

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA APLICADA**

**ADRIANA RUTE CORDEIRO**

**ESTUDO QUÍMICO DA PRÓPOLIS DOS CAMPOS GERAIS DO PARANÁ**

**PONTA GROSSA**

**2013**

**ADRIANA RUTE CORDEIRO**

**ESTUDO QUÍMICO DA PRÓPOLIS DOS CAMPOS GERAIS DO PARANÁ**

**Dissertação apresentada como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada, Universidade Estadual de Ponta Grossa.**

**Orientador: Prof. Dr. Domingos Sávio Nunes**

**PONTA GROSSA**

**2013**

**Ficha Catalográfica**  
**Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG**

Cordeiro, Adriana Rute  
C794        Estudo químico da própolis dos Campos  
             Gerais do Paraná/ Adriana Rute Cordeiro.  
             Ponta Grossa, 2013.  
             80f.

             Dissertação (Mestrado em Química  
             Aplicada - Área de Concentração: Química),  
             Universidade Estadual de Ponta Grossa.  
             Orientador: Prof. Dr. Domingos Sávio  
             Nunes.

             1.Própolis regional. 2.Própolis verde.  
             3.Ácido benzoico. 4.Ácido  
             para-hidroxicinâmico. 5.Espatulenol.  
             I.Nunes, Domingos Sávio. II. Universidade  
             Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em  
             Química Aplicada. III. T.

CDD: 547

TERMO DE APROVAÇÃO

ADRIANA RUTE CORDEIRO

“ESTUDO QUÍMICO DA PRÓPOLIS DOS CAMPOS GERAIS DO PARANÁ”

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora.

Orientador:



Prof. Dr. Domingos Sávio Nunes  
UEPG/PR



Prof. Dr. Daniel Granato  
IAL/SP



Profa. Dra. Romaiana Picada Pereira  
UEPG/PR

Ponta Grossa, 30 de agosto de 2013.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente ao meu amado DEUS, por tudo o que tenho e por tudo o que sou por sempre estar comigo em todos os momentos.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela oportunidade.

Aos meus pais pelo esforço que empenharam pelos meus estudos, mesmo às vezes faltando forças, nunca me desanimaram demonstrando seu amor incondicional.

Aos meus irmãos Júlio Marcos e sua esposa Sarah, Raquel e sua família Wilson e Kauâne, Roséla e seu esposo Antônio e Edson, pelo amor, dedicação, apoio e incentivo no decorrer desta caminhada. Em especial ao meu esposo Henrique sempre disposto a me apoiar e ajudar. Amo vocês imensamente.

Meus agradecimentos ao Prof. Dr. Domingos Sávio Nunes, pela orientação, grandes ensinamentos e sugestões.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada e a todos os professores da área pelos ensinamentos durante as disciplinas cursadas.

Ao senhor Ernesto e ao senhor Lincoln e a todos da Associação dos Apicultores dos Campos Gerais pelas amostras de própolis.

Às minhas colegas de mestrado, em especial a Raquel pelo apoio e companheirismo e a todas que de alguma forma contribuíram para esta conquista.

À CAPES, pela bolsa de mestrado para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores responsáveis pelo RMN, pela dedicação na obtenção dos espectros, e à toda a equipe técnica do Labmu-UEPG pelo apoio nas demais análises.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Sueli Pércio Quináia e à sua aluna Mc. Daiane Finger pela ajuda nas Análises de Metais.

Ao Prof. Dr. Alberto Wisniewski Junior, da Universidade Federal de Sergipe, pelas análises por CG-EM-DIC.

Aos servidores e funcionários do CIPP e da UEPG em especial à Cleunice que sempre nos recebeu com um sorriso.

A todos que direta e indiretamente contribuíram para a realização desta pesquisa.

“Filho meu, guarda o mandamento do teu pai, e não deixes a lei da tua mãe; ata-os perpetuamente ao teu coração, quando caminhares te guiará, quando deitares te guardará: quando acordares, falará contigo. Porque o mandamento é lâmpada, e a lei é luz; e as repreensões da correção são o caminho da vida”.

*(Pv. 6:20-23)*

## RESUMO

Este estudo buscou desenvolver métodos para a obtenção de extratos destinados ao isolamento e análises químicas de própolis utilizando duas amostras provenientes da Região dos Campos Gerais do Paraná. Uma das amostras de própolis estudadas foi produzida no município de Ipiranga e a outra no município de Ponta Grossa. O método geral de fracionamento utilizado permitiu obter, de uma mesma amostra, os óleos essenciais e em seguida o extrato aquoso e diversos extratos orgânicos contendo substâncias de várias polaridades. As análises dos óleos essenciais demonstraram que ambas as amostras de própolis contêm vários componentes também presentes na espécie vegetal *Baccharis dracunculifolia*, conhecida como vassoura ou alecrim do campo, indicando tratar-se da chamada própolis verde, similares às produzidas na região sudeste do Brasil. As análises também demonstraram a presença de substâncias fenólicas, tanto flavonoides como ácidos cafeoilquínicos, reforçando que a origem botânica das própolis analisadas inclui o alecrim dos campos. As análises de óleos essenciais da amostra de Ipiranga indicaram como componentes principais o espatulenol e o (*E*)-nerolidol, enquanto que as de Ponta Grossa apresentaram altas proporções de duas substâncias contendo anéis aromáticos em suas estruturas, o 2,6-di-*t*-butil-*p*-cresol e o benzilbenzoato. Os dois álcoois sesquiterpênicos espatulenol e (*E*)-nerolidol são encontrados comumente em óleos essenciais de *B. dracunculifolia* e aparecem na própolis de Ponta Grossa em baixas porcentagens, enquanto que os dois mencionados compostos aromáticos não são tão comuns em espécies do gênero *Baccharis*. As diversas análises de extratos e isolamentos demonstraram que dois ácidos aromáticos podem ser considerados como substâncias marcadoras das duas amostras de própolis analisadas. O ácido *para*-hidroxicinâmico mostrou-se característico da própolis de Ipiranga, enquanto que o ácido benzoico pode ser considerado típico da amostra de Ponta Grossa. As análises por espectrometria de absorção atômica que foram conduzidas com ambas as própolis estudadas não indicaram níveis elevados de metais e nem a presença de metais pesados inconvenientes, sendo mais uma garantia de que os produtores estão trabalhando em ambientes limpos quanto a este aspecto.

Palavras-chave: Própolis regional. Própolis verde. Ácido benzoico. Ácido *para*-hidroxicinâmico. Espatulenol. (*E*)-nerolidol. 2,6-di-*t*-butil-*p*-cresol. Benzilbenzoato.



## ABSTRACT

This study aimed to develop methods for obtaining extracts for the isolation and chemical analysis of propolis using two samples from the region known as "Campos Gerais do Paraná". One of the studied propolis samples was produced in the district of Ipiranga and another in the municipality of Ponta Grossa. The utilized general fractionation method allowed obtaining from the same sample the essential oils and then the aqueous extracts and various organic fractions containing chemical components of several polarities. The analyses of the essential oils showed that both samples of propolis contain several components found in *Baccharis dracunculifolia*, known as *vassoura* or *alecrim do campo*, indicating that these are similar to those of green propolis produced in southeastern Brazil. The analyses also demonstrated the presence of phenol compounds such as flavonoids and caffeoylquinic acids, pointing once again that the botanical origin of both propolis includes the *alecrim do campo*. The analyses of essential oils originating from Ipiranga propolis sample indicated spathulenol and (*E*)-nerolidol as the main components, while the one acquired in Ponta Grossa showed high proportions of two substances containing aromatic rings in their structures, 2,6-di-*t*-butyl-*p*-cresol and benzyl benzoate. The two sesquiterpene alcohols spathulenol and (*E*)-nerolidol are commonly found in essential oils from *B. dracunculifolia* and appear in propolis from Ponta Grossa in low percentages, while the two mentioned aromatic compounds are not commonly found in the genus *Baccharis*. The various analyses of extracts and isolates showed that two aromatic acids may be considered as marker substances for both samples of propolis. The *para*-hydroxycinnamic acid seemed to be characteristic of propolis from Ipiranga, while the benzoic acid could be considered typical of the sample from Ponta Grossa. Atomic absorption spectrometry analyses that were conducted with both studied propolis did not indicate neither high levels of essential minerals nor the presence of heavy metals, and this fact represents a guarantee that producers have been working in clean environments.

Key-words: Regional propolis. Green propolis. Benzoic acid. *para*-Hydroxycinnamic acid. Spathulenol. (*E*)-Nerolidol. 2,6-Di-*tert*-butyl-*para*-cresol. Benzyl benzoate.

## LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

- AcOEt<sub>pH4</sub> – extrato acetato de etila em pH = 4
- AcOEt<sub>pH8</sub> – extrato acetato de etila em pH = 8
- CCD – cromatografia em camada delgada
- CG – cromatografia gasosa
- CG-DIC – cromatografia gasosa com detector de ionização de chama
- CG-EM – cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
- d – dubleto
- dd – duplo dubleto
- DEPT – *Distortionless Enhancement of Polarization Transfer*
- EM – espectro de massas
- FAAS – espectroscopia de absorção atômica em modo chama
- gCOSY – *Correlated Spectroscopy*
- IV – espectro de infravermelho
- J – constante de acoplamento
- m – multipletto
- pH – potencial hidrogeniônico
- P1 – amostra de própolis de Ipiranga-PR
- P2 – amostra de própolis de Ponta-Grossa-PR
- R<sub>f</sub> – fator de retenção
- RMN de <sup>1</sup>H – Ressonância magnética nuclear de próton
- RMN de <sup>13</sup>C – Ressonância magnética nuclear de carbono-13
- s – singleto
- t – tripleto
- TMS – tetrametilsilano
- UV – ultravioleta
- UV-VIS – ultravioleta visível
- λ – comprimento de onda

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Baccharis dracunculifolia</i> .....	19
Figura 2 - Estruturas dos ácidos 3,5-diprenil-p-cumárico (1) 3-prenil-p-cumárico (2) principais compostos fenólicos encontrados na própolis verde.....	22
Figura 3 - Estrutura geral dos flavonoides.....	22
Figura 4 - Flavonoides comumente encontrados na própolis verde .....	23
Figura 5 - Ácidos fenólicos presentes na própolis verde .....	24
Figura 6 - Derivados do ácido cafeoilquínico presentes na própolis verde. ....	24
Figura 7 - Componentes majoritários no óleo essencial de <i>B. dracunculifolia</i> .....	26
Figura 8 - Foto do hidroddestilador utilizado. ....	32
Figura 9 - Obtenção dos óleos essenciais .....	33
Figura 10 - Esquema geral para a obtenção de todos os extratos .....	35
Figura 11 - Fracionamento do extrato AcOEt <sub>p</sub> H <sub>4</sub> da P1 .....	36
Figura 12 - Preparação das amostras para análise quantitativa de metais por FAAS .....	37
Figura 13 – CCD do óleo essencial da P1, placa de sílica gel eluída com CHCl <sub>3</sub> /MeOH (99:1) mostrando os componentes marcados sob luz UV de 254 nm e revelação com H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /MeOH seguida de aquecimento em chapa quente a 110 °C por 5 minutos .....	39
Figura 14 – Cromatogramas obtidos nas análises por CG/EM dos óleos essenciais da P1 hidroddestilados em três durações diferentes: P11, 2 horas; P12, 2,5 horas; P13, 3 horas .....	39
Figura 15 - Espectros de ultravioleta do óleo essencial da P1 .....	41
Figura 16 - Componentes principais presentes nos óleos essenciais da P1.....	42
Figura 17 - Espectros de ultravioleta extrato CHCl <sub>3</sub> da P1 .....	44
Figura 18 - Espectros de ultravioleta extrato AcOEt <sub>p</sub> H <sub>8</sub> da P1 .....	46
Figura 19 - Espectros de ultravioleta extrato AcOEt <sub>p</sub> H <sub>4</sub> da P1.....	47
Figura 20 - Cromatoplas das frações reunidas 6-10 do AcOEt <sub>p</sub> H <sub>4</sub> da P1 .....	48
Figura 21 - Espectro de IV das frações de 6-10 do AcOEt <sub>p</sub> H <sub>4</sub> da P1.....	48
Figura 22 - Espectro de gCOSY do ácido para-hidroxicinâmico (14).....	50
Figura 23 - Cromatogramas obtidos nas análises por CG/EM dos óleos essenciais da própolis P2 hidroddestilados em três durações diferentes: P21, 2 horas; P22, 2,5 horas; P23, 3 horas.....	52

Figura 24 - Espectros de ultravioleta do óleo essencial da P2 .....	53
Figura 25 - Componentes contendo anéis aromáticos do óleo essencial da própolis P2 .....	54
Figura 26 - Análise por CCD da substância fenólica separada do óleo essencial da amostra de própolis P2.....	55
Figura 27 - Espectros de ultravioleta extrato CHCl <sub>3</sub> da P2.....	56
Figura 28 - Espectros de ultravioleta extrato AcOEt pH8 da P2.....	57
Figura 29 - Espectros de ultravioleta extrato AcOEt pH4 da P2.....	58
Figura 30 - Espectro de ultravioleta dos cristais presentes no extrato CHCl <sub>3</sub> da P2 .	59
Figura 31 - Espectro de IV dos cristais presentes nos extratos CHCl <sub>3</sub> da amostra P2 .....	60
Figura 32 - Ácido benzóico.....	61

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação da própolis Brasileira.....	18
Tabela 2 - Coluna de fracionamento do extrato AcOEt pH4 da P1 .....	36
Tabela 3 - Rendimentos dos óleos essenciais de própolis.....	38
Tabela 4 - Porcentagens relativas dos componentes identificados nos óleos essenciais da P1 por CG/EM/DIC .....	40
Tabela 5 - Deslocamentos químicos atribuídos nos espectros de RMN de <sup>1</sup> H e de <sup>13</sup> C para o espatulenol ( <b>20</b> ) presente no óleo essencial da própolis P1 em comparação com dados publicados.....	42
Tabela 6 - Deslocamentos químicos atribuídos nos espectros de RMN de <sup>1</sup> H e de <sup>13</sup> C para ( <i>E</i> )-nerolidol ( <b>19</b> ) presente no óleo essencial da própolis P1 em comparação com dados publicados.....	43
Tabela 7- Rendimentos dos extratos clorofórmicos da P1 .....	44
Tabela 8 - Rendimentos dos extratos AcOEt pH8 e AcOEt pH4 da própolis P1 .....	45
Tabela 9 - Rendimentos dos óleos essenciais de própolis.....	50
Tabela 10 - Porcentagens relativas dos componentes identificados nos óleos essenciais da própolis P2 por CG/EM/DIC em três tempos de hidrodestilação .....	51
Tabela 11 - Deslocamentos químicos de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C do 2,6-di- <i>t</i> -butil- <i>p</i> -cresol ( <b>21</b> ) comparados com dados da literatura .....	54
Tabela 12 - Deslocamentos químicos de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C do benzilbenzoato ( <b>22</b> ) presente no óleo essencial da P2 comparados com dados da literatura..	55
Tabela 13 - Rendimentos dos extratos CHCl <sub>3</sub> da P2 .....	56
Tabela 14 - Rendimentos dos extratos da própolis P2 em pH 8 e pH 4.....	57
Tabela 15 - Deslocamentos químicos de RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C do ácido benzóico ( <b>23</b> ) obtido dos extratos CHCl <sub>3</sub> , AcOEt e éter etílico da amostra P2 comparados com dados da literatura. ....	60
Tabela 16 - Concentração de metais nas amostras de própolis bruta .....	61

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1 PRÓPOLIS .....	16
1.2 PRÓPOLIS BRASILEIRA .....	17
1.3 METODOLOGIAS PARA OBTENÇÃO DE EXTRATOS DA PRÓPOLIS VERDE .....	19
1.4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA PRÓPOLIS VERDE .....	20
1.4.1 Compostos fenólicos .....	21
1.4.2 Componentes metálicos .....	25
1.5 ÓLEOS ESSENCIAIS.....	25
<b>2 HIPÓTESES</b> .....	27
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	28
3.1 OBJETIVO GERAL .....	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	28
<b>4 JUSTIFICATIVA</b> .....	29
<b>5 ESTRATÉGIAS</b> .....	30
5.1 REAGENTES .....	30
5.2 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS .....	30
5.3 ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS.....	30
5.4 COLETA DE AMOSTRAS .....	31
<b>6 MÉTODOS</b> .....	32
6.1 COLETA.....	32
6.2 OBTENÇÃO E ANÁLISE DE ÓLEOS ESSENCIAIS .....	32
6.2.1 Componente isolado do óleo essencial da própolis P2 .....	34
6.3 OBTENÇÃO DE EXTRATOS CONTENDO FENÓIS .....	34
6.3.1 Fracionamento do extrato obtido com AcOEt em pH 4 da P1 .....	36
6.4 DETERMINAÇÃO DE METAIS POR ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA .....	37

<b>7 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	38
7.1 ANÁLISES DA PRÓPOLIS DE IPIRANGA (P1) .....	38
7.1.1 Análise do óleo essencial de P1 .....	38
7.1.2 Análise dos extratos clorofórmicos da P1 .....	43
7.1.3 Análise dos extratos da P1 obtidos com acetato de etila .....	44
7.1.4 Fracionamento do extrato da P1 obtido com AcOEt em pH4 .....	47
7.2 ANÁLISES DA PRÓPOLIS DE PONTA GROSSA (P2) .....	50
7.2.1 Análise do óleo essencial de P2.....	50
7.2.2 Isolamento do componente fenólico do óleo essencial de P2 .....	55
7.2.3 Análise dos extratos clorofórmicos da P2.....	56
7.2.4 Análise dos extratos da P2 obtidos em pH 8 e pH 4 .....	57
7.3 ANÁLISE DE METAIS NAS PRÓPOLIS P1 E P2 .....	61
<b>8 CONCLUSÕES</b> .....	63
<b>9 REFERÊNCIAS</b> .....	65
<b>ANEXO 1</b> - Espectros de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ do óleo essencial da própolis de Ipiranga, amostra P1 (item 7.1.1) .....	74
<b>ANEXO 2</b> - Espectros de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ do extrato acetato de etila em pH 4 da própolis de Ipiranga, P1 (item 7.1.4) .....	75
<b>ANEXO 4</b> - Espectros de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ do óleo essencial da própolis de Ponta Grossa, amostra P2 (item 7.2.1) .....	77
<b>ANEXO 5</b> - Espectros de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ do extrato acetato de etila em pH 8 da própolis de Ponta Grossa, amostra P2 (item 7.2.4).....	78
<b>ANEXO 6</b> - Espectros de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ do extrato acetato de etila em pH 4 da própolis de Ponta Grossa, amostra P2 (item 7.2.4).....	79
<b>ANEXO 7</b> - Espectros de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ do extrato obtido com éter etílico em pH 4 da própolis de Ponta Grossa, amostra P2 (item 7.2.4) .....	80

## 1 INTRODUÇÃO

Ao longo da história, o homem passou a utilizar os produtos naturais na medicina através da descoberta de sua eficácia, partindo do empirismo. A própolis (CAS No. 9009-62-5) tem sido um dos muitos produtos naturais utilizados durante séculos pela humanidade de diversas formas. Seu emprego já era descrito pelos assírios, gregos, romanos, incas e egípcios (PEREIRA, et al., 2002).

Própolis é uma substância de composição complexa, natural, preparada pelas abelhas a partir de resinas coletadas de diferentes partes de plantas que estejam em um raio de até 5 km de distância em torno da colmeia (BURDOCK, 1998; PARK et al., 2000). A própolis nas últimas décadas tem atraído o interesse de pesquisadores devido às suas diversas propriedades biológicas e farmacológicas (BANKOVA et al., 2000; BANSKOTA et al., 2001).

Atualmente existem diversos estudos científicos sobre as propriedades farmacológicas da própolis, como: antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatória, imunomodulatória, bem como hipotensiva, cicatrizante, anestésica entre outras (GHISALBERTI, 1979; KUJUMGIEV et al., 1999; PARK et al., 2000). Muitos produtos são comercializados contendo própolis, na forma de cremes, pasta de dente, spray, doces, xampus, sabonetes usada em grande escala em comidas e bebidas entre outros, pois a presença da própolis agrega valor aos mesmos, devido os benefícios comprovados de melhorar a saúde e prevenir doenças (PARK et al., 1998; BANKOSTA et al., 2001; BEZERRA; GONÇALVES, 2009).

Os primeiros estudos mais aprofundados sobre a própolis foram realizados na Europa Oriental, e os primeiros resultados obtidos sobre a composição química da própolis das abelhas *Apis mellifera* foram de regiões de clima temperado (SAWAYA, 2006). Já a própolis de clima tropical e subtropical como o do Brasil, começou a ser estudada nos anos 90, quando se observou a grande diferença entre as composições químicas das própolis brasileiras e européias (MARCUCCI, 1995).

Recentemente, começaram a serem estudadas as fontes vegetais da própolis. Várias metodologias já foram aplicadas a estes estudos e poucas delas dão ênfase à composição química do óleo essencial. Tendo em vista a importância do estudo da própolis e pouco conhecimento sobre seus óleos essenciais, propomos



neste trabalho uma nova metodologia de análise dos extratos de própolis, bem como a análise química de seus óleos essenciais.

## 1.1 PRÓPOLIS

A própolis consiste em uma resina natural de coloração e consistência variada que é coletada por abelhas de diferentes partes das plantas, como gemas vegetativas, brotos, ramos, botões florais e exsudados resinosos (BURDOCK, 1998; PARK et al., 2000; CASTRO et al., 2007). As abelhas transportam estas substâncias até a colmeia sendo posteriormente acrescidas de secreções da própria abelha, enzima salivar  $\beta$ -glicosidase, aumentando a ação farmacológica da própolis (PARK et al., 1998; PARK et al., 2002). Resulta desta mistura, um composto rico em aminoácidos, vitaminas e bioflavonoides com um poderoso efeito antioxidante e ação antibacteriana. A composição da própolis é extremamente complexa sendo que mais de 300 substâncias já foram identificadas (BURDOCK, 1998; BANKOVA et al., 2000; PARK et al., 2000).

As abelhas utilizam a própolis nas colmeias como proteção, para reparar danos, como assepsia das colmeias e como isolante térmico (CARDOSO et al. 2011). A própolis é conhecida há mais de três mil anos, e na idade média era costume aplicá-la ao umbigo dos bebês para auxiliar na cicatrização. Sabe-se também que devido à utilização da própolis no processo de embalsamamento, as múmias dos faraós eram conservadas (GUIMARÃES, 1989). Há algumas décadas, o uso da própolis tornou-se comum, especialmente na antiga União Soviética e nos países do Leste Europeu, com aplicação na indústria alimentícia como conservante e na indústria farmacêutica para o tratamento de infecções como otites externas, faringite, rinite, amidalite, asma, bronquite doenças cardíacas, diabetes entre outros. Devido às suas atividades biológicas, a própolis tem sido utilizada mundialmente e seu consumo está em torno de 700 a 800 toneladas anuais (IVANOV et al., 1973; BURDOCK, 1998; BANKOSTA et al., 2001; ADELMANN, 2005; SILVA et al., 2006).

Na América do Sul, existe uma grande diversidade vegetal para a retirada de substâncias pelas abelhas o que dificulta a correlação das própolis com suas origens vegetais (PARK et al., 2002). No Brasil, já foram identificadas algumas destas plantas que as abelhas visitam para retirar componentes para a produção de

própolis, como o assa-peixe (*Vernonia polyanthes*), a aroeira (*Schinus molle L.*), o eucalipto (*Eucalyptus*), e o alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*), que ficou mais conhecido como fonte botânica da própolis verde (MARCUCCI, 1995; BANKOVA et al., 1999; PARK et al., 2000).

## 1.2 PRÓPOLIS BRASILEIRA

O Brasil foi o primeiro país a elaborar uma norma que regulamenta a identidade e os requisitos mínimos de qualidade a que deve atender a própolis. A norma nº 3, de 19 de janeiro de 2001 do Ministério da Agricultura e do Abastecimento destaca características sensoriais como: aroma, cor, sabor, consistência (à temperatura ambiente), requisitos físico-químicos, umidade, cinzas, ceras, compostos fenólicos, flavonoides. Entretanto, as condições mínimas abordadas pela ANVISA preconizam análise das características sensoriais, como aspecto, cor e odor, e os requisitos físico-químicos como perda por dessecação, teor de cinzas totais, cinzas insolúveis em ácido clorídrico, densidade, viscosidade e pH, além da atividade antioxidante, teor de fenóis totais, teor de flavonóides, teor de compostos voláteis e teor de ceras (BRASIL, 2013). Além disso, se faz necessário pesquisar e identificar contaminantes e patógenos, metais pesados, resíduo de pesticidas, determinação de material estranho e um laudo de análise do fornecedor com descrição dos processos de produção e coleta da própolis (BRASIL, 2001). Ou seja, a própolis deve estar livre de aditivos e contaminantes, sejam eles químicos, físicos ou biológicos, que são as condições mínimas para o seu registro, estão definidas na RDC nº 132 de 2003.

No ano de 2000, pesquisadores estudaram amostras de própolis coletadas de todas as regiões do Brasil com o objetivo de classificá-las a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. As técnicas utilizadas foram: a cromatografia em camada delgada de alta eficiência, a espectroscopia em luz ultravioleta e a cromatografia líquida de alta eficiência. A própolis brasileira foi então classificada em 12 grupos: 5 grupos na região sul, 6 na região nordeste e 1 na região sudeste (Tabela 1).

Esse estudo indicou a existência de uma grande diversidade de própolis dentro do território brasileiro, e que uma maior variedade de própolis encontra-se

nas regiões sul e nordeste do Brasil, devido à grande diversidade do bioma presente. Observou-se, que as propriedades biológicas dependem do tipo da própolis testada, ou seja, da sua composição química, levando a concluir que os diferentes tipos de própolis têm também aplicações diferentes. A atividade antioxidante teve resultado positivo para todas as amostras, uma vez que em sua composição a própolis é rica em compostos fenólicos (PARK et al., 2000).

Tabela 1 - Classificação da própolis Brasileira

Grupos	Cor	Substâncias Solúveis (%)	Origem da Própolis
Grupo 1 (RS5)	Amarelo	63,0	Região Sul
Grupo 2 (RS1)	Castanho claro	57,5	Região Sul
Grupo 3 (PR7)	Castanho escuro	65,0	Região Sul
Grupo 4 (PR8)	Castanho claro	54,5	Região Sul
Grupo 5 (PR9)	Marrom esverdeado	58,7	Região Sul
Grupo 6 (BP11)	Marrom avermelhado	45,9	Região Nordeste
Grupo 7 (BA51)	Marrom esverdeado	43,9	Região Nordeste
Grupo 8 (PE5)	Castanho escuro	41,3	Região Nordeste
Grupo 9 (PE3)	Amarelo	46,7	Região Nordeste
Grupo 10 (CE3)	Amarelo escuro	24,1	Região Nordeste
Grupo 11 (PG11)	Amarelo	23,1	Região Nordeste
Grupo 12 (PG12)	Verde ou Marrom esverdeado	61	Região Sudeste

Fonte: PARK, et al., 2000.

Com base nessa classificação, a própolis verde foi classificada como PG12 (Própolis do grupo 12) sendo esta produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera*, possuindo uma coloração verde característica que é utilizada para sua rápida identificação, no processo de comercialização, sendo que esta própolis é conhecida internacionalmente como própolis verde, *green propolis* (SOUZA et al., 2007). O grupo 12 representa com fidelidade a sua origem botânica a *Baccharis dracunculifolia* (Figura 1) (KUMAZAWA et al., 2003)

A espécie *Baccharis dracunculifolia* DC. é um arbusto com ocorrência espontânea no Brasil, Uruguai, Argentina, Paraguai sendo também encontrada nos

altos vales da Bolívia, chegando até 3.280 m de altitude, a espécie é utilizada popularmente para combater distúrbios gástricos, cansaço físico, inapetência, afecções febris e debilidade orgânica (CASSEL et al., 2000).

Esta espécie é arbustiva, possui folhas lanceoladas, possui flor feminina com corola de 2 a 3 mm de comprimento e flor masculina com corola de 2,5 a 3 mm de comprimento (BUDEL et al., 2004). É uma espécie normalmente encontrada em campos secos e locais alterados, florescendo desde o início de janeiro até maio nos Campos Gerais do Paraná (Figura 1).

Figura 1 - *Baccharis dracunculifolia*



Fonte: D. S. Nunes, 2012.

### 1.3 METODOLOGIAS PARA OBTENÇÃO DE EXTRATOS DA PRÓPOLIS VERDE

A própolis tem sido estudada há décadas, e muitas metodologias já foram utilizadas na extração de seus componentes, podendo-se usar diversos solventes dependendo da finalidade. Bankova e colaboradores (1992) utilizaram o seguinte método: 1 g de própolis, cortada em pedaços, extraída com 10 mL de metanol foi deixada em ebulição por 2h. Posteriormente adicionou-se 2 ml de água ao extrato filtrado e extraiu-se 3 vezes com éter etílico evaporando-se o solvente.

No ano de 1997, três autores publicaram suas metodologias: Fernandes e colaboradores utilizaram extratos etanólicos preparados com 50 g de amostra em 100 mL de etanol. Os mesmos autores, em 2001, testaram a sua metodologia com 100 g de amostra. Koo e Park usaram extratos etanólicos preparados com 2 g de amostras em 25 mL de etanol 80%, utilizando agitação por 30 minutos e temperatura de 70 °C. Menezes e colaboradores também prepararam extratos etanólicos a partir de 100 g de própolis e 200 mL de etanol 95%, deixando em agitação por uma semana na temperatura ambiente.

Bosio e colegas (2000) obtiveram extratos etanólicos a partir de 30 g de amostra em 100 mL de etanol 95° G.L., deixando em agitação durante uma semana, a temperatura ambiente. Marcucci (2001) obteve extratos metanólicos com 50 g de amostra em aparelho Soxhlet por 8 horas. Em 2002, Alencar utilizou 2 g de amostra e 15 mL de etanol em banho-maria a 70 °C por 30 minutos, em agitação constante; o extrato foi centrifugado e, ao resíduo, adicionado 10 mL de etanol 80% com nova extração; o extrato final resultou da somatória dos dois sobrenadantes das extrações. Park e colaboradores (1998) obtiveram extratos etanólicos preparados com 2 g de própolis em 15 mL de etanol a 80%, utilizando agitação por 30 minutos e temperatura de 70 °C.

Nagai (2003) obteve extratos aquosos com 50 g de amostra e 5 volumes de água destilada, a 20 °C por um dia. Cabral (2008) preparou extratos etanólicos com 100 g em 400 mL de etanol a 80%. Bezerra e Golçalves (2007) obtiveram extratos de 20 g em 400 mL de etanol absoluto. Buriol e colegas (2009) obtiveram pela primeira vez, um extrato oleoso de própolis como uma alternativa aos extratos etanólicos. Os extratos foram obtidos com 5 g de amostra, em 25 mL de óleo de canola na temperatura ambiente e com agitação continua durante 10, 30 e 90 dias.

A própolis apresenta uma grande quantidade de substâncias e a extração completa ou seletiva depende do solvente utilizado.

#### 1.4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA PRÓPOLIS VERDE

Dentre os constituintes, muitas substâncias químicas encontradas na própolis verde estão também presentes em sua fonte botânica, a *Baccharis dracunculifolia*. A composição química da própolis verde produzida por *Apis mellifera*

é bastante variada e está intimamente relacionada com a época do ano em que é produzida (PARK et al., 2002). Há própolis produzidas com base em diversas plantas, enquanto outras são derivadas de espécies particulares de plantas (VARGAS et al., 2004).

A própolis verde apresenta em sua composição vários tipos de substâncias, entre as quais triterpenóides, flavonoides, ácidos aromáticos, ácidos graxos, polissacarídeos, hidrocarbonetos e vários outros compostos em pequenas quantidades, como aminoácidos, vitaminas A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, C e E, além de microelementos, como Mn, Cu, Ca, Al, V, Ni, Zn e Cr (BURDOCK, 1998; WOISKY et al., 1998; PARK et al., 2002; MENEZES, 2005; SILICI & KUTLUKA, 2005; HU et al., 2005; HAYACIBARA et al., 2005; FUNARI & FERRO, 2006).

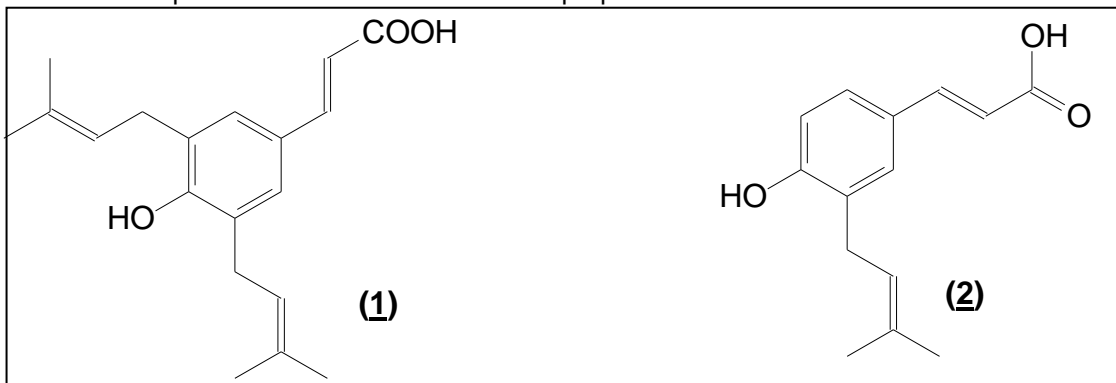
#### 1.4.1 Compostos fenólicos

Os constituintes principais da própolis verde são os compostos fenólicos, que se caracterizam pela presença de pelo menos um grupo hidroxila ligado a um anel aromático. Estes compostos são relativamente polares e tendem a ser solúveis em água ou solventes orgânicos polares (SIMÕES et al., 2004).

A presença de diversos compostos fenólicos, principalmente, ao flavonoides, os terpenóides e derivados de ácidos prenilados, explica, em parte, a grande variedade de propriedades biológicas de amostras de própolis (MARCUCCI, BANKOVA, 1999). Sendo assim, as atividades biológicas relacionadas à própolis são devidas a uma mistura de vários compostos. Em muitas amostras brasileiras de própolis, os compostos fenólicos, como o ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico, que é conhecido como artepilin C (**1**) e o ácido 3-prenil-hidroxicinâmico (**2**), mostrados na figura 1, são as principais substâncias (PEREIRA et al., 2003).

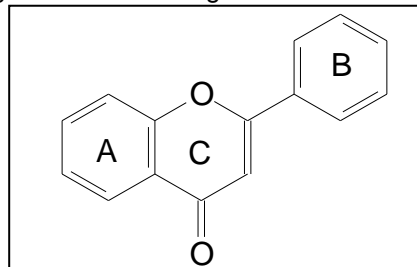
Devido à presença do artepilin C, a própolis verde apresenta atividade antiinflamatória, antitumoral, indutora de apoptose, imunomoduladora, antioxidante e supressora da angiogênese tumoral (PISCO et al., 2006; PAULINO et al., 2008).

Figura 2 - Estruturas dos ácidos 3,5-diprenil-p-cumárico **(1)** 3-prenil-p-cumárico **(2)** principais compostos fenólicos encontrados na própolis verde.



Os flavonoides são caracterizados por uma estrutura com quinze átomos de carbono formando dois anéis aromáticos, que se encontram ligados por uma cadeia de três átomos de carbono, podendo ou não formarem um terceiro anel (Figura 3). As classes dos flavonoides variam em sua estrutura característica ao redor do anel C (PETERSON, DWYER, 1998).

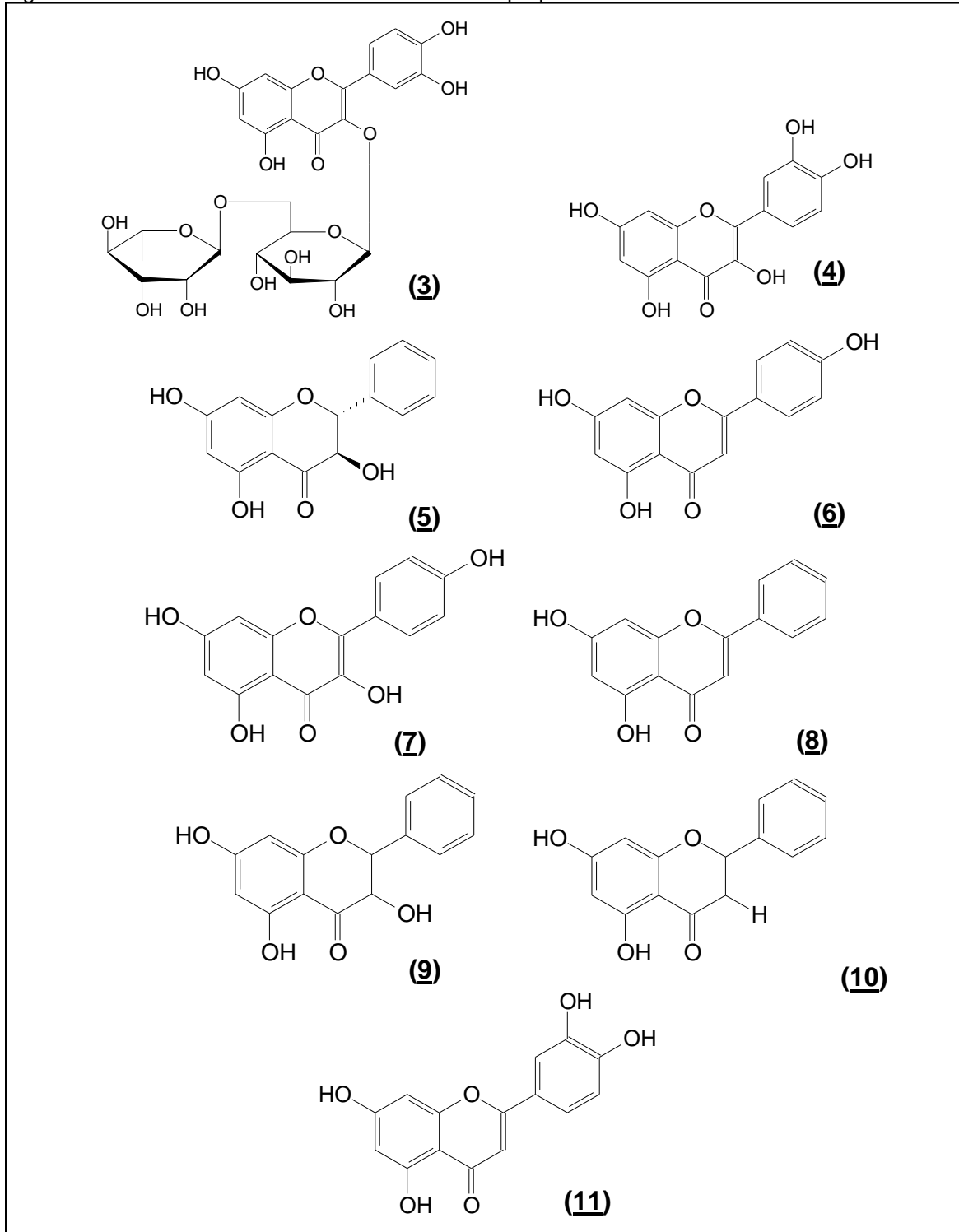
Figura 3 - Estrutura geral dos flavonoides



Muitos flavonoides apresentam a cor amarela, absorvem radiação eletromagnética na faixa do ultravioleta (UV) e do visível (VIS) e, dessa maneira, desempenham um papel importante na defesa das plantas frente à radiação UV da luz solar, além de representarem uma barreira química de defesa contra os microrganismos e insetos herbívoros (ADELMANN, 2005). A atividade antioxidante dos flavonoides depende dos grupos hidroxila, em reações de abstração do átomo de hidrogênio. A própolis apresenta flavonoides como rutina **(3)**, quercetina **(4)**, pinobanksina **(5)**, apigenina **(6)**, canferol **(7)**, crisina **(8)**, galangina **(9)**, pinocembrina

(10), luteolina (11), (figura 4) entre outros (PARK et al., 2002; ALENCAR et al., 2002).

Figura 4 - Flavonoides comumente encontrados na própolis verde





Ácidos aromáticos como os ácidos caféico **(12)**, ferúlico **(13)** e ácido *para*-hidroxicinâmico (ácido *p*-cumárico) **(14)** também são encontrados na própolis verde (Figura 5). Alguns desses derivados do ácido quínico, os ácidos 3,5-dicafeoil-quínico **(15)**, 4,5-dicafeoil-quínico **(16)**, 3,4-dicafeoil-quínico **(17)** e 3-cafeoil-quínico **(18)** (ácido clorogênico), são mostrados na Figura 6 (MARCUCCI, 2006; GARDANA et al., 2007).

Figura 5 - Ácidos fenólicos presentes na própolis verde

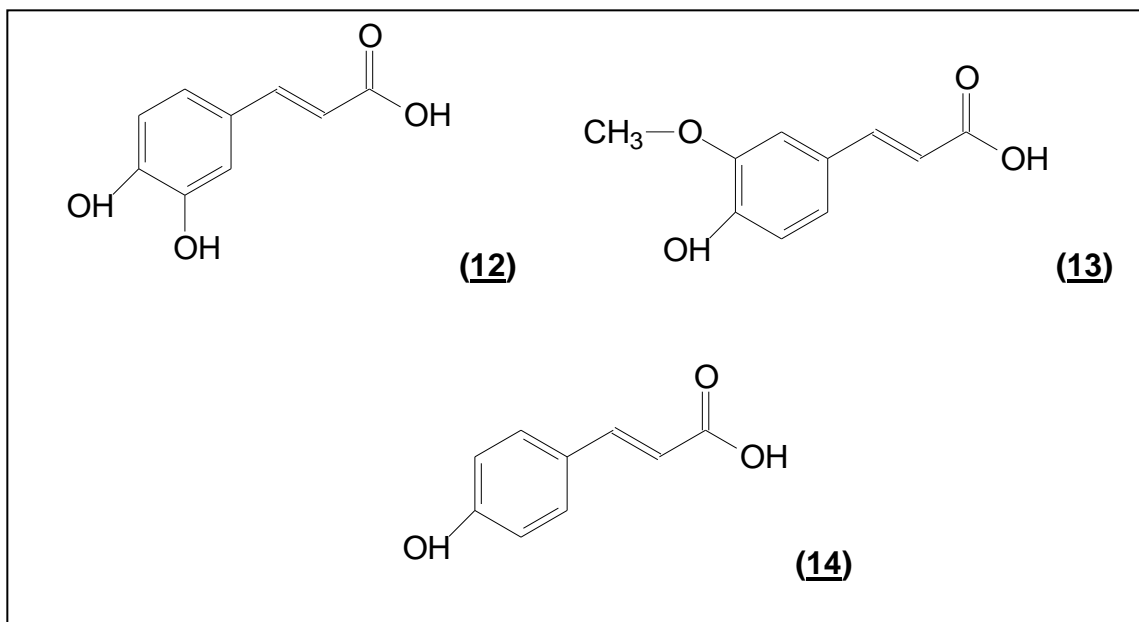
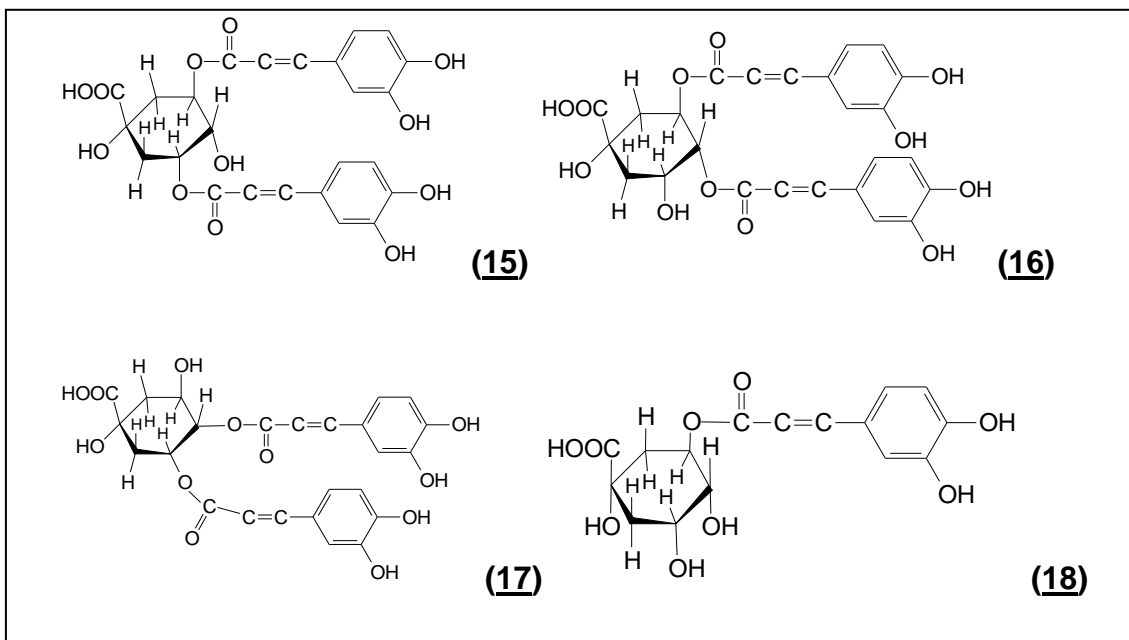


Figura 6 - Derivados do ácido cafeoilquínico presentes na própolis verde.



Os compostos fenólicos têm uma importante atividade antioxidante, a qual é aumentada pela presença de um grupo prenil ligado a anel aromático. Ésteres do ácido caféico (fenetil éster do ácido caféico) assim como outros componentes fenólicos foram apontados como responsáveis por importantes atividades antimicrobiana e antitumoral (SFORCIN; ORSI; BANKOVA, 2005). Segundo Brewer (2011), alguns antioxidantes como flavonoides e antocianinas naturais possuem qualidade tão boa quanto os antioxidantes sintéticos comerciais, tornando-se atraentes para a indústria.

#### 1.4.2 Componentes metálicos

A produção nacional de própolis é a terceira maior no ranking mundial e corresponde a 80% da demanda do mercado japonês (PEREIRA et al., 2002). Esta conquista tem sido motivada pelo fato da própolis brasileira ser rica em compostos fenólicos, e por apresentar menor teor de metais pesados (MARCUCCI, 1995), contendo também íons metálicos necessários para muitas das funções vitais do organismo humano. A ausência de alguns desses elementos pode ocasionar sérias doenças, tais como a anemia, por deficiência de ferro; retardamento do crescimento de crianças, por falta de zinco; e má formação óssea em crianças, por falta de cálcio (MASSABNI, 2006).

A própolis é um produto oriundo da vegetação da qual as abelhas retiram substâncias desejadas. Assim, pesquisadores analisaram própolis como indicador biológico de poluição ambiental, através da verificação dos teores de metais pesados (cádmio, cromo e chumbo). Estes metais são tóxicos e competem com os metais normalmente presentes na própolis, podendo causar sérios danos à saúde humana e animal (CONTI & BOTRÉ, 2001).

#### 1.5 ÓLEOS ESSENCIAIS

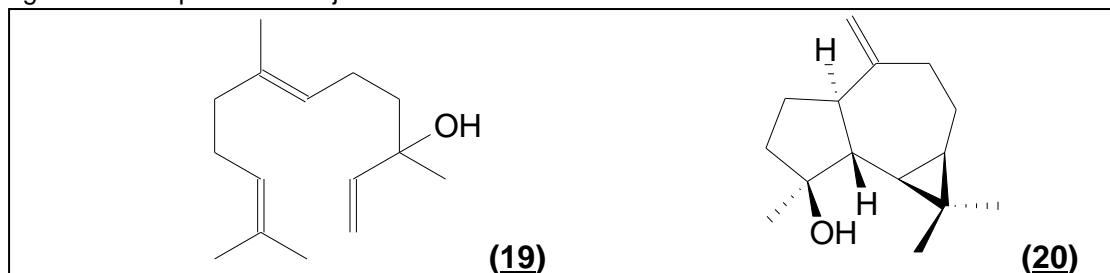
Os óleos essenciais são originados no metabolismo secundário das plantas, são constituídos por substâncias voláteis e estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal. Além disso, são os principais componentes

odoríferos encontrados nas plantas e exercem um papel fundamental na defesa contra microrganismos (CRAVEIRO et al., 1981; SIQUI et al., 2000). Foi estabelecido cientificamente que cerca de 60% dos óleos essenciais tem propriedades antifúngicas e 35% exibem propriedades antibacterianas (BHAVANANI; BALLOW, 1992). Os óleos essenciais extraídos das folhas de *Baccharis dracunculifolia* são produzidos para usos em perfumaria, possuindo alto valor para indústrias de fragrâncias (FERRACINI et al., 1995; VERDI et al., 2005).

Existem vários processos para extração de óleos essenciais, como a destilação por arraste de vapor e a hidrodestilação - utilizada nesse trabalho, e extração com fluido supercrítico. Para extração de óleos essenciais de plantas, a hidrodestilação é uma técnica bastante utilizada, com o equipamento conhecido como *Hidrodestilador* ou *Clevenger*, em que se usa água como solvente. A água evapora e arrasta os componentes voláteis presentes na própolis, e em seguida os componentes extraídos se condensam e o óleo é obtido.

A hidrodestilação pode proporcionar um rendimento de 1 a 2 % de óleo essencial, dependendo do tipo de amostra (CASSEL, 2001). Muitas substâncias encontradas nas amostras dos óleos essenciais de própolis verde têm um alto interesse econômico devido à sua atividade biológica. Assim como na sua fonte botânica, *Baccharis dracunculifolia*, são principalmente encontrados (*E*)-nerolidol **(19)** e espatulenol **(20)**, (Figura 7) de grande importância comercial (FERRACINI et al., 1995; CASSEL et al., 2000). Os óleos essenciais de *Baccharis* e própolis estão sujeitos a muitas variações em suas composições, devido a fatores climáticos e ambientais.

Figura 7 - Componentes majoritários no óleo essencial de *B. dracunculifolia*



## 2 HIPÓTESES

Neste trabalho é proposto o estudo da composição química dos óleos voláteis e extratos fenólicos de duas amostras de própolis.

A primeira hipótese é de que se trata de uma própolis verde: originada em *Baccharis dracunculifolia*, com presença de artepilin C, e óleos essenciais com vários componentes similares aos da planta, ácidos cafeoilquínicos e flavonoides.

A segunda hipótese é de que as amostras estudadas serão similares às própolis do Segundo Planalto do Paraná já analisadas, contendo baixa proporção de artepilin C.

A terceira hipótese é de que as duas amostras de própolis regionais estudadas serão similares entre si.

A quarta hipótese é de que a metodologia utilizada deverá levar a uma boa separação de extratos contendo substâncias fenólicas neutras (flavonoides) e substâncias ácidas (ácidos cafeoilquínicos).

A quinta hipótese é de que as análises de metais não deverão indicar a presença de metais pesados, pois normalmente a própolis não os apresenta. As análises poderão indicar os níveis de metais presentes.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver sequências metodológicas mais adequadas para a obtenção de extratos para isolamento preparativo e para análises químicas de amostras de própolis da Região dos Campos Gerais do Paraná.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar a composição química do óleo essencial nas duas amostras de própolis por cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas.

Trabalhar com uma metodologia diferenciada, nunca antes utilizada para obtenção dos extratos de amostras de própolis, na tentativa de melhorar a extração. Obter os extratos com diferentes solventes em diferentes pHs, isolar, identificar e determinar a estrutura de compostos fenólicos presentes nas duas amostras de própolis utilizando métodos espectroscópicos e cromatográficos.

Analisar, com uso de CCD, UV e RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , os extratos obtidos com acetato de etila em pH básico e pH ácido.

Determinar as quantidades de metais presentes nas duas amostras de própolis do Segundo Planalto do Paraná.

#### 4 JUSTIFICATIVA

É proposto o estudo químico de duas amostras de própolis da Região do Segundo Planalto do Paraná (Ponta Grossa e Ipiranga). A própolis brasileira já é amplamente estudada, mas devido à grande diversidade da vegetação, pode apresentar uma grande variabilidade nas suas características. A própolis da região de Ponta Grossa, conforme estudos realizados anteriormente têm origem em *Baccharis dracunculifolia* (CARDOZO, 2009). A própolis de Ipiranga não tem estudos químicos publicados até o momento.

A própolis está cada dia mais popular, as pessoas a estão consumindo como aditivo alimentar e medicamento. Por esse motivo considera-se importante a realização de análises químicas, visando um produto de melhor qualidade para consumo, e o incentivo a uma maior produção de própolis por parte dos produtores da nossa região, que são pressionados pela alta qualidade da própolis verde de São Paulo. Para que a produção de própolis seja intensificada, há necessidade de conhecimentos sobre os requisitos mínimos de qualidade. A própolis é um produto natural e as abelhas visitam uma grande variedade de vegetais em busca de substâncias para sua produção. A produção de própolis favorece ações destinadas à conservação do meio ambiente, pois amplia os horizontes da necessidade de preservação ambiental e proteção da vegetação característica de cada região.

Do ponto de vista científico, as própolis pouco estudadas podem guardar importantes características ainda desconhecidas, como substâncias novas com novas aplicações.

## 5 ESTRATÉGIAS

### 5.1 REAGENTES

Os solventes orgânicos utilizados na obtenção dos extratos e realização das análises constantes nesse trabalho foram todos com especificações P.A, sem tratamento prévio e de procedências variadas: Nuclear<sup>®</sup>, Merck<sup>®</sup>, Reagen<sup>®</sup> e Synth<sup>®</sup>. A água utilizada na obtenção dos óleos essenciais foi ultrapura filtrada com filtro Milli-Q.

### 5.2 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

As análises de cromatografia com camada delgada (CCD) foram realizadas em cromatofolhas de alumínio preparadas com sílica gel HF-254 (Macharey-Nagel), com indicador fluorescente. Os reveladores utilizados foram: exposição à luz ultravioleta de 254 nm e 365 nm; solução de 5% de FeCl<sub>3</sub> em MeOH; H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/MeOH 1:1 seguido de aquecimento sobre chapa metálica a 110°C por 5 minutos (WAGNER; BLADT; ZGAINSKI, 1983). Como fase móvel, utilizaram-se os solventes de grau PA clorofórmio, metanol e hexano, 100% ou em misturas de diversas proporções adequadas para cada caso.

As amostras de óleo essencial foram analisadas através de técnica de cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas e a um detector de ionização de chama (CG/EM/DIC), utilizando um cromatógrafo a gás Shimadzu GC-17A acoplado ao espectrômetro de massas QP5050A. As análises foram feitas em cooperação com a Universidade Federal de Sergipe, São Cristovão – SE.

### 5.3 ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS

As análises por espectrofotometria ultravioleta-visível, infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram realizadas na própria instituição, o que tem uma grande importância para o trabalho devido ao acesso facilitado a esses equipamentos. Através de parcerias com outras instituições foi possível a realização de diversas análises. As análises de absorção atômica foram realizadas em parceria

com a Universidade Estadual do Centro Oeste – UNICENTRO, através da professora Dr<sup>a</sup> Sueli Pércio Quináia. Os espectros de ultravioleta-visível foram medidos em espectrofotômetro CARY-100 Varian<sup>®</sup>, entre 200 e 400 nm.

Os espectros de Infravermelho foram obtidos em equipamento da marca Shimadzu<sup>®</sup>, IR Prestige-21 com Transformada de Fourier, que usa o software IR Solution<sup>®</sup>. Foram utilizadas pastilhas de KBr (100 mg mais 2 mg de amostra), medindo-se na faixa de 4.000 cm<sup>-1</sup> a 400 cm<sup>-1</sup>.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C foram registrados em espectrômetro Bruker de 400 MHz. Utilizou-se CDCl<sub>3</sub> como solvente e tetrametilsilano (TMS) como referência interna, mantendo-se a temperatura constante durante os experimentos.

Na determinação de metais, utilizou-se um espectrômetro de absorção atômica Varian AA-220, equipado com lâmpada de deutério como corretor de fundo. Soluções estoque dos elementos avaliados foram preparadas com concentrações 1,000 mg L<sup>-1</sup> (SpecSol, NISTUSA).

#### 5.4 COLETA DE AMOSTRAS

Na realização deste trabalho foi utilizada a relação já estabelecida com produtores locais, os apicultores, com nosso grupo de pesquisas. Este trabalho se propõe a estudar amostras de própolis obtidas por produtores locais, o que facilita a obtenção e realização.



## 6 MÉTODOS

### 6.1 COLETA

As amostras de própolis utilizadas para as análises foram coletadas aproximadamente 1kg de cada uma delas entre os anos de 2009 e 2012, sendo a primeira da região de Ipiranga-PR, codificada como própolis 1 (P1), e a segunda proveniente de Ponta Grossa-PR, codificada como própolis 2 (P2), ambas do Segundo Planalto do Paraná. As amostras foram acondicionadas em embalagens plásticas e armazenadas a -18°C até o momento da análise.

### 6.2 OBTENÇÃO E ANÁLISE DE ÓLEOS ESSENCIAIS

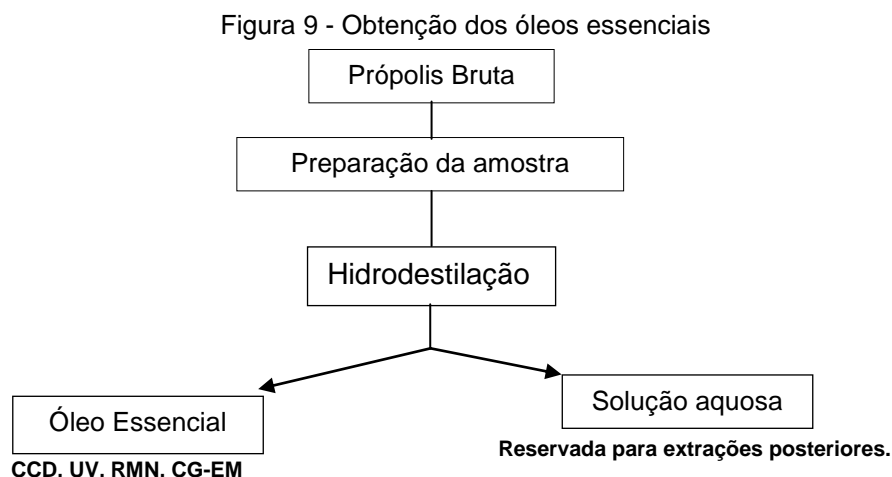
Aproximadamente 100 gramas de cada amostra de própolis em triplicada depois de limpas e trituradas, foram submetidas à hidrodestilação por 2 horas, 2,5 horas e 3 horas em um balão de 2 litros contendo 1 litro de água destilada acoplado a uma aparelhagem de vidro (Figura 8) construída conforme as medidas recomendadas por STAHL & SCHILD (1981). Cada uma das 18 amostras de óleos essenciais foi separada da água condensada com uso de éter etílico, por decantação.

Figura 8 - Foto do hidrodestilador utilizado.



Fonte: NUNES, 2011.

O éter etílico utilizado como solvente foi evaporado na temperatura ambiente por 24 horas. Os rendimentos de cada óleo essencial foram calculados com relação à quantidade de própolis utilizada. A Figura 9 mostra o fluxograma da obtenção dos óleos essenciais.



As amostras de óleo essencial foram submetidas à análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e a um detector de ionização de chama (CG/EM/DIC). Foi utilizada uma coluna capilar DB5-MS (30 m x 0,25 mm; espessura do filme 0,25  $\mu\text{m}$ ), temperatura do injetor: 250 °C, temperatura da interface: 300 °C. Utilizou-se o seguinte programa de aquecimento: temperatura inicial de 60 °C (3 min), aquecimento de 6 °C  $\text{min}^{-1}$  até 240 °C permanecendo nesta temperatura por 5 min. Foi utilizado hélio como gás de arraste com fluxo constante de 1,2  $\text{mL min}^{-1}$  e injeção em modo *split* com razão de 1:50. O espectrômetro operou em modo de varredura (*scan*) de 40 a 550 *u.m.a.* por impacto de elétrons (70 eV). A identificação dos constituintes foi realizada por meio de análise dos espectros de massas utilizando as bibliotecas de espectros NIST107, NIST21, WILEY8, e comparação com espectros da literatura. Foram calculados os Índices de Retenção Relativos (Índices de Kovats, IRRs), utilizando a série de n-alcenos de C<sub>9</sub> a C<sub>23</sub> e comparados com os IRRs publicados (ADAMS, 1995; PHEROBASE, 2013). A quantificação relativa dos componentes de cada óleo essencial foi feita com base nos cromatogramas obtidos com o detector de ionização de chamas (DIC). Os

resultados de todas as análises de óleos essenciais realizadas nesta pesquisa são apresentados nos itens 7.1.1 e 7.2.1.

### 6.2.1 Componente isolado do óleo essencial da própolis P2

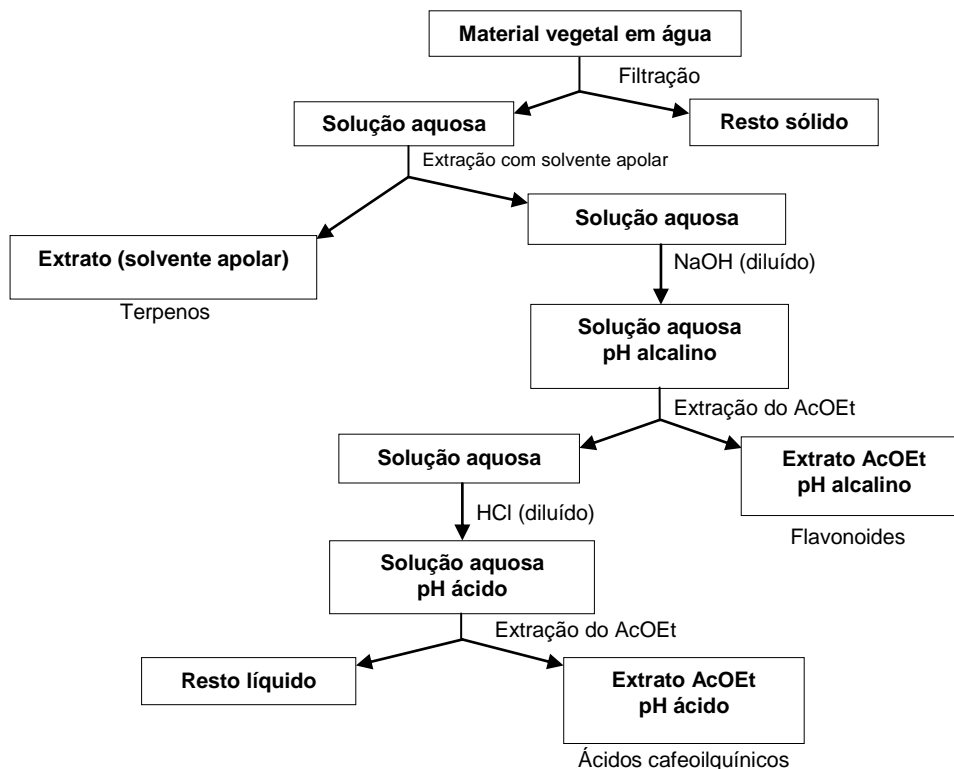
Antes do isolamento foram realizadas análises por CCD sobre placas de sílica HF 254 Merck<sup>®</sup> como fase estacionária e eluente constituído por CHCl<sub>3</sub> 100%. As placas foram visualizadas sob luz ultravioleta em 250 e 360 nm e reveladas com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: MeOH (1:1), e posterior aquecimento sobre chapa metálica. O isolamento do componente foi realizado por extração em funil de decantação. A amostra (aproximadamente 17 mg) de óleo essencial da P2, foi diluída em 10 ml de NaOH de 10% e aquecida durante 10 min sob agitação constante. Em seguida a solução aquosa básica foi extraída com três porções de 20 mL de CHCl<sub>3</sub>. A solução aquosa restante foi acidificada até pH 4 com HCl concentrado, extraída com três porções de 20 mL CHCl<sub>3</sub>. As fases clorofórmicas foram reunidas, lavando-se com três porções de 10 mL de H<sub>2</sub>O destilada. Em seguida a fase orgânica foi secada com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, filtrada e o solvente foi evaporado em evaporador rotativo obtendo-se o componente isolado (6mg).

### 6.3 OBTENÇÃO DE EXTRATOS CONTENDO FENÓIS

Após a obtenção de cada óleo essencial, a solução aquosa restante no balão foi então filtrada, o material sólido foi descartado, e do líquido restante foram retirados 20 mL para liofilizar. O restante de cada solução aquosa então foi colocado em um funil de separação, onde foi submetido à extração com 3 porções consecutivas de 300 mL, 250 mL e 200 mL, de CHCl<sub>3</sub>. As fases orgânicas obtidas foram reunidas para lavagem e secagem com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, o solvente foi evaporado em evaporador rotativo obtendo-se os extratos clorofórmicos. Após as extrações com CHCl<sub>3</sub>, a solução aquosa teve o pH elevado até 8 com NaOH 5M, extraindo-se em funil de separação com 3 porções consecutivas de 150 mL de AcOEt, para obtenção de extratos contendo substâncias neutras (AcOEt<sup>pH8</sup>). As fases orgânicas foram reunidas e permaneceram em repouso por várias horas para

separação completa da água, os extratos foram concentrados e os seus rendimentos calculados. Em seguida cada solução aquosa básica restante foi acidificada até pH 4 com HCl concentrado e extraída com três porções de 250 mL de AcOEt evaporando-se para obter os extratos AcOEt em pH 4 (AcOEt<sub>pH4</sub>). A Figura 10 mostra o fluxograma de obtenção de todos os extratos. Com uma das amostras da P2, antes da obtenção dos extratos AcOEt<sub>pH4</sub>, foi realizada uma extração com 250 mL de éter etílico, obtendo-se o extrato etéreo em pH 4. A solução de éter etílico foi secada com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, o solvente foi evaporado em capela, na temperatura ambiente por aproximadamente 24 horas. Os rendimentos de todos os extratos contendo substâncias sólidas são apresentados nos itens 7.1.3 e 7.2.4.

Figura 10 - Esquema geral para a obtenção de todos os extratos



### 6.3.1 Fracionamento do extrato obtido com AcOEt em pH 4 da P1

O extrato AcOEt<sub>pH4</sub> (1,03 g) foi fracionado numa coluna cromatográfica de sílica gel 60 com partículas de 0,040 a 0,063 mm, com altura 22 cm e diâmetro de 4 cm (Figura 11). Foram coletadas 57 frações e identificadas 3 substâncias como mostrado na Tabela 3.

Figura 11 - Fracionamento do extrato AcOEt<sub>pH4</sub> da P1



Fonte: NUNES, 2011.

Tabela 2 - Coluna de fracionamento do extrato AcOEt<sub>pH4</sub> da P1

Fração	Volume do eluente	Eluente	Componentes identificados	Identificação
1 a 5	5 x 50 mL	CHCl <sub>3</sub> /MeOH 10%		
6 a 10	5 x 50 mL	CHCl <sub>3</sub> /MeOH 10%	ácido <i>para</i> -hidroxicinâmico	CCD, IV, RMN
11 a 30	20 x 50 mL	CHCl <sub>3</sub> /MeOH 10%		
31 a 39	9 x 50 mL	AcOEt		
40	50 mL	AcOEt/HCOOH 2%		
41 a 50	10 x 30 mL	AcOEt/HCOOH 2%	3,5-dicafeoilquinico	CCD
51 e 52	2 x 30 mL	AcOEt/HCOOH 2%		
53 a 55	3 x 30 mL	AcOEt/HCOOH 2%	4,5-dicafeoilquinico	CCD
56 e 57	2 x 30 mL	AcOEt/HCOOH 2%		

Fração 6-10:

CCD: Figura 20, item 7.1.4.

Espectro IV (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3.381; 2.962; 1.674; 1.448 e 1.421 (Figura 21).

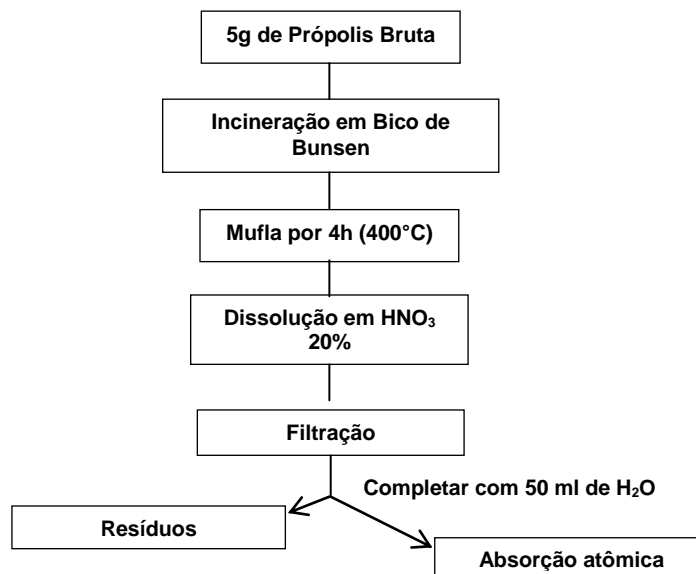
RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C: Anexo 3.

gCOSY: Figura 22, item 7.1.4.

## 6.4 DETERMINAÇÃO DE METAIS POR ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA

Foram quantificados os metais Na, Mn, Ca, Al, Mg, K, Fe, Zn, Cu, Cd, Cr e Pb nas própolis brutas, amostras A e B, por meio de espectroscopia de absorção atômica em modo chama (FAAS). Amostras em triplicatas de 5 g de cada própolis bruta triturada foram calcinadas em bico de Bunsen em seguida levadas a mufla por 4h a 400 °C. As cinzas foram dissolvidas em ácido nítrico 20% v/v em placa quente. Como ainda restaram alguns resíduos carbonáceos, as soluções resultantes foram filtradas em papel de filtro quantitativo e os filtrados foram transferidos para balões volumétricos de 50 mL cujo volume foi ajustado com água deionizada. O fluxograma da preparação da amostra de própolis bruta para análise por FAAS é mostrado na Figura 12.

Figura 12 - Preparação das amostras para análise quantitativa de metais por FAAS



## 7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 7.1 ANÁLISES DA PRÓPOLIS DE IPIRANGA (P1)

#### 7.1.1 Análise do óleo essencial de P1

Os resultados das análises dos componentes do óleo essencial obtido por hidrodestilação em 2 horas, 2,5 horas e 3 horas tem seus rendimentos comparados na Tabela 3. Não encontramos motivos aparentes para as variações observadas nos rendimentos dos óleos essenciais, quando são comparados os tempos de duração das hidrodestilações ou as amostras das triplicatas.

Tabela 3 - Rendimentos dos óleos essenciais de própolis

Óleo	Hidrodestilação (h)	1°	2°	3°	Massa*	Rendimento %
		g				
P1						
P11	2,0	0,131	0,123	0,148	0,131±0,01	0,13
P12	2,5	0,123	0,109	0,144	0,123±0,01	0,12
P13	3,0	0,186	0,097	0,099	0,099±0,03	0,10

\* Massa: média das triplicatas. P: Própolis; P11, P12, P13.

Os óleos essenciais obtidos a partir da amostra de própolis de Ipiranga (P1) foram inicialmente analisados por CCD, utilizando-se clorofórmio como eluente e revelando-se com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/MeOH (1:1), seguido de aquecimento sobre chapa. A análise revelou um componente principal com coloração levemente azulada com R<sub>f</sub> = 0,37 (Figura 13). Com base na análise de CG/EM, 22 constituintes foram identificados na P1 e são apresentados na Tabela 4. Os componentes estão apresentados por ordem de eluição na coluna DB5, o perfil cromatográfico da amostra de P1 no CG/EM encontra-se na Figura 14. A hidrodestilação desta amostra de própolis deu origem a um óleo resinoso com odor forte e bastante característico apresentando uma coloração amarelada. O componente principal observado nas amostras por CCD foi identificado nas análises por CG-EM como espatulenol (**20**), com (13,80, 14,04 e 19,63%). Dentre os componentes principais, o (*E*)-nerolidol (**19**) (14,02, 10,77 e 12,49%) também foi observado anteriormente em grandes

proporções em óleos essenciais de própolis verde e de *Baccharis dracunculifolia* (MARCUCCI, 1995; BANKOVA et al., 1999; PARK et al., 2000).

Além destes, outros sesquiterpenos principais do óleo essencial da P1 são o viridiflorol (3,84, 5,10 e 4,67%) e o  $\alpha$ -cadinol (2,59, 2,23 e 5,08%). Os monoterpenos se apresentaram em menor proporção e, dentre os monoterpenos oxigenados, os que apresentaram maior concentração foram terpinen-4-ol (2,1, 1,42 e 1,63%) e o  $\alpha$ -terpineol (4,2, 2,73 e 2,33%). Tendo em vista que as triplicatas hidrodestiladas foram preparadas de forma idêntica a partir de uma mesma amostra de P1, pode-se colocar a hipótese de que as variações das concentrações relativas observadas entre os componentes químicos (Tabela 4) estejam relacionadas aos tempos de duração dos experimentos. No caso da acetofenona, por exemplo, pode-se supor que o tempo de 2 horas de hidrodestilação tenha sido insuficiente para atingir o rendimento observado com o tempo de 2,5 horas, podendo ter havido decomposição com o tempo de 3 horas.

Figura 13 – CCD do óleo essencial da P1, placa de sílica gel eluída com  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (99:1) mostrando os componentes marcados sob luz UV de 254 nm e revelação com  $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$  seguida de aquecimento em chapa quente a 110 °C por 5 minutos

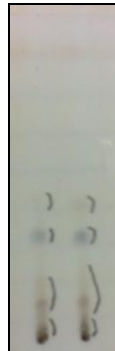


Figura 14 – Cromatogramas obtidos nas análises por CG/EM dos óleos essenciais da P1 hidrodestilados em três durações diferentes: P11, 2 horas; P12, 2,5 horas; P13, 3 horas

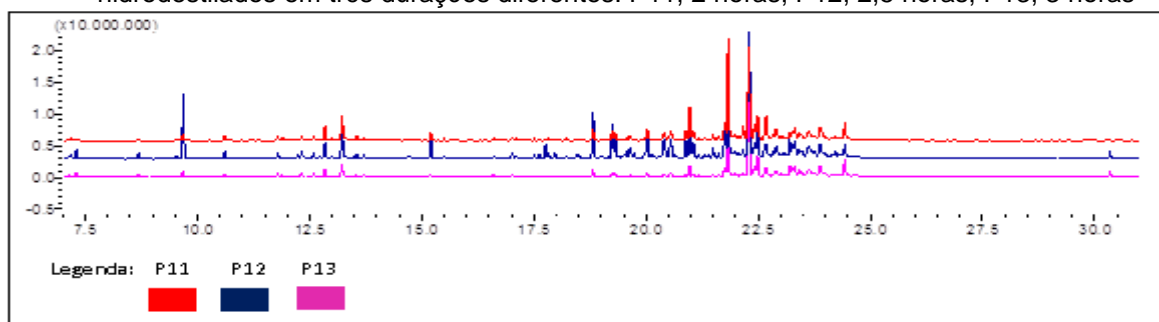




Tabela 4 - Porcentagens relativas dos componentes identificados nos óleos essenciais da P1 por CG/EM/DIC

COMPONENTES	P11 (2,0 horas)	P12 (2,5 horas)	P13 (3,0 horas)	* IRR <sub>Calc</sub>	** IRR <sub>Lit</sub>
$\alpha$ -Pineno	-	-	1,14	933	939
$\beta$ -Pineno	0,86	0,77	0,81	974	980
Acetofenona	0,96	5,54	1,04	1066	1065
Linalool	0,66	-	-	1099	1098
<i>trans</i> -Pinocarveol	0,83	-	0,80	1043	1139
Terpinen-4-ol	2,10	1,42	1,63	1182	1177
$\alpha$ -Terpineol	4,20	2,73	2,33	1196	1189
Verbenona	0,68	-	-	1209	1204
$\alpha$ -Copaeno	-	1,41	-	1380	1376
$\beta$ -Cariofileno	1,61	4,33	1,44	1425	1418
Aromadendreno	1,37	3,39	0,93	1444	1439
$\gamma$ -Muuroleno	2,16	3,51	0,66	1479	1477
$\alpha$ -Muuroleno	1,37	2,79	-	1502	1499
$\delta$ -Cadineno	-	4,32	2,44	1522	1524
$\alpha$ -Calacoreno	-	1,01	-	1546	1548
( <i>E</i> )-Nerolidol	14,02	10,77	12,49	1562	1564
Espatuleno	13,80	14,04	19,63	1578	1576
Viridiflorol	3,84	5,10	4,67	1590	1590
Cubenol	0,63	0,57	0,64	1641	1642
$\alpha$ -Cadinol	2,59	2,23	5,08	1650	1653
Cadaleno	0,57	0,57	3,47	1679	1674
$\alpha$ -Bisabolol	2,81	1,56	3,47	1689	1683
<b>Monoterpenos</b>					
<b>não oxigenados</b>	0,86	0,77	1,95		
<b>Monoterpenos</b>					
<b>oxigenados</b>	9,43	9,69	5,80		
<b>Sesquiterpenos</b>					
<b>não oxigenados</b>	7,08	21,33	8,94		
<b>Sesquiterpenos</b>					
<b>oxigenados</b>	37,69	34,27	45,98		
<b>Total</b>	55,08	66,06	62,67		
<b>Rendimentos dos</b>					
<b>óleos essenciais</b>	0,13	0,12	0,10		

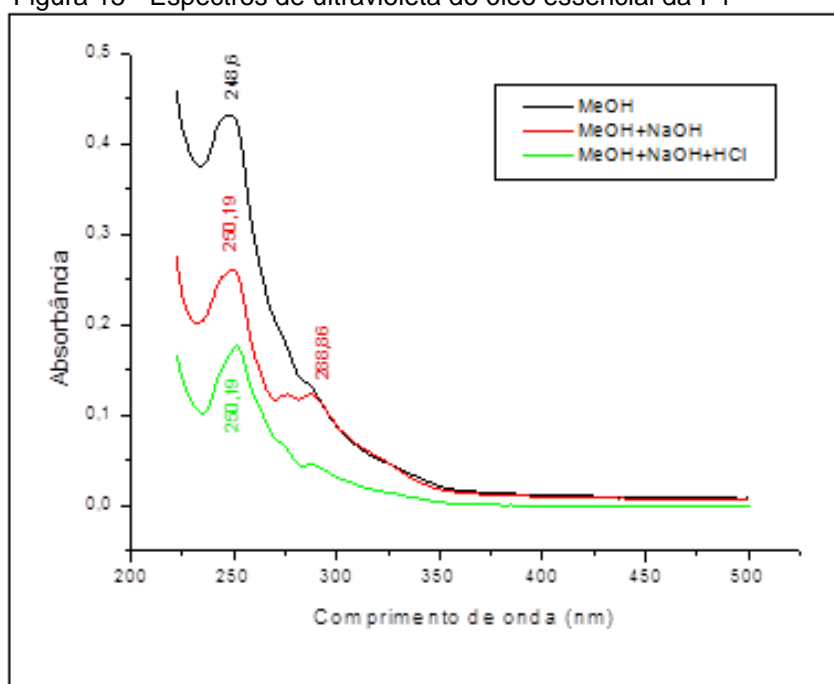
\* IRR<sub>cal</sub> = índices de retenção relativa calculados; \*\* IRR<sub>lit</sub> = dados publicados (ADAMS, 1995).

Diferenças com relação às concentrações relativas de componentes de óleos essenciais obtidos em diferentes tempos de hidrodestilação são pouco estudadas. Se adotarmos métodos mais criteriosos nas fases de coleta, preparação e análise, estas diferenças podem ser minimizadas. No presente estudo, apesar do cuidado

crítico na metodologia aplicada para a obtenção dos óleos essenciais de própolis, ainda assim observaram-se diferenças nos rendimentos e nas composições.

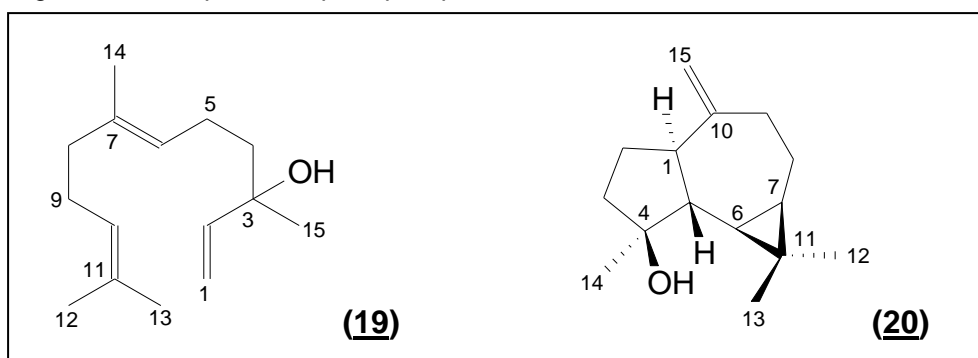
As análises no ultravioleta foram realizadas primeiro em MeOH, em seguida com adição de solução diluída de NaOH e por fim repetido com acidificação de HCl. Observa-se nos espectros medidos (Figura 15) que uma absorção em torno de 250 nm aparece nos três espectros. A adição de NaOH leva ao surgimento de bandas de absorção em torno de 275 nm e 288 nm, as quais podem ser devidas a compostos fenólicos não identificados (Tabela 6) presentes em baixas proporções, o que se confirma pelo espectro obtido após a adição de HCl.

Figura 15 - Espectros de ultravioleta do óleo essencial da P1



Os componentes majoritários mostrados na Figura 16, espatulenol (**20**) e o (*E*)-nerolidol (**19**), foram confirmados por RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  pelos deslocamentos químicos mostrados na Tabela 5 e na Tabela 6 (espectros mostrados nos Anexo 1).

Figura 16 - Componentes principais presentes nos óleos essenciais da P1

Tabela 5 - Deslocamentos químicos atribuídos nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  para o espatulenol **(20)** presente no óleo essencial da própolis P1 em comparação com dados publicados

C/H	RMN $^1\text{H}$ ( $\delta$ )		RMN $^{13}\text{C}$ (ppm)	
	<b>(20)</b>	REF	<b>(20)</b>	REF
<b>1 CH</b>	-	-	54,31	54,3
<b>2 CH<sub>2</sub></b>	-	-	26,70	26,7
<b>3 CH<sub>2</sub></b>	-	-	41,72	41,7
<b>4 C</b>	-	-	81,07	80,9
<b>5 CH</b>	-	-	53,40	53,3
<b>6 CH</b>	0,46 dd J = 11,2 e 9,6 Hz	0,46 dd J = 11,2 e 9,5 Hz	29,92	29,9
<b>7 CH</b>	0,72 ddd J = 11,2; 9,5 e 6,4 Hz	0,72 ddd J = 11,2; 9,5 e 6,1 Hz	27,39	27,4
<b>8 CH<sub>2</sub></b>	-	-	24,78	24,8
<b>9 CH<sub>2</sub></b>	-	-	38,86	38,8
<b>10 C</b>	-	-	153,40	153,4
<b>11 C</b>	-	-	20,08	20,2
<b>12 CH<sub>3</sub></b>	1,05 s	1,05 s	28,65	28,6
<b>13 CH<sub>3</sub></b>	1,08 s	1,06 s	16,31	16,2
<b>14 CH<sub>3</sub></b>	1,28 s	1,28 s	26,02	26,0
<b>15a CH<sub>2</sub></b>	4,69 s	4,69 s	106,27	106,0
<b>15b CH<sub>2</sub></b>	4,66 s	4,66 s		

REF = MOREIRA et al., 2007.

Klopell e colaboradores (2007) analisaram o óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* e encontraram como componente majoritário o (*E*)-nerolidol **(19)** (23,4%). Também no trabalho de Parreira e colaboradores (2010), o óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia*, a fonte vegetal da própolis verde, tem como principais componentes os mono- e sesquiterpenos (*E*)-nerolidol **(19)** (33,51%) e o espatulenol **(20)** (16,24%).

Tabela 6 - Deslocamentos químicos atribuídos nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  para (*E*)-nerolidol (**19**) presente no óleo essencial da própolis P1 em comparação com dados publicados

C/H	RMN $^1\text{H}$ ( $\delta$ )		RMN $^{13}\text{C}$ (ppm)	
	( <b>19</b> )	REF	( <b>19</b> )	REF
<b>1</b> CH <sub>2</sub>	5,23-5,04 m	5,24-5,04 m	111,36	111,0
<b>2</b> CH	5,92 dd, J=11Hz	5,92 dd	145,03	144,7
<b>3</b> C	-	-	73,55	72,8
<b>4</b> CH <sub>2</sub>	-	1,62-1,45	42,06	41,9
<b>5</b> CH <sub>2</sub>	2,10-1,90 m	2,10-1,90 m	22,36	22,4
<b>6</b> CH	5,23-5,04 m	5,24-5,04 m	124,21	124,2
<b>7</b> C	-	-	133,87	134,4
<b>8</b> CH <sub>2</sub>	2,10-1,90 m	2,10-1,90 m	39,46	39,4
<b>9</b> CH <sub>2</sub>	2,10-1,90 m	2,10-1,90 m	26,50	26,4
<b>10</b> CH	5,23-5,04 m	5,24-5,04 m	124,21	124,2
<b>11</b> C	-	-	130,90	130,4
<b>12</b> CH <sub>3</sub>	1,68 s	1,68 s	17,66	17,3
<b>13</b> CH <sub>3</sub>	1,59 s	1,60 s	25,70	25,3
<b>14</b> CH <sub>3</sub>	1,59 s	1,60s	16,00	15,6
<b>15</b> CH <sub>3</sub>	1,26 s	1,28 s	27,39	27,3

REF = SUAREZ, 2002.

A composição química do óleo essencial de própolis pode apresentar grandes variações dependendo da região de coleta. Os óleos essenciais das própolis de regiões tropicais contêm sesquiterpenos que não são encontrados em amostras de zonas temperadas, como por exemplo, o espatulenol (BANKOVA et al., 2000). Outras variações podem ocorrer na composição química dos componentes voláteis devido à época do ano em que a própolis foi produzida, pois as plantas em que as abelhas colhem as resinas podem estar em diferentes etapas de crescimento.

#### 7.1.2 Análise dos extratos clorofórmicos da P1

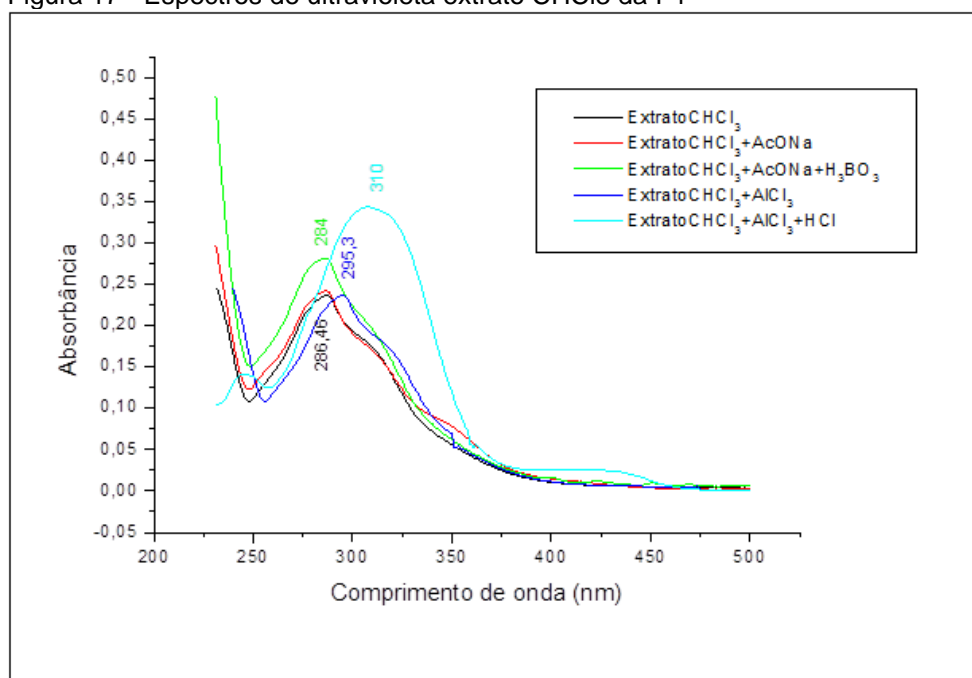
Os rendimentos dos extratos  $\text{CHCl}_3$  obtidos a partir das águas restantes após as hidrodestilações da amostra de própolis P1 são mostrados na Tabela 7. Além da duração da hidrodestilação, diversos outros fatores podem estar interferindo nos rendimentos obtidos para os extratos clorofórmicos como, por exemplo, a formação de emulsão durante a extração líquido-líquido.

Tabela 7- Rendimentos dos extratos clorofórmicos da P1

Amostra	Rendimento %
P11 (2,0 horas)	0,61
P12 (2,5 horas)	0,56
P13 (3,0 horas)	0,68

P11, P12, P13: própolis de Ipiranga.

Os espectros de ultravioleta dos extratos  $\text{CHCl}_3$  são mostrados na Figura 17. Foram utilizados os reagentes de deslocamento de absorções normalmente recomendados para a localização de grupos hidroxila em esqueletos flavonoídicos (MARKHAM, 1982). Observou-se apenas um deslocamento de cerca de 10 nm na principal banda de absorção após a adição de HCl, mas não foi encontrada uma explicação específica para o caso.

Figura 17 - Espectros de ultravioleta extrato  $\text{CHCl}_3$  da P1

### 7.1.3 Análise dos extratos da P1 obtidos com acetato de etila

Os compostos fenólicos são bastante estudados devido às suas propriedades antioxidantes, como na inibição da oxidação lipídica e da proliferação

de fungos (SOARES, 2002; SOUSA et al., 2007). A identificação da presença dos compostos fenólicos nesta pesquisa é feita em extratos obtidos em pH 8 (AcOEt<sub>pH8</sub>) e em pH 4 (AcOEt<sub>pH4</sub>).

Os rendimentos obtidos para os extratos AcOEt<sub>pH8</sub> e AcOEt<sub>pH4</sub> são mostrados na Tabela 8. Diversos problemas podem ocorrer durante a aplicação dessa técnica de extração e separação de classes de compostos fenólicos como, por exemplo, a formação de emulsões em pH básico, o que dificulta a explicação das variações observadas entre os rendimentos obtidos nos extratos AcOEt<sub>pH8</sub>. Parece mais certo interpretar que o fator duração da hidrodestilação tenha afetado os rendimentos dos extratos AcOEt<sub>pH4</sub>, podendo ter ocasionado decomposição de componentes ácidos presentes na própolis, o que poderia ser melhor compreendido com uso de análises destes extratos por CLAE. Em alguns casos, adicionar uma solução saturada de NaCl ao extrato aquoso pode diminuir ou eliminar completamente a formação de emulsões. O pH 8 é obtido para que os flavonoides e demais substâncias neutras sejam separados dos ácidos cafeoilquínicos. Quando o extrato aquoso em pH 8 é acidificado, os ácidos orgânicos podem ser extraídos para a camada orgânica.

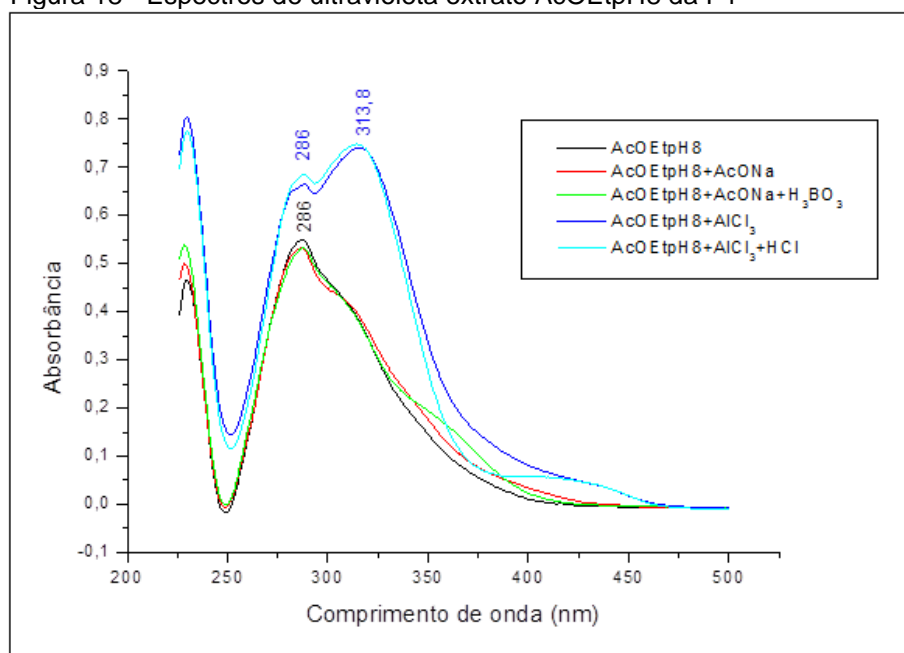
Tabela 8 - Rendimentos dos extratos AcOEt<sub>pH8</sub> e AcOEt<sub>pH4</sub> da própolis P1

Amostra	Rendimento %	
	AcOEt <sub>pH8</sub>	AcOEt <sub>pH4</sub>
P11	0,60	1,03
P12	0,87	0,93
P13	0,69	0,78

\* P11, P12, P13: própolis de Ipiranga.

Para análise dos compostos fenólicos presentes na própolis, tanto flavonoides como ácidos fenólicos, a utilização da técnica UV-VIS é um dos parâmetros físico-químicos mais utilizados (MIYATAKA et al., 1997; KUMAZAWA et al., 2004). O espectro de ultravioleta obtido em pH 8 com AcOEt, mostrado na Figura 18, é típico de flavanonas (ou dihidroflavonol) (MARKHAM, 1982), podendo-se supor a ocorrência de um composto majoritário pertencente a esta classe de flavonoides.

Figura 18 - Espectros de ultravioleta extrato AcOEt pH8 da P1

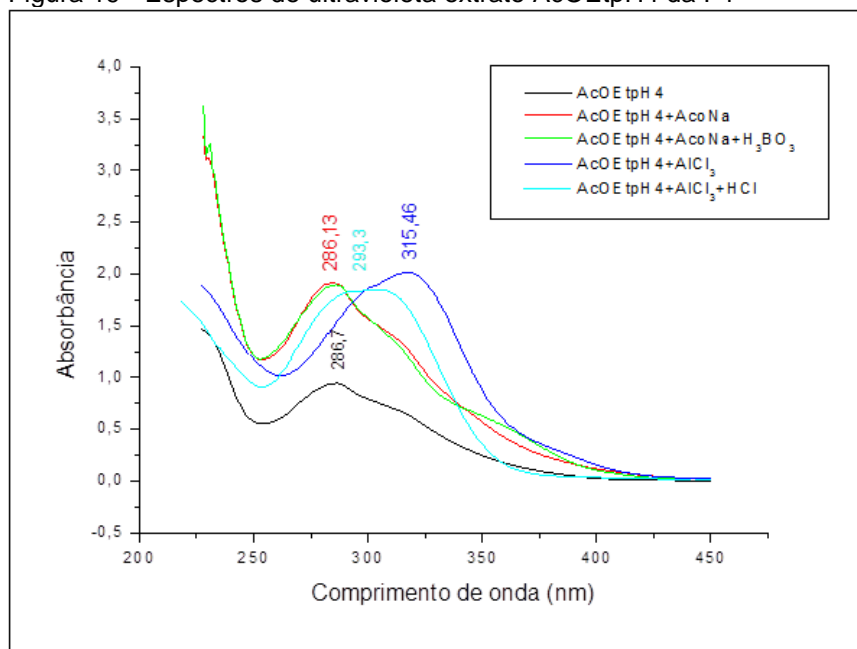


Analisando-se os espectros de UV obtidos, não se observa alteração com a adição de AcONa, o que indica a inexistência de grupo C<sub>7</sub>-OH, possivelmente 7-metoxil ou 7-O-glicosil que são os substituintes mais comuns. Com a adição de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, não ocorreu alteração do deslocamento o que indica a inexistência de grupos C<sub>6,7</sub>-di-OH ou C<sub>7,8</sub>-di-OH, ligados ao anel aromático A (vide Figura 3, item 1.4.1). Com a adição de AlCl<sub>3</sub> ocorreu um aumento da intensidade do ombro observado em cerca de 313 nm, efeito que não se alterou com HCl. Estes resultados são de difícil interpretação, especialmente por se tratar de um extrato bruto.

Depois da extração em pH 8, o pH da solução aquosa foi levado até 4 com adição de HCl, extraído-se novamente com AcOEt (rendimentos na Tabela 8). Os extratos obtidos em pH4 com AcOEt, apresentaram espectros de UV mostrados na Figura 19, típicos de ácidos cafeoilquínicos como observado em diversas pesquisas desenvolvidas em nosso laboratório.

Nos espectros de UV dos extratos em pH 4 não ocorreu deslocamento após adição de AcONa e H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>. Um complexo é formado com a adição de AlCl<sub>3</sub> com deslocamento de cerca de 30 nm em relação ao espectro em MeOH. O complexo formado pelo AlCl<sub>3</sub> é desfeito pelo HCl, confirmando que provavelmente se trata de grupos *orto*-di-OH como os que estão presentes nos ácidos cafeoilquínicos.

Figura 19 - Espectros de ultravioleta extrato AcOEt pH4 da P1



O espectro de RMN  $^1\text{H}$  do extrato AcOEt pH4 apresenta-se bastante complexo, pela presença de vários ácidos cafeoilquínicos e do ácido *para*-hidroxicinâmico como componente principal. São observados dois dubletos em  $\delta$  6,81 ( $J = 8,38\text{Hz}$ ) e em  $\delta$  7,43 ( $J = 8,38\text{Hz}$ ) correspondentes aos quatro hidrogênios do anel *para*-substituído do ácido *para*-hidroxicinâmico. Observa-se também os dubletos em  $\delta$  6,33 ( $J = 16\text{Hz}$ ) e em  $\delta$  7,60 ( $J = 16\text{Hz}$ ) atribuíveis aos hidrogênios *trans* da dupla ligação (Anexo 2).

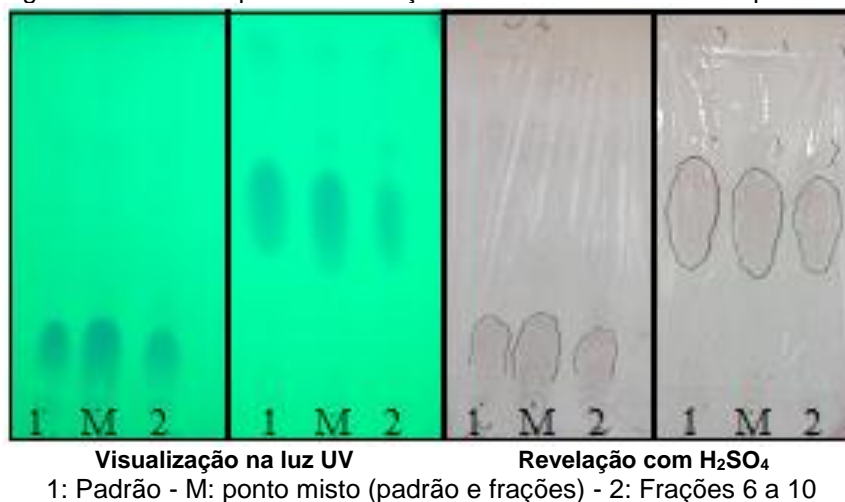
#### 7.1.4 Fracionamento do extrato da P1 obtido com AcOEt em pH4

O extrato AcOEt pH4 foi submetido a fracionamento em coluna cromatográfica (item 6.3.1, na Tabela 4). Para acompanhamento da coluna foram realizadas análises por CCD, que confirmaram a presença de dois ácidos cafeoilquínicos comparados com padrões, os ácidos 3,5-dicafeoilquínico e 4,5-dicafeoilquínico. O fracionamento do extrato AcOEt pH4 permitiu o isolamento do ácido *para*-hidroxicinâmico (**14**) nas frações reunidas 6-10. A substância isolada foi submetida a análises de CCD em comparação com o padrão usando dois eluentes,



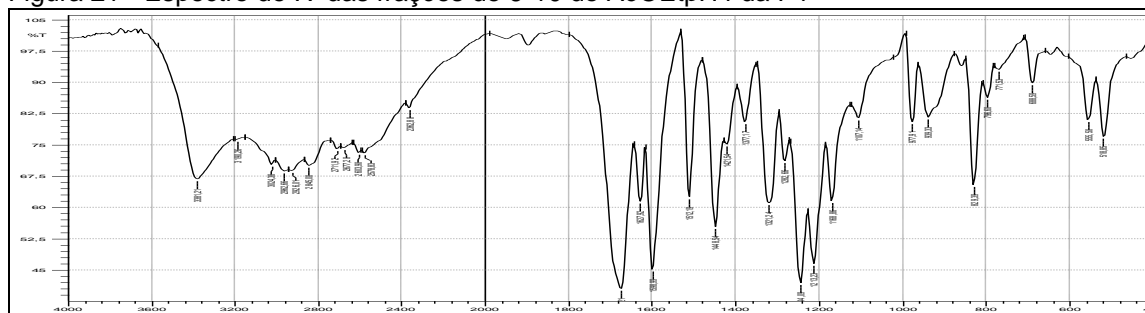
$\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  5% e  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  10%. Os cromatogramas são mostrados na Figura 20.

Figura 20 - Cromatoplas das frações reunidas 6-10 do AcOEt $\text{pH}4$  da P1



No espectro de IV da substância isolada (Figura 21) apresentou as bandas de absorção características de ácidos carboxílicos entre  $3.600$  e  $2400\text{ cm}^{-1}$ . A banda com máximo em  $3.381\text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuída à hidroxila fenólica, e em  $1.674\text{ cm}^{-1}$  à carbonila  $\alpha,\beta$ -insaturada. As vibrações das ligações duplas  $\text{C}=\text{C}$  aparecem como banda de absorção forte em  $1.598\text{ cm}^{-1}$ . Todas as absorções observadas no espectro de IV da substância isolada são encontradas no espectro publicado on-line (AIST, 2013).

Figura 21 - Espectro de IV das frações de 6-10 do AcOEt $\text{pH}4$  da P1

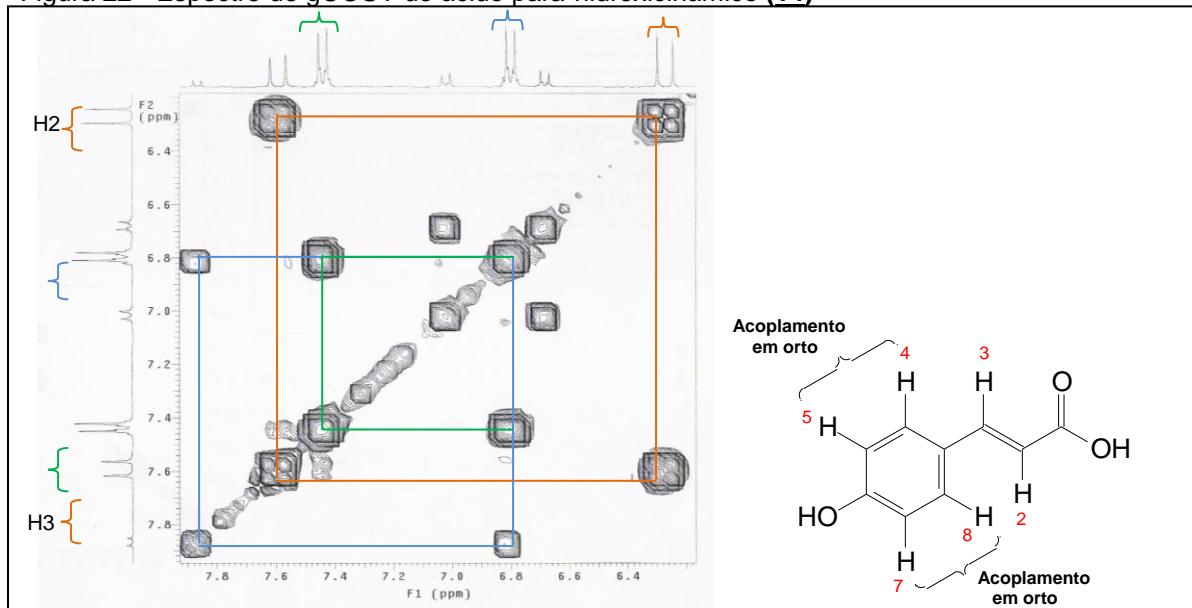


Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  confirmaram a estrutura do ácido *para*-hidroxicinâmico isolado. São observados os dois dubletos dos prótons do anel aromático, um em  $\delta$  7,43 ( $J = 8,8\text{Hz}$ ) referente aos prótons H5 e H7 e o outro em  $\delta$  6,80 ( $J = 8,8\text{Hz}$ ) correspondentes aos prótons H4 e H8. Os dubletos em  $\delta$  7,60 ( $J = 15,7\text{Hz}$ ) e  $\delta$  6,30 ( $J = 15,7\text{Hz}$ ) são atribuídos aos prótons acoplados em disposição *trans* H3 e H2, respectivamente. Esta relação é observada no espectro gCOSY (Figura 22). O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  DEPT confirmou a presença dos grupos CH, e confirmou a presença de três carbonos quaternários em  $\delta$  171,03 ppm ( $\text{C}_1$ ),  $\delta$  127,20 ppm ( $\text{C}_4$ ) e  $\delta$  161,14 ppm ( $\text{C}_7$ ).

Considerando todas as análises discutidas foi confirmada a presença do ácido *para*-hidroxicinâmico como principal constituinte ácido da própolis P1. O ácido *para*-hidroxicinâmico é muito importante, já que pesquisas recentes demonstraram seus efeitos benéficos em termos de atividade antioxidante, inibição da melanogênese, reabsorção óssea, propriedades protetoras dos ossos, podendo ser utilizado como componente para diminuir o risco de osteoporose (YAMAGUCHI, 2008; LEE et al., 2012; YAMAGUCHI et al., 2012). Também pode ser utilizado como ingrediente ativo em um alimento potencialmente funcional ou material alimentar para prevenir doenças diabéticas (MASAYOSHI, 2008).

A presença do ácido clorogênico (**18**), ácido 3,5-dicafeoilquínico (**16**) e do ácido 4,5-dicafeoilquínico (**17**), verificada por CCD em comparação com os respectivos padrões, confirma a sua origem em *Baccharis dracunculifolia* (KUMASAWA et al., 2003).

Figura 22 - Espectro de gCOSY do ácido para-hidroxicinâmico (14)



## 7.2 ANÁLISES DA PRÓPOLIS DE PONTA GROSSA (P2)

### 7.2.1 Análise do óleo essencial de P2

Observam-se diferenças consideráveis na composição dos dois óleos essenciais da própolis de Ipiranga e de Ponta Grossa, os rendimentos obtidos da amostra de própolis de Ponta Grossa encontram-se na Tabela 9. Os componentes identificados por CG-EM no óleo essencial da própolis P2 estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 9 - Rendimentos dos óleos essenciais de própolis

Óleo	Hidrodestilação (h)	1°	2°	3°	Massa*	Rendimento %
		G				
P2						
P21	2,0	0,320	0,291	0,228	0,291±0,03	0,29
P22	2,5	0,394	0,287	0,213	0,287±0,06	0,29
P23	3,0	0,193	0,213	0,110	0,193±0,04	0,19

\* Massa: média das triplicatas. P: Própolis; P21, P22, P23: própolis de Ponta Grossa.

Tabela 10 - Porcentagens relativas dos componentes identificados nos óleos essenciais da própolis P2 por CG/EM/DIC em três tempos de hidrodestilação

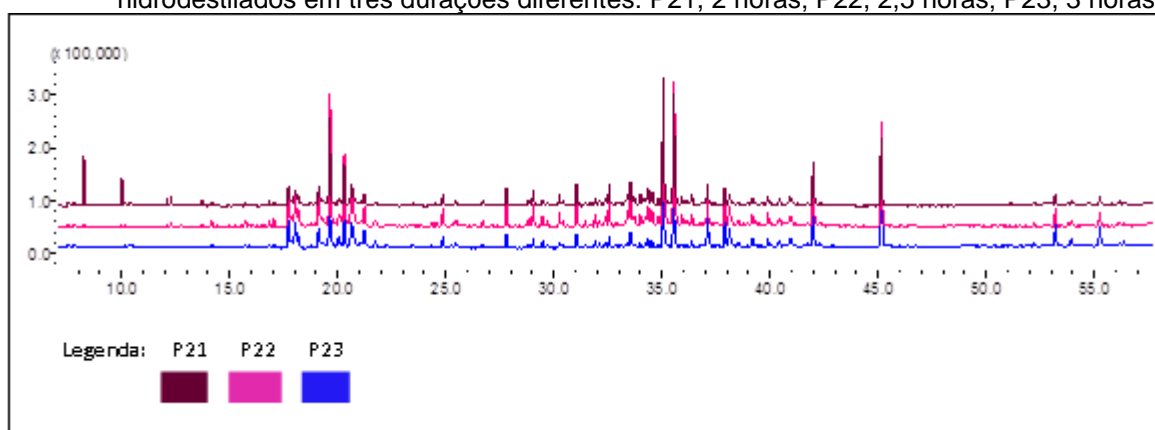
COMPONENTES	P21 (2 horas)	P22 (2,5 horas)	P23 (3,0 horas)	* IRR <sub>Calc</sub>	** IRR <sub>Lit</sub>
$\alpha$ -Pineno	5,14	-	-	934	939
$\beta$ -Pineno	3,04	-	-	978	980
<i>p</i> -Cimeno	1,03	-	-	1029	1026
<i>trans</i> -Pinocarveol	3,05	3,77	3,18	1141	1139
<i>trans</i> -Verbenol	3,12	4,17	4,00	1148	1144
$\alpha$ -Felandren-8-ol	0,99	3,73	2,00	1151	1166
Terpinen-4-ol	2,87	11,93	6,84	1170	1177
$\alpha$ -Pineol	5,99	6,09	1,03	1189	1189
Mirtenol	5,98	5,60	5,36	1195	1195
Borneol acetato	1,38	1,65	1,22	1285	1285
Isoledeno	0,82	-	-	1372	1373
$\alpha$ -Copaeno	2,08	1,91	1,00	1377	1376
$\beta$ -Cariofileno	3,20	3,81	1,66	1404	1418
Aromadendreno	0,99	-	-	1442	1439
$\alpha$ -Cariofileno	2,69	2,78	1,01	1456	1454
$\beta$ -Cadineno	1,06	-	-	1476	1473
$\gamma$ -Muuroleol	3,66	3,17	1,01	1479	1477
2,6-di- <i>t</i> -butil- <i>p</i> -cresol	12,78	10,84	13,12	1515	1512
$\alpha$ -Morfeno	1,37	-	-	1482	1485
$\alpha$ -Sileno	1,76	-	-	1493	1494
$\alpha$ -Bulneseno	1,68	-	-	1502	1505
$\delta$ -Cadineno	1,83	13,14	6,94	1527	1525
$\alpha$ -Cadineno	1,09	-	-	1536	1538
$\alpha$ -Calacoreno	1,18	-	-	1547	1558
( <i>E</i> )-Nerolidol	2,62	2,23	4,49	1564	1564
Espatuleno	2,90	-	3,69	1583	1576
Epiglobulol	-	-	2,66	1589	1581
Cariofileno óxido	1,90	-	-	1633	1641
Cubenol	1,07	-	-	1647	1653
$\alpha$ -Cadinol	0,67	-	-	1660	1655
$\alpha$ -Bisabolol	7,07	-	4,24	1687	1683
Benzilbenzoato	11,09	10,38	13,06	1771	1762
<b>Monoterpenos não oxigenados</b>	9,21				
<b>Monoterpenos oxigenados</b>	23,38	36,94	23,63		
<b>Sesquiterpenos não oxigenados</b>	23,41	24,81	11,62		
<b>Sesquiterpenos oxigenados</b>	16,23	2,23	15,08		
<b>Aromáticos</b>	23,87	21,22	26,18		
<b>Total</b>	96,10	85,20	76,51		
<b>Rendimento dos óleos essenciais</b>	0,29	0,29	0,19		

\* IRR<sub>cal</sub> = índices de retenção relativa calculados; \*\* IRR<sub>lit</sub> = dados publicados (ADAMS, 1995).

Proporções totais muito similares foram observadas para os tempos de 2,0, 2,5 ou 3,0 horas de hidrodestilação na classe dos monoterpenos oxigenados (23,38%, 36,94% e 23,63%) e dos compostos aromáticos (23,87%, 21,22% e 26,18%). Foi observado o aparecimento dos monoterpenos não oxigenados somente no óleo essencial obtido com tempo de hidrodestilação de 2,0 horas, sendo identificados  $\alpha$ -pineno (5,14%),  $\beta$ -pineno (3,04%) e o *p*-cimeno (1,03%) com um total

de 9,21%. Comparativamente, com 2,5 horas de hidrodestilação, observou-se um aumento significativo das proporções de monoterpenos oxigenados, que totalizaram (36,94%). Essa alteração se deve principalmente a um aumento significativo da porcentagem de terpinel-4-ol (11,93%). Ao mesmo tempo, ocorreu uma diminuição do total de sesquiterpenos oxigenados, sendo identificado apenas o (*E*)-nerolidol (2,23%). Por outro lado, ocorreu um aumento brusco na porcentagem dos sesquiterpenos não oxigenados, principalmente do  $\delta$ -cadineno (13,14 %). Os cromatogramas obtidos nas análises por CG-EM mostrados na Figura 23.

Figura 23 - Cromatogramas obtidos nas análises por CG/EM dos óleos essenciais da própolis P2 hidrodestilados em três durações diferentes: P21, 2 horas; P22, 2,5 horas; P23, 3 horas



Um dos componentes principais observados por CCD nas amostras de óleos essenciais foi um composto fenólico identificado pela primeira vez em uma própolis. Esta substância foi identificada por CG-EM como 2,6-di-*t*-butil-*p*-cresol (**21**), com 12,78%, 10,84% e 13,12% nos três tempos de hidrodestilação do óleo essencial da própolis P2, 2,0, 2,5 e 3,0 horas, respectivamente. O benzilbenzoato (**22**) também foi observado em quantidades próximas às do composto (**21**), apresentando 11,09%, 10,38% e 13,06%, nos três tempos de hidrodestilação. Também foram observados em menores proporções (*E*)-nerolidol (**19**) (2,62%, 2,23% e 4,49 %) e espatulenol (**20**) (2,90%, 0,00% e 3,69%). Além destes componentes, os monoterpenos oxigenados principais do óleo essencial de P2 foram terpinen-4-ol (2,87%, 11,93% e 6,84%),  $\alpha$ -pineol (5,99%, 6,09% e 1,03%) e o mirtenol (5,98%, 5,60% e 5,36%).

Nos espectros de UV-VIS do óleo essencial da própolis P2 (Figura 24) pode-se observar um perfil de absorção diferente do encontrado para P1 (Figura 15). No espectro obtido em metanol, observam-se bandas com máximos de absorção em 250,9 nm e 289,4 nm, que correspondem à faixa de absorção de compostos fenólicos simples, como o 2,6-di-*t*-butil-*para*-cresol (**21**) figura 25.

O composto (**21**) é amplamente utilizado na indústria de alimentos ou de produtos naturais como antioxidante (ROMALHO; JORGE, 2006). O segundo componente encontrado em maior proporção no óleo essencial de P2, identificado como benzilbenzoato (**22**) figura 25, é utilizado, por exemplo, no tratamento de afecções da pele (escabiose), como agente ativo de medicamentos que combatem a osteoporose pós-menopausa (LEI et al., 2012). Suas estruturas são mostradas na Figura 25.

Figura 24 - Espectros de ultravioleta do óleo essencial da P2

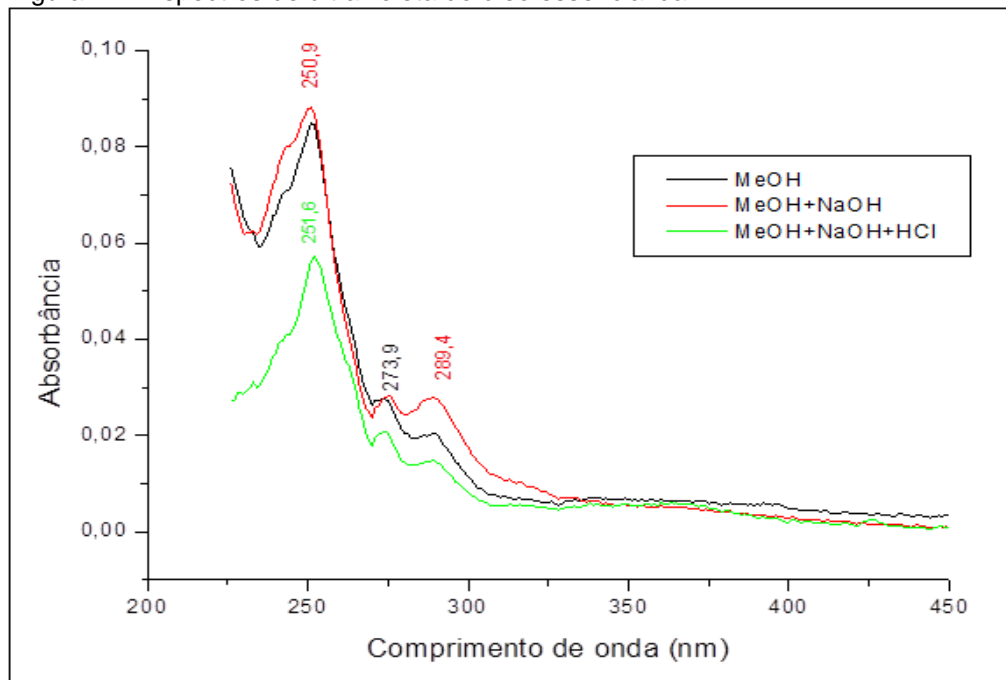
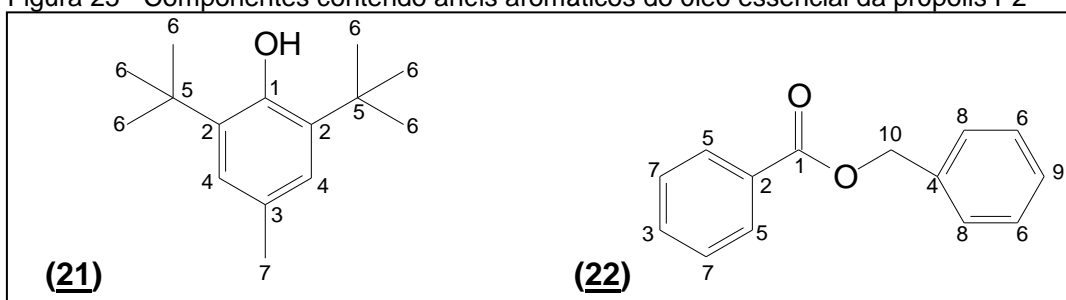


Figura 25 - Componentes contendo anéis aromáticos do óleo essencial da própolis P2



Os óleos essenciais da própolis P2, hidrodestilados por 2,5 horas e 3,0 horas, foram escolhidos para análises por técnicas unidimensionais de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , por conterem maiores proporções dos compostos **(21)** e **(22)**. Estas análises foram utilizadas para confirmam as duas estruturas químicas sugeridas anteriormente por CG/EM. Os deslocamentos químicos atribuídos a todos os prótons e carbonos de ambas as substâncias são apresentados na Tabela 11 e na Tabela 12 (Anexo 4).

Tabela 11 - Deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do 2,6-di-t-butil-p-cresol (21) comparados com dados da literatura

C/H	RMN $^1\text{H}$ ( $\delta$ )		RMN $^{13}\text{C}$ (ppm)	
	(21)	REF	(21)	REF
1 C	-		153,38	151,54
2 C	-		135,52	135,79
3 CH	7,00 s	6,97	125,70	125,49
4 C	-		128,25	128,22
5 CH	7,00 s	6,97	126,25	125,49
6 C	-		135,52	135,79
7 C	-		34,91	34,21
8 CH <sub>3</sub>	1,43 s	1,43	30,94	30,36
9 CH <sub>3</sub>	1,43 s	1,43	30,94	30,36
10 CH <sub>3</sub>	1,43 s	1,43	30,94	30,36
11 C	-		34,61	34,21
12 CH <sub>3</sub>	1,43 s	1,43	30,94	30,36
13 CH <sub>3</sub>	1,43 s	1,43	30,94	30,36
14 CH <sub>3</sub>	1,43 s	1,43	30,94	30,36
15 CH <sub>3</sub>	2,60 s	2,27	21,23	21,16

REF = dados da literatura (SDBS, 2012).

Tabela 12 - Deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do benzilbenzoato (22) presente no óleo essencial da P2 comparados com dados da literatura

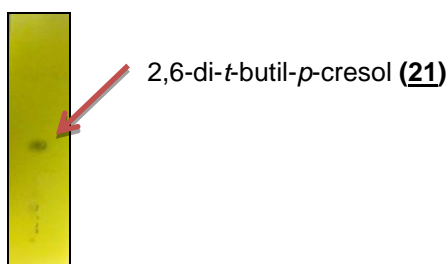
C/H	RMN $^1\text{H}$ ( $\delta$ )		RMN $^{13}\text{C}$ (ppm)	
	(22)	REF	(22)	REF
1 C	-	-	-	166,34
2 CH <sub>2</sub>	5,23	5,35	66,70	66,69
3 C	-	-	136,8	136,20
4 CH	7,46 - 7,44 t	7,46 - 7,26	128,6	128,65
5 CH	7,46 - 7,44 t		128,24	128,23
6 CH	7,46 - 7,44 t		-	-
7 CH	7,46 - 7,44 t		128,24	128,23
8 CH	7,46 - 7,44 t		128,6	128,65
9 C	-	-	130,09	130,28
10 CH	9,80	8,70	129,76	129,76
11 CH	7,44	7,41	128,41	128,43
12 CH	7,26	7,25	133,03	133,01
13 CH	7,44	7,41	128,41	128,43
14 CH	9,80	8,70	129,76	129,76

REF = dados da literatura (SDBS, 2012).

### 7.2.2 Isolamento do componente fenólico do óleo essencial de P2

A amostra P23 continha maior proporção do componente fenólico (21), 13,12%, e foi então submetida a um método químico para seu isolamento. Uma amostra de aproximadamente 0,170 g foi tratada com NaOH concentrado sob aquecimento para transposição dos possíveis fenolatos para a fase aquosa. Após extração dos hidrocarbonetos em pH básico, nova extração com  $\text{CHCl}_3$  em pH ácido permitiu obter 0,006 g de um resíduo contendo uma substância fenólica majoritária. A análise cromatográfica sobre placa de sílica utilizando  $\text{CHCl}_3$  como eluente foi observada sob luz ultravioleta de 254 nm e revelada para fenóis utilizando de  $\text{FeCl}_3$  5% em MeOH observando-se composto principal com  $R_f = 0,47$  (Figura 26).

Figura 26 - Análise por CCD da substância fenólica separada do óleo essencial da amostra de própolis P2





### 7.2.3 Análise dos extratos clorofórmicos da P2

Os rendimentos dos extratos clorofórmicos obtidos a partir do extrato aquoso produzido nas hidrodestilações com três durações (2,0 horas, 2,5 horas e 3,0 horas) da amostra de própolis P2 são mostrados na Tabela 13. Provavelmente, as variações observadas nos rendimentos são devidas a problemas como emulsões, que são frequentes nas extrações líquido-líquido.

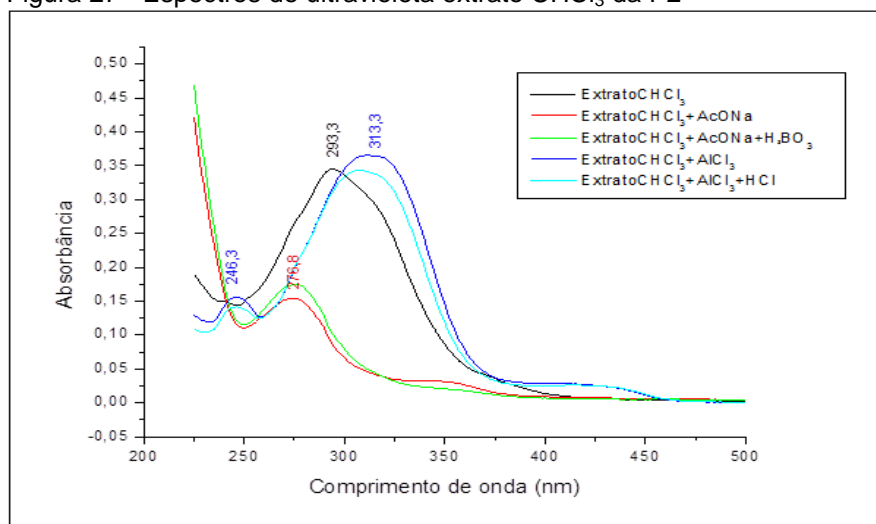
Os espectros de ultravioleta dos extratos  $\text{CHCl}_3$  são mostrados na Figura 19. O máximo de absorção do espectro em MeOH é observada em 293,3 nm, indicando a presença de anel aromático na(s) substância(s) principal(is). O complexo formado pela adição de  $\text{AlCl}_3$  parece estar sendo formado entre a carbonila e a hidroxila de um grupo  $\text{COOH}$ , não se desfazendo com a adição de  $\text{HCl}$  como observado no último espectro. O extrato de  $\text{CHCl}_3$  da amostra P2 apresentou cristais, ficando depois demonstrado que se tratava da mesma substância presente como majoritária em outros extratos (item 7.5.1).

Tabela 13 - Rendimentos dos extratos  $\text{CHCl}_3$  da P2

Amostra	Rendimento %
P21 (2,0 horas)	0,82
P22 (2,5 horas)	0,96
P23 (3,0 horas)	0,72

P: Própolis; P21, P22, P23: própolis de Ponta Grossa.

Figura 27 - Espectros de ultravioleta extrato  $\text{CHCl}_3$  da P2



#### 7.2.4 Análise dos extratos da P2 obtidos em pH 8 e pH 4

Os extratos aquosos resultantes das hidrodestilações (P21, 2,0 horas; P22, 2,5 horas; P23, 3,0 horas) foram submetidos à extrações com acetato de etila em pH 8 e pH 4, resultando nos rendimentos disponibilizados na Tabela 14.

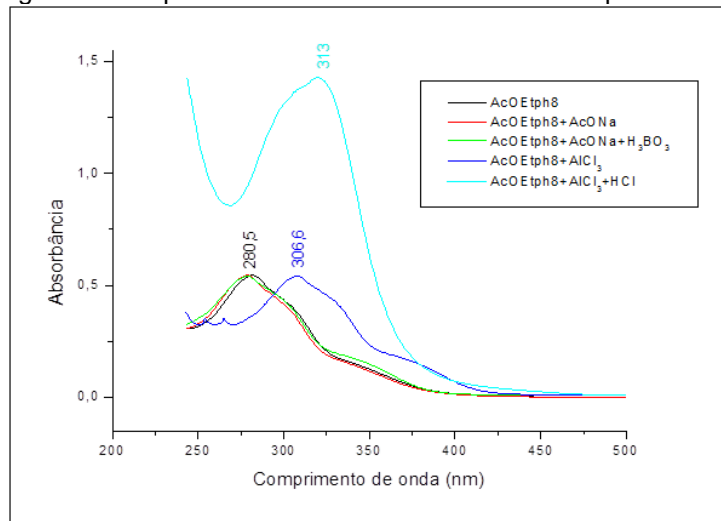
Tabela 14 - Rendimentos dos extratos da própolis P2 em pH 8 e pH 4

Amostra	Rendimento % AcOEt pH 8	Rendimento % AcOEt pH 4	Rendimento % Et <sub>2</sub> O em pH 4
P21	0,82	1,07	-
P22	0,96	0,90	0,71
P23	0,72	0,86	-

\* P21, P22, P23: própolis de Ponta Grossa.

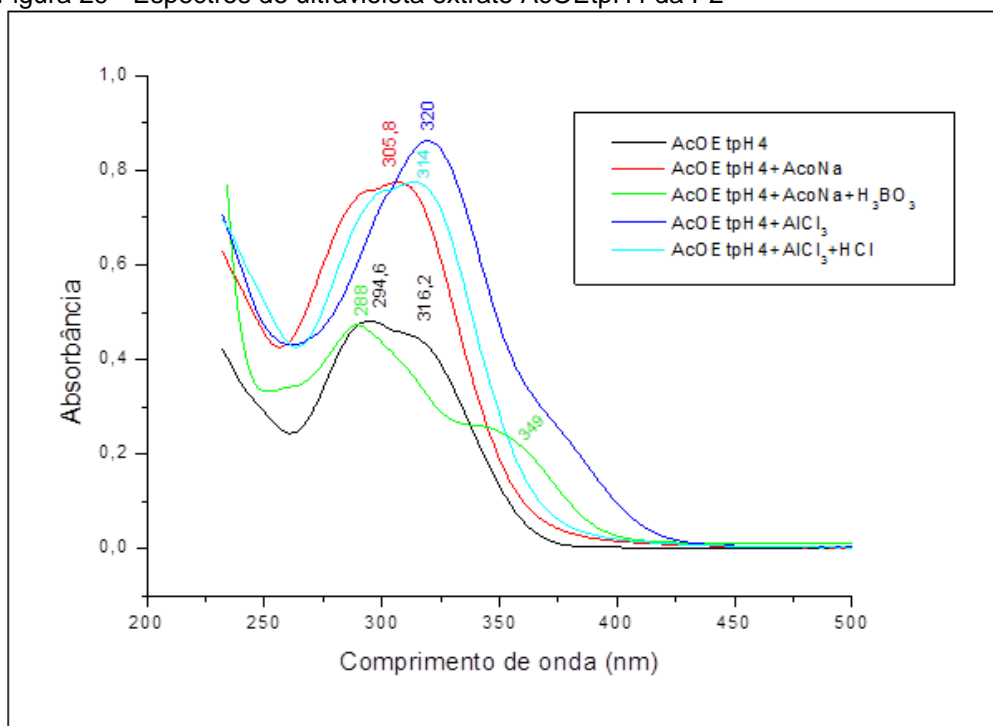
Os espectros de ultravioleta do extrato AcOEt em pH 8 foram medidos com a adição dos diversos reagentes utilizados para análise de flavonoides, na mesma sequência utilizada para análise dos extratos da P1 (item 7.1.3) (Figura 28). As absorções das possíveis substâncias fenólicas neutras presentes em menores proporções são suplantadas pela presença maciça do mesmo componente majoritário do extrato clorofórmico (7.2.3).

Figura 28 - Espectros de ultravioleta extrato AcOEt pH 8 da P2



Os espectros de UV do extrato obtido em pH4 com AcOEt são mostrados na Figura 29. Embora este extrato também tenha apresentado a formação dos mesmos cristais observados nos vários outros extratos, o primeiro espectro da série, medido em metanol é típico de ácidos cafeoilquínicos (JASINSKI, 2010; BESTEN, 2012). No entanto, observa-se que ocorre pequenos deslocamentos nas bandas de absorção após adição de AcONa, e com a adição  $H_3BO_3$ , que podem ser interpretados como devidos à complexidade da mistura de substâncias presentes. As absorções observadas após adição de  $AlCl_3$ , e em seguida com adição de HCl, parecem novamente estar relacionadas com a presença de ácidos cafeoilquínicos (JASINSKI, 2010; BESTEN, 2012).

Figura 29 - Espectros de ultravioleta extrato AcOEt pH4 da P2



Um dos extratos aquosos da amostra P2 foi também submetido à extração com éter etílico em pH 4 (item 6.3), obtendo-se um extrato com rendimento de 0,71% (Tabela 13). O extrato etéreo apresentou a formação cristais, sendo estes da mesma substância cristalizada nos extratos obtidos com  $CHCl_3$  e acetato de etila, como confirmado por análises cromatográficas sobre placa de sílica.

Esses cristais foram submetidos a análises de UV, IV e RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . A análise de UV foi realizada a partir dos cristais do extrato clorofórmico obtido dos extratos aquosos da amostra P2, mostrada na Figura 30. No espectro de UV obtido em metanol, observa-se a banda com máximo de absorção em 284 nm, que corresponde à absorção de um anel aromático conjugado a grupos contendo elétrons  $\pi$  ou elétrons desemparelhados.

O espectro de IV dos cristais obtidos no extrato clorofórmico (Figura 31) apresentou as bandas de absorção características de ácidos carboxílicos entre  $3.600$  e  $2400\text{ cm}^{-1}$ . A banda com máximo em  $3.070\text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuída às vibrações de ligações C-H de carbono  $\text{sp}^2$ . A absorção forte que aparece em  $1.691\text{ cm}^{-1}$  banda atribuível à carbonila ligada diretamente a um anel aromático. As vibrações das ligações duplas C=C características de anel aromático, aparecem como forte banda de absorção em  $1.602\text{ cm}^{-1}$ . Todas as absorções observadas no espectro de IV dos cristais analisados são encontrados no espectro publicado on-line para o ácido benzoico (AIST, 2013).

Figura 30 - Espectro de ultravioleta dos cristais presentes no extrato  $\text{CHCl}_3$  da P2

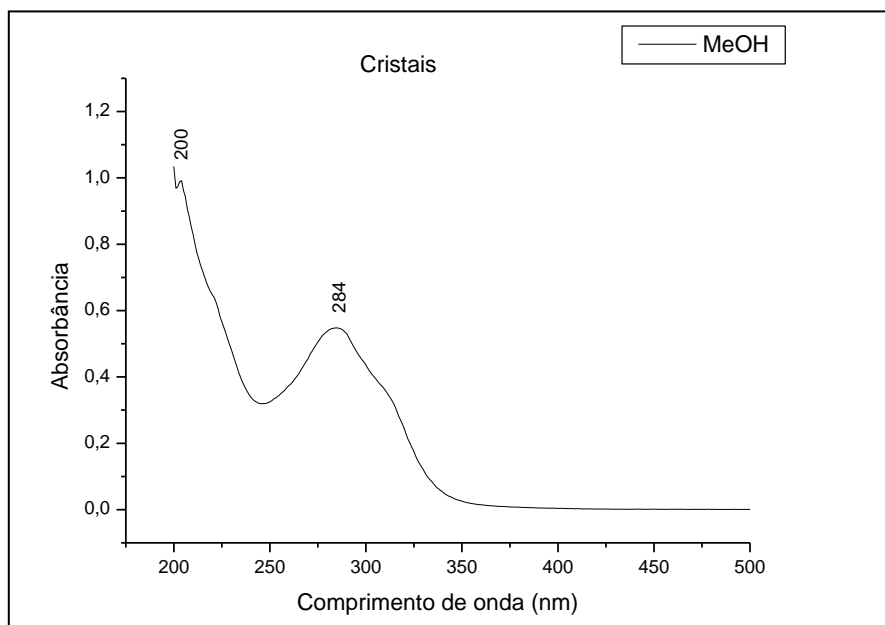
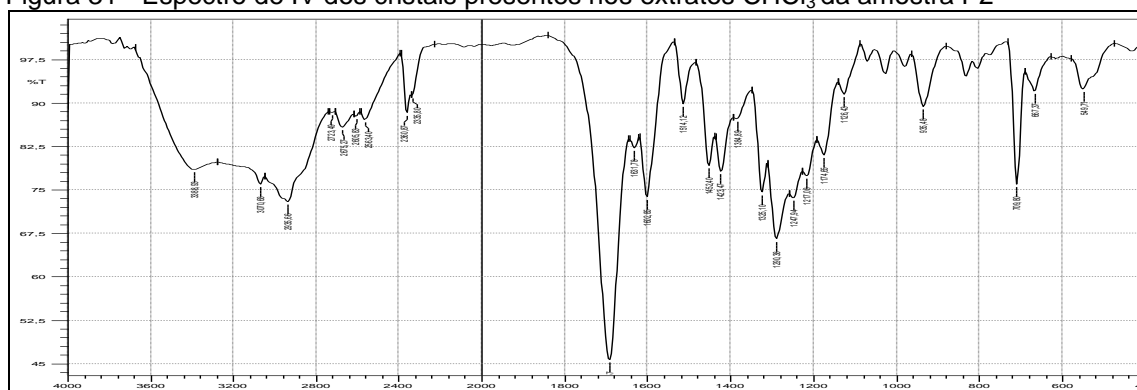


Figura 31 - Espectro de IV dos cristais presentes nos extratos  $\text{CHCl}_3$  da amostra P2

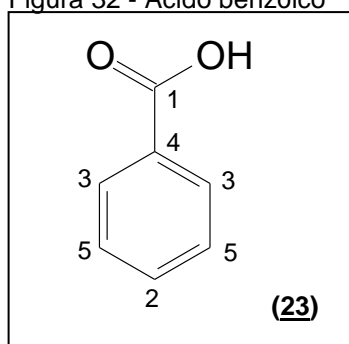
Os cristais obtidos nos extratos  $\text{CHCl}_3$ , acetato de etila e éter foram submetidos à análise de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (Anexos 5, 6 e 7). Nos cristais foram observados os deslocamentos químicos dos prótons aromáticos, referente os prótons dos próximos a carbonila (3CH), em  $\delta$  8,13 ( $J = 7,76\text{Hz}$ ) e em  $\delta$  7,45 ( $J = 7,4$ ) correspondentes aos prótons (5CH) e em  $\delta$  7,62 referente aos prótons (2CH). O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  DEPT confirmou a presença dos grupos CH, e confirmou a presença de dois carbonos quaternários, dados disponíveis na Tabela 15. Considerando os dados dos espectros de UV, IV e RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  destes cristais, sugeriu-se a substância responsável pelas absorções, seria o ácido benzoico (**23**), (Figura 32). O ácido benzoico é amplamente utilizado na conservação de alimentos, como por exemplo, o vinho (MACHADO et al., 2007). Estudos mostram que a adição de ácido benzoico na dieta de suínos, está associada à diminuição da mortalidade de suínos pós-desmame (GHELER et al., 2009).

Tabela 15 - Deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do ácido benzóico (23) obtido dos extratos  $\text{CHCl}_3$ , AcOEt e éter etílico da amostra P2 comparados com dados da literatura.

CH	RMN $^1\text{H}$ ( $\delta$ )				RMN $^{13}\text{C}$ (ppm)			
	$\text{CHCl}_3$	AcOEt pH4	éter etílico	REF	$\text{CHCl}_3$	AcOEt pH4	éter etílico	REF
1 C	-	-	-	-	171,33	171,68	171,19	172,77
2 CH	7,62	$\delta$ 7,63	$\delta$ 7,68	$\delta$ 7,62	133,76	133,80	133,77	133,83
3 CH	$\delta$ 8,13	$\delta$ 8,12	$\delta$ 8,13	$\delta$ 8,12	129,26	130,21	130,20	130,28
4 C	-	-	-	-	128,98	129,25	129,20	129,44
5 CH	$\delta$ 7,5	$\delta$ 7,46	$\delta$ 7,50	$\delta$ 7,45	128,47	128,59	128,50	128,49

REF = dados da literatura (SDBS, 2013)

Figura 32 - Ácido benzóico



### 7.3 ANÁLISE DE METAIS NAS PRÓPOLIS P1 E P2

A determinação de metais através da espectroscopia de absorção atômica em chama mostrou que ambas as amostras de própolis bruta apresentam traços de Mg, K, Ca, Zn, e baixos teores de Al. Ambas apresentam também teores de metais pesados como Cr e Pb, abaixo dos limites de detecção, enquanto que os teores de cádmio encontrados estão no limite de detecção. Os valores encontrados são mostrados na Tabela 16. Com base nos resultados obtidos, observa-se que as amostras de própolis analisadas podem ser fontes de micronutrientes como, por exemplo, cálcio e magnésio.

Tabela 16 - Concentração de metais nas amostras de própolis bruta

Metal	P1 (mg/g)	P2 (mg/g)	Limite de Detecção
<b>Ca</b>	0,87±0,13	0,61±0,13	0,15
<b>Na</b>	0,16±0,10	0,21±0,11	0,29
<b>K</b>	8,64±0,30	2,76±0,63	0,29
<b>Al</b>	<LD	<LD	13,57
<b>Mn</b>	0,08±0,005	0,09±0,005	0,12
<b>Cu</b>	0,01±0,001	0,04±0,003	0,39
<b>Mg</b>	0,80±0,03	0,66±0,01	0,06
<b>Zn</b>	0,02±0,00	0,02±0,002	0,41
<b>Cr</b>	<LD	<LD	2,06
<b>Pb</b>	<LD	<LD	3,73
<b>Cd</b>	0,0004±0,00	0,0003±0,00	0,07

<LD = Menor que o limite de detecção.

Outro fato bastante importante é a ausência de metais tóxicos como chumbo e cromo. A contaminação por metais tóxicos na própolis poderia estar relacionada com problemas de contaminação ambiental, já que as abelhas buscam na flora o material para a sua produção. Nos últimos anos a agricultura tornou-se dependente do uso de pesticidas no combate das doenças e das pragas de plantas cultivadas, representando um risco em potencial para a saúde das abelhas, e para a qualidade dos produtos produzidos por elas. Ou ainda por um manejo inadequado da própolis por parte dos apicultores. Existem diversos equipamentos e materiais inadequados para a produção de própolis: como telas metálicas não inox, a própria tintura da caixa da colmeia e embalagens impróprias são utilizadas.

## 8 CONCLUSÕES

Neste trabalho foram realizados estudos sobre a composição química dos compostos voláteis e fenólicos de duas amostras de própolis da Região dos Campos Gerais do Paraná, avaliando-se quantitativamente os íons metálicos presentes. As análises por espectrometria de absorção atômica não indicaram níveis elevados de metais e nem a presença de metais pesados inconvenientes, sendo mais uma garantia de que os produtores estão trabalhando em ambientes limpos quanto a este aspecto.

A partir das análises realizadas, pode-se concluir que ambas pertencem ao grupo das chamadas própolis verdes, isto é, contém em sua composição metabólitos secundários obtidos pelas abelhas na resina de *Baccharis dracunculifolia*, a vassoura ou alecrim dos campos. Embora seja diminuta a proporção de artepilin C nos extratos analisados, diversos compostos voláteis encontrados em ambas amostras são característicos desta espécie vegetal, como o (*E*)-neriolidol e o espatulenol. Análises anteriores já demonstraram que é baixa a porcentagem de artepilin C nas própolis produzidas nesta região, o que é uma característica da própria variedade de *B. dracunculifolia* que cresce *in natura* nos Campos Gerais. Além disto, foram observadas, em ambas as amostras de própolis pesquisadas, a ocorrência de flavonoides e de ácidos cafeoilquínicos, estes últimos também hoje reconhecidos como típicos da própolis verde brasileira e das espécies do gênero *Baccharis* em geral.

Este estudo também permitiu demonstrar que as duas amostras de própolis regionais estudadas, embora obtidas de locais distantes entre si, contém composições químicas bastante similares. A metodologia utilizada permitiu uma boa separação de extratos contendo substâncias fenólicas neutras (flavonoides) e substâncias ácidas (ácidos dicafeoilquínicos).

No entanto, sem dúvida nenhuma, a principal diferença observada entre as amostras estudadas está na ocorrência de altas proporções de dois ácidos orgânicos distintos, que permitem caracterizar e classificar estas duas própolis do Segundo Planalto do Paraná. O ácido *para*-hidroxicinâmico é encontrado na amostra chamada P1, proveniente de Ipiranga – PR, enquanto que o ácido benzóico caracteriza a própolis P2, obtida em Ponta Grossa – PR. Também, como provável



consequência da forte presença do ácido benzóico na amostra P2, seu óleo essencial apresenta alta proporção de benzilbenzoato. Além das mencionadas substâncias características da própolis verde, o ácido *para*-hidroxicinâmico em P1, e o ácido benzóico e o benzilbenzoato em P2 certamente vão influenciar o perfil das atividades biológicas das própolis da Região dos Campos Gerais.

## 9 REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy**. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 1995.

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**. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

ADELMANN, J. **Própolis: variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana/antioxidante**. Dissertação, UFPR, Curitiba, 2005.

BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; STOEV, G.; POPOV, J. Determination of fenolic from propolis by capillary gas chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 607, p.150-153, 1992.

BANKOVA, V.; BOUDOUREVA-KRASTEVA, G.; SFORCIN J. M. Phytochemical evidence for the plant origin of brazilian propolis from Sao Paulo state. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v. 54, p. 401–405, 1999.

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

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

BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Recent progress in pharmacological research of propolis. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 561–571, 2001b.

BESTEN, M. A. **Estudo químico de três espécies do gênero *Baccharis*: *B. trimera*, *B. milleflora* e *B. pentaptera* (seção Caulopterae)**. Dissertação, UEPG, Paraná, 2012.

BEZERRA, A. C. A.; GONÇALVES, G. M. S. Desenvolvimento e estudos de estabilidade de formulações cosméticas contendo própolis destinadas à prevenção da acne. **Anais de resumos do XIV Encontro de Iniciação Científica da PUC**, Campinas, 2009.

BHAVANANI, S. M.; BALLOW, C. H. New agents for Gram-positive bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, v.13, p. 528-534, 1992.

BOSIO, K.; AVANZINI, C.; D'AVOLIO, A.; OZINO, O.; SAVOIA, D. In vitro activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 31, p. 174-177, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001. Aprovar os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geleia Real, Geleia Real Liofilizada, Pólen, Apícola, Própolis e Extrato de Própolis, conforme consta dos Anexos desta Instrução Normativa.** Diário Oficial da União, Brasília, 23 jan. 2001.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Câmara Técnica de Medicamentos Fitoterápicos – CATEF. **Nota Técnica sobre o registro de produtos contendo própolis acesso em 06 setembro 2013.** Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/catef/propolis.htm>

BURIOL, L.; FINGER, D.; SCHMIDT, M. D.; SANTOS, J. M. T.; ROSA, M. R.; QUINÁIA, S. P.; TORRES, R. Y. Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólicos. **Química Nova**, v. 32, p. 296-302, 2009.

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

CABRAL, I. S. R. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antibacteriana da própolis vermelha brasileira.** Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2008.

CARDOSO, S.; RIBEIRO, M.; FERREIRA, I. L.; REGO, A. C. Northeast portuguese propolis protects against staurosporine and hydrogen peroxide-induced neurotoxicity in primary cortical neurons. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 2862-2868, 2011.

CARDOZO, A. G. L. **Estudo químico de *Baccharis dracunculifolia* DC. e sua correlação com a própolis de uma microregião dos Campos Gerais do Paraná.** Dissertação (Mestrado em química aplicada), UEPG, 2009.

CARDOZO, A. G. L.; NUNES, D. S. ALENCAR, S. M. Estudo químico da própolis da região de Ponta Grossa – PR e sua fonte botânica: *Baccharis dracunculifolia* DC. **XI encontro de química da região Sul**, UEPG, 2009.

CASTRO, M. L.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química Nova**, v. 30, p. 1512-1516, 2007.

CASSEL, E.; FRIZZO, C. D.; VANDERLINDE, R.; ATTI-SERAFINI, L.; LORENZO, D.; DELLACASSA, E. Extraction of Baccharis Oil by supercritical CO<sub>2</sub>. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 3, p. 4803-4805, 2000.

CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES A. G.; ANDRADE C. H. S.; MATOS F. J. A.; ALENCAR J. W.; MACHADO M. I. L. **Óleos essenciais de Plantas do Nordeste**. Editora UFC, Fortaleza, 1981. 209p.

FERRACINI, V. L.; PARAIBA, L. C.; LEITÃO FILHO, H. F.; SILVA, A. G. D.; NASCIMENTO, L. R.; MARSALOLI, A. J. Essential oils of seven Brazilian *Baccharis* species. **Journal of Essential Oil Research**, v. 7, p. 355-367, 1995.

FERNANDES, Jr. A.; LOPES, C. A. M.; SFORCIN, J. M.; FUNARI, S. R. C. Population analysis of susceptibility to própolis in reference strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 3, p. 287-294, 1997.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Análise de Própolis. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 171-178, 2006.

GHELER, T. R.; ARAÚJO, L. F.; SILVA, C. C.; GOMES, G. A.; PRATA, M. F.; GOMIDE, C. A. Uso do ácido benzoico na dieta de leitões. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 11, p.2182-2187, 2009.

GHISALBERTI, E.L. Propolis: A review. **Bee World**, v.60, p.59-84, 1979.

GUIMARÃES, N. P. **Apicultura: a ciência da longa vida**. Editora Itatiaia, Belo Horizonte, 1989. 109 p.

HAYACIBARA, M. F.; KOO, H.; ROSALEN, P. L.; DUARTE, S.; FRANCO, E. M.; BROWEN, W. H.; IKEGAKI, M.; CURY, J. A. In vitro and vivo effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, p. 110-115, 2005.

HU, F.; HEPBURN, H. R.; LI, Y.; CHEN, M.; RADLOFF, S. E.; DAYA, S. Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 276-283, 2005.

IVANOV, D. F.; TIKHONOV, A. I.; KRIVENCHUK, P. E.; LIARSKAIA, E. V.; LOTOVA, S. I. Propolis and its clinical use. **Oftalmol Zh**, v. 28, p. 104-107, 1973.

JASINSKI, V. C. G. **Óleos essenciais e compostos fenólicos de espécimes masculinos e femininos de *Baccharis uncinella* DC.** 2010. Dissertação (Mestrado em química aplicada) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2010.

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

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**, v. 64, p. 235-240, 1999.

KUMAZAWA, S.; YONEDA, M.; SHIBATA, I.; KANAEDA, J.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, p. 740-742, 2003.

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

LEE, H. S.; KIM, Y. D.; NA, B. R.; KIM, H. R.; CHOI, E. J.; HAN, W. C.; CHOI, H. K.; LEE, S. H.; JUN, C. D. Phytocomponent p-hydroxycinnamic acid inhibits T-cell activation by modulation of protein kinase C-q-dependent pathway. **International Immunopharmacology**, v. 12, p. 131-138, 2012.

LEI, L.; YUAN-HUI, G.; HAI-LIANG, X.; YAN, N.; TING, H.; LU-PING, Q.; QIAO-YAN, Z. Antiosteoporotic effects of benzylbenzoate glucosides from *Curculigo orchoides* in ovariectomized rats. **Journal of Chinese Integrative Medicine**, v. 10, p. 1419-1426, 2012.

MACHADO, R. M. R.; TFOUNI, S. A. V.; VITORINO, S. H. P.; VICENTE, E.; TOLEDO, M. C. F. Presença dos ácidos benzóico e sórbico em vinhos e sidras produzidos no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, 847-850, 2007.

MARKHAM, K. R. **Techniques of flavonoid identification**. Londres, Academic Press, 1982, 113 p.

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

MARCUCCI, M. C., & BANKOVA, V. Chemical composition, plant origin and biological activity of Brazilian propolis. **Current Topics in Phytochemistry**. V. 2, p.115–123, 1999.

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

MARCUCCI, M. C. Própolis tipificada: um novo caminho para a elaboração de medicamentos de origem natural, contendo este produto apícola. **Fitos**, v. 3, p. 36-46, 2006.

MASSABNI, A. C. Os metais e a saúde humana. **Instituto de Química – Araraquara – UNESP**. Publicado em 2006. Disponível em <[http://www.crq4.org.br/quimica\\_viva\\_\\_os\\_metais\\_e\\_a\\_saude\\_humana](http://www.crq4.org.br/quimica_viva__os_metais_e_a_saude_humana)> acesso 2 de outubro de 2013.

MENEZES, H. Própolis: Uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, p. 405-411, 2005.

MIYATAKA, H.; NISHIKI, M.; MATSUMOTO, H.; FUJIMOTO, T.; MATSUKA, M.; SATOH, T. Evaluation of propolis. I. Evaluation of Brazilian and Chinese propolis by enzymatic and physico-chemical methods. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 20, p. 496-501, 1997.

MOREIRA, I. C; ROQUE, N. F; CONTINI, K; LAGO, J. H. G. Sesquiterpenos e hidrocarbonetos dos frutos de *Xylopiá emarginata* (Annonacea). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, p. 55-58, 2007.

NAGAI, T.; INOUE, R.; INOUE, H.; SUZUKI, N. Preparation and antioxidante properties of water extract of propolis. **Food Chemistry**, v.80, p. 29–33, 2003.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ABREU, J. A. S. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, p. 313-318, 1998.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M.; MOURA, F. F.; Classificação das própolis Brasileira através de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. **Honeybee Science**, v. 21, 2000.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; SCAMPARINI, A. R. P.; AGUIAR, C. L. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**, v.32, p. 997-1003, 2002.

PAULINO, N.; ABREU, S. R. L.; UTO, Y.; KOYAMA, D.; NAGASAWA, H.; HORI, H.; DIRSCH, V. M.; VOLLMAR, A. M.; SCREMIN, A.; BRETZ, W. A. Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, artepillin C, in Brazilian própolis. **European Journal of Pharmacology**, v. 587, p. 296-301, 2008.

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

PEREIRA, A. S.; PEREIRA, A. F. M.; TRUGO, L. C.; AQUINO NETO, F. R. Distribution of quinic acid derivatives and other phenolic compounds in Brazilian propolis. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 58, p. 590-593, 2003.

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

PISCO, L.; KORDIAN, M.; PESEKE, K.; FEIST, H.; MICHALIK, D.; ESTRADA, E.; CARVALHO, J.; HAMILTON, G.; RANDO, D.; QUINCOSES, J. Synthesis of compounds with antiproliferative activity as analogues of prenylated natural products existing in Brazilian propolis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, p. 401-407, 2006.

ROMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, p. 755-760, 2006.

SAWAYA, A. C. H. **Análise da composição química de própolis brasileira por espectrometria de massas**. Tese, UNICAMP, Campinas, 2006.

SDBS. Spectral Database for Organic Compounds. Disponível em: <[http://sdbs.riondb.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct\\_frame\\_top.cgi](http://sdbs.riondb.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi)>. Acesso em 10 de julho 2013.

SFORCIN, J. M.; ORSI, R. O.; BANKOVA, V. Effect of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, p. 301-305, 2005.

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

SIMÕES, L. M. C.; GREGORIO, L.E.; SILVA, FILHO A. A.; SOUZA M. L.; AZZOLINI A. E. C. S.; BASTOS J. K.; LUCISANO-VALIN, Y. M. Effect of Brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 59-65, 2004.

SIQUI, A. C.; SAMPAIO, A. L. F.; SOUSA, M. C.; HENRIQUES, M. G. M. O.; RAMOS, M. F. S.; Óleos essenciais - potencial antiinflamatório. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v.16, p. 38-43, 2000.

SOUZA, J. P. B.; FURTADO, N. A. J. C.; JORGE, R.; SOARES, A. E. E.; BASTOS, J. K. Perfis físico-químico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG), Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, p. 85-93, 2007.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista Nutrição**, v. 15, p. 71-81, 2002.

SOUSA, C. M. M.; ROCHA E SILVA, H.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, p. 351-355, 2007.

SUAREZ, L. E.C; MENICHINI, F; MONACHE, F. D, Tetranortriterpenoids and dihydrocinnamic acid derivatives from *Hortia colombiana*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.13, p. 339-344, 2002.

TAKAHASHI, O. 2,6-Di-*tert*-butyl-4-methylene-2,5-cyclohexadienone (BHT quinone methide): na active metabolite of BHT causing haemorrhages in rats. **Archives of Toxicology**. v. 62, p. 325-327, 1988.



VARGAS, A. C.; LOGUERCIO, A. P.; WITT, N. M.; COSTA, M. M.; SÁ e SILVA, M.; VIANA L, R. Atividade antimicrobiana in vitro de extrato alcoólico de própolis. **Ciência Rural**, v. 34, p. 159-163, 2004.

VERDI, L. G, BRIGHENTE, I. M. C, PIZZOLATTI, M. G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, v. 28, p. 85-94, 2005.

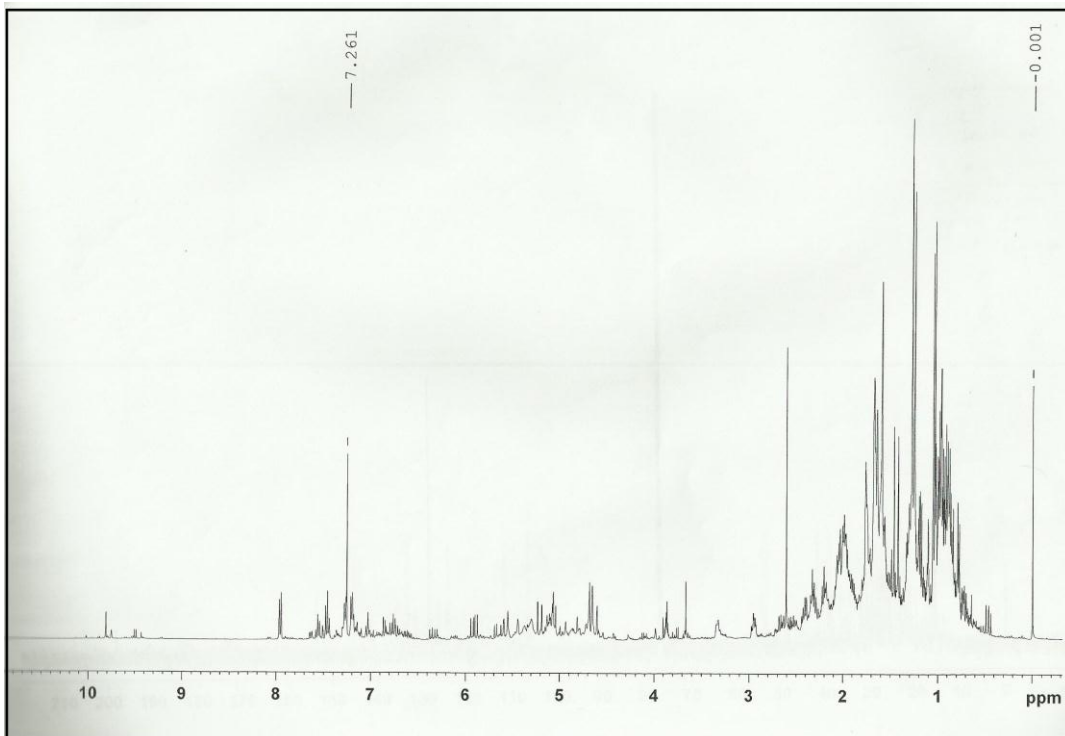
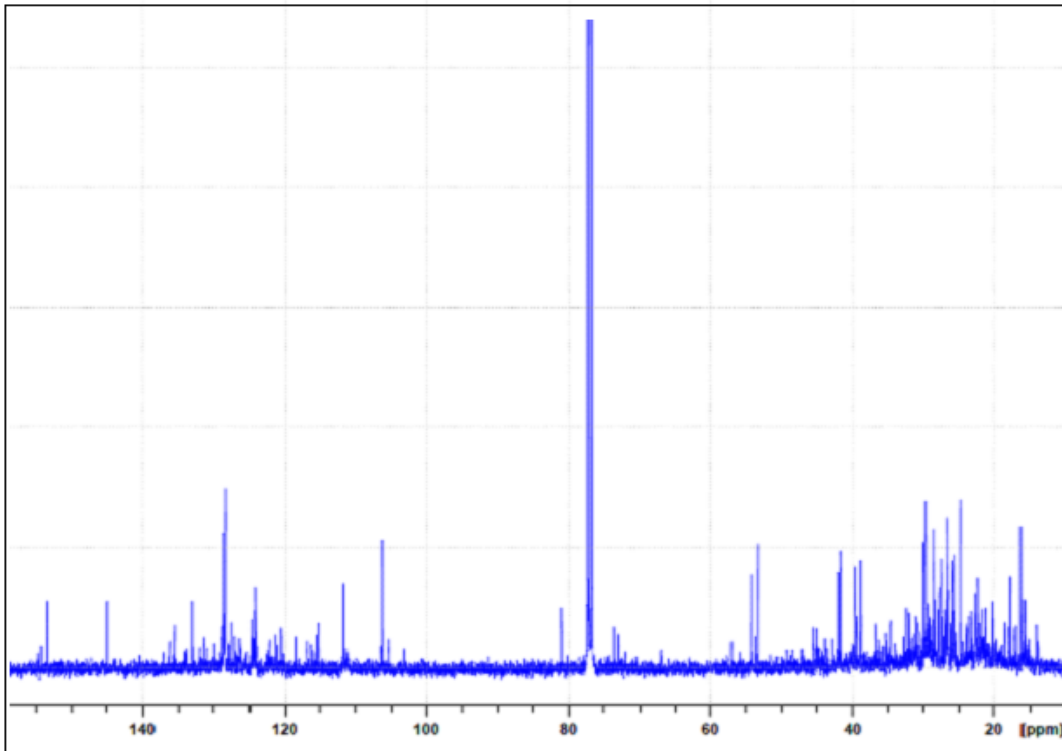
WOISKY, R. G. Métodos de controle químico de amostras de própolis. **Dissertação de Mestrado**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de São Paulo. Universidade de São Paulo, 1996.

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

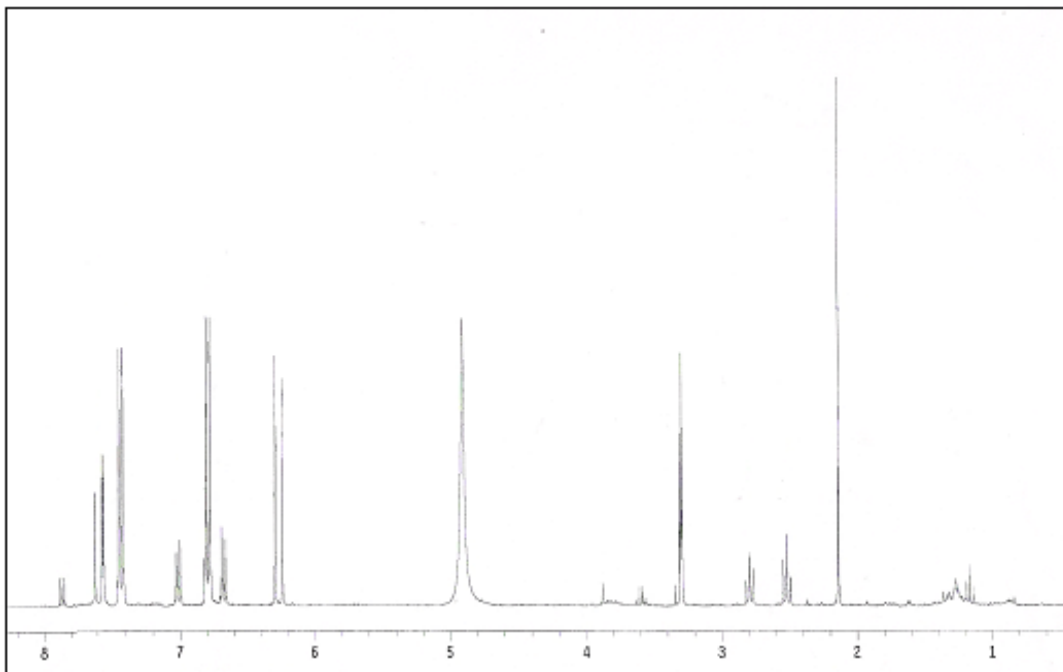
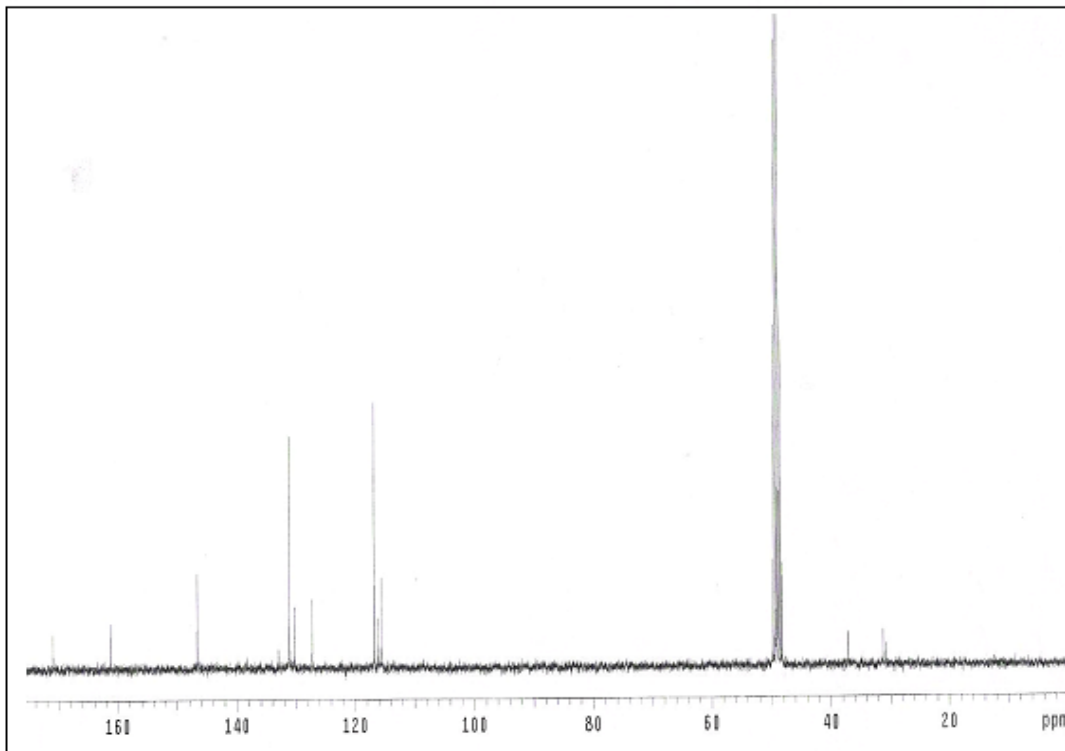
YAMAGUCHI, M. Preventive/therapeutic agent for diabetic diseases. **PCT/JP2007/052328 - International Application**, 2008.

YAMAGUCHI, M.; WEITZMANN, M. N. The bone anabolic carotenoid *p*-hydroxycinnamic acid promotes osteoblast mineralization and suppresses osteoclast differentiation by antagonizing NF- $\kappa$ B activation. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 30, 708-712, 2012.

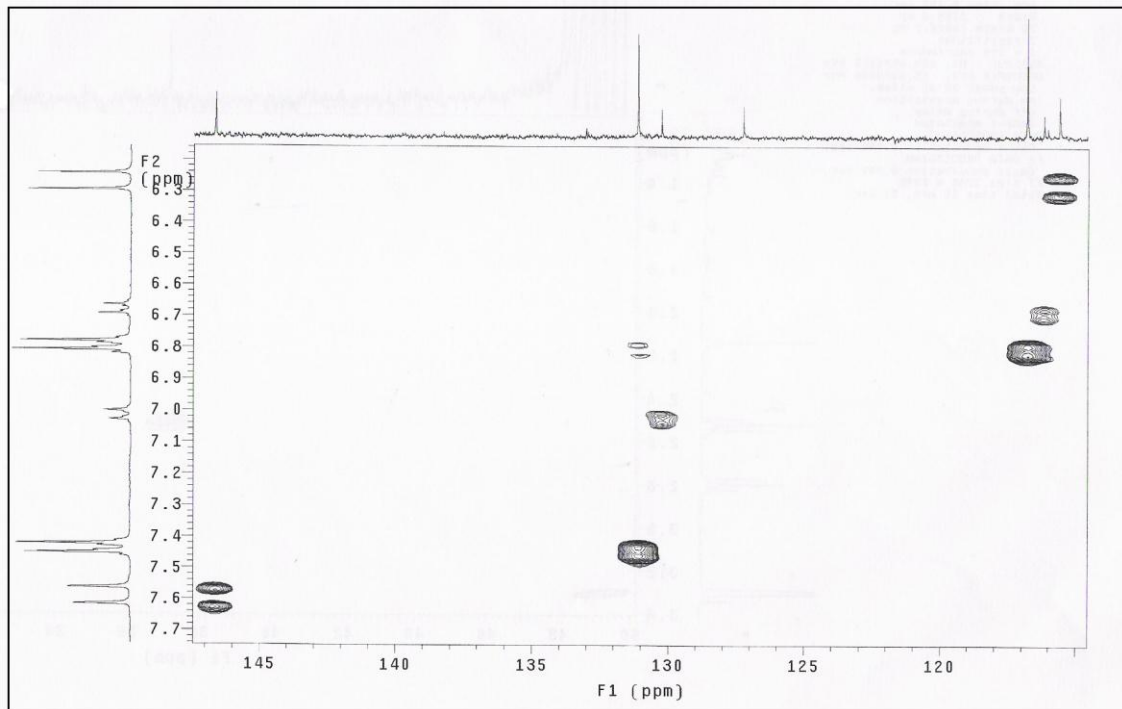
**ANEXOS**



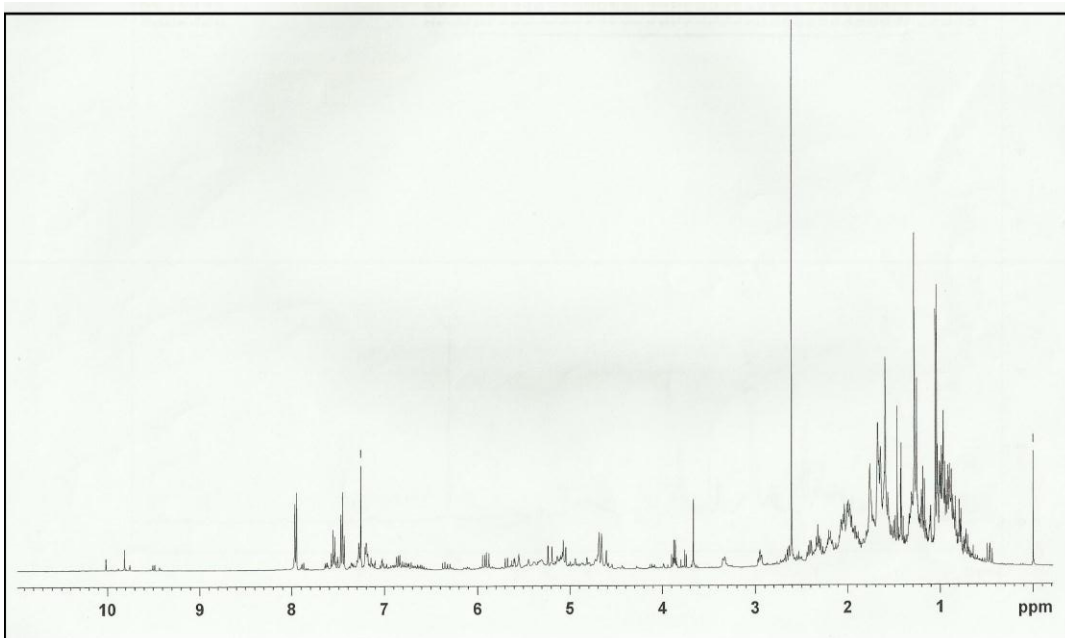
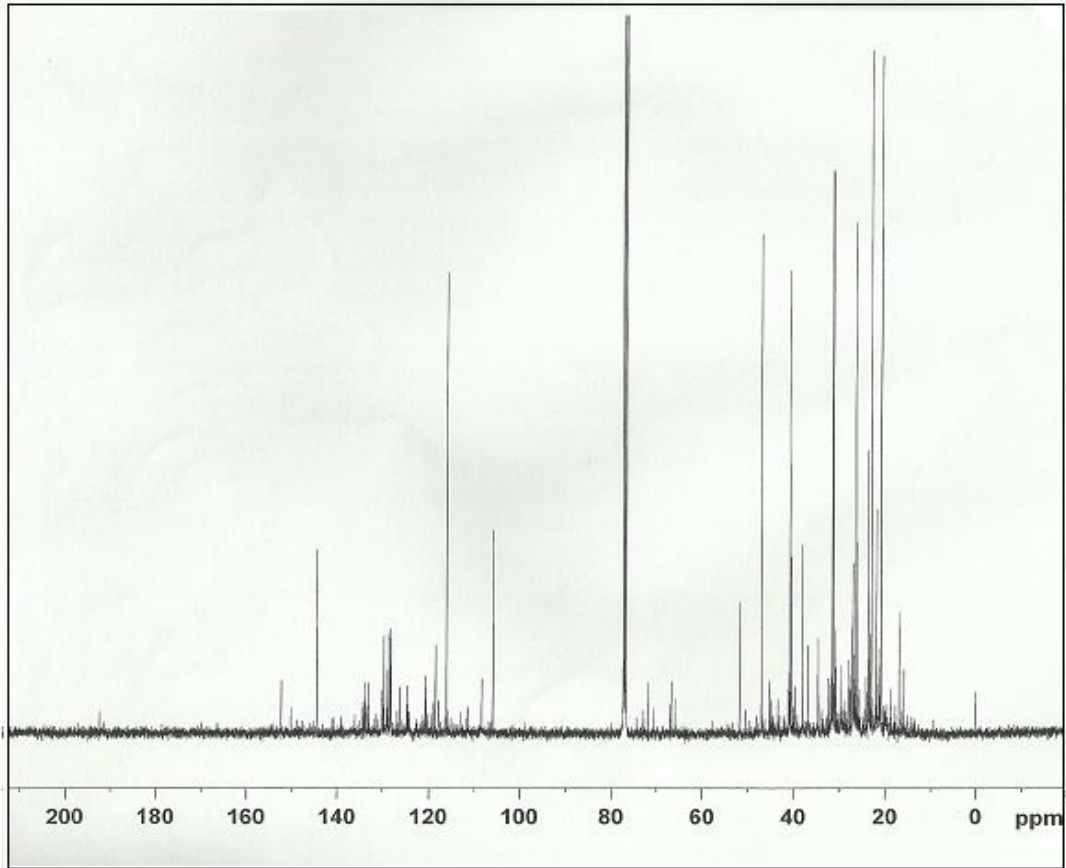
**ANEXO 1** - Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do óleo essencial da própolis de Ipiranga, amostra P1 (item 7.1.1)



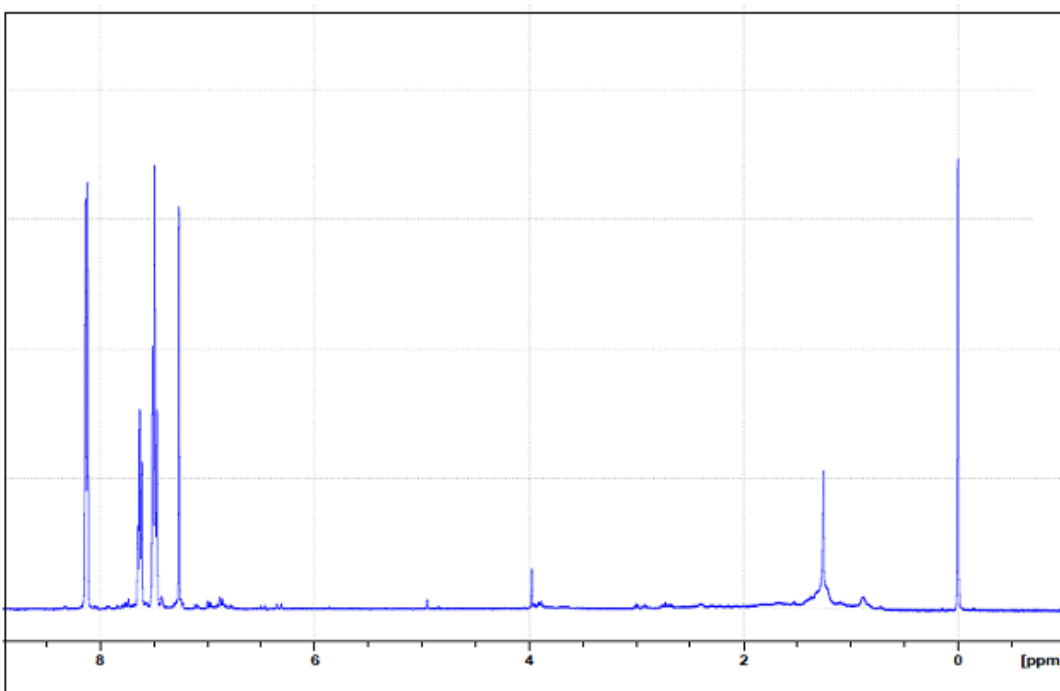
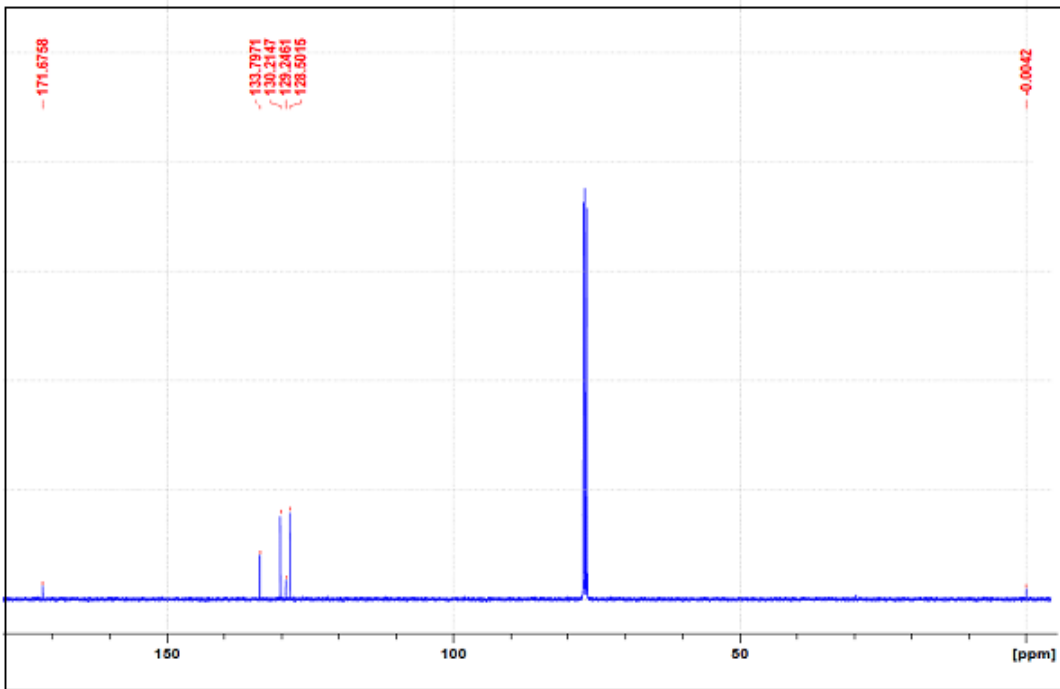
**ANEXO 2** - Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do extrato acetato de etila em pH 4 da própolis de Ipiranga, P1 (item 7.1.4)



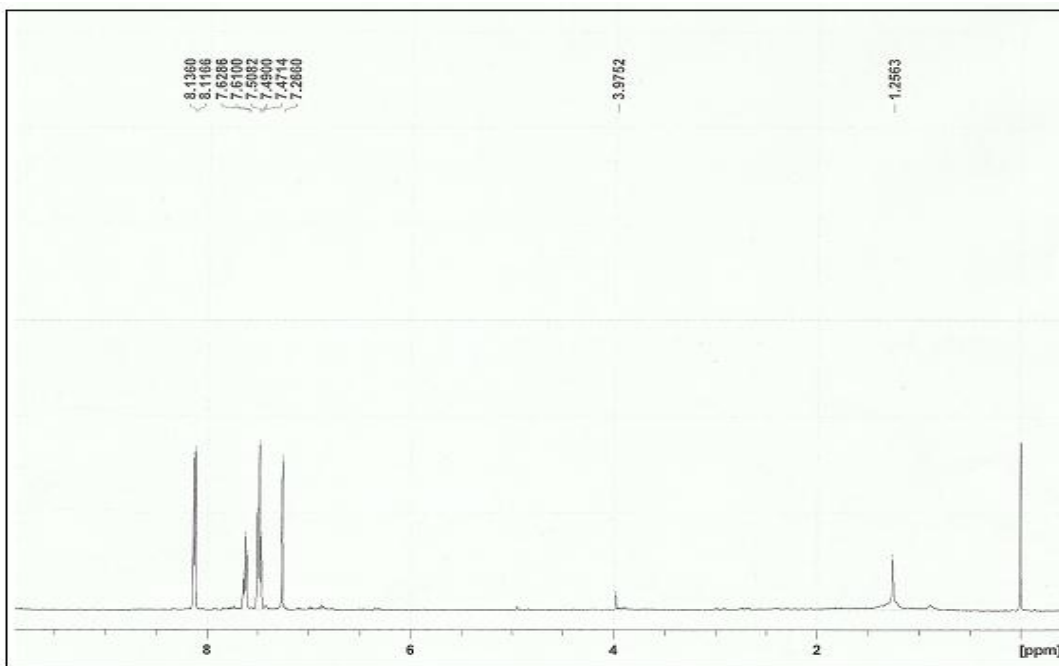
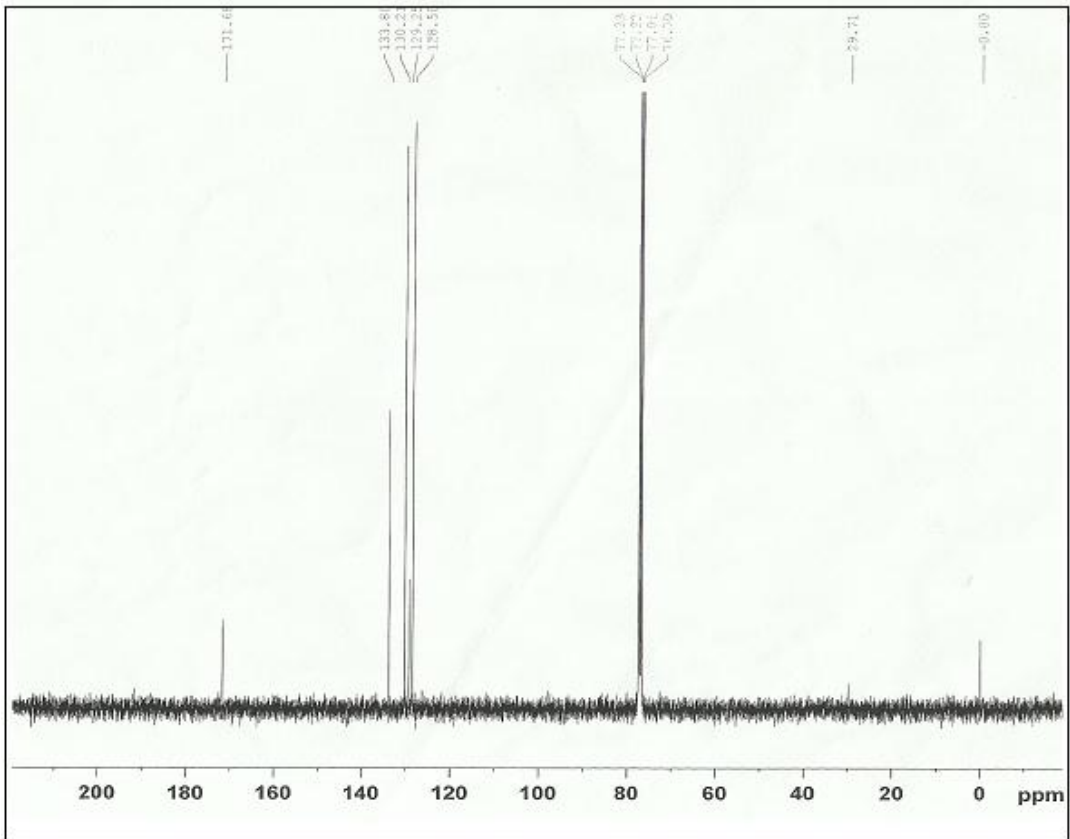
ANEXO 3 - Espectros de RMN gHSQC de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da fração 6-10 da coluna de fracionamento do extrato acetato de etila em pH 4 da própolis de Ipiranga, amostra P1 (item 7.1.4)



**ANEXO 4** - Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do óleo essencial da própolis de Ponta Grossa, amostra P2 (item 7.2.1)

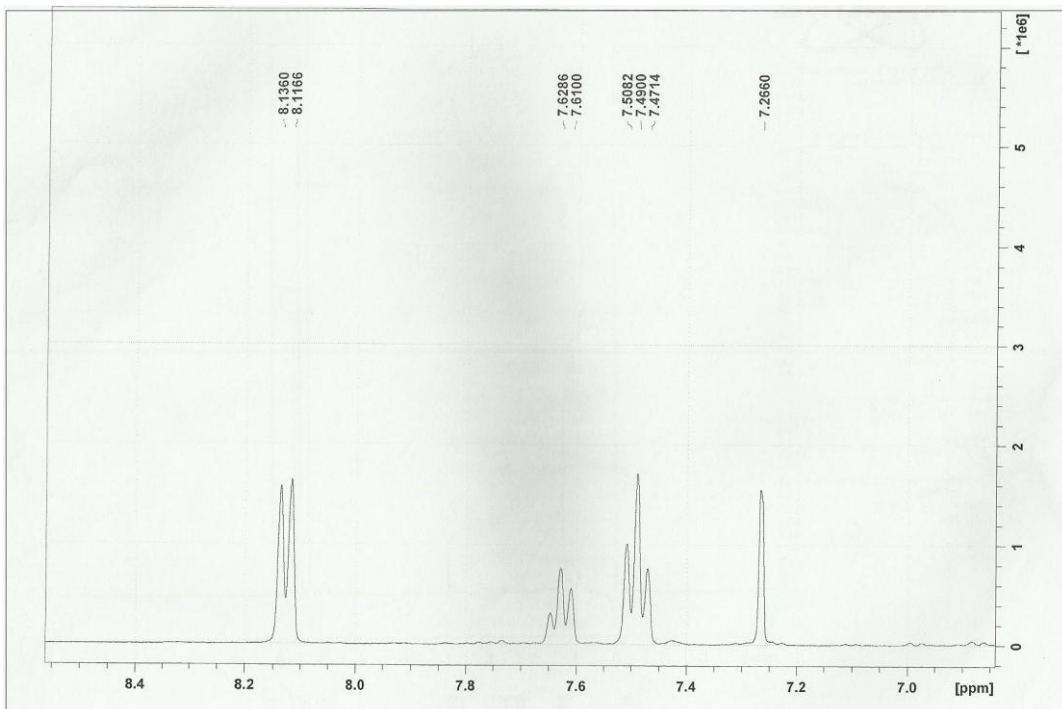
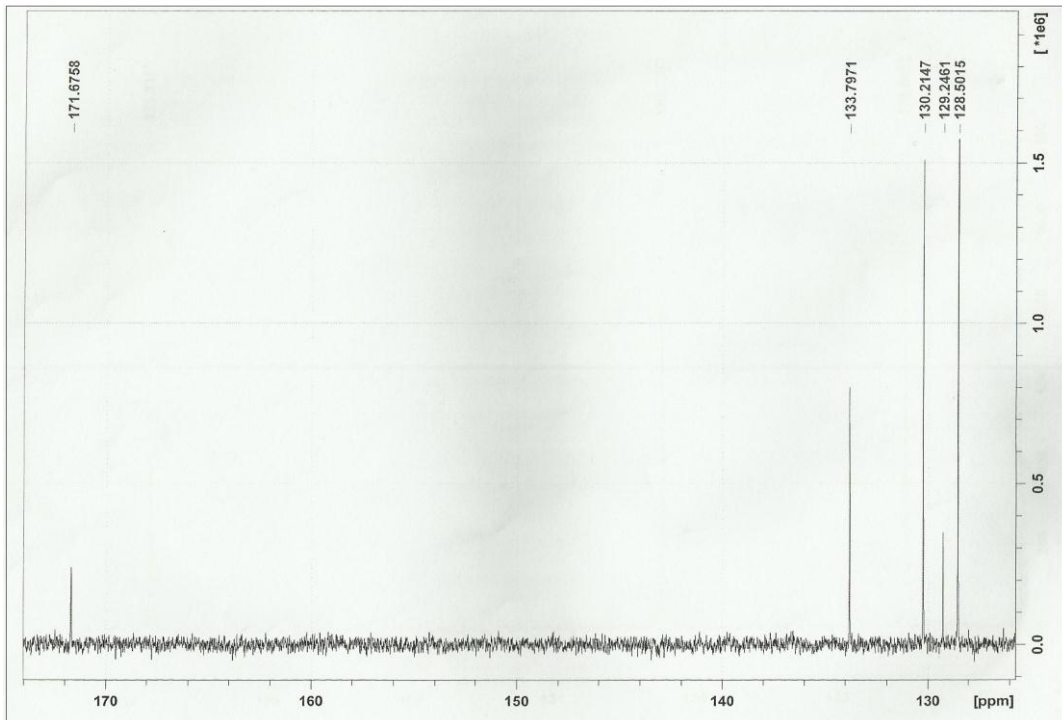


**ANEXO 5** - Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do extrato acetato de etila em pH 8 da própolis de Ponta Grossa, amostra P2 (item 7.2.4)



**ANEXO 6** - Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do extrato acetato de etila em pH 4 da própolis de Ponta Grossa, amostra P2 (item 7.2.4)





**ANEXO 7** - Espectros de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C do extrato obtido com éter etílico em pH 4 da própolis de Ponta Grossa, amostra P2 (item 7.2.4)