi somente usada nos testes da determinação de fenóis e flavonoides totais.

2.1.1. Tratamento da amostra

A amostra original de própolis, recolhida de várias colmeias de um apiário instalado na serra de Bornes apresentava-se no estado sólido. Na sua composição encontravam-se várias impurezas, tais como abelhas, pedaços de madeira, de favo, folhas, traças e outras inclusões, tornando-se necessário remover fisicamente todas essas impurezas antes da sua utilização para análise.

2.2. Análise polínica

A análise polínica do própolis foi efetuada de acordo com o descrito por Barth *et al.* (1999) [11], com algumas modificações.

2.2.1. Preparação da solução de própolis

Para a execução da análise polínica, foi utilizada a amostra de própolis de Bornes limpa (ponto 2.1.1.). Para um matraz, pesaram-se 0,5 g da amostra, adicionaram-se 15 ml de etanol absoluto e deixou-se repousar durante 24 horas.

2.2.2. Procedimento experimental

Passadas 24 horas, o preparado foi centrifugado durante 15 minutos a 2200 rpm (Eppendorf centrífuga 5810 R, Alemanha). Ao sedimento obtido da centrifugação foram adicionados 3 ml de KOH a 10% (v/v) e colocado num banho-maria tendo fervido durante 2 minutos. A mistura foi a centrifugar durante 10 minutos a 2200 rpm e após lavagem com água destilada, foi novamente a centrifugar durante 10 minutos a 2200 rpm. O sedimento permaneceu durante uma noite em 5 ml de ácido acético glacial. Esta mistura foi centrifugada durante 17 minutos a 2000 rpm. Ao sedimento adicionaram-se 5 ml da mistura anidrido acético e ácido sulfúrico (9:1) e aqueceu-se a 80°C durante 3 minutos num banho-maria. A mistura foi centrifugada durante 17 minutos a 2000 rpm. O sedimento obtido foi lavado com água, centrifugou-se 10 minutos a 2200 rpm e depois lavou-se com água glicerinada a 50%, centrifugou-se durante mais 15 minutos a 2000 rpm. Posteriormente, o sedimento foi preparado sobre as lâminas de microscopia em gelatina-glicerinada.

2.3. Extração de compostos fenólicos

Para a extração dos compostos fenólicos, misturou-se metanol 1:1 à amostra limpa obtida no ponto 2.1.1.. A mistura esteve em agitação durante a noite. Posteriormente, a amostra foi filtrada (Whatman nº 4 papel de filtro). O própolis sofreu mais duas extrações metanólicas seguindo o mesmo procedimento. Os extratos metanólicos combinados foram colocados no frigorífico a +5°C e, após 12 horas, efetuou-se nova filtração para remover a cera.

Do extrato metanólico de própolis mediram-se 50 ml para um matraz (previamente lavado com metanol, seco e pesado). Posteriormente, usou-se um evaporador rotativo (Rotavapor Buchi RE 111 com um Buchi 461 banho-maria, 2002)

para evaporar o solvente a uma temperatura de 65°C. O matraz com o extrato foi colocado na estufa, sendo consecutivamente pesado até ter peso constante.

Retirou-se a maior quantidade possível do extrato de própolis (Figura 7) existente no balão para um vial. Ao extrato que ficou no balão, adicionaram-se 100 ml de éter dietílico e 100 ml de água, sendo possível visualizar duas fases (Figura 8). A amostra foi tratada com o solvente éter dietílico para se extrair (purificar) a maior quantidade possível de compostos fenólicos da amostra. O sobrenadante (éter dietílico), foi colocado num novo matraz, repetindo-se a extração mais três vezes, até obter uma cor quase transparente entre as duas fases visíveis.

Posteriormente, levou-se à secura o extrato de própolis purificado, tendo-se também recorrido ao liofilizador (Labconco, modelo Freezone 4.5) para remoção da percentagem de água, obtendo-se assim o extrato seco de própolis (Figura 9).



Figura 7. Extrato de própolis



Figura 8. Amostra de própolis tratada com éter dietílico



Figura 9. Extrato seco de própolis



2.4. Determinação de compostos fenólicos totais

Na determinação de fenóis totais foi utilizado o método de Folin-Ciocalteu de acordo com o descrito por Singleton, Orthofer, & Lamuela-Raventos, (1999) [93].

2.4.1. Preparação da solução de própolis

A solução de própolis foi obtida (referido no item 2.3.) medindo cerca de 0,2 g de extrato seco de própolis (referido no item 2.3.) que foram dissolvidos num balão de 25 ml. Deste preparado retirou-se 1 ml para outro balão de 25 ml e aferiu-se com água desionizada.

2.4.2. Análise de fenóis totais

Na análise, dos fenóis totais do própolis (análise efetuada em triplicado) misturou-se 0,5 ml da solução preparada anteriormente, 2,5 ml do reagente Folin-Ciocalteu a 10%, e 2 ml de carbonato de sódio a 75 g/L.

A solução resultante ficou a repousar durante 2 horas à temperatura ambiente, e foi medida a sua absorvância a 760 nm.

2.4.3. Determinação da curva padrão

Para a determinação da curva de calibração para análise dos fenóis totais, o composto padrão utilizado foi o ácido gálico (AG). A solução mãe foi preparada por pesagem de 0,1 g de ácido gálico e dissolvidos em 100 ml de água desionizada.

As concentrações usadas foram obtidas por medição dos volumes 0,5, 0,6, 0,75, 1, 2, 3 e 4 ml da solução mãe em balões de 25 ml, que foram aferidos com água desionizada.

O branco foi preparado com 0,5 ml de água desionizada e os reagentes (2,5 ml de Folin-Ciocalteu mais 2 ml de carbonato de sódio). Após decorridas 2 horas, foram efetuadas as leituras a 760 nm.

2.5. Determinação de flavonoides totais

Na determinação de flavonoides totais usou-se o método de Woisky & Salatino (1998) [94].

2.5.1. Preparação da solução de própolis

A preparação da solução de própolis desta metodologia foi efetuada conforme o descrito na seção 2.4.1..

2.5.2. Análise de flavonoides totais

A análise dos flavonoides totais nas amostras de própolis foi feita por mistura de, 2,5 ml da solução de própolis, com 2,5 ml de AlCl_3 a 2% (esta solução foi efetuada em triplicado).

A solução obtida ficou em repouso durante 1 hora, à temperatura ambiente, e de seguida mediu-se a sua absorvância a 420 nm.

2.5.3. Determinação da curva padrão

Na determinação da curva de calibração para análise dos flavonoides totais usou-se como composto padrão a quercetina (Q). Para a preparação da solução mãe, pesaram-se 0,1 g de quercetina para um balão de 100 ml que foi aferido com etanol.

As concentrações utilizadas foram obtidas por medição dos volumes 0,1 ml para um balão de 100 ml, 0,1 e 0,2 ml num balão de 50 ml, 0,2, 0,4, 0,5, 0,75 e 1 ml para balões de 25 ml e 1 ml para um balão de 20 ml. Todos os balões volumétricos foram aferidos com etanol.

O branco foi preparado com 2,5 ml de etanol e 2,5 ml do reagente AlCl_3 (cloreto de alumínio). Ao fim de 1 hora foram efetuadas as leituras a 420 nm.

2.6. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada pelo: método do poder redutor de acordo com o descrito por Berker *et al.* (2007) [95]; efeito bloqueador dos radicais livres (DPPH) de acordo com Hatano *et al.* (1988) [96].

2.6.1. Poder redutor

2.6.1.1. Preparação da solução de própolis

Para analisar o poder redutor, preparou-se uma solução mãe de própolis pesando 0,2 g do extrato seco de própolis (item 2.3.), para um balão de 25 ml que foi aferido com etanol.

Antes da realização da análise do poder redutor foram preparadas diferentes concentrações por medição de diferentes volumes da solução mãe de própolis: 0,15, 0,2 e 0,3 ml para balões de 50 ml; 0,25, 0,3 e 0,6 ml para balões de 25 ml; 0,4, 0,5, 0,6 ml para balões de 10 ml. Todas as soluções foram aferidas com etanol.

2.6.1.2. Análise do poder redutor

Para avaliar o poder redutor das amostras de própolis, mediu-se 1 ml de cada solução para tubos de ensaio, adicionando-se, posteriormente, 2,5 ml do tampão de fosfato de sódio a 0,2 M (pH 6,6) e 2,5 ml de ferrocianeto de potássio a 1%. Seguidamente colocaram-se os tubos de ensaio em banho-maria a 50°C, durante 20 minutos. Após arrefecimento à temperatura ambiente, acrescentou-se 2,5 ml de TCA (ácido tricloroacético) a 10%, e agitou-se vigorosamente (vortex). Foram retirados 2,5 ml do sobrenadante para novos tubos de ensaio onde se adicionou 2,5 ml de água desionizada e 0,5 ml de cloreto de ferro a 0,1%. Os tubos de ensaio foram agitados no vortex e, após repouso durante 2 minutos, as absorvâncias das soluções foram medidas a 700 nm. A concentração de própolis correspondente a 0,5 de absorvância (EC_{50}), foi calculada a partir do gráfico das absorvâncias obtidas em função das concentrações do extrato na solução.

2.6.2. DPPH

2.6.2.1. Preparação do extrato

A preparação do extrato desta metodologia foi efetuado conforme o descrito na seção 2.6.1.1..

2.6.2.2. Análise do DPPH

Na avaliação do poder redutor pela metodologia do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), utilizaram-se as mesmas concentrações de extratos usado na metodologia anterior. Neste ensaio transferiram-se 0,3 ml das soluções anteriores de extrato de própolis para tubos de ensaio e 2,7 ml do reagente DPPH. Os tubos de ensaio foram agitados vigorosamente no vortex, posteriormente a solução ficou a repousar durante 60 minutos no escuro. Ao fim deste tempo mediu-se a absorvância das soluções a 517 nm.

O efeito bloqueador do DPPH foi calculado pela percentagem de descoloração do DPPH usando a seguinte equação:

$$\% \text{ Efeito bloqueador} = [(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{S}})/A_{\text{DPPH}}] \times 100, \quad \text{equação 1}$$

sendo, A_{S} a absorvância da solução quando o extrato da amostra foi adicionado a um nível específico, e A_{DPPH} , a absorvância da solução de DPPH. A concentração do extrato que proporciona uma inibição de 50% (EC_{50}) foi calculada a partir do gráfico do efeito da percentagem de eliminação em função da concentração de extrato na solução.

2.7. Preparação das placas de TLC

As placas novas de TLC foram colocadas na câmara cromatográfica com metanol, deixando o solvente subir até ficar a uma distância de 1 cm do cimo da placa de TLC para as lavar. Para ativar as placas de TLC usadas nas análises colocaram-se cada uma delas na estufa a uma temperatura de 110°C durante 10 minutos.

A solução de compostos fenólicos do própolis (Figura 10) foi preparada a partir do extrato seco de própolis obtido no ponto 2.3., por medição de 0,2-0,5 g em 10 ml de etanol.



Figura 10. Solução de compostos fenólicos do própolis.

Nas placas de TLC ativas colocou-se um volume de 30 μL de amostra a uma distância de 2 cm de cada extremidade da placa, com o auxílio de uma microseringa (Figura 11).



Figura 11. Placas de TLC e microseringa.

Para a realização da corrida nas duas dimensões (análise bidimensional), foi necessário testar diferentes eluentes, para verificar qual o mais adequado na separação dos compostos presentes na amostra. Dos eluentes testados os que apresentaram melhores resultados de separação bidimensional foram: **1D** (clorofórmio, metanol, ácido fórmico (88;7;5 v/v)) e **2D** (n-hexano, acetato de etilo, ácido acético (62; 28;10 v/v)); **1D** (Tolueno, acetato de etilo, metanol (85;10;5 v/v)) e **2D** (metanol, acetato de etilo (1;9 v/v)).

O eluente (1D) foi preparado no momento das análises e com um volume total que permitisse ter 1 cm de altura na câmara cromatográfica. Depois de 15-30 minutos de repouso para garantir o equilíbrio da atmosfera gasosa na câmara, as placas de TLC com a amostra foram colocadas na câmara cromatográfica. A análise era dada por terminada quando a frente do solvente estava próximo de 1 cm da extremidade superior da placa. Estas são depois retiradas da câmara e secas na estufa. De seguida, após lavagem e secagem da câmara, colocou-se o eluente relativo à 2D, seguindo o mesmo procedimento da 1D (Figura 12).

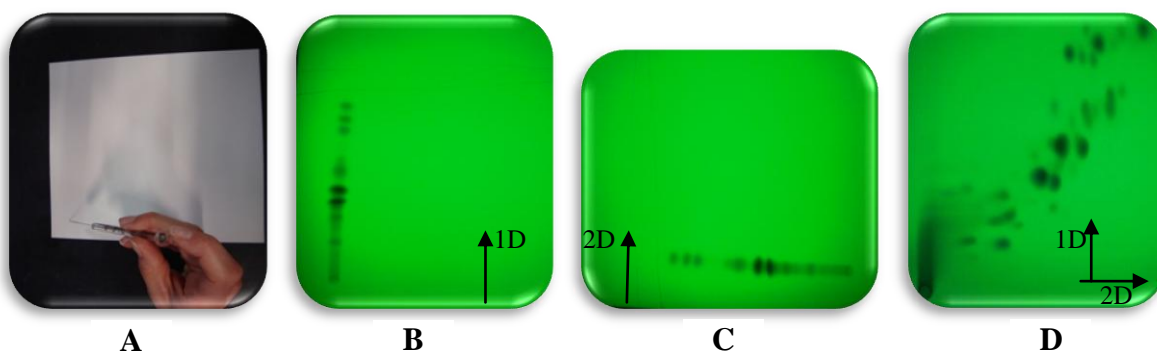


Figura 12. Sequência da análise bidimensional.

As placas foram observadas à luz ultravioleta a um comprimento de onda de 254 nm (Figura 13).

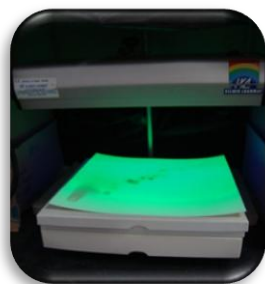


Figura 13. Luz ultravioleta.

2.8. Visualização dos compostos fenólicos na placa de TLC

Os reagentes foram aplicados na placa de TLC após a análise cromatográfica, usando um pulverizador, para que as manchas dos compostos fenólicos adquirissem coloração e pudessem ser visíveis à luz UV ou então emitissem fluorescência.

Os reagentes usados neste trabalho foram: cloreto de alumínio, cloreto de ferro, Folin-Ciocalteu, DPPH (2,2- difenil-1-picrilhidrazil) e vanilina.

2.8.1. Reagente de cloreto de alumínio

Preparou-se o cloreto de alumínio pesando 2 g num frasco com tampa e adicionando 100 ml de metanol. A solução depois de colocada num frasco com pulverizador foi utilizada na pulverização das placas de TLC. Após pulverização as placas foram colocadas na estufa para evaporar o solvente.

2.8.2. Reagente de cloreto de ferro

Preparou-se uma solução de cloreto de ferro a 2% em etanol (2 g de FeCl_3 em 100 ml de etanol). Esta solução foi colocada num frasco com pulverizador para posteriormente ser aplicada numa placa de TLC. Após aplicação, a placa de TLC foi colocada numa estufa para secar.

2.8.3. Reagente Folin-Ciocalteu

A aplicação do reagente Folin-Ciocalteu exigiu um passo preparatório da placa de TLC. Primeiro preparou-se a solução de carbonato de sódio a 2% (w/v) diluída em água, que foi usada para pulverizar a placa de TLC após a análise cromatográfica. A placa foi colocada numa estufa para evaporar o solvente. Posteriormente aplicou-se a solução 1:10 de Folin-Ciocalteu diluída em água, por pulverização. Seguidamente a placa foi colocada na estufa.

2.8.4. Reagente DPPH (2,2- difenil-1-picrilhidrazil)

Na preparação da solução do reagente DPPH pesou-se 25 mg de DPPH para um balão de 50 ml que se aferiu com o solvente acetona. A placa de TLC foi pulverizada com esta solução e colocada na estufa para evaporação do solvente.

2.8.5. Reagente de vanilina

O reagente de vanilina foi preparado com 250 mg diluídos em 100 ml de etanol e 2,5 ml de ácido sulfúrico (reagente adicionado cuidadosamente). Posteriormente, a placa de TLC foi pulverizada e colocada na estufa a 80°C para secagem durante 5-10 minutos.

2.9. Atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade do própolis contra as bactérias (Gram-negativas e positivas) e a levedura, baseou-se no método de micro-diluição em microplacas (Cordeiro, 2004) [97].

2.9.1. Preparação do extrato de TLC

Para a análise da atividade antimicrobiana, o extrato foi preparado consoante o descrito no item 2.7.. Os extratos de TLC (raspagem das manchas) foram colocados em tubos de ensaio identificados com tampa e guardados no congelador. Foram

selecionados os tubos de ensaio que continham uma maior quantidade de compostos fenólicos separados por TLC e colocou-se 2 ml de metanol. Posteriormente levaram-se ao vortex, e com o auxílio de uma seringa+filtro (filtro descartável de nylon 0,2 µm da whatman), colocou-se a solução num vial também identificado, e deixou-se a evaporar na hote. Após a evaporação do metanol, levou-se ao liofilizador para evaporar alguma água presente no extrato de TLC seco.

2.9.2. Microrganismos e condições de Cultura

Os microrganismos utilizados nos ensaios foram isolados e identificados no laboratório de Microbiologia da Escola Superior Agrária de Bragança.

Foram utilizadas bactérias gram-negativas (*Escherichia coli* ESA 152 e *Salmonella* spp. ESA 162), gram-positivas, (*Staphylococcus aureus* ESA 25 e *Bacillus cereus* ESA 32) e ainda uma levedura (*Candida albicans* ESA 65). Os microrganismos estavam congelados a -80°C, para os reativar utilizou-se a técnica de estriamento em placa com o meio de agar nutritivo (AN) para as bactérias e meio sólido YNB (Yeast Nitrogen Base) para a levedura. Seguidamente levaram-se a incubar à temperatura de 37°C para as bactérias e a 25°C para a levedura, numa estufa durante 24 horas e 48 horas, respetivamente.

Posteriormente, os microrganismos foram transferidos para erlenmayer com o auxílio de uma ansa. Os erlenmayer que continham as bactérias foram colocados numa incubadora orbital (Stuart, modelo SI500) à temperatura de 37°C, enquanto que o Erlenmayer contendo a levedura foi colocado numa incubadora orbital (Stuart, modelo SI50, 2002) à temperatura de 25°C. Permaneceram durante 24 horas na incubadora.

2.9.3. Análise da atividade antimicrobiana

O parâmetro utilizado para determinar os efeitos inibidores nos microrganismos pelo própolis foi a concentração mínima inibitória (CMI): concentração acima da qual não há crescimento visível.

Para a análise antimicrobiana pesou-se o vial com o extrato de TLC seco obtido anteriormente e adicionaram-se 2,3 ml de dimetil sulfóxido (DMSO).

Nas microplacas estéreis (96 poços), foram colocados 200 µL de amostra (concentração conhecida) nos poços da coluna 1, nos poços 2 a 8, 11 e 12 colocaram-se 100 µL de meio (caldo nutritivo) e nos poços 9 e 10, 200 µL de meio.

De seguida, efetuaram-se diluições sucessivas dos poços da coluna 1 até aos poços da coluna 8 (volume de 100 µL), de modo a obter uma concentração decrescente do extrato da amostra. Em seguida adicionaram-se 20 µL de cada um dos microrganismos em estudo a todos os poços exceto nos das colunas 1, 9 e 10. Posteriormente, as placas foram seladas com um filme respirável (sealing film e BF-400-S) e incubadas durante 48 horas a 25°C. Ao fim das 48 horas colocou-se em todos os poços exceto na primeira coluna, 20 µL de cloreto de trifetil tetrazolium (TTC). As microplacas foram re-incubadas por mais 4 horas à mesma temperatura e, por fim, observou-se visualmente a mudança de cor. Este procedimento foi efetuado em duplicado para cada microrganismo.

A concentração mínima inibitória (CMI) define-se como a concentração de extrato mínima capaz de impedir o crescimento do microrganismo e consequentemente, o aparecimento de coloração rosa.

Na Tabela 2 apresentam-se as diferentes concentrações de própolis utilizadas neste trabalho.

Tabela 2. Concentração (mg/mL) das amostras utilizadas para a análise da atividade antimicrobiana.

Amostras (manchas)	Poços (mg/mL)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A2	1,1	0,55	0,275	0,1375	0,06875	0,0344	0,0172	0,00859
A3	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0313	0,0156	0,0078
A5	0,7	0,35	0,175	0,0875	0,044	0,0219	0,011	0,0055
A10	0,9	0,45	0,225	0,1125	0,056	0,028	0,0141	0,007
A11	22,85	11,425	5,7125	2,856	1,428	0,714	0,357	0,1785
A12	15,95	7,975	3,9875	1,994	0,997	0,498	0,249	0,1246
A13	3,1	1,55	0,775	0,3875	0,1938	0,0969	0,0484	0,0242
A15	1,2	0,6	0,3	0,15	0,075	0,0375	0,019	0,009
A20	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125
A24	1,1	0,55	0,275	0,1375	0,069	0,034	0,017	0,0086
A25	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03	0,016	0,008
A26	0,6	0,3	0,15	0,075	0,0375	0,01875	0,009	0,0047

2.10. HPLC

2.10.1. Preparação da solução dos extratos de TLC

Para analisar o própolis por HPLC, foi necessário efetuar o procedimento descrito no ponto 2.7.. Os extratos de TLC (raspagem das manchas) presentes nos tubos de ensaio com tampa foram dissolvidos com 0,3 ml do solvente acetonitrilo (ACN) e, após homogeneização no vortex, a solução foi filtrada (seringa+filtro descartável de nylon 0,2 µm da whatman) para um vial identificado.

2.10.2. Análise por HPLC

Na análise de soluções por HPLC usou-se a eluição por gradiente por mistura de dois eluentes: acetonitrilo puro (A) e a solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% (B).

O gradiente utilizado foi: 10% do eluente A (90% do eluente B) no início da corrida; aos 5 minutos, 15% de A (85% de B); aos 10 minutos, 25% de A (75% de B); aos 20 minutos, 38% de A (62% de B); ao fim de 30 minutos o gradiente estabiliza sendo 50% dos dois eluentes; até aos 40 minutos mantem-se a mistura de 50% de cada um dos eluentes; dos 50 até 55 minutos, a mistura tem a composição inicial de corrida cromatográfica (10% de A).

2.10.3. Equipamento de HPLC

As análises foram efetuadas num sistema cromatográfico constituído por: bomba ternária Varian, modelo 9010 (fluxo de 0,5 ml/min); injetor Rheodyne (quantidade injetada de 10 µl) e detetor Varian, modelo Prostart 330 Photodiode Array detector (varrimento de comprimentos de onda entre 190-340 nm). Na separação cromatográfica usou-se uma coluna do tipo Kromasil C₁₈ 5 µm (150 mm × 4,6 mm), da Supelco. Na aquisição e tratamento dos dados utilizou-se o software Star Chromatography Workstation, version 6.41. Os dados espectrais de todos os picos foram obtidos na gama 190-400 nm, sendo os cromatogramas adquiridos e analisados a 280 nm.

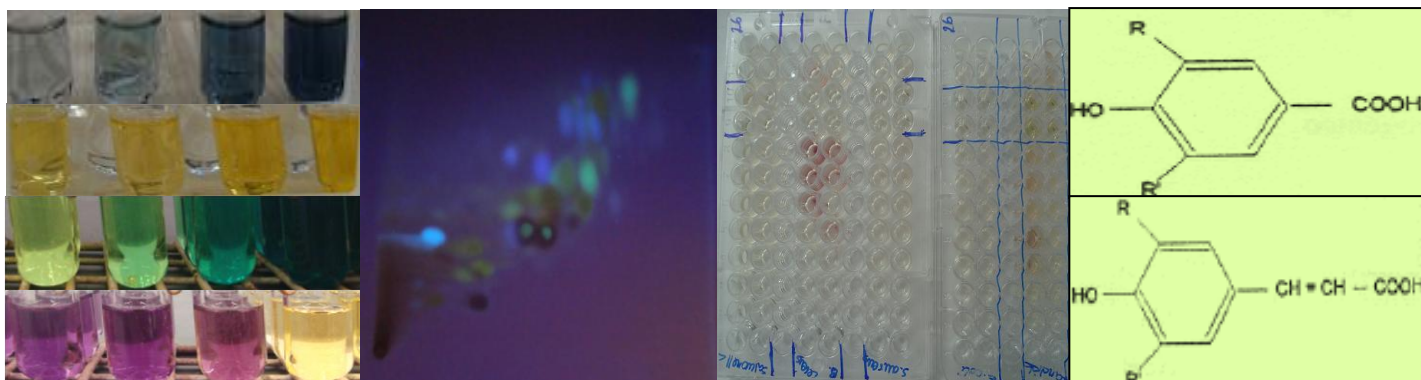
2.11. MS

2.11.1. Preparação do extrato

Para a análise com MS, tal como para a análise por HPLC, prepararam-se extratos das manchas presentes na placa de TLC referentes à separação de compostos fenólicos da amostra de própolis (descrito no ponto 2.7.). A extração dos compostos presentes na sílica gel referente a cada mancha presente na placa de TLC foi diferente. A extração foi feita com 3 ml de mistura de 50% de metanol e 50% de acetato de etilo, e em triplicado. Após centrifugação, para se obter boa separação entre o solvente e a sílica, o extrato foi levado à secura em speed-vacuum. Para efetuar a análise no espectrómetro de massa, o extrato seco obtido foi redissolvido em metanol. O procedimento foi repetido para cada mancha identificada e removida referente à separação dos compostos fenólicos do extrato de própolis analisado por TLC.

2.11.2. Análise por MS e equipamento

Os extratos metanólicos obtidos das extrações à sílica gel de cada mancha removida da placa de TLC foram injetados diretamente na fonte de ESI por meio de uma seringa com bomba a uma taxa de fluxo de 8 $\mu\text{l}/\text{min}$. As análises ESI-MS foram realizadas no modo de íon negativo dentro da gama de m/z 50-1000, utilizando um Espectrómetro de Massa LXQ (ThermoFinnigan, San Jose, CA, EUA) com um analisador de armadilha de íões Linear (“Linear Ion Trap”) e equipado com software Xcalibur (ThermoFinnigan, San Jose, CA, EUA). As condições analíticas usadas na fonte ESI foram: gás de azoto a 30 psi, tensão de pulverização a 4,7 kV, temperatura de capilar a 275 C, tensão capilar a 37,0 V e tensão de tubo de lentes a 81,89 V. Experiências usando CID-MS/MS e MS^n foram realizadas em íões percursores de massa selecionada usando uma configuração de isolamento e de excitação padrão. O varrimento completo MS para a aquisição de dados foi realizada a partir de m/z 100 até m/z 1000.



Capítulo 3

Resultados e Discussão

- 3.1. Análise polínica
- 3.2. Determinação de compostos fenólicos totais
- 3.3. Determinação de compostos de flavonoides totais
- 3.4. Atividade antioxidante
- 3.5. Preparação das placas de TLC
- 3.6. Visualização dos compostos fenólicos na placa de TLC
- 3.7. Atividade antimicrobiana
- 3.8. HPLC
- 3.9. MS

O trabalho desenvolvido teve como principal objetivo: contribuir para a caracterização química e biológica do própolis de Bornes. De seguida apresentam-se os resultados obtidos.

3.1. Análise polínica

Os resultados da análise do perfil de pólen do própolis permitem determinar a sua origem floral. A análise consiste na identificação e contagem do pólen presente na amostra por observação ao microscópico. Para isso, é necessário fazer uma série de passos. Em primeiro lugar é necessário proceder a uma separação simples de resinas e ceras do própolis. Este procedimento foi realizado com etanol, tratando-se de um método pouco agressivo, uma vez que a seguir a amostra é submetida à mistura de acetólise para a eliminação dos detritos orgânicos. Para se obter uma razoável concentração de grãos de pólen, é essencial o uso de KOH a quente antes da acetólise, uma vez que facilita a solubilização da celulose e hemicelulose tornando o sedimento final reduzido [11].

Os tipos de pólen identificados e a sua frequência na amostra de própolis de Bornes, estão representados na Figura 14.

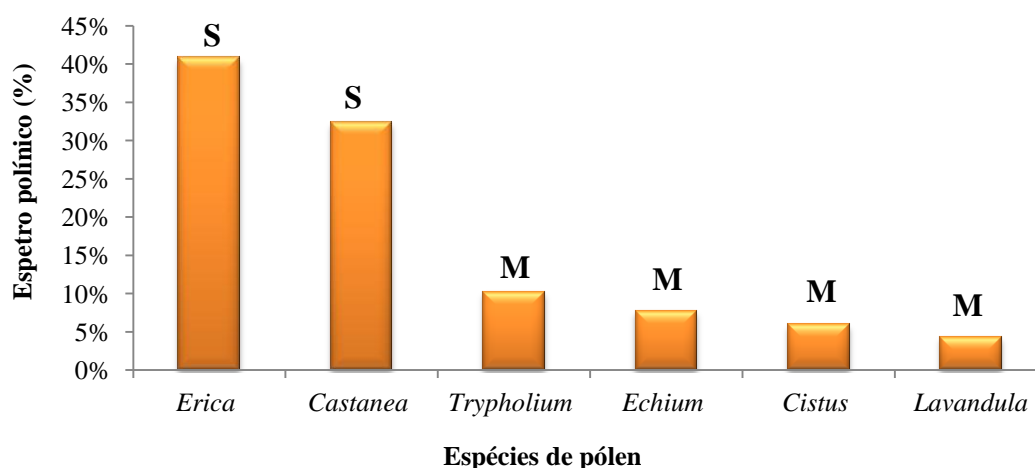


Figura 14. Caracterização polínica da amostra de própolis de Bornes.

Classes de frequência: **D**- pólen dominante (> 45% de grãos de pólen); **S**- pólen secundário (16%-45%); **M**- pólen minoritário (3%-15%).

Da análise da Figura 14, verifica-se que a amostra de própolis de Bornes não apresenta características típicas de um produto com perfil polínico monofloral, pois não apresenta uma percentagem de frequência superior a 45% em qualquer um dos tipos de pólen identificados.

A maioria dos pólenes identificados, foram pólenes minoritários (M, entre 3 e 15%), não deixando por isso de ser menos importante pois, na maioria dos casos, trata-se de plantas que produzem pouco pólen (entomófilas) [11].

Comparando estes resultados com os obtidos por Moreira *et al.* (2008) [98], o tipo de pólen predominante foi diferente, pois neste trabalho o pólen predominante foi o de *Erica* sp. (41%), enquanto que, no trabalho de Moreira *et al.* (2008) [98] foi a *Castanea* sp.(45%). Esta diferença poder-se-á dever ao local de colheita da amostra. Apesar de ambas serem provenientes de Bornes foram fornecidas por apicultores diferentes. Convém salientar que a origem botânica do própolis é variável dependendo da origem botânica e geográfica, do clima, das técnicas de colheita e da espécie da abelha [17].

3.2. Determinação de compostos fenólicos totais

Para quantificar os grupos hidroxilo fenólicos presentes na amostra de própolis, recorreu-se ao método do reagente Folin-Ciocalteu e ácido gálico. Este método baseia-se numa reação de óxido-redução, no qual o ião fenolato é oxidado em meio alcalino, enquanto reduz o complexo fosfotúngstico-fosfomolibdico no reagente que origina uma solução azul que absorve a 760 nm [10].

Para a determinação do teor em compostos fenólicos totais, utilizou-se ácido gálico (AG) como padrão para calibrar o espectrofotómetro quando foi analisada a amostra de própolis de Bornes ($R^2= 0,9915$) e, no dia seguinte, a amostra de própolis de Lousã ($R^2= 0,9945$), estando as retas de calibração obtidas representadas na Figura 15. Os valores de limite de deteção (LD) e quantificação (LQ) calculados com os parâmetros da regressão linear obtidos da análise à amostra de própolis de Bornes foram de 12 e 38 mg/L, respetivamente e os valores obtidos a partir da calibração efetuada para a análise da amostra de própolis de Lousã foram de 15 e 46 mg/L para LD e LQ, respetivamente.

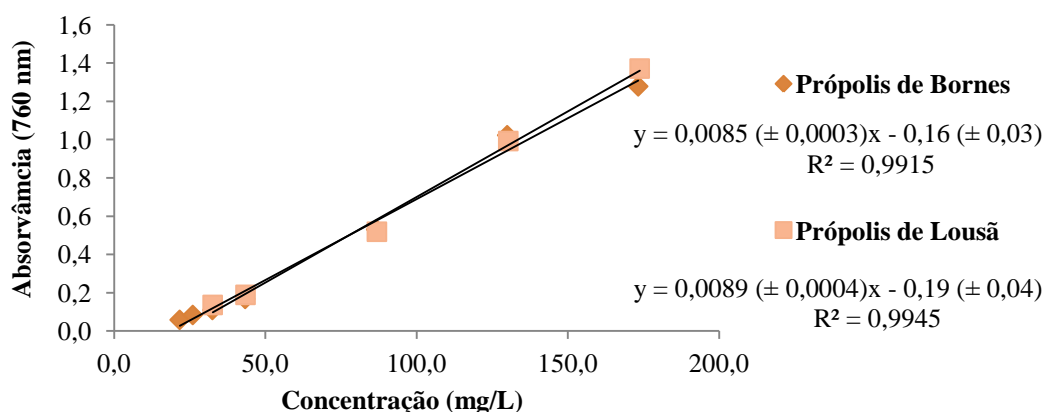


Figura 15. Retas de calibração dos compostos fenólicos totais para as amostras de própolis de Bornes e Lousã.

A partir das soluções de própolis diluídas para análise obtiveram-se concentrações de fenóis totais de $91,5 \pm 0,7$ mg/L (287 mg AG/g de extrato) e de 117 ± 2 mg/L (371 mg AG/g de extrato) para as amostras de Bornes e Lousã, respetivamente. Os resultados mostraram precisões aceitáveis pois os sr% (desvio padrão relativo) foram inferiores a 2%. Estes resultados mostram que 28,7% e 37,1% do extrato de própolis seco da amostra de Bornes e Lousã, respetivamente, são de compostos fenólicos.

A variação nos resultados relativamente à composição em compostos fenólicos para as duas amostras de própolis, pode estar relacionada com a origem da amostra e com a época em que a resina foi recolhida pelas abelhas para a produção do própolis [1,5].

Estes resultados diferem dos obtidos por Moreira *et al.* (2008) [98], em que o valor em teor de compostos fenólicos totais do própolis de Bornes foi maior (329 mg/g) que o obtido neste trabalho. Uma possível explicação para tal facto, pode ser devido à diferente origem botânica das duas amostras.

Dias *et al.* (2012) [17], obtiveram para amostras de própolis portugueses (Mirandela, Mogadouro, Nogueira, Vinhais), valores mais baixos de compostos fenólicos totais (entre 11 e 28%), comparativamente com os determinados neste trabalho.

As percentagens obtidas para os compostos fenólicos para as amostras de extrato seco de própolis estudadas, encontram-se dentro do limite máximo verificado em amostras de própolis brasileiro [3].

3.3. Determinação de flavonoides totais

Na determinação de flavonoides totais, o método utilizado baseia-se na propriedade do catião alumínio para formar complexos estáveis com o hidroxilo dos flavonoides, formando um complexo de cor amarela [10,58]. Este permite determinar a quantidade de flavonoides presentes na amostra evitando-se a interferência de outras classes de substâncias fenólicas, sobretudo os ácidos fenólicos [10].

O teor em flavonoides totais foi determinado utilizando quercetina (Q) como padrão para calibrar o espectro fotométrico quando foi analisada a amostra de própolis de Bornes ($R^2 = 0,9963$) e, um dia diferente, a amostra de própolis de Lousã ($R^2 = 0,9947$), estando as retas de calibração obtidas representadas na Figura 16. Os valores de LD e LQ calculados com os parâmetros da regressão linear obtidos da análise à amostra de própolis de Bornes foram de 2,98 e 9,03 mg/L, respetivamente. Valores próximos foram também obtidos a partir da calibração efetuada para a análise da amostra de própolis de Lousã 3,77 e 11,4 mg/L para LD e LQ, respetivamente.

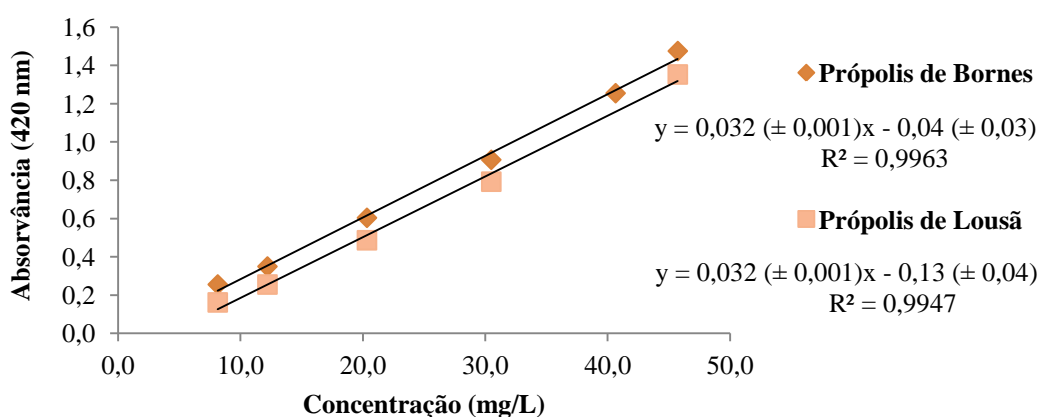


Figura 16. Retas de calibração dos compostos de flavonoides totais para as amostras de própolis de Bornes e Lousã.

Na análise das soluções de própolis diluídas obtiveram-se concentrações de compostos de flavonoides totais de $23,4 \pm 0,8$ mg/L (74 mg Q/g de extrato) e de $32,9 \pm 0,1$ mg/L (103 mg Q/g de extrato) para as amostras de Bornes e Lousã, respetivamente. Os resultados para a determinação dos compostos de flavonoides totais para o extrato seco da amostra de Bornes e Lousã mostraram precisões razoáveis, pois o sr% foi

inferior a 4%. A percentagem do teor em flavonoides totais do extrato seco da amostra de Bornes e Lousã foi de 7,4% e 10,3%, respetivamente.

Mais uma vez verifica-se que o fator fitogeográfico pode estar na origem dos resultados obtidos nas duas amostras [1,5].

Os resultados deste estudo sugerem que a amostra de própolis de Lousã apresenta um teor em compostos de flavonoides totais superior à amostra de própolis de Bornes.

Dias *et al.* (2012) [17] em amostras de própolis português (Mirandela, Mogadouro, Nogueira, Vinhais) obtiveram resultados de flavonoides totais compreendidos entre 3 a 12%, valores nos quais se enquadram os obtidos neste trabalho.

A percentagem em compostos flavonoides totais presentes nas amostras analisadas, foram superiores aos obtidos em amostras de própolis brasileiras. Convém no entanto salientar, que a amostra não sofreu o mesmo tipo de tratamento e a composição química das amostras de própolis do Brasil e de Portugal são distintas [3].

3.4. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante consiste em atrasar ou inibir a oxidação de lípidos ou de outras moléculas, impedindo o desenvolvimento das reações em cadeia da oxidação [99]. O cálculo desta baseia-se em duas metodologias: poder redutor e DPPH.

3.4.1. Poder redutor

No poder redutor, temos a presença de antioxidantes que provocam a redução do complexo Fe^{3+} /Ferricianeto a uma forma ferrosa (Fe^{2+}), resultando num complexo azul [14,100]. As soluções preparadas da amostra de própolis para a análise do poder redutor, com concentrações a variar entre 0,024 e 0,48 mg/mL de extrato de própolis de Bornes, apresentam uma coloração amarela que muda para verde-azulado consoante o poder redutor das soluções testadas.

A relação entre as concentrações e o sinal de absorvância dá a indicação do poder redutor. Na Figura 17 mostra-se a relação obtida para a amostra de própolis de

Bornes onde se visualiza uma relação linear direta entre a absorvância e o aumento da concentração em extrato de própolis de Bornes.

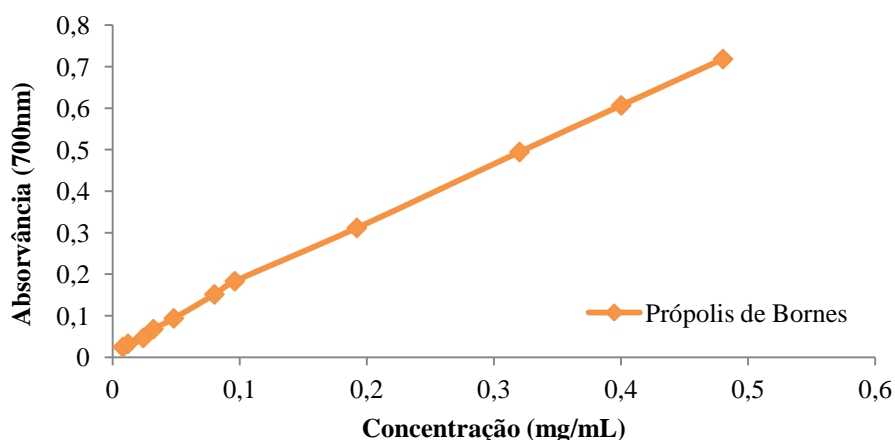


Figura 17. Poder redutor do extrato seco da amostra de própolis de Bornes.

Da análise desta relação referente ao poder redutor para o extrato de própolis de Bornes, o valor de EC_{50} (concentração mínima necessária para fornecer 50% de atividade antioxidante) foi de $0,33 \pm 0,02$ mg/mL.

O resultado obtido neste estudo é bastante diferente do obtido por Moreira *et al.* (2008) [98], que indica um EC_{50} de $0,009 \pm 0,001$ mg/mL para o própolis de Bornes. Esta situação poder-se-á dever ao facto da amostra de própolis neste trabalho ter sofrido uma purificação, com base numa extração líquida-líquido usando o éter dietílico, ou ainda devido à sua diferente origem botânica das duas amostras.

3.4.2. DPPH

Neste trabalho, o radical DPPH é usado para se avaliar a capacidade bloqueadora de compostos presentes num extrato de própolis.

O radical livre DPPH é um cromóforo extremamente estável que absorve a 517 nm e apresenta uma coloração violeta intensa. Consoante o DPPH vai sendo reduzido à forma de hidrazina por um composto químico antioxidante, o seu eletrão emparelha-se, o que resulta numa diminuição da cor para amarelo claro [20]. Na Figura 18 mostram-se os resultados obtidos da reação do DPPH, ao nível do efeito bloqueador, com níveis crescentes de extrato de própolis de Bornes.

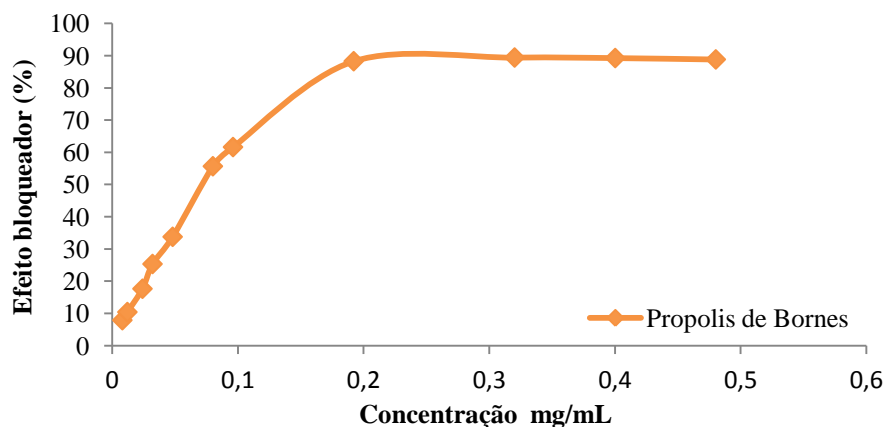


Figura 18. Efeito bloqueador do DPPH do extrato seco da amostra de própolis de Bornes.

A concentração de extrato seco de própolis a que equivale 50% de inibição, calculou-se a partir da percentagem do efeito bloqueador em função da concentração de extrato [101].

O valor de EC_{50} indica a concentração que elimina 50% dos radicais livres, o que significa que quanto maior o consumo de DPPH pelo extrato de própolis (amostra), menor será a concentração de EC_{50} e maior atividade antioxidante do extrato de própolis [14,102,103]. O valor calculado de EC_{50} para o extrato seco de própolis de Bornes foi de $0,072 \pm 0,003$ mg/mL.

Mais uma vez o resultado obtido neste estudo tem uma diferença acentuada comparativamente com o valor obtido por Moreira *et al.* (2008) [98], de $0,006 \pm 0,003$ mg/mL.

Miguel *et al.* (2010) [23], em própolis do Algarve obtiveram valores mais baixos de DPPH, os quais variaram entre 0,027 e 0,031 mg/mL dependendo da época de colheita da resina pela abelha (Inverno e Verão, respetivamente).

Os resultados obtidos para a determinação de compostos fenólicos e flavonoides totais, assim como para a atividade antioxidante estão sumariados na Tabela 3.

Tabela 3. Valores determinados para os fenóis, flavonoides totais e a atividade antioxidante para o própolis de Bornes e Lousã.

Amostras de própolis	Fenóis totais	Flavonoides totais	Atividade antioxidante (poder redutor, EC₅₀)	Atividade antioxidante (DPPH, EC₅₀)
Bornes	91,5 ± 0,7 (mg/L)	23,4 ± 0,8 (mg/L)	0,33 ± 0,02 (mg/mL)	0,072 ± 0,003 (mg/mL)
Lousã	117 ± 2 (mg/L)	32,9 ± 0,1 (mg/L)	-	-

Da análise da Tabela 3 pode-se verificar que a amostra de própolis de Bornes apresenta um teor em compostos fenólicos totais muito menor comparativamente à amostra de própolis de Lousã. Relativamente aos compostos de flavonoides totais a diferença entre as duas amostras não foi muito significativa. Das duas amostras de propolis, foi a de Lousã que apresentou uma quantidade maior tanto de compostos fenólicos totais como de flavonoides totais, o que pode ser explicado pela sua proveniência.

Zheng e Wang (2001) [99] observaram uma correlação positiva entre a atividade antioxidante e os compostos fenólicos totais para ervas medicinais e aromáticas, de 0,92 e 0,986, respetivamente.

Carpes (2008) [104], demonstrou uma correlação entre os dois parâmetros apresentando um coeficiente de correlação de 0,73 e 0,78 para o extrato etanólico de pólen do Paraná e Alagoas, respetivamente. Também Leja (2007) [105], verificou uma correlação positiva de 0,61 entre fenilpropanóides (compostos fenólicos) e a atividade antioxidante para o pólen de abelha.

Amostras de própolis da Transilvânia também evidenciaram uma relação linear entre a atividade antioxidante (DPPH) e o teor em compostos fenólicos totais (polifenóis), apresentando um valor de coeficiente de correlação de 0,84 [26].

3.5. Preparação das placas de TLC

No que respeita aos eluentes testados para a separação dos compostos fenólicos na placa de TLC, observou-se que a eluição bidimensional que apresentou melhores resultados foi: para a primeira dimensão, clorofórmio, metanol, ácido fórmico (88; 7; 5 v/v) e para a segunda dimensão, n-hexano, acetato de etilo, ácido acético (62; 28; 10 v/v).

Com a utilização destes eluentes, foi possível separar 26 manchas, com tamanhos diferentes e localizadas ao longo de toda a área da placa de TLC, como se pode observar na Figura 19. Algumas das manchas observáveis podem ser misturas de compostos.

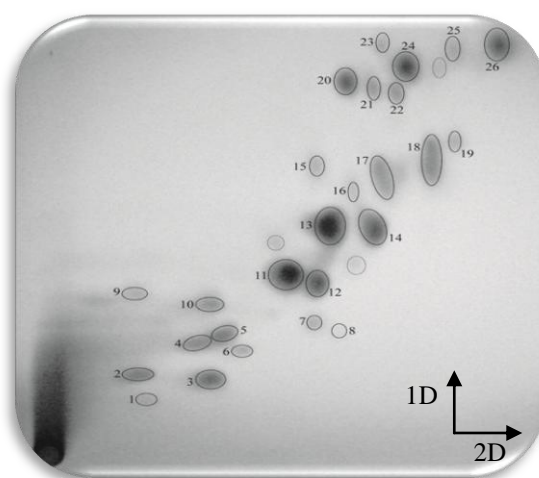


Figura 19. Separação de compostos fenólicos na placa de TLC.

3.6. Visualização dos compostos fenólicos na placa de TLC

Nas placas de TLC obtiveram-se 26 manchas separadas, cuja composição se pretende caracterizar. Com recurso, numa fase inicial, a técnicas de visualização usando reagentes químicos. Esta consiste em saber se na sua composição se encontram presentes compostos fenólicos, recorrendo-se a reagentes que reagem com estes compostos formando cores visíveis a olho nu ou na luz UV:

- ✓ Reagente de cloreto de alumínio;
- ✓ Reagente de cloreto de ferro;
- ✓ Reagente Folin-Ciocalteu;
- ✓ Reagente DPPH;
- ✓ Reagente de vanilina.

3.6.1. Reagente de cloreto de alumínio

O reagente cloreto de alumínio quando aplicado na placa de TLC por pulverização e na presença de compostos fenólicos forma manchas amarelas fluorescentes quando submetida à luz UV (365 nm), como podemos visualizar na Figura 20.

Da análise da Figura 20 verifica-se que nem todas as manchas apresentam fluorescência amarela, o que significa que algumas manchas podem ter menor quantidade de compostos fenólicos. Pelo contrário as manchas que apresentam uma fluorescência amarela mais intensa que outras, pode estar relacionado com a elevada quantidade de compostos fenólicos que cada mancha contém, assim como o tamanho da mancha em questão.

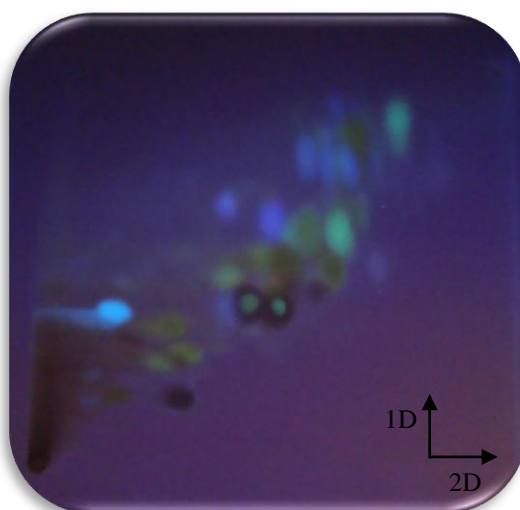


Figura 20. Resultado da pulverização da placa de TLC com o reagente cloreto de alumínio.

3.6.2. Reagente de cloreto de ferro

Os compostos fenólicos da amostra presentes nas manchas da placa de TLC vão reagir com o cloreto de ferro e formar uma cor azul-violeta, como se pode verificar na Figura 21.

Observando a Figura 21 verificamos que existem manchas azuladas e outras violetas, num fundo amarelo-alaranjado. Tal facto pode estar relacionado com a quantidade de compostos fenólicos presentes nas diferentes manchas, a espécie de família de compostos fenólicos presentes nas diferentes manchas e com a quantidade de reagente pulverizado que se depositou nas zonas das mesmas. As manchas azul-violeta

indicam que a quantidade de compostos presentes (compostos fenólicos) na respectiva mancha a reagir com o cloreto de ferro foi elevada.

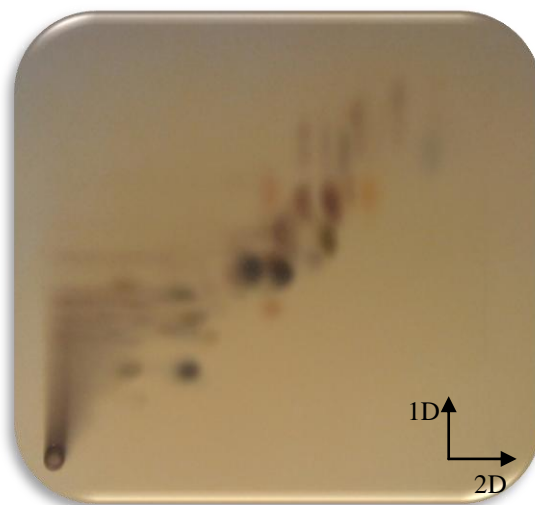


Figura 21. Resultado da pulverização da placa de TLC com o reagente cloreto de ferro.

3.6.3. Reagente Folin-Ciocalteu

As manchas na placa de TLC, obtidas por separação bidimensional usando a amostra de própolis de Bornes, que contenham compostos fenólicos, quando na presença do reagente Folin-Ciocalteu vão formar manchas com cor amarela e azul num fundo azulado como se pode visualizar na Figura 22. Com aplicação deste reagente ainda podemos observar quais as manchas que contêm compostos com atividade antioxidante.

Na Figura 22 são visíveis manchas amarelas e manchas azuis, sendo as manchas amarelas aquelas que possivelmente indicam a presença de maior quantidade de compostos fenólicos. Sendo também visível que a maioria das manchas separadas por TLC contém compostos com atividade antioxidante.

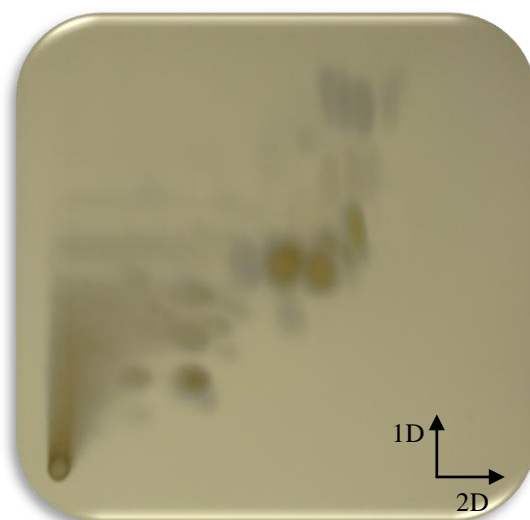


Figura 22. Resultado da pulverização da placa de TLC com o reagente Folin-Ciocalteu.

3.6.4. Reagente DPPH

O reagente DPPH apresenta uma cor roxa que tem como propriedade reagir com os compostos fenólicos presentes nas manchas separadas por TLC.

Este reagente quando reage com os compostos fenólicos na placa de TLC, forma manchas amarelas num fundo violeta. A Figura 23 mostra o resultado típico da aplicação do reagente DPPH por pulverização a uma placa de TLC contendo manchas com compostos que reagem com radicais que nos indicam a sua atividade antioxidante.

Observando a Figura 23 pode-se observar que praticamente todas as manchas têm coloração amarela, o que significa que no própolis podemos encontrar um elevado teor em compostos fenólicos assim como, uma elevada atividade antioxidante.

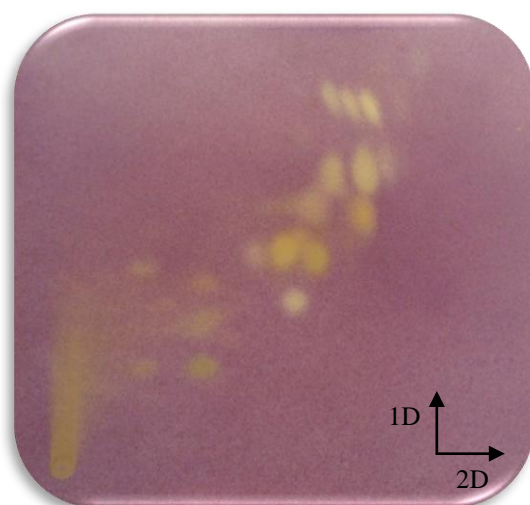


Figura 23. Resultado da pulverização da placa de TLC com o reagente DPPH.

3.6.5. Reagente de vanilina

O reagente vanilina quando aplicado na placa de TLC vai reagir com os compostos fenólicos presentes nas manchas separadas por TLC. Este em reação com os compostos fenólicos forma uma cor escura sobre um fundo branco como é observável na Figura 24.

Da observação da Figura 24 pode-se notar que as manchas com maior diâmetro foram aquelas que reagiram com maior intensidade com o reagente vanilina aplicado na placa de TLC por pulverização, o que significa que provavelmente têm uma maior composição em compostos fenólicos que as outras.

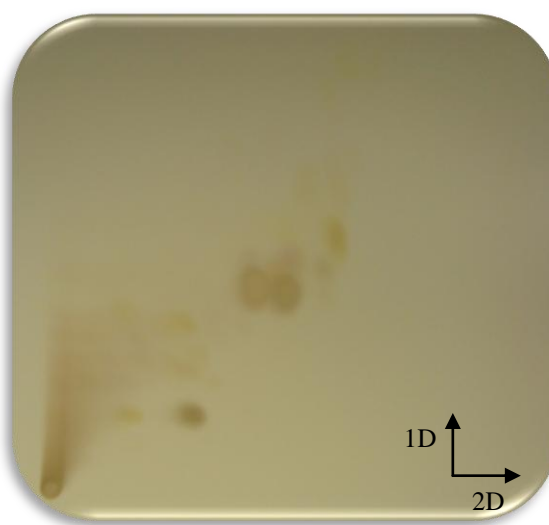


Figura 24. Resultado da pulverização da placa de TLC com o reagente vanilina.

Na Tabela 4 mostram-se os resultados obtidos pela aplicação dos reagentes de cloreto de alumínio (AlCl_3), cloreto de ferro (FeCl_3), Folin-Ciocalteu, DPPH e vanilina à placa de TLC após separação bidimensional de um extrato etanólico de própolis de Bornes. Os resultados são apresentados de forma a indicar se houve reação característica de possível presença de compostos fenólicos ou não e com indicação da coloração obtida quando for intensa.

Tabela 4. Reação dos reagentes com as manchas separadas na placa de TLC.

Amostras (manchas)	Reagentes*				
	AlCl ₃	FeCl ₃	FC	DPPH	Vanilina
A1	N	N	N	N	N
A2	N	N	S	S	S
A3	N	+S	+S	S	+S
A4	S	N	S	S	S
A5	S	N	S	S	S
A6	N	N	S	N	S
A7	N	N	N	S	N
A8	N	N	N	N	N
A9	N	N	S	S	S
A10	S	N	S	S	S
A11	+S	+S	+S	+S	+S
A12	+S	+S	+S	+S	+S
A13	S	S	N	S	S
A14	S	N	+S	+S	+S
A15	N	N	N	N	N
A16	S	S	S	S	S
A17	+S	S	S	S	S
A18	N	N	S	S	N
A19	N	N	N	N	N
A20	N	S	S	S	S
A21	N	N	S	S	N
A22	N	N	S	S	N
A23	N	N	N	N	S
A24	N	S	N	N	S
A25	+S	S	N	N	N
A26	N	N	N	N	N

* N - não houve reação; S - houve reação; +S - houve reação intensa.

Globalmente verifica-se que:

- ✓ Existe coerência nos resultados para todos os reagentes;
- ✓ Praticamente todas as manchas apresentam compostos que reagem com os reagentes usados, indicando a presença de compostos fenólicos, à exceção das manchas 1, 8, 15, 19 e 26, que não reagiram com nenhum dos reagentes.

- ✓ Maioritariamente foram as manchas 11 e 12 que apresentaram uma maior reação aos reagentes aplicados na placa de TLC, o que significa que são as que têm na sua composição uma possível maior quantidade de compostos fenólicos.

3.7. Atividade antimicrobiana

Para a realização da atividade antimicrobiana, nem todas as manchas dos compostos fenólicos separados por TLC foram usados. Foram selecionados para a execução do trabalho, as manchas de TLC mais escuras por se entender que seriam as que continham uma maior quantidade de compostos fenólicos (Figura 25).

Neste estudo avaliou-se a atividade antimicrobiana dos extratos obtidos por TLC do própolis de Bornes contra bactérias Gram-negativas (*Salmonella* spp. e *E. coli*), Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*) e a levedura (*Candida albicans*).

As concentrações mínimas inibitórias (CMI) para as bactérias e para levedura foram determinadas através da avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos de TLC. Os resultados estão sumariados na Tabela 5.

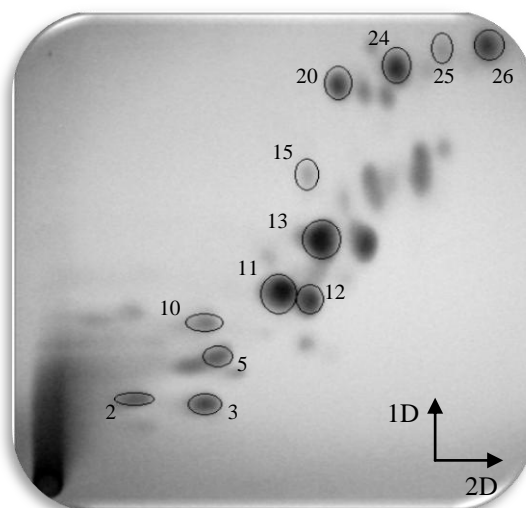


Figura 25. Manchas separadas por TLC utilizadas para a atividade antimicrobiana.

Tabela 5. Atividade antimicrobiana de várias amostras de extratos de TLC analisadas.

Amostras (manchas)	Microrganismos				
	<i>Salmonella</i> (CMI mg/mL)	<i>E. coli</i> (CMI mg/mL)	<i>B. cereus</i> (CMI mg/mL)	<i>S. aureus</i> (CMI mg/mL)	<i>C. albicans</i> (CMI mg/mL)
A2	0,00859	0,00859	0,1375	0,06875	0,1375
A3	0,0078	0,0078	0,125	0,0625	0,125
A5	0,0055	0,0055	0,0875	0,175	0,0875
A10	0,007	0,007	0,1125	0,45	0,1125
A11	0,1785	0,1785	1,428	0,1785	1,428
A12	0,1246	0,1246	0,997	7,975	0,498
A13	0,0242	0,0242	0,0969	1,55	0,1938
A15	0,009	0,009	0,15	0,6	0,30
A20	0,03125	0,03125	0,25	0,125	0,125
A24	0,0086	0,0086	0,275	0,55	0,275
A25	0,008	0,008	0,125	0,5	0,25
A26	0,0047	0,0047	0,075	0,3	0,15

Da análise da Tabela 5 podemos verificar que os extratos de manchas retirados da placa de TLC inibiram o crescimento de todos os microrganismos em estudo. A inibição dependeu da mancha removida da placa de TLC que foi selecionada e do microrganismo em questão. A mancha do TLC que induziu efeitos negativos menos acentuados contra todos os microrganismos em estudo foi a A11 (Figura 26) sendo a mais eficaz a A26 (Figura 27), talvez devido à concentração do composto presente que não foi possível controlar.

As bactérias *Salmonella* spp. e *E. coli* (Gram-negativas) foram as mais sensíveis aos extratos das manchas de TLC, o que significa que uma pequena concentração destas inibe o crescimento destes microrganismos. As bactérias Gram-positivas e a levedura apresentam uma CMI maior comparativamente às bactérias Gram-negativas, ou seja, é necessário uma concentração maior de extratos de TLC para inibir estes microrganismos. Estes resultados não estão em concordância com outros trabalhos, que referem que as bactérias Gram-negativas são mais resistentes que as Gram-positivas aos extratos de própolis [1,70]. Contudo, deve-se salientar que estas amostras são extratos obtidos de manchas isoladas na placa de TLC por análise bidimensional da amostra de própolis e não de extratos globais de própolis.

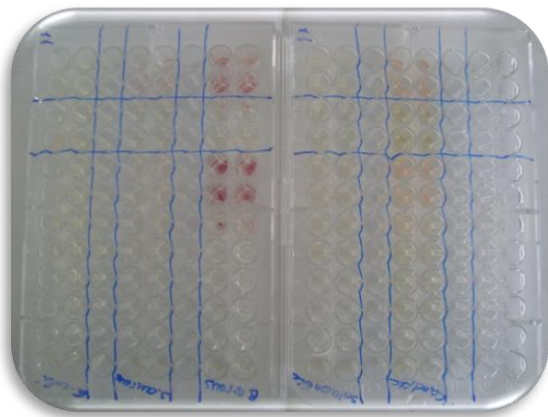


Figura 26. Microplaca com os resultados da amostra A11.

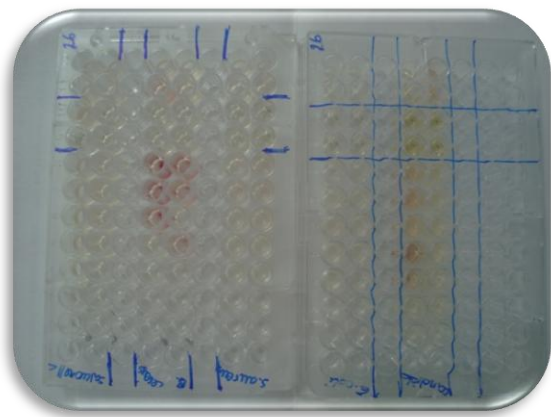


Figura 27. Microplaca com os resultados da amostra A26.

HPLC

Na placa de TLC foi possível separar 26 manchas por meio de uma análise bidimensional do extrato de própolis purificado, cuja composição é desconhecida. Um dos métodos usados para tentar identificar a composição de cada mancha obtida da análise por TLC foi o HPLC. Os cromatogramas obtidos para cada mancha (sinalizados de A1 a A26) estão apresentados nas Figuras 28 a 34. Os picos de cada cromatograma estão numerados, indicando a possível família de compostos fenólicos através do respectivo espectro UV. As famílias de compostos fenólicos que se procuram identificar foram: ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinâmicos, flavanonas, flavonas e flavonóis.

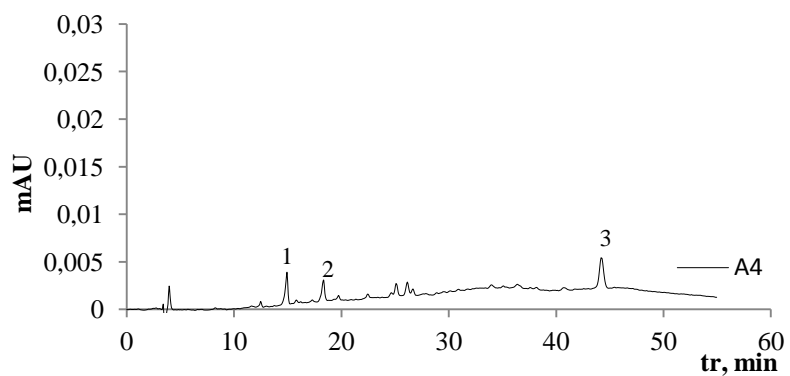
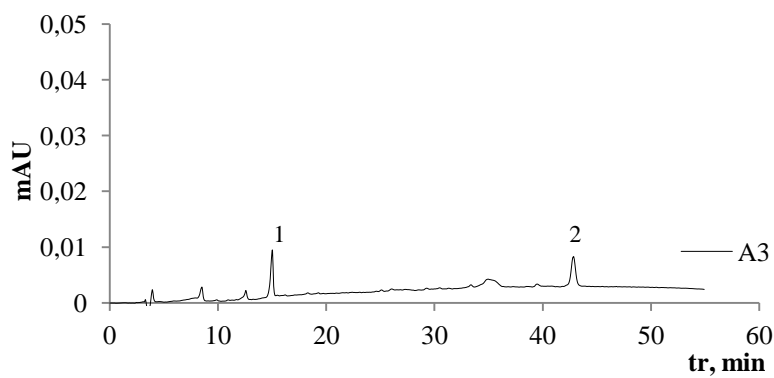
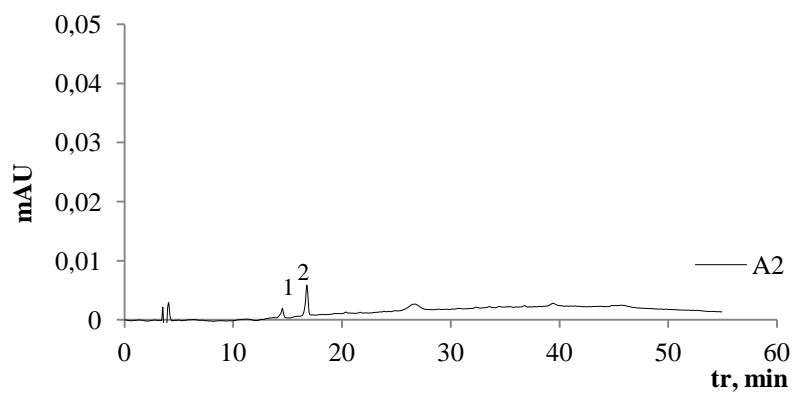
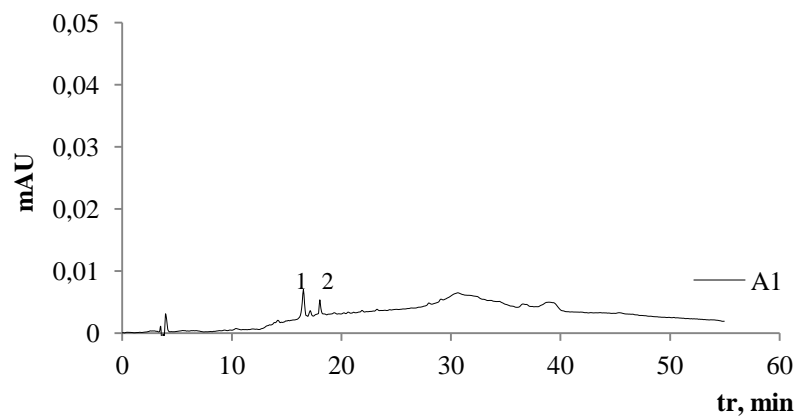


Figura 28. Cromatogramas de HPLC dos extratos de acetonitrilo obtidos para as manchas de TLC de 1 a 4.

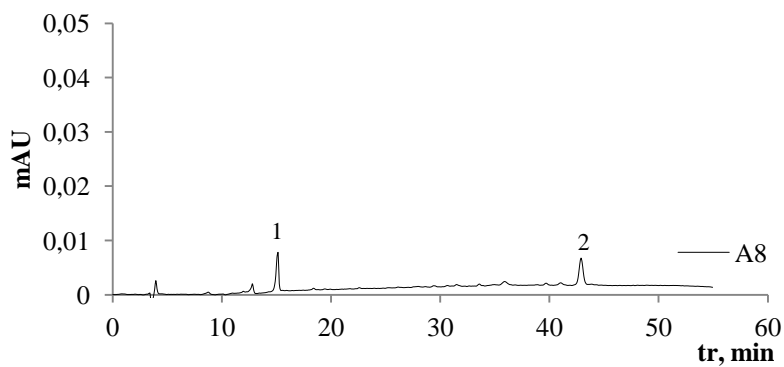
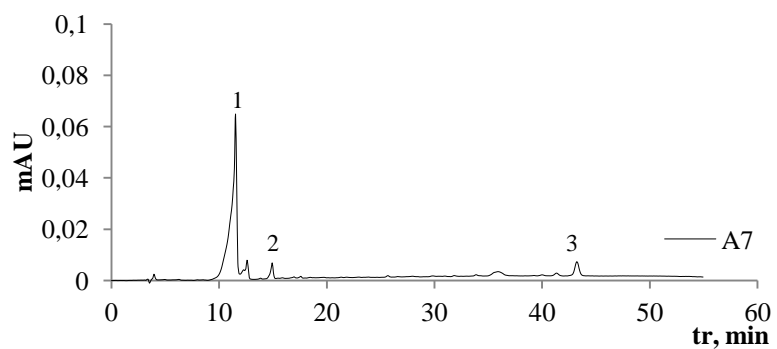
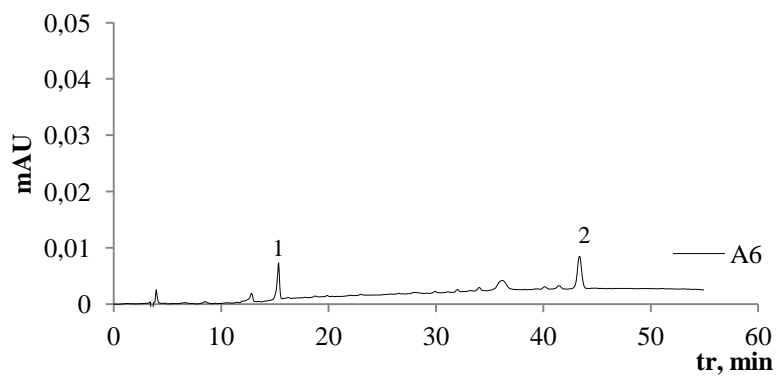
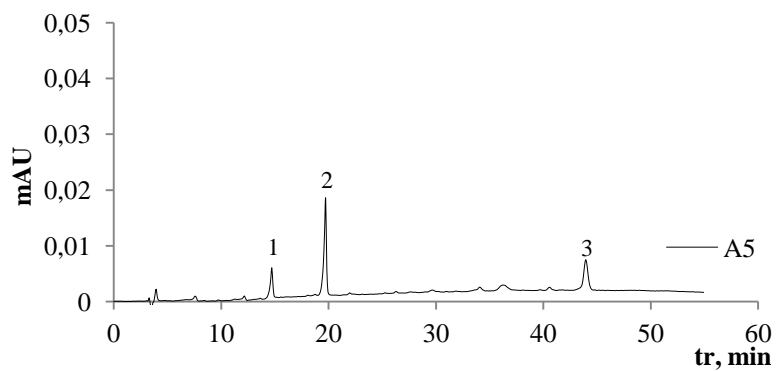


Figura 29. Cromatogramas de HPLC dos extratos de acetonitrilo obtidos para as manchas de TLC de 5 a 8.

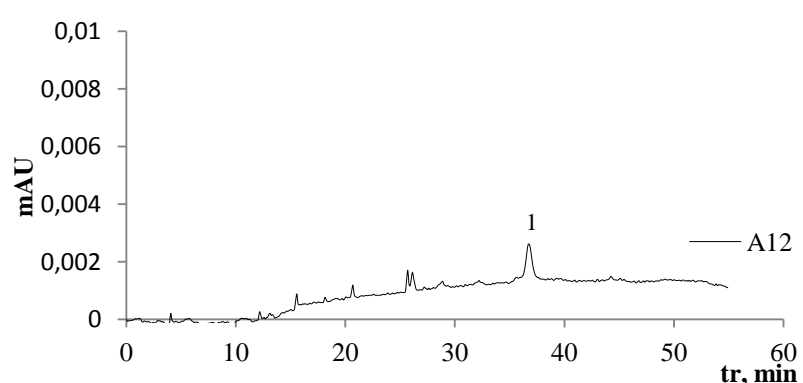
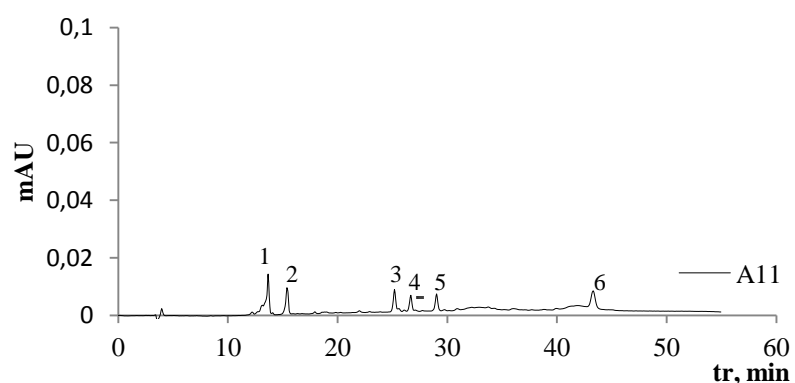
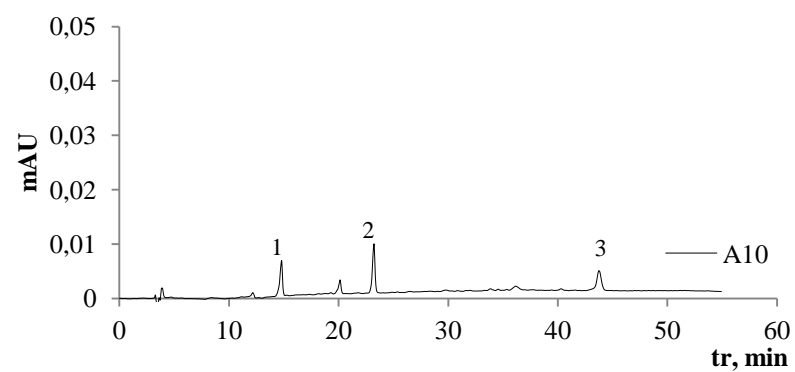
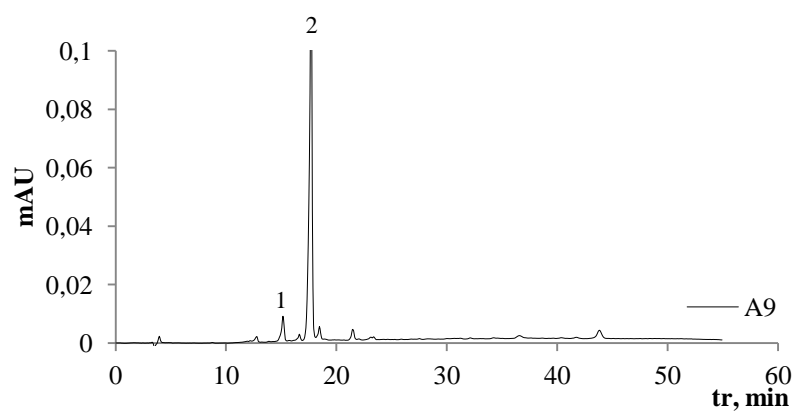


Figura 30. Cromatogramas de HPLC dos extratos de acetonitrilo obtidos para as manchas de TLC de 9 a 12.

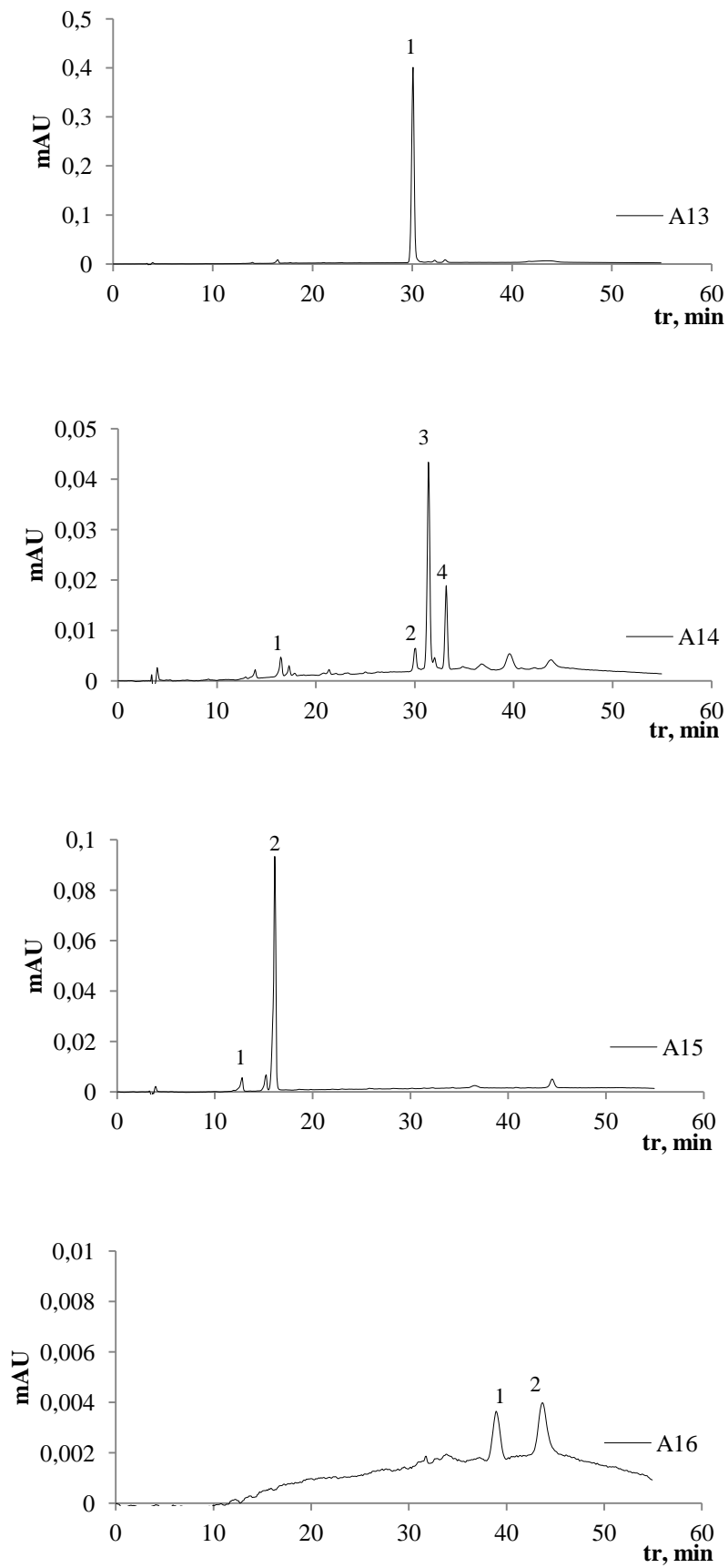


Figura 31. Cromatogramas de HPLC dos extratos de acetonitrilo obtidos para as manchas de TLC de 13 a 16.

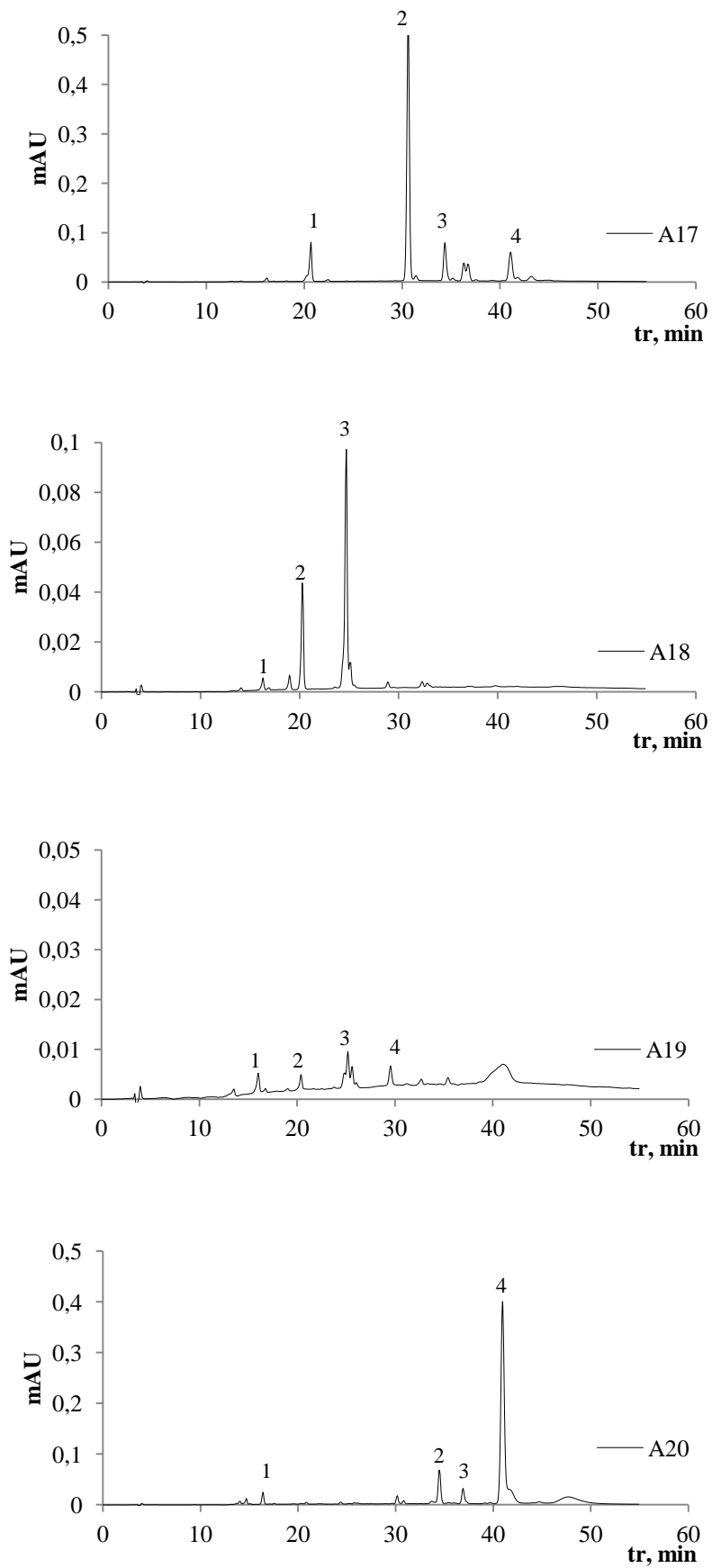


Figura 32. Cromatogramas de HPLC dos extratos de acetonitrilo obtidos para as manchas de TLC de 17 a 20.

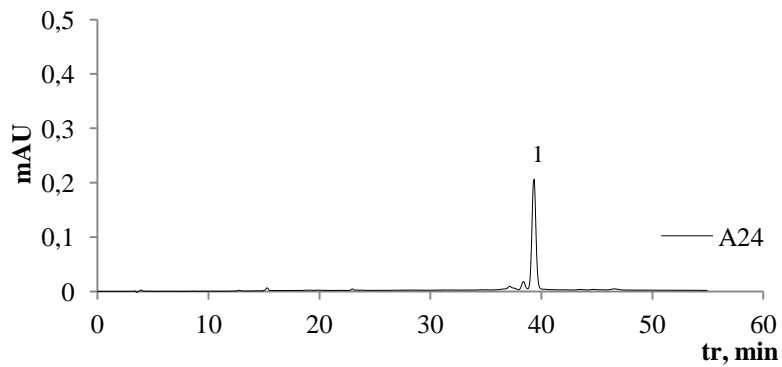
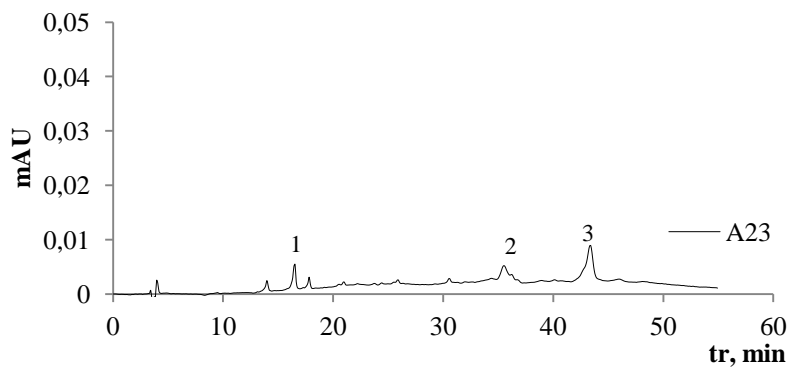
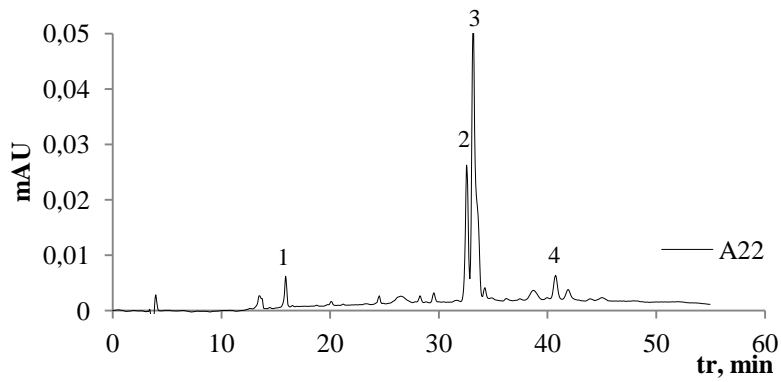
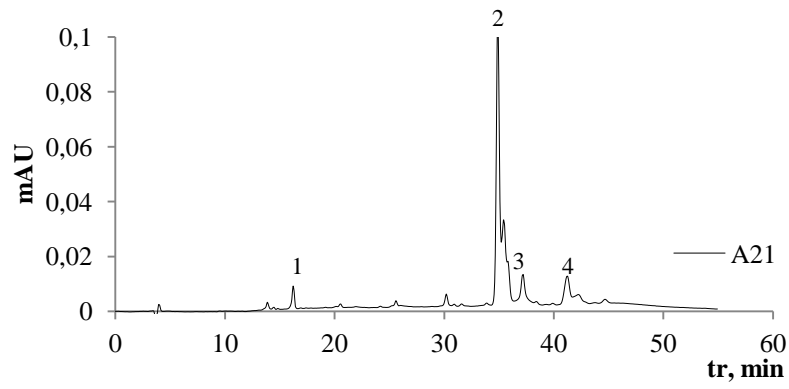


Figura 33. Cromatogramas de HPLC dos extratos de acetonitrilo obtidos para as manchas de TLC de 21 a 24.

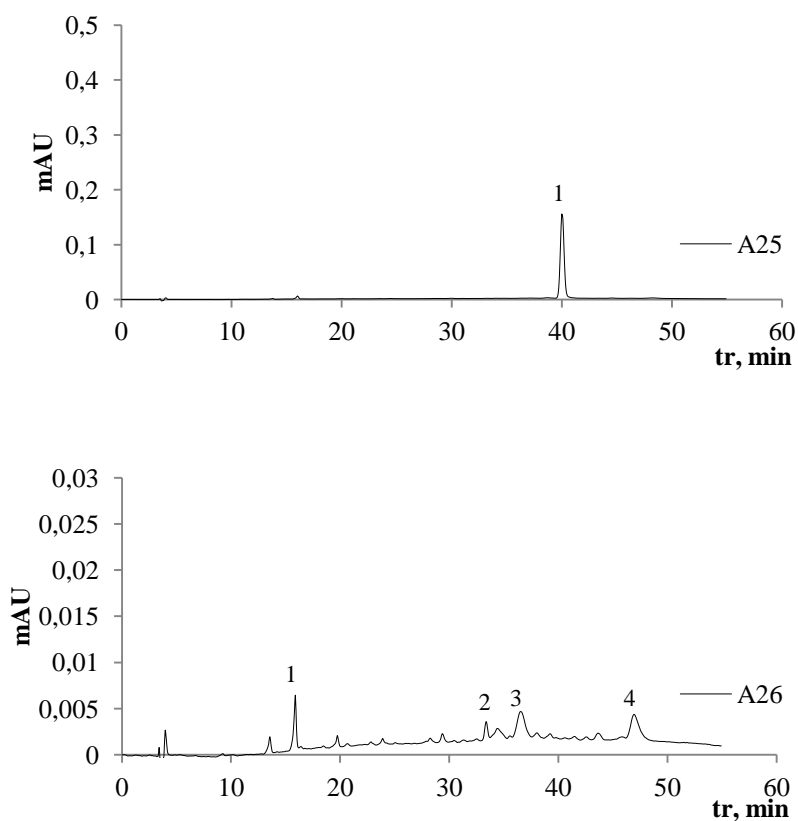


Figura 34. Cromatogramas de HPLC dos extratos de acetonitrilo obtidos para as manchas de TLC de 25 e 26.

Da análise dos cromatogramas, podemos verificar que existem picos que são praticamente comuns a quase todos eles como, por exemplo, os do tempo de retenção entre os 14,80 e 16,48 minutos, tendo-se verificado através dos espectros UV de cada pico que são provavelmente da mesma família de compostos fenólicos (ácidos hidroxibenzóicos). Há outros compostos que só aparecem em alguns cromatogramas e com picos de grande intensidade, supondo-se que seja o composto maioritário presente na respetiva mancha.

Muitos dos picos presentes nos cromatogramas não foram identificados relativamente à família do composto fenólico provável para aquele tempo de retenção, devido ao facto dos espectros dos picos dos compostos da amostra de própolis terem pequenas variações quando comparado com os dos compostos puros dos padrões.

Na Tabela 6 apresentam-se os tempos de retenção dos picos presentes nos cromatogramas obtidos da análise de cada mancha do própolis de Bornes, assim como a possível família de compostos fenólicos identificada através do espectro UV.

Dos 72 picos referidos na Tabela 6, 33 picos foram classificados como desconhecidos (46 %).

Tabela 6. Tempo de retenção e possível família de composto fenólico dos picos obtidos da análise de casa mancha por HPLC.

Nº mancha	Tempo de retenção (min)	Família	
1	1.	14,23	Desconhecido
	2.	18,06	Desconhecido
2	1.	14,53	Desconhecido
	2.	16,79	Desconhecido
3	1.	15,01	Desconhecido
	2.	42,86	Desconhecido
4	1.	14,92	Ácido hidroxibenzóico
	2.	18,32	Flavona
	3.	44,22	Desconhecido
5	1.	14,73	Desconhecido
	2.	19,73	Flavona
	3.	43,97	Desconhecido
6	1.	15,35	Desconhecido
	2.	43,38	Desconhecido
7	1.	11,54	Ácido hidroxicinâmico
	2.	14,93	Desconhecido
	3.	43,24	Desconhecido
8	1.	15,11	Ácido hidroxibenzóico
	2.	42,90	Desconhecido
9	1.	15,18	Desconhecido
	2.	17,70	Flavanona
10	1.	14,80	Ácido hidroxibenzóico
	2.	23,24	Flavonol
	3.	43,79	Desconhecido
11	1.	13,68	Ácido hidroxicinâmico
	2.	15,41	Ácido hidroxibenzóico
	3.	25,20	Ácido hidroxicinâmico
	4.	26,67	Ácido hidroxicinâmico
	5.	29,75	Ácido hidroxicinâmico
	6.	43,30	Desconhecido
12	1.	36,78	Desconhecido
13	1.	30,08	Flavona
14	1.	16,48	Ácido hidroxibenzóico
	2.	30,04	Flavona
	3.	31,40	Desconhecido
	4.	33,18	Desconhecido

Tabela 6. Tempo de retenção e possível família de composto fenólico dos picos obtidos da análise de casa mancha por HPLC (Continuação).

Nº mancha	Tempo de retenção (min)	Família	
15	1.	15,22	Ácido hidroxibenzóico
	2.	16,15	Ácido hidroxicinâmico
16	1.	38,98	Desconhecido
	2.	43,70	Desconhecido
17	1.	20,69	Ácido hidroxicinâmico
	2.	30,63	Flavanonas
	3.	34,38	Ácidos hidroxicinâmicos
	4.	41,09	Desconhecido
18	1.	16,32	Ácido hidroxibenzóico
	2.	20,32	Ácido hidroxicinâmico
	3.	24,72	Ácido hidroxicinâmico
19	1.	16,04	Desconhecido
	2.	20,41	Desconhecido
	3.	25,19	Desconhecido
	4.	29,54	Desconhecido
20	1.	16,42	Ácido hidroxibenzóico
	2.	34,51	Ácido hidroxicinâmico
	3.	36,93	Ácido hidroxicinâmico
	4.	40,98	Ácido hidroxicinâmico
21	1.	16,26	Ácido hidroxibenzóico
	2.	34,91	Ácido hidroxicinâmico
	3.	37,20	Ácido hidroxicinâmico
	4.	41,25	Ácido hidroxicinâmico
22	1.	15,93	Ácido hidroxibenzóico
	2.	32,58	Ácido hidroxicinâmico
	3.	33,16	Ácido hidroxicinâmico
	4.	40,74	Desconhecido
23	1.	16,50	Desconhecido
	2.	35,53	Desconhecido
	3.	43,38	Desconhecido
24	1.	39,33	Flavona
25	1.	40,06	Flavanona
26	1.	15,89	Ácido hidroxibenzóico
	2.	33,40	Ácido hidroxibenzóico
	3.	36,57	Desconhecido
	4.	46,96	Desconhecido

Como se pode verificar da análise da Tabela 6, a maior parte dos picos cromatográficos não mostraram qualquer identificação relativamente à possível família de compostos fenólicos. Da família dos compostos fenólicos identificadas na amostra de própolis de Bornes, a predominante foi a dos ácidos hidroxicinâmicos.

Os nossos resultados são corroborados pelas observações de Park *et al.* (2002) [49] sobre o própolis do Brasil.

3.8. MS

Outro método utilizado neste trabalho para identificar quais os compostos presentes em cada mancha separada por TLC foi o MS. Na Tabela 7 estão sumariados os primeiros resultados sobre os compostos identificados em cada mancha de TLC.

Tabela 7. Identificação dos compostos por MS presentes nos extratos de TLC com identificação do composto fenólico a que pertence.

Nº mancha	[M-H] ⁺	Composto fenólico
1	-	Em estudo
2	-	Em estudo
3	-	Em estudo
4	269	Apigenina
	397	Desconhecido
5	299	Kaempferide
6	255	Em estudo
	283	Em estudo
7	163	Em estudo
	255	Em estudo
	283	Em estudo
	326	Em estudo
	613	Em estudo
8	265	Em estudo
9	285	Pinobanksina-5-metil-éter
10	265	Em estudo
	329	Desconhecido
11	269	Ácido cafeico benzil éster
	283	Ácido cafeico feniletil éster

Tabela 7. Identificação dos compostos por MS presentes nos extratos de TLC com identificação do composto fenólico a que pertence (Continuação).

Nº mancha	[M-H] ⁺	Composto fenólico
12	247	Pinobanksina
	271	Ácido cafeico isoprenil éster
13	253	Crisina
	313	Pinobanksina-3-O-acetato
14	255	Pinocembrina
	269	Galangina
	283	Galangina-5-metil-éter
15	207	Ácido 3,4-Dimetil cafeico
	255	Em estudo
	283	Em estudo
16	313	Pinobanksina-3-O-acetato
	626	Em estudo
17	255	Pinocembrina
	327	Pinobanksina-3-O-propionato
18	173	Em estudo
	319	Em estudo
19	293	Em estudo
20	283	Acacetina
	309	Em estudo
21	283	Acacetina
22	261	Em estudo
23	-	Em estudo
24	-	Em estudo
25	-	Em estudo
26	-	Em estudo

Da análise da Tabela 7 pode verificar-se que das 26 manchas separadas por TLC nem todas foram identificadas, encontrando-se ainda em estudo as manchas 1-3, 6-8, 18, 19, 22-26. Dos compostos identificados, os mais abundantes foram os derivados do ácido cafeico e da pinobanksina.

Relativamente aos compostos fenólicos identificados no própolis por LC-MS, estes corroboram com os relatados por outros investigadores. De facto, Kumazana *et al.* (2004) [24] estudou amostras de própolis de várias origens geográficas (Argentina, China, Chile, Bulgária, Austrália, Brasil, Hungria, Nova Zelândia, Tailândia, África do

Sul, Estados Unidos, Ucrânia, Uruguai e Uzbequistão) e observou que, da família dos flavonoides, o composto pinobanksina e seus derivados foram os mais encontrados.

Outros trabalhos, com diferentes métodos de análise, verificaram que em amostras de própolis os ácidos fenólicos mais frequentes foram p-cumárico e ferúlico, o que não se verificou neste trabalho [43,45,46]. Convém salientar que o ácido cafeico e seus derivados foram encontrados sobretudo em amostras de própolis Turco e do Iraque [45,46].

Considerando que os resultados apresentados neste trabalho referentes às análises, dos extratos das manchas obtidas na separação por TLC, por espectrometria de massa são ainda preliminares não é ainda possível fazer uma comparação mais exaustiva sobre as diferenças na composição entre diferentes países de origem.



Capítulo 4

Conclusão

O própolis é um produto natural com uma composição complexa que varia consoante as características fitogeográficas onde se situa a colmeia e a época de colheita da resina. Este produto apresenta propriedades bioativas atribuídas à presença de compostos fenólicos, como os flavonoides e os ácidos fenólicos, tornando-se imperioso o seu estudo com vista à sua introdução na alimentação como alimento funcional e em terapêutica.

Da análise palinológica efetuada ao própolis de Bornes não foi detetado nenhum pólen como dominante. Os pólenes secundários mais frequentes pertenceram à família *Erica* sp. (41%) e *Castanea* sp. (32%).

Todos os reagentes utilizados para a visualização de compostos fenólicos na metodologia de TLC reagiram com as manchas separadas. Cada mancha mostrou um comportamento diferente de reação com os distintos reagentes, sendo possível definir as manchas com cores mais intensas na placa de TLC que se traduz numa maior concentração de compostos fenólicos. O reagente cloreto de alumínio foi o que permitiu uma maior visualização de manchas, para além das 26 manchas facilmente visíveis na placa de TLC com a utilização dos outros reagentes. Os reagentes Folin-Ciocalteu e DPPH além de permitirem visualizar as manchas separadas por TLC, também permitem verificar quais as que detêm atividade antioxidante.

Na análise aos fenóis totais, os resultados revelaram que o extrato de própolis de Bornes contém 28,7% de fenóis totais, tendo-se obtido um valor mais elevado de 37,1% para o extrato de própolis de Lousã. Situação similar obteve-se na análise do conteúdo em flavonoides totais, o extrato de própolis de Bornes tem teores de flavonoides (7,4%) inferiores ao extrato do própolis de Lousã (10,3%).

Relativamente à atividade antioxidante obtiveram-se valores de EC_{50} de $0,33 \pm 0,02$ mg/mL e de $0,072 \pm 0,003$ mg/mL para o extrato de própolis de Bornes usando o método do poder redutor e DPPH, respetivamente. Esta amostra revela ter um elevado potencial antioxidante.

Na atividade antimicrobiana todos os extratos das manchas obtidas da análise por TLC do própolis de Bornes inibiram os microrganismos em estudo. A inibição do microrganismo dependeu do extrato e do microrganismo em questão. A amostra que evidenciou mais atividade contra todos os microrganismos em estudo foi a A26 (extrato da mancha de TLC identificado como o nº 26 da separação bidimensional por TLC). As

bactérias Gram-negativas foram mais sensíveis aos extratos de TLC do que as Gram-positivas.

Por fim, na análise dos compostos fenólicos pelo método de HPLC, a família de compostos fenólicos que predominou foi a dos ácidos hidroxicinâmicos. Pelo método de MS os compostos fenólicos identificados maioritariamente foram os derivados do ácido cafeico (ácido cafeico benzil éster, ácido cafeico feniletil éster, ácido cafeico isoprenil éster, ácido 3,4-dimetil cafeico) e da pinobanksina (pinobanksina-5-metil-éter, pinobanksina-3-*O*-acetato, pinobanksina-3-*O*-propionato).

O presente trabalho mostra os resultados preliminares de um trabalho de caracterização de uma amostra de própolis por TLC através da análise bidimensional, que tem elevadas vantagens por permitir uma primeira separação de compostos fenólicos que pode ser importante para:

- ✓ identificar possíveis diferenças entre diferentes amostras de própolis;
- ✓ separação previa de compostos para posterior análise por MS.

As amostras de própolis têm importantes propriedades biológicas como, a atividade antioxidante e antimicrobiana, geralmente associadas à sua composição em compostos fenólicos, o que mostram a importância deste trabalho como contribuição para a caracterização do própolis para futuramente ser mais valorizado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Lustosa, S.R., Galindo, A.B., Nunes, L.C.C., Randau, K.P., Neto, P.J.R., 2008. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **18**, 447-454.
- [2] Burdock, G.A., 1998. Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis (Propolis). *Food and Chemical Toxicology* **36**, 347-363.
- [3] Righi, A.A., 2008. Perfil Químico de Amostras de Própolis Brasileiras. Dissertação apresentada no Instituto de Biociências Universidade de São Paulo.
- [4] Mendonça, L.S., 2011. Aspectos ambientais, químicos e biológicos relacionados à própolis vermelha. Dissertação apresentada na Universidade Tiradentes.
- [5] Marcucci, M.C., 1996. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. *Química Nova* **19**, 529-536.
- [6] Gregoris, E., Stevanato, R., 2010. Correlations between polyphenolic composition and antioxidant activity of Venetian propolis. *Food and Chemical Toxicology* **48**, 76-82.
- [7] Barbosa, M.H., Zuffi, F.B., Maruxo, H.B., Jorge, L.L.R., 2009. Ação terapêutica da própolis em lesões cutâneas. *Acta Paulista de Enfermagem* **22**, 318-322.
- [8] Longhini, R., Raksa, S.M., Oliveira, A.C.P., Svidzinski, T.I.E., Franco, S.L., 2007. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **17**, 388-395.

- [9] Kalogeropoulos, N., Konteles, S.J., Troullidou, E., Mourtzinos, I., Karathanos, V.T., 2009. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chemistry* **116**, 452-461.
- [10] Funari, C.S., Ferro, V.O., 2006. Análise de própolis. *Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas* **26**, 171-178.
- [11] Barth, O.M., Dutra, V.M.L., Justo, R.L., 1999. Pollen analysis of some samples of propolis from Southern Brazil. *Ciência Rural* **29**, 663-667.
- [12] Castro, M.L., Cury, J.A., Rosalen, P.L., Alencar, S.M., Ikegaki, M., Duarte, S., Koo, H., 2007. Propolis do sudeste e nordeste do brasil influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. *Química Nova* **30**, 1512-1516.
- [13] Simões, C.C., Araújo, D.B., Araújo, R.P.C., 2008. Estudo in vitro e ex vivo da ação de diferentes concentrações de extratos de própolis frente aos microrganismos presentes na saliva de humanos. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **18**, 84-89.
- [14] Cottica, S.M., Sawaya, A.C.H.F., Eberlin, M.N., Franco, S.L., Zeoula, L.M., Visentainer, J.V., 2011. Antioxidant Activity and Composition of Propolis Obtained by Different Methods of Extraction. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **22**, 929-935.
- [15] Silva, R.A., Rodrigues, A.E., Ribeiro, A.C.M., Custódio, A.R., Andrade, N.E.D., Pereira, W.E., 2006. Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil. *Ciência Rural, Santa Maria* **36**, 1842-1848.
- [16] Cueto, A.P., Alves, S.H., Pilau, M., Weiblen, R., Kubiça, T.F., Lovato, L.T., 2011. Atividade antiviral do extrato de própolis contra o calicivírus felino, adenovírus canino 2 e vírus da diarreia viral bovina. *Ciência Rural, Santa Maria* **41**, 1800-1806.
- [17] Dias, L.G., Pereira, A.P., Estevinho, L.M., 2012. Comparative study of different Portuguese samples of propolis: Pollinic, sensorial, physicochemical, microbiological characterization and antibacterial activity. *Food and Chemical Toxicology* **50**, 4246-4253.

- [18] Nunes, L.C.C., Galindo, A.B., Deus, A.S.O., Rufino, D.A., Randau, K.P., Xavier, H.S., Citó, A.M.G.L., Neto, P.J.R., 2009. Variabilidade sazonal dos constituintes da própolis vermelha e bioatividade em *Artermia salina*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **19**, 524-529.
- [19] Júnior, A.F., Lopes, M.M.R., Colombari, V., Monteiro, A.C.M., Vieira, E.P., 2006. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. *Ciência Rural, Santa Maria* **36**, 294-297.
- [20] Cabral, I.S.R., Oldoni, T.L.C., Prado, A., Bezerra, R.M.N., Alencar, S.M., Ikegaki, M., Rosalen, P.L., 2009. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. *Química Nova* **32**, 1523-1527.
- [21] Sforcin, J.M., 2007. Propolis and the immune system: a review. *Journal of Ethnopharmacology* **113** 1-14.
- [22] Koru, O., Toksoy, F., Acikel, C.H., Tunca, Y.M., Baysallar, M., Guclu, A.U., Akca, E., Tuylu, A.O., Sorkun, K., Tanyuksel, M., Salih, B., 2007. In vitro antimicrobial activity of propolis samples from different geographical origins against certain oral pathogens. *Anaerobe* **13**, 40-145.
- [23] Miguel, M.G., Nunes, S., Dandlen, S.A., Cavaco, A.M., Antunes, M.D., 2010. Phenols and antioxidant activity of hydro-alcoholic extracts of propolis from Algarve, South of Portugal. *Food and Chemical Toxicology* **48**, 3418-3423.
- [24] Kumazana, S., Hamasaka, T., Nakayama, T., 2004. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry* **84**, 329-339.
- [25] Sforcin, J.M., Orsi, R.O., Bankova, V., 2005. Effect of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production. *Journal of Ethnopharmacology* **98**, 301-305.
- [26] Mihai, C.M., Marghitas, L.A., Dezmirean, D.S., Barnutiu, L., 2011. Correlation between Polyphenolic Profile and Antioxidant Activity of Propolis from Transylvania. *Animal Science and Biotechnologies* **44**, 100-103.
- [27] Petrova, A., Popova, M., Kuzmanova, C., Tsvetkova, I., Naydenski, H., Muli, E., Bankova, V., 2010. New biologically active compounds from Kenyan propolis. *Fitoterapia* **81**, 509-514.

- [28] Alencar, S.M., Oldoni, T.L.C., Castro, M.L., Cabral, I.S.R., Costa-Neto, C.M., Cury, J.A., Rosalen, P.L., Ikegaki, M., 2007. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. *Journal of Ethnopharmacology* **113**, 278-283.
- [29] Moț, A.C., Silaghi-Dumitrescu, R., Sârbu, C., 2011. Rapid and effective evaluation of the antioxidant capacity of propolis extracts using DPPH bleaching kinetic profiles, FT-IR and UV-vis spectroscopic data. *Journal of Food Composition and Analysis* **24**, 516-522.
- [30] Marcucci, M.C., 1995. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* **26**, 83-99.
- [31] Scazzocchio, F., D'Auria, F.D., Alessandrini, D., Pantanella, F., 2006. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. *Microbiological Research* **161**, 327-333.
- [32] Dos Santos, C.R., Arcenio, F., Carvalho, E.S., Lúcio, E.M.R.A., Araújo, G.L., Teixeira, L.A., Sharapin, N., Rocha, L., 2003. Otimização do processo de extração de própolis através da verificação da atividade antimicrobiana. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **13**, 71-74.
- [33] Valente, M.J., Baltazar, A.F., Henrique, R., Estevinho, L., Carvalho, M., 2011. Biological activities of Portuguese propolis: Protection against free radical-induced erythrocyte damage and inhibition of human renal cancer cell growth in vitro. *Food and Chemical Toxicology* **49**, 86-92.
- [34] Ramos, A.F.N., Miranda, J.L., 2007. Própolis: a review of its anti-inflammatory and healing actions. *Journal of Venomous Animals and Toxins Diseases* **13**, 697-710.
- [35] Marcucci, M.C., Ferreres, F., García-Viguera, C., Bankova, V.S., Castro, S.L., Dantas, A.P., Valente, P.H.M., Paulino, N., 2001. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology* **74**, 105-112.
- [36] Mirzoeva, O.K., Grishanin, R.N., Calder, P.C., 1997. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiological Research* **152**, 239-246.

- [37] Luo, C., Zou, X., Li, Y., Sun, C., Jiang, Y., Wu, Z., 2011. Determination of flavonoids in propolis-rich functional foods by reversed phase high performance liquid chromatography with diode array detection. *Food Chemistry* **127**, 314-320.
- [38] Vargas, A.C., Loguercio, A.P., Witt, N.M., Costa, M.M., Silva, M.S., Viana, L.R., 2004. Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcóolico de própolis. *Ciência Rural, Santa Maria* **34**, 159-163.
- [39] Ferreira, C.M., 2008. Caracterização de Méis da Serra do Caramulo. Dissertação apresentada na Universidade de Aveiro.
- [40] Sousa, J.B.A.S.P., 2008. Actividade Biológica de derivados do Ácido Cafeico: Efeito antioxidante e anti-inflamatório. Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.
- [41] Pires, A.P.M., 2010. Composição química e actividade antioxidante de folhas de diferentes castas de videira. Dissertação apresentada na Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança.
- [42] Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L., 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* **79**, 727-747.
- [43] Gómez-Caravaca, A.M., Gómez-Romero, M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., 2006. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **41**, 1220-1234.
- [44] Barbarić, M., Mišković, K., Bojić, M., Lončar, M.B., Smolčić-Bubalo, A., Debeljak, Z., Medić-Šarić, M., 2011. Chemical composition of the ethanolic propolis extracts and its effect on HeLa cells. *Journal of Ethnopharmacology* **135**, 772-778.
- [45] Popova, M., Silici, S., Kaftanoglu, O., Bankova, V., 2005. Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. *Phytomedicine* **12**, 221-228.

- [46] Sulaiman, G.M., Al Sammarrae, K.W., Ad'hjah, A.H., Zuchetti, M., Frapolli, R., Bello, E., Erba, E., D'Incalci, M., Bagnati, R., 2011. Chemical characterization of Iraqi propolis samples and assessing their antioxidant potentials. *Food and Chemical Toxicology* **49**, 2415-2421.
- [47] Teixeira, E.W., Message, D., Meira, R.M.S.A., Salatino, A., 2003. Indicadores da origem botânica da própolis: importância e perspectivas. *Boletim de Indústria Animal, Nova Odessa* **60**, 83-106.
- [48] Barth, O.M., 2004. Melissopalynology in Brazil: a review of pollen analysis of honeys propolis and pollen loads of bees. *Scientia Agricola (Piracicaba, Brazil)*. **61**, 342-350.
- [49] Park, Y.K., Alencar, S.M., Scamparini, A.R.P., Aguiar, C.L., 2002. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. *Ciência Rural, Santa Maria* **32**, 997-1003.
- [50] Sawaya, A.C.H.F., Souza, K.S., Marcucci, M.C., Cunha, I.B.S., Shimizu, M.T., 2004. Analysis the composition of brazilian propolis extracts by chromatography and evaluation of their in vitro activity against gram-positive bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology* **35**, 104-109.
- [51] Bankova, V., de Castro, S.L., Marcucci, M.C., 2000. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* **31**, 3-15.
- [52] Popova, M.P., Chinou, I.B., Marekov, I.N., Bankova, V.S., 2009. Terpenes with antimicrobial activity from Cretan propolis. *Phytochemistry* **70**, 1262-1271.
- [53] Valencia, D., Alday, E., Robles-Zepeda, R., Garibay-Escobar, A., Galvez-Ruiz, J.C., Salas-Reyes, M., Jiménez-Estrada, M., Velazquez-Contreras, E., Hernandez, J., Velazquez, C., 2012. Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis. *Food Chemistry* **131**, 645-651.
- [54] Abu-Mellal, A., Koolaji, N., Duke, R.K., Tran, V.H., Duke, C.C., 2012. Prenylated cinnamate and stilbenes from Kangaroo Island propolis and their antioxidant activity. *Phytochemistry* **77**, 251-259.
- [55] Alencar, S.M., Aguiar, C.L., Paredes-Guzmán, J., Park, Y.K., 2005. Composição química de *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais. *Ciência Rural, Santa Maria* **35**, 909-915.

- [56] Silici, S., Kutluca, S., 2005. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *Journal of Ethnopharmacology* **99**, 69-73.
- [57] Gonsales, G.Z., Orsi, R.O., Fernandes Júnior, A., Rodrigues, P., Funari, S.R.C., 2006. Antibacterial activity of própolis collected in diferente regions of brazil. *Journal of Venomous Animals and Toxins Diseases* **12**, 276-284.
- [58] Almeida, R.B., Camarato, J.L., Navarro, D.F., Parker, Y.K., Ikegaki, M., Junior, V.A.K., 1997. Determinação de flavonoides totais em amostras de própolis. *Ciências Biológicas e da Saúde* **3**, 33-41.
- [59] Tylkowski, B., Trusheva, B., Bankova, V., Giamberini, M., Peev, G., Nikolova, A., 2010. Extraction of biologically active compounds from propolis and concentration of extract by nanofiltration. *Journal of Membrane Science* **348**, 124-130.
- [60] Silva, J.F.M.S., Souza, M.C., Matta, S.R., Andrade, M.R., Vidal, F.V.N., 2006. Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. *Food Chemistry* **99**, 431-435.
- [61] Cardoso, R.L., Maboni, F., Machado, G., Alves, S.H., Vargas, A.C., 2010. Antimicrobial activity of propolis extract against Staphylococcus coagulase positive and Malassezia pachydermatis of canine otitis. *Veterinary Microbiology* **142**, 432-434.
- [62] Kujungiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Christov, R., Popov, S., 1999. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology* **64**, 235-240.
- [63] Lu, L.C., Chen, Y.W., Chou, C.C., 2005. Antibacterial activity of propolis against Staphylococcus aureus. *International Journal of Food Microbiology* **102**, 213-220.
- [64] Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J.A., 2008. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *Journal of food science* **73**, 117-124.
- [65] Tim-Cushnie, T.P., Lamb, A.J., 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents* **26**, 343-356.

- [66] Uzel, A., Sorkun, K., Önçağ, O., Çoğulu, D., Gençay, O., Salih, B., 2005. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiological Research* **160**, 189-195.
- [67] Mohammadzadeh, S., Shariatpanahi, M., Hamed, M., Ahmadkniha, R., Samadi, N., Ostad, S.N., 2007. Chemical composition, oral toxicity and antimicrobial activity of Iranian propolis. *Food Chemistry* **103**, 1097-1103.
- [68] Bianchini, L., Bedendo, I.P., 1998. Efeito antibiótico do própolis sobre bactérias fitopatogênicas. *Scientia agricola* **55**, 149-152.
- [69] Menezes, H., 2005. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. Arquivos do Instituto. *Biologico, São Paulo* **72**, 405-411.
- [70] Sforcin, J.M., Fernandes Jr, A., Lopes, C.A.M., Bankova, V., Funari, S.R.C., 2000. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology* **73**, 243-249.
- [71] Oliveira, A.C.P., Shinobu, C.S., Longhini, R., Franco, S.L., Svidzinshi, T.I.E., 2006. Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from onychomycosis lesions. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* **101**, 493-497.
- [72] Agüero, M.B., Svetaz, L., Sánchez, M., Luna, L., Lima, B., López, M.L., Zacchino, S., Palermo, J., Wunderlin, D., Feresin, G.E., Tapia, A., 2011. Argentinean Andean propolis associated with the medicinal plant *Larrea nitida* Cav. (Zygophyllaceae). HPLC–MS and GC–MS characterization and antifungal activity. *Food and Chemical Toxicology* **49**, 1970-1978.
- [73] Banskota, A.H., Tezuka, Y., Kadota, S., 2001. Recent Progress in Pharmacological Research of Propolis. *Phytotherapy Research* **15**, 561-571.
- [74] Laguerre, M., Lecomte, J., Villeneuve, P., 2007. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research* **46**, 244-282.
- [75] Mohammadzadeh, S., Shariatpanahi, M., Hamed, M., Amanzadeh, Y., Ebrahimi, S.E.S., Ostad, S.N., 2007. Antioxidant power of Iranian propolis extract. *Food Chemistry* **103**, 729-733.

- [76] Gekker, G., Hu, S., Spivak, M., Lokensgard, J.R., Peterson, P.K., 2005. Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4⁺ lymphocyte and microglial cell cultures. *Journal of Ethnopharmacology* **102**, 158-163.
- [77] Ozkul, Y., Silici, S., Eroglu, E., 2005. The anticarcinogenic effect of propolis in human lymphocytes culture. *Phytomedicine* **12**, 742-747.
- [78] Carvalho, A.A., Finger, D., Machado, C.S., Schmidt, E.M., Costa, P.M., Alves, A.P.N.N., Morais, T.M.F., Queiroz, M.G.R., Quináia, S.P., Rosa, M.R., Santos, J.M.T., Pessoa, C., Moraes, M.O., Costa-Lotufo, L.V., Sawaya, A.C.H.F., Eberlin, M.N., Torres, Y.R., 2011. In vivo antitumoural activity and composition of an oil extract of Brazilian propolis. *Food Chemistry* **126**, 1239-1245.
- [79] Packer, J.F., Luz, M.M.S., 2007. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **17**, 102-107.
- [80] Bankova, V., 2005. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology* **100**, 114-117.
- [81] Almeida, E.C., Menezes, H., 2002. Anti-inflammatory activity of propolis extracts: a review. *Journal of Venomous Animals and Toxins* **8**, 191-212.
- [82] Barth, O.M., Luz, C.F.P., 2009. Palynological analysis of Brazilian red propolis samples. *Journal of Apicultural Research and Bee World* **48**, 181-188.
- [83] Park, Y.K., Ikegaki, M., Abreu, J.A.S., Alcici, N.M.F., 1998. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* **18**, 313-318.
- [84] Hanh-Deinstrop, Elke. Applied thin-layer chromatography, best practice and avoidance of mistakes. Wiley-VCH, 2007.
- [85] Spangenberg, Bernd; Poole, Colin F.; Weins, Christel. Quantitative thin-layer chromatography, a practical survey. Springer, 2011.
- [86] Sherma, Joseph; Fried, Bernard. Handbook of Thin-Layer Chromatography (*Chromatographic science series* **89**), Marcel Dekker, Inc., 2003.
- [87] Wall, Peter E.. Thin-layer chromatography, a modern practical approach. The Royal Society of Chemistry, 2005.

- [88] Kar, Ashutosh. Pharmaceutical drug analysis, revised second edition. New age international publishers, 2005.
- [89] Waksmundzka-Hajnos, Monika; Sherma, Joseph; Komalska, Teresa. Thin layer chromatography in phytochemistry (*Chromatography science series 99*). CRC Press, 2008.
- [90] Chen, C.R., Lee, Y.N., Chang, C.M.J., Lee, M.R., Wei, I.C., 2007. Hot-pressurized fluid extraction of flavonoids and phenolic acids from Brazilian propolis and their cytotoxic assay in vitro. *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers* **38**, 191-196.
- [91] Scott, R.P.W.. Liquid chromatography detectors, second completely revised edition (*Journal of chromatography library 33*). Elsevier, 1986.
- [92] McMaster, Marvin C.. LC-MS, a practical user's guide. Wiley, 2005.
- [93] Singleton, V.L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* **299**, 152-178.
- [94] Woisky, R.G., & Salatino, A., 1998. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apicultural Research* **37**, 99-105.
- [95] Berker, K.I., Güçlü, K., Tor, I., Apak, R., 2007. Comparative evaluation of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. *Talanta* **72**, 1157-1165.
- [96] Hatano, T., Kagawa, H., Yasuhara, T., Okuda, T., 1988. Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effects. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **36**, 2090-2097.
- [97] Moreira, L., Dias, L.G., Pereira, J.A., Estevinho, L., 2008. Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. *Food and Chemical Toxicology* **46**, 3482-3485.

- [98] Cordeiro, P.C.S., 2004. Efeito da variação sazonal na produção de compostos ativos e na atividade antimicrobiana de *Tithonia diversifolia* (Hemsl) Gray, utilizando ensaios com microrganismos. Dissertação apresentada na Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" Universidade de São Paulo.
- [99] Zheng, W., Wang, S.Y., 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal Agricultural Food Chemistry* **49**, 5165-5170.
- [100] Sousa, A., Ferreira, I.C.F.R., Barros, L., Bento, A., Pereira, J.A., 2008. Effect of solvent and extraction temperatures on the antioxidant potential of traditional stoned table olives "alcaparras". *Food Science and Technology* **41**, 739-745.
- [101] Antolovich, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., McDonald, S., Robards, K., 2002. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst* **127**, 183-198.
- [102] Calado, J.C.P., Santos, L.C., Cabral, F.A., Marcucci, M.C., 2008. Atividade antimicrobiana e antioxidante de extratos de própolis obtidos através da extração por fluido supercrítico. I jornada de iniciação científica e tecnológica UNIBAN Brasil.
- [103] Sousa, C.M.M., Silva, H.R., Vieira-Jr, G.M., Ayres, M.C.C., Costa, C.L.S., Araújo, D.S., Cavalcante, L.C.D., Barros, E.D.S., Araújo, P.B.M., Brandão, M.S., Chaves, M.H., 2007. Fenóis totais e atividade de cinco plantas medicinais. *Química Nova* **30**, 351-355.
- [104] Carpes, S.T., Prado, A., Moreno, I.A.M., Mourão, G.B., Alencar, S.M., Masson, M.L., 2008. Avaliação do potencial antioxidante do pólen apícola produzido na Região Sul do Brasil. *Química Nova* **31**, 1660-1664.
- [105] Leja, M., Mareczek, A., Wyżgolik, G., Klepacz-Baniak, J., Czekońska, K., 2007. Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. *Food Chemistry* **100**, 237-240.

