Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera*

Tatiane Luiza Cadorin Oldoni

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2007

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Tatiane Luiza Cadorin Oldoni
Tecnóloga em Química Industrial

Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera*

Orientador:
Prof. Dr. **SEVERINO MATIAS DE ALENCAR**

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Oldoni, Tatiane Luiza Cadorin
Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécies *Apis mellifera* / Tatiane Luiza Cadorin Oldoni. - - Piracicaba, 2007.
104 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007.
Bibliografia.

1. Antioxidantes 2. Compostos fenólicos 3. Flavonóides 4. Própolis – Composição química I. Título

CDD 615.36

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Dedico este trabalho ao meu esposo Cleverson e minha filha Gabriella, razões de minha existência e formas de amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo agradeço a Deus, que em sua enorme generosidade me acumulou de bênçãos, dando-me força física e mental para a realização deste trabalho.

À minha amada família, minha mãe Eloide e minha tia Elaine pelo exemplo de dedicação, força, honestidade e principalmente pelo amor e carinho que sempre me foi destinado durante toda a minha existência.

À minha querida irmã gêmea Tais, pela sua cumplicidade, amor, confiança, carinho, ou simplesmente pela sua existência em minha vida.

À minha tia Eliza pela sua grande ajuda, principalmente nos momentos mais difíceis que passei no início de meu mestrado e pelas suas constantes orações para que Deus iluminasse meu caminho.

À minha avó, Lourdes Cadorin, minha tia Eliane, meus tios, meus queridos primos e a minha segunda família, Alda, Antônio e Jefinho por serem parte de minha história.

À minha grande amiga, Naiane Sangaletti, pela sua garra, ajuda nos momentos difíceis, às alegrias que dividimos juntas e pela sua incrível dedicação à nossa eterna amizade.

Ao meu inestimável orientador Professor Severino Matias de Alencar, pela oportunidade oferecida desde o início, ensinando-me os primeiros passos na pesquisa durante a graduação. Depois, a oportunidade de realizar o mestrado sob sua orientação. Admiro sua incomparável honestidade, e agradeço pela confiança, atenção e dedicação durante todos esses anos de trabalho.

Aos meus amigos e colegas que conquistei no Laboratório de Bioquímica, com os quais compartilhei esta etapa de minha vida. Obrigada pelas conversas, ajuda e amizade: Ivani Moreno, Lucimara, Rosângela, Ingridy, K-tina, Myrella, Adna e Letícia.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, em especial a professora Marisa A. R. d'Arce, obrigada pela atenção e auxílio.

Aos funcionários da biblioteca e seção de pós-graduação.

À professora Vera Lúcia Rheder, do CPQBA (UNICAMP), obrigada pela identificação dos compostos isolados.

Aos meus queridos amigos e colegas de turma, pelas experiências compartilhadas: Anderson (Sinho), Solange, Jailson, Ana Paula (Flipper), Elio, Erik, Ricardo (Xoio), Rodrigo (Paxuxu), Camila (Brioxe), Fernando (Passaralho), Mateus (Ímola), Priscila (Mimela) e Álvaro (Bicudo).

A todos os amigos que fiz nesta Escola, especialmente àqueles que conviveram comigo no meu primeiro ano em Piracicaba, na Vila Estudantil.

Aos meus amigos distantes, porém nunca esquecidos, em especial Juliane Ribas, Vinícius Giusti e Nelson Peres Júnior.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro concedido para a realização deste trabalho.

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

SUMÁRIO

RESUMO 8
ABSTRACT 9
LISTA DE FIGURAS 10
LISTA DE TABELAS 13
1 INTRODUÇÃO 14
2 DESENVOLVIMENTO 16
2.1 Revisão Bibliográfica 16
2.1.1 Evolução da apicultura no cenário nacional e internacional 16
2.1.2 Própolis 18
2.1.2.1 Patentes x Própolis 22
2.1.2.2 Composição química da própolis 23
2.1.3 Compostos fenólicos 25
2.1.3.1 Flavonóides 30
2.1.3.2 Ácidos fenólicos 35
2.1.4 Estresse oxidativo 37
2.1.4.1 Espécies reativas de oxigênio (ERO) 37
2.1.4.2 Formação das espécies reativas de oxigênio 38
2.1.4.3 Patogenia das espécies reativas de oxigênio (ERO) 41
2.1.5 Antioxidantes 42
2.1.5.1 Atividade antioxidante de flavonóides 45
2.1.5.2 Atividade antioxidante de ácidos fenólicos 48
2.1.5.3 Avaliação da atividade antioxidante 48
2.1.6 Métodos de Medida da atividade antioxidante *in vitro*. 49
2.1.6.1 Método indireto - sequestro de radical 49
2.1.6.2 Método direto - Habilidade em inibir a oxidação de lipídeos em sistemas modelo 51
2.2 Material e Métodos 54
2.2.1 Coleta das amostras 54
2.2.2 Tratamento das amostras de própolis bruta 54
2.2.3 Preparo do extrato etanólico da própolis (EEP) para o fracionamento cromatográfico 54
2.2.4 Fracionamento cromatográfico da própolis 54
2.2.5 Análises físico-químicas do EEP, frações e subfrações 55

2.2.5.1 Espectrofotometria na região ultravioleta-visível 55
2.2.5.2 Cromatografia em Camada Delgada (CCD) 55
2.2.5.3 Cromatografia em camada delgada de alta eficiência em fase reversa (CCDAE-FR) 56
2.2.5.4 Teor de Polifénois Totais e Flavonóides 56
2.2.5.5 Cromatografia gasosa com espectrometria de massas (CG-EM) 57
2.2.5.6 – Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) 57
2.2.5.7 Isolamento dos compostos com atividade antioxidante.....58
2.2.6 Avaliação da atividade antioxidante do EEP, frações e subfrações 58
2.2.6.1 Avaliação da atividade seqüestrante de radical DPPH.....58
2.2.6.2 Avaliação da atividade antioxidante pelo sistema beta-caroteno/ácido linoléico (BCAL) 59
2.3 Resultados e Discussão.....61
2.3.1 Coleta das amostras de própolis.....61
2.3.2 Perfil químico da própolis vermelha obtido por CG-EM 63
2.3.3 Fracionamento cromatográfico da própolis vermelha.....65
2.3.4 Análises físico-químicas do EEP e frações semi-purificadas 70
2.3.4.1 Cromatografia em Camada Delgada de alta efciência em fase reversa (CCDAE-FR) e Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....70
2.3.4.2 Espectrofotometria na região ultravioleta-visível 74
2.3.4.3 Teor de fenólicos totais e flavonóides.....76
2.3.5 Avaliação da atividade antioxidante do EEP, frações e subfrações. 78
2.3.6 Correlação entre compostos fenólicos totais, flavonóides e atividade antioxidante.....83
2.3.7 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) 84
2.3.8 Isolamento dos compostos bioativos 86
2.3.8.1 Avaliação da atividade antioxidante dos compostos isolados 88
2.3.9 Identificação química dos compostos isolados 90
3 CONCLUSÕES 93
REFERÊNCIAS 94

RESUMO

Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera*

A própolis é conhecida por suas atividades biológicas, tais como antioxidante, antimicrobiana, antinflamatória, antiviral, entre outras. Sua composição varia entre regiões e existe grande diversidade química entre os diferentes tipos de própolis. Os principais constituintes da própolis são os compostos fenólicos, os quais são responsáveis por várias atividades biológicas, como a atividade antioxidante. Um novo tipo de própolis, nunca antes relatado na literatura, denominado própolis vermelha em decorrência de sua coloração intensa característica, foi coletado na região de mangue do Estado de Alagoas. Este trabalho teve como objetivo avaliar a composição química e fracionar e isolar compostos com atividade antioxidante da própolis vermelha brasileira. O extrato etanólico da própolis vermelha (EEP) foi primeiramente fracionado pela técnica de extração líquido-líquido, originando as frações hexânica (fr-Hex) e clorofórmica (fr-Clo). A fr-Clo apresentou alto rendimento e composição química complexa, sendo, então, recromatografada em coluna aberta de sílica-gel, gerando 15 subfrações. O EEP, frações e subfrações foram avaliados quanto à sua composição química e atividade antioxidante para seleção das frações destinadas ao isolamento bioguiado. O EEP também foi analisado pela técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), tendo sido identificados sete compostos nunca antes relatados em própolis brasileira, entre os quais, quatro isoflavonóides. Os teores de compostos fenólicos totais e de flavonóides, testados para o EEP, frações e subfrações, variaram de 37,4 a 324,2 mg/g e de 0,0 a 158 mg/g, respectivamente. Com relação ao potencial antioxidante, a maior atividade de seqüestro do radical DPPH foi encontrada para a fr-Hex, enquanto a subfração 5 apresentou alto rendimento e boa atividade pelo método do sistema β-caroteno/ácido linoléico, tendo sido estas frações selecionadas para o isolamento dos compostos bioativos por Cromatografía Líquida de Alta Eficiência (CLAE) preparativa. Três compostos, um da fr-Hex e dois da subfração 5, foram isolados e analisados por CG-EM. Os compostos da subfração 5 foram identificados como 2',7-diidroxi-4'metoxiisoflavana (vestitol) e 2',4'-dihidroxi-7 metoxiisoflavana, ambos isoflavonóides. Não foi possível identificar o composto da fr-Hex utilizando somente a técnica de CG-EM, embora tenha sido possível verificar que este é uma mistura de dois isômeros com peso molecular de 466 g/mol. Os resultados obtidos demonstram que a própolis vermelha é uma boa fonte de compostos bioativos, dentre os quais encontram-se isoflavonas, que possuem atividade antioxidante.

Palavras-chave: Própolis; Compostos fenólicos; Flavonóides; Atividade antioxidante

ABSTRACT

Isolation and identification of compounds with antioxidant activity in a novel variety of Brazilian propolis produced by bees from the species *Apis mellifera*

Propolis is known for its wide range of biological activities, such as antioxidant, antibacterial, anti-inflammatory, antiviral, among others. Its composition varies according to the region where it is collected and there is a great chemical diversity among the different types of propolis. The main constituents of propolis are the phenolic compounds, which are responsible for several biological activities, such as the antioxidant activity. A novel type of propolis, which has never been reported in the literature before, named red propolis due to its intense characteristic color, was collected in a mangrove area in the state of Alagoas. This study aimed to evaluate the chemical composition, and fractionate and isolate the compounds with antioxidant activity of Brazilian red propolis. The Ethanolic Extract of Propolis (EEP) was first fractionated using the liquid-liquid extraction technique, yielding the hexanic (Hex-fr) and the chloroformic fractions (Chlo-fr). Chlo-fr showed great yield and a complex chemical composition and therefore was refractioned in silica gel open column, yielding 15 subfractions. The EEP, fractions and subfractions were evaluated for their chemical composition and antioxidant activity aiming to select the fractions destined for bioguided isolation. The EEP was also analyzed by the gas-chromatography-mass spectrometry (GC-MS) technique, and seven compounds, never reported for Brazilian propolis before, were identified, among which are four isoflavonoids. The amounts of total polyphenol and flavonoid compounds, tested for EEP, fractions and subfractions, ranged from 37,4 to 324,2 mg/g and 0,0 to 158 mg/g, respectively. The major free radical (DPPH) scavenging activity was found for Hex-fr, while subfraction 5 showed high yield and good antioxidant activity by β-carotene/linoleic acid system oxidation, and these fractions were selected for isolation of bioactive compounds by preparative High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Three compounds, one from Hex-fr and two from subfraction 5, were isolated and analyzed by GC-MS. The compounds from subfraction 5 were identified as 2',7-diidroxi-4'metoxiisoflavan (vestitol) and 2',4'-dihidroxi-7 metoxiisoflavan, both isoflavonoids. It was not possible to identify the compound from Hex-fr using GC-MS, although it was possible to verify that this compound is a mixture of two isomers presenting molecular weight of 466 g/mol. The results obtained in this study demonstrate that red propolis is a good source of bioactive compounds, among which are isoflavonoids, compounds that possess antioxidant activity.

Key words: Propolis; Total polyphenols; Flavonoids; Antioxidant activity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho esquemático da coleta e utilização da própolis pelas abelhas 21
Figura 2 - Estrutura espacial (A) e planar (B) de um fenol simples..... 25
Figura 3 - Via do ácido chiquímico para biossíntese de compostos fenólicos..... 29
Figura 4 - Núcleo básico de flavonóides composto por dois anéis aromáticos (A e B) e um anel intermediário (C)..... 31
Figura 5 - Interelações entre as diferentes classes de flavonóides. Setas indicam as principais rotas biossintéticas..... 32
Figura 6 - Estrutura química dos principais ácidos benzóicos..... 35
Figura 7 - Estrutura química dos principas ácidos cinâmicos..... 35
Figura 8 - Estrutura química das cumarinas..... 36
Figura 9 - Formação de radicais livres (RL) (espécie reativa de oxigênio) e mecanismos de defesa antioxidantes em sistemas biológicos..... 41
Figura 10 - Doenças associadas com espécies reativas de oxigênio (ERO)..... 42
Figura 11 - Esquema de seqüestro de ERO (R.) por flavonóides (Fl)..... 44
Figura 12 - Sítios de ligação de metais em flavonóides..... 45
Figura 13 - Estrutura do flavonol quercetina mostrando características importantes na definição de potencial antioxidante clássico dos flavonóides..... 47
Figura 14 - Reação do radical livre DPPH com uma molécula antioxidante..... 51
Figura 15 - Distribuição interfacial de antoxidantes lipofílicos e hidrofílicos em óleo comparado a emulsões óleo em água..... 52
Figura 16 - Visualização do apiário selecionado como fornecedor de própolis vermelha, localizado no município de Marechal Deodoro- AL..... 62
Figura 17 - Aspecto da própolis vermelha in natura nos coletores instalados nas colméias de abelhas *Apis mellifera*..... 62
Figura 18 - Aspecto da própolis vermelha triturada, utilizada nos ensaios..... 62
Figura 19 - Perfil químico do EEP da própolis vermelha obtido por CG-EM..... 65
Figura 20 - Fluxograma do processo de fracionamento e isolamento bioguiado de compostos com atividade antioxidante da própolis vermelha..... 66

Figura 21 - Aspecto visual do fracionamento líquido-líquido do EEP com os solventes com hexano (A) e clorofórmio (B)..... 67
Figura 22 - Monitoramento da coluna cromatográfica por irradiação com lâmpada UV a 366 nm..... 68
Figura 23 - Aparência do EEP, fr-Hex, fr-Clo e das 15 subfrações (1-15) obtidas a partir da fr-Clo da própolis vermelha..... 68
Figura 24 - Aparência do EEP, fr-Hex, fr-Clo e das 15 subfrações (1-15) obtidas a partir da fr-Clo, irradiadas a 366 nm, da própolis vermelha..... 69
Figura 25 - Cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE), irradiada 254 nm, do EEP, fr-Hex, fr-Clo e das 15 subfrações (1-15) obtidas a partir da fr-Clo, da própolis vermelha..... 71
Figura 26 - Cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE), irradiada 366 nm, do EEP, fr-Hex, fr-Clo e das 15 subfrações (1-15) obtidas a partir da fr-Clo da própolis vermelha..... 71
Figura 27 - Cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE), revelada com anisaldeído sulfúrico a quente, do EEP, fr-Hex, fr-Clo e das 15 subfrações (1-15) obtidas a partir da fr-Clo da própolis vermelha..... 72
Figura 28 - Cromatografia em camada delgada (CCD), revelada com anisaldeído sulfúrico a quente e irradiada a 366 nm, do EEP, fr-Hex, fr-Clo e das 15 subfrações (1-15) obtidas a partir da fração clorofórmica (fr-Clo), da própolis vermelha..... 73
Figura 29 - Cromatografia em camada delgada (CCD), revelada com DPPH 0,5 mM, do EEP, fr-Hex, fr- Clo e das 15 subfrações (1-15) obtidas a partir da fr-Clo da própolis vermelha..... 74
Figura 30 - Espectros de absorção na região UV-visível, do EEP, frações (fr-Hex e fr-Clo) e subfrações da fr-Clo..... 75
Figura 31 - Formação do complexo flavonóide-alumínio, em solução de cloreto de alumínio..... 78

Figura 32 - Atividade seqüestrante do radical livre DPPH pelo α-tocoferol, BHT, EEP, frações e subfrações da própolis vermelha..... 79
Figura 33 - Atividade antioxidante do α-tocoferol, EEP e frações da própolis vermelha pelo sistema β-caroteno-ácido linoléico..... 81
Figura 34 - Atividade antioxidante do BHA, α-tocoferol, BHT e subfrações no sistema β-caroteno-ácido linoléico..... 82
Figura 35 - Correlação entre os teores de fenólicos totais e flavonóides e os métodos de avaliação da atividade antioxidante *in vitro* (DPPH e BCAL)..... 84
Figura 36 - Cromatogramas do extrato etanólico da própolis vermelha e suas frações. (A) EEP; (B) fr-Hex; (C) fr-Clo..... 85
Figura 37 - Cromatograma obtido por CLAE das frações geradas pelo fracionamento da fr-Clo em coluna aberta: subfração 3 (A), subfração 4 (B) e subfração 5 (C)..... 86
Figura 38 - Cromatogramas de coleta dos compostos das frações por CLAE preparativa: fração hexânica composto 1 (A), subfração 5 – compostos 2 e 3 (B)..... 87
Figura 39 - Cromatograma obtido por CLAE dos compostos isolados da fração hexânica (composto 1) e da sub-fração 5 (composto 2 e composto 3)... 88
Figura 40 - Atividade antioxidante dos compostos puros pelo teste de seqüestro do radical DPPH..... 89
Figura 41 - Atividade antioxidante dos compostos puros pelo sistema (BCAL)..... 89
Figura 42 - Possível estrutura do composto 1 (benzofenonas preniladas), isolado a partir da fração hexânica..... 91
Figura 43 - Estrutura do composto 2 (2’, 7-dihidroxi- 4’metoxiisoflavan – vestitol), isolado a partir da subfração 5..... 91
Figura 44 - Estrutura do composto 3 (2’, 4’ – dihidroxi – 7 metoxiisoflavan), isolado a partir da subfração 5..... 92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparativo de Produtividade de mel..... 18
Tabela 2 - Classificação dos compostos fenólicos de acordo com o esqueleto básico…….. 27
Tabela 3 - Classificação e estrutura de alguns flavonóides……. 34
Tabela 4 - Localidades de coleta de própolis vermelha…… 61
Tabela 5 - Compostos químicos medidos por CG-MS do EEP da própolis vermelha……. 64
Tabela 6 - Solventes utilizados no fracionamento e rendimento obtido para as subfrações…….. 69
Tabela 7 - Teor de fenólicos totais e flavonóides do EEP, frações e subfrações… 77
Tabela 8 - Análise estatística da correlação entre a atividade antioxidante e os teores de compostos fenólicos totais e flavonóides…… 84
Tabela 9 - Caracterização química por CG/EM dos compostos isolados com atividade antioxidante da própolis vermelha…… 90

1 INTRODUÇÃO

O uso de produtos naturais na medicina popular como agente terapêutico é conhecido por praticamente todas as civilizações antigas. Muitas culturas utilizaram estes produtos por serem a principal, ou mesmo a única matéria-prima para elaboração de medicamentos. Nos últimos anos, os produtos naturais têm se tornado fontes para o desenvolvimento de novas drogas, permitindo o avanço na descoberta de agentes terapêuticos contra doenças infecciosas, como câncer, imunodeficiências e outras. O valor dos produtos naturais está claramente reconhecido e os desafios são identificar novos compostos bioativos e elucidar seus mecanismos de ação.

Entre os produtos naturais, está a própolis que é uma resina coletada por abelhas da espécie *Apis mellifera* de diversas partes das plantas como brotos, botões florais e exudados resinosos. Dessa maneira, a composição da própolis é um reflexo direto da flora onde as abelhas estão localizadas (GHISALBERTI, 1979). A própolis tem demonstrado várias atividades biológicas, como atividade antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatória, cicatrizante, anestésica, antiviral (BANKOVA *et al*., 1989; ALENCAR, 2002; CHEN *et al*., 2003). Portanto com aplicação nas indústrias farmacêutica e alimentícia (ACKERMANN, 1991).

Devido a grande complexidade química, a própolis é considerada uma das misturas mais heterogêneas já encontradas em fontes naturais. Os principais constituintes são os compostos fenólicos, representados pelos flavonóides agliconas e ácidos fenólicos e seus ésteres, que possuem papel importante no corpo humano e

podem agir como antioxidantes, antiinflamatórios, antimicrobianos entre outras atividades biológicas.

Recentemente, compostos com atividade antioxidante têm recebido atenção especial por apresentarem capacidade de seqüestrar radicais livres. Esses radicais podem agir no corpo humano e causar diversos danos à célula, como câncer, doenças neurodegenerativas, anemia, isquemia, além da oxidação do LDL, o que pode levar a problemas cardiovasculares. Os compostos fenólicos, principalmente os flavonóides, possuem atividade de seqüestro de espécies reativas de oxigênio, incluindo os radicais hidroxil, peroxil e radicais superóxido, além de quelar metais de transição, impedindo assim, a formação de espécies reativas (HALLIWELL, 2007). Desta forma, são apontados como drogas terapêuticas promissoras para prevenir e tratar desordens clínicas causadas por radicais livres.

Um novo tipo de própolis nunca antes relatado no Brasil, e denominado de "própolis vermelha", demonstrou atividade biológica em ensaios preliminares *in vitro*, o que surgiu a necessidade de um estudo detalhado. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a composição química e isolar e identificar compostos com atividade antioxidante dessa nova variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera*.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 Evolução da apicultura no cenário nacional e internacional

As abelhas são descendentes das vespas que deixaram de se alimentar de aranhas e pequenos insetos, para consumirem o pólen das flores quando este surgiu há cerca de 135 milhões de anos atrás. Durante o processo evolutivo surgiram várias espécies de abelhas e, atualmente são conhecidas mais de 20 mil, mas acredita-se que existam cerca de 40 mil espécies ainda não descobertas. Somente 2% das espécies de abelhas são sociais e produzem mel e, dentre estas, as do gênero *Apis* são as mais conhecidas (SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS - SEBRAE, 2006).

Em 1956 o professor Dr. Warwick Estevam Kerr, renomado cientista brasileiro, tinha como principal objetivo contribuir cientificamente para a melhoria da apicultura brasileira, mediante um programa de melhoramento com abelhas trazidas da África. Ao fazer um minucioso levantamento das raças de abelhas existentes na África, o Prof. Kerr verificou que as abelhas africanas *Apis mellifera scutellata* apresentavam como características positivas a alta produtividade e capacidade de adaptação e como negativas a alta agressividade e tendência enxameatória. Portanto, o plano seria eliminar ou reduzir, por seleção massal, as características negativas dessas abelhas e posteriormente distribuir aos apicultores as rainhas selecionadas. Infelizmente, houve um imprevisto e o Prof. Kerr foi surpreendido pelas enxameações que se seguiram à retirada das telas excluídoras e, a conseqüente africanização dos apiários antes da realização do programa de seleção pretendido. Hoje temos em todo o território nacional uma abelha poli-híbrida africanizada. No entanto, apesar de todos os aspectos envolvendo as abelhas nesses 50 anos podemos, com absoluta convicção, falar que hoje, graças à boa produtividade e alta capacidade de adaptação das abelhas africanizadas, bem como da sua alta resistência a doenças de crias e resistência ao ácaro *Varroa destructor*, a apicultura brasileira é uma atividade do agronegócio que

mais tem sido desenvolvida no Brasil. Hoje o Brasil é conhecido como exportador e produtor de mel orgânico e própolis (GONÇALVES, 2006).

Devido à grande diversidade da flora brasileira e à adaptação das abelhas *A. mellifera,* a apicultura tornou-se uma importante atividade, porém, foi somente a partir da segunda metade do século vinte que o setor sofreu o maior impulso, provavelmente pelo grande investimento realizado pelos produtores, centros de pesquisa e órgãos governamentais. Também merece destaque a hibridação entre a espécie européia versus africana, que provocou maior resistência a doenças e predadores, rusticidade, maior produtividade e menor agressividade em relação aos parentais africanos, entre outras características (CARVALHO, 2006; SANFORD, 2005).

Como toda atividade, o setor apícola também apresenta vários problemas, desde aqueles relacionados à produção até a comercialização. Com relação à produção de mel, o Brasil vem, a cada dia, ocupando lugar de destaque. Segundo o IBGE (2004), o país ocupava o sexto lugar, com produção estimada de 20 mil toneladas, no ano de 2001, sendo a China o maior produtor mundial. Paula Neto e Almeida Neto (2005) classificaram o Brasil como 14º produtor, no ano de 2001, segundo levantamento da FAOSTAT (2005), contradizendo o censo do IBGE (2004). Já em 2004, o país perdeu mais uma posição para a Coréia, passando para o 15º lugar, porém, com aumento de 12,05%, alcançando 24,5 mil toneladas de mel, correspondendo a 1,88% da produção mundial. Neste estudo, China, EUA e Argentina permaneceram nas três primeiras posições, com 276, 82 e 80 mil toneladas de mel em 2004, respectivamente.

Na década de 1990 a apicultura recebeu vários incentivos, principalmente econômicos, devido ao interesse do governo em difundir a atividade e agregar maior rentabilidade ao setor agropecuário. Mas, foi somente após o ano de 2002 que o setor alcançou o auge de sua produção e comercialização, devido ao embargo da União Européia ao mel da China, pela presença de altos índices de resíduos de antibióticos e pela restrição de compra do mel da Argentina pelos americanos, alegando concorrência desleal (PAULA NETO; ALMEIDA NETO, 2005). Com a restrição imposta aos principais produtores e exportadores mundiais, o mercado internacional voltou-se para o Brasil, como sendo um grande produtor de mel e própolis, fazendo com que os preços do

mercado interno se elevassem rapidamente, atingindo reajustes de 300%. Outra grande expansão do setor foi a referente à produção de própolis verde, principalmente no Estado de Minas Gerais, sendo esta quase que totalmente exportada para o Japão.

A baixa produtividade dos apiários brasileiros é explicada pela pouca utilização de recursos tecnológicos na produção. A Tabela 1 apresenta comparação da produtividade brasileira, frente à de outros países produtores de mel (SEBRAE, 2006).

Tabela 1 - Comparativo de Produtividade de Mel

Produtividade Média Anual	Brasil	EUA	México	Argentina	China
Kg / Colméia / Ano	15	32	31	30 a 35	50 a 100

Fonte: Embrapa Pantanal e Banco do Nordeste (SEBRAE, 2006).

Com relação à própolis, não existem estatísticas confiáveis sobre a produção mundial. Entretanto, sabe-se que os maiores produtores mundiais são a China, o Brasil, EUA, Austrália e Uruguai, os quais processam cerca de 200 toneladas de própolis por mês para o consumo mundial. O Japão é um dos maiores consumidores de própolis como complemento alimentar, entretanto a Nova Zelândia já possui consumo anual de aproximadamente 9,9 milhões de doses diárias (SEBRAE, 2006).

2.1.2 Própolis

A descoberta de que certos alimentos podem prevenir doenças iniciou uma revolução nas áreas de nutrição, farmácia, medicina e ciência de alimentos. Além dos nutrientes, sabe-se hoje que existem outras substâncias nos alimentos que tem funções específicas e importantes para a saúde. Elas são chamadas de “substâncias bioativas” e os alimentos que as contêm são denominados de “alimentos funcionais” (MANN, 1994).

Os produtos naturais têm sido fontes valiosas para o desenvolvimento de novas drogas (NEWMAN *et al*., 2000; 2002), permitindo o avanço na descoberta de agentes

terapêuticos para doenças infecciosas, como câncer, imunodeficiências e outras (CLARDY; WALSH, 2004). Entre todas as novas drogas aprovadas pelo Food and Drug Administration (FDA) ou outras entidades equivalentes de outros países, 28% delas são totalmente de origem direta de produtos naturais (vs. 33% são drogas sintéticas), e 39% são derivadas destes (NEWMAN *et al*., 2002). Assim, 67% de todas as drogas aprovadas são de fontes naturais ou derivadas. O valor dos produtos naturais está claramente reconhecido e os desafios são identificar novos compostos bioativos e elucidar seus mecanismos de ação.

Entre os produtos naturais está a própolis que já era conhecida a mais de três mil anos, na idade média, pois era costume esfregar o umbigo dos bebês com esta substância. As múmias dos faraós ainda estão em perfeito estado de conservação, graças à utilização da própolis no processo de embalsamento. Na música, dizem os historiadores, que a maravilhosa sonoridade dos violinos de Stradivarius era devida à proteção deste instrumento com um verniz a base de própolis. Os pintores primitivos criaram quadros muito valiosos, onde as abelhas esvoaçavam entre lindas flores coloridas e, na Iugoslávia essas pinturas deram origem a uma escola primitivista, que é, ainda hoje, conservada com muito carinho e beleza. As abelhas eram tão admiradas pelo povo iugoslavo que se tornaram símbolos do progresso, da ciência e da cultura. Os iugoslavos eram bons apicultores e consumiam grande quantidade de mel. Em quase toda mesa, e na maioria das receitas culinárias, o mel estava presente como ingrediente. Mesmo na mais antiga literatura, encontra-se referências às abelhas como, por exemplo, no Velho Testamento da Bíblia Sagrada (GUIMARÃES, 1989).

Na África do Sul, na guerra ao final do século XIX, a própolis foi amplamente utilizada como cicatrizante, e na segunda guerra mundial foi empregada em várias clínicas soviéticas (MARCUCCI, 1996). Na antiga URSS, a própolis mereceu atenção especial na medicina humana e veterinária, com aplicações inclusive no tratamento da tuberculose, onde foram observados regressão dos problemas pulmonares e recuperação do apetite (WOISKY; GIESBRECHT; SALATINO, 1994). Os gregos, entre os quais Hipócrates, a adotaram como cicratizante interno e externo. Plínio, historiador romano, refere-se à própolis como medicamento capaz de reduzir inchaços e aliviar

dores. O termo própolis já era descrito no século XVI na França e, em 1908 surgiu o primeiro trabalho científico sobre *suas propriedades químicas e composição*, indexado no *Chemical Abstracts* (referência n° 192) (PEREIRA et al., 2002).

Própolis é o nome genérico para a substância resinosa de composição complexa, coletada pelas abelhas a partir das mais variadas espécies de plantas (GHISALBERTI, 1979). A palavra própolis é derivada do grego onde *pro* significa “em defesa de” e *polis* “cidade”, isto é, em defesa da cidade ou da colméia (MARCUCCI, 1996; BURDOCK, 1998). As abelhas, de fato, usam esta substância para protegê-las contra insetos e microorganismos, empregando-a no reparo de frestas ou danos à colméia (isolamento térmico e contra inimigos), no preparo de locais assépticos para a postura da abelha rainha e na mumificação de insetos invasores (Figura 1). Costuma-se encontrar na colméia pequenos animais ou parte deles envoltos em própolis, e em perfeito estado de conservação (MARCUCCI, 1996), já que a própolis é também atribuída ação antimicrobiana, o que impede a decomposição do cadáver (PARK et al., 1998a).

A própolis é um material quebradiço quando frio e se torna dúctil e maleável quando aquecido. Seu ponto de fusão é variável entre 60 – 70 ºC, sendo que pode atingir em alguns casos até 100 ºC. Das propriedades adesivas derivou a designação em língua inglesa de *bee glue* (cola-de-abelha). A coloração da própolis é dependente de sua procedência e pode variar do marrom escuro passando a uma tonalidade esverdeada até o marrom avermelhado, dependendo da flora de origem e idade. Possui também um odor característico que pode variar de uma amostra para outra (MARCUCCI, 1996; BURDOCK, 1998).

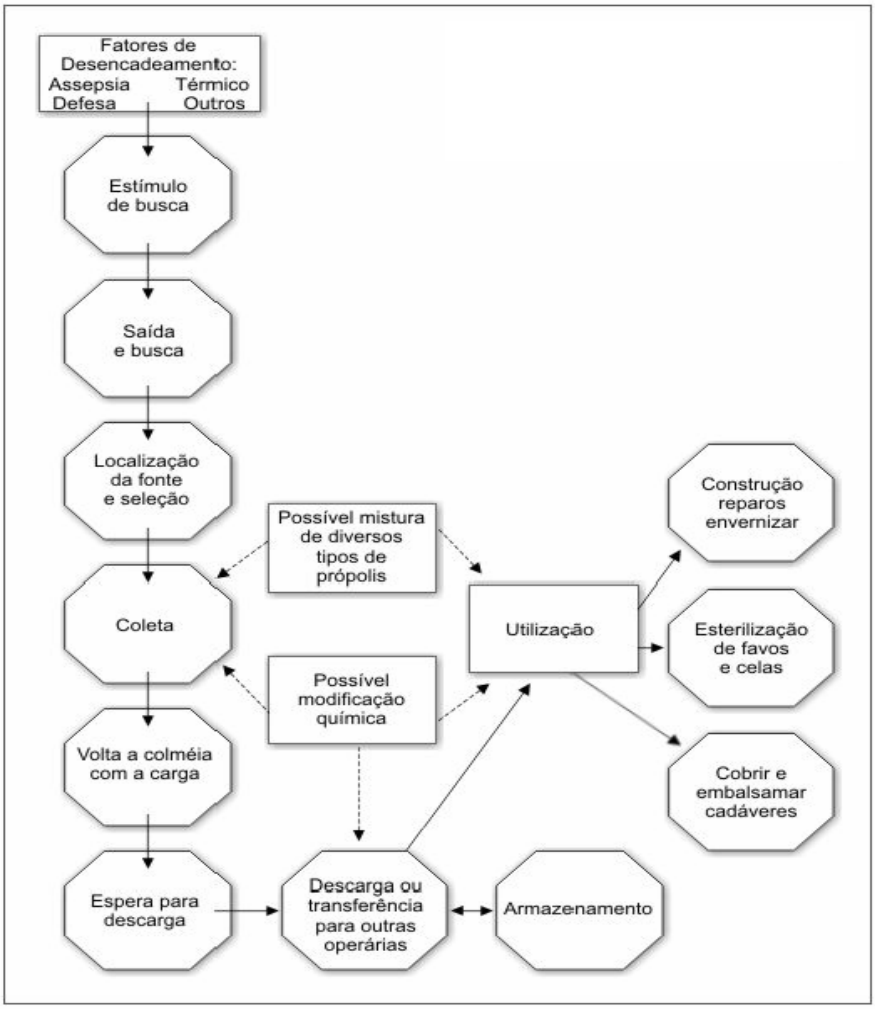


Figura 1 - Desenho esquemático da coleta e utilização da própolis pelas abelhas
Fonte: Apicultura (2006).

A própolis tem demonstrado várias atividades biológicas, como atividade antimicrobiana, antiinflamatória, cicatrizante, anestésica, antitripanossomal (GHISALBERTI, 1979; BANKOVA; POPOV; MAREKOV, 1989; KHAYYAL; ELGHAZALY; ELKHATIB, 1993; KUJUMGIEV et al., 1999; MARCUCCI et al., 2001; ALENCAR, 2002; MONTPIED et al., 2003, CUNHA et al., 2004), anticariogênica (PARK et al. 1998a; PARK et al., 1998b; KOO et al., 1999; KOO et al., 2000a; KOO et al., 2000b; KOO et al., 2000c; ROSALEN et al., 2002; MURATA et al., 2003; DUARTE et al., 2003; HAYACIBARA et al., 2005), antiviral, anticarcinogênica, antioxidante (BURDOCK, 1998; MARCUCCI, 1996; CHEN et al., 1996; ALENCAR, 2002; CHEN et al., 2003; NAGAI et al., 2003; ASO et al., 2004; ISHIKAWA et al., 2004; KUMAZAWA; HAMASAKA;

NAKAYAMA, 2004) e fitotóxica (GHISALBERTI, 1979; JOHNSON; EISCHEN; GIANASSI et al., 1994), apresentando assim aplicação nas indústrias farmacêutica e alimentícia na forma de alimento funcional. Atualmente a própolis tem sido utilizada em pasta de dente, solução de bochecho, balas, chocolates, cápsulas, entre outros produtos. (ACKERMANN, 1991).

No estudo realizado por Silva et. al (2006), extratos etanólicos de própolis comerciais foram testados quanto ao potencial de inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* e a capacidade seqüestrante do radical livre DPPH, sendo estas atividades correlacionadas com os teores de compostos fenólicos totais e flavonóides. Foi observado que a quantidade de flavonóides dos extratos apresentou maior relação com a atividade antioxidante do que com a atividade antimicrobiana.

Vários trabalhos têm demonstrado atividade antioxidante da própolis. Kumazawa; Hamasaka; Nakayama (2004) analisaram própolis de várias origens geográficas e encontraram que os extratos etanólicos de própolis (EEP) da Austrália, China, Hungria e Nova Zelândia possuem alta atividade de seqüestro do radical livre DPPH, enquanto que os EEP da China, Argentina, Chile e Hungria demostraram alta atividade antioxidante pelo método de descoloração do β-caroteno (peroxidação lipídica). Apesar do EEP da própolis brasileira ter demonstrado baixa capacidade de seqüestro para o radical DPPH (em torno de 40%), a atividade seqüestrante do composto puro isolado desta própolis (artepilina C), ficou em torno de 80%. Da mesma forma, o éster fenólico do ácido caféico (CAPE) isolado de própolis de clima temperado, tem se mostrado um potente inibidor de radicais livres (OZGUNER et al., 2005).

2.1.2.1 Patentes x Própolis

Uma verdadeira “febre” de patentes com própolis vem sendo observada. Desde a primeira patente romena, em 1965, até 1999 já foram depositadas cerca de 239 patentes. Até o final da década de 80, as patentes eram dominadas pela antiga URSS e seus países satélites, principalmente a Romênia. Hoje 43% de todas as patentes depositadas são japonesas, sendo que a primeira patente japonesa surgiu somente em 1987, sobre o uso da própolis no controle de odores (CHO, 1987). Em relação ao Brasil,

a primeira patente com própolis surgiu somente em 1995, para o uso no tratamento odontológico de prevenção de cáries e gengivites. Até 1999, o Brasil possuía somente cerca de 3 patentes (menos de 2% de todas as patentes depositadas). Quinze patentes, 6,2% das patentes depositadas até o começo de 1999, referem-se ao uso da própolis no tratamento odontológico. Essa é uma das aplicações da própolis mais estudada em todo mundo, tendo estudos científicos desde 1952. O reduzido número de patentes nacionais em relação aos trabalhos publicados (3 patentes/27 trabalhos publicados) reflete o fato das universidades brasileiras não terem o hábito de proteger atividades de pesquisa por meio de patentes. O oposto ocorre no Japão, onde foram depositadas 98 patentes, mais do dobro do número de trabalhos publicados (43) no mesmo período, incluindo patentes sobre a aplicação de compostos isolados inicialmente de amostras da própolis brasileira (PEREIRA et al., 2002).

2.1.2.2 Composição química da própolis

A composição da própolis é muito variável, mas em geral é composta por 50% de resina e bálsamo vegetal, 30% de cera, 10% de óleos essenciais e aromáticos, 5% de pólen e 5% de outras substâncias variadas, incluindo resíduos orgânicos. É considerada uma das misturas mais heterogêneas encontradas em fontes naturais, e hoje mais de 300 constituintes já foram identificados e/ou caracterizados em diferentes amostras de própolis. O maior grupo de compostos isolados da própolis são os flavonóides, largamente encontrados no reino vegetal, os quais junto com os ácidos fenólicos são os componentes responsáveis pela bioatividade contra vários microorganismos patogênicos (BURDOCK, 1998).

Os locais para as abelhas coletarem matéria prima para elaboração da própolis estão presentes em uma grande variedade de plantas e, podem conter substâncias secretadas ativamente e substâncias exsudadas de cortes, materiais lipofílicos das folhas e dos brotos foliares, mucilagens, gomas, resinas e látex (BANKOVA; CASTRO; MARCUCCI, 2000). Também podem ser encontradas na própolis materiais que são adicionados durante a sua elaboração como, por exemplo, cera (MARCUCCI, 1995).

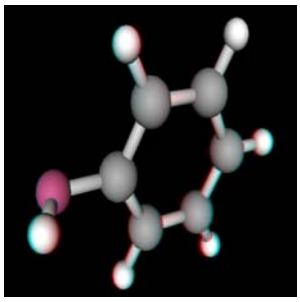
As propriedades biológicas da própolis estão, obviamente, ligadas diretamente com a sua composição química. Esse é possivelmente o maior problema para o uso da própolis como fitoterápico, tendo em vista que a sua composição química varia com a flora da região (brotos, cascas, galhos, exsudatos e menos importante, botões florais). A época da colheita, assim como a espécie da abelha, também influenciam a composição da própolis. No Brasil há o fator adicional relacionado ao grau de "africanização" da *Apis melífera* (TOMÁS-BARBERAN, 1993).

Na Europa, América do Norte e oeste da Ásia a fonte dominante de própolis é o exsudado do botão de álamo (*Populus* sp.) e, portanto, somente um tipo de própolis é encontrado nestas regiões (MARKHAM *et al*., 1996; WOLLENWEBER; BUCHMANN, 1997). Entretanto, na América do Sul, a espécie vegetal do gênero *Populus* sp. não é nativa, existindo grande diversidade vegetal para a retirada de resina, dificultando inclusive a correlação da própolis com a fonte produtora. A dependência geográfica e vegetal da própolis é exemplificada nos trabalhos, como por exemplo, de própolis da América do Sul, Europa, China, Canadá e Espanha (GARCIA-VIGUERA, GREENAWAY, WHATLEY, 1992; TOMÁS-BARBERÁN et al., 1993; PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002; PARK *et al*., 2004).

Análises de própolis oriundas do Brasil e da Venezuela confirmaram a presença de compostos incomuns, além dos flavonóides, como por exemplo, os derivados do ácido cinâmico e seus ésteres e os diterpenos (MARCUCCI, 1995; MARCUCCI, 1996; BANKOVA et al. 1995; BANSKOTA, 1998; TOMÁS-BARBERÁN et al., 1993, NEGRI; SALATINO, 2003; PEREIRA et al., 2002). A origem botânica e química das própolis brasileira tem sido ainda uma questão em aberto devido, principalmente, a grande diversidade de vegetais para a retirada de resinas vegetais. Além disso, com exceção da região sudeste, poucos trabalhos foram desenvolvidos sobre a composição química e as propriedades biológicas das própolis oriundas de outras regiões brasileiras (AGA et al., 1994; TOMÁS-BARBERÁN et al., 1993, BANKOVA et al., 1995; PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002, PARK et al., 2004).

2.1.3 Compostos fenólicos

A expressão “compostos fenólicos” abrange grande número de substâncias orgânicas, que são compostos aromáticos que possuem hidroxilas como substituintes. O composto mais comum é o fenol simples (Figura 2), que ocorre como resultado da descarboxilação de ácidos fenólicos, degradação térmica da lignina ou atividade microbiana. Estão amplamente distribuídos no reino vegetal e em microrganismos, fazendo parte também do metabolismo animal. No entanto, os animais são incapazes de sintetizar o anel aromático e, neste caso, a síntese dos compostos fenólicos em pequena quantidade é feita utilizando o anel benzênico de substâncias ingeridas na dieta. Por outro lado, os vegetais e a maioria dos microrganismos têm a capacidade de sintetizar o anel benzênico, e, a partir dele, produzir diferentes tipos de compostos fenólicos.



A

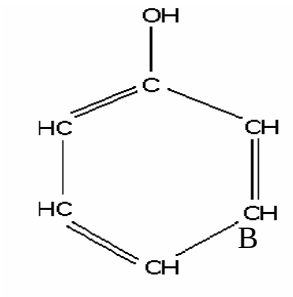


Figura 2 - Estrutura espacial (A) e planar (B) de um fenol simples

A biossíntese completa de compostos fenólicos pode ser observada em plantas vasculares. Todas as gimnospermas e angiospermas possuem lignina na parede celular, a qual tem os fenilpropanóides como precursores. Pode-se ainda encontrar os ácidos hidroxibenzóico e hidroxicinâmico e flavonóides, além de outras classes de fenóis de menor distribuição. Os isoflavonóides estão presentes principalmente na família das leguminosas, enquanto que as antraquinonas podem ser encontradas em aproximadamente seis famílias do reino vegetal (MANN, 1994).

a) Propriedades Gerais

A maior parte dos compostos fenólicos não é encontrada na natureza no estado livre, mas sob a forma de ésteres ou de heterosídeos, sendo, portanto, solúveis em água e em solventes orgânicos polares. Por serem fenólicos, esses compostos são muito reativos quimicamente e isso não deve ser esquecido quando do seu isolamento dos vegetais. Assim, possuem em geral características ácidas e podem ser isolados por meio da sua solubilidade em soluções fracamente básicas (por exemplo, solução de carbonato de sódio). Os compostos fenólicos podem formar pontes de hidrogênio, e estas podem ser tanto intramoleculares quanto intermoleculares. Uma característica importante é a complexação com metais, sendo que muitos desses quelatos metálicos são importantes em diversos sistemas biológicos. Por serem compostos aromáticos, também apresentam intensa absorção na região do ultravioleta. Os compostos fenólicos são facilmente oxidáveis, tanto por meio de enzimas vegetais específicas quanto por influência de metais, luz, calor ou em meio alcalino, ocasionando o escurecimento de soluções ou compostos isolados (Simões, 2001).

b) Classificação

Os compostos fenólicos podem ser classificados segundo o tipo de esqueleto principal, conforme apresentado na Tabela 2. O C6 corresponde ao anel benzênico e o CX à cadeia substituinte com X átomos de carbono.

Tabela 2 - Classificação dos compostos fenólicos de acordo com o esqueleto básico

Esqueleto básico	**Classe de compostos fenólicos**
C6	Fenóis simples, benzoquinonas
C6-C1	Ácidos fenólicos
C26-C2	Acetofenonas e ácidos fenilacéticos
C6-C3	Fenilpropanóides: ácidos cinâmicos e compostos análogos, fenilpropenos, cumarinas, isocumarinas e cromonas
C6-C4	Naftoquinonas
C6-C1-C6	Xantonas, benzofenonas
C6-C2-C6	Estilbenos, antraquinonas
C6-C3-C6	Flavonóides, isoflavonóides e chalconas
(C6-C3)2	Lignanas
(C6-C3-C6)2	Diflavonóides
(C6)n	Melaninas vegetais
(C6-C3)n	Ligninas
(C6-C1)n	Taninos hidrolisáveis
(C6-C3-C6)n	Taninos condensados

Outro tipo de classificação está relacionada com a ocorrência desses compostos no reino vegetal e, assim podem ser divididos em:

a) Compostos fenólicos amplamente distribuídos, como os derivados dos ácidos benzóico e cinâmico, cumarinas, flavonóides e derivados de polimerização (taninos e ligninas);
b) Compostos fenólicos de distribuição restrita, abrangendo as classes de substâncias não citadas no item anterior.

Cada classe de compostos apresenta ampla variação estrutural, principalmente pela presença de diferentes substituintes (hidroxilas ou metoxilas) em um segundo esqueleto aromático comum (SIMÕES, 2001).

Os fenóis são quimicamente reativos, usualmente ácidos e podem frequentemente ser separados de outros constituintes de plantas por sua solubilidade em carbonato de sódio aquoso. Uma propriedade importante de muitos fenóis, que possuem um grupamento *o*-diidroxi (catecol), é a habilidade de quelar metais, característica esta muito importante em sistemas biológicos. São também muito suscetíveis a oxidação, e, em plantas existem enzimas específicas – as fenolases – que catalizam a oxidação de monofenóis a difenóis, de difenóis a quinonas e desses produtos a compostos poliméricos coloridos (MANN, 1994).

As propriedades biológicas dos compostos fenólicos estão relacionadas com a atividade antioxidante que cada fenol exerce sobre determinado meio. A atividade dos antioxidantes, por sua vez, depende de sua estrutura química, podendo ser determinada pela ação da molécula como agente redutor (velocidade de inativação do radical livre, reatividade com outros antioxidantes e potencial de quelação de metais). Alguns estudos *in vitro* demonstram que a atividade antioxidante dos flavonóides é maior que a das vitaminas E e C (RICE-EVANS, MILLER e PAGANGA, 1997; RICE-EVANS et al., 1995).

c) Biogênese

Os compostos fenólicos podem ser formados por meio de duas rotas biogenéticas: via do ácido chiquímico a partir de carboidratos (Figura 3) ou via do acetato-polimalato que se inicia com acetil-coenzima A e malonil-coenzima A. A origem biogenética determina o padrão de substituição do composto fenólico resultante. Dessa maneira, pela via do ácido chiquímico obtêm-se compostos com grupos hidroxilas em posição *orto*, que se formam a partir do ácido cinâmico. Por outro lado, a via do acetato-polimalato origina compostos com grupos hidroxilas dispostos em *meta* (DEWICK, 1998).

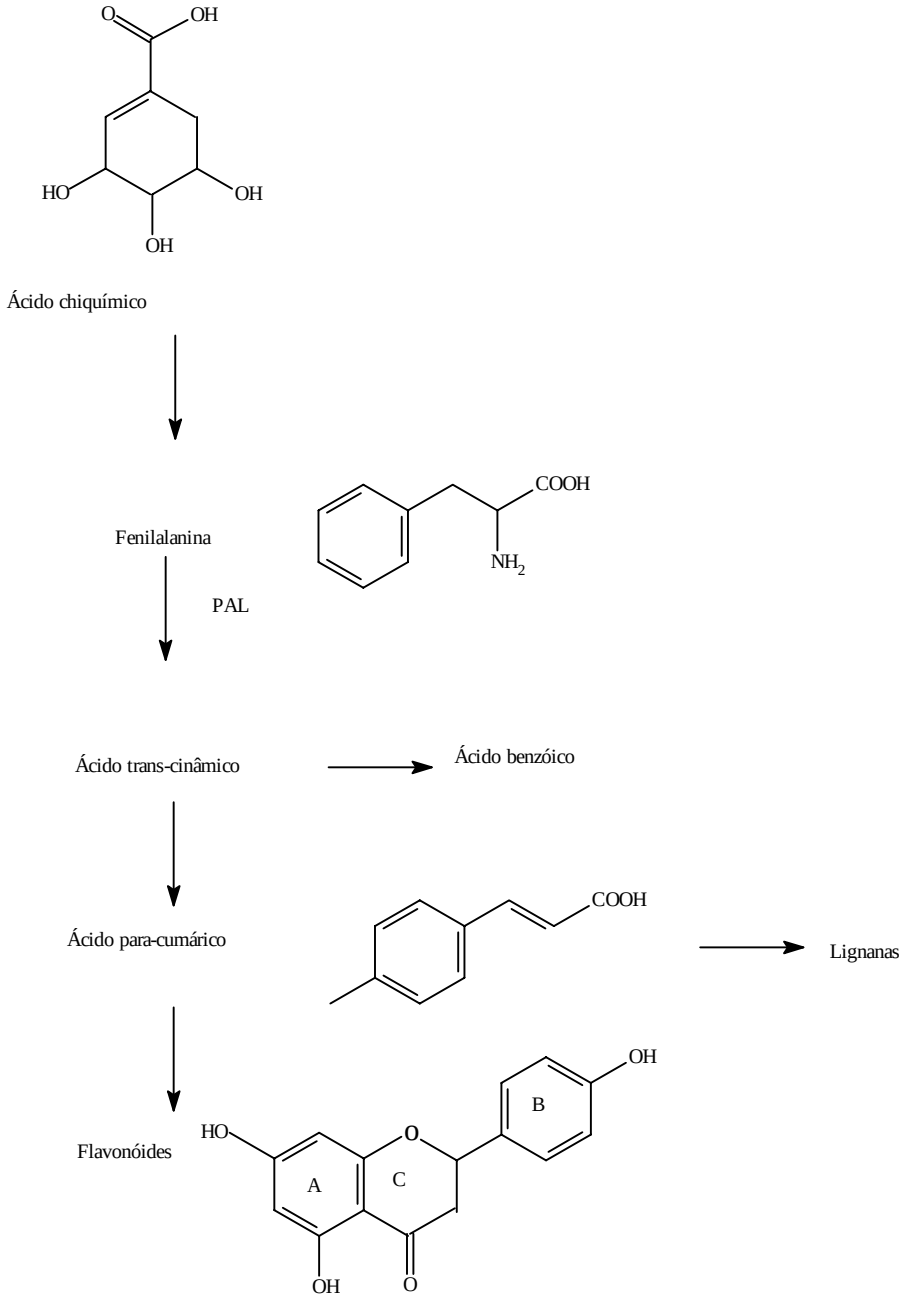


Figura 3 - Via do ácido chiquímico para biossíntese de compostos fenólicos

Uma importante enzima na via do ácido chiquímico é a fenilalanina amônio liase (PAL) a qual produz o ácido cinâmico. Uma importante classe de compostos derivada do ácido cinâmico são as ligninas.

Uma característica importante da biogênese de derivados fenólicos é a capacidade que os vegetais têm de produzir um mesmo composto (como o ácido

clorogênico) a partir de diferentes intermediários, ou seja, os vegetais apresentam rotas biogenéticas alternativas. Outra característica importante é a possibilidade de ocorrerem acoplamentos oxidativos que originam ligações C-C ou C-O intramoleculares com formação de anéis, e intermoleculares com formação de polímeros (DEWICK, 1998).

2.1.3.1 Flavonóides

A palavra flavonóide tem origem no latim *flavus*, que significa amarelo, e incluía no início somente grupos de compostos que apresentavam a cor amarela e um núcleo flavona. Hoje, este termo é usado em um amplo contexto e inclui compostos menos coloridos e incolores, bem como as antocianinas que apresentam coloração vermelha e azul. Esses compostos compõem ampla classe de substâncias de origem natural, cuja síntese não ocorre na espécie humana, mas são constituintes de frutas, vegetais, nozes e bebidas originadas de plantas como o chá e o vinho (PETERSON; DWYER, 1998; RICE-EVANS, 2004).

Os flavonóides absorvem radiação eletromagnética na faixa do ultravioleta (UV) e do visível e, dessa maneira, apresentam papel de defesa nas plantas frente à radiação UV da luz solar. Além disso, os flavonóides podem representar barreira química de defesa contra microrganismos (bactérias, fungos e vírus), insetos e outros animais herbívoros. Também possuem a capacidade de regular determinadas reações enzimáticas e prover “flavor” a produtos usados para consumo humano (COOPER-DRIVER, 2001). Os flavonóides também proporcionam relacionamentos harmônicos entre insetos e plantas, por meio da orientação destes até o néctar, contribuindo assim significativamente com o processo de polinização (MARCUCCI, 1996).

Estruturalmente, os flavonóides são substâncias aromáticas com 15 átomos de carbono no seu esqueleto básico, compostos do tipo C6-C3-C6, onde os dois anéis C6 são necessariamente aromáticos (anéis A e B), conectados por uma ponte de três carbonos, que geralmente contém um átomo de oxigênio (anel C) (Figura 4) (RICE-EVANS, 2004; LOPES et al., 2000; PETERSON; DWYER, 1998). Com exceção das

chalconas, todos os flavonóides possuem um anel pirânico (heteroátomo de oxigênio). De acordo com as características químicas e biossintéticas, os flavonóides são separados em diversas classes: flavonas, flavonóis, dihidroflavonóides (flavanonas e flavanonóis), antocianidinas, isoflavonóides, auronas, neoflavonóides, biflavonóides, catequinas e seus precursores metabólicos conhecidos como chalconas e podem ocorrer como agliconas, glicosilados e como derivados metilados (HAVSTEEN, 2002).

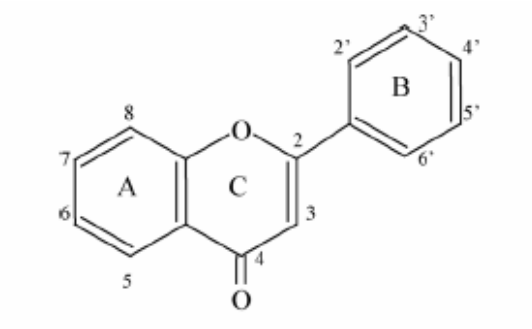


Figura 4 - Núcleo básico de flavonóides composto por dois anéis aromáticos (A e B) e um anel intermediário (C)

Com mais de 8000 compostos conhecidos, os flavonóides são biossintetizados a partir de um derivado do ácido cinâmico (*trans*-4-cumarato), o qual é obtido a partir do metabolismo dos aminoácidos fenilalanina ou tirosina. O *trans*-4-cumarato age como precursor na síntese de um intermediário, ao qual são adicionados três resíduos de malonato e posterior ciclização da estrutura. Por meio de subseqüentes hidroxilações e reduções, diferentes flavonóides são formados (Figura 5) (PIETTA, 2000; RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1997).

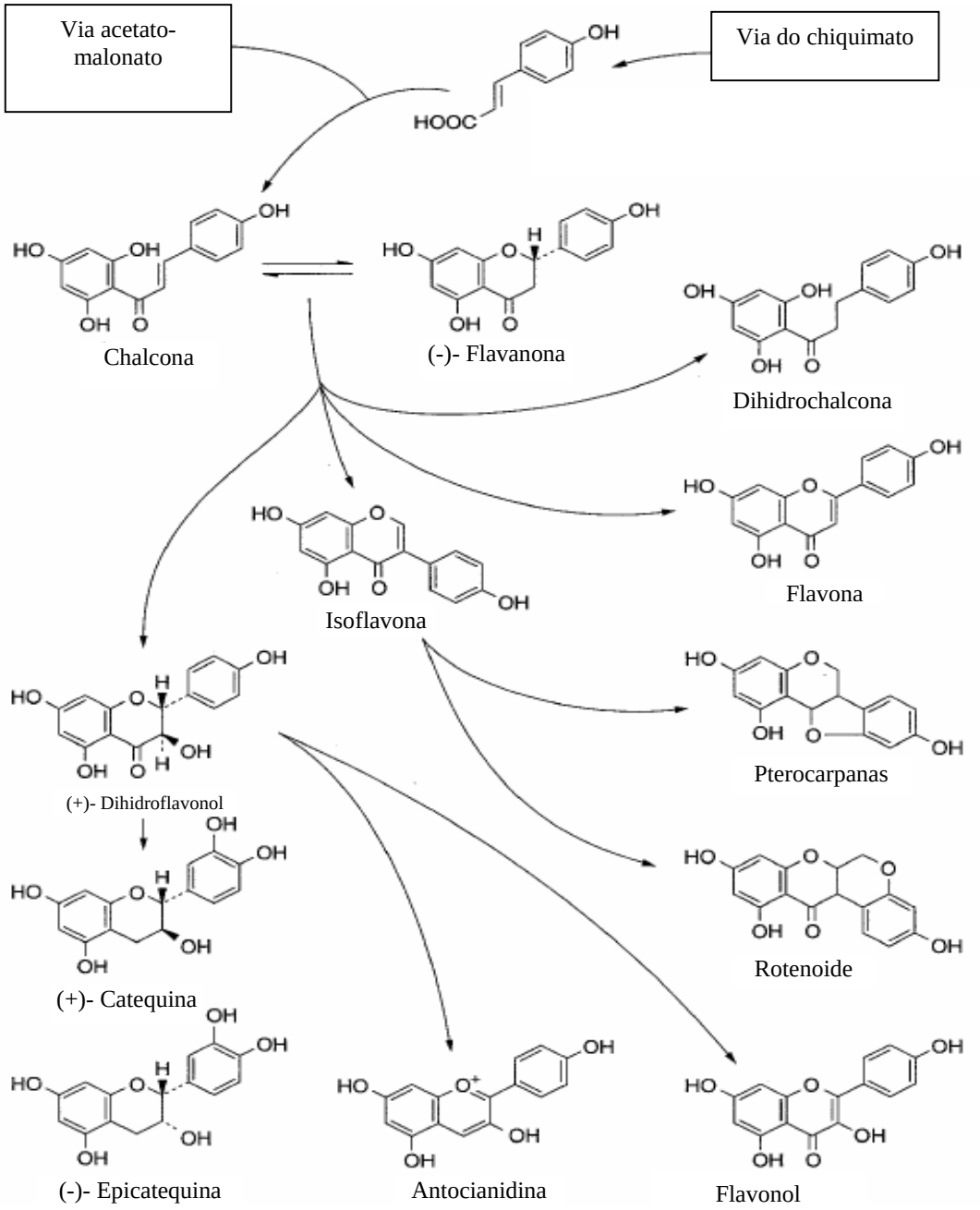


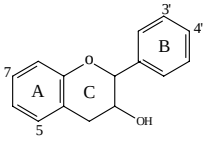
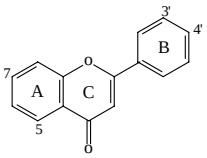
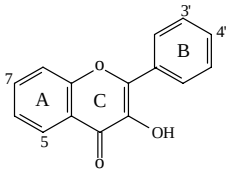
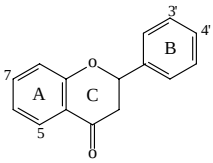
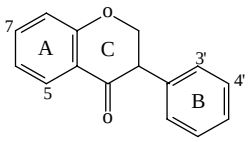
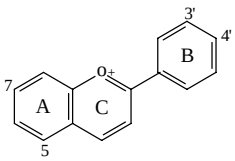
Figura 5 - Interelações entre as diferentes classes de flavonóides. Setas indicam as principais rotas biossintéticas
Fonte: RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA (1997).

As várias classes de flavonóides são função da estrutura característica do anel C, como a presença ou não do anel central e dupla ligação ou grupo hidroxila a ele

ligado (PIETTA, 2000). O anel C condensado com o anel A pode ser tanto um anel γ-pirano, no caso das flavonas e dos flavonóis, quanto o seu dihidroderivado, no caso das flavanonas e dos flavononóis. A posição do anel benzênico substituinte (B) divide a classe dos flavonóides em flavonóides (posição 2) e isoflavonóides (posição 3) (Tabela 3). As chalconas são os precursores dos flavonóides, e, as antocianidinas possuem o anel C com carga positiva como a principal diferença das outras classes de flavonóides (HAVSTEEN, 2000).

A explicação para a existência de uma grande diversidade estrutural de flavonóides se dá pelas modificações que tais compostos podem sofrer, como: hidroxilação, metilação, acilação, glicosilação, entre outras (LOPES et al., 2000). Os flavonóides são freqüentemente hidroxilados nas posições 3, 5, 7, 3', 4' e 5'. Alguns desses grupos hidroxilas são freqüentemente metilados, acetilados ou sulfatados. As ligações glicosídicas ocorrem geralmente nas posições 3 ou 7, e os monossacarídeos comuns são geralmente a L-ramnose, D-glucose, galactose e arabinose e o dissacarídeo glucoramnose. As prenilações geralmente ocorrem diretamente num átomo de carbono no anel aromático, mas *O*-prenilações já foram encontradas (HAVSTEEN, 2002). Os flavonóides são facilmente oxidados no anel B, o que leva a abertura do mesmo no nível do átomo de oxigênio.

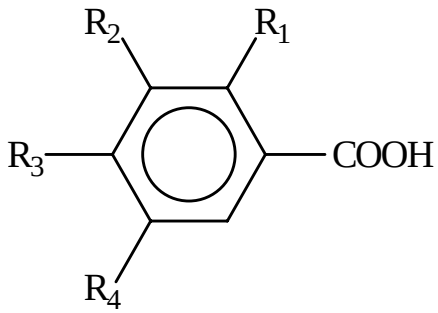
Tabela 3 - Classificação e estrutura de alguns flavonóides

Classe	Estrutura geral	Flavonóide	Substituição
Flavanol		(+) - catequina	3,5,7,3',4'- OH
		(-) - epicatequina	3,5,7,3',4'- OH
		galato epigalocatequina	3,5,7,3',4',5'-OH,3-galato
Flavona		crisina	5,7 – OH
		apigenina	5,7,4'-OH
		rutina	5,7,3',4',-OH,3 rutinose
		luteolina	5,7,3',4',-OH
Flavonol		canferol	3,5,7,4',-OH
		quercetina	3,5,7,3',4',-OH
		miricetina	3,5,7,3',4',5',-OH
		tamarixetina	3,5,7,3',-OH,4'-OMe
Flavanona		naringina	5,4'-OH,7-ramnoglicose
		naringenina	5,7,4'-OH
		taxifolin	3,5,7,3',4'-OH
Isoflavona		genistina	5,4'-OH, 7-glicose
		genisteína	5,7,4'-OH
		daidzina	4'-OH, 7-glicose
		daidzeína	7,4'-OH
Antocianidina		apigenidina	5,7,4'-OH
		cianidina	3,5,7,4'-OH,3,5,OMe

Fonte: HEIM (2002)

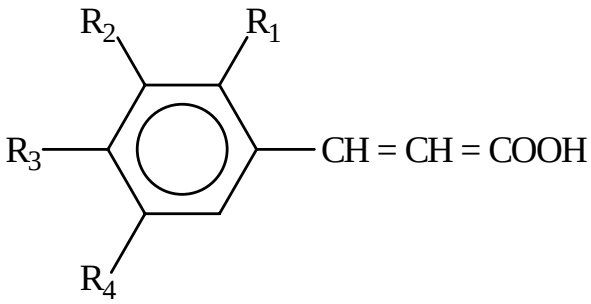
2.1.3.2 Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos são divididos em três grupos. O primeiro é composto pelos ácidos benzóicos, que possuem sete átomos de carbono (C6-C1) e, são os ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza. As fórmulas gerais, bem como denominações estão apresentadas na Figura 6. O segundo é formado pelos ácidos cinâmicos, que possuem nove átomos de carbono (C6-C3), sendo sete os mais comumente encontrados no reino vegetal (Figura 7). As cumarinas são derivadas do ácido cinâmico por ciclização da cadeia lateral do ácido *o*-cumárico (Figura 8) (SOARES, 2002).



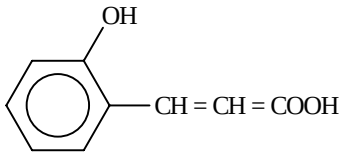
R_1 = OH (Ácido Salicílico); R_1 = R_4 = OH (Ácido Gentísico); R_3 = OH (Ácido ρ-hidroxibenzóico); R_2 = R_3 = OH (Ácido Protocatequínico); R_2 = OCH_3; R_3 = OH (Ácido Vanílico); R_2 = R_3 = R_4 = OH (Ácido Gálico); R_2 = R_4 = OCH_3; R_3 = OH (Ácido Siríngico)

Figura 6 - Estrutura química dos principais ácidos benzóicos
Fonte: SOARES (2002).

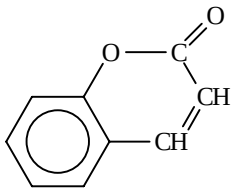


R1 = R2 = R3 = R4 = H (Ácido cinâmico); R1 = OH (Ácido *o*-cumárico); R2 = OH (Ácido m-cumárico); R3 = OH (Ácido ρ-cumárico); R2 = R3 = OH (Ácido Caféico); R2 = OCH3; R3 = OH (Ácido Ferúlico); R2 = R4 = OCH3; R3 = OH (Ácido Sinápico)

Figura 7 - Estrutura química dos principas ácidos cinâmicos
Fonte: SOARES (2002).



Ácido o-cumárico



Cumarina

Figura 8 - Estrutura química das cumarinas
Fonte: SOARES (2002).

Os ácidos ρ-cumárico, ferúlico, caféico e sináptico são os ácidos cinâmicos mais comuns na natureza. Estes ácidos são encontrados nas plantas, usualmente na forma de ésteres, a exemplo do ácido clorogênico, éster do ácido quínico, cuja molécula é constituída pelo ácido quínico (álcool-ácido-cíclico) esterificado ao ácido caféico. Alguns ésteres do ácido caféico são alergênicos e, responsáveis pela ocorrência de dermatites em indivíduos sensíveis. Também são encontrados na forma de glicosídeos ou ligados a proteínas e a outros polímeros da parede celular e, raramente, como ácidos livres (BELITZ; GROSCH, 1987; HARBORNE, 1973). Os fenóis ácidos encontram-se distribuídos na casca e na polpa da uva e, seus teores diminuem com o amadurecimento e também durante a fermentação do vinho (MACHEIX, SAPIS e FLEURIET, 1991).

No grupo dos ácidos benzóicos, compostos que possuem grupo carboxílico ligado ao anel aromático, destacam-se os ácidos protocatecuíco, vanílico, siríngico, gentísico, salicílico, elágico e gálico. Esses dois grupos de ácidos fenólicos possuem atividade antioxidante (HARBORNE, 1973). Embora outras características também contribuam para a atividade antioxidante dos ácidos fenólicos e seus ésteres, esta é, geralmente, determinada pelo número de hidroxilas presentes na molécula e também com a proximidade do grupo $-CO_2H$ com o grupo fenil. Quanto mais próximo esse grupo estiver do grupo fenil maior será a capacidade antioxidante do grupo hidroxila na posição meta.

Em geral, a atividade antioxidante dos derivados dos ácidos hidroxicinâmicos é maior do que a dos ácidos hidroxibenzóicos. A presença do grupo –CH=CH-COOH na estrutura do ácido cinâmico aumenta sua capacidade de estabilizar radicais livres. Provavelmente, há conjugação da dupla ligação do grupo –CH=CH-COOH com as duplas do anel. Deve-se destacar que o ácido gálico apresenta atividade antioxidante maior do que a catequina (flavonóide), que conta com cinco grupos hidroxilas em sua estrutura (RICE-EVANS et al., 1996).

2.1.4 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo está associado com um distúrbio no balanço pró-oxidante/antioxidante em favor do pró-oxidante. A ocorrência de espécies reativas de oxigênio, conhecidas como pró-oxidantes, é um atributo da vida aeróbica normal. A existência e desenvolvimento de células em ambiente contendo oxigênio poderia não ser possível sem a presença de sistemas de defesa que incluem enzimas e antioxidantes não enzimáticos. A vida aeróbica é caracterizada por uma formação constante de pró-oxidantes sendo seu consumo balanceado por antioxidantes (SIES, 1991).

2.1.4.1 Espécies reativas de oxigênio (ERO)

Espécies reativas de oxigênio (ERO) são produzidas naturalmente em nosso organismo por meio de processos metabólicos oxidativos, e muitas vezes, são de extrema utilidade, como nas situações em que há necessidade de ativação do sistema imunológico (como exemplo, os macrófagos utilizam o peróxido de hidrogênio para destruir bactérias e outros elementos estranhos); na desintoxicação de drogas; e na produção do fator relaxante derivado do endotélio, o óxido nítrico, extremamente

importante nos processos que desencadeiam o relaxamento dos vasos sanguíneos (HALLIWELL, 2000).

Conforme Halliwell (2000), o oxigênio (O_2) que respiramos é metabolizado em nosso organismo da seguinte maneira: aproximadamente 85 a 90% são utilizados pela mitocôndria, através da cadeia de transporte de elétrons, e os 10 a 15% restantes são utilizados por diversas enzimas oxidases e oxigenases e também por reações químicas de oxidação direta. Na parte terminal da cadeia de transporte de elétrons, a enzima citocromo oxidase (equação 1) remove um elétron de cada uma das quatro moléculas reduzidas de citocromo c, oxidando-as, e adiciona os quatro elétrons ao O_2 para formar água (em torno de 95 a 98% dos 85 a 90% citados acima). Os 2 a 5% restantes são reduzidos univalentemente em metabólitos denominados espécies reativas de oxigênio.

$$O_2 + 4e^- + 4H^+ \longrightarrow 2\ H_2O + \text{energia} \qquad (1)$$

2.1.4.2 Formação das espécies reativas de oxigênio

Em razão da sua configuração eletrônica, o oxigênio tem uma forte tendência a receber um elétron de cada vez. Desta forma, a conversão univalente do oxigênio à água processa-se da seguinte maneira:

(a) A adição de um elétron a uma molécula de oxigênio no estado fundamental gera o radical superóxido (O2•-) (equação 2) (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

$$O_2 + e- \longrightarrow O_2\bullet- \qquad (2)$$

(b) O superóxido ao receber mais um elétron e dois íons hidrogênio forma o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), por meio do processo chamado dismutação (ABDOLLAHI et al., 2004). Essa reação é catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD), que é encontrada em quantidades elevadas nas células dos mamíferos e que acelera a reação em até 104 vezes, em pH fisiológico (equação 3).

$$2\ O_2\bullet- + 2H+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 \qquad (3)$$

(c) Quando o H_2O_2 recebe mais um elétron e um íon hidrogênio, é formado o radical hidroxil (OH•), que é o mais reativo dos intermediários, pois pode reagir e alterar qualquer estrutura celular que esteja próxima e assim influenciar enzimas, membranas ou ácidos nucléicos (SIES, 1991). O radical hidroxil pode ser formado quando o H_2O_2 reage com íons ferro ou cobre (equação 4). A reação é conhecida como Reação de Fenton.

$$Fe^{2+}/Cu^{+} + H_2O_2 \longrightarrow OH\bullet + OH^{-} + Fe^{3}+/Cu^{2}+ \qquad (4)$$

Os íons de metais de transição também podem catalisar a reação entre o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e superóxido (O_2•), levando à produção do radical hidroxil (equação 5), num processo conhecido como Reação de Haber-Weiss (SCHNEIDER, 2004).

$$H_2O_2 + O_2\bullet \xrightarrow{Fe/Cu} OH\bullet + OH- + O_2 \qquad (5)$$

Os radicais superóxido e hidroxil têm elétrons desemparelhados em sua órbita mais externa e são, portanto, chamados de radicais livres (RL). O peróxido de hidrogênio não é um radical livre; no entanto, representa um metabólito de oxigênio parcialmente reduzido. Outras espécies reativas de interesse são o oxigênio singlete, que são formas de oxigênio spin-alteradas. Esses metabólitos derivados do oxigênio, considerados em conjunto, são denominados espécies reativas de oxigênio (ERO), em função da sua aumentada reatividade para as biomoléculas, e em geral alteram o tamanho e a forma dos compostos com os quais eles interagem. Além disso, o radical superóxido pode reagir diretamente com o óxido nítrico (NO), um radical livre centrado no nitrogênio, gerando peroxinitrito. Este pode levar à formação de um oxidante com características do radical hidroxil (equação 6) (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

$$O2\bullet- + NO \rightarrow ONOO- \rightarrow ONOO- + H+ \rightarrow OH\bullet \qquad (6)$$

Cada ERO tem suas próprias características, mostrando diferentes reatividades e tempos de meia-vida. O oxigênio singlete ($^1O_2$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), não são radicais e seu tempo de meia-vida é diferente. O radical hidroxil ($OH^{\cdot}$) é o mais

reativo e possui o menor tempo de vida. O radical peroxil ($LOO^{\cdot}$) possui o maior tempo de vida, e aqueles radicais que podem ser formados de ácidos graxos poliinsaturados, capazes de difundir-se do seu sítio de geração, a menos que, desativados por antioxidantes (LEE, K.; LEE, H, 2006; SIES, 1991; HALLIWELL, 2000).

Estes radicais irão causar alterações nas células, agindo diretamente sobre alguns componentes celulares (Figura 9). Os ácidos graxos poliinsaturados das membranas, por exemplo, são muito vulneráveis ao ataque de radicais livres. Estas moléculas desencadeiam reações de oxidação nos ácidos graxos da membrana lipoprotéica, denominadas de peroxidação lipídica, que afetarão a integridade estrutural e funcional da membrana celular, alterando sua fluidez e permeabilidade. Além disso, os produtos da oxidação dos lipídios da membrana podem causar alterações em certas funções celulares (RICE-EVANS; BURDON, 1993). Os radicais livres podem provocar também modificações nas proteínas celulares, resultando em sua fragmentação, *cross linking*, agregação e, em certos casos, ativação ou inativação de certas enzimas devido à reação dos radicais livres com aminoácidos constituintes da cadeia polipeptídica. A reação de radicais livres com ácidos nucléicos também foi observada, gerando mudança em moléculas de DNA e acarretando certas aberrações cromossômicas. Além destes efeitos indiretos, há a ação tóxica resultante de altas concentrações dos íons superóxido e peróxido de hidrogênio na célula (HALLIWELL et al., 1995).

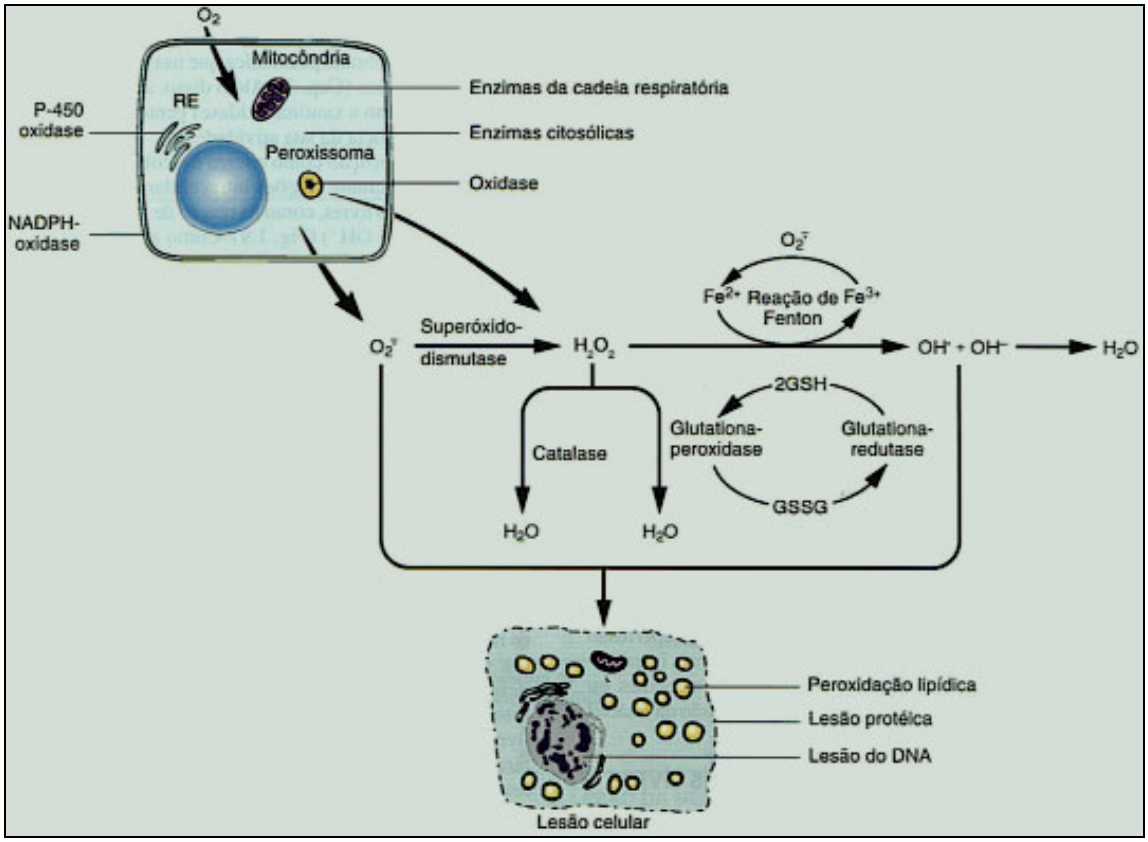


Figura 9 - Formação de radicais livres (RL) (espécie reativa de oxigênio) e mecanismos de defesa antioxidantes em sistemas biológicos
Fonte: Sistema Nervoso (2007).

2.1.4.3 Patogenia das espécies reativas de oxigênio (ERO)

Há muitas evidências de influencias das ERO sobre doenças degenerativas, como a catarata, enfisema, artrite, doença de Parkinson, diabetes, mutação, câncer e envelhecimento (Figura 10). As formas como ocorrem estas doenças podem ser assim classificadas: 1) estresse oxidativo mitocondrial, quando ocorre desequilíbrio do estado redox sistêmico e uma depuração prejudicada de glicose, sugerindo que a mitocôndria do músculo esquelético seja o principal sítio de geração de ERO; 2) condição oxidativa inflamatória, quando há uma estimulação excessiva da atividade da NADPH oxidase por citoquinas e outros agentes (SIES, 1991).

A vida aeróbica consiste em uma constante produção destes radicais livres, a qual é contrabalanceada por uma produção equivalente de mecanismos antioxidantes

visando neutralizar seus efeitos deletérios. Quando esta neutralização não é possível devido a uma sobrecarga do mecanismo antioxidante, diz-se que há uma situação de estresse oxidativo, levando a geração de diversos danos aos sistemas biológicos. Frente ao estresse oxidativo ocorrem os seguintes processos: 1) adaptação, por aumento da resposta antioxidante; 2) dano tecidual por agressão a lipídeos, carboidratos e proteínas; 3) morte celular por necrose ou apoptose.

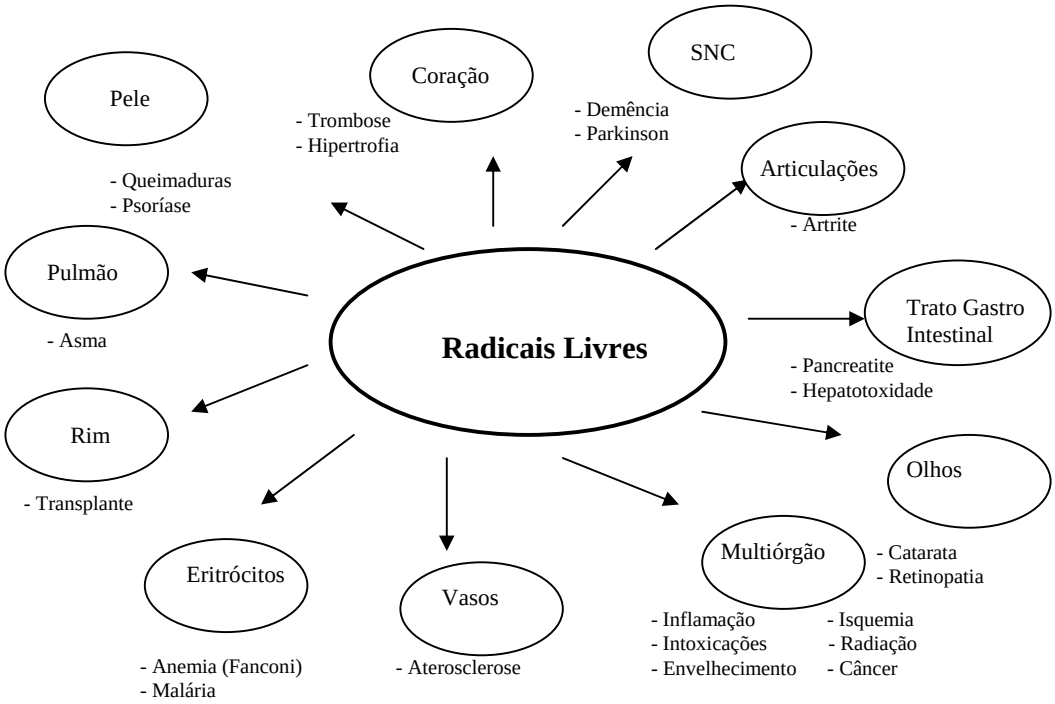


Figura 10 - Doenças associadas com espécies reativas de oxigênio (ERO)
Fonte: RENZ (2003).

2.1.5 Antioxidantes

A eliminação das espécies reativas de oxigênio é um dos pré-requisitos da vida aeróbia e, muitos sistemas de defesa antioxidante de prevenção e reparo estão envolvidos. Estes sistemas consistem em seqüestradores não enzimátios, conhecidos

como antioxidantes, bem como sistemas enzimáticos que incluem a superóxido desmutase e hidroperoxidases, como a peroxidase glutationa, catalase e outras importantes peroxidases hemoproteicas (SIES, 1991).

O termo antioxidante possui algumas definições, mas uma largamente utilizada cobre todos os substratos oxidáveis como, lipídeos, proteínas, DNA e carboidratos e foi sugerida por Halliwell e Guteridge (1990), da seguinte forma: ”Um antioxidante pode ser definido como uma substância que diminui ou previne significativamente a oxidação de outra substância, sempre que presente em menor concentração comparada a substância oxidável de interesse”. Outra definição é o de antioxidantes em alimentos, como uma substância que em pequena quantidade é capaz de prevenir ou retardar grandemente a oxidação de materiais facilmente oxidáveis como as gorduras (BECKER; NISSEN; SKIBSTED; 2004).

Estas definições gerais não limitam a atividade antioxidante a um grupo específico de compostos químicos e nem se referem a um mecanismo particular de ação. Para a situação *in vivo,* o conceito de antioxidante é amplo, incluindo enzimas antioxidantes, ligações de ferro e proteínas transportadoras e outros compostos que afetam o sinal de transdução e expressão gênica. Para alimentos e bebidas, antioxidantes podem ser relacionados a proteção da oxidação de substratos específicos ou a formação de produtos de oxidação específicos, e valores podem ser definidos para diferentes produtos. De um ponto de vista termodinâmico, a ação antioxidante depende de parâmetros bem definidos, como as ligações de energia e potenciais de redução padrão, e, desta forma é possível deduzir se um dado radical pode ser seqüestrado por um antioxidante específico ou não (BECKER; NISSEN; SKIBSTED; 2004).

Os antioxidantes são capazes de inibir a oxidação de diversos substratos, de moléculas simples a polímeros e biossistemas complexos, por meio de dois mecanismos: o primeiro envolve a inibição da formação de radicais livres que possibilitam a etapa de iniciação; o segundo abrange a eliminação de radicais importantes na etapa de propagação, como alcoxila e peroxila, através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia (NAMIKI, 1990).

Há ainda diferenças entre os três principais mecanismos que podem suprimir a formação de radicais livres: antioxidantes, sequestrantes de radicais livres e quelantes. Antioxidantes e sequestrantes de radicais livres são usualmente considerados sinônimos, embora nem sempre o sejam. Por exemplo, etanol é um sequestrante de radicais hidroxil, mas nunca foi considerado um antioxidante. Antioxidante é o termo mais antigo, que no início foi aplicado para a descrição de inibidores de processos oxidativos, os quais eram capazes de reagir com radical peroxil. Agora, este termo é aplicado a todos os inibidores de radicais livres. Em adição aos antioxidantes diretos, há dois outros grupos importantes de inibidores de radicais livres: enzimas antioxidantes e os compostos que possuem propriedades antioxidantes indiretas (DENISOV; AFANAS, 2005).

Inibidores de radicais livres suprimem a formação do radical, reagindo com os mesmos e formando novos radicais inativos (Figura 11) ou quelando cataliticamente metais de transição ativos e formando complexos inativos (Figura 12):

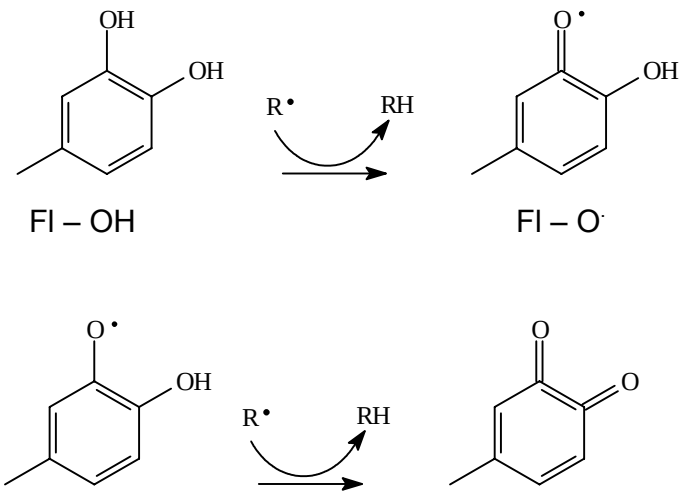


Figura 11 - Esquema de seqüestro de ERO (R·) por flavonóides (Fl)
Fonte: PIETTA (2000)

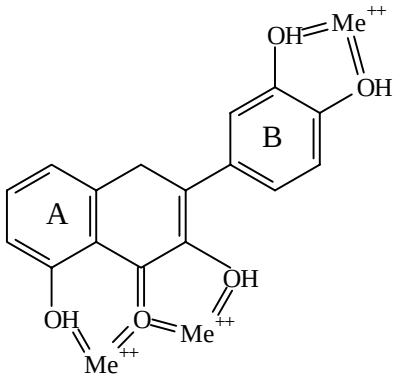


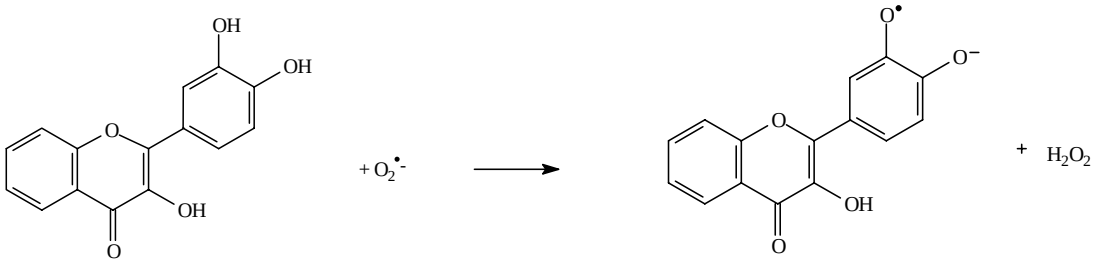
Figura 12 - Sítios de ligação de metais em flavonóides
Fonte: PIETTA (2000).

2.1.5.1 Atividade antioxidante de flavonóides

Flavonóides são fenólicos, e desta forma, sua atividade antioxidante depende da reatividade dos substituintes hidroxil em reações de abstração do átomo de hidrogênio. As reações mais importantes e mais estudadas são as reações com radicais peroxil (7), hidroxil (8) e superoxido (9) (Denisov; Atanas, 2005). Devido a seus baixos potenciais de redução (0,23< E <0,75 V), os flavonóides são termodinamicamente capazes de reduzir radicais livres com potenciais de redução entre 2,13 – 1,0 V, como o superoxido, peroxil e hidroxil, pela doação de um átomo de hidrogênio (PIETTA, 2000).

$$ROO^{\cdot} + FlOH \longrightarrow ROOH + FlO^{\cdot} \qquad (7)$$

$$HO^{\cdot} + FlOH \longrightarrow H_2O + FlO^{\cdot} \qquad (8)$$



(9)

Radicais hidroxil reagem com flavonóides com uma taxa de aproximadamente 10^9 $mol^{-1}s^{-1}$, enquanto a taxa contante para os radicais menos reativos peroxil é usualmente

de (0,1-1) x 10^7 $mol^{-1}s^{-1}$. Já os radicais superoxidos reagem com flavonóides a uma taxa de (0,1-5) x 10^4 $mol^{-1}s^{-1}$. Esta reação é de grande importância porque a capacidade dos flavonóides de seqüestrar superoxidos os torna importantes agentes farmacêuticos para o tratamento de doenças associadas com a super produção de radicais livres. O mecanismo mais provável para esta reação é a abstração combinada de um próton e um átomo de hidrogênio de *o*-hidroxil da molécula de flavonóide (Equação 9). Esta habilidade de seqüestrar radicais superoxidos é o principal mecanismo da proteção de flavonóides contra danos celulares mediados por radicais livres (DENISOV; ATANAS, 2005).

Muitos estudos têm sido realizados para estabelecer a relação entre a estrutura de flavonóides e sua atividade de seqüestro de radical. Segundo Bors et al. (1999), os principais determinantes para a capacidade de seqüestro de radical são 1) a presença de um grupo catecol no anel B, o qual possui a as melhores propriedades de doação de elétrons e a oxidação do flavonóide ocorre no anel B quando o grupo catecol está presente e 2) uma dupla ligação na posição 2,3 conjugada com um grupo 4-oxo, o qual é responsável pelo deslocamento do elétron do anel B (Figura 13).

A presença de um grupo 3-hidroxil no anel heterocíclico também aumenta a atividade de seqüestro de radical, enquanto grupos adicionais hidroxil ou metoxil nas posições 3,5 e 7 dos anéis A e C parecem ser menos importantes. Estas características estruturais contribuem para aumentar a estabilidade do radical aroxil. Assim os flavonols e flavonas, contendo o grupo catecol no anel B, são mais ativos. Entretanto, a presença do grupo 3-hidroxil nos flavonols os torna mais potentes que as correspondentes flavonas. A glicosilação deste grupo, como a rutina, reduz grandemente a capacidade de seqüestro de radical. Flavanol e flavanonas, devido a perda da conjugação provida pela dupla ligação 2,3 com o grupo 4-oxo, são fracos antioxidantes (PIETTA, 2000).

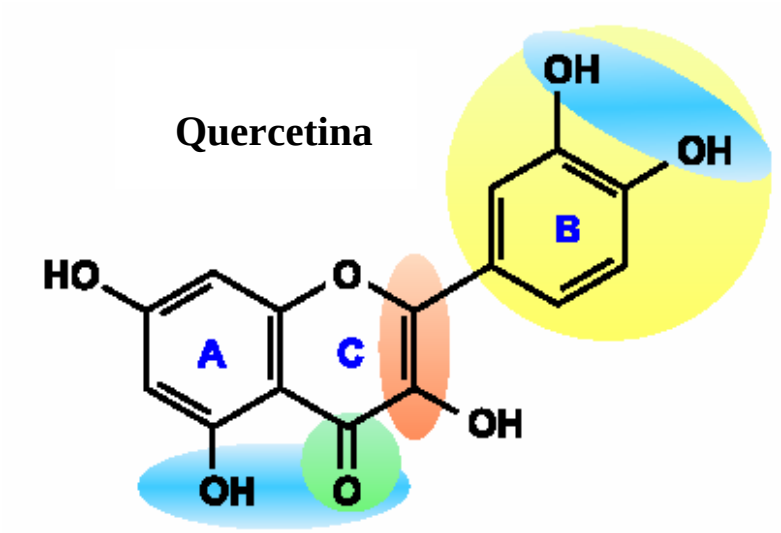


Figura 13 - Estrutura do flavonol quercetina mostrando características importantes na definição de potencial antioxidante clássico dos flavonóides. A característica mais importante é a presence do grupo catecol ou dihidroxil no ane B (marcado em amarelo). Outra importante característica inclui a presença da insaturação no anel C (marcado em vermelho) e a presença da função 4-oxo no anel C (marcado em verde). O grupo catecol e outras funções podem também explicar a habilidade dos flavonides em quelar metais de transição como cobre e ferro (marcado em azul)

Fonte: WILLIAMS; SPENCER; RICE-EVANS (2004).

Antocianidinas e seus glicosídeos (antocianinas) possuem atividade comparada a quercetina e galato de catequina, pela presença do grupo catecol no anel B (como a cianidina). A remoção do grupo 3-hidroxil do anel B, reduz a capacidade antioxidante no mesmo nível do canferol (que difere da quercetina porque tem somente um grupo hidroxil no anel B). Estes dados confirmam que a estrutura catecol no anel B é o principal determinante para a capacidade de seqüestro de radical dos flavonóides.

No caso das isoflavonas, a localização do anel B na posição 3 do anel heterocíclico afeta grandemente a capacidade de seqüestro. Assim, a genisteína é duas vezes mais potente do que a relativa flavona apigenina. O grupo 4'-hidroxi é necessário para a atividade de seqüestro, e a metilação, como em biochanin A, diminui a potência. A estrutura 5,7-diidroxi no anel A é também importante, como é evidenciado quando se compara os pares genisteína/daidzeína e biochanin A/formononetin. Como nas outras classes de flavonóides, a glicosilação influencia de forma negativa a capacidade de seqüestro de radical.

2.1.5.2 Atividade antioxidante de ácidos fenólicos

Marinova e Yanishlieva, (1992) realizaram um estudo com o objetivo de elucidar as diferenças de potencial antioxidante existentes entre os ácidos fenólicos. Neste trabalho foi realizada comparação quantitativa do comportamento cinético da inibição da oxidação de ácidos benzóicos (ácidos *p*-hidroxibenzóico, vanílico, siríngico, e 3,4-dihidroxibenzóico) e cinâmicos (ácidos *p*-cumárico, ferúlico, sinápico e caféico). Pode-se concluir que, no caso dos ácidos benzóicos, a hidroxila presente na molécula do ácido *p*-hidroxibenzóico não confere a este nenhuma propriedade antioxidante. Já a metoxila presente com a hidroxila no ácido vanílico confere a ele uma pequena atividade antioxidante. No caso do ácido siríngico, o qual possui dois grupamentos de metoxila, a ação é ainda maior. Com referência aos ácidos cinâmicos, a presença de uma metoxila adjacente à hidroxila, como ocorre no ácido ferúlico, aumenta o período de indução da oxidação duas vezes em relação ao controle. Este decurso de tempo é ainda maior com a presença de duas metoxilas, como ocorre no ácido sinápico. Entretanto, o maior potencial antioxidante foi encontrado quando há duas hidroxilas nas posições 3 e 4, estrutura apresentada pelos ácidos caféico e 3,4-dihidroxibenzóico. Portanto, a atividade antioxidante dos compostos estudados por estes autores possuem a seguinte ordem: ácido caféico > 3,4-dihidroxibenzóico > sinápico > siríngico > ferúlico > *p*-cumárico > vanílico.

Em estudos cinéticos mais recentes, utilizando-se triglicerídios e metil ésteres de óleo de girassol, foi verificado que os ácidos fenólicos participam mais efetivamente na fase de iniciação da oxidação e os ácidos ferúlico, caféico e sinápico atuam também nas reações de propagação. Isso leva ao melhor esclarecimento da ação destes antioxidantes no processo oxidativo (YANISHLIEVA; MARINOVA, 1995).

2.1.5.3 Avaliação da atividade antioxidante

Os métodos para a avaliação da ação antioxidante devem ser baseados na identificação de diferentes mecanismos antioxidativos sob condições variáveis; refletindo as propriedades multifuncionais dos antioxidantes em ambos processos

oxidativos fisiológicos e relacionados a alimentos. Resultados conflitantes podem ser obtidos quando se mede atividade antioxidante por diferentes métodos, e podem ser relacionados a alguns fatores: a) a estrutura física do sistema teste, b) a natureza do substrato para oxidação, c) a presença de componentes que possuam interação, d) o modo de iniciar a oxidação, e) o método analítico para medir a oxidação (FRANKEL; MEYER, 2000).

A influência de alguns fatores tem sido elucidada em sistemas modelo simples, mas o efeito em sistemas heterogêneos complexos como um alimento ou o corpo humano não é simples de se estimar e, desta forma, há a necessidade de se padronizar protocolos para avaliar os efeitos antioxidantes (FRANKEL; MEYER, 2000). Quatro passos foram propostos para a aplicação de antioxidantes em alimentos e podem ser posteriormente acrescidos para a avaliação dos benefícios a saúde. O primeiro passo (I) sugerido é a quantificação e identificação de compostos fenólicos no produto. O passo dois (II) tem o objetivo de quantificar a atividade de seqüestro do radical de diferentes antioxidantes, usando mais que um método e considerando o efeito do solvente no mecanismo antioxidante. O próximo passo (III) é a avaliação da habilidade do antioxidante em inibir ou retardar a oxidação lipídica. O último passo (IV) depende do objetivo do estudo e é subdividido em IV (a) e IV (b). O passo IV (a) é sugerido para aplicação em alimentos, onde experimentos de estocagem são imperativos, enquanto o passo IV (b) é necessário para avaliação dos efeitos antioxidantes da dieta no corpo humano, onde estudos de intervenção são necessários (BECKER; NISSEN; SKIBSTED, 2004).

2.1.6 Métodos de Medida da atividade antioxidante *in vitro*.

2.1.6.1 Método indireto - sequestro de radical

A atividade antioxidante de um composto depende de qual radical livre ou oxidante é utilizado no método, e uma diferença nessa atividade antioxidante é, portanto, esperada quando análises são realizadas usando-se diferentes métodos. O método de seqüestro de radical opera pela medida direta da doação do átomo de

hidrogênio ou transferência de elétron de um antioxidante em potencial a moléculas do radical livre em sistemas “livres de lipídeos”. Entretanto, esses métodos necessitam de substratos de oxidação, e não refletem a situação *in vivo* ou a peroxidação em alimentos (BECKER; NISSEN; SKIBSTED, 2004; ARNAO; CANO; ACOSTA, 2000).

Os métodos mais comumente utilizados por serem fáceis, rápidos e sensíveis são aqueles envolvendo compostos cromogênicos de um radical natural que simula as espécies reativas de oxigênio (ERO). A presença do antioxidante leva ao desaparecimento desses radicais cromogênicos. Dois radicais muito utilizados para medir a atividade antioxidante são o $ABTS^+$ (2,2’-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) e o DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazil). Ambos apresentam uma excelente estabilidade em certas condições, mas também apresentam importantes diferenças em suas respostas antioxidantes e em sua manipulação (ARNAO, 2000; BRAND-WILLIANS; CUVELIER; BERSET, 1995)

DPPH é um radical livre que é adquirido diretamente sem preparação (pronto para dissolver), enquanto $ABTS^+$ deve ser gerado por reações enzimática ou química. Outra importante diferença é que o $ABTS^+$ pode ser solubilizado em meio aquoso e orgânico, enquanto DPPH pode ser dissolvido somente em meio orgânico (especialmente em meio alcoólico) (BLOIS, 1958; MILLER; RICE-EVANS, 1997; ARNAO; CANO; ACOSTA, 2001). O radical cromogênico $ABTS^+$ apresenta três comprimentos de onda onde sua absorção é máxima em meio aquoso (414 nm, 752 nm e 842 nm) e outros três em meio etanólico (414 nm, 730 nm e 873 nm). DPPH é um radical muito estável que apresenta um pico de absorção a 515 nm (ARNAO, 2000). O radical $ABTS^+$ reage com qualquer composto aromático hidroxilado, independentemente do seu real potencial antioxidante, podendo reagir com grupos-OH que não contribuem com a atividade antioxidante. Ao contrário, DPPH não reage com flavonóides que não apresentem grupos – OH no anel B, bem como, com ácidos aromáticos contendo um único grupo –OH (ROGINSKI; LISSI, 2005).

Pode-se verificar pela estrutura do DPPH (Figura 14), que o composto pode aceitar um elétron ou radical hidrogênio para se tornar uma molécula estável, que apenas raramente pode ser oxidada irreversivelmente (BLOIS, 1958). O radical livre

DPPH• é um cromóforo extremamente estável que apresenta um pico de absorção comprimento de onda de 515 nm em meio metanólico e sua solução possui uma coloração violeta intensa (ARNAO, 2000; BLOIS, 1958). Conforme o DPPH vai sendo reduzido por um antioxidante, seu elétron se torna emparelhado e a absortividade desaparece (BRAND-WILLIANS; CUVELIER; BERSET, 1995).

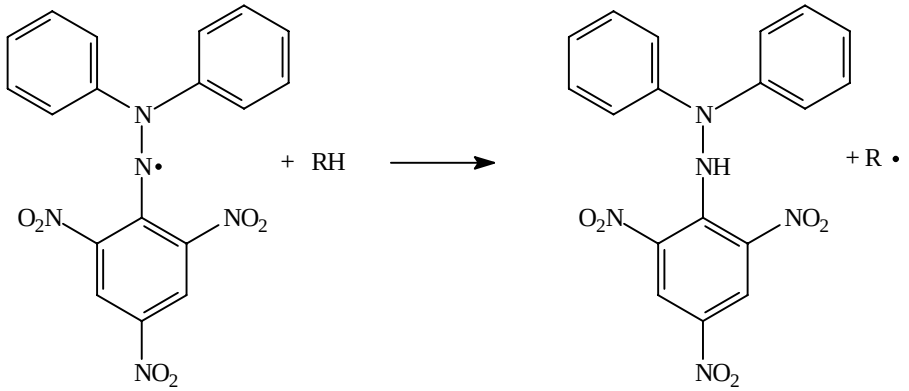


Figura 14 - Reação do radical livre DPPH com uma molécula antioxidante

2.1.6.2 Método direto - Habilidade em inibir a oxidação de lipídeos em sistemas modelo

Em sistemas lipofílicos as taxas de reações de seqüestro podem ser influenciadas pelo coeficiente de partição dos compostos fenólicos entre as fases aquosa e lipídica, e dessa forma, reduzir a reação dos fenólicos polares com o radical não-polar $LOO^{\cdot}$ (RICE-EVANS; NICHOLAS; PAGANGA, 1996). A habilidade em quelar metais e de reagir com o radical α-tocoferol, regenerando-o, são mecanismo possíveis que tornam os flavonóides capazes de aumentar a estabilidade dos ácidos graxos (RICE-EVANS; NICHOLAS; PAGANGA, 1996; SHAHIDI; JANITHA; WANASUNDARA, 1992).

A avaliação de antioxidantes em sistemas modelo deve ser baseada nas mudanças de concentração dos compostos que estão sendo oxidados, na depleção do oxigênio ou na formação de produtos de oxidação. Alguns métodos como o TBARS e Rancimat podem ser citados (BECKER; NISSEN; SKIBSTED, 2004;), apesar de ambos apresentarem algumas limitações.

A proteção relativa proporcionada por diferentes antioxidantes depende do tipo de substrato, por exemplo, fosfolipídeos, triacilgliceróis ou ácidos graxos livres, o grau de insaturação dos ácidos graxos bem como a estrutura do substrato oxidável (FRANKEL; MEYER, 2000). Em sistemas multifases, a eficiência do antioxidante é grandemente afetada pelas propriedades de solubilidade, que determinam a distribuição dos compostos nas diferentes fases, incluindo a localização e orientação. Esta dependência foi observada primeiramente por Porter (1993), que descobriu que antioxidantes solúveis em água tendem a ser mais ativos do que antioxidantes solúveis em lipídeos quando testados em óleo puro. Ao contrário, antioxidantes solúveis em lipídeos tendem a apresentar uma maior proteção para uma emulsão óleo em água do que os antioxidantes solúveis em água. Este fenômeno pode ser chamado de “paradoxo polar” e é baseado na suposição de que o início da oxidação de lipídeos está localizada na interface do sistema. Desta forma, a oxidação do óleo puro, ocorre na interface ar/óleo, onde os antioxidantes hidrofílicos estão concentrados, enquanto a oxidação de emulsões está localizada na interface água/óleo onde os antioxidantes lipofílicos estão localizados (Figura 15) (HUANG, 1996). Lipoproteínas de baixa densidade (LDL) ou lipossomos são frequentemente utilizados como substrato para medir a atividade antioxidante na nutrição humana.

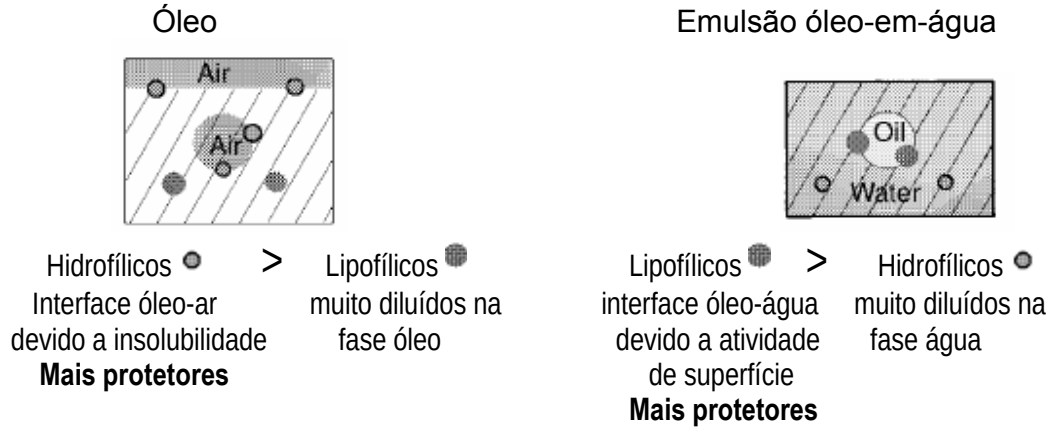


Figura 15 - Distribuição interfacial de antoxidantes lipofílicos e hidrofílicos em óleo comparado a emulsões óleo em água
Fonte: FRANKEL (2000).

A partição de antioxidantes entre as fases óleo e água ocorre em diferentes extensões, de acordo com a polaridade e estrutura química. O conhecimento da partição e efetiva atividade antioxidante de compostos fenólicos naturais, em sistemas heterofásicos, são limitados e governados pela estrutura química destas substâncias.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Coleta das amostras

As amostras de própolis foram obtidas de coletores colocados nas caixas de abelhas *Apis mellifera*, em março de 2005, em um apiário localizado na cidade de Marechal Deodoro, Estado de Alagoas.

2.2.2 Tratamento das amostras de própolis bruta

A amostra de própolis bruta foi limpa retirando-se a poeira, pedaços de madeira, abelhas mortas, traças e qualquer outro tipo de material estranho. Em seguida, foi triturada mediante a adição de nitrogênio líquido, homogeneizada, pesada e armazenada a -18ºC.

2.2.3 Preparo do extrato etanólico da própolis (EEP) para o fracionamento cromatográfico

Para o preparo do extrato etanólico de própolis (EEP) foram pesados 100 gramas de própolis triturada, obtidos conforme o item 2.2.2, e transferido para frasco de vidro contendo 450 mL de etanol P.A (80%). A extração foi à feita a 70ºC, em banho de água termostatizado, por 30 minutos, sob agitação constante. Em seguida foi realizada uma filtração e o sobrenadante, denominado Extrato Etanólico de Própolis (EEP), transferido para um frasco de vidro com tampa de rosca. O EEP obtido foi utilizado no fracionamento cromatográfico da própolis.

2.2.4 Fracionamento cromatográfico da própolis

O EEP teve primeiramente os seus componentes fracionados pela técnica de extração líquido-líquido. A partição em série em funil de separação foi realizada com cada um dos solventes: hexano e clorofórmio. As frações hexânica (fr-Hex) e clorofórmica (fr-Clo) obtidas foram concentradas em rotaevaporador, a 60ºC. Para a

realização do fracionamento em coluna aberta, 8 gramas da fr-Clo concentrada foram redissolvidos em 15 mL de clorofórmio e, em seguida misturados com 10 gramas de sílica gel (G60 Merck 70 – 230 mesh; tamanho de partícula 0,063 – 0,02 mm). Após a completa evaporação do solvente, a fr-Clo foi cromatografada em uma coluna (60 x 4 cm) empacotada com sílica gel e eluída com sistemas de solventes com um aumento crescente de polaridade: clorofórmio, clorofórmio: acetato de etila (8:2), clorofórmio: acetato de etila (5:5), clorofórmio: acetato de etila (2:8), acetato de etila, acetato de etila:etanol 80% (8:2); acetato de etila:etanol 80% (5:5); acetato de etila:etanol (2:8); etanol 80%, obtendo-se um total de 15 subfrações. A coleta das frações foi monitorada com uma lâmpada de ultravioleta a 366 nm. Após isto, foi feita a remoção dos respectivos solventes por meio de rotaevaporador, a 60 ºC, para posterior análise da atividade antioxidante e análise por cromatografia líquida.

2.2.5 Análises físico-químicas do EEP, frações e subfrações

2.2.5.1 Espectrofotometria na região ultravioleta-visível

A determinação do espectro de absorção foi realizada segundo o método descrito por e Park et al. (2000); Ikegaki (2001) e Alencar et al. (2005). Alíquotas do EEP, fr-Hex, fr-Clo e subfrações, na concentração de 90 ppm, tiveram seus espectros de absorção na região UV-visível determinados na faixa de comprimento de onda de 200 a 600 nm, em um espectrofotômetro UV Mini 1240 (Shimadzu Co.).

2.2.5.2 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

As análises de cromatografia em camada delgada foram realizadas em cromatofolhas de silica gel 60 F_{254} (Merck Co.). Uma alíquota de 40 µL do EEP, fr-Hex, fr-Clo e subfrações na concentração de 2000 ppm foi aplicada na placa. O e o tempo de desenvolvimento dos cromatogramas foi de aproximadamente 30 minutos, utilizando-se o sistema acetato de etila: clorofórmio (30:70, v/v), como fase móvel. As cromatoplacas foram visualizadas sob luz ultravioleta, no comprimento de onda de 365 nm, antes e após a revelação com anisaldeíso sulfúrico com aquecimento a 100ºC, por 5 minutos. A

visualização do perfil dos compostos com atividade sequestrante de radical livre foi realizada através do borrifamento de DPPH na concentração 0,5 mM em etanol, sob luz ambiente.

2.2.5.3 – Cromatografia em camada delgada de alta eficiência em fase reversa (CCDAE-FR)

A cromatografia em camada delgada de alta eficiência do EEP, fr-Hex, fr-Clo e subfrações foi realizada de acordo com o método descrito por Park *et al.* (2000) e Alencar *et al*. (2005). Alíquotas de 10 μL na concentração de 1% foram aplicadas em placas RP18 F_{254} S (Merck Co). O tempo de desenvolvimento dos cromatogramas foi de aproximadamente 2 horas, utilizando-se um sistema etanol: água destilada (55:45, v/v), como fase móvel. As cromatoplacas foram visualizadas sob luz ultravioleta, nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm, antes e após a revelação com anisaldeído sulfúrico com aquecimento a 100ºC, por 5 minutos.

2.2.5.4 Teor de Polifénois Totais e Flavonóides

O conteúdo total de polifenóis do EEP, frações e subfrações foi determinado pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteau (Singleton et al., 1999). Este método envolve a oxidação de fenóis por um reagente amarelo heteropoliácido de fosfomolibdato e fosfotungstênio (reagente de Folin-Ciocalteau), e a medida colorimétrica de um complexo azul Mo-W que se forma na reação em meio alcalino (Singleton & Rossi, 1965). Para a determinação de fenólicos totais, uma solução do EEP, frações e subfrações (0,5 mL) foi misturada com 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteau diluído 1:10 e 2,0 mL de Na_2CO_3 4%. A absorbância foi medida a 740 nm depois de duas horas de incubação no escuro a temperatura ambiente. O EEP, frações e subfrações foram avaliadas a concentração final de 200 ug/mL. Os resultados do teor dos de polifenóis totais foram expressos como equivalentes de ácido gálico (mg AG/g).

O conteúdo total de flavonóides no EEP, frações e subfrações foi determinado pelo método de Jurd e Geissman (1965), com algumas modificações. Foi adicionado a

0,5 mL de solução das subfrações, 4,3 mL de etanol 80%, 0,1 mL de $Al(NO_3)_3$ e 0,1 mL de acetato de potássio. Uma série controle foi realizada paralelamente, nesta foi adicionado etanol em substituição ao $Al(NO_3)_3$. Depois de 40 minutos a temperatura ambiente, a absorbância foi medida a 415 nm. As subfrações foram avaliadas a concentração final de 2000 μg/mL. A quantidade total de flavonóides foi calculada como equivalentes de quercetina (mg/g).

2.2.5.5 Cromatografia gasosa com espectrometria de massas (CG-EM)

As análises por CG-EM do EEP e compostos isolados foram realizadas de acordo com o método modificado descrito por Markham *et al*. (1996) e citado por Alencar *et al*. (2004). Alíquotas de 400 μL (10 mg/ml) de cada extrato alcoólico foram colocados dentro de "vials" de vidro e adicionados 1 mL de uma solução etérea de diazometano (CH_2N_2) para a metilação. As amostras foram mantidas em banho de gelo por 4 horas para completa reação de metilação. As amostras metiladas foram injetadas em um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas, equipado com uma coluna capilar CBP5 30 m x 0,25 mm e um detector operando no modo “scanning” (*m/z* 40-400). A programação de temperatura foi 50ºC (0,3 min) a 285ºC (15 min), com um incremento de 6ºC/min. As amostras (0,6 μl) foram injetadas por um auto-injetor, utilizando a técnica de injeção *splitless*. O gás de arraste utilizado foi o hélio (He) com uma vazão de 1,0 mL/min. Os picos dos cromatogramas foram indentificados pela comparação com os dados da literatura e perfis de massa das bibliotecas do equipamento (Wiley 138 and Nist 98).

2.2.5.6 – Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR)

As análises por CLAE em fase reversa das subfrações foram feitas de acordo com o método descrito por Alencar (2002) e Park *et al*. (2004). Quinze microlitros de cada extrato na concentração 1% foram injetados em um cromatógrafo líquido acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos a 260 nm e uma coluna de fase reversa C18 (250 x 4,6 mm) com tamanho de partícula de 5 μm. A fase móvel utilizada foi água/ácido

acético (19:1, v/v) (solvente A) e metanol (solvente B), com vazão constante de 1 mL/min. O gradiente iniciou com 40% do solvente B até 60% de B em 45 minutos, 90% em 60 minutos até 75 minutos, 40% de B em 85 minutos. A coluna foi mantida a uma temperatura constante de 30 ^{o}C e os cromatogramas foram processados utilizando "software" específico. Neste trabalho foram investigados os seguintes padrões autênticos de flavonóides e ácidos fenólicos (Extrasynthese Co.): quercetina, canferol, apigenina, pinocembrina, crisina, acacetina, galangina, canferide, isosacuranetina, sacuranetina, ramnetina, isorramnetina, rutina, ácido gálico, ácido ρ-cumárico, ácido cinâmico e ácido ferúlico.

2.2.5.7 Isolamento dos compostos com atividade antioxidante

As frações que apresentaram atividade antioxidante foram recromatografadas em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) preparativa, utilizando uma coluna preparativa Shimadzu PREP-ODS (H) (250 x 20 mm), para o isolamento dos compostos bioativos. A fase móvel utilizada foi 5% do solvente A (água) e 95% do solvente B (metanol). O gradiente iniciou com 95% do solvente B, 99% de B em 12 minutos até 25 minutos, 95% de solvente B em 26 minutos, com uma vazão constante de 6 mL/min. A detecção foi realizada a 260 nm. Os picos dos compostos eluídos foram recolhidos em um coletor automático de frações (FRC-10A, Shimadzu Co.) acoplado ao sistema de cromatografia.

2.2.6 Avaliação da atividade antioxidante do EEP, frações e subfrações

2.2.6.1 Avaliação da atividade seqüestrante de radical DPPH

A medida da atividade seqüestrante do radical DPPH foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Brand-willians, Cuvelier e Berset (1995). DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazil) é um radical livre estável que aceita um elétron ou um radical hidrogênio para tornar-se uma molécula diamagnética estável e desta forma, é reduzido na presença de um antioxidante. Para avaliação da atividade antioxidante as subfrações

foram reagidas com o radical estável DPPH em uma solução de etanol. Na forma de radical, o DPPH possui uma absorção característica a 517 nm, a qual desaparece após a redução pelo hidrogênio arrancado de um composto antioxidante. A mistura de reação foi constituída da adição de 0,5 mL do EEP, frações ou subfrações, 3 mL de etanol e 0,3 mL da solução do radical DPPH 0,5 mM em etanol. Para cada subfração e substância de referência foi realizado em paralelo, um teste branco com adição de etanol em substituição a solução de DPPH 0,5 mM, para descontar uma possível coloração que pudesse influenciar na interpretação dos resutados. O EEP, fr-Hex, fr-Clo, subfrações e as substâncias de referência (BHT, α-tocoferol e BHA) foram avaliadas na concentração final de 90 μg/mL.

A atividade anti-radical foi determinada na forma de atividade antioxidante (AA), calculada através da taxa de declínio da absorbância da solução de DPPH - subfrações e padrões após 40 minutos de reação (fase estável) em relação à solução referência (DPPH em etanol) de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ Atividade antioxidante} = 100-((A_{amostra}-A_{branco})*100)/A_{controle})$$ onde:

$A_{amostra}$ = absorbância da solução DPPH (amostras)
A_{branco} = absorbância da solução das amostras sem adição de DPPH
$A_{controle}$ = absorbância da solução referência de DPPH (etanol)

2.2.6.2 Avaliação da atividade antioxidante pelo sistema beta-caroteno/ácido linoléico (BCAL)

A medida da atividade antioxidante foi determinada pela oxidação acoplada do beta-caroteno e do ácido linoléico, de acordo com Ahn *et al.* (2004). Foram pesados 10 mg de beta-caroteno, os quais foram dissolvidos em 100 mL de clorofórmio. Após isto, foi retirada uma alíquota de 3 mL da solução clorofórmio – beta-caroteno e adicionada a 40 mg de ácido linoléico e 400 mg de Tween 40. Em seguida, o clorofórmio foi removido com a utilização de uma corrente de gás nitrogênio, e o resíduo obtido redissolvido em

100 mL de água aerada por 30 minutos. Alíquotas de 3 mL da emulsão beta-caroteno/ácido linoléico foram misturadas com 50 μL do EEP, frações ou subfrações. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 470 nm, no tempo inicial e em intervalos de 20 minutos durante 2 horas com incubação a 50 ºC, para a reação de oxidação. A amostra controle continha 50 μL de solvente. A atividade antioxidante foi expressa pela porcentagem de inibição relativa em relação ao controle depois de 120 minutos de incubação, usando a seguinte equação:

$$AA = (R_{Controle} - R_{Amostra})/R_{Controle} \times 100$$

Onde $R_{controle}$ e $R_{amostra}$ representam as taxas de branqueamento do β-caroteno sem e com a adição de antioxidante respectivamente. As taxas de degradação (R_D) foram calculadas de acordo com a primeira ordem da cinética :

$$R_D = \ln(a/b) \times 1 / t$$

Onde ln é o logaritmo natural, *a* a absorbância inicial no tempo 0 e *b* a absorbância depois de 120 min. O EEP, frações, subfrações e compostos puros foram avaliados na concentração final de 200 μg/mL, enquanto as substâncias referência estavam em soluções de 90 μg/mL.

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Coleta das amostras de própolis

As amostras de própolis vermelha foram coletadas de oito cidades da região litoral do estado de Alagoas (Tabela 4). A coleta foi realizada diretamente nos apiários, onde foi feita a identificação de modo que fosse possível o retorno a cada colméia, caso necessário. A caracterização dos extratos etanólicos da própolis (EEP) foi realizada por espectrofotometria de varredura na região UV-Visível (200 - 600 nm), onde foi observada uma grande similaridade das amostras, todas com picos de absorção máxima entre 280 e 283 nm. Os EEP também demonstraram o mesmo perfil químico quando avaliados pela técnica de cromatografia em camada delgada. Desta forma, para se obter um material o mais homogêneo que possível foi escolhido um único apiário como fornecedor de própolis vermelha. A Figura 16 ilustra o aspecto do apiário selecionado como fornecedor de própolis *in natura*, localizado no município de Marechal Deodoro – AL. Na Figura 17 pode-se observar a própolis vermelha *in natura* nos coletores, enquanto que a Figura 18 ilustra o aspecto da própolis vermelha triturada, utilizada no preparo dos extratos utilizados nos ensaios.

Tabela 4 - Localidades de coleta de própolis vermelha no litoral do estado de Alagoas

	Município	**Nº de amostras coletadas**
Litoral Norte	Maragogi, Matriz de Camaragibe, Ipioca (distrito de Maceió) e Paripueira	10
Litoral Sul	Barra de São Miguel, Jequiá da Praia, Coruripe e Marechal Deodoro	15

Figura 16 - Visualização do apiário selecionado como fornecedor de própolis vermelha, localizado no município de Marechal Deodoro- AL

Figura 17 - Aspecto da própolis vermelha in natura nos coletores instalados nas colméias de abelhas Apis mellifera

Figura 18 - Aspecto da própolis vermelha triturada, utilizada nos ensaios

2.3.2 Perfil químico da própolis vermelha obtido por CG-EM

O EEP foi obtido conforme o item 2.2.3, e a análise da composição química por CG-EM possibilitou a identificação de 20 compostos (Tabela 5). Os seguintes compostos foram identificados pela primeira vez em amostras de própolis brasileira: metil-*o*-orsellinato, metil-abietato, medicarpina, homopterocarpina, mesitol e 4',7-dimetoxi-2'-isoflavonol e 7,4´-Diidroxiisoflavona. Pode-se observar a presença de pelo menos 4 isoflavonas nunca antes relatadas, sendo que as isoflavonas homopterocarpina (13), medicarpina, (14) e 4',7-dimetoxi-2'-isoflavonol (16) apresentaram-se como os compostos de maior abundância pela técnica de CG-EM (Figura 19).

Os isoflavonóides são uma subclasse dos flavonóides e possuem uma distribuição limitada na natureza. São compostos intrínsecos das plantas, cuja quantidade depende de fatores como crescimento e base genética. Embora várias plantas sintetizem isoflavonóides, a forma bioativa para o consumo humano está presente em poucos vegetais, que são espécies tipicamente da família das leguminosas (DEWICK, 1996; PETERSON; DWYER, 1998). Desta forma, estes compostos podem ser úteis como marcadores químicos deste novo tipo própolis brasileira.

Tabela 5 - Compostos químicos medidos por CG-EM do EEP da própolis vermelha (RT: tempo de retenção, min)

Número do Pico*	TR	Compostos
1	9.88	Ester dimetílico do ácido butanedioico
2	12.46	Ester dimetílico do ácido hidroxi-butanedioico
3	15.31	m-guaiacol
4	16.82	1-metoxi-4-(1-propenil)-benzeno
5	19.67	Metileugenol
6	21.27	metil-*o*-orselinato
7	23.14	1,2,3-trimethoxi-5-(2-propenil)-benzeno
8	24.21	Metoxieugenol
9	30.26	Éster metílico do ácido hexadecanóico
10	33.38	Éster metílico do ácido 10-octadecenóico
11	36.40	Metil abietato
12	37.11	Ácido benzóico
13	40.41	Homopterocarpina
14	41.39	Medicarpina
15	41.74	2,4,6-trimetilfenol
16	43.79	4’,7-dimetoxi-2’-isoflavonol
17	44.41	7,4´-Diidroxiisoflavona
18	44.86	2H-1-benzopirano-7-ol
19	45.66	2,2,6-beta-trimetil-biciclo(4.3.0)non-9(1)-en-7.alfa.-ol
20	46.37	1,1,2-trimetil-3,5-bis(1-metiletenil)-, (2.alfa., 3.alfa., 5.beta.)-ciclohexano

* Relacionado ao cromatograma apresentado na Figura 19.

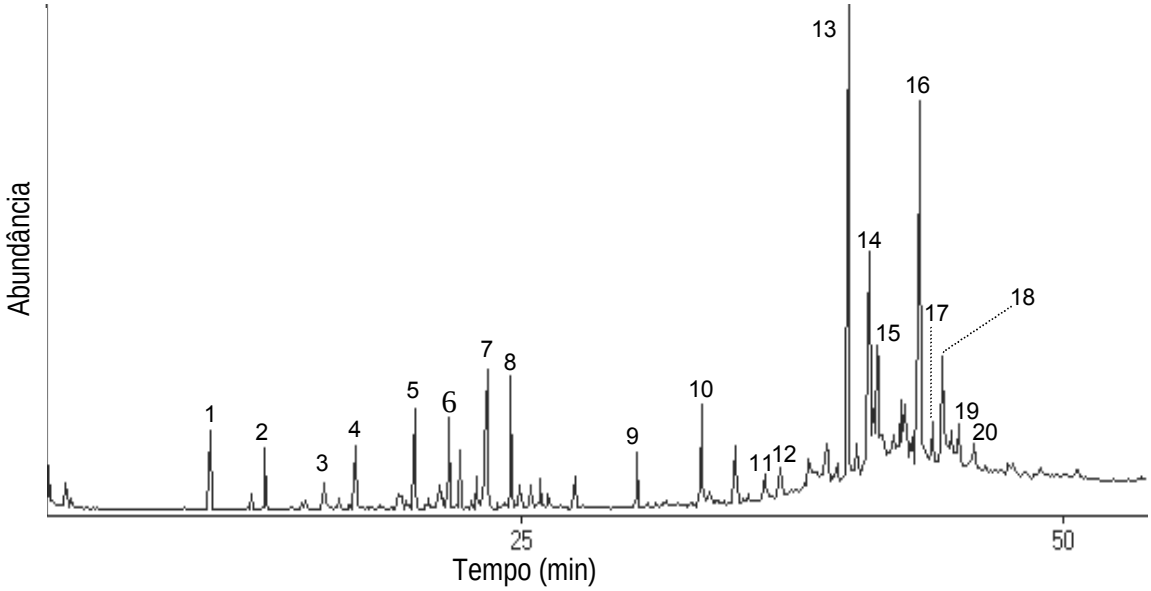


Figura 19 - Perfil químico do EEP da própolis vermelha obtido por CG-EM

A origem botânica da própolis vermelha brasileira tem sido há algum tempo investigada e, agora parece ter sido elucidada. Estudos realizados por Silva et al. (2007), demonstraram que a própolis vermelha possui composição química idêntica à planta *Dalbergia ecasthopyllum*, que é uma leguminosa normalmente encontrada na América tropical e África, rica em isoflavonas. Existem vários trabalhos na literatura demostrando que essas isoflavonas possuem atividade antimicrobiana, antifúngica, anticâncer e antioxidante (SOBY; BATES; VANETTEN, 1997; WANG; WENG; CHENG, 2000; MILITAO, 2005; MILITAO, 2006; RUFER; KULING, 2006).

2.3.3 Fracionamento cromatográfico da própolis vermelha

O esquema do fracionamento do EEP da própolis vermelha, obtido conforme o item 2.2.4, pode ser visualizado na Figura 20. O processo foi iniciado pela extração líquido-líquido, utilizando os solventes hexano e clorofórmio (Figura 21). Este tipo de cromatografia é denominada cromatografia de partição, e a separação dos

componentes ocorre com base nos seus coeficientes de partição entre os solventes imiscíveis (COLLINS; BRAGA; BONATO; 1997). A partir de 100 gramas da própolis bruta foi obtido um rendimento de 58 gramas para o EEP, 11 gramas para a fração hexânica (fr-Hex) e 28,5 gramas para a fração clorofórmio (fr-Clor).

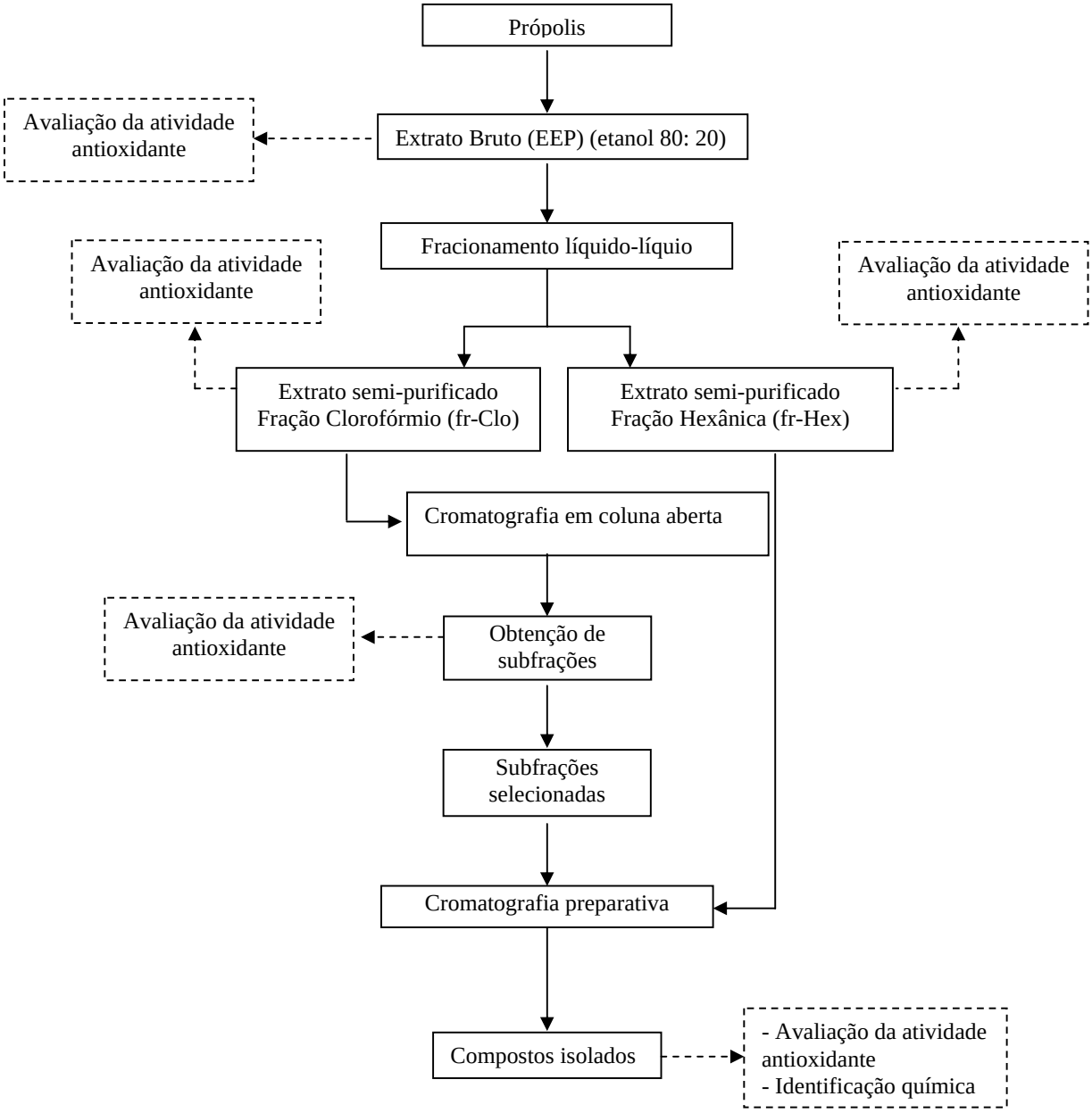


Figura 20 - Fluxograma do processo de fracionamento e isolamento bioguiado de compostos com atividade antioxidante da própolis vermelha

Figura 21 - Aspecto visual do fracionamento líquido-líquido do EEP com os solventes com hexano (A) e clorofórmio (B)

O processo de fracionamento separa compostos com polaridades diferentes e rende frações de diferentes composições e propriedades com atividades farmacológicas individualizadas, diferentes daquelas apresentadas pelo sistema sinérgico inicial (YANG; WANG, 1999). Pelo fato da fração clorofórmica (fr-Clo) ter apresentando alto rendimento (Tabela 6), atividade antioxidante (Figuras 32 e 33) e composição química complexa (Figura 36 C), esta foi selecionada para o fracionamento em coluna aberta de sílica gel G60, utilizando um gradiente crescente de polaridade de solvente, antes do isolamento dos compostos bioativos por CLAE preparativa, conforme descrito no item 2.2.5.6. A fração hexânica (fr-Hex) apresentou um perfil químico com poucos compostos (Figura 36 B) e alta atividade antioxidante (Figuras 32 e 33), e neste caso, o isolamento dos compostos com atividade antioxidante foi realizado diretamente pela injeção da fr-Hex no cromatógrafo preparativo.

A eluição das subfrações da coluna cromatográfica foi monitorada pela mudança de cor e irradiação com luz ultravioleta a 366nm (Figura 22 A e B). Na Figura 22 B pode-se observar a eluição da fração de número 10, de fluorescência vermelha intensa. No total foram coletadas no total 15 subfrações (Figuras 23 e 24). A Tabela 6 apresenta os

solventes utilizados no fracionamento, bem como o rendimento obtido para cada subfração.

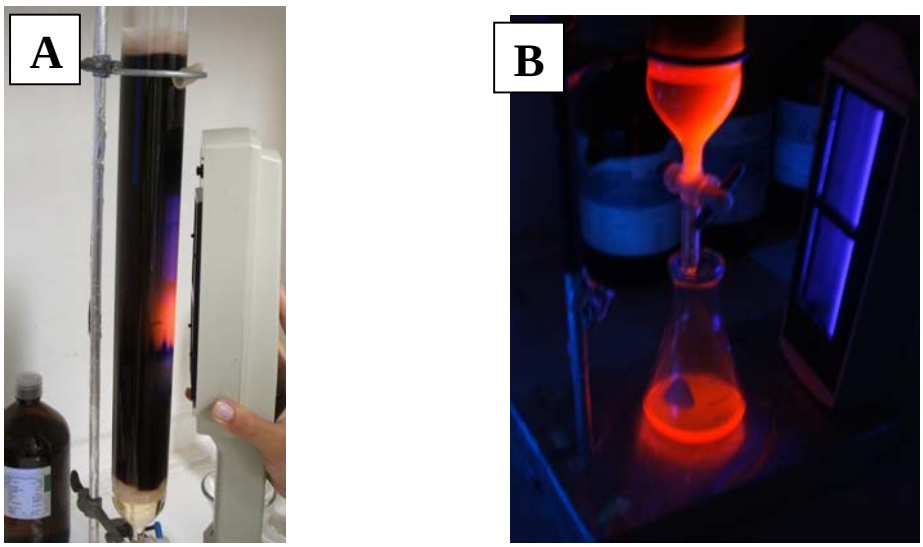


Figura 22 - Monitoramento da coluna cromatográfica por irradiação com lâmpada UV a 366 nm

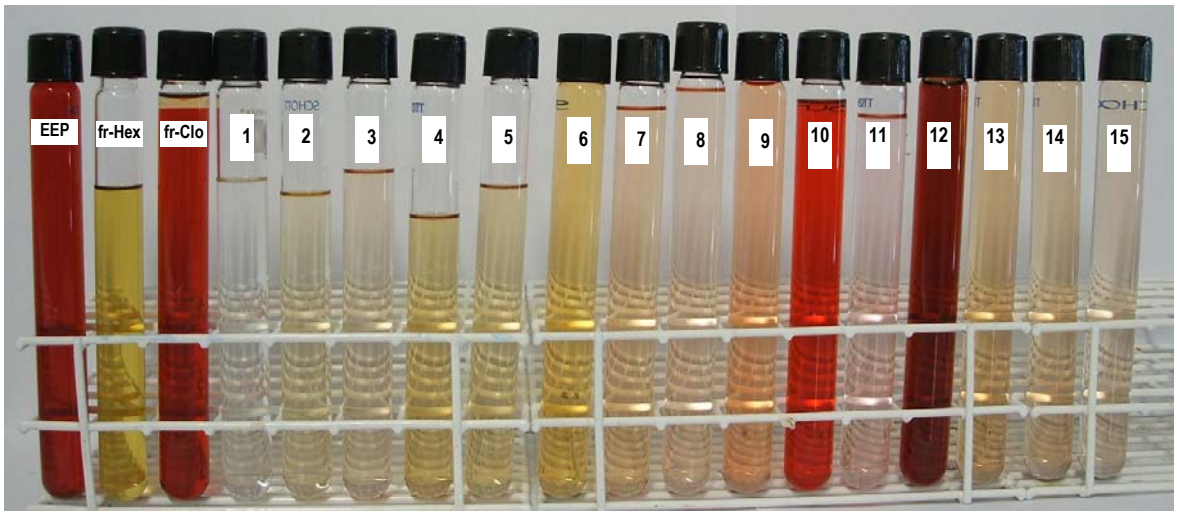


Figura 23 - Aparência do EEP, fr-Hex, fr-Clo e das 15 subfrações (1-15) obtidas a partir da fr-Clo da própolis vermelha do estado de Alagoas

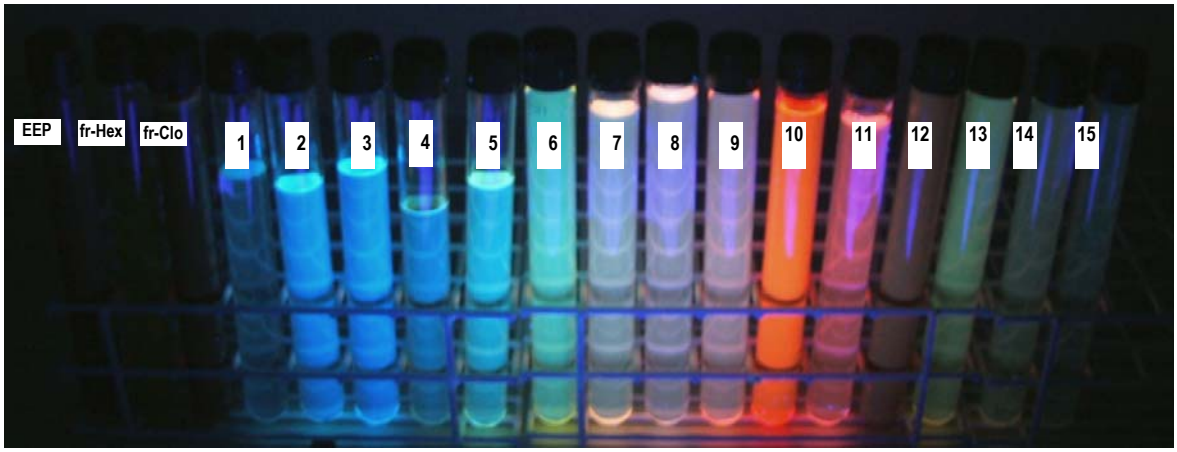


Figura 24 - Aparência do EEP, fr-Hex, fr-Clo e das 15 subfrações (1-15) obtidas a partir da fr-Clo, irradiadas a 366 nm, da própolis vermelha do estado de Alagoas

.

Tabela 6 - Solventes utilizados no fracionamento e rendimento obtido para as subfrações a partir de 8g da fr-Clo

Fração	Solvente	Rendimento (g)
Subfração 01	Clorofórmio 100%	0,04
Subfração 02	Clorofórmio 8:2 acetato de etila	0,45
Subfração 03	Clorofórmio 8:2 acetato de etila	0,89
Subfração 04	Clorofórmio 8:2 acetato de etila	1,53
Subfração 05	Clorofórmio 8 :2 acetato de etila	1,16
Subfração 06	Clorofórmio 5:5 acetato de etila	0,85
Subfração 07	Clorofórmio 5:5 acetato de etila	0,09
Subfração 08	Clorofórmio 5:5 acetato de etila	0,08
Subfração 09	Clorofórmio 2:8 acetato de etila	0,25
Subfração 10	Clorofórmio 2:8 acetato de etila	0,30
Subfração 11	Clorofórmio 2:8 acetato de etila	0,08
Subfração 12	Acetato 8:2 etanol 80%	0,70
Subfração 13	Acetato 8:2 etanol 80%	0,42
Subfração 14	Acetato 5:5 etanol 80%	0,25
Subfração 15	Etanol 80%	0,08

2.3.4 Análises físico-químicas do EEP e frações semi-purificadas

2.3.4.1 Cromatografia em Camada Delgada de alta efciência em fase reversa (CCDAE-FR) e Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

O EEP, fr-Hex, fr-Clo e subfrações foram analisados por CCD e CCDAE-FR, como descrito no item 2.2.5.1 e 2.2.5.2, respectivamente. Com base nestes dois métodos foi possível verificar diferenças entre o EEP, frações e subfrações. As técnicas de cromatografia em camada delgada permitiram uma visualização qualitativa rápida e distinta da composição química das amostras. Na cromatoplaca de CCDAE revelada sob luz UV a 254 nm (Figura 25), pode-se observar diferentes bandas com tonalidades que variaram entre azul claro a azul escuro, que são características de compostos fenólicos, principalmente da classe dos flavonóides (WAGNER; BLADT; ZGAINSKI, 1984).

Quando as cromatoplacas de CCDAE foram reveladas sob luz UV a 366 nm (Figura 26), observaram-se bandas fluorescentes nas cores azul, verde, amarelo, laranja e vermelho intenso, que também são características de flavonóides e que variam de acordo com o tipo estrutural da molécula (WAGNER; BLADT; ZGAINSKI, 1984; MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970). Pela análise das cromatoplacas pode-se observar que o fracionamento promoveu uma purificação do EEP, pois nas diferentes subfrações obtidas pode-se verificar a presença de bandas concentradas ou dstintas da fr-Clo.

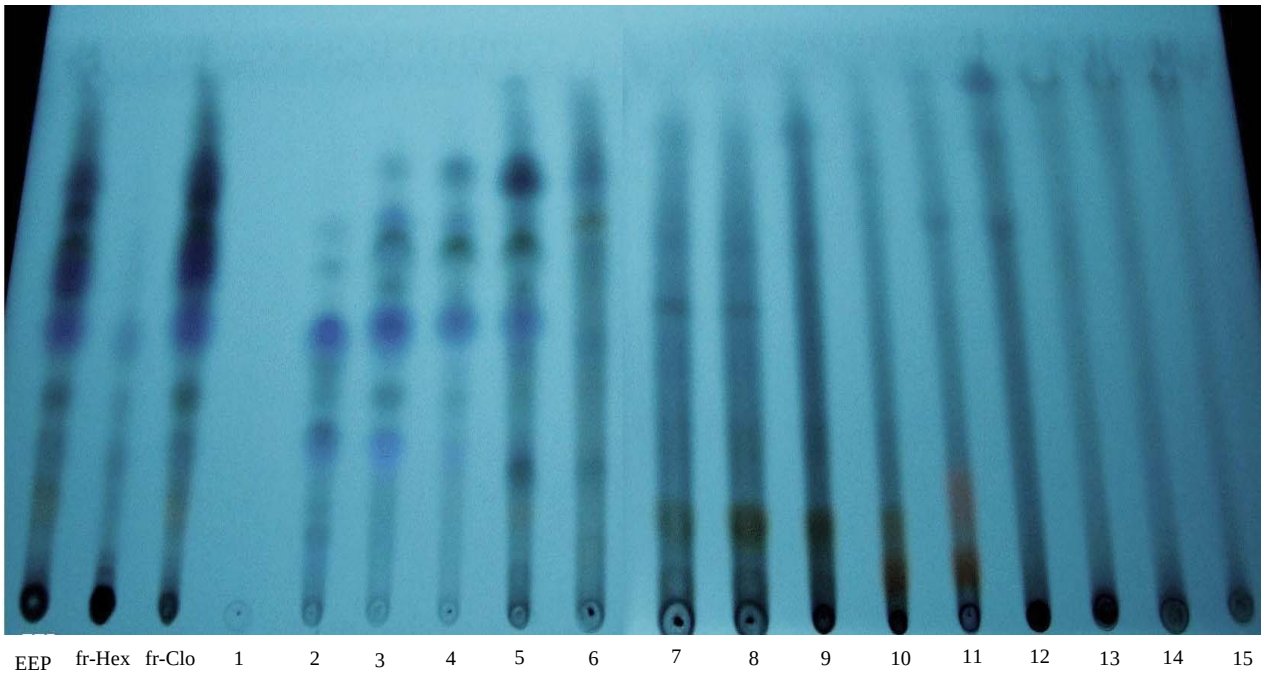


Figura 25 - Cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE), irradiada 254 nm, do EEP, fr-Hex, fr-Clo e das 15 subfrações (1-15) obtidas a partir da fr-Clo, da própolis vermelha do Estado de Alagoas

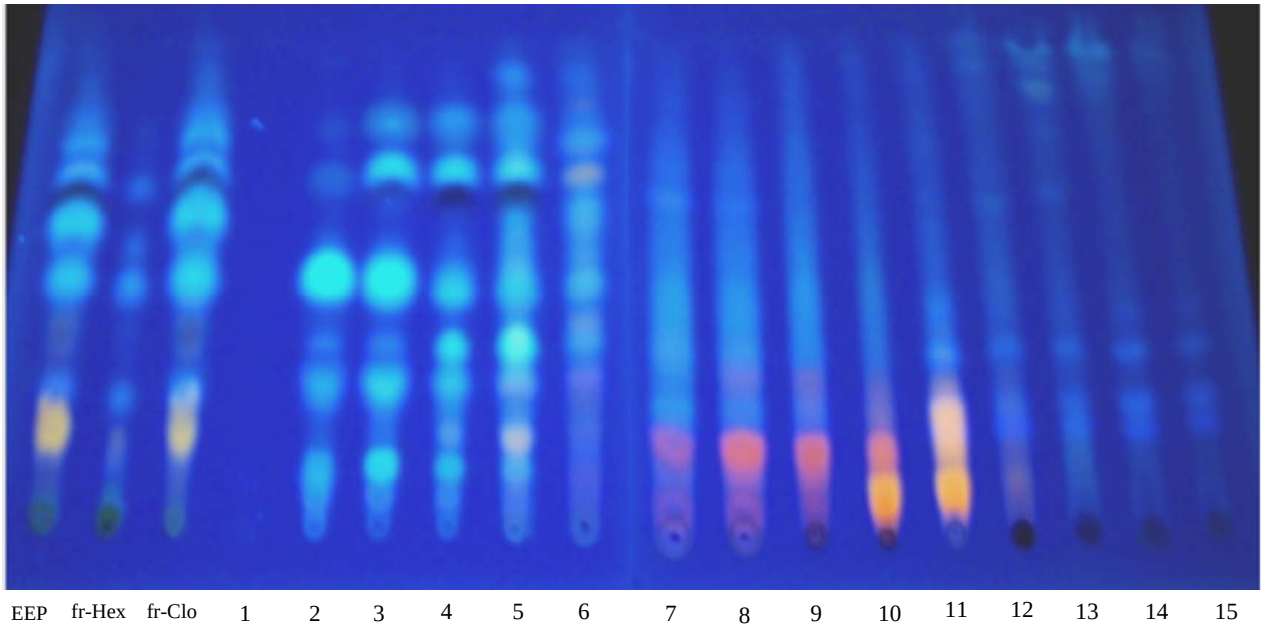
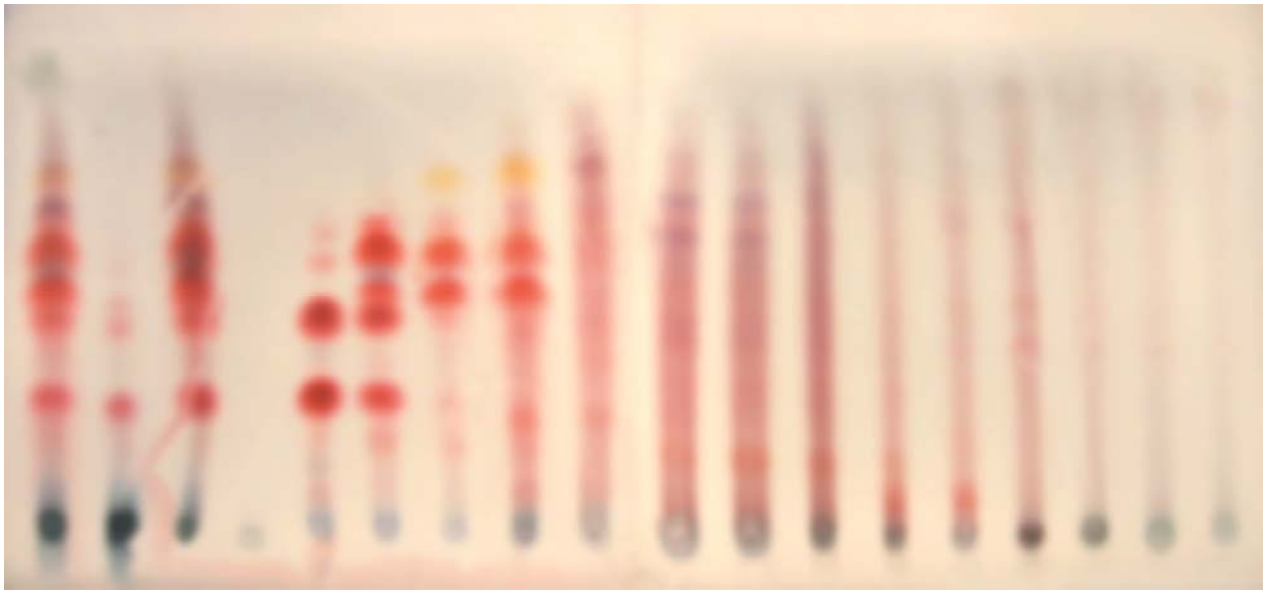


Figura 26 - Cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE), irradiada 366 nm, do EEP, fr-Hex, fr-Clo e das 15 subfrações (1-15) obtidas a partir da fr-Clo da própolis vermelha do Estado de Alagoas

Posteriormente a cromatoplaca de CCDAE foi revelada com anisaldeído sulfúrico (Figura 27), e desta forma, manchas incolores que não absorvem no ultravioleta

puderam ser visualizadas. As bandas apresentaram colorações que variaram entre vermelho, amarelo e amarelo-laranja que são características de terpenos, óleos essenciais e antocianinas (WAGNER; BLADT; ZGAINSKI, 1984). Pode-se observar ainda que as bandas mais reativas ao revelador concentraram-se nas subfrações 2 a 5.

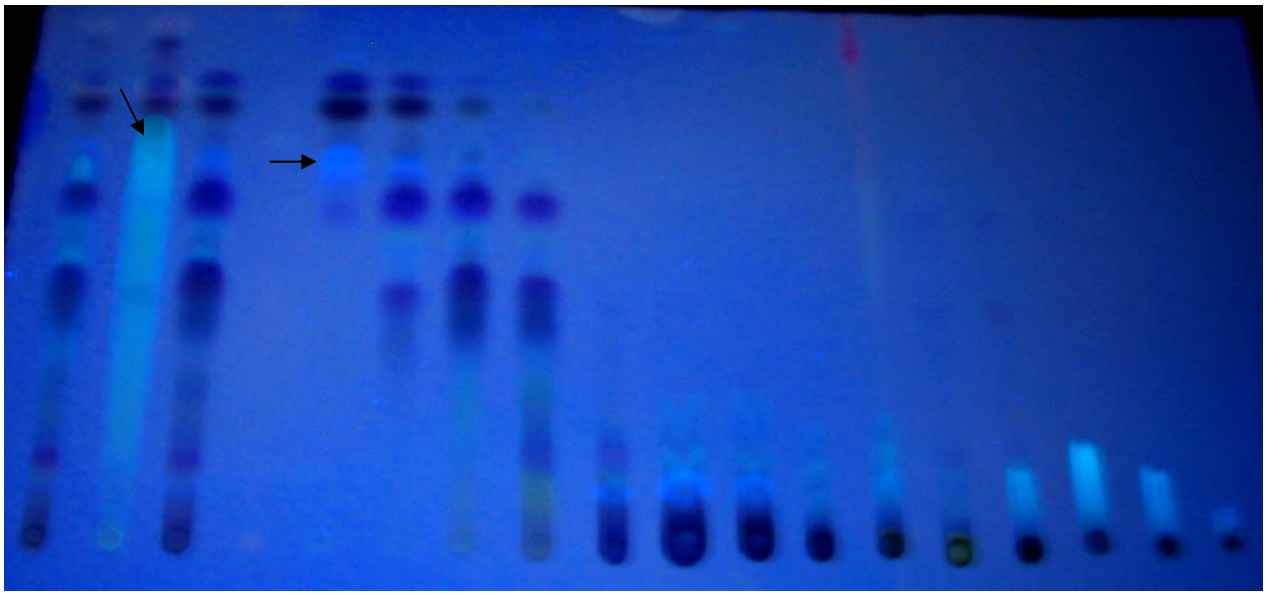


EEP fr-Hex fr-Clo 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

Figura 27 - Cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE), revelada com anisaldeído sulfúrico a quente, do EEP, fr-Hex, fr-Clo e das 15 subfrações (1-15) obtidas a partir da fr-Clo da própolis vermelha do Estado de Alagoas

.

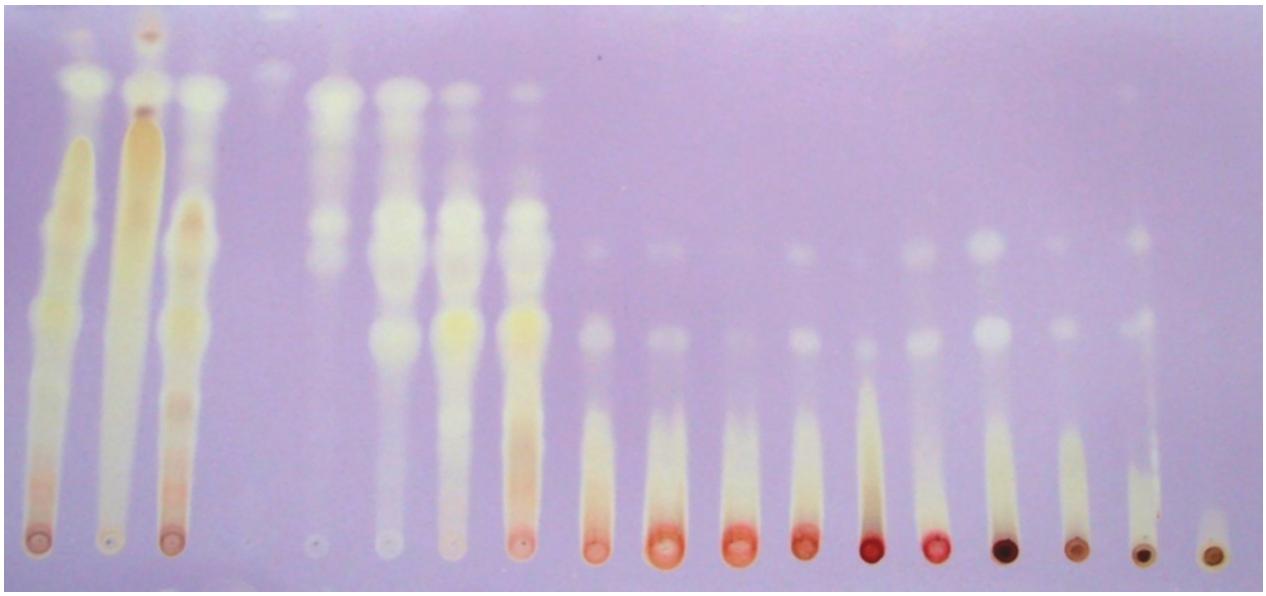
As cromatoplacas de CCD reveladas com anisaldeído sulfúrico a quente e visualizadas sob luz UV a 366 nm estão apresentadas na Figura 28. Quando a placa foi irradiada, pode-se observar a presença bandas fluorescentes de coloração azul intensa, sugerindo mais uma vez a presença de flavonóides. A fr-hex foi a que apresentou a maior concentração de compostos fluorescentes.



EEP fr-Hex fr-Clo 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

Figura 28 - Cromatografia em camada delgada (CCD), revelada com anisaldeído sulfúrico a quente e irradiada a 366 nm, do EEP, fr-Hex, fr-Clo e das 15 subfrações (1-15) obtidas a partir da fração clorofórmica (fr-Clo), da própolis vermelha do Estado de Alagoas

Quando a cromatoplaca de CCD foi revelada com DPPH 0,5 mM (reagente que quando reduzido por um antioxidante torna-se amarelo), pode-se verificar uma coloração amarela intensa na fr-hex em relação ao EEP e a fr-clo, indicando assim a presença de compostos com alta atividade seqüestrante de radical livre (Figura 29).



EEP fr-Hex fr-Clo 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

Figura 29 - Cromatografia em camada delgada (CCD), revelada com DPPH 0,5 mM, do EEP, fr-Hex, fr-Clo e das 15 subfrações (1-15) obtidas a partir da fr-Clo da própolis vermelha do Estado de Alagoas

2.3.4.2 Espectrofotometria na região ultravioleta-visível

Os espectros de absorção na região do UV-Visível, do EEP, frações e subfrações estão ilustrados na Figura 28. Pode-se observar que a absorbância máxima variou de 276 a 284 nm, sendo que as subfrações 13, 14 e 15 não apresentaram picos de absorção. Os compostos fenólicos, de modo geral, apresentam o pico de absorção da luz ultravioleta na faixa de 250 e 350 nm (MARKHAM; THOMAS, 1970). Segundo Mabry; Markham; Thomas, 1970, as classes de flavonóides que normalmente absorvem nos comprimentos de onda entre 281 a 284 nm, comprimentos de onda observados para o EEP, fr-Clo e subfrações, são os isoflavonóides, flavanonas e diidroflavonas. Os espectros de absorção diferentes observados para o EEP, frações e subfrações, demonstram que a técnica de extração líquido-líquido, seguida pela cromatografia em coluna aberta, possibilitaram a purificação e a extração de diferentes compostos ou classe de compostos.

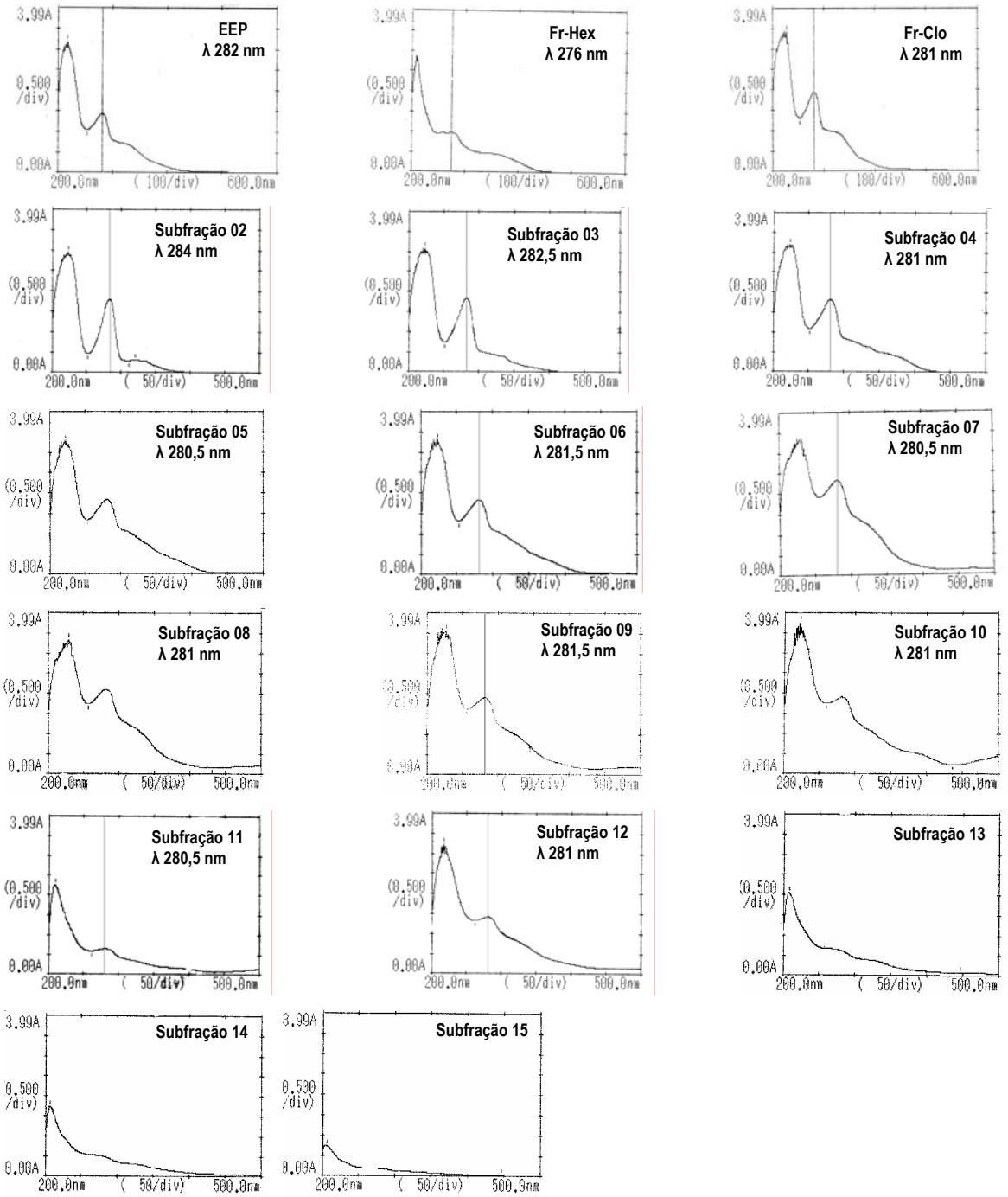


Figura 30 - Espectros de absorção na região UV-visível, do EEP, frações (fr-Hex e fr-Clo) e subfrações da fr-Clo

.

2.3.4.3 Teor de fenólicos totais e flavonóides

O teor de compostos fenólicos totais é frequentemente usado para explicar a atividade antioxidante, entretanto o seu significado é diferente de capacidade e/ou atividade antioxidante. Para se medir a capacidade antioxidante é necessário a extração de compostos fenólicos de efetiva atividade. Em geral, soluções de etanol ou metanol contendo um pouco de água são mais eficientes na extração de compostos fenólicos do que água, etanol ou metanol puros (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1997).

A Tabela 7 apresenta os resultados dos teores de fenólicos e flavonóides totais no EEP, frações e subfrações. A quantidade de compostos fenólicos totais apresentada pelo EEP foi uma das maiores já encontrados para própolis brasileira (231,4 mg/g) enquanto que o teor de flavonóides foi baixo (43 mg/g), quando comparado com outras amostras de própolis, principalmente as das regiões de clima temperado que são ricas em flavonóides (WOISKI; GIESBRECHT; SALATINO, 1998; KUMAZAWA; HAMAZAKA; NAKAYAMA, 2004). Entretanto quando se observa os resultados da fr-Hex, verifica-se que a quase totalidade dos compostos fenólicos presentes (167 mg/g) são compostos da classe dos flavonóides (158 mg/g), possivelmente da classe dos flavonóis ou das flavonas, pois formaram complexos estáveis com o cátion alumínio e puderam ser determinados a 415 nm (WOISKI; GIESBRECHT; SALATINO, 1998). Estes dados corroboram com os resultados obtidos por CCD da figura 28, em que a fr-Hex apresenta uma banda azul fluorescente intensa, característica de compostos fenólicos da classe dos flavonóides.

O fracionamento da fr-Clo possibilitou a obtenção de subfrações que apresentaram um aumento gradativo no teor de compostos fenólicos totais, tendo a subfração 04 a maior concentração (207,2 mg/g) (Tabela 7). Entretanto quando se analisa os flavonóides totais, verifica-se que a subfração 10 foi a que apresentou o maior teor (19 mg/g). A partir da subfração 10 foi observada uma redução progressiva nos teores de fenólicos totais e flavonóides, tendo a subfração 15 as menores

concentrações. Estes resultados demonstram que o fracio namento promoveu uma distribuição diferenciada dos compostos fenólicos nas subfrações.

Tabela 7 - Teor de fenólicos totais e flavonóides do EEP, fr-Hex, fr-Clo e subfrações

	Fenólicos totais (mg/g) [a, b]	Flavonóides (mg/g) [a, c]
EEP	231,4 ± 22,3	43,0 ± 1,0
fr-Hex	167,0 ± 2,2	158,0 ± 0,9
fr-Clo	324,2 ± 4,2	10,0 ± 0,6
Subfração 02	104,0 ± 2,7	0,3 ± 0,2
Subfração 03	171,9 ± 2,7	1,8 ± 0,8
Subfração 04	207,2 ± 4,0	9,9 ± 1,6
Subfração 05	195,6 ± 4,4	10,5 ± 1,0
Subfração 06	147,4 ± 3,2	5,0 ± 0,2
Subfração 07	196,9 ± 4,9	8,3 ± 1,1
Subfração 08	199,6 ± 7,2	8,8 ± 2,0
Subfração 09	193,3 ± 1,2	7,7 ± 1,5
Subfração 10	191,3 ± 2,2	19,0 ± 1,9
Subfração 11	172,2 ± 7,0	10,8 ± 1,4
Subfração 12	166,9 ± 3,6	9,3 ± 0,6
Subfração 13	84,6 ± 0,9	3,9 ± 0,4
Subfração 14	66,7 ± 0,6	0,1 ± 0,9
Subfração 15	37,4 ± 7,5	0,0 ± 0,0

[a] Valor é a média ± o desvio padrão (n = 3)
[b] equivalentes de ácido gálico
[c] equivalentes de quercetina

Apesar do método colorimétrico para a determinação de flavonóides totais, através do nitrato de alumínio, ser rápido e prático, não é um método preciso, pois o efeito batocrômico da absorção causado pelo complexo com alumínio não é uniforme para todos os flavonóides. Isto porque, a formação de quelatos entre o alumínio e os flavonóides ocorre de forma diferente, dependendo do flavonóide (Figura 31). O aumento do grau de hidroxilação do núcleo leva ao aumento do efeito batocrômico e,

conseqüentemente, os espectros deslocam-se no sentido dos maiores comprimentos de onda (JURD; GEISSMAN, 1956). Desta forma, dependendo da composição de flavonóides os resultados podem ser sub ou super estimados.

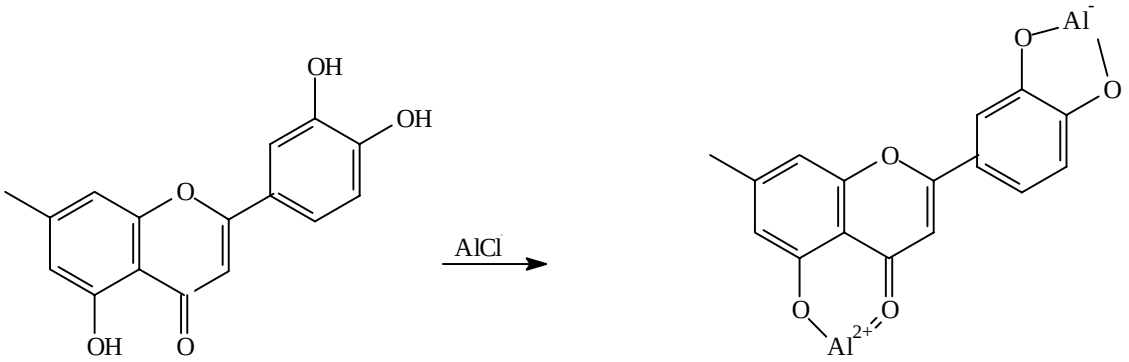


Figura 31 - Formação do complexo flavonóide-alumínio, em solução de cloreto de alumínio
Fonte: Marcucci (1998)

2.3.5 Avaliação da atividade antioxidante do EEP, frações e subfrações.

Os resultados obtidos para o seqüestro do radical livre DPPH para as substâncias referências de elevada atividade antioxidante como o α-tocoferol, BHT, BHA, EEP, frações e subfrações estão apresentados na Figura 32.

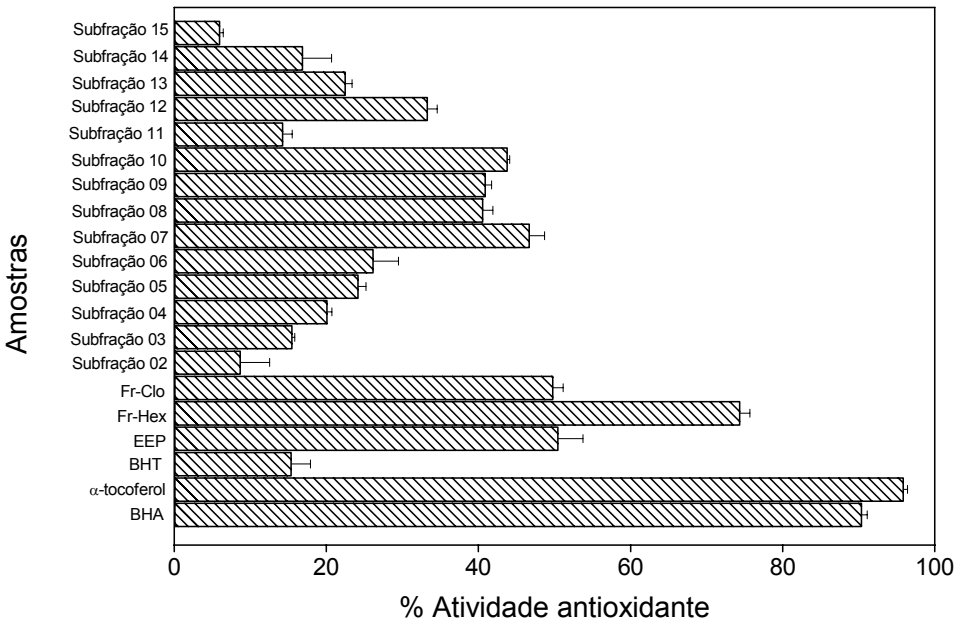


Figura 32 - Atividade seqüestrante do radical livre DPPH pelo α-tocoferol, BHT, EEP, frações e subfrações da própolis vermelha. Médias e desvios padrões estão indicados

Conforme demonstrado na Figura 32, a fração hexânica foi a que apresentou maior atividade de seqüestro do radical livre DPPH (74,4%), seguida pelo EEP (50,5%) e fr-Clo (49,8%). Esses resultados corroboram com os obtidos na figura 29, em que o cromatograma revelado com DPPH apresentou maior intensidade de amarelo para a fr-Hex, e como consequência maior atividade sequestrante. A explicação para uma maior atividade da fr-Hex se deve a purificação do composto bioativo, pois como demonstrado por Brand-Williams; Cuvelier; Berset (1995), a interação de antioxidantes com o DPPH• depende da estrutura conformacional, e por isso, variando-se a composição das amostras, varia-se também a interação dos compostos com o radical livre e a consequente atividade sequestrante.

O resultado obtido da atividade antioxidante para o EEP foi superior aos extratos de amostras de própolis do sul da África, Chile e própolis verde brasileira, os quais apresentaram atividades inferiores a 40% (KUMAZAWA; HAMASAKA; NAKAYAMA, 2004).

As subfrações 7 e 10 foram as que apresentaram as maiores atividades de seqüestro do radical livre DPPH, 46,7% e 43,8%, respectivamente, sendo inclusive estes resultados próximos daquele encontrado para a fr-Clo (49,8%). As demais subfrações tiveram atividades sequestrantes menores do que 40%.

Na Figura 33 estão apresentados os resultados da atividade antioxidante do EEP, fr-Hex, fr-Clo e do padrão α-tocoferol avaliados pelo método do sistema β-caroteno-ácido linoléico. Na avaliação do potencial antioxidante por este método, o β-caroteno sofre ataque dos radicais livres do ácido linoléico, e assim perde suas duplas ligações e conseqüentemente a coloração laranja característica (MARCO, 1968; MILLER, 1971). A principal vantagem do método do sistema beta-caroteno/ácido linoléico é adicionar efetiva oxidação lipídica ao sistema (BECKER; NISSEN; SKIBSTED, 2004).

A Figura 33 demonstra que a fr-Clo foi a fração que apresentou a melhor atividade antioxidante, enquanto a fr-hex e o EEP apresentaram atividades semelhantes. A atividade elevada da fr-Clo pode estar relacionada com a quantidade de compostos fenólicos totais, pois esta foi a amostra que apresentou maior concentração destes compostos (Tabela 7). Apesar da fr-Hex ter apresentado alta porcentagem de seqüestro para o radical livre DPPH (Figura 32) e a maior concentração de flavonóides (Tabela 7), não foi eficiente em inibir a peroxidação lipídica *in vitro* (Figura 33).

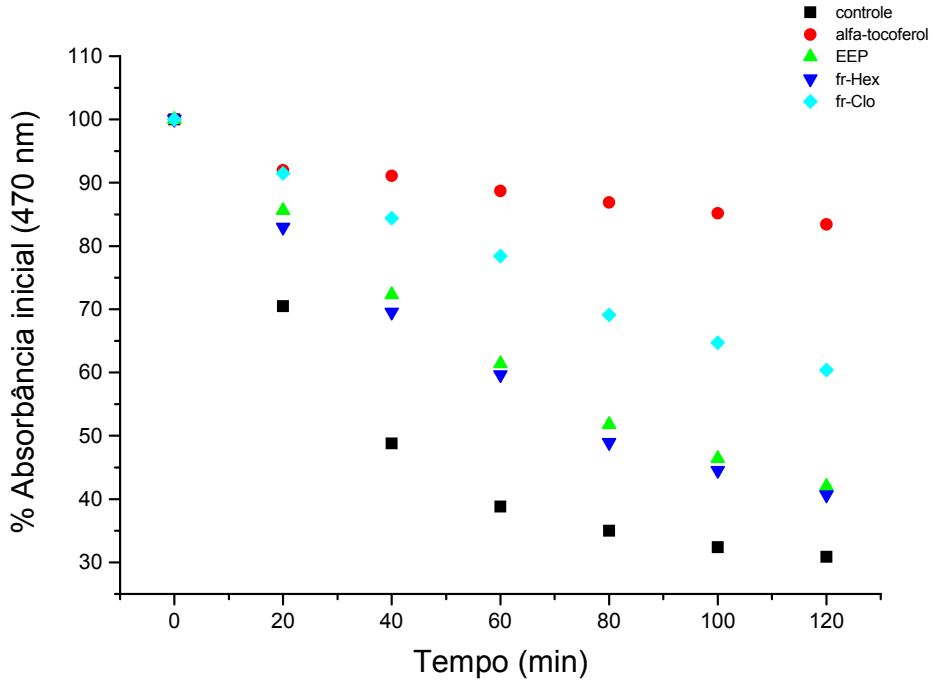


Figura 33 - Atividade antioxidante do α-tocoferol, EEP e frações da própolis vermelha pelo sistema β-caroteno-ácido linoléico

Em sistemas multifases, a eficiência dos antioxidantes é grandemente afetada pelas propriedades de solubilidade, o que determina em parte a sua distribuição na fase, incluindo localização e orientação. Esta dependência foi observada primeiramente por Porter (1993), que descobriu que antioxidantes hidrossolúveis tendem a ser mais ativos que antioxidantes lipossolúveis quando testados em óleo. Ao contrário, antioxidantes lipofílicos tendem a prover uma melhor proteção de uma emulsão óleo em água que os antioxidantes hidrossolúveis. A explicação para este fenômeno, chamado de “paradoxo polar”, é baseado na suposição de que a iniciação da oxidação lipídica está localizada na interface do sistema. Para o óleo, a oxidação ocorre na interface ar/óleo onde os antioxidantes hidrofílicos estão concentrados, enquanto a oxidação em emulsões está localizada na interface água/óleo onde os antioxidantes lipofílicos estão localizados (RICE-EVANS, 1997).

As subfrações 3-10 demonstraram atividade antioxidante superior a 50% (Figura 34), enquanto que as demais subfrações apresentaram uma atividade inferior ou igual a

42%. A subfração 3, apesar de ter demonstrado uma das melhores atividades em inibir a peroxidação lipídica (59,6%), foi uma das subfrações que apresentaram a menor quantidade de flavonóides e também não foi eficiente em seqüestrar o radical livre DPPH. Os resultados obtidos corroboram os encontrados por WANG; LIEN; YU (2004), que ao fracionarem própolis pelo método de extração supercrítica também observaram diferentes intensidades de inibição da peroxidação lipídica das frações.

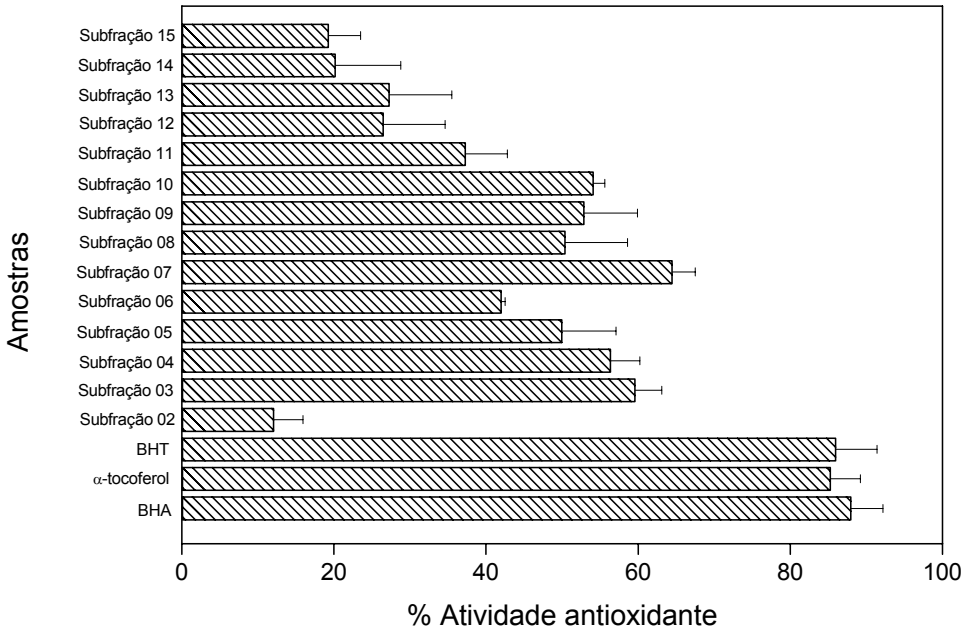


Figura 34 - Atividade antioxidante do BHA, α-tocoferol, BHT e subfrações no sistema β-caroteno-ácido linoléico. Médias e desvios padrões estão indicados (n=3)

A atividade antioxidante determinada pelo teste de seqüestro do radical DPPH (Figura 32), parece não estar relacionada com a atividade determinada pelo método de clareamento do β-caroteno, apresentado nas Figuras 33 e 34. Estas diferenças podem estar relacionadas com o fato de que em sistemas lipofílicos, as taxas de reações de seqüestro podem ser influenciadas pelo coeficiente de partição dos compostos entre as fases aquosa e lipídica, e desta forma, reduzir a disponibilidade dos compostos polares para reação com o radical não-polar $LOO^{\cdot}$ (RICE-EVANS; NICHOLAS; PAGANGA, 1996).

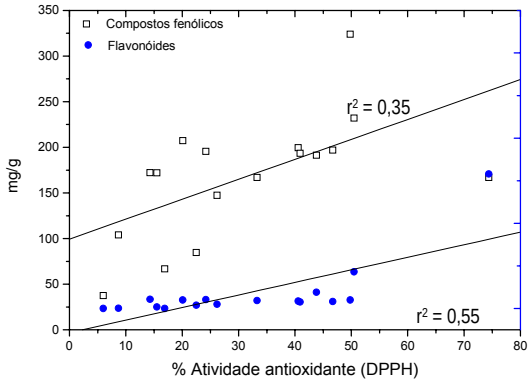
2.3.6 Correlação entre compostos fenólicos totais, flavonóides e atividade antioxidante

A análise da correlação entre a atividade antioxidante do EEP, frações e subfrações e a quantidade de compostos fenólicos, mostrou-se moderada, tanto para o teste de DPPH quanto para o sistema beta-caroteno/ácido linoléico (Tabela 8 e Figura 35). A correlação entre o conteúdo de flavonóides totais e a atividade antioxidante pelo método de DPPH foi positiva e de moderada a forte, entretanto quando o método avaliado foi o sistema beta-caroteno/ácido linoléico, uma correlação negativa foi encontrada para o teor de flavonóides. Isto pode ser explicado pelo fato de que flavonóides solubilizam-se mais facilmente em meios polares, como o etanol utilizado para solubilizar o radical DPPH, do que em meios que possuem as fases aquosa e lipídica (emulsões), como no caso do método da oxidação do ácido linoléico (RICE-EVANS; NICHOLAS; PAGANGA, 1996). Essas correlações indicam que o grupo dos compostos fenólicos (fenóis simples e ácidos fenólicos) possui importante função na atividade antioxidante. Os flavonóides apresentaram-se importantes no teste de DPPH, e não tiveram relação com o teste do BCAL.

Tabela 8 - Análise estatística da correlação entre a atividade antioxidante e os teores de compostos fenólicos totais e flavonóides

CORRELAÇÃO	r [a]	r [2b]
Atividade antioxidante		
DPPH x compostos fenólicos	0,59	0,35
DPPH x flavonóides totais	0,74	0,55
Oxidação do ác. linoléico x compostos fenólicos	0,65	0,43
Oxidação do ác. linoléico x flavonóides totais	- 0,23	0,052

[a] r coeficiente de correlação
[b] r^2 coeficiente de determinação



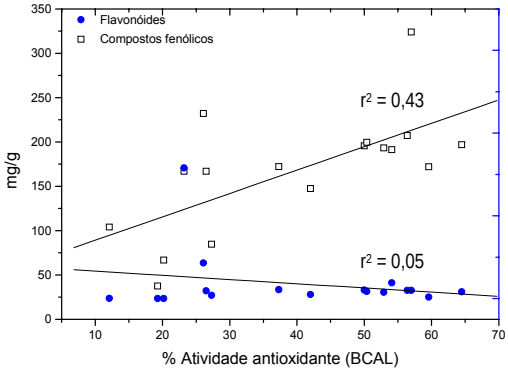


Figura 35 - Correlação entre os teores de fenólicos totais e flavonóides e os métodos de avaliação da atividade antioxidante in vitro (DPPH e BCAL)

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

Nos resultados obtidos por CLAE, somente o flavonol quercetina, a isoflavona daidzeína e o ácido ferúlcio foram identificados no EEP e frações da própolis vermelha (Figuras 36). Entretanto, nenhum dos compostos apresentados como majoritários no comprimento de onda selecionado para fenólicos, puderam ser identificados.

Como pode ser observado na Figura 36 B e C, o processo de fracionamento líquido-líquido produziu duas frações distintas e com um menor número de compostos majoratórios em relação ao EEP (Figura 36 A). A fr-Hex apresentou um cromatograma com poucos picos e, apenas um pico majorotário foi observado no tempo 70 minutos, o que facilitou o isolamento deste pico.

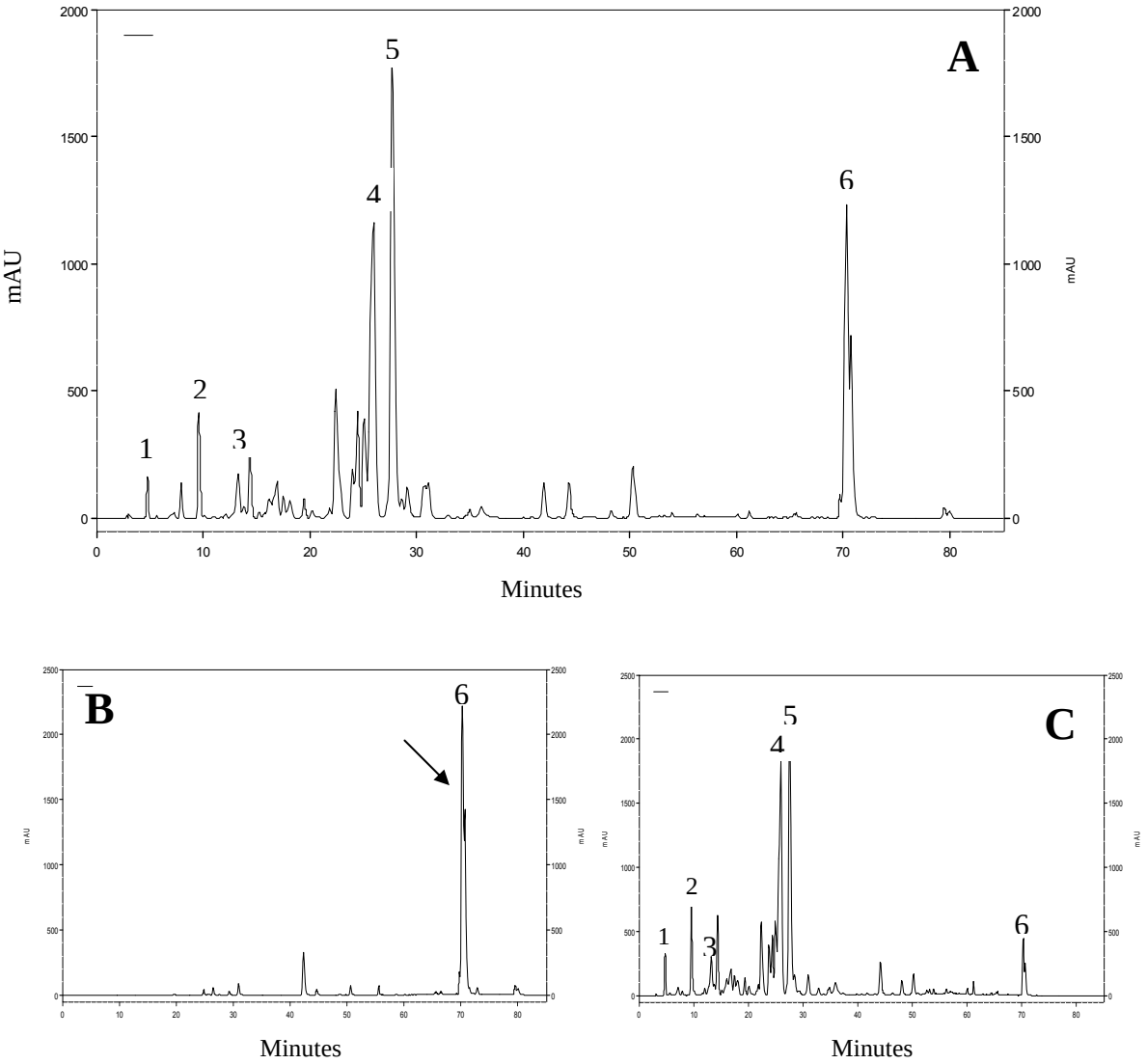


Figura 36 - Cromatogramas do extrato etanólico da própolis vermelha e suas frações. (A) EEP; (B) fr-Hex; (C) fr-Clo. 1, ácido ferúlico (EEP= 7,4 mg/g; fr-Clo= 9,1mg/g) 2, Daidzeina (EEP=4,5 mg/g; fr-Clo=6,2 mg/g); 3, Quercetina (EEP=9,1 mg/g; fr-Clo= 10,1mg/g); 4, UV λ 230, 242, 372 nm; RT=26.2 min; 5, UV λ 243, 323 nm; RT=27.8 min; 6, UV λ 227, 247, 359 nm; RT=70.2 min

Após o fracionamento da fr-Clo, foram escolhidas para análise por CLAE as subfrações que apresentaram o melhor rendimento e as maiores atividades antioxidantes, as quais foram as subfrações 3, 4 e 5. Como pode ser visualizado na Figura 37, o processo de fracionamento em coluna aberta produziu frações distintas e com um menor número de compostos majoratórios em relação a fr-Clo.

O perfil químico encontrado para as subfrações foi parecido, e assim, a subfração 5 por ter apresentado a melhor resposta no teste de inibição da peroxidação lipídica e maior rendimento (Tabela 6) foi escolhida, juntamente com a fração hexânica de alta atividade anti-radical, para o isolamento dos compostos bioativos por CLAE preparativa.

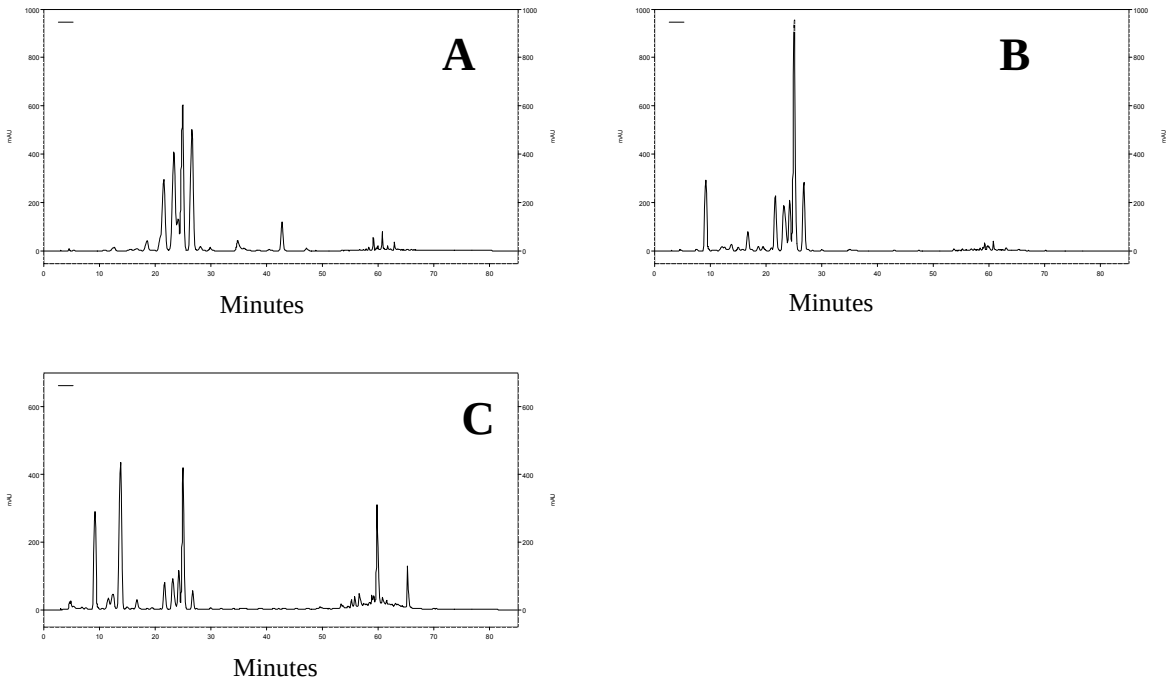


Figura 37 - Cromatograma obtido por CLAE das frações geradas pelo fracionamento da fr-Clo em coluna aberta: subfração 3 (A), subfração 4 (B) e subfração 5 (C)

2.3.8 Isolamento dos compostos bioativos

A partir da fração hexânica e da sub-fração 5 foi realizado o isolamento bioguiado dos compostos com alta atividade antioxidante pela técnica de CLAE

preparativa. A fração hexânica foi escolhida por apresentar a melhor atividade seqüestrante para o radical livre DPPH. Apesar da subfração 7 ter apresentado a melhor atividade contra a peroxidação lipídica (Figura 34), esta apresentou rendimento inferior a 100 mg, tornando assim inviável o isolamento em função da quantidade de material disponível. Sendo assim, a subfração 5 foi escolhida por apresentar boa atividade contra a peroxidação lipídica e rendimento satisfatório (1,16 g) (Tabela 6). Três compostos foram isolados (picos marcados nos cromatogramas) e denominados de composto nº 1, oriundo da fração hexânica (Figura 38 A), composto nº 2 e composto nº 3, originados da subfração 5 (Figura 38 B).

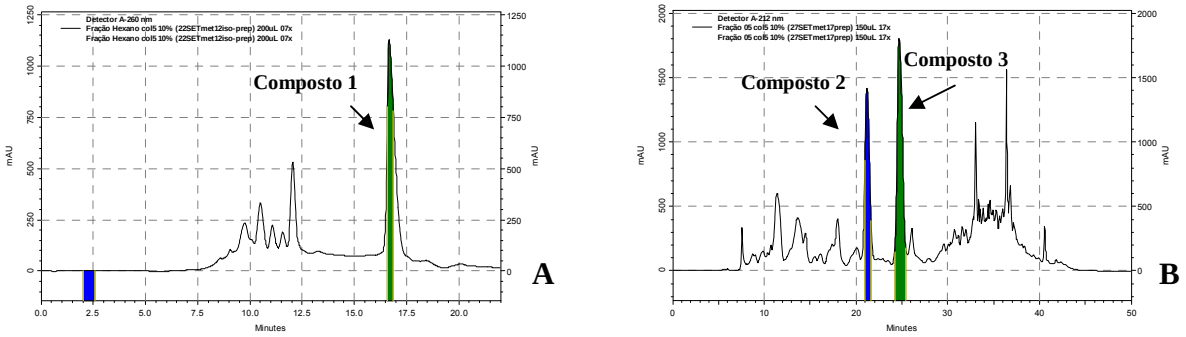


Figura 38 - Cromatogramas de coleta dos compostos das frações por CLAE preparativa: fração hexânica composto 1 (A), subfração 5 – compostos 2 e 3 (B)

Após o isolamento realizado segundo o item 2.2.5.6, os compostos puros foram cromatografados por CLAE, pode-se observar a existência de somente um pico, indicando assim que estavam realmente puros (Figura 39), com exceção do composto 2. Apesar do composto 2 ter apresentado uma pequena contaminação, não foi empecilho para a identificação do composto majoritário.

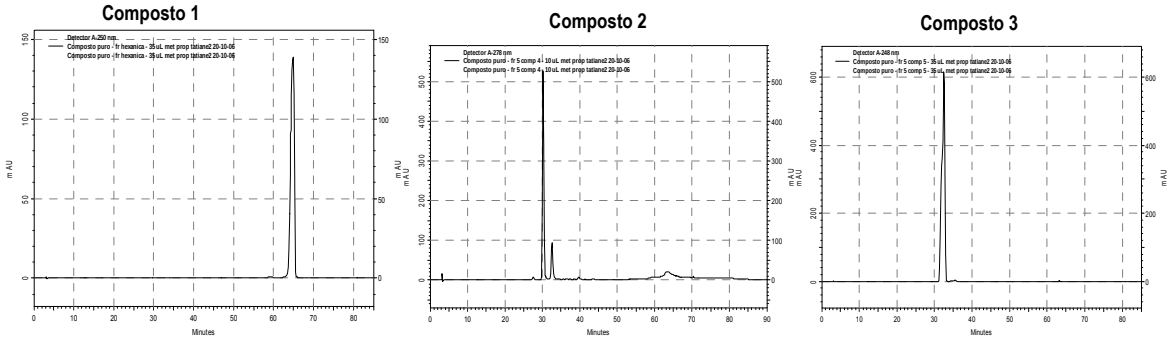


Figura 39 - Cromatograma obtido por CLAE dos compostos isolados da fração hexânica (composto 1) e da sub-fração 5 (composto 2 e composto 3)

2.3.8.1 Avaliação da atividade antioxidante dos compostos isolados

Depois de isolados os compostos tiveram suas atividades reavaliadas, como parte do monitoramento bioguiado. Pelo teste de seqüestro do radical DPPH, o composto 1 apresentou atividade antioxidante de 89,9%, maior do que aquelas observadas para os padrões BHA e BHT e muito próxima daquela encontrada para o padrão α-tocoferol (95,2%) (Figura 40). Os compostos 2 e 3, ao contrário, depois de isolados, tiveram atividade inferior ao da apresentada inicialmente pela subfração 5 (Figura 32), o que pode ser devido a um efeito de sinergismo entre esses compostos para a atividade testada. Entretanto, as atividades dos compostos 2 e 3 ainda foram superiores aquela apresentada pelo padrão BHT (Figura 40).

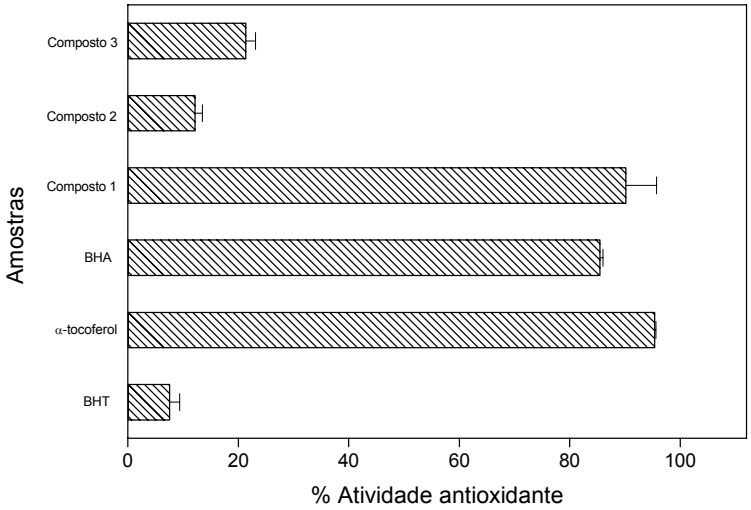


Figura 40 - Atividade antioxidante dos compostos puros pelo teste de seqüestro do radical DPPH. Médias e desvios padrões estão indicados (n = 3)

Quando a atividade antioxidante dos compostos isolados foi avaliada pelo sistema β-caroteno-ácido linoléico, pode-se observar que o composto 2 foi o que apresentou a melhor atividade (39,5%) (Figura 41). Apesar da fração hexânica apresentar uma inibição para a peroxidação lipídica de 23,2 % (Figura 33), o composto isolado desta fração apresentou uma atividade de 35,6% (Figura 41).

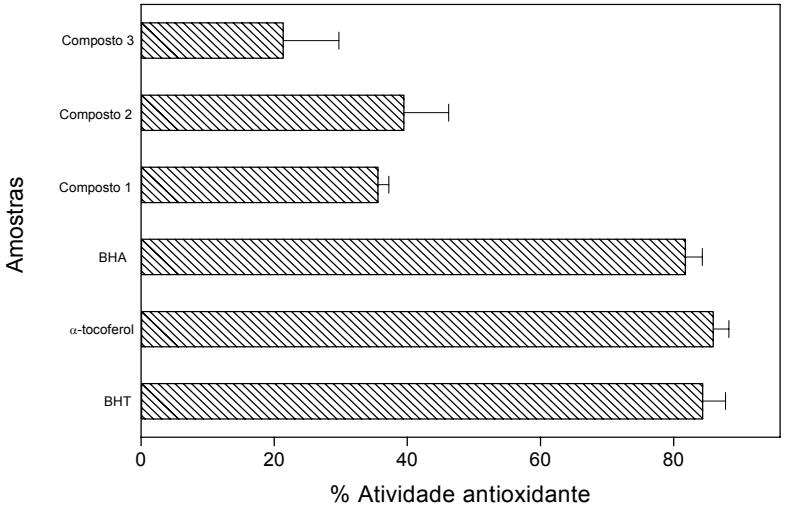


Figura 41- Atividade antioxidante dos compostos puros: pelo sistema β-caroteno-ácido linoléico. Médias e desvios padrões estão indicados (n = 3)

2.3.9 Identificação química dos compostos isolados

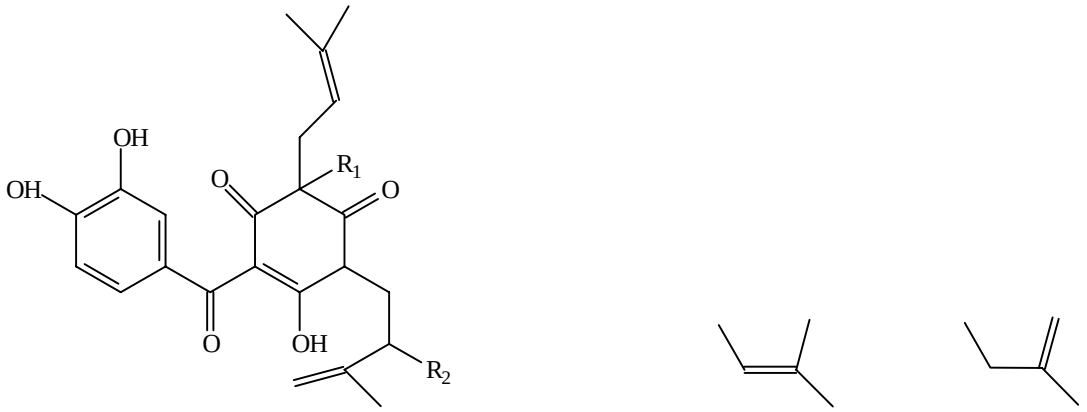
Após o isolamento e análise da atividade antioxidante, os compostos foram encaminhados para a identificação química por CG-EM (cromatografia gasosa acoplado ao espectro de massas). Os dados obtidos para CG-MS e $\lambda_{máx}$ estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Caracterização química por CG/EM (íon molecular e pico base) e absorbância máxima .dos compostos isolados com atividade antioxidante da própolis vermelha

Comp. número	Nome	Tempo de retenção	m/z (%)	$\lambda_{máx}$
1	Isômero *	39,60	466 [18, M^+], 69 (100), 41 (45,3), 327 (32), 109 (25,3)	280
	Isômero *	39,70	466 [18, M^+], 69 (100), 41 (43,1), 327 (36,2), 109 (30)	280
2	2', 7-dihidroxi-4'metoxiisoflavan (vestitol)**	37,78	272 [38, M^+], 150 (100), 137 (31,6), 123 (10,5)	208, 280
3	2', 4' – dihidroxi – 7 metoxiisoflavan **	38,09	272 [38, M^+], 137 (100), 150 (16,7), 121 (15)	211, 278

* Compostos isolados a partir da fr-Hex;
** Compostos isolados a partir da. subfração 5

O composto número 1, isolado a partir da fração hexânica, não foi possível de ser identificado apenas pela técncia de CG/EM, no entanto foi possível saber que se trata de uma mistura de dois isômeros, com peso molecular de 466 g/mol e absorção máxima no UV de 280 nm (Tabela 9). Os espectros de massas apresentaram fragmentações características de benzofenonas preniladas (xantonas), com estrutura semelhante à apresentada na Figura 42.



$C_{23}H_{24}O_6$ C_5H_9 C_5H_9

MM = 396 MM = 69 MM = 69

(Sem considerar os substituintes R_1 e R_2) 3-metil-2-butenil 3-metil-3-butenil

MM = 466 se: R_1 = H e R_2 = C_5H_9 ou R_1 = C_5H_9 e R_2 = H

Figura 42 - Possível estrutura do composto 1 (benzofenonas preniladas), isolado a partir da fração hexânica

Os compostos 2 e 3, isolados a partir da subfração 5, foram identificados como isoflavonóides metilados. Suas estruturas químicas são muito semelhantes, variando apenas na localização dos substituintes hidroxila e metila (Tabela 9 e Figuras 43 e 44). O composto 2, identificado como vestitol, também já foi isolado de um tipo de própolis, cubana (PICCINELLI et al. 2005).

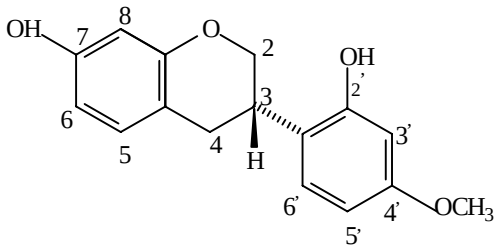


Figura 43 - Estrutura do composto 2 (2', 7-diidroxi- 4'metoxiisoflavan – vestitol), isolado a partir da subfração 5

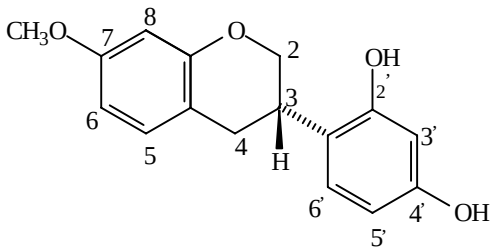


Figura 44 - Estrutura do composto 3 (2', 4' – diidroxi – 7 metoxiisoflavan), isolado a partir da subfração 5

No trabalho realizado por Jin et al. (2005), o isolamento do ácido cafeico fenil éster de própolis foi feito por CLAE preparativa e a identificação realizada por CG/EM. Maciejewicz (2001) também realizou o isolamento de flavonóides agliconas de própolis da Polônia por CLAE preparativa e a identificação pelas técnicas de CG-EM e CCD. Os compostos identificados foram a tectocrisina, pinocembrina, crisina, galangina, apigenina, canferol, piloina, 5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavona e pinostrobina chalcona.

Vários trabalhos já foram realizados para avaliação da atividade antioxidante de isoflavonas. Wang; Weng e Cheng, (2000) e Yu; Wang e Yang, (2007) encontraram atividade antioxidante para isoflavonas, como o vestitol, isoladas de *Dalbergia odorífera T. Chen*.

Estes resultados demonstram a importância da família das leguminosas (que produzem isoflavonóides em resposta a condições de estresse sofrido pela planta), como fonte de resina para a produção de própolis, além de sugerir um grande potencial biológico para a própolis vermelha brasileira. Os isoflavonóides têm sido associados com diversos benefícios para a saúde como a prevenção de doenças cardiovasculares, combate ao colesterol, prevenção de câncer e osteoporose, alívio dos sintomas da menopausa, entre outros (LEE, 2006), sendo ainda possível a utilização como marcadores biológicos.

3 CONCLUSÕES

A própolis vermelha se apresenta como uma importante fonte de compostos que possuem atividades biológicas, sendo uma delas a atividade antioxidante, objeto deste estudo. Neste trabalho foi possível estabelecer as seguintes conclusões, de acordo com os objetivos definidos:

1. A própolis vermelha, como a maioria dos outros tipos de própolis brasileira, possui elevado teor de compostos fenólicos totais e um baixo teor de flavonóides.
2. O fracionamento líquido-líquido e em coluna aberta de sílica-gel possibilitou a obtenção de frações distintas;
3. A atividade antioxidante encontrada para o EEP, frações, subfrações e compostos isolados variaram com os diferentes métodos empregados, demonstrando assim a presença de diferentes classes de compostos bioativos, bem como diferenças dos meios reacionais utilizados;
4. O composto isolado da fração hexânica possui elevada atividade sequestrante para o radical livre DPPH, sendo igual aos controles positivos α-tocoferol e BHA;
5. O isolamento dos compostos por CLAE-preparativa, partindo de frações semi-purificadas, mostrou-se eficaz. Os compostos isolados apresentarem elevada pureza, e desta forma, foi possível a identificação dos mesmos.

REFERÊNCIAS

ABDOLLAHI M.; RANJBAR A.; SHADNIA S.; NIKFAR S.; REZAIE A. Pesticides and oxidative stress: a review. **Medical Science Monitor,** New York, v. 10, n.6, p. 141–147, Jun. 2004.

ACKERMANN, T. Fast chromatographic study of propolis crudes. **Food chemistry,** Barking, v. 42, n. 2, p. 135-138, Nov. 1991.

AGA, H.; SHIBUYA, T.; SUGIMOTO, K.; NAKAJIMA, S. Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry,** Tokyo, v. 58, n. 5, p. 945-946, 1994.

ALENCAR, S. M. **Estudo fitoquímico da origem botânica da própolis e avaliação da composição química de mel de *Apis mellifera* africanizada de diferentes regiões do Brasil**. 2002. 120p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

ALENCAR, S.M.; AGUIAR, C.L.; PAREDES-GUSMÁN, J.; PARK, Y. K. Composição química de *Baccharis dracunculifolia,* fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais. **Ciência Rural,** Santa Maria, v. 35, n. 4, p. 909 - 915, jul./ago., 2005.

Apicultura. Disponível em: http://www.breyer.ind.br/apicultura/apicultura_propolis.htm. Acesso em: 25 ago. 2006.

ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a pratical case**. Trends in Food Science & Technology,** Cambridge**,** v. 11, p. 419-421, 2000.

ASO, K.; KANNO, S. I.; TADANO, T.; SATOH, S.; ISHIKAWA, M. Inhibitory effect of propolis on the growth of human leukemia U937**. Biological & Pharmaceutical Bulletin,** Tokyo, v. 27, n. 5, p. 727-730, May. 2004.

BANKOVA, V. S., CASTRO, S. L., MARCUCCI, M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie,** Paris, v. 31, n.1, p. 3 -15, Jan/Feb. 2000.

BANKOVA, V.; POPOVA, M.; BOGDANOV, S.; SABATINI, A.G. Chemical composition of European própolis: expected and unexpected results. **Zeitschrift fur Naturforschung,** Tubingen, v. 57c, p. 530-533, 2005.

BANKOVA, V.; POPOV, S.; MAREKOV, N. L. Isopentenyl cinnamates from poplar buds and propolis. **Phytochemistry**, Oxford, v. 28, n. 3, p. 871-873, Aug. 1989.

BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; KUJUMGIEV, A.; MARCUCCI, M. C.; POPOV, S. Chemical composition and antibacterial activity of brazilian propolis. **Zeitschrift fur Naturforschung,** Tubingen, v. 50c, n. 2, p. 167-172, 1995.

BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; PRASAIN, J. K. Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic ctivities. **Journal of Natural Products**, Pittsburgh, v. 61, n. 7, p. 896-900, 1998.

BECKER, E. M.; NISSEN, L. R.; SKIBSTED, L. H. Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. **European Food Research Technology**, Berlin, v. 219, p. 561–571, oct, 2004.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W. Lipids. **Food chemistry**, Berlin, Springer Verlag, 1987.

BLOIS, M. S. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. **Nature,** Paris, v. 26, p. 1199–1200, 1958.

BORS, W.; MICHEL, C. Antioxidant capacity of flavanols and gallate esters: pulse radiolysis studies. **Free Radical Biology and Medicine,** New York, v. 27, n. 11/12, p. 1413-1426, 1999.

BRAND, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **LWT - Food Science and Technology,** London, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. **Food and Chemical Toxicology**, London, v. 36, n. 4, p. 347-363, Apr. 1998.

CARVALHO, S. M. **Toxicidade de produtos fitossanitários utilizados na cultura de citros a operárias de *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae)**. 2006. 72 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

CHEN, C. N.; WU, C. L.; SHY, H. S.; LIN, J.K. Cytotoxic Prenylflavanones from Taiwanese Propolis. **Journal of Natural Products**, Pittsburgh, v. 66, n. 4, p. 503-506, 2003.

CHEN, D. F.; ZHANG, S. X.; CHEN, K.; ZHOU, B. N.; WANG, P.; COSENTINO, L. M.; LEE, K. H. Two new lignans, interiotherins A and B, as anti-HIV principles from Kadsura interior. **Journal of Natural Products**, Pittsburgh, v. 59, n. 11, p. 1066-1068, 1996.

CHO, H.; TORII, M.; KANAMORI, T.; Patente No. JP 63264516 **1987**.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules**. Nature Publishing Groups**, Paris, v. 432, p. 829 – 837, Dec. 2004.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos.** 7. ed. Campinas: UNICAMP, 1997. 279p.

CUNHA, I. B. D. S.; SALOMAO, K.; SHIMIZU, M.; BANKOVA, V. S.; CUSTODIO, A. R.; DE CASTRO, S. L.; MARCUCCI, M. C. Antitrypanosomal activity of Brazilian Propolis from *Apis mellifera*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin,** Tokyo, v. 52, n. 5, p. 602-604, 2004.

DENISOV, E. T.; AFANAS EV, I. B. **Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology**. Boca Raton: CRC Taylor & Francis Group, 2005. 981p.

DEWICK, P. M. The biosynthesis os shikimate metabolites. **Natural Products Report**. Cambridge, v. 15, n. 1, p. 15-58, 1998.

DUARTE, S.; KOO, H.; BOWEN, W. H.; HAYACIBARA, M. F.; CURY, J. A.; IKEGAKI, M.; PARK, Y. K.; ROSALEN, P. L. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of mutans streptococci. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 26, n. 4, p. 527-531, Apr. 2003.

FAOSTAT. **Key statistics of food and agriculture external trade.** Disponível em: http://www.faostat.org/es/ess/toptrade/trade.asp. Acesso em: 15 dez. 2005.

FRANKEL, E. N.; MEYER, A. S. Review. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 80, p. 1925-1941, 2000.

GARCIA-VIGUERA, C., GREENAWAY, W., WHATLEY, F. R. Composition of propolis from 2 different Spanish regions. **Zeitschrift fur Naturforschung C**, Wiesbaden, v. 47, n. 7/8 p. 634-637, 1992

GHISALBERTI, E. L. Própolis: a review. **Bee World**, Benson, v.60, n. 2, p. 59-84, 1979.

GONÇALVES, L. S. 50 Anos de abelhas africanizadas no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 16, 2006, Aracaju. Anais... Aracaju, 2006. 1 CD-ROM.

GUIMARÃES, N. P. **Apicultura**: a ciência da longa vida. Belo Horizonte: Itatiaia, 1989. 155p.

HALLIWELL, B. Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward? **Cardiovascular Research,** London, v. 47, n. 3, p. 410–418, Aug. 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford: Clarendon Press, 1990. 543 p.

HALLIWELL, B., MURCIA, M. A., CHIRICO, S., ARUOMA, O. I. Free radicals and antioxidants in food and *in vivo:* what they do and how they work. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition***,* Cleveland, v.35, n.1/2, p.7-20, 1995.

HARBORNE, J. B. **Phytochemical methods.** London: Champman and Hall, 1973. 295 p.

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

HAYACIBARA, M.; KOO, H.; ROSALEN, P. L.; DUARTE, S.; FRANCO, E. M.; BOWEN, W. H.; IKEGAKI, M.; CURY, J. A. *In vitro* and *in vivo* effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 101, n. 3, p.371-376, Oct. 2005.

HUANG, S. W.; HOPIA, A.; SCHWARZ, K., FRANKEL, E. N.; GERMAN, J. B. Antioxidant activity of α – tocoferol and Trolox in different lipid substrates: bulk oils vs. oil-in-water emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 44, p. 444- 452, 1996.

IKEGAKI, M. **Determinação de qualidade de propolis de *Apis mellifera* africanizada da região sul do Brasil: avaliação de algumas propriedades físico-químicas e biológicas da própolis**. Campinas, 2001, 74p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2001.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E PESQUISA - IBGE. **Levantamento sistemático da produção agrícola – LSPA 2004**. Disponível em http://www. ibge. gov. br. Acesso em: 2 dez. 2005.

ISHIKAWA, M.; KANNO, S.; ASOU, K.; OGINO, M.; TADANO, T.; SATOU, S. Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by Propolis. **Journal of Pharmacological Sciences,** Tokyo**,** v**.** 94, p. 129-129, 2004.

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

JOHNSON, K. S.; EISCHEN, F. A.; GIANNASI, D. E. Chemical-compositing of North-American bee propolis and biological-activity towards larvae of greater wax moth (*Lepidoptera, Pyralidae*). **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 20, n. 7, p. 1783-1791, Jul. 1994.

JURD, L.; GEISSMAN, T. A. Absorption spectra of metal complexes of flavonoid compounds. **Journal of Organic Chemistry,** Baltimore, v. 21, n. 12, p. 1395-1401, Jun. 1956.

KHAYYAL, M. T.; ELGHAZALY, M. A.; ELKHATIB, A. S. Mechanisms involved in the antiinflammatory effect of propolis extract. **Drugs under Experimental and Clinical Research**, v. 19, n. 5, p. 197-203, 1993.

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

KOO, H.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; SATTLER, A. Effect of *Apis mellifera* propolis from two brazilian regions on caries development in desalivated rats. **Caries Research**, Basel, v. 33, n. 5, p. 393-400, Sep./Oct. 1999**.**

KOO, H.; SMITH, A. M. V.; BOWEN, W. H.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; PARK, Y. K. Effects of *Apis mellifera* propolis on the activities of Streptococcal glucosyltransferases in solution and adsorbed onto saliva-coated hydroxyapatite. **Caries Research**, Basel, v. 34 n. 5, p. 418-426, Sep./Oct. 2000.

KOO, H.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; AMBROSANO, G. M. B.; MURATA, R. M.; YATSUDA, R.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M.; PARK, Y. K. Effect of a new variety of *Apis mellifera* propolis on mutants *Streptococci*. **Current Microbiology,** New York, v. 41, n. 3, p. 192-196, 2000.

KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins**. Food Chemistry**, Barking, v. 84, n. 3, p. 329-339, Feb. 2004.

KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, Y.; BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 64, n. 3, p. 235-240, Mar.1999.

LEE, K. W.; LEE, H. J. Biphasic effects of dietary antioxidants on oxidative stress-mediated carcinogenesis. **Mechanisms of Ageing and Development**, Baltimore, v. 127, n. 5, p. 424–431, May, 2006.

LOPES, R. M., OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; PINTO, A. S. Flavonóides. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 17, p. 18-22, 2000.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The systematic identification of flavonoids**. Berlin:Springer-Verlag, 1970. 354p.

MACHEIX, J.J.; SAPIS, J. C.; FLEURIET, A. Phenolic compounds and polyphenoloxidase in relation to browning in grapes and wines. **Critical Review Food Science Nutrition,** Oxford, v. 30, n. 1, p. 441-486, 1991.

MACIEJEWICZ, W. Isolation of flavonoids aglynones from propolis by a column chromatography method and their identification by GC-MS and TLC methods. **Journal Liquid Chromatography and Related Technologies,** Paris, v. 24, n.8, p. 1171-1179, 2001.

MANN, J.; DAVIDSON, S.; HOBBS, J.; BANTHORPE, D. **Natural products:** their chemistry and biological significance. Longmann: Harlow, 1994. 455 p.

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

MARCUCCI, M. C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**, São Paulo, v. 19, n. 5, p. 529-536, 1996.

MARCUCCI, M. C.; FERRERES, F.; GARCIA-VIGUERA, C.; BANKOVA, V. S.; DE CASTRO, S. L.; DANTAS, A. P.; VALENTE, P. H. M.; PAULINO, N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 74, n. 2, p. 105-112, Feb. 2001.

MARKHAM, R. K.; MITCHELL, K. A.; WILKINS, A. L.; DALDY, J. A.; LU, Y. HPLC and GC-MS identification of the major organic constituints in new Zealand propolis. **Phytochemistry**, Oxford, v. 42, n. 1, p. 205-211, May. 1996.

MARINOVA, E. M., YANISHLIEVA, N. V. Inhibited oxidation of lipids II: Comparison of the antioxidative properties of some hydroxy derivatives of benzoic and cinnamic acids. **Fett-Wissenschaft Technologie***,* Leinfeldem-Echterdingen, v.94, n.11, p.428-432, 1992.

MILITAO, G. C. G.; JIMENEZ, P. C.; WILKE, D. V.; PESSOA, C.; FALCAO, M. J. C.; LIMA, M. A. S.; SILVEIRA, E. R.; DE MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V. Antimitotic properties of pterocarpans isolated from Platymiscium floribundum on sea urchin eggs. **Planta Medica**, Sttutgart, v. 71, n. 7, p. 683-685, Jul. 2005.

MILITAO, G. C. G.; DANTAS, I. N. F.; PESSOA, C.; FALCAO, M. J. C.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A. S.; CURI, R.; LIMA, T.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V. Induction of apoptosis by pterocarpans from Platymiscium floribundum in HL-60 human leukemia cells. **Life Sciences,** Amsterdan v. 78, n. 20, p. 2409-2417, Apr. 2006.

MILLER, N. J.; RICE-EVANS, C. A. Factors infuencing the antioxidant activity determined by the $ABTS^+$ radical cation assay. **Free Radical Research**, London, v. 26, p. 195–199, 1997.

MONTPIED, P.; DE BOCK, F.; RONDOUIN, G.; NIEL, G.; BRIANT, L.; COURSEAU, A. S.; LERNER-NATOLI, M.; BOCKAERT, J. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) prevents inflammatory stress in organotypic hippocampal slice cultures**. Molecular Brain Research**, Amsterdam, v. 115, n. 2, p. 111-120, Jul. 2003.

MURATA, R. M.; KOO, H.; GONCALVES, R. B.; CURY, J. A.; YATSUDA, R.; ROSALEN, P. L. Antimicrobial potential of propolis from brazilian regions against periodontopatogenic microorganisms. **Journal of Dental Research,** Chicago, v. 82, p. 234-234, 2003.

NAGAI, T.; INOUE, R.; INOUE, H.; SUZUKI, N. Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. **Food Chemistry,** Barking, v. 80, n. 1, p. 29-33, 2003.

NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagens in food. **Journal of Nutrition**, Boca Raton, v.29, n.4, p. 273-300, 1990.

NEGRI, G.; SALATINO, M. L. F.; SALATINO, A. “Green propolis”: unreported constituents and a novel compound from chloroform extracts. **Journal of Apicultural Research,** London, v. 42, n. 3, p. 39-41, 2003.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Products Report,** Cambridge, v. 17, p. 215-234, 2000.

NEWMAN D. J.; CRAGG, G. M.; HOLBECK, S.; SAUSVILLE, E. A. Natural products and derivatives as leads to cell cycle pathway targets in cancer chemotherapy. **Current Cancer Drug Targets,** New York, v. 2, p. 279-308, 2002.

OZGUNER, F.; ARMAGAN, A.; KOYU, A.; CALÝSKAN, S.; KOYLU, H. A novel antioxidant agent caffeic acid phenethyl ester (CAPE) prevents shock wave-induced renal tubular oxidative stress. **Urological Research,** Heidelberg, v. 33, n. 3, p. 239–243, 2005.

PARK, Y. K. ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 9, p. 2502-2506, 2002.

PARK, Y. K.; PAREDES-GUZMAN, J. F. AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; FUJIWARA, F. Y. Chemical constituents in Baccharis dracunculifolia as the main botanical origin of southeastern Brazilian Propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 5, p. 1100-1103, 2004.

PARK, Y. K.; KOO, M. H.; IKEGAKI, M.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L. Effects of propolis on *Streptococcus mutants*, *Actinomyces naeslundii* and *Staphylococcus aureus*. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 29, p. 143-148, 1998.

PARK, Y. K.; KOO, M. H.; IKEGAKI, M.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; ABREU, J. A. S. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. **Current Microbiology**, New York, v. 36, n. 1, p. 24-28, 1998.

PAULA NETO, F. L.; ALMEIDA NETO, R. M. Principais mercados apícolas mundiais e a apicultura brasileira. **Mensagem Doce,** São Paulo, v. 84, p. 2-23, 2005.

PEREIRA, A. S.; SEIXAS, F.R. M. S.; NETO, F.R.A. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova,** São Paulo, v. 25, n. 2, p. 321 -326, 2002.

PETERSON, J.; DWYER, J. Flavonoids: dietary, occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research,** New York, v. 18, n. 12, p. 1995-2018, 1998.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products,** Pittsburgh, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

PORTER, W. L. Paradoxal behavior of antioxidants in food and biological systems. **Toxicology and Industrial Health,** London, v. 9, p. 93-122, 1992.

RENZ, S. V. Seminário apresentado na disciplina de Bioquímica do Tecido Animal, no programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da UFRGS no primeiro semestre de 2003. Disponível em: www.ufrgs.br/bioquimica. Acesso em: 6 fev. 2007.

RICE-EVANS, C. Flavonoids and Isoflavones (Phytoestrogens): Absorption, Metabolism, and Bioactivity. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 36, n. 7, p. 827 – 828, 2004.

RICE-EVANS, C; MILLER, N. J.; BOLWELL, G. P.; BRAMLEY, P. M.; PRIDHAM, J. B. The relative antioxidant activities of plant derived polyphenolic flavonoids. **Free Radical Research,** London, v. 22, p. 375-383, 1995.

RICE-EVANS, C. A.; NICHOLAS, J. M.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine***,* New York, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends Plant Science,** London, v. 2, n. 4, p. 152-159, 1997.

RICE-EVANS, C., BURDON, R. Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. **Progress in Lipid Research***,* Oxford, v.32, p.71-110, 1993.

ROGINSKY, V.; LISSI, E.A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry,** Barking, v. 92, p. 235-254, 2005.

ROSALEN, P. L.; MURATA, R. M.; YATSUDA, R. DUARTE, S.; GONCALVES, R. B.; KOO, H.; CURY, J. A. Effect of propolis from eight Brazilian regions on oral microorganisms. **Journal of Dental Research**, Chicago, v. 81, p. A 349-A 349, 2002.

RUFER, C. E.; KULLING, S. E. Antioxidant activity of isoflavones and their major metabolites using different in vitro assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, p. 2926-2931, 2006.

SANFORD, M. T. Apicultura no Brasil: um gigante adormecido desperta. Parte II. **Mensagem Doce,** São Paulo, v. 84, p. 24-27, nov. 2005.

SCHNEIDER, C.D.; OLIVEIRA, A.R. radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de adaptação e formação ao treinamento físico. **Revista Brasileira Medicina e Esporte,** São Paulo, v. 10, n. 4, p. 308-313, jul/ago. 2004

SEBRAE. **Informações de Mercado sobre mel e derivados da colméia.** Relatório completo. Brasília, 243p. 2006

SHAHIDI, F.; JANITHA, P.K.; WANASUNDARA, P.D. Phenolic antioxidants. **Critical Review Food Science Nutrition,** London, v. 32, n. 1, p. 67-103, 1992.

SIES, H.; Oxidative stress: From basic research to clinical application. **The American Journal of Medicine,** New York, v. 91, S. 3, p. S31-S38, Sep. 1991.

SILVA, B. B.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; IKEGAKI, M.; SOUZA, V. C.; ESTEVES, A.; ALENCAR, S.M. Chemical composition and botanical origin of red própolis, a new type of Brazilian própolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2007,doi:10.1093/ecam/nem059

SILVA, J. F. M.; SOUZA, M.C.; MATTA, S. R.; ANDRADE, M. R.; VIDAL, V. N. Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. **Food Chemistry,** Barking, v. 99, p. 431-435, 2006.

SIMÕES, C. M.C.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R.. **Farmacognosia:** da planta ao medicamento. 3 ed. Porto Alegre / Florianópolis: Ed. UFSC/ Ed. UFRGS, 2001. 833p.

Sistema Nervoso. Disponível em: http://www.sistemanervoso.com. Acesso em: 02 jul. 2007.

SOBY, S.; BATES, R.; VANETTEN, H. Oxidation of the phytoalexin Maackiain to 6,6a-dihydroxy-Maackiain by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Phytochemistry,** Oxford, v. 45, n. 5, p. 925-929, Jul., 1997.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição,** Campinas, v. 15, n.1, p. 71-81, jan/abr, 2002.

TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; GARCÍA-VIGUERA, C.; VIT-OLIVIER, P.; FERRERES, F.; TOMÁS-LORENTE, F. Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. **Phytochemistry**, Oxford, v. 34, n. 1, p. 191-196, Aug., 1993.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. M. Plant Drug Analysis: a thin layer chromatography atlas. Berlin: Springer–Verlag, 1984. 394p.

WANG, B. J.; LIEN, Y. H.; YU, Z. R. Supercritical fuid extractive fractionation – study of the antioxidant activities of propolis. **Food Chemistry,** Barking, v. 86, p. 237-243, 2004**.**

WANG, W.; WENG, X. C.; CHENG, D. L. Antioxidant activities of natural phenolic components from Dalbergia odorifera T. Chen. **Food Chemistry**, Barking, v. 71, p. 45-49, Oct., 2000.

WILLIAMS, R. J.; SPENCER, J. P. E.; RICE-EVANS, C. Flavonoids: Antioxidants or signalling molecules. **Free Radical Biology and Medicine.** New York, v. 37, n. 7, p. 838-849, 2004.

WOLLENWEBER, E.; BUCHMANN, S.L. Feral honey bees in the Sonoran Desert: propolis sources other than poplars (*Populus* spp.) **Zeitschrift fur Naturforschung C**, Tubingen, v. 52, n. 7/8, p. 530-535, 1997.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis:some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal Apicultural Research,** London, v. 37, n. 2 p. 99-105, 1998.

YANISHLIEVA, N.V., MARINOVA, E.M. Effects of antioxidants on the stability of triacylglycerols and methyl esters of fatty acids of sunflower oil. **Food Chemistry***,* Oxford, v.54, n.4, p.377-382, 1995.

YANG, G.; WANG, R. A. The supercritical fuid extractive fractionation and the characterization of heavy oils and petroleum residua. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, Amsterdam, v. 22, n. 1/3, p. 47–52, Jan.,1999.

YU, X.; WANG, W., YANG, M. Antioxidant activities of compounds isolated from Dalbergia odorifera T. Chen and their inhibition e.ects on the decrease of glutathione level of rat lens induced by UV irradiation. **Food Chemistry**, Oxford, v. 104, p. 715-720, 2007.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo