

ÉRICA WEINSTEIN TEIXEIRA

**IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES VEGETAIS COMPONENTES DA PRÓPOLIS
ORIGINÁRIA DE TRÊS REGIÕES DE MINAS GERAIS E SUAS ATIVIDADES
BIOLÓGICAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Entomologia, para obtenção do título de “Doctor Scientiae”.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2003**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

T266i
2003

Teixeira, Érica Weinstein, 1968-

Identificação de espécies vegetais componentes da
própolis originária de três regiões de Minas Gerais e suas
atividades biológicas / Érica Weinstein Teixeira. – Viço-
sa : UFV, 2003.

171p. : il.

Texto em português e inglês

Orientador: Dejair Message

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa

1. Própole - Origem. 2. Própole - Atividade biológica.
3. Própole - Composição. I. Universidade Federal de
Viçosa. II. Título.

CDD 19.ed. 638.1

CDD 20.ed. 638.1

ÉRICA WEINSTEIN TEIXEIRA

**IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES VEGETAIS COMPONENTES DA PRÓPOLIS
ORIGINÁRIA DE TRÊS REGIÕES DE MINAS GERAIS E SUAS ATIVIDADES
BIOLÓGICAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Entomologia, para obtenção do título de “Doctor Scientiae”.

APROVADA: 30 de abril de 2003.

Renata Maria Strozi Alves Meira
(Conselheira)

Antônio Salatino
(Conselheiro)

Giuseppina Negri

Célia Alencar de Moraes

Dejair Message
(Orientador)

Ao Marcos,

ao Lucas e

à Thaís,

pelo imenso e incondicional carinho,

dedico este trabalho.

À Kenny e ao Ney

*pela confiança e incentivo constantes,
ofereço.*

Agradeço de forma especial

Ao Mestre, entusiasta da Apicultura, Prof. Dr. Dejair Message, com quem ficou estabelecida uma relação de grande amizade e sem a qual não seria possível o desenvolvimento deste trabalho com as características e as dimensões que possui.

À Profa. Dra. Renata Maria Strozi Alves Meira, muito mais do que uma conselheira, verdadeira amiga, que norteou os meus primeiros passos na área de Anatomia Vegetal.

Ao Prof. Dr. Antônio Salatino, pela calorosa acolhida em seu laboratório, pela simplicidade e pela paciência nos ensinamentos de Fitoquímica.

À Profa. Dra. Giuseppina Negri, pela transferência de forma totalmente desprendida dos seus conhecimentos de técnicas cromatográficas e pela maneira solícita com que sempre me atendeu.

Ao Prof. Dr. Lúcio Antônio de Oliveira Campos, pelos longos e estimulantes bate-papos.

Ao apicultor Adomar Jesus de Carvalho, homem dedicado e perspicaz que faz ciência sem perceber: agradeço principalmente pela confiança.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e à Agência de Pesquisa Tecnológica dos Agronegócios, pela oportunidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de estudo.

À Profa. Dra. Célia Alencar de Moraes, ao Prof. Dr. Mauro Pires Moraes e ao Prof. Dr. Paulo César Stringueta, pelas contribuições indispensáveis e por terem disponibilizado, além das dependências dos seus laboratórios, o material necessário para as avaliações das atividades biológicas.

Ao Prof. Dr. João Augusto Alves Meira Neto, pelas contribuições na caracterização das vegetações dos locais dos apiários experimentais e pela identificação de algumas espécies coletadas.

Ao funcionário Geraldo Ferreira Neri, pelo auxílio no estabelecimento dos apiários experimentais e pela companhia durante as viagens de coleta no campo.

Aos estudantes de iniciação científica Jamária, Lílian e Cleverson, pela responsabilidade e dedicação e pelos dias e noites de trabalho conjunto.

Ao colega e professor Marcelo Souza Pinto, pela colaboração na execução dos pré-experimentos realizados com os vírus e extratos a serem testados.

Aos estagiários e estudantes de pós-graduação dos laboratórios de Virologia, de Pigmentos e Secagem, de Análise e Síntese de Agroquímicos da UFV e de Fitoquímica da USP, pelos risos e sugestões durante a execução das análises.

À animada turma do Laboratório de Microbiologia Industrial da UFV comandada pela Profa. Célia, em especial à Cidinha Aparecidinha e à Paty Maionese pelas dicas e pelo diário “bem-vinda à realidade”.

Às funcionárias e usuários do Laboratório de Anatomia Vegetal da UFV, que contagiados pelo bom humor e entusiasmo da Profa. Renata (“santa das causas impossíveis”), tornaram as intermináveis análises prazerosas e agradáveis.

Ao colega e “assessor para assuntos especiais” Márcio Dionísio, pela solicitude.

Aos funcionários e colegas do apiário, pelos momentos de descontração e auxílio quando necessário.

Aos amigos, muitos dos quais também pós-graduandos e pais, tia Valcília, Cida e Edson, Simone e Dilenio, Rita e Orlando e Eliane e Ronaldo, por dividirem as culpas e as experiências relativas a estas difíceis tarefas e pelos churrascos, fogueiras e cantorias acompanhadas do violão.

A todos que cooperaram para a execução deste trabalho.

BIOGRAFIA

Érica Weinstein Teixeira, filha de Eunio Ney Teixeira e de Kenny Weinstein Teixeira, nasceu em Recife, Pernambuco, em 17 de maio de 1968.

No primeiro semestre de 1985 iniciou o curso de Zootecnia na UFRPE, em Recife, Pernambuco, graduando-se em abril de 1989.

Em outubro de 1992, obteve o título de Mestre em Zootecnia, na área de Produção Animal, na Universidade Federal Minas Gerais, em Belo Horizonte, Minas Gerais.

No período de maio de 1992 a julho de 1994 foi contratada pela Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado de Minas Gerais (EPAMIG/CRZM, Viçosa, MG), exercendo atividades de pesquisa na área de Nutrição de Monogástricos.

Em julho de 1994 foi contratada, mediante concurso público, pelo Instituto de Zootecnia (IZ/SAA, SP), atualmente vinculado à Agência de Pesquisa Tecnológica dos Agronegócios (APTA/SAA, SP), onde atua até o momento, tendo ingressado na série de classes como Pesquisador Científico.

Em março de 1999, iniciou o curso de Doutorado em Entomologia na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

Em 30 de abril de 2003, submeteu-se aos exames finais de defesa de tese para obtenção do título de *Doctor Scientiae* em Entomologia.

*“Um vencedor não vence pessoas,
vence desafios,
vence obstáculos.”*

CONTEÚDO

RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
Introdução Geral.	1
Capítulo 1 – Indicadores da origem botânica da própolis: importância e perspectivas.....	3
1.1 Introdução.....	3
1.2 Origem da própolis: Zonas Temperadas x Zonas Tropicais.....	6
1.3 Secreção de resinas em estruturas florais.....	20
1.4 Metabólitos na identificação da origem botânica da própolis.....	21
1.5 Estruturas secretoras na identificação da origem botânica da própolis.....	28
1.6 Relevância das relações <i>Apis mellifera</i> x <i>Baccharis dracunculifolia</i> spp. (Asteraceae).....	30
1.7 Considerações Finais.....	33
1.8 Referências Bibliográficas.....	36
Capítulo 2 – Metacrilato: uma alternativa na identificação da composição botânica da própolis.....	46
Resumo.....	46
Introdução.....	47

Material e Métodos.....	49
Resultados e Discussão.....	51
Conclusões.....	57
Referências Bibliográficas.....	58
Capítulo 3 – Identificação de espécies vegetais componentes da própolis originária de três regiões de Minas Gerais, pela técnica de inclusão em metacrilato.....	60
Resumo.....	60
Introdução.....	61
Material e Métodos.....	66
Resultados e Discussão.....	71
Conclusões.....	106
Referências Bibliográficas.....	108
Capítulo 4 – Avaliação da atividade antibacteriana, antioxidante e antiviral da própolis originária de três regiões de Minas Gerais	113
Resumo.....	113
Introdução.....	115
Material e Métodos.....	118
Resultados e Discussão.....	128
Conclusões.....	151
Referências bibliográficas.....	152
Capítulo 5 – Pentacyclic Triterpenoid Bauer-7-en-3 β -yl acetate Isolated from Brazilian Propolis.....	163
Abstract.....	163
Introduction.....	164
Materials and Methods.....	165
Results and Discussion.....	167
References.....	168

Conclusões Gerais.....	171
------------------------	-----

RESUMO

TEIXEIRA, Érica Weinstein, D.S., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2003.
Identificação de espécies vegetais componentes da própolis originária de três regiões de Minas Gerais e suas atividades biológicas. Orientador: Dejair Message. Conselheiros: Renata Maria Strozi Alves Meira e Antônio Salatino.

O objetivo desse estudo foi identificar as espécies vegetais constituintes da própolis produzida em diferentes localidades do Estado de Minas Gerais, bem como avaliar as atividades antibacteriana, antiviral e antioxidante apresentadas pelos extratos metanólicos de acordo com a sazonalidade da produção. Foram coletadas, mensalmente, durante um ano, amostras de própolis produzidas em três apiários experimentais localizados nos Municípios de Itapeçerica, Paula Cândido e Virginópolis, Minas Gerais. Ramos de espécies vegetais que floresciam nos arredores dos apiários foram também coletados e utilizados, tanto na produção de laminário de referência como de exsicatas depositadas em herbário, devidamente registradas para confirmação da identidade taxonômica. Na obtenção do laminário de própolis produzido com amostras coletadas em cada localidade, além de técnica tradicionalmente utilizada, testou-se a viabilidade de identificação de espécies vegetais presentes em amostras de própolis incluídas em metacrilato, por meio de observações microscópicas. Diferenças qualitativas marcantes a favor da técnica de inclusão em metacrilato foram constatadas, permitindo a obtenção de cortes seriados, de espessura conhecida e nitidez nas características anatômicas indicadoras de táxon. O considerável nível de detalhamento proporcionado por essa técnica levou à obtenção de resultados inéditos quanto à origem botânica da própolis,

indicando que na região de Itapecerica, embora *B. dracunculifolia* tenha sido identificada como espécie predominante, constatou-se a presença também de fragmentos de ápices vegetativos de *Baccharis calvescens* DC. e *Baccharis trimera* DC. (Asteraceae), além de *Myrsine umbellata* G. Don (Myrsinaceae). Dois outros tipos de estruturas anatômicas não identificadas foram também detectados. Na própolis de Paula Cândido, houve contribuição relevante de *B. dracunculifolia*. Tricomas secretores de *Myrsine umbellata* foram visualizados, além de traqueídeos de gimnosperma. Na região de Virginópolis, a própolis constitui-se, principalmente, de secreções vegetais que estão exsudando em espécies locais, além de constituintes advindos de estruturas secretoras de *B. dracunculifolia*. *Vernonia polyanthes* Less. (Asteraceae) também participa da composição da própolis produzida nessa região. *B. calvescens*, além de três outros tipos morfológicos, foram também visualizados. Os resultados mostraram-se promissores quanto à possibilidade de utilização da própolis cuja principal fonte vegetal seja *B. dracunculifolia*, como agente antioxidante e antibacteriano (para *S. aureus*). A associação de elevado teor de triterpenóides e de alguns compostos fenólicos em amostras de própolis pode garantir atividade anti-BHV-1 e anti-PRV. Pôde-se constatar ainda que a sazonalidade é um fator determinante na atividade biológica da própolis. Amostras de própolis com conteúdo semelhante de substâncias fenólicas apresentaram atividades biológicas diferenciadas, sugerindo a presença de certos compostos ativos em concentrações diferentes entre as amostras. Amostras de própolis de origem botânica e perfis químicos semelhantes podem apresentar diferenças quanto à eficiência na inibição da multiplicação de *S. aureus*. Ademais, bactérias de uma mesma espécie podem apresentar sensibilidades diferentes a um mesmo extrato de própolis. Embora amostras de própolis com teor mais elevado de substâncias fenólicas sejam mais eficientes na inibição de *S. aureus*, os resultados sugeriram possível sinergismo desses compostos com triterpenos. Própolis cujas características organolépticas não se ajustam às exigidas pelo mercado podem apresentar atividades biológicas importantes.

ABSTRACT

TEIXEIRA, Érica Weinstein, D.S., Universidade Federal de Viçosa, April 2003.
Identification of plant species constituting the propolis of three different regions of Minas Gerais and its biological activity. Adviser: Dejair Message.
Committee members: Renata Maria Strozi Alves Meira and Antônio Salatino.

The aim of this study was to identify the plant species constituting the propolis produced in different regions of the State of Minas Gerais, as well as to evaluate antibacterial, antiviral and antioxidant activities presented by methanolic extracts that vary with the season of the production. Propolis samples were collected, monthly, during one year, in three experimental apiaries located in the Municipalities of Itapeçerica, Paula Cândido and Virgíniópolis, MG. Buds of plant species that bloomed in the apiary surroundings were also collected and used for the production of reference slides and exsicates deposited in herbarium, properly registered for taxonomic identity confirmation. For the obtention of the propolis slides produced with samples collected in each locality, besides the technique traditionally used, the viability of the identification of plant species present in propolis samples in metacrilato through microscopic observations was tested. Strong qualitative differences favoring the metacrilato inclusion technique were verified. This technique allowed the obtention of seriate cuts, whose thickness was known and in which taxon indicative anatomic characteristics were easily identified. The considerable level of detail provided by this technique brought unpublished results on the propolis botanical origin. These results indicate that in the Itapeçerica region, although *B. dracunculifolia* has been identified as the predominant species, the presence of fragments of vegetative apices of *Baccharis*

calvescens DC. and *Baccharis trimera* DC. (Asteraceae), besides *Myrsine umbellata* G. Don (Myrsinaceae) was also verified. Two other types of non-identified anatomical structures were also detected. There was an important contribution of *B. dracunculifolia* in Paula Cândido's propolis. Secretory trichomes of *Myrsine umbellata* as well as gymnosperm tracheides were observed. In the region of Virginópolis, propolis is made up mainly of plant secretion exuded by local species. Besides constituents derived from secretory structures of *B. dracunculifolia*, *Vernonia polyanthes* Less. (Asteraceae), *B. calvescens* also participates in the composition of propolis produced in that region, together with three other morphological types that were observed. The results in relation to the possibility of using propolis, having *B. dracunculifolia* as the main plant source, as an antioxidant and antibacterial (against *S. aureus*) agent, were promising. The association of high triterpenoid levels and some phenolic compounds in propolis samples may guarantee activity anti-BHV-1 and anti-PRV. It was also verified that seasonality is a major determinant of propolis biological activity. Propolis samples with constituents similar to phenolic substances showed differentiated biological activities, suggesting the presence of certain active compounds in different concentrations among the samples. Propolis samples of similar botanical origin and chemical profiles may present differences in efficiency of *S. aureus* growth inhibition. Likewise, a single species of bacteria may show different susceptibilities to a single propolis extract. Although propolis samples with higher levels of phenolic substances are more efficient in inhibiting *S. aureus* growth, the results suggested a possible synergism of these compounds with triterpenes. Propolis whose organoleptic characteristics do not adjust to market demands may present important biological activities.

INTRODUÇÃO GERAL

O panorama contemporâneo do mercado de produtos apícolas vem sofrendo modificações marcantes nos últimos anos, em virtude do processo de diversificação. Considerando-se os produtos básicos (mel, pólen, própolis, geléia real, cera e apitoxina), o que se observa é que eles se revezam ao longo dos anos em termos de importância econômica, atribuindo-se com freqüência a responsabilidade desta instabilidade a fatores mercadológicos. A exemplo de qualquer outro produto, a demanda e a oferta são os reguladores fundamentais do mercado. A oferta, além de incipiente no Brasil, sofre considerável influência da entrada de produtos de qualidade muitas vezes inferior, porém a preços mais competitivos. Quanto à demanda, observa-se acentuado e progressivo interesse da população por produtos naturais, seja para inclusão na dieta ou para fins terapêuticos.

Atualmente, a própolis afigura-se como um dos mais importantes produtos de exportação do setor, com significativa representatividade também no mercado interno, chegando a ocupar, em certos momentos, a posição de destaque tradicionalmente ocupada pelo mel. As cifras que traduzem o incremento de sua produção são surpreendentes e, certamente, a premiação recebida pela própolis brasileira durante a realização do XXX Congresso Internacional da APIMONDIA, no Japão, representou importante marco nas negociações que envolvem o produto, valorizando-o em função de suas qualidades. A partir de então, intensificou-se a valorização das suas características organolépticas, as quais constituem importantes parâmetros avaliados nas transações comerciais do produto, tanto no mercado interno como no externo. Valoriza-se a própolis verde, aromática e de aspecto não-pegajoso, não se observando a mesma tendência com relação àquela de cor escura, pouco aromática e pegajosa. Ressalte-se que este tipo de avaliação, a qual ocorre durante a sua comercialização, freqüentemente antecede análises físico-químicas ou avaliações mais detalhadas do perfil químico do produto, o que possibilita o desmerecimento de considerável parcela da produção nacional.

Apesar dos avanços alcançados quanto à caracterização da própolis e da amplitude da produção científica acerca do produto, constata-se a escassez de informações que vinculem a origem botânica às atividades biológicas já observadas. Tal lacuna está relacionada às dificuldades existentes quanto à identificação da origem dos compostos que

contribuem para a composição do perfil químico do produto e, conseqüentemente, das atividades biológicas a eles associadas.

Sendo assim, estudos que viabilizem a avaliação da origem botânica da própolis, bem como o perfil químico e as atividades biológicas relacionadas a esta origem, poderão gerar subsídios e abrir novas perspectivas no que tange à utilização racional do produto para fins terapêuticos específicos.

CAPÍTULO 1

Indicadores da origem botânica da própolis: importância e perspectivas

1.1 Introdução

Comercialmente, a própolis tem ocupado lugar de destaque no mercado nacional e internacional de produtos apícolas. Sua inserção se deve, essencialmente, às inúmeras constatações das diferentes atividades biológicas atribuídas aos seus constituintes químicos. Como consequência, observou-se incremento do valor agregado ao produto, sendo este um dos importantes indicadores que representam a cadeia produtiva da apicultura.

Ilustrando esta afirmação, Northenberg (1997) mencionou diferenças da ordem de até 30 vezes nos valores de venda do produto já beneficiado e comercializado no Brasil e no Japão, podendo esta discrepância ser explicada pela sua grande popularidade em países da Europa Oriental e, particularmente, nos asiáticos como Japão, Coreia do Sul e China.

As informações existentes sobre a magnitude do mercado de própolis ainda são pouco precisas. Abreu (1997) estimou que a produção anual de própolis no Brasil era de 115 toneladas, o que representa cerca de R\$ 80,5 milhões. Segundo o autor citou, conforme dados do *Japan Trade Organization* (JETRO), 92% de toda a própolis *in natura* consumida no Japão é de origem brasileira, o que gera faturamento em torno de US\$ 20 milhões/ano às exportações nacionais.

No panorama atual, o Brasil ocupa a posição de terceiro maior produtor mundial, perdendo apenas para a Rússia e para a China (Pereira et al., 2002).

Comprova-se a importância do produto não só em termos econômicos, mas principalmente científicos, com centenas de artigos publicados nas últimas décadas. Todavia, segundo constatações de Pereira et al. (2002), apesar da posição de destaque na produção e comércio da própolis, e de possuir a quinta maior produtividade científica no assunto, a atividade de pesquisa no Brasil não reflete, nem em número nem em conteúdo, o interesse internacional que a própolis brasileira possui, principalmente para os japoneses.

Os estudos, desenvolvidos em praticamente todo o mundo, atribuem à complexidade de sua composição propriedades farmacológicas importantes, considerando alguns compostos isoladamente, ou o sinergismo existente entre eles. Os resultados indicam atividade de amplo espectro contra diferentes microorganismos (fungos, bactérias, vírus, protozoários etc.) de distintos graus de patogenicidade para o homem e outros animais. Ainda, importantes propriedades biológicas foram comprovadas, como a antioxidante, acitotóxica e a imunomoduladora. Tais resultados encontram-se bem documentados em revisões bibliográficas específicas, como a conduzida recentemente por Banskota et al. (2001), na qual são apresentados dados compilados desde os citados por Guisalberti (1979) até os dias atuais.

Contudo, a exemplo de muitos outros produtos naturais, falta à própolis garantia de parâmetros essenciais quanto à sua eficácia, segurança e qualidade, de forma a permitir o uso racional do produto. Para tanto, avaliações fitoquímicas e fármaco-toxicológicas se fazem necessárias.

Hausen et al. (1987, 1988) identificaram alguns compostos alergênicos presentes em própolis originária de espécies do gênero *Populus* (Salicaceae), bem como em constituintes presentes em suas gemas foliares (Hausen et al., 1992). Recentemente, Popova et al. (2002) comprovaram que certos compostos presentes em amostras de própolis provenientes de *Myroxylon balsamum* (Fabaceae) apresentam considerável toxicidade. Embora ainda incipientes, alguns trabalhos também vêm sendo desenvolvidos no intuito de se estabelecer dosagens de ingestão diária consideradas seguras (Burdock, 1998).

Porém, é imprescindível que tais avaliações sejam efetuadas de forma individualizada, específica e bem fundamentadas quanto à origem das amostras estudadas, tipos de reações produzidas e organismos utilizados.

Ainda, deve-se considerar que a associação da origem botânica aos fatores climáticos do local de produção implicam diferenças marcantes, tanto no aspecto qualitativo como quantitativo da composição química do produto final (Guisalberti et al., 1979, Jeanne, 1984, Greenaway et al., 1990, Cheng e Wong, 1996, Asis, 1991, Bankova et al., 1992, Gary, 1993, Tomás-Barberán, 1993), dificultando a obtenção de regularidade na eficácia farmacológica do produto.

Conforme discutido por Pereira et al. (2002), faz-se necessário definir quais parâmetros terapêuticos mínimos os diferentes tipos de própolis devem possuir, ou idealmente que composição química mínima deveria ser exigida para que apresentem as

propriedades farmacológicas desejadas, devendo-se responder a um questionamento antigo: qual própolis serve para qual ação terapêutica?

Neste sentido, uma das etapas primordiais a serem galgadas é a identificação das espécies vegetais que estariam contribuindo como fontes potenciais de compostos bioativos constituintes da própolis. Desta forma, o produto poderia ser considerado não só provedor de modelos de moléculas que apresentem atividades biológicas importantes, mas também como fonte de tais constituintes.

Se por um lado a definição do produto¹ evidencia a complexidade de sua origem e composição, por outro demonstra a importância da utilização de bases científicas e aportes tecnológicos no suporte e orientação de investigações relativas à própolis. Esta afirmação justifica-se pelo caráter multidisciplinar que permeia a pesquisa de biofármacos, havendo envolvimento e complementaridade de conhecimentos advindos de diversas ciências, tais como Farmacologia, Química Orgânica, Botânica, Etnobotânica, Etnofarmacologia, Quimiossistemática, dentre outras (Di Stasi, 1996).

Vale ressaltar que, embora as plantas sejam uma fonte importante de produtos biologicamente ativos, os quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos, muitas vezes, a síntese de certos compostos por vias químicas artificiais é tecnicamente inviável, seja pela dificuldade metodológica ou pelo elevado custo que apresentam.

Entretanto, as diversas formas pelas quais tais compostos ficam disponíveis para coleta pelas abelhas, nas diferentes partes dos vegetais, bem como a origem e natureza dos compostos, ainda não estão, em muitos casos, bem determinadas, havendo grande variação entre as espécies vegetais envolvidas.

Sabe-se que complexos processos estão envolvidos nas atividades secretoras das plantas e que muitas dúvidas ainda perduram quanto à natureza das substâncias secretadas e suas respectivas localizações nos vegetais.

É fundamental, portanto, a elucidação do significado da presença das estruturas vegetais e dos constituintes químicos presentes na própolis, sugerindo a possibilidade de sua utilização como indicadores da real composição botânica do produto.

Crane (1990), ao abordar os diversos recursos vegetais utilizados pelas abelhas, chamou a atenção para a ausência de derivação botânica do termo própolis,

¹ Brasil (2001): Entende-se por própolis o produto oriundo de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas, coletadas pelas abelhas, de brotos, flores e exsudatos de plantas, ao qual as abelhas acrescentam secreções salivares, cera e pólen.

diferentemente do que ocorre com os termos néctar e pólen, que por si sós indicam produtos de origem vegetal.

O termo própolis é amplamente utilizado em publicações para designar o produto final depositado na colméia pelas abelhas campeiras, cuja alocação final na colônia fica a cargo das abelhas mais jovens que executam tarefas internas. É também usado para descrever a matéria-prima que será utilizada para este fim, já que é comum encontrarmos descritas na literatura expressões como “coleta de própolis”, a qual resume circunstâncias de forrageamento e coleta nas diversas fontes vegetais pelas abelhas.

De acordo com Seeley (1995), a própolis tem para as abelhas basicamente duas funções: mecânica (por evitar perda de calor por convecção) e química (por garantir a assepsia, principalmente nas regiões de cria), sendo, segundo Ogren (1990), a última considerada a principal. Estas funções explicam a origem grega da palavra *pro* – (à frente de) e *-polis* (cidade).

Ressalte-se que o conhecimento da origem da própolis não é unicamente de interesse acadêmico, pois permite gerar informações dos locais mais adequados para a alocação de colméias destinadas à sua produção. Ainda, a associação deste conhecimento a estudos fitoquímicos específicos possibilitaria a predição da composição aproximada da própolis a ser disponibilizada no mercado, conferindo-lhe certificação de origem, uma vez que sua produção ocorreria em apiários cujas composições florísticas teriam sido previamente avaliadas.

1.2 Origem da própolis: Zonas Temperadas x Zonas Tropicais

Em países da Europa, a preocupação com a origem da própolis parece acompanhar os estudiosos da área desde o início do século passado. Embora a dificuldade na aquisição da literatura dessa época e o idioma em que são publicadas sejam uma realidade, dado que em sua maioria os trabalhos são originários de países do leste europeu, Ghisalbert (1979) apresentou em sua revisão os trabalhos pioneiros com alguns dos principais resultados: Helfenberg (1908) observou que as abelhas coletavam própolis de ramos, folhas e brotos de *Betula* spp. (Betulaceae), *Fraxinus* spp. (Oleaceae), *Ulmus* spp. (Ulmaceae) e árvores de bálsamo. A primeira indicação de que a própolis seria obtida de *Populus nigra* var. *pyramidalis*, família Salicaceae, foi efetuada por Jaubert, em 1926. Posteriormente, Vansell e Bisson (1940) concluíram que também

a própolis do oeste dos Estados Unidos era originária de gemas de *Populus nigra*, além de *Alnus viridis* (Betulaceae).

Popravko (1974), citado por König (1985), afirmou que espécies de *Populus*² (de nome vulgar choupo ou álamo) constituem-se nas principais fontes de própolis na Europa, sendo *Betula* spp., *Quercus* spp. (Fagaceae), *Alnus* spp., *Salix* spp. (Salicaceae) e *Corylus avellana* (Corylaceae, aveleira) de importância secundária. Todavia, na Rússia central, segundo o autor, *Betula* parece predominar em relação à *Populus* como fonte de própolis.

Em publicação posterior, Popravko (1976) descreveu a importância das secreções de gemas de *Betula* (que ocupa grande superfície de bosques de zonas temperadas) para a planta e, provavelmente, também para as abelhas que as coletam. Foi considerada, em suas conclusões, que a natureza das substâncias presentes nas gemas era equivalente àsquelas presentes na própolis (basicamente: hexabiterpenos, ácidos aromáticos e flavonóides). Segundo o autor, as secreções das gemas exercem papel essencial no sistema de defesa do vegetal, apresentando notável atividade biológica contra microorganismos fitopatogênicos, como fungos e vírus. Argumentou-se ainda tratar-se de um gênero de plantas que atua eficientemente em termos de manifestações alelopáticas, inibindo eficientemente o desenvolvimento da flora competidora.

Nagy et al. (1985) afirmaram que, na Hungria, as principais fontes de própolis seriam os gêneros *Acacia* (Fabaceae), *Betula* (Betulaceae), *Populus* (Salicaceae), *Pinus* (Pinaceae), *Prunus* (Rosaceae), além de espécies como *Aesculus hypocastane* (Hippocastanaceae), de onde as abelhas fazem coletas em gemas ainda fechadas.

Ghisalbert (1979), concluindo sua revisão, afirmou que a própolis de zonas temperadas advém também de faia (*Fagus*, Fagaceae), de árvores de coníferas e de *Aesculus* spp. (Hippocastanaceae).

Suas informações foram corroboradas por Bonvehí e Coll (1994), que indicaram como principais fontes de resinas do Hemisfério Norte: *Aesculus hippocastanum*, *Betula* spp., *Fraxinus* spp., *Picea* spp., *Pinus* spp., *Populus* spp., *Quercus* spp., *Salix* spp. e *Ulmus* spp. Já para as amostras de própolis por eles analisadas e embora não esclarecendo a técnica utilizada, os autores atribuíram a origem do produto na China às

² *Populus* - Gênero presente em extensa faixa geográfica, a qual abrange América do Norte, Europa, norte da África e regiões não-tropicais da Ásia, incluindo oeste da China e Coreia (Schmithüsen, 1976, citado por König, 1985).

seguintes espécies: *Melia azederach*, *Morus* spp., *Populus* spp., *Prunus* spp., *Pyrus* spp., *Salix* spp., *Robinia pseudacacia* L. e *Ulmus* spp.

Entretanto, Greenaway et al. (1990), ao analisarem própolis e gemas vegetais de diversas espécies provenientes de diversos países, incluindo Áustria, Alemanha, Israel, Reino Unido, Estados Unidos e Equador, afirmaram que, com exceção de amostras do Equador, foram identificados compostos característicos unicamente de gemas de *Populus* spp., além de cera e açúcares agregados posteriormente pelas abelhas. Segundo os autores, os constituintes oriundos de gemas de *Aesculus hippocastanum* e de várias espécies de coníferas têm características próprias, diferentes dos presentes em gemas de *Populus*, não estando presentes em nenhuma das amostras analisadas. Suas análises comprovaram que ocorre preferência de coleta pelas abelhas por algumas espécies do gênero *Populus*. Com exceção do Equador, todas as amostras de própolis analisadas apresentaram constituintes típicos de espécies da seção *Aigeiros* desse gênero (a qual inclui *P. deltoides* e *P. nigra*, juntamente com outras espécies relacionadas à *P. deltoides*, como *P. fremontii*, *P. sargentii* Dode e *P. wislizeni* Sarg.) e de híbridos resultantes de cruzamentos dessas espécies.

Konig (1985), associando suas avaliações a comunicações pessoais, afirmou que nas ilhas do Havaí as principais fontes de própolis são *Plumeria acuminata* e *Plumeria acutifolia* (Apocynaceae), de onde as abelhas coletam matéria-prima dos caules e gemas, havendo também coleta em *Eucalyptus sideroxylon* (Myrtaceae), originário da Austrália, e de *Psidium guajava* (Myrtaceae) e *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae), ambas originárias da América do Sul.

Bankova e Popov (1994) constataram que *Populus nigra* e *Populus canadensis* são as principais fontes de própolis na Albânia, sendo a primeira espécie mais importante e que, possivelmente, constituintes de gemas de *Prunus* spp. também façam parte da composição do produto nesse país. Os autores ressaltaram as diferenças por eles observadas entre a própolis produzida na Bulgária e na Albânia, justificando tal fato em função do clima predominante nos dois países, embora ambos se situem na Península Balcânica.

Vale ressaltar que a espécie *Populus deltoides*, amplamente distribuída na região central e oeste dos Estados Unidos, foi introduzida na Europa no final do século XVIII. A partir de então, ocorreu um processo de livre hibridação com *P. nigra*, cujos produtos passaram a ser designados *Populus x euramericana*. O híbrido encontra-se atualmente espalhado pelo oeste europeu, promovendo variações na composição da própolis,

conforme relatado por Garcia-Viguera (1992), sendo, segundo o autor, inadequado o raciocínio de que fontes similares (híbridos de uma espécie) produzem própolis de constituições semelhantes.

Christov et al. (1998), ao constatar a complexidade da composição da própolis egípcia, concluiu que, além de *Populus nigra*, presente no local de coleta, outras espécies poderiam participar da composição do produto. Os autores consideraram a influência de clima subtropical e tropical nos resultados obtidos.

De maneira geral, nos estudos desenvolvidos em países europeus, incluindo Hungria (Papay et al., 1985), Grã-Bretanha (Greenaway et al., 1987) e Bulgária (Bankova et al., 1992), o gênero *Populus* predomina como fonte de própolis, principalmente *P. nigra*. Já na Mongólia, *P. suaveolens* é a única espécie disponível do gênero para esse fim (Bankova et al., 1992).

Nakamura et al. (1997) identificaram, por meio de análises cromatográficas, *Populus italica* e *Betula platyphylla* como sendo as principais espécies que originavam a própolis na região de Tóquio, no Japão. Em seus resultados foi constatado ainda que há uma significativa variação ao longo do ano, quanto à quantidade de resina produzida pelas gemas de *P. italica*.

Algumas outras informações compiladas por Crane (1990), as quais incluem a origem da própolis coletada por *Apis mellifera* encontram-se apresentadas na Tabela 1.

Saliente-se que a autora baseou-se em informações da literatura, principalmente de Fahn (1979), ao apresentar o provável tipo de substância coletada em cada fonte vegetal pelas abelhas.

Em seu apanhado, embora Crane (1990) tenha demonstrado certa diversidade de fontes de própolis observadas em países de clima temperado, a autora também concluiu que *Populus* e *Betula* são os gêneros que predominam nessa zona como fonte de material para a produção de própolis.

É possível constatar a escassez de informações obtidas em países tropicais relativas a esta época, tendo sido *Xanthorrhoea* (Juncaceae) indicada como fonte no oeste da Austrália (Ghisalberti, 1979).

Recentemente, vários estudos têm sido conduzidos na tentativa de se identificar efetivamente a origem da própolis nos trópicos, por meio de diferentes técnicas, sejam elas diretas (observação de coleta no campo) ou indiretas (análise dos constituintes químicos e estruturas anatômicas vegetais presentes ou análises palinológicas).

Tabela 1. Origem da própolis coletada por abelhas *Apis mellifera*. (Adaptado de Crane, 1990)

Fontes vegetais	Local	Substância
Anacardiaceae		
<i>Mangifera indica</i> L.	Tailândia, Montserrat	Resina
<i>Schinus terenbethifolius</i> Raddi	Havaí	Resina?
Apocynaceae		
<i>Landolphia capensis</i> Oliver	África do Sul	Látex
<i>Plumeria rubra</i> L.	Havaí	Látex
Araucariaceae		
<i>Araucaria heterophylla</i> (Salisb.) Franco	Barbados	Resina
Betulaceae		
<i>Alnus sieboldiana</i> Matsumura	Japão	Lipossolúvel?
<i>Alnus viridis</i> (Chaix) DC	USA	Lipossolúvel
<i>Betula pendula</i> Roth		
como <i>B. alba</i>	USSR	Lipossolúvel
como <i>B. verrucosa</i>	USSR	Lipossolúvel
Burseraceae		
<i>Bursera excelsa</i> (Knuth.) Engel.	México	Lipossolúvel?
<i>Bursera simaruba</i> (L.) Sarg.	México, Montserrat	Lipossolúvel, resina
<i>Protium copal</i> Engl.	México	
Caryophyllaceae		
<i>Lychnis viscaria</i> L.	URSS	Lipossolúvel
Casuarinaceae		
<i>Casuarina equisetifolia</i> J.R. Forst & G. Forst	Barbados, Egito e Seicheles	Resina
Compositae		
<i>Cynara cardunculus</i> L.	Chile	
<i>Helianthus annuus</i> L.	Grã-Bretanha	Mucilagem
Cornaceae		
<i>Cornus mas</i> L.	Romênia	
Euphorbiaceae		
<i>Hevea brasiliensis</i> Muell. Arg. (das folhas).	Botswana	Cera
Fagaceae		
<i>Castanea sativa</i> Mill.	França	
<i>Quercus robur</i> L.	França	
Guttiferae		
<i>Calophyllum inophyllum</i> L.	Seicheles	
Hippocastanaceae		
<i>Aesculus hippocastanum</i> L.	URSS e França	Lipossolúvel

Tabela 1. (Cont.).

Fontes vegetais	Local	Substância
Labiatae		
<i>Salvia officianalis</i> L.	URSS	
Lauraceae		
<i>Laurus nobilis</i> L.	Itália	
Leguminosae		
<i>Acacia</i>	África do Sul	Mucilagem
<i>Acacia karroo</i> Hayne	Botswana	Mucilagem
<i>Brachystegia utilis</i> Burtt Davy & Hutch.	Zimbábue	
<i>Hymenae courbaril</i> L.	México	Resina
<i>Julbernardia baumii</i> (Harms) Troupin	Zaire	Resina?
<i>Schizolobium parahybum</i> (Vell.) Blake	Zaire	Resina?
<i>Sophora japonica</i> L.	Romênia	Resina?
Liliaceae		
<i>Xantorrhoea</i> spp. incluindo <i>johnsonii</i>	Austrália	Resina
<i>Xantorrhoea australis</i> R. Br.	Austrália	Resina
<i>Xantorrhoea preissii</i> Endl.	Austrália	Resina
Malvaceae		
<i>Althae rosea</i> (L.) Cav.	Grã-Bretanha	Mucilagem
<i>Hibiscus rosa-sinesis</i> L.	Zaire	Mucilagem
Moraceae		
<i>Artocarpus altillis</i> (Parkinson) Fosberg	Barbados e Montserrat	Látex
<i>Artocarpus heterophyllus</i> Lam.	Seicheles	Látex
<i>Ficus caricas</i> L.	Botswana	Resina
<i>Ficus elastica</i> Roxb. ex Hornem	Tailândia	Látex
<i>Ficus thonningii</i> Blume	Angola	Látex
Myoporaceae		
<i>Myoporum laetum</i> Forst. f.	Nova Zelândia	
Myrtaceae		
<i>Eucalyptus sideroxylon</i> A. Cunn. Ex Wolls	Havaí	
<i>Psidium guajava</i> L.	Havaí	
Oleaceae		
<i>Fraxinus</i> L.	EUA	
<i>Fraxinus excelsior</i> L.ash	desconhecido	
Onagraceae		
<i>Epilobium angustifolium</i> L.	URSS	
Palmae		
<i>Cocos nucifera</i> L.	Seicheles	
Pinaceae		
<i>Albies alba</i> Miller	Romênia	Resina
<i>Pinus wallichiana</i> A.B. Jacks	Romênia	Resina

Tabela 1. (Cont.).

Fontes vegetais	Local	Substância
Rosaceae		
<i>Prunus armeniaca</i> L.	Romênia	Goma
<i>Prunus avium</i> L.	Egito	
<i>Prunus cerasifera</i> Ehrh.	URSS	Goma
ou <i>Prunus cerasus</i> L.	Romenia	Goma
Salicaceae		
<i>Populus alba</i> L.	Itália	Lipossolúvel
<i>Populus angustifolia</i> E. J.	USA	
<i>Populus balsamifera</i> L.	USA	
<i>Populus canadensis</i> Moench.	Itália	Lipossolúvel
<i>Populus deltoides</i> Bartr. ex Marsh.	África do Sul	Lipossolúvel
<i>Populus x euramericana</i> (Dode) Guinier	Reino Unido	
	USA	
<i>Populus nigra</i> L.	Itália	Lipossolúvel
<i>Populus tremula</i> L.	Itália	Lipossolúvel
<i>Populus trichocarpa</i> Torr. & A. Gray	Canadá	Lipossolúvel
<i>Salix alba</i> L.	Romênia	Lipossolúvel
<i>Salix babylonica</i> L.	Egito	
<i>Salix caprea</i> L.	URSS	Lipossolúvel
<i>Salix cinerea</i> L.	Romênia	Lipossolúvel
Sterculiaceae		
<i>Sterculia tragacantha</i> Lindl.	Zaire	Goma
Zygophyllaceae		
<i>Larrea tridentata</i> (DC.) Cov.	USA	

Sem dúvida, a observação direta de abelhas no campo coletando matéria-prima para a produção de própolis seria a técnica mais adequada e cujos resultados seriam incontestáveis no intuito de gerar informações de fontes vegetais utilizadas para a produção de própolis pelas abelhas.

Outras técnicas, ditas indiretas, têm sido utilizadas, tais como: identificação de constituintes químicos e de estruturas ou fragmentos de tecidos vegetais encontrados na própolis, além de grãos de pólen presentes no resíduo insolúvel do produto.

A diversidade de técnicas empregadas denota as dificuldades existentes na determinação de métodos efetivos que indiquem a real origem do produto. Possivelmente, a combinação de vários métodos seja a melhor estratégia a ser adotada.

Ressalte-se que, no caso da utilização de técnicas indiretas, os resultados são algumas vezes não-conclusivos, dada à heterogeneidade e diversidade de informações obtidas com essas análises. Em amostras oriundas de países tropicais, tal fato pode ser atribuído, principalmente, à diversidade da flora presente, podendo as abelhas ser atraídas por diferentes fontes vegetais em um mesmo local. Soma-se a essas dificuldades a falta de conhecimento dos constituintes químicos presentes em muitas espécies vegetais. Também, investigações químicas de material vegetal são

tradicionalmente conduzidas com porções de biomassa de muitas partes não-coletadas pelas abelhas, além das coletadas.

Apesar de adequada, as dificuldades na viabilidade da técnica de observação direta no campo são uma realidade, em função da complexidade que o estudo do comportamento de forrageamento de *Apis mellifera* para obtenção de própolis apresenta, quando comparado aos estudos para obtenção de outros recursos, como néctar e pólen. O principal fator em questão é o reduzido percentual de indivíduos que executam tal atividade por colônia, apesar de que esse número pode ser alterado em função da necessidade.

Santos (1996), ao estudar o forrageamento de própolis de abelhas *Apis mellifera* africanizadas, observou que o forrageamento para coleta desse recurso é pouco representativo em relação a outras atividades de campo, incluindo coleta de pólen. Em seus resultados, constatou-se que apenas cerca de 1% dos indivíduos de uma colônia coletavam própolis. Já a atividade de coleta de pólen observada foi de aproximadamente 35%. Tais resultados justificam-se, possivelmente, pela reduzida demanda do produto pela colônia, em relação a outros recursos que garantem sua nutrição (pólen, néctar e água). Temperatura e insolação são, segundo o autor, fatores ambientais determinantes no comportamento de forrageamento de própolis.

Greenaway et al. (1990) constataram diferenças marcantes no perfil químico de amostras de própolis oriundas do Equador, quando comparadas com aquelas originárias de países de clima temperado e subtropical. Os autores atribuíram tais diferenças a possíveis novas fontes de própolis presentes em zonas tropicais, utilizadas por abelhas *Apis mellifera*, em função da ausência de espécies de *Populus*. Todavia, tais fontes não foram por eles determinadas.

Em regiões tropicais, em especial no Brasil, o grande desafio nesta área é justamente a grande diversidade florística e a disponibilidade de espécies potencialmente atrativas para as abelhas para coleta de própolis. De acordo com Joly (2001), o País é recordista em termos de biodiversidade, detendo cerca de 20% das espécies do planeta. Aproximadamente 55.000 espécies de plantas estão catalogadas em território nacional, de um total estimado entre 350.000 e 500.000 espécies (Guerra e Nodari, 2001).

Tomás-Barberán et al. (1993) concluíram que as principais fontes de própolis da Venezuela seriam *Clusia minor* e *Clusia major* (Guttiferae), ao constatarem que a maioria das amostras por eles analisadas continham benzofenonas polipreniladas,

também presentes em resinas que exsudam de flores daquelas espécies. Os autores associaram observações de campo de *Apis mellifera* visitando tais flores e coletando resina que exsuda da base dos estames (em *C. minor*) ou de um anel na porção mediana dos estames (em *C. major*), com resultados de análise química dessa resina e da própolis produzida. Constata-se em seus resultados que, em uma mesma localidade, houve diferenças no padrão de compostos fenólicos e características organolépticas (cor) apresentados pelo extrato metanólico da própolis produzida pelas abelhas. Uma das amostras apresentou características completamente diferentes, sem nenhum composto comum às outras amostras, além do seu extrato apresentar cor pálida ou incolor, enquanto aqueles obtidos com outras amostras eram de cor marrom-avermelhada ou amarelada. Indícios associados a fatores ecológicos, relacionados à ordem de colonização da fonte vegetal coletada por abelhas *Apis mellifera*, podem estar relacionados.

Bonvehí e Coll (1994), analisando seis amostras de própolis oriundas do Uruguai e apenas uma amostra originária do Brasil, concluíram, por meio de análises espectrométricas que as diferenças encontradas no padrão de flavonóides das amostras foi suficiente para discriminar a origem geográfica. Sem, no entanto, esclarecer de que forma foram correlacionados os resultados químicos das amostras com suas origens botânicas, os autores afirmaram que as seguintes espécies contribuíram para a composição das amostras analisadas: *Betula* spp., *Eucalyptus globulus* L., *Populus* spp., e *Salix* spp. (no Uruguai) e *Citrus sinensis*, *Coffea arabica*, *Saccharum officinarum* e *Eucalyptus* spp. (no Brasil).

Ressalte-se que em alguns casos os resultados obtidos devem ser avaliados com cautela, não sendo, muitas vezes, conclusivos para identificar a origem botânica da própolis. É válido, no entanto, excluir a possibilidade de participação de certos grupos vegetais, levando em conta a associação do conhecimento prévio dos constituintes químicos presentes nos vegetais e do perfil dos constituintes químicos das amostras analisadas.

Banskota et al. (1998), por meio de comparações dos resultados de análises químicas efetuadas em amostras de própolis e informações da literatura de constituintes químicos presentes em diversas espécies vegetais, sugeriram que *Baccharis* spp. seria uma importante fonte de própolis no Brasil, além de *Clusia minor*, *Clusia major* (conforme já sugerido por Tomás-Barberán et al. ,1993, na Venezuela) e *Araucaria heterophylla* (Pinaceae).

Os primeiros resultados de observações de forrageamento de própolis por *Apis mellifera* (africanizadas) no Brasil foram apresentados inicialmente por Santos (1996) e em seguida por Santos e Message (1997). Os autores constataram que em *Baccharis dracunculifolia*, conhecido popularmente como alecrim, a idade das abelhas coletoras variava de 41 a 63 dias. Observaram também que a coleta da própolis ocorria nas gemas apicais e axilares da planta, com o auxílio das mandíbulas e do primeiro par de patas, sendo depois transferida para a corbícula e transportada para a colônia. Foi observado ainda que as coletoras são capazes de recrutar outras operárias pelo comportamento de dança.

Ao detectarem fragmentos de epiderme de um só tipo de tricomas tectores e glandulares de *B. dracunculifolia* em amostras de própolis produzidas em áreas de cerrado de Minas Gerais, Brasil, Bastos et al. (1998) também sugeriram grande participação dessa espécie na composição da própolis. Na análise do espectro polínico, grãos de pólen que se apresentaram na frequência de pólen isolado e/ou isolado ocasional indicaram, segundo os autores, a possível fonte botânica de resina (0 a 3% do total de grãos eram de *Baccharis* e de *Vernonia*).

Estudos conduzidos por Warakomska e Maciejewicz (1992), fundamentados na análise de sedimentos de amostras de própolis com o objetivo de caracterizar os grãos de pólen, bem como outros componentes vegetais presentes, foram pioneiros. A constatação de discos (ou tricomas) secretores e outros elementos dotados de parede celular, os quais foram preservados durante as etapas de extração seqüencial das amostras com diferentes solventes orgânicos (etanol, benzeno e acetona, nesta ordem), serviu de indicação para a descoberta das fontes vegetais presentes. Paralelamente, foram preparadas lâminas com cortes de folhas de *Betula* e de *Alnus*. As observações os levaram a concluir que tais estruturas eram idênticas às presentes no sedimento insolúvel da própolis e que espécies de tais gêneros certamente seriam as fontes vegetais utilizadas para coleta pelas abelhas nos locais estudados.

Entretanto, para Warakomska e Maciejewicz (1992), o conteúdo polínico encontrado nas amostras de própolis por eles analisadas refletia apenas a flora da região de origem, interpretação esta partilhada por muitos pesquisadores.

Ao conduzir o primeiro estudo sobre o pólen encontrado na fração insolúvel de própolis, Jungkunz (1932), citado por Ghisalberti (1979), observou a presença de pólen das leguminosas *Lupinus*, *Robinia* e *Onobrychis sativa*. Todavia, o autor também não concluiu a origem do produto em função dos tipos polínicos encontrados.

D'Albore (1979), pela análise polínica de amostras de própolis de diferentes países (inclusive do Brasil), constatou ser possível utilizar este elemento como indicativo da origem geográfica do produto, em função da ocorrência das espécies vegetais encontradas. As amostras analisadas foram submetidas a extração com mistura de etanol, clorofórmio e acetona em partes iguais. Segundo seus resultados, com base no espectro polínico e identificação de táxons vegetais pela morfologia dos grãos de pólen, é possível inferir sobre o tipo de vegetação de onde foi recolhida a própolis. Também Barth et al. (1999) chegaram a esta conclusão. Com o objetivo de propor uma metodologia para preparo de própolis visando a estudos palinológicos, bem como caracterizar amostras de própolis provenientes de diferentes regiões geográficas do Brasil (RJ, MG e RS) por morfologia polínica, os autores identificaram os seguintes táxons vegetais mais freqüentes: *Eucalyptus*, Compositae (principalmente *Eupatorium*) e *Cecropia* (Cecropiaceae). Este último gênero, juntamente com *Ambrosia* (Compositae), *Piper* (Piperaceae) e *Brosimum* (Urticaceae), constituíram o pólen anemófilo mais representativo. Segundo os autores, as análises qualitativas e quantitativas dos tipos polínicos encontrados em amostras de própolis são instrumentos utilizáveis para a caracterização geográfica de sua procedência, bem como da origem florística e, em alguns casos, estacional das amostras. Como exemplo de pólen utilizado para referencial do período sazonal de coleta de própolis, foram citadas as observações de pólen de *Mimosa caesalpiniaefolia* (Leguminosae) e *Citrus* no sedimento das amostras.

Na interpretação de D'Albore (1979) e de Barth et al. (1999), o pólen presente na própolis pode ter as seguintes origens: (a) carregado pelo vento, adere-se à resina de exsudados vegetais; (b) é um contaminante, colhido em separado pelas abelhas para armazenamento dentro da colméia; (c) vem aderido ao corpo das abelhas durante trabalhos de campo ou mesmo no interior da colméia.

Considerando que essas hipóteses representariam meras contaminações da própolis por pólen, não caberia a interpretação de que em alguma das alternativas haveria possibilidade de utilização de análises morfológicas de pólenes provenientes de espécies vegetais, que estivessem também contribuindo em termos de fornecimento de matéria-prima, para coleta de própolis pelas abelhas.

Neste sentido, a hipótese mais provável a ser considerada seria a possibilidade de coleta de secreções resiníferas em estruturas florais por abelhas *Apis mellifera*, onde efetivamente poderiam estar ocorrendo contaminação de pólenes aderidos aos pêlos do

corpo do inseto, ou ainda, poderia ocorrer o evento do tipo citado pelos autores acima na hipótese (a).

Recentemente, a despeito de tais argumentos, a origem botânica da própolis vem sendo atrelada a estudos polínicos. A própolis produzida na região central do Chile tem sido intensamente estudada dessa forma. De acordo com Valcic *et al.* (1998), a vegetação predominante na região é o matorral, dominada por espécies arbustivas perenes. Para Valcic *et al.* (1999), tanto o pólen como fragmentos de folhas têm considerável valor em termos de sistemática, na análise da origem botânica da própolis. As investigações da origem botânica da própolis oriunda da região central do Chile, por eles conduzidas, basearam-se em análises microscópicas dessas estruturas. Em seus resultados constatou-se que os grãos de pólen que apareciam mais freqüentemente e de forma significativa nas amostras eram das espécies nativas *Baccharis linearis* (Asteraceae), *Buddleja globosa* (Loganiaceae), *Peumus boldus* (Monimiaceae) e *Salix humboldtiana*, e das espécies exóticas *Eucalyptus globulus* e *Ricinus communis* (Euphorbiaceae). Fragmentos de folhas de quatro espécies nativas, quais sejam, *Baccharis linearis*, *Kageneckia oblonga* (Rosaceae), *Lithraea caustica* (Anacardiaceae) e *Trevoa trinervis* (Rhamnaceae) foram facilmente visualizados e identificados nas amostras de própolis, em função da presença de tricomas glandulares e filamentosos e do formato dos estômatos. Embora pólen dessas espécies também estivessem presentes nas amostras analisadas, o nível de significância só foi atingido pela última espécie citada. Diante dos resultados, os autores concluíram que as espécies de plantas consideradas como as principais fontes botânicas da própolis analisada foram aquelas cujo pólen ocorre em grande quantidade (significativa estatisticamente) e aquelas espécies cujos fragmentos de folhas foram também identificados (neste caso, apenas quando associadas à presença de seus respectivos grãos de pólen).

Montenegro *et al.* (2000) diagnosticaram a origem botânica da própolis da região central do Chile em três localidades, onde o clima é do tipo mediterrâneo, pela presença de grãos de pólen no sedimento insolúvel das amostras. As espécies nativas mais representativas foram *Baccharis linearis* (Ruiz & Pav.) Person, *Buddleja globosa* Hope, *Peumus boldus* Molina e *Salix humboldtiana* Willd. Os grãos de pólen que apareceram de maneira mais significativa de espécies exóticas foram de *Eucalyptus globulus* Labill. e *Ricinus communis* L. Foi constatada ainda a presença de grãos de pólen de outras espécies, tais como *Aristotelia chilensis* Stuntz (Elaeocarpaceae), *Cestrum parqui* L'Hér. (Solonaceae), *Citrus limon* (L.) Burm., *Colliguaja odorifera* Molina

(Euphorbiaceae), *Cryptocarya alba* (Molina) Looser (Lauraceae), *Escallonia illinita* (Saxifragaceae), *Eupatorium glechonophyllum* Less. (Asteraceae), *E. salvia* Colla, *Hypochaeris radicata* L. (Asteraceae), *Lithraea caustica* (Molina) Hook. & Arn. (Anacardiaceae), *Maytenus boaria* Molina (Celastraceae), *Populus alba* L. (Salicaceae), *Quillaja saponaria* Molina (Rosaceae) e *Trevoa trinervis* (Rhaminaceae). A presença de grãos de pólen dessas espécies, com níveis de frequência estatisticamente significativas, é, segundo os autores, suficiente para indicá-las como fontes de própolis. Outro parâmetro utilizado pelos autores para obtenção do diagnóstico foi a identificação de fragmentos de folhas e outras estruturas vegetativas presentes no sedimento (presença de estômatos, epiderme e tricomas). Este parâmetro, no entanto, foi considerado secundário, já que nas conclusões do trabalho, embora fragmentos de folhas de *Baccharis linearis*, *Kagenechia oblonga*, *Lithraea caustica* e *Trevoa trinervis* tenham sido facilmente reconhecidos nas amostras de própolis (devido a suas características filamentosas e tricomas glandulares), apenas *B. linearis* foi incluída como uma das principais fontes de própolis na região estudada. Para os autores, a frequência polínica significativa de determinada espécie no sedimento insolúvel de própolis é o principal parâmetro a ser avaliado.

Montenegro et al. (2001a), ao estudarem a origem botânica e produtividade sazonal da própolis naquela mesma região, mas proveniente de outra localidade, basearam-se também em estudos micromorfológicos de grãos de pólen e de anexos de epiderme (glândulas da epiderme, tricomas e tecidos de gemas) presentes no sedimento insolúvel das amostras analisadas. Foi constatado que espécies das famílias Myrtaceae e Salicaceae foram as mais representativas quanto ao forrageamento de abelhas melíferas para coleta de resinas e óleos para produção de própolis. Novamente para os autores, a participação de espécies como fonte de própolis pôde ser avaliada pela representatividade de grãos de pólen presentes nas amostras. Desta forma, as espécies exóticas que contribuíram de maneira mais significativa foram *Eucalyptus globulus* e *Populus alba* (não inserida na seção Aigeiros). Já as espécies nativas foram: *Baccharis lineares*, *Escallonia illinita*, *Pelmus boldus* e *Quillaja saponaria*. Fica claro que na apresentação dos resultados principais, foi considerada, principalmente, a presença de grãos de pólen, embora outros indicadores (tricomas ou estruturas remanescentes da epiderme) também tenham sido estudados (não durante o ano todo, mas especialmente em períodos em que a planta não estava florescendo).

Paralelamente, considerando dez outras localidades na mesma região central do Chile (entre 32° e 38° latitude sul), Montenegro et al. (2001b) confirmaram que as abelhas coletam resinas principalmente das famílias Salicaceae e Myrtaceae, sendo desta vez as espécies *Salix humboldtiana* (nativa) e *Eucalyptus globulus* (exótica) as mais representativas. Suas conclusões basearam-se novamente na presença constante de pólen dessas espécies nas amostras estudadas, sendo suas proporções dentro da fração polínica sempre significativas. Outras espécies também foram utilizadas como fonte de própolis, porém não representadas em todos os locais estudados, segundo os autores: *Baccharis linearis*, *Lithraea caustica* e *Quillaja saponaria* (espécies nativas) e *Populus alba* (espécie exótica). Houve ainda espécies que não apresentaram importância quando o conjunto dos dez locais foi avaliado, sendo todavia importantes no local onde se encontravam, por exemplo *Escallonia rubra*, *Escallonia pulverulenta* e *Otholobium glandulosum* (Leguminosae). Os autores concluíram que a participação dessas espécies só ocorreu porque havia baixa disponibilidade de fontes consideradas por eles preferidas pelas abelhas, como *Eucalyptus globulus* e *S. humboldtiana*.

Também foram avaliadas estruturas morfológicas dos vegetais presentes nas amostras, como possíveis indicadores da origem botânica (tecidos epidérmicos, tricomas filamentosos, glândulas e estômatos). A importância da presença dessas estruturas nas amostras, durante a discussão do trabalho, foi vinculada a aspectos não só de local de coleta do vegetal mas também da fenologia das espécies vegetais em questão. Por exemplo, quando as estruturas vegetais presentes não pertenciam a espécies ditas significativas na fração polínica, afirmou-se que os exsudados coletados eram produzidos principalmente em órgãos vegetativos e que as espécies não estavam em floração. Ademais, quando as estruturas morfológicas presentes eram associadas às espécies de maior importância dentro da fração polínica, a discussão foi conduzida no intuito de considerar que tanto as flores como outras partes dos vegetais eram utilizadas pelas abelhas para coleta de própolis.

Ao mesmo tempo em que afirmaram em seus trabalhos a importância de considerar as estruturas vegetais como um dos parâmetros utilizados na identificação da origem da própolis, Montenegro et al. (2000, 2001a, 2001b) concluíram que a análise da composição polínica específica da própolis pode ser usada prioritariamente na determinação de sua origem botânica.

1.3 Secreção de resina em estruturas florais

Interessantes considerações foram efetuadas por Armbruster (1984) quanto ao papel das resinas na polinização de angiospermas. O autor sugeriu que secreções de resinas em estruturas florais podem ter se originado como uma defesa contra herbívoros e que, secundariamente, tais secreções se transformaram em objeto de recompensa para polinizadores. As resinas florais podem ser um recurso importante para certas abelhas, as quais, em contrapartida, se tornam os principais polinizadores de muitas espécies de plantas tropicais. Até o momento, foram descritos apenas dois gêneros não-correlacionados de plantas, *Dalechampia* (Euphorbiaceae) e *Clusia* (Guttiferae), que atraem polinizadores pela secreção de resinas em suas estruturas florais.

Nos primeiros estudos desenvolvidos para identificar outros recursos disponibilizados pelos vegetais aos polinizadores, além de pólen ou néctar, constatou-se a produção de óleos secretados por flores. Data de fins do século XIX a primeira observação de abelhas coletando resina em estruturas florais de *Dalechampia* (Muller, 1879, citado por Armbruster, 1984), cuja secreção ocorre nas brácteas, embaixo de flores estaminadas da inflorescência bissexual. Embora tecnicamente essas brácteas sejam extraflorais, Armbruster e Webster (1979) se referem a tais secreções como florais ao considerarem a função atrativa da resina.

De acordo com Armbruster (1984), dentre os diversos táxons de insetos que coletam resinas para utilização no ninho, as abelhas da superfamília Apoidea, especialmente Apidae e Megachilidae são as mais representativas. Fêmeas das tribos Apini, Euglossini e Meliponini (todos da família Apidae) apresentam comportamento de coleta de resina semelhante: iniciam a coleta com as mandíbulas, manipulam o material coletado com o primeiro par de patas e o transferem para as corbículas, localizadas nas patas traseiras. Como consequência, não deve ocorrer coleta de resina e pólen concomitantemente, além do que, presumivelmente, pólen e resina misturados numa mesma carga na corbícula não serviriam como suprimento alimentar para as larvas, devido à impossibilidade de digestão de muitos compostos presentes. Já as abelhas da família Megachilidae transportam resina em forma de pequenos glóbulos, embaixo de suas mandíbulas, o que permite que a escopa abdominal permaneça livre para coleta de pólen na mesma viagem, o que, segundo o autor, significaria economia de energia para o indivíduo, com minimização de custo e maximização de benefícios.

Todavia, as observações de Armbruster e Webster (1979) e de Armbruster (1984), quanto à coleta de resina em *Dalechampia* só dizem respeito a abelhas da tribo Euglossini, Meliponini e da família Megachilidae, não tendo sido feita menção quanto a abelhas do gênero *Apis*.

Analogamente, nenhuma observação foi feita quanto à coleta de resina floral por abelhas do gênero *Apis* em *Clusia*. Muitas espécies deste gênero vegetal secretam resina em flores estaminadas que apresentam um conjunto de estaminódios centrais, circulados pelos estames férteis e em flores pistiladas circundadas por anéis de estaminódios.

Para Armbruster (1984), a hipótese de que a coleta de resina em estruturas florais tenha fins nutricionais para as abelhas é pouco provável, já que a maioria das espécies que efetuam esta atividade o fazem para utilização no ninho como proteção mecânica e/ou química.

Assim, para o completo entendimento do significado ecológico da secreção de resinas florais, são necessárias avaliações dos compostos presentes, bem como a sua disponibilidade e utilidade para as abelhas que os coletam.

1.4 Metabólitos na identificação da origem botânica da própolis

Os vegetais, assim como outros organismos, apresentam todo um arsenal metabólico capaz de produzir, transformar e acumular inúmeras substâncias não necessariamente relacionadas de forma direta à manutenção da vida do organismo produtor. Essas substâncias, cujo acúmulo e produção estão restritos a um número limitado de organismos, podem ser caracterizadas como elementos de diferenciação e especialização (Wink, 1990). Todo esse conjunto metabólico costuma-se definir como metabolismo secundário, cujos produtos, embora não necessariamente essenciais para o organismo produtor, garantem vantagens para a sua sobrevivência e para perpetuação da espécie em seu meio (Santos, 2001). Assim, para Wink (1990), os compostos secundários estão direta ou indiretamente relacionados a adaptações das plantas ao meio em que se encontram, em função de condições climáticas, de presença de microorganismos ou mesmo de interações com animais (incluindo dispersores de sementes, polinizadores ou insetos herbívoros), além de alelopatias (Harborne, 1988). Esse diverso grupo de produtos naturais, os quais incluem alcalóides, terpenóides, compostos fenólicos e outros compostos, considerados não-essenciais para processos metabólicos básicos, têm sido extensivamente empregados como caracteres

taxonômicos em estudos de sistemática de plantas superiores (Gershenzon & Mabry, 1983). Assim, esses compostos podem assumir papel importante quanto à possibilidade de identificação da origem botânica da própolis, por meio de conhecimentos de quimiosistemática. Os flavonóides, por exemplo, têm sido os metabólitos secundários mais utilizados em sistemática, em função, dentre outros fatores, de suas variações estruturais, além da estabilidade, rapidez e facilidade com que podem ser identificados (Harborne, 1967).

Porém em muitos grupos de plantas, como Asteraceae, a distribuição de flavonóides nem sempre reflete relações filogenéticas entre tribos (Seeligmann, 1994) e gêneros (Harborne, 1969). Há que se considerar ainda que os flavonóides, embora presentes em amostras de própolis oriundas de zonas temperadas, assumem papel secundário, em termos quantitativos, na maioria das amostras já analisadas oriundas de zonas tropicais. Própolis oriundas da América do Norte são reconhecidamente ricas em óleos voláteis e compostos fenólicos, principalmente flavonas, flavanonas e flavonóis (Greenaway et al., 1990, García-Viguera et al., 1993, Bankova et al., 1994), que são classes de substâncias flavonoídicas. Em contraste, a maioria das amostras de própolis provenientes de regiões tropicais são pobres em flavonóides. Desta forma, a utilização destes compostos como marcadores para designar a origem botânica da própolis de regiões tropicais torna-se impraticável.

Outros constituintes químicos podem ser utilizados em estudos taxonômicos, inclusive macromoléculas (como proteínas e ácidos nucléicos), mas fatores como simplicidade na identificação de metabólitos secundários e disponibilidade de técnicas analíticas rápidas e precisas, além de custo não-elevado, são extremamente importantes e devem ser considerados, principalmente no que tange às análises de rotina empregadas na avaliação de identidade e qualidade do produto.

Genericamente, a própolis constitui-se de cerca de 50 a 80% de resinas e substâncias balsâmicas, 4,5 a 15% de óleos essenciais e outras substâncias voláteis, 12 a 50% de cera, 4 a 10,5% de substâncias tânicas e menos de 15% de impurezas mecânicas, das quais 5 a 11% são grãos de pólen (Asis, 1993). Quantidades variáveis de alguns nutrientes, como as vitaminas A, B1, B2, B6, C, E, ácido nicotínico e ácido pantotênico (Asis, 1991), além de aminoácidos (Marcucci et al., 1996), também estão presentes. Todavia, a amplitude qualitativa e quantitativa dessas substâncias é considerável e, nos trópicos, provavelmente, tais generalizações podem ser consideradas

prematuras, considerando a magnitude da biodiversidade presente e o número de amostras já analisadas (segundo suas origens).

Há que se considerar ainda que muitos compostos presentes na própolis podem advir de fontes botânicas que não a originaram, como por exemplo constituintes de pólenes contaminantes e carboidratos agregados durante o processo de manipulação pelas abelhas. Para alguns autores, existe também a possibilidade de modificações químicas neste processo de manipulação (Ghisalberti, 1979, Bonvehí e Coll, 1994 e Greenaway et al., 1990), o que, quando comprovado, deve ser considerado em correlações de avaliações químicas da própolis e das fontes vegetais.

A ausência ou evidente escassez de estruturas anatômicas vegetais em certas amostras de própolis é uma realidade. Tal fato pode ser indicativo de que está ocorrendo coleta de exsudados disponibilizados em troncos e ramos ou mesmo de estruturas florais de espécies vegetais que estão exercendo poder de atração sobre as abelhas, sem que no momento da coleta sejam carregados fragmentos de tecidos vegetais ou que sejam em quantidade insignificante. Neste caso, a busca de identificação de possíveis marcadores fitoquímicos pode ser uma alternativa, apesar das dificuldades que o uso desta estratégia analítica possa significar.

Estudos nesse sentido vêm sendo conduzidos há anos na tentativa de identificação da origem floral de méis. A experiência tem demonstrado que esta não é uma tarefa fácil, já que se fazem necessárias avaliações concomitantes de forrageamento para certificação da origem do produto e comparações posteriores das análises químicas. Ainda, avaliações da influência de fatores ambientais e fenológicos devem ser consideradas na síntese e alocação de compostos pelas espécies vegetais em questão.

Dificuldades sem dúvida existem e a caracterização do perfil químico e o isolamento e identificação de substâncias encontradas em produtos naturais constituem-se em grande desafio intelectual (Matos, 1988). No entanto, o crescente desenvolvimento de novas técnicas analíticas, como a cromatografia, e o contínuo aperfeiçoamento dos instrumentos de análise espectrométricos, dentre outros, têm permitido considerável avanço na química dos produtos naturais (cujo objetivo imediato é a identificação de constituintes resultantes do metabolismo secundário), bem como elucidação de suas estruturas moleculares (Mann, 1987).

Síntese e alocação de compostos secundários

As informações constantes neste item foram extraídas, principalmente, de Santos (2001), ao abordar a importância do processo de compartimentalização de certos compostos secundários para a sobrevivência do vegetal. Como exemplo, o autor cita os glicosídeos cianogênicos que são estocados nos vacúolos das células epidérmicas e que, portanto, encontram-se isolados das hidrolases, localizadas nos tecidos do mesófilo adjacente. Somente nas situações em que os tecidos são danificados é que os glicosídeos cianogênicos e as hidrolases interagem, havendo liberação de cianidreto. Assim, a própria planta produtora fica protegida e utiliza essa estratégia em caso de ataque por herbívoros. Todavia, a maioria dos mecanismos que regulam tanto a biossíntese quanto a estocagem e a degradação dos compostos secundários permanecem ainda desconhecidos.

Embora qualquer tecido ou célula vegetal tenha a capacidade de biossintetizar metabólitos secundários, parece que isto ocorre somente em alguns tecidos ou mesmo em células especiais, em função do seu grau de diferenciação e desenvolvimento. Em alguns casos, a produção pode estar restrita a um estágio específico do desenvolvimento do vegetal ou a determinadas condições ecológicas ou ambientais.

Em várias espécies, o local da biossíntese está restrito a um órgão, enquanto os produtos são acumulados em toda a planta ou em órgãos diferentes.

Para Wink (1990), os metabólitos secundários mais hidrofílicos tendem a ser armazenados nos vacúolos, enquanto os lipofílicos se acumulam em ductos originados por células mortas ou ligam-se aos componentes celulares lipofílicos, como membranas e ceras cuticulares. De acordo com esse autor, a produção de metabólitos secundários é resultado de complexas interações entre biossíntese, transporte, estocagem e degradação. Cada um desses processos, por sua vez, é governado por genes e, portanto, será influenciado por três fatores principais: hereditariedade, ontogenia e ambiente (Robbers et al., 1996).

Mann (1987) sugeriu que as rotas metabólicas dos compostos secundários podem ser ativadas durante alguns estágios particulares de crescimento e desenvolvimento ou em períodos de estresse causados por limitações nutricionais ou ataque microbiológico.

Uma das dificuldades encontradas na determinação do perfil químico de espécies vegetais é a variação observada quanto ao conteúdo de metabólitos

secundários. Fatores não necessariamente genéticos e ambientais estão também relacionados, como por exemplo o próprio órgão vegetal analisado. Assim, conclusões sobre a possibilidade de uso de certo composto para fins taxonômicos só podem ser obtidas a partir de uma amostragem adequada: de um grande número de membros de uma espécie, em diferentes estádios de desenvolvimento e em diferentes ambientes. Ainda, a aplicação de resultados analíticos em sistemática só deve ser efetuada se todas as espécies de um gênero forem investigadas (Vickery e Vickery, 1981).

As substâncias secretadas pelos vegetais podem permanecer no citoplasma (em compartimentos como vacúolos, ou livres) ou podem ser eliminadas da célula. Quando eliminadas da célula, podem permanecer dentro da planta, em espaços intercelulares, como ductos e cavidades (os quais mostram-se alongados e arredondados em cortes longitudinais, respectivamente) ou podem ser eliminadas da planta (como acontece com os nectários e hidatódios). Podem ainda permanecer em apêndices como tricomas ou glândulas de sal, os quais ao sofrerem injúrias eliminam o conteúdo existente, podendo desintegrar-se ou regenerar-se.

Diversas obras discutem a classificação ideal das estruturas secretoras nos vegetais, dada à complexidade morfológica, fisiológica e citológica. Schnepf (1974) diferenciou as estruturas secretoras de acordo com a natureza química das substâncias secretadas (hidrofílicas: glândulas mucilaginosas, digestivas e de sal, nectários e hidatódios ou lipofílicas: algumas glândulas e alguns tricomas). Esau (1985) classificou as estruturas de acordo com a localização (externas: que se encontram na superfície dos vegetais e internas: que se encontram incluídas nos tecidos dos vegetais).

Fahn (1979) agrupou os tecidos secretores da seguinte forma: (1) tecidos que eliminam substâncias não-modificadas, ou ligeiramente modificadas e cujo suprimento direto ou indireto fica a cargo do sistema vascular (floema: açúcares, e xilema: água, minerais e pequenas quantidades de substâncias orgânicas), quais sejam: hidatódios, glândulas de sal e nectários; (2) tecidos secretores em que os constituintes celulares sintetizam as substâncias secretadas (substâncias hidrofílicas e lipofílicas), como: tecidos secretores de mucilagem, glândulas das plantas carnívoras, células de mirosina, tricomas urticantes, tecidos que secretam substâncias lipofílicas e laticíferos. Para o autor, existem diferentes maneiras de eliminação de substâncias secretadas pelo citoplasma: (1) holócrina – a célula desintegra-se e (2) merócrina – o citoplasma permanece intacto. Neste caso, o processo de eliminação da substância pode ocorrer (a) por diferença de gradiente de concentração, (b) a substância pode ser coletada por

vesículas que se fundem diretamente com o plasmalema (ou tonoplasto) ou (c) invaginações do plasmalema envolvem a vesícula com a substância que é então eliminada do protoplasto.

Outra forma de classificação da substância secretada baseia-se no local de deposição do material. Segundo esta proposta, denomina-se de secreção endógena o material secretado e acumulado em espaços intercelulares e de secreção exógena substâncias secretadas e eliminadas pela planta por diversos tipos de estruturas secretoras epidérmicas (Fahn, 1990).

As dificuldades de classificação se intensificam quando estruturas semelhantes secretam diferentes tipos de compostos ou quando a mesma estrutura secreta compostos de diferentes naturezas químicas, como ocorre com os idioblastos. Segundo Ferri et al. (1969), idioblastos são células de um tecido qualquer que diferem marcadamente das outras pela forma, tamanho, conteúdo, espessura da parede ou mesmo pela função. Podem secretar mirosina, taninos, mucilagem, cristais, óleos essenciais, resinas etc.

Um bom exemplo desta heterogeneidade são os laticíferos, conforme apresentado por Fahn (1990). Látex ocorre em muitas Angiospermas e é caracterizado por uma suspensão ou em alguns casos uma emulsão, de muitas partículas em um líquido. Esse líquido pode ocorrer em células isoladas alongadas ou em uma série de células, as quais recebem a denominação de laticíferas. Pode estar presente na forma de gotas no citoplasma ou em vacúolos. A composição química das partículas em suspensão ou emulsão difere consideravelmente entre espécies, podendo ser bastante heterogênea (partículas de borracha, ceras, resinas, proteínas, óleos essenciais, mucilagens, grãos de amido etc.). Ainda, sais e ácidos orgânicos podem estar presentes na solução, além de açúcares, taninos, alcalóides e enzimas proteolíticas. Por conseguinte, o látex pode apresentar cores também variadas, desde branco leitoso até cor amarelada, alaranjada ou incolor.

Entretanto, compostos similares podem ser secretados por diferentes tipos de estruturas, como ocorre com tricomas e ductos internos (Fahn, 1979).

Embora as estruturas secretoras venham sendo estudadas intensamente, ainda não se detém conhecimento pleno da composição química do material que é secretado. É comum o uso dos termos óleos, resinas, mucilagens etc., porém este emprego tem sido feito em sentido amplo e a natureza do material secretado tem sido atribuída muito mais às características que apresenta quando observado sob microscopia (como por exemplo cor) do que com base em avaliações químicas específicas (Metcalf, 1983).

Assim, os principais sítios de síntese de compostos oriundos do metabolismo vegetal, bem como alocação final, são bastante variáveis, podendo estar relacionados tanto a estruturas secretoras internas como externas.

Essas informações evidenciam a dificuldade existente em se correlacionar a natureza dos compostos encontrados nas amostras de própolis e os respectivos locais de coleta no vegetal, sem que se utilizem conjuntamente outras ferramentas analíticas. Ainda, o fato de muitos constituintes químicos estarem amplamente distribuídos em diferentes grupos vegetais e considerando o tempo necessário para obtenção de resultados de determinações químicas, avaliações morfológicas das células secretoras apresentam grande utilidade em termos de diagnóstico.

Neste contexto, análises de fragmentos de tecidos vegetais assumem papel importante como indicadores de táxons vegetais. Dentre as diversas estruturas que podem ser utilizadas como indicadores de origem botânica enumeradas por Metcalfe (1983), encontram-se as células secretoras e as cavidades e canais secretores. Analogamente, essas estruturas, quando presentes em amostras de própolis, podem ser consideradas um importante indicativo de sua origem.

De acordo com Metcalfe (1983), produtos do metabolismo vegetal podem ser depositados em células ou em espaços intercelulares com epitélio secretor. As células secretoras se diferenciam das células vizinhas por conter material secretado (por exemplo células taniníferas e células que contêm mucilagem) ou pela aparência morfológica. Na opinião do autor, quando diferenciadas por características morfológicas, essas células são classificadas como idioblastos secretores. Idioblastos que contêm óleo são denominados glândulas. Essas células podem conter outras substâncias como mirosina, substâncias oleosas, substâncias mucilaginosas e substâncias resinosas (Fahn, 1990). Os óleos também podem ser secretados em tricomas glandulares que emergem da superfície da planta (Metcalfe, 1983).

De acordo com Metcalfe e Chalk (1979), o valor taxonômico de tricomas está bem estabelecido, podendo delimitar espécies, gêneros ou mesmo famílias. Por estarem freqüentemente presentes e serem facilmente observadas, essas estruturas são consideravelmente importantes em investigações sistemáticas de angiospermas. Além disso, o número de espécies de angiospermas que são completamente isentas de tricomas em todas as partes da planta representa pequena minoria. Em muitos casos, a ausência de tricomas pode estar associada a casos em que houve degeneração nos

estágios iniciais de desenvolvimento ou mesmo perda imediatamente após a maturação (Theobald et al., 1979).

Considerando-se que as abelhas coletam matéria-prima para elaboração da própolis freqüentemente em primórdios foliares, também os tricomas podem ser utilizados efetivamente para diagnóstico das espécies vegetais que a originaram.

1.5 Estruturas secretoras na identificação da origem botânica da própolis

Pioneiramente, Warakonmska e Maciejewicz (1992) sugeriram a utilização de observações de fragmentos de epiderme e algumas estruturas vegetativas para reconhecimento de espécies utilizadas por *Apis mellifera* para coleta de própolis na Polônia. Na América do Sul, além das pesquisas desenvolvidas na região central do Chile (Valcic et al., 1998, Valcic et al., 1999, Montenegro et al. 2000, Montenegro et al. 2001a, Montenegro et al. 2001b), Oliveira e Bastos (1998) encontraram estruturas secretoras em sedimento de própolis, as quais foram utilizadas como diagnóstico da origem botânica das amostras oriundas de Minas Gerais, Brasil. Foram observados tricomas glandulares e tectores de *Baccharis dracunculifolia*, não sendo encontrados fragmentos foliares com feixes vasculares ou canais secretores desenvolvidos. Por conseguinte, as autoras concluíram que as abelhas coletaram resinas produzidas por tricomas glandulares localizados em ápices vegetativos.

Freire (2000), ao investigar as espécies vegetais constituintes de amostras de própolis, também oriundas de Minas Gerais, pela identificação anatômica das estruturas presentes, constatou que as abelhas são capazes de realizar cortes de fragmentos de tecido vegetal repletos de estruturas secretoras internas e externas de folhas jovens. Usando-se técnica baseada na proposta desenvolvida por Warakonmska e Maciejewicz (1992), observaram-se as seguintes estruturas no resíduo insolúvel da própolis de cor verde, de uma das localidades estudadas (Itapecerica): tricomas tectores, tricomas glandulares, ápices foliares com ductos, todos caracteristicamente pertencentes a *Baccharis dracunculifolia*. Nas amostras de própolis de cor preta, oriundas de outra localidade (Virginópolis), as estruturas observadas foram: tricomas glandulares, tricomas tectores, hidatódios e fragmentos de tecidos, recobertos ou não com tricomas de *Vernonia rubriramea* (Asteraceae). Também traqueídeos de *Pinus* spp. estavam presentes nas amostras dessa região. Em suas conclusões, o autor afirmou ser possível associar características organolépticas, como cor, à origem botânica da própolis, em

função da predominância das estruturas anatômicas encontradas. Todavia, uma avaliação quantitativa dessas estruturas não foi possível, em função da imprecisão ocorrida durante as tentativas de contagem das estruturas, as quais aparecem, muitas vezes, fragmentadas e sobrepostas. Outro resultado importante apresentado pela pesquisa foi a certificação de que há realmente preferência de coleta de própolis por *A. mellifera* em *Baccharis*. Não foram observados fragmentos de *Vernonia* nos sedimentos de amostras oriundas de Itapecerica, embora tenha sido constatada a ocorrência desse gênero na área do apiário experimental.

Bastos (2001), estudando amostras de própolis também produzidas em Minas Gerais, confirmou que a própolis verde dos locais avaliados origina-se de *Baccharis dracunculifolia*, por possuir inúmeros fragmentos dessa planta em seu sedimento. Esta confirmação foi realizada por meio de estudo anatômico, utilizando microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura. Segundo a autora, a própolis verde, com aspecto resinoso e quebradiço, apresenta em sua análise microscópica 90 a 100% de fragmentos epidérmicos, tricomas glandulares e tectores somados e até 1% de outras fontes resiníferas. Índices maiores que 1% de estruturas de *Vernonia polyanthes* alteram a coloração e o aspecto das amostras (amostras de própolis com fragmentos de *Vernonia polyanthes*, escamas de *Vellozia* spp. e/ou elementos de periderme, apresentavam coloração escura e aspecto pegajoso). Curiosamente, ao mesmo tempo em que a autora afirmou em suas conclusões que os grãos de pólen presentes nas amostras de própolis, além de indicarem a origem geográfica, podem ser utilizados como marcadores para elucidação das possíveis fontes de resina - no estudo foram indicados: *Astronium* spp., *Baccharis dracunculifolia*, *Eucalyptus* sp., *Vernonia polyanthes*, *Hyptis* sp. (Labiatae). A autora afirmou que a coleta de resinas dos ápices vegetativos de *B. dracunculifolia* é feita pelas abelhas quando a planta não está em floração. Esta constatação não vai de encontro às observações de campo recentemente realizadas (ref. Cap. III), segundo as quais, embora com menor frequência, *A. mellifera* também efetua coleta em primórdios foliares de *Baccharis* spp. durante a floração. A diminuição na frequência de visita para coleta ocorre, provavelmente, em função da considerável queda de disponibilidade de ápices foliares, já que houve diferenciação meristemática para formação de flores, em detrimento de crescimento vegetativo do indivíduo.

Diante deste fato, não se deve descartar a possibilidade de modificações no perfil organoléptico e químico da própolis produzida em época de floração de *Baccharis* spp., seja por mudanças no padrão de alocação de metabólitos secundários durante esse

período ou mesmo pela coleta de matéria-prima em outras fontes vegetais mais disponíveis no momento, as quais garantiriam maior otimização na busca do recurso em questão, significando minimização de custo com maximização de benefícios.

Na grande maioria de amostras de própolis já analisadas, seja nos trópicos ou em zonas temperadas, os compostos fenólicos representavam mais de 50% dos constituintes químicos encontrados. De acordo com Hahlbrock e Scheel (1989), a função fisiológica dos fenóis no desenvolvimento e metabolismo das plantas requer estudos mais detalhados, já que o padrão das atividades das vias de síntese varia durante o desenvolvimento vegetal e na distribuição espacial entre os órgãos individuais e os tipos de células. Esses compostos podem ser mais atuantes, segundo resultados obtidos por Siqueira et al. (1991), no período de crescimento intenso do vegetal ou durante a diferenciação celular.

Considerando-se resultados de estudos desenvolvidos com própolis oriunda do Brasil, constata-se que membros da família Asteraceae apresentam importância significativa.

1.6 Relevância das relações *Apis mellifera* x *Baccharis* spp. (Asteraceae)

A família Asteraceae constitui-se em importante componente de praticamente todos os ecossistemas terrestres, muito embora relativamente poucas informações existam em termos de biologia da polinização de muitas de suas espécies. Biologia da polinização (ou ecologia da polinização) é o estudo das interações entre espécies vegetais e seus respectivos vetores. Estas interações podem ser muito simples (quando os vetores envolvidos são abióticos, como por exemplo água ou vento) ou extremamente complexas (quando vetores como animais estão associados, chegando a considerável grau de especificidade). Muitas interações de polinização se situam entre esses dois extremos, mas todas envolvem adaptações evolutivas em estruturas florais, com desenvolvimento em termos de recursos químicos para atrair e guiar o vetor para dentro da flor de diversas espécies de angiospermas (Lane, 1994).

Membros de muitos grupos de insetos visitam espécies de Asteraceae, entretanto, aqueles pertencentes à ordem Hymenoptera, especialmente Apoidea (abelhas solitárias, em particular), são geralmente aceitos como sendo os polinizadores primários, apresentando relações especiais com a família em grande parte do mundo. Há consenso entre os estudiosos que a interação mutualística entre plantas e insetos

polinizadores emerge de um conflito de interesses, e nem sempre apresenta resultado positivo simétrico (Brostein, 1994).

Embora existam algumas relações intrincadas e precisas de espécies vegetais com seus polinizadores, as quais são ricas e possibilitam interessantes estudos de biologia de polinização, poucas são as informações disponíveis a respeito de espécies de abelhas que visitam plantas invasoras no Brasil. Sob esta óptica, os resultados são especialmente escassos quando a espécie em questão é *A. mellifera*.

A maioria dos trabalhos sobre polinizadores aborda aspectos relacionados à biologia ou ecologia floral e à composição de comunidade de polinizadores.

Vários estudos sobre insetos associados a *Baccharis* spp. foram desenvolvidos principalmente na América do Norte, devido à crescente necessidade de se conhecer potenciais herbívoros para seu controle populacional (Lara e Fernandes, 1994, Araújo et al., 1995). Boldt e Robbins (1987), avaliando a fauna de insetos polinizadores de *Baccharis neglecta* (espécie dióica), constatou que, dentre as quatro ordens associadas (Coleoptera, Lepidoptera, Diptera e Hymenoptera), membros da família Apidae, e em especial *Apis mellifera* eram importantes no processo de formação de sementes, embora a polinização pelo vento também ocorresse. Segundo o autor, a frequência de visitação de *A. mellifera* é intensa durante a floração, sendo muitas espécies consideradas importantes para produção de mel naquela região (Pellet, 1930, citado por Boldt e Robbins, 1987).

O gênero *Baccharis* apresenta distribuição cosmopolita, podendo ser encontrado na Oceania, América do Sul, América do Norte (Palmer, 1987) e América Central, possuindo mais de 500 espécies (Silva e Grotta, 1971).

Barroso (1976) conduziu estudo detalhado sobre as espécies ocorrentes no Brasil da subtribo Baccharidinae, à qual pertence o gênero *Baccharis*. Cerca de 120 espécies estão representadas em território nacional. Descrevendo suas características gerais, a autora enfatizou tratar-se de gênero cujas espécies são todas dióicas e apresentam capítulos com flores femininas e capítulos com flores masculinas, dispostas em indivíduos diferentes. São espécies de subarbustos ou arbustos ramificados, nos quais as folhas são, em geral, alternas e muito variáveis na forma e no tamanho, podendo ser glabras ou pilosas.

Segundo Ferracini e Paraiba (1995), o cerrado brasileiro constitui-se em uma das áreas mais ricas em espécies de *Baccharis*.

Constatações da estreita relação existente entre *Apis mellifera* e *Baccharis* spp., no que tange ao forrageamento de própolis, são recentes, o que justifica a ausência de estudos que avaliem as implicações ecológicas envolvidas. Há que se considerar ainda que também a introdução de abelhas melíferas no Brasil, bem como o processo de africanização ocorrido, são relativamente recentes.

Embora ainda não estudadas, os traumatismos mecânicos provocados pelas abelhas aos primórdios foliares visitados para coleta (ref. Cap.III) trazem, possivelmente, conseqüências importantes em termos de mecanismos desencadeados posteriormente para sobrevivência da planta.

De acordo com Wilson (1979), plantas masculinas e femininas diferem em termos de crescimento, nutrição e defesa e, portanto, a susceptibilidade ao ataque de herbívoros também pode ser distinta entre sexos. Alguns resultados têm comprovado essa hipótese, demonstrando que plantas masculinas de *Baccharis halimifolia* geralmente sofrem mais ataque de herbívoros do que plantas femininas (Krischik e Demo, 1990).

Danniel et al. (1985) afirmaram que, num mesmo táxon, herbívoros fazem distinção entre indivíduos de sexo e idade diferentes, além de preferirem diferentes partes da planta, e que tais afirmações justificam-se em função de composições químicas distintas. Uma das hipóteses apresentadas foi a possibilidade de ser mais vantajoso para o indivíduo do sexo feminino investir mais em defesa para garantir melhor qualidade reprodutiva. Seus estudos, no entanto, foram desenvolvidos com *Salix myrsinifoliaphylicifolia*.

Em trabalho recente, Araújo et al. (1995), estudando a influência do sexo e fenologia de *Baccharis dracunculifolia* sobre insetos herbívoros, embora não tenham encontrado diferenças estatísticas, constataram que houve tendência a maior riqueza e abundância total de insetos herbívoros em plantas masculinas nos períodos fenológicos estudados.

Conforme constatado por Delph (1990), diferenças na qualidade nutricional entre plantas masculinas e femininas de espécies dióicas têm influência na comunidade de insetos herbívoros. Nesse sentido, faz-se necessária a condução de estudos sobre possíveis influências da fenologia e modificações do perfil químico da matéria-prima coletada por *Apis mellifera* nesses vegetais.

Recentemente, Pires et al. (2002), estudando a preferência entre plantas de *Baccharis dracunculifolia* por abelhas africanizadas de *Apis mellifera* para coleta de

própolis, bem como a determinação de horário e temperatura de maior coleta, em um apiário situado em Paula Cândido/MG, constataram que houve diferença significativa de coleta entre plantas ♂ e ♀ (55,9% e 44,1% de abelhas, respectivamente). Observou-se também que a elevação de um grau na temperatura ambiente correspondia a um aumento de 4,7 bolotas de própolis coletadas a mais e interceptadas em coletores de pólen instalados nas colméias e utilizados para este fim (para avaliação quantitativa). O horário de maior coleta foi próximo às 13 horas, sendo as coletas desprezíveis antes das 9 horas e após as 16 horas. Serão efetuadas, posteriormente, avaliações da composição química das bolotas de própolis interceptadas antes e durante a floração.

Os resultados indicaram que relações semioquímicas provavelmente estão envolvidas e avaliações destas relações podem auxiliar na elucidação do comportamento de forrageamento para própolis.

1.7 Considerações finais

Métodos indiretos de certificação de origem da própolis devem ser aperfeiçoados e melhor avaliados, levando-se em conta as implicações ecológicas envolvidas, de forma a assegurar a utilização de estruturas ou constituintes químicos vegetais encontrados na própolis, como indicadores da origem botânica do produto. A utilização de fragmentos de tecidos vegetais como indicador taxonômico presente no sedimento de própolis oferece maior segurança no diagnóstico, devendo-se levar em consideração aspectos correlatos tais como características da composição da flora do local de coleta, bem como possibilidade de uso da estrutura vegetal encontrada, quanto a indicador de táxon dentro da família ou gênero em questão. Raciocínio análogo deve ser feito com relação ao uso de marcadores químicos.

A exemplo da estratégia sugerida por Imperatriz-Fonseca (1989) a ser adotada na programação da produção de pólen e mel, é possível, a longo prazo, a elaboração de uma lista de espécies vegetais atrativas, com o intuito de viabilizar a indicação de locais apropriados para instalação de apiários para produção de própolis, bem como sugestão de reflorestamento com espécies de interesse, além de possibilitar a produção de safras importantes que possam ter maior homogeneidade quanto ao efeito farmacológico apresentado.

Ainda, avaliações quantitativas em termos de espectro de estruturas vegetais presentes em amostras de própolis, para fins de diagnóstico, só devem ser feitas quando

houver segurança em termos de amostragem e contagem, não devendo deixar de tecer considerações críticas quanto à possibilidade de superestimação ou subestimação, a exemplo de ponderações efetuadas quanto ao espectro polínico de méis para certificação de origem botânica. Isto possibilitaria inserção diferenciada do produto no mercado.

No entanto, considerando-se a diversidade da flora brasileira potencialmente produtora de matéria-prima para produção de própolis, fica evidente, diante do levantamento ora apresentado que, sem dúvida, os conhecimentos científicos acerca do assunto ainda encontram-se em fase inicial. Percebe-se a necessidade de novo direcionamento das pesquisas nesta área, cujo ponto de partida deve ser o estabelecimento da certificação de origem botânica e mesmo geográfica do produto a ser disponibilizado no mercado, com associação de estudos fármaco-toxicológicos. Estas ações, embora denotem certa complexidade, geram maior segurança e critério quanto à obtenção de resultados.

Avaliações da origem botânica da própolis em diferentes regiões não devem ser dissociadas do conhecimento de possíveis variações dos constituintes químicos em função de aspectos fenológicos das espécies vegetais ou em função da obtenção do produto em diferentes épocas do ano.

Não se pode deixar de considerar o grande potencial do produto como fornecedor de modelos de moléculas a serem testadas como biofármacos. Essas determinações devem estar sempre atreladas a estudos sazonais e de origem (onde e quando obter), pois, em alguns casos, a obtenção de moléculas de interesse farmacológico por síntese artificial torna-se inviável, fazendo-se necessária por conseguinte a obtenção de compostos a partir de técnicas de extração de matrizes naturais complexas, como a própolis. Ainda, o uso da matriz como um todo, é também proveitoso e promissor, considerando-se o possível sinergismo apresentado pelas moléculas que a constituem.

Estudos químicos e farmacológicos em espécies tropicais têm sido apontados como de grande importância, em função da intensa produção de metabólitos secundários pelas espécies nesses ecossistemas, muitos dos quais com comprovada atividade biológica. No entanto, apenas 8% das espécies vegetais da flora brasileira foram estudadas em busca de compostos bioativos e 1.100 espécies vegetais foram estudadas em suas propriedades medicinais (Garcia et al., 1996).

Avaliações do panorama brasileiro nesta área mostram que 84% de todos os fármacos são importados e que 78% da produção brasileira é feita por empresas multinacionais (Bermudez, 1995).

De acordo com Abreu (1997), no que tange ao mercado da própolis, o Brasil pode ser caracterizado como mero exportador de matéria-prima. Os quase US\$ 20 milhões/ano gerados pelas exportações se transformam em cerca de US\$ 350 milhões/ano gerados pelo mercado de produtos industrializados que contêm própolis, só no Japão. Nesse país, as pesquisas quanto à atividade antitumoral, antimicrobiana e antioxidante de compostos derivados da própolis brasileira encontram-se avançadas e vêm apresentando resultados promissores.

As informações ora apresentadas revelam a necessidade de se buscar alternativas para superar a dependência externa. Neste contexto, a própolis surge como um dos possíveis propulsores, podendo incrementar a obtenção de novos compostos e, para isto, estudos que objetivem a determinação da origem botânica e geográfica dos seus constituintes, aliados à sua composição química e efeitos farmacológicos e toxicológicos, tornam-se imperativos, possibilitando segurança na comercialização do produto e uso para homens, animais e plantas.

Referências bibliográficas

- Abreu, J. A. S. 1997. Amargando a clandestinidade – Grupo Técnico de Apicultura. *Agroanalysis*, v.17, p. 32-33.
- Araújo, A. M., Fernandes, G. W., Bedê, L. C. 1995. Influência do sexo e fenologia de *Baccharis dracunculifolia* DC. (Asteraceae) sobre insetos herbívoros. *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 39, n. 2, p. 347-353.
- Armbruster, W. S. 1984. The role of resin in angiosperm pollination: ecological and chemical considerations. *American Journal of Botany*, v. 71, p. 1149-1160.
- Armbruster, W. S., Webster, G. L. 1979. Pollination of two species of *Dalechampia* (Euphorbiaceae) in Mexico by Euglossini bees. *Biotropica*, v. 11, p. 278-283.
- Asis, M. 1991. Propoleo – El oro purpura de las abejas. 1 reimpress. Ciudad de La Habana. Centro de Información y Documentación Agropecuario (CIDA), 256p.
- Asis, M. 1993. Apiterapia para todos. Cómo usar los siete productos de la colmena para curar. La Habana, Cuba: Editorial Científico-Técnica, 194p.
- Bankova, V., Dyulgerov, A., Popov, S. 1992. Propolis produced in Bulgaria and Mongolia: phenolic compounds and plant origin. *Apidologie*, v. 23, p. 79-85.
- Bankova, V., Popov, S. 1994. Phenolics in Albanian poplar buds and their relationship to propolis. *Fitoterapia*, v. 65, n. 4, p. 323-330.
- Banskota, A. H., Tezuka, Y., Praisain, J. K., Matsushige, M., Saiki, I., Kadota, S. 1998. Chemical constituents of Brazilian própolis and their cytotoxic activities. *Journal of Natural Products*, v. 61, p. 896-900.
- Banskota, A. H., Tezuka, Y., Kadota, S. 2001. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytotherapy Research*, v. 15, p.1-11.
- Barroso, G. 1976. Compositae – Subtribo Baccharidinae Hoffmann. Estudo das espécies

ocorrentes no Brasil. *Revista Rodriguesia*, ano XXVIII, v. 40, 273p.

Barth, O. M., Dutra, V. M. L., Justo, R. L. 1999. Análise polínica de algumas amostras de própolis do Brasil meridional. *Ciência rural*, v. 29, n. 4, p. 663-667.

Bastos, E. M., Del Carmen, V., Monteiro, E. P., Espencer, A. E. S. 1998. Indicadores da origem botânica da própolis produzida por abelhas *Apis mellifera* em áreas de cerrado do Estado de Minas Gerais. In: XLIX Congresso Nacional de Botânica. Anais...Salvador, Bahia. p. 329.

Bastos, E. M. A. F. 2001. Origem botânica e indicadores de qualidade da “própolis verde” produzida no Estado de Minas Gerais. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo/Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras (tese de Doutorado), 137p.

Bermudez, J. A. Z. 1995. Indústria farmacêutica, Estado e sociedade. São Paulo: Hucitec. 204p.

Boldt, P. E., Robbins, T. O. 1987. Phytophagous and pollinating insect fauna of *Baccharis neglecta* (Compositae) in Texas. *Environmental Entomology*, v.16, p. 887-895.

Bonvehí, J. S., Coll, F. V. 1994. Phenolic composition of propolis from China and South America. *Zeitschrift fur Naturforschung*, v. 49c, p.712-718.

Brasil. 2001. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Regulamentos técnicos de Identidade e Qualidade do mel e produtos apícolas. Brasília: MAPA/DAS/ DIPOA/DNT, 2001, 27p.

Burdock, J. S. 1988. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food and Chemical Toxicology*, v. 36, p. 347-363.

Bronstein, J. L. 1994. Conditional outcomes in mutualistic interactions. *Tree*, v. 9, p. 214-217.

- Cheng, P. C., Wong, G. 1996. Honey bee propolis: Prospects in medicine. *Bee World*, v. 77, p. 8-15.
- Crane, E. 1990. Bees and beekeeping. Cornell: Cornell University Press. 614p.
- Christov, R., Bankova, V., Hegazi, A., Abd El Hady, F., Popov, S. 1998. Chemical Composition of Egyptian propolis. *Zeitschrift fur Naturforschung*, v. 53c, p.197-200.
- D'albore, G. R. 1979. L'origine géographique de la propolis. *Apidologie*, v. 10, n. 3, p. 241-267.
- Daniel, K., Elmvist, T., Ericson, L., salomonson, A. 1985. Sexuality in willows and preference by bark-eating voles: defense or not? *Oikos*, v. 44, p. 82-90.
- Delph, L. F. 1990. Sex-differential resource allocation patterns in the subdioecious shrub *Hebe subalpina*. *Ecology*, v. 70, p. 1342-1351.
- Di Stasi, L. C. Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: UNESP, 1996, 230p.
- Esau, K. 1985. Anatomía vegetal. Barcelona: Ediciones Omega, 779p.
- Fahn, A. 1979. Secretory tissues in plants. London: Academic Press. 302p.
- Fahn, A. 1990. Plant Anatomy. Jerusalem, Israel: Hebrew University of Jerusalem. 4 ed. 588p.
- Ferracini, V. F., Silva, A. G., Paraíba, L. C., Hermogenes, F. L. F., Marsaioli, A. J. 1994. Essential oils of seven Brazilian *Baccharis*: a prospective approach on their ecological role. In: Compositae: Systematics – International Compositae Conference. v.1 . Proceedings...United Kingdom, Kew: D.J.N. Hind & H.J. Beentje (ed.). 1994. p. 467-475, 784 p.
- Ferracini, V. F., Paraíba, L. C. 1995. Essential Oils of seven Brazilian *Baccharis*

species. *Journal of Essential Oil research*, v. 7, p. 355-367.

Freire, U. C. 2000. Origem da própolis verde e preta produzida em Minas Gerais. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa (dissertação de Mestrado), 50p.

Garcia, E. S., Silva, A. C. P., Gilbert, B., Corrêa, C. B. V., Cavalheiro, M. V. S., Santos, R. R., Tomasini, T. 1996. Fitoterápicos. Campinas: André Tosello. 17p.

García-Viguera, C., Ferreres, F., Tomás-Barberán, F. A. 1993. Study of Canadian propolis by GC-MS e HPLC. *Zeitschrift fur Naturforschung*, v. 48c, p. 731-735.

García-Viguera, C., Greenaway, W., Whatley, F. R. 1992. Composition of propolis from two different Spanish regions. *Zeitschrift fur Naturforschung*, v. 47c, p. 634-637.

Gary, N. E. 1993. Activities and behavior of honey bees. In: The hive and the honey bee. J. M. Graham (ed.). Michigan, Chelsea, p. 269-361.

Gershenzon, J., Mabry, T. J. 1983. Secondary metabolites and higher classification of angiosperms. *Nordic Journal of Botany*, v. 3, n. 1, p. 5-34.

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

Guerra, M. P., Nodari, R. O. 2001. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: Farmacognosia – da planta ao medicamento. C. M. O. Simões, E. P. Schenkel, G. Gosmam, J. C. P. de Mello, L. A. Mentz, P. R. Petrovick (orgs.). Porto Alegre/Florianópolis: Ed. da UFRGS/Ed. da UFSC, p. 13-26.

Greenaway, W., Scaysbrook, T., Whatley, F. R. 1987. The analysis of bud exudate of *Populu x euramericana*, and of propolis, by gas chromatography-mass spectrometry. In: Royal Society of London. Proceedings...London. B 232, p. 249-272.

Greenaway, W., Scaysbrook, T., Whatley, F. R. 1990. The composition and plant origin of propolis: a report of work at Oxford. *Bee World*, v. 71, p. 107-118.

- Hahlbrock, K., Scheel, D. 1989. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annual Review of Plant Molecular Biology*, v. 40, p. 347-369.
- Hausen, B. M., Wollenweber, E. 1987. Propolis allergy (II). The sensitizing properties of 1,1-dimethylallyl caffeic acid ester. *Contact Dermatitis*, v. 17, p. 171-177.
- Hausen, B. M., Wollenweber, E. 1988. Propolis allergy (III). Sensitizing studies with minor constituents. *Contact Dermatitis*, v. 19, p. 296-303.
- Hausen, B. M., Evers, P., Srüwe, H. T., König, W. A., Wollenweber, E. 1992. Propolis allergy (IV). Studies with further sensitizers from propolis and constituents common to propolis, poplar buds and balsam of Peru. *Contact Dermatitis*, v. 26, p. 34-44.
- Harborne, J. B. 1967. Comparative biochemistry of the flavonoids. London: Academic Press.
- Harborne, J. B. 1969. Perspectives in phytochemistry. London: Academic Press. 235p.
- Harborne, J. B. 1988. Introduction to ecological biochemistry. London: Academic Press. 223p.
- Imperatriz-Fonseca, V. L. 1989. Considerações sobre ecologia das abelhas sociais. Síntese apresentada ao Departamento de Ecologia Geral do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Livre-Docente. 109p.
- Isawumi, M. A. 1994. Trichome types and their taxonomic value at the sectional and species level in West African Vernonia (Compositae). In: Compositae: Systematics – International Compositae Conference. Proceedings...United Kingdom, Kew: D.J.N. Hind & H.J. Beentje (ed.). 1994. v.1, p. 29-39, 784 p.
- Jéane, F. 1984. La propolis et sa récolte par l'apiculteur. *Bulletin Technique Apicole*, v. 11, p. 45-46.

- Joly, C. A. 2001. Programa BIOTA/FAPESP: O desenvolvimento de um modelo para viabilizar a conservação e o uso sustentável da biodiversidade brasileira. In: XXII Encontro de Botânicos SBB – Regional MG, BA e ES. Anais...Viçosa. p. 66.
- Konig, B. 1985. Plant sources of propolis. *Bee World* 66:136-139.
- Krischik, V. A., Denno, R. F. 1990. Patterns of growth, reproduction, defense and herbivory in the dioecious shrub *Baccharis halimifolia* (Compositae). *Oecologia*, v. 83, p. 182-190.
- Lane, M. A. 1994. Pollination biology of *Compositae*. In: *Compositae: Systematics – Proceedings of the International Compositae Conference*. v.1. United Kingdom, Kew: D.J.N. Hind & H.J. Beentje (ed.). 1994. p. 61-80, 784 p.
- Lara, A. C. F., Fernandes, G. W. 1994. Distribuição de *Neopelma baccharidis* (Homoptera: Psyllidae) em *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). *Revista Brasileira de Biologia* 54: 661-668.
- Marcucci, M. C., Camargo, F. A., Lopes, C. M. A. 1995. Identification of amino acids in Brazilian propolis. *Zeitschrift fur Naturforschung*, v. 51c, p. 11-14.
- Mann, J. 1987. Secondary metabolism. 2 ed. Oxford: Clarendon Press. 374p.
- Matos, F. J. A. 1988. Introdução à fitoquímica experimental. Fortaleza: Imprensa Universitária (UFC). 126p.
- Metcalf, C. R. 1983. Secretory structures: cells, cavities, and canals – in leaves and stems. In: Metcalf, C. R., Chalk, L. *Anatomy of the Dicotyledons*. Oxford: Clarendon. v.2, p. 64-67.
- Metcalf, C. R., Chalk, L. 1979. *Anatomy of the Dicotyledons*. Oxford: Clarendon. v.1, 276 p.
- Montenegro, G., Timmermann, B. N., Peña, R., Mujica A. M., Avila, G. 2000. Pollen

grains and vegetative structures in propolis as indicators of potential drugs in Chilean plants. *Phyton - International Journal of Experimental Botany*, v. 66, p. 15-23.

Montenegro, G., Peña, R., Avila, G., Timmermann, B. N. 2001a. Botanical origin and seasonal production of propolis in hive of Central Chile. *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo*, v. 19, p. 1-6.

Montenegro, G., Peña, R., Timmermann, B. N., Mujica, A. M., Avila, G. 2001b. Botanical resources for propolis in na apiary network in Central Chile. *Phyton - International Journal of Experimental Botany* 50th anniversary: 191-201.

Nagy, E., Pápay, V., Litkey, G., Dinya, Z. 1985. Investigation of the chemical constituents, particularly the flavonoid components, of propolis and *Populi Gemma* by the GC/MS metho. In: *Flavonoids and bioflavonoids – 7th Hungarian Bioflavonoid Symposium Szeged*. v. 23. Proceedings...Hungary. L. Farkas, M. gábor, F. Kállay (ed.), Elsevier. p. 223-232.

Nakamura, J., Osawa, H., Matsuka, M. 1997. Utilization of propolis resources by honeybees *Apis mellifera*. In: XXXVth International Apicultural Congress. Proceedings...Antwerp, Belgium. p. 308-311.

Northenberg, M. 1997. Própolis enfrenta um desafio das pesquisas. *Química e Derivados*, v. 348, p. 24-28.

Ogren, W. 1990. What in the world is propolis used for? *American Bee Journal*, v. 130, n. 4, p. 239-240.

Oliveira, V. C., Bastos, E. M. 1998. Aspectos morfo-anatômicos da folha de *Baccharis dracunculifolia* DC. (Asteraceae) visando à identificação da origem botânica da própolis. *Acta Botânica Brasileira*, v. 12, n. 3, p. 431-439, suplemento.

Palmer, W. A. 1987. The phytophagous insect fauna associated with *Baccharis halimifolia* L. and *B. neglecta* Britton in Texas, Lousiana, and northern Mexico. *Proceedings Entomology Society Washington*, v. 89, p. 185-199.

- Pápay, V., Tóth, L., Soltész, M., Nagy, É., Litkey, G. 1985. Investigation of the chemical constituents, particularly the flavonoid components, of propolis and *Populi Gemma* by the GC/MS metho. In: Flavonoids and bioflavonoids – 7th Hungarian Bioflavonoid Symposium Szeged. Proceedings....Hungary. L. Farkas, M. gábor, F. Kállay (ed.), Elsevier. v. 23, p. 233-240.
- Pereira, A. dos S., Seixas, F. R. M. S., Neto, R. de A. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas. *Química Nova*, v.25, n.2, p. 321-326.
- Pires, C. V., Teixeira, E. W., Message, D. Avaliação de preferência entre plantas de *Baccharis dracunculifolia* por abelhas *Apis mellifera* (africanizadas) para coleta de própolis e determinação de horário e temperatura de maior coleta. In: 5^o Encontro sobre abelhas. Anais...Ribeirão Preto, São Paulo. p. 342.
- Popova, M., Bankova, V., Chimov, A., Silva, M. V. 2002. A scientific note on the high toxicity of propolis that comes from *Myroxylon balsamum*. *Apidologie*, v. 33, p. 87-88.
- Popravko, S. A. 1976. Naturaleza química del propoleos. In: Nuevas investigaciones en la apiterapia – II simpósio Internacional de Apiterapia. Anais...Rumanía, Bucarest. p. 188-189.
- Robbers, J. E., Speedie, M. K., Tyler, V. E. 1996. Pharmacognosy and pharmacobiotechnology. Baltimore: Williams & Wilkns. 198p.
- Santos, M. A. 1996. Estudo de forrageamento de própolis em abelhas africanizadas, *Apis mellifera* L. 1758. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa (dissertação de Mestrado), 59p.
- Santos, R. I. 2001. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: Farmacognosia – da planta ao medicamento. C. M. O. Simões, E. P. Schenkel, G. Gosmam, J. C. P. de Mello, L. A. Mentz, P. R. Petrovick (orgs.). Porto Alegre/Florianópolis: Ed. da UFRGS/Ed. da UFSC, p. 333-364.

- Santos, M. A., Message, D. 1997. Comportamento de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) na coleta de própolis em colônias de observação e em alecrim (*Baccharis dracunculifolia* D. C.). In: 16^o Congresso Brasileiro de Entomologia. Anais...Salvador, Bahia. p. 90.
- Seeley, T. D. 1995. The wisdom of the hive – The social physiology of honey bee colonies. Harvard: Harvard University Press. 295p.
- Seeligmann, P. 1994. Flavonoids of the Compositae as evolutionary parameters in the tribes which synthesize them: a critical approach. In: Compositae: Systematics – International Compositae Conference. Proceedings...United Kingdom, Kew: D.J.N. Hind & H.J. Beentje (ed.). v.1, p. 159-185, 784 p.
- Silva, J. B., Grotta, A. S. 1971. Anatomia da folha e óleo essencial de *Baccharis retusa* DC. *Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo* 9 (2): 321-326.
- Siqueira, J. O., Nair, M. G., Hammerschmidt, R., Safir, G. R. 1991. Significance of phenolic compounds in plant-soil-microbial systems. *Critical Reviews in Plant Science*, v. 10, n. 1, p. 63-121.
- Schnepf, E. 1974. Gland cells. In: Dynamic aspects of plant ultrastructure. A. W. Robards (ed.). Maidenhead: McGraw-Hill Book. p. 331-357.
- Theobald, W. L., Krahulik, J. L., Rollins, R. C. 1979. Trichome description and classification. In: Metcalfe, C. R., Chalk, L. Anatomy of the Dicotyledons. Oxford: Clarendon. v.1, p. 40-53.
- Tomás-Barberán, F. A., Garcia-Viguera, C., Vit-Oliver, P., Ferreres, F., Tomás-Lorente, F. 1993. Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. *Phytochemistry*, v. 34, p. 191-196.
- Valcic, S., Montenegro, G., Timmermann, B. N. 1998. Lignans from Chilean propolis. *Journal of Natural Products* 61: 771-775.

- Valcic, S., Montenegro, G., Mujica, A. M., Avila, G., Franzblau, S., Singh, M. P., Maiese, W. M., Timmermann, B. N. 1999. Phytochemical, morphological, and biological investigations of propolis from Central Chile. *Zeitschrift fur Naturforschung*, v. 54c, p. 406-416.
- Vickery, M. L., Vickery, B. V. 1981. Secondary plant metabolism. London: Macmillan Press. 335p.
- Warakomska, Z., Maciejewisk, W. 1992. Microscopic analysis of propolis from Polish regions. *Apidologie*, v. 23, p. 277-283.
- Wilson, M. F. 1979. Sexual selection in plants. *American Naturalist*, v. 113, p. 777-790.
- Wink, M. 1990. Phisiology of secondary product formation in plants. In: Secondary products from plant tissue culture. B. V. Charlwood, M. J. C. Rhodes (ed.). Oxford: Clarendon. p. 67-86.

CAPÍTULO 2

Metacrilato: uma alternativa na identificação da composição botânica da própolis

Resumo – A análise de fragmentos vegetais constituintes da própolis tem sido uma ferramenta útil na identificação da composição botânica do produto. Amostras de própolis oriundas dos municípios de Itapeccerica, de Paula Cândido e de Virginópolis, Minas Gerais, foram incluídas em metacrilato, objetivando-se testar a possibilidade da utilização dessa técnica analítica na confecção de um laminário para fins de identificação da origem botânica da própolis. As características anatômicas observadas em estruturas e em fragmentos de tecidos vegetais presentes na própolis incluída em metacrilato foram comparadas àquelas observadas em laminário preparado conforme metodologia proposta por Warakomska e Maciejewicz (1992), com própolis originária das mesmas regiões. Diferenças qualitativas marcantes a favor da técnica de inclusão em metacrilato foram constatadas, confrontando-se as imagens obtidas nos dois laminários produzidos. A inclusão da própolis em metacrilato permite cortes seriados, de espessura conhecida, o que pode ser útil na comparação de estruturas anatômicas. A nitidez das características anatômicas observadas com essa técnica permite a observação detalhada e segura de estruturas internas e externas que são importantes caracteres diagnósticos. Além disso, o laminário produzido, adotando-se esse procedimento analítico, apresenta durabilidade indefinida, podendo ser considerado um material de consulta permanente. Levando-se em conta apenas o valor do metacrilato, o custo unitário da análise é acessível, aproximadamente US\$ 0.10 por amostra, o que torna a técnica uma interessante alternativa a ser implementada em laboratórios de rotina que se dedicam à identificação da composição botânica da própolis, contribuindo com as análises de controle de qualidade.

Palavras-chave: *Apis mellifera*, metacrilato, origem botânica, própolis,.

INTRODUÇÃO

Em recente publicação, Pereira et al. (2002) apresentaram um interessante panorama atual das pesquisas desenvolvidas com própolis no Brasil e no mundo. Ressaltou-se o crescimento quase que exponencial, nas últimas décadas, do número de publicações sobre própolis.

Todavia, constata-se que a vasta literatura científica relata, principalmente, as diversas atividades biológicas e composição química apresentadas pelo produto. Uma das justificativas discutidas pelos autores, quanto ao interesse global das pesquisas com própolis, está relacionada ao fato de lhe serem atribuídas dezenas de atividades biológicas simultaneamente, o que de certa maneira dificulta a aceitação do produto na área médica, conferindo-lhe características de panacéia.

A exemplo do que ocorre com o uso de fitoterápicos, as informações terapêuticas sobre a própolis vêm se acumulando durante séculos e de maneira indireta. Segundo interpretação de Maciel et al. (2002), essa modalidade de terapia desperta o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, incluindo a Botânica, a Farmacologia e a Fitoquímica, ciências que juntas se complementam e enriquecem o conhecimento sobre fontes medicinais naturais.

Por ser a própolis um produto em grande parte derivado de plantas, o seu perfil químico é delineado principalmente pela contribuição das diferentes espécies vegetais que a originam, havendo também outros fatores envolvidos, como condições climáticas da área de produção e características fenológicas das espécies vegetais, por exemplo.

Historicamente, importante estudo desenvolvido por Warakomska e Maciejewicz (1992) pode ser considerado como um marco nas pesquisas da composição botânica da própolis. A constatação de fragmentos de tecidos vegetais presentes nos sedimentos das amostras de própolis analisadas permitiu aos estudiosos lançarem mão dos conhecimentos da anatomia vegetal que são ferramentas úteis para a taxonomia e, assim, possibilitar a identificação das espécies que as constituíam. A partir de então, diversas outras pesquisas foram desenvolvidas nessa área (Valcic et al. 1999, Montenegro et al., 2000, Montenegro et al., 2001a, Montenegro et al., 2001b, Oliveira e Bastos, 1998, Freire, 2000, Bastos, 2001).

Todavia, as técnicas utilizadas na maioria desses estudos têm como base a proposta apresentada por Warakomska e Maciejewicz (1992), com algumas modificações. Em função das dificuldades que muitas vezes ocorrem com o uso da técnica, quanto à visualização das características anatômicas dos fragmentos e caracterização das estruturas vegetais observados no sedimento de própolis, fazem-se necessários aperfeiçoamentos ou mesmo desenvolvimento de novas técnicas analíticas que otimizem os parâmetros anatômicos úteis na avaliação.

Nesse sentido, o metacrilato (usualmente designado historresina) surge como uma alternativa. O seu uso tem sido freqüente nas últimas décadas, tanto em estudos anatômicos de tecido animal como vegetal, por apresentar grande capacidade de infiltração, permitindo cortes muito finos e, inclusive, testes histoquímicos, dentre outras vantagens.

Objetivou-se neste trabalho testar a viabilidade de identificação de espécies vegetais presentes em amostras de própolis incluídas em metacrilato.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de própolis originárias do Município de Itapecerica (20°32'S, 45°13'O), de Paula Cândido (20°49'S, 42°54'O) e de Virginópolis (18°50'S, 42°43'O), Minas Gerais, foram coletadas mensalmente, durante um ano, em apiários experimentais constituídos de cinco colônias de *Apis mellifera* L. (africanizadas). Os ninhos utilizados foram do tipo Langstroth. Foram confeccionadas melgueiras especiais, contendo frestas laterais de 3 cm de largura, objetivando-se estimular a produção de própolis.

As amostras foram armazenadas, individualmente, em freezer a -20°C, em frascos de vidro até o momento das análises. Amostras compostas foram preparadas, utilizando-se porções mensais das frestas das cinco colônias, obtidas nos doze meses de coleta, em cada local. Posteriormente, essas amostras foram desidratadas em série etílica e incluídas em metacrilato (Hissoresin, Leica), segundo o seguinte procedimento: amostras de própolis de 2,0 g foram tratadas por duas horas com álcool etílico 85%, acondicionadas em frascos de vidro com capacidade para 8 mL. As amostras foram então transferidas para outros frascos, utilizando-se papel de filtro (Inlab tipo 10 - porosidade 3 µm), sendo então tratadas com álcool etílico 95% por mais duas horas. Em seguida, novamente com o auxílio de papel de filtro, as amostras foram transferidas para novos frascos e submersas em álcool etílico 95% + resina básica contendo ativador (segundo preparo indicado pelo fabricante), na proporção de 1:1 (v/v). Quatro horas após, o material foi novamente filtrado e o resíduo retido no papel de filtro foi espalhado, individualmente, em placas de petri forradas com papel de filtro, objetivando a eliminação do excesso de álcool 95% + resina. O resíduo assim obtido permaneceu submerso durante uma noite em resina pura. Na manhã seguinte, o material foi finalmente espalhado em folhas de papel de filtro, de onde, com uma espátula, retirou-se 0,4 g do resíduo. Essa porção de própolis foi então incluída em resina + polimerizador (na proporção indicada pelo fabricante) em bandejas plásticas próprias, com nove unidades de 0,8 cm x 1,0 cm, previamente identificadas, conforme a procedência das amostras. A cada transferência, tanto durante a série etílica quanto na inclusão em resina pura, o material foi submetido a vácuo, em dessecador, com o objetivo de promover melhor infiltração.

As bandejas permaneceram em estufa a 34°C cerca de quatro horas após a inclusão, até que os blocos se apresentassem totalmente polimerizados. Os blocos foram então

retirados das bandejas e aderidos a pequenos suportes de madeira, sendo mantidos em potes de vidro fechados, contendo sílica, até serem cortados.

Os blocos foram cortados em micrótomo rotativo de avanço automático (RM 2155 – Leica), utilizando-se navalha de vidro. A espessura de 12 μm foi a mais adequada para a visualização dos fragmentos vegetais contidos nas amostras de própolis. Os cortes foram distendidos em recipiente com água destilada e posteriormente transferidos para lâminas histológicas, ordenados em seqüência crescente. Dentre os corantes e tempo de exposição testados, foi selecionado o azul de toluidina pH 4 (Vidal, 1977), durante 18 minutos, à temperatura ambiente. As lâminas foram montadas com resina sintética Permount, após serem secas em suportes verticais, também à temperatura ambiente, protegidas da poeira. As lâminas permanentes resultantes foram identificadas e arquivadas em caixas de madeira, constituindo-se, assim, em laminário permanente.

As lâminas foram analisadas em microscopia de luz. Para o registro fotográfico e captura de imagens do material em estudo, foi utilizado fotomicroscópio Olympus AX-70 equipado com sistema U-Photo e câmara filmadora acoplada a um monitor de vídeo. O software Image Pro Plus foi utilizado no monitoramento das imagens.

Avaliações anatômicas desses registros, utilizando-se os mesmos recursos, foram comparadas àquelas obtidas em outro laminário de própolis, produzido segundo a técnica proposta por Warakomska e Maciejewicz (1992), com amostras compostas de própolis coletadas na mesma região, na mesma época. A fim de facilitar a designação das duas metodologias utilizadas, passou-se a designá-las simplesmente “técnica de inclusão em metacrilato” e “técnica convencional”, respectivamente.

A coleta de espécies vegetais que floresciam nos arredores dos apiários permitiu a produção de um laminário de referência, utilizando-se técnicas tradicionais de preparo para avaliações anatômicas (Johansen, 1940, Gerlach, 1969). Ramos dessas espécies foram também coletados e as exsiccatas depositadas no Herbário do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa (VIC) e devidamente registradas para a confirmação da identidade taxonômica.

Objetivando identificar as espécies vegetais constituintes das amostras de própolis analisadas, efetuaram-se comparações anatômicas dos fragmentos e estruturas vegetais presentes nas amostras de própolis e aquelas observadas no laminário de referência.

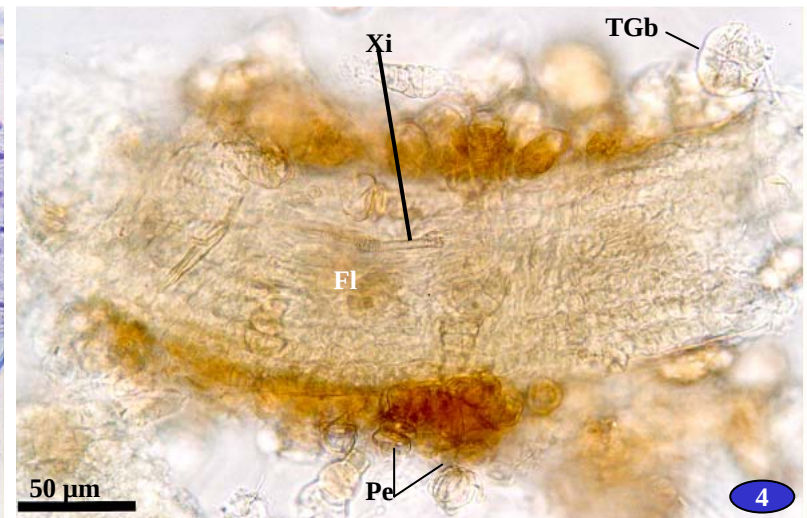
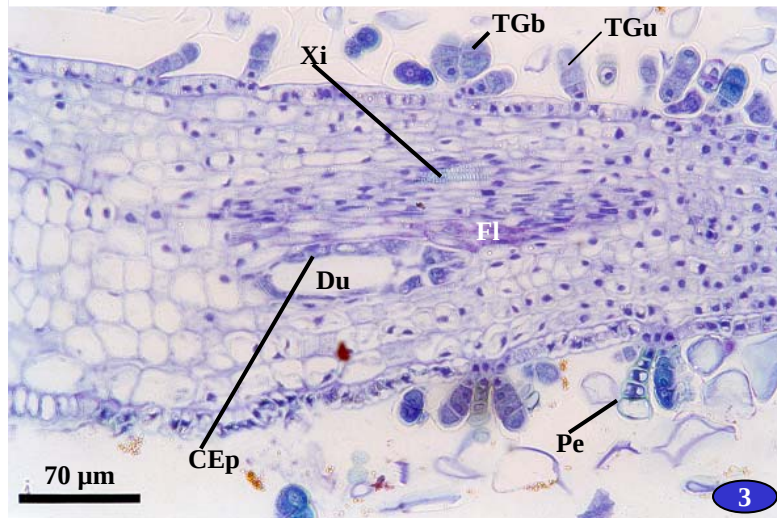
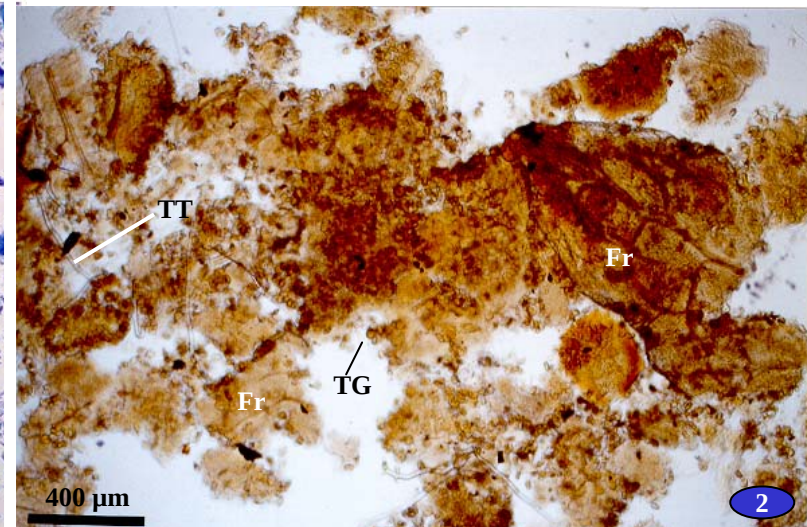
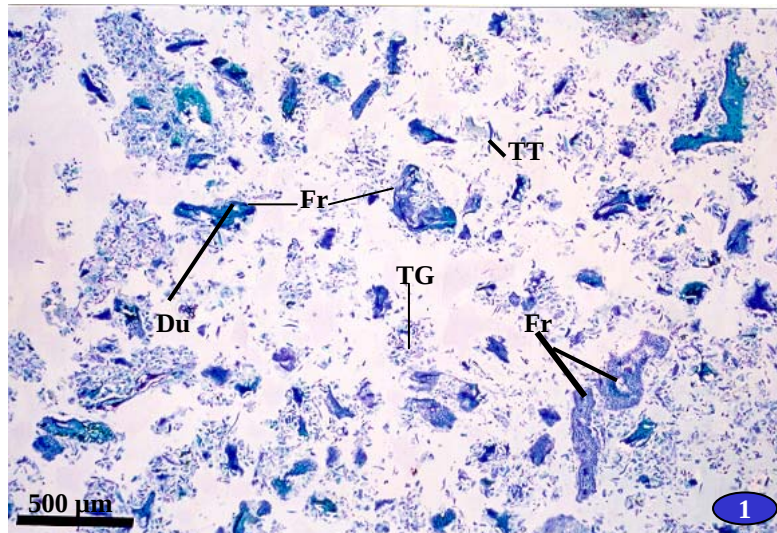
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Confrontando-se as imagens obtidas nos dois laminários produzidos para as três regiões mencionadas, pôde-se constatar diferenças qualitativas marcantes, quanto à visualização dos fragmentos e estruturas vegetais presentes nas amostras de própolis. Fragmentos de *Baccharis dracunculifolia* eram abundantes e predominantes nas amostras analisadas oriundas de Itapeçerica e de Paula Cândido, motivo pelo qual se adotou o procedimento de comparação das imagens obtidas principalmente com esses fragmentos, a fim de ilustrar as diferenças observadas usando as duas técnicas.

Nas Figuras 1 e 2 podem ser apreciadas, respectivamente, vista panorâmica da própolis de Paula Cândido incluída em metacrilato e daquela preparada segundo a técnica convencional, oriunda da mesma região, ambas referentes à amostra composta dos doze meses de coleta. Foi possível constatar a predominância de fragmentos de *Baccharis dracunculifolia* DC. (Asteraceae), espécie muito comum nas proximidades das colméias. Todavia, a inclusão em metacrilato evidenciou importantes caracteres internos diagnósticos, como por exemplo a presença e a posição dos ductos em relação aos feixes vasculares e quanto aos apêndices epidérmicos. Com o uso da técnica tradicional, esse tipo de avaliação só é possível se forem visualizados cortes promovidos pela mandíbula da abelha em região de mesofilo.

Constatou-se que todos os detalhes anatômicos dos primórdios foliares dessa espécie, observados no laminário de referência, podem também ser observados na própolis incluída em metacrilato (Figura 3), demonstrando elevado grau de preservação. Tricomas secretores unisseriados e bisseriados, tricomas tectores e ductos associados a feixes vasculares e voltados para o floema foram evidenciados. Tais características são compatíveis com aquelas já descritas anteriormente para *B. dracunculifolia* (Castro, 1987, Oliveira e Bastos, 1998, Freire, 2000, Bastos, 2001). Com o uso da técnica convencional, há comprometimento de alguns detalhes importantes, principalmente quanto aos caracteres internos da região de mesofilo (Figura 4).

Figuras 1 a 4 – Corte de amostra de própolis incluída em metacrilato e sedimento de própolis obtido através da técnica tradicional. 1 – Vista panorâmica de corte de amostra de própolis oriunda de Paula Cândido incluída em metacrilato, com fragmentos de *B. dracunculifolia*. 2 – Sedimento de própolis de Paula Cândido obtido com o uso da técnica tradicional, com fragmentos de tecido vegetal. 3 – Detalhe da Foto 1 com fragmento de folha de *B. dracunculifolia*. 4 – Detalhe da Foto 2 com fragmentos de *B. dracunculifolia*. CEp = célula epitelial. Du = ducto. Fl = floema. Fr = fragmento de folha. Pe = pedúnculo. TG = tricoma glandular. TGb = tricoma glandular biseriado. TGu = Tricoma glandular uniseriado. Tr = tricoma. TT = tricoma tector. Xi = xilema.



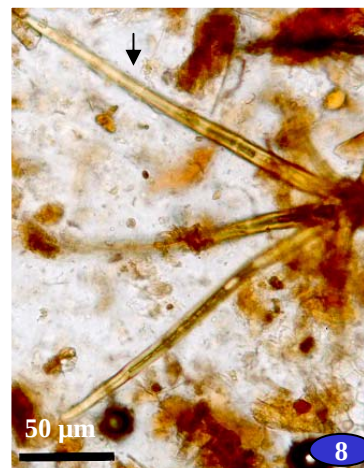
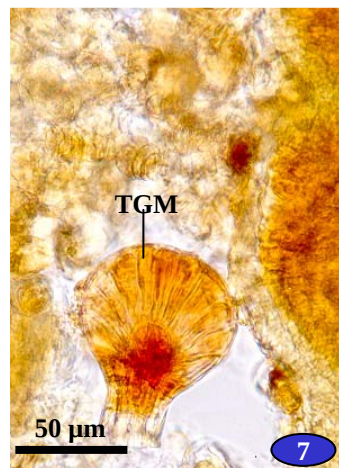
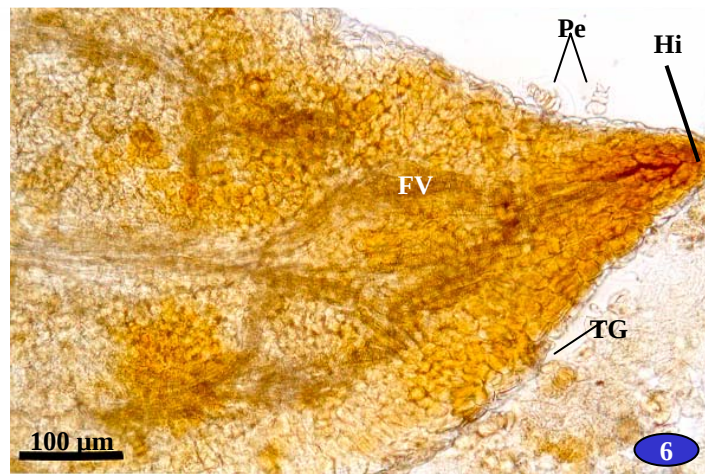
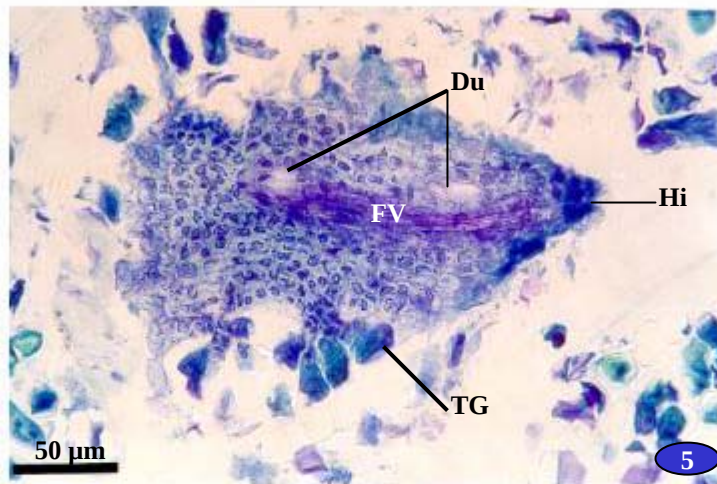
Hidatódios são muito freqüentes e podem ser visualizados na própolis incluída em metacrilato (Figura 5) e mais abundantemente no sedimento obtido pelo uso da técnica convencional (Figuras 6). Ressalte-se a possibilidade de visualização de detalhes anatômicos importantes a serem utilizados na identificação de tais fragmentos com a inclusão em metacrilato.

Embora *Myrsine umbellata* G. Don (Myrsinaceae) tenha sido identificada como outra espécie vegetal constituinte da amostra composta de própolis oriunda de Paula Cândido por meio das duas técnicas utilizadas, a visualização de tal fragmento pela técnica convencional só foi possível após insistentes buscas no laminário produzido (Figura 7). A facilidade de observação e detalhamento de tricomas secretores dessa espécie, usando a técnica de inclusão em metacrilato, induziu a novas buscas no laminário produzido pela técnica convencional.

Ressalte-se que a sobreposição de fragmentos e estruturas observadas no laminário produzido com uso da técnica convencional dificulta sobremaneira a identificação de sua origem. Essas constatações evidenciam o potencial que a técnica de inclusão da própolis em metacrilato apresenta para a identificação das espécies vegetais que contribuem com fontes de constituintes da própolis.

Na amostra composta de própolis obtida na região de Virginópolis, além de alguns fragmentos de *B. dracunculifolia*, tricomas de *Vernonia polyanthes* Less. (Asteraceae) e traqueídes de Gimnospermae puderam ser visualizados com as duas técnicas, havendo também diferenças quanto à qualidade do material observado, a favor da técnica do metacrilato. Um tipo morfológico não identificado pôde também ser visualizado pelas duas técnicas, o qual apresentava epiderme em paliçada. Todavia, procedeu-se busca semelhante à efetuada para os tricomas de *Myrsine umbellata*, ou seja, posterior à identificação pela técnica do metacrilato, na qual se observou, inclusive, a característica de parênquima incolor nesses fragmentos. Tricomas tectores de *Sida* sp. (Malvaceae) livres foram visualizados apenas na amostra composta dessa região e com o uso da técnica tradicional (Figura 8).

Figuras 5 a 8 – Corte da própolis de Itapecerica incluída em metacrilato e sedimento de própolis de Itapecerica e de Virginópolis obtido através da técnica tradicional. 5 - Hidatódio evidenciado em folha de *B. dracunculifolia* na própolis de Itapecerica. 6 - Hidatódio evidenciado em folha de *B. dracunculifolia* em sedimento de própolis de Itapecerica. 7 - Seção longitudinal de tricoma glandular de *Myrsine umbellata* em sedimento de própolis de Virginópolis. 8 – Tricoma tector de *Sida* sp em sedimento de própolis de Virginópolis. Du = ducto. FV = feixe vascular. Hi = hidatódio. Pe = pedúnculo. TG = tricoma glandular. TGM = tricoma glandular multicelular. A seta indica tricoma tector de *Sida* sp.



Algumas técnicas de extração têm sido utilizadas com a finalidade de concentrar o resíduo insolúvel de própolis, todavia com objetivos diversos: a) verificar a possibilidade de identificação da origem geográfica da própolis com base no espectro polínico (D'Albore, 1979), b) caracterizar, além de grãos de pólen, outros componentes da própolis insolúveis em água e em solventes orgânicos que sirvam de diagnóstico para a origem do produto (Warakomska e Maciejewicz, 1992), c) reconhecimento de regiões fitogeográficas nas quais as amostras foram coletadas (Barth, 1998) ou d) estabelecer uma metodologia padrão visando a estudos palinológicos da própolis, além de caracterizar amostras de própolis provenientes de diferentes regiões geográficas do Brasil, pela análise polínica (Barth, 1998). As variações das técnicas propostas estão associadas ao uso de diferentes solventes orgânicos, em diferentes proporções. Todavia, tais procedimentos, independentemente dos reagentes utilizados, eliminam compostos orgânicos por meio de processos de extração conjunta (álcool etílico:clorofórmio:acetona, 1:1:1), conforme proposto por D'Albore, ou extrações seqüenciais em diferentes solventes (álcool etílico, benzeno e acetona), segundo Warakomska e Maciejewicz (1992), além de submeter o sedimento obtido a várias centrifugações, filtrações e fervuras. Já as propostas de Barth (1998) e de Barth et al. (1999) são associações de extrações em etanol e o método da acetólise (Erdtman, 1952). Esses procedimentos levam à análise final de apenas uma parcela do material presente na própolis.

Outro ponto positivo da técnica de inclusão em metacrilato é a garantia de visualização de todo o material vegetal presente na própolis no momento de sua coleta, já que o processamento adotado pela técnica não incorre em riscos de perdas de estruturas que possam ser importantes no diagnóstico da origem da própolis, durante a passagem do sedimento por peneira, conforme proposto por Warakomska e Maciejewicz (1992). Outra vantagem está relacionada ao fato de a técnica permitir a visualização do conteúdo amorfo presente entre os fragmentos e estruturas vegetais, o qual não é eliminado durante o processo de desidratação das amostras na série etílica. Provavelmente, esse conteúdo é fruto do extravasamento ocorrido após o rompimento das estruturas secretoras internas e externas presentes, tendo sido promovido durante o processo de fragmentação dos ápices foliares

pelas abelhas. Essas constatações demonstram que as imagens obtidas com a técnica da metacrilato retratam de forma mais fiel à composição botânica da própolis produzida.

A técnica do metacrilato permite ainda cortes seriados, de espessura conhecida, o que pode ser útil na comparação de estruturas anatômicas. A nitidez das características anatômicas observadas com essa técnica pode permitir a visualização de caracteres diagnósticos importantes.

Ressalte-se que o laminário produzido com a inclusão da própolis em metacrilato apresenta durabilidade indefinida, podendo ser considerado um material de consulta permanente. Já o laminário produzido pela técnica convencional tem durabilidade limitada, não sendo considerado um laminário permanente.

Quanto ao custo de implementação dessa técnica, pode-se afirmar que com um *kit* de metacrilato (Historesin-Leica), cujo valor aproximado é de US\$ 200,00, possibilita a análise de cerca de 2.000 amostras de própolis, o que corresponde a um custo unitário de aproximadamente US\$ 0,10, no que tange ao uso do referido meio de inclusão.

CONCLUSÕES

A qualidade do material obtido, com o uso da técnica de inclusão de própolis em metacrilato, é superior à apresentada pela técnica tradicional. Sua praticidade e custo reduzido fazem dessa técnica uma interessante alternativa a ser implementada em laboratórios de rotina que se dedicam à identificação da origem da própolis e do seu controle de qualidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barth, O. M. 1998. Pollen analysis of Brazilian propolis. *Grana*, v. 37, p. 97-101.
- Barth, O. M., Dutra, V. M. L., Justo, R. L. 1999. Análise polínica de algumas amostras de própolis do Brasil meridional. *Ciência rural*, v. 29, n.4, p. 663-667.
- Bastos, E. M. A. F. 2001. Origem botânica e indicadores de qualidade da “própolis verde” produzida no Estado de Minas Gerais. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo/Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras (tese de Doutorado), 137p.
- Castro, M. M. 1987. Estruturas secretoras em folhas de espécies da família Asteraceae: aspectos estruturais e histoquímicos. São Paulo: Universidade de São Paulo/Instituto de Biociências (tese de Doutorado), 118p.
- D'albore, G. R. 1979. L'origine géographique de la propolis. *Apidologie*, v.10, n. 3, p. 241-267.
- Freire, U. C. 2000. Origem da própolis verde e preta produzida em Minas Gerais. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa (dissertação de Mestrado), 50p.
- Gerlach, G. 1969. Botanische Mikrotechnik, eine Einführung. Gorg Thieme, Stuttgart.
- Johansen, D. A. 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill Book Co. Inc., New York.
- Maciel, M. A. M., Pinto, A. C., Veiga Jr., V. F. 2002. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, v.25, n.3, p. 429-438.
- Montenegro, G., Timmermann, B. N., Peña, R., Mujica A. M., Avila, G. 2000. Pollen grains and vegetative structures in propolis as indicators of potential drugs in Chilean plants. *Phyton International Journal of Experimental Botany*, v. 66, p. 15-23.

- Montenegro, G., Peña, R., Avila, G., Timmermann, B. N. 2001a. Botanical origin and seasonal production of propolis in hive of Central Chile. *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo*, v. 19, p. 1-6.
- Montenegro, G., Peña, R., Timmermann, B. N., Mujica, A. M., Avila, G. 2001b. Botanical resources for propolis in an apiary network in Central Chile. *Phyton International Journal of Experimental Botany*, 50th anniversary, p. 191-201.
- Oliveira, V. C., Bastos, E. M. 1998. Aspectos morfo-anatômicos da folha de *Baccharis dracunculifolia* DC. (Asteraceae) visando à identificação da origem botânica da própolis. *Acta Botânica Brasileira*, v. 12, n. 3, p. 431-439, suplemento.
- Pereira, A. dos S., Seixas, F. R. M. S., Neto, R. de A. 2002. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas. *Química Nova*, v.25, n.2, p. 321-326.
- Valcic, S., Montenegro, G., Mujica, A. M., Avila, G., Franzblau, S., Singh, M. P., Maiese, W. M., Timmermann, B. N. 1999. Phytochemical, morphological, and biological investigations of propolis from Central Chile. *Zeitschrift fur Naturforschung*, v. 54c, p. 406-416.
- Vidal, B. C. 1977. Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification: microspectrophotometric evolution and macromolecular orientation. *Cell Molecular Biology*, v. 22, p. 45-64.
- Warakomska, Z., Maciejewisk, W. 1992. Microscopic analysis of propolis from Polish regions. *Apidologie*, v. 23, p. 277-283.

CAPÍTULO 3

Identificação de espécies vegetais componentes da própolis originária de três regiões de Minas Gerais, pela técnica de inclusão em metacrilato

Resumo – A associação entre as propriedades farmacológicas da própolis e o conhecimento da flora que origina seus diferentes tipos constitui-se em importante obstáculo a ser superado no estabelecimento da identidade e da qualidade do produto. Estudos anatômicos de fragmentos de tecidos vegetais encontrados na própolis surgem como uma alternativa viável para transpor tais dificuldades. Identificaram-se as espécies vegetais constituintes da própolis produzida em três regiões de Minas Gerais (Municípios de Itapeçerica, de Virginópolis e de Paula Cândido) por meio de observações microscópicas de amostras incluídas em metacrilato. A comparação do laminário produzido com as amostras de própolis e com o laminário de referência preparado a partir de espécies vegetais coletadas mensalmente, durante um ano, nas localidades dos apiários experimentais, permitiu a identificação de diversas espécies vegetais presentes na própolis. Observações de campo permitiram discutir alguns aspectos relacionados ao comportamento de coleta, além de comprovarem que *Apis mellifera* L. 1758 (africanizada) coleta ápices vegetativos de *Baccharis dracunculifolia* DC. (Asteraceae), também em época de floração, embora com menor incidência. Em todas as amostras de própolis oriundas de Itapeçerica, *B. dracunculifolia* foi identificada como espécie predominante. Constatou-se que a própolis produzida nessa região contém também fragmentos de ápices vegetativos de *Baccharis calvescens* DC. e *Baccharis trimera* DC. (Asteraceae), além de *Myrsine umbellata* G. Don (Myrsinaceae). Dois outros tipos de estruturas anatômicas não identificadas foram detectados. Na própolis de Paula Cândido, houve contribuição relevante de *B. dracunculifolia*. Tricomas secretores de *Myrsine umbellata* foram visualizados, além de traqueídeos de gimnosperma. Na região de Virginópolis, a própolis constitui-se, principalmente, de secreções vegetais que estão exsudando em espécies locais, além de constituintes advindos de estruturas secretoras de *B. dracunculifolia*. *Vernonia polyanthes* Less. (Asteraceae) também participa da composição da própolis produzida nessa região. *B.*

calvescens, além de três outros tipos morfológicos, foram também visualizados. A técnica analítica utilizada permitiu considerável nível de detalhamento das características anatômicas estudadas, produzindo resultados inéditos quanto à origem botânica da própolis. Os resultados dessa pesquisa servem de subsídio à caracterização da própolis produzida em Minas Gerais, cuja inserção é privilegiada no mercado interno e externo de produtos apícolas.

Palavras-chave: *Apis mellifera*, origem botânica, própolis.

INTRODUÇÃO

Apesar dos estudos sobre própolis terem se iniciado há mais de um século, com grande avanço quanto às descobertas dos constituintes químicos presentes no produto, bem como quanto ao conhecimento das diversas atividades biológicas associadas e técnicas químicas analíticas utilizadas, pouco se avançou quanto ao seu uso terapêutico efetivamente. Essa constatação justifica-se, possivelmente, pela escassez de informações existentes quanto à associação do conhecimento da flora que origina os diferentes tipos de própolis produzidos e as mais de três centenas de compostos já identificados.

A amplitude de informações disponíveis na literatura, ao mesmo tempo em que confirma que a sua atividade é de amplo espectro, indica o seu potencial incontestável, não só como fonte de biofármacos, mas também como provedor de modelos moleculares de importância biológica, além de apresentar a possibilidade de uso do produto como matriz complexa, tirando proveito, nesse caso, do sinergismo que o grupo de compostos presentes pode apresentar.

Se por um lado muitas das informações terapêuticas acumuladas durante milênios concernentes ao uso popular do produto vêm se confirmando cientificamente, por outro, ainda faltam para a própolis avaliações fitoquímicas e fármaco-toxicológicas que, associadas ao conhecimento das espécies vegetais participantes em termos de constituintes químicos do produto, produzam informações que permitam o seu uso racional e seguro para o homem e outros animais.

Torna-se imperativo, conforme exposto por Pereira et al. (2002), procurar responder, nesse momento, a uma questão antiga que permeia essa área científica: “que própolis serve para que ação terapêutica?” A busca de conhecimentos que permitam a resposta a essa questão representa, sem dúvida, um grande desafio, por fazer-se necessário caracterizar um produto natural, cuja constituição é determinada, em larga escala, pela flora que o origina.

No Brasil, os primeiros resultados de observações de forrageamento para produção de própolis por abelhas africanizadas de *Apis mellifera*, foram apresentados por Santos e Message (1997). Os autores constataram que em *Baccharis dracunculifolia*, conhecido popularmente como alecrim, as abelhas fragmentavam e coletavam gemas apicais e axilares

da planta, com o auxílio das mandíbulas e do primeiro par de patas. O material coletado era então transferido para a corbícula e transportado para a colônia. Foi observado ainda que as campeiras coletoras eram capazes de recrutar outras operárias pelo comportamento de dança.

Tais constatações decorreram da observação direta no campo, das abelhas coletando material vegetal para produção de própolis. Essa, sem dúvida, constitui-se na estratégia mais segura em termos de averiguação da origem botânica da própolis, por gerar resultados incontestáveis quanto ao fornecimento de informações de fontes vegetais utilizadas pelas abelhas para esse fim.

Embora produzam resultados consistentes, as dificuldades para viabilizar a técnica de observação direta no campo são uma realidade, em função da complexidade que o estudo do comportamento de forrageamento de *Apis mellifera* para obtenção de própolis apresenta, quando comparado aos estudos para obtenção de outros recursos, como néctar e pólen. O principal fator em questão é o reduzido percentual de indivíduos que executam tal atividade por colônia, podendo esse número ser alterado em função da necessidade.

Santos (1996), ao estudar o forrageamento de própolis em abelhas *Apis mellifera* africanizadas, de colônias não-selecionadas, observou que o forrageamento para coleta desse recurso é pouco representativo em relação a outras atividades de campo. Em seus resultados, constatou-se que apenas cerca de 1% dos indivíduos de uma colônia coletavam própolis. Já a atividade de coleta de pólen observada foi de aproximadamente 35%. Tais resultados justificam-se, possivelmente, pela reduzida demanda do produto pela colônia, em relação a outros recursos que garantem sua nutrição (pólen, néctar e água), por ser a própolis uma substância de defesa, isolamento, reparo e construção. Temperatura e insolação são, segundo o autor, fatores ambientais determinantes no comportamento de forrageamento de própolis.

Buscando agilidade e otimização na busca de informações quanto à origem da própolis, outras técnicas, ditas indiretas, são também utilizadas, tais como: identificação de constituintes químicos e de estruturas ou fragmentos de tecidos vegetais encontrados na própolis, além de grãos de pólen presentes no resíduo insolúvel do produto. Todavia, nesse último caso, tendo como base o espectro polínico e identificação de táxons vegetais por meio da morfologia dos grãos de pólen, é possível inferir apenas sobre o tipo de vegetação

de onde foi recolhida a própolis, ou seja, sobre a sua origem geográfica (D'Albore,1979, Warakomska e Maciejewicz, 1992, Barth, 1998, Barth et al.,1999). A identificação de grãos de pólen presentes em amostras de própolis se constitui em ferramenta útil a ser utilizada como diagnóstico para identificação da origem botânica do produto apenas em casos específicos, nos quais resinas produzidas por estruturas florais exercem atratividade sobre as abelhas. Esse tipo de matéria-prima utilizada na produção de própolis foi descrito por Thomás-Barberán et al. (1993). Nesse estudo, os autores demonstraram que a compatibilidade do perfil químico das amostras de própolis produzidas e da resina secretada em flores de *Clusi*, confirmou a origem do produto. Registros de observações de campo de *Apis mellifera* visitando tais flores foram, nesse caso, importantes e imprescindíveis.

Portanto, para que a identificação dos constituintes químicos presentes em amostras de própolis possa ser utilizada na determinação da sua origem botânica, faz-se necessário o estabelecimento de um paralelo entre os compostos químicos presentes nas amostras e aqueles presentes em secreções ou em extratos obtidos de partes de vegetais do local de coleta, enfocados como possíveis fontes visitadas para esse fim. Sem esse tipo de avaliação conjunta, a estratégia de análise exclusivamente das amostras torna-se insuficiente: por um lado, em função da amplitude com que certos compostos encontram-se distribuídos no reino vegetal, e por outro, em função das dificuldades vigentes sobre a possibilidade do uso de certo composto como marcador taxonômico, posto que a aplicação de resultados de análises químicas em sistemática só é válida se todas as espécies de um gênero forem investigadas, sendo necessária a garantia de uma amostragem adequada, com um grande número de membros de uma espécie avaliados, em diferentes estádios de desenvolvimento e em diferentes ambientes (Vickery e Vickery, 1981).

Nesse contexto, diante das limitações de tais técnicas utilizadas na identificação da origem botânica da própolis, a análise comparada de estruturas morfológicas de fragmentos de tecido vegetal encontrados nas amostras de própolis e de estruturas morfológicas presentes nas espécies vegetais visitadas pelas abelhas pode contribuir efetivamente para a elucidação da origem botânica dos constituintes da própolis.

Pioneiramente, Warakomska e Maciejewicz (1992) sugeriram a utilização de observações de fragmentos de epiderme e algumas estruturas vegetativas para

reconhecimento de espécies utilizadas por *Apis mellifera* para coleta de própolis na Polônia. Na América do Sul, além das pesquisas desenvolvidas na região central do Chile (Valcic et al., 1998, Valcic et al., 1999, Montenegro et al. 2000, Montenegro et al. 2001a, Montenegro et al. 2001b), Oliveira e Bastos (1998), Freire (2000) e Bastos (2001) encontraram estruturas secretoras em sedimento de própolis, as quais foram utilizadas como diagnóstico da origem botânica das amostras oriundas de Minas Gerais, Brasil.

Todavia, o processo analítico proposto por Warakomska e Maciejewicz (1992), embora freqüentemente utilizado, apresenta limitações quanto à qualidade do laminário obtido, não só em termos de visualização e identificação dos fragmentos presentes, mas também quanto à durabilidade do laminário produzido e à possibilidade de perda de importantes fragmentos que apresentem potencial para o diagnóstico da origem da própolis. Também perde-se a possibilidade de detectar a presença de resinas em maior ou menor abundância, uma vez que essa é removida durante a preparação. Além disso, segundo Barth et al. (1999), os processos de extração sugeridos por Warakomska e Maciejewicz (1992) e por D'Albore (1979) são demorados, dispendiosos e oferecem risco de intoxicação.

Objetivou-se, nesse estudo, identificar as espécies vegetais componentes da própolis produzida em três regiões de Minas Gerais, de características organolépticas distintas, pela inclusão da própolis em metacrilato e análise de estruturas anatômicas de origem vegetal.

MATERIAL E MÉTODOS

Apiários

Para o desenvolvimento da pesquisa, foram instalados três apiários experimentais, localizados nos Municípios de Itapecerica (20°32'S, 45°13'O), de Paula Cândido (20°49'S, 42°54'O) e de Virginópolis (18°50'S, 42°43'O), em Minas Gerais. A escolha de tais localidades baseou-se nas características distintas das própolis nelas produzidas, fato que se adequava aos interesses propostos nos objetivos específicos da pesquisa.

Em cada apiário foram instalados dez enxames de *Apis mellifera* (africanizada), dos quais cinco eram mantidos como enxames-extras, para o caso de perda de qualquer um dos outros cinco que efetivamente participavam da pesquisa.

Foram utilizadas colméias com ninhos do tipo Langstroth. Para estimular a produção de própolis pelas colônias, foram confeccionadas melgueiras especiais com aberturas ao longo das duas laterais, de 3 cm de largura. Com a finalidade de proteger a própolis das chuvas, as caixas, além das tampas, receberam uma cobertura plástica, cujas laterais ultrapassavam a largura da tampa, aproximadamente 60 cm de cada lado, formando abas presas ao chão.

Os enxames receberam alimentação energética preventiva (xarope de açúcar comercial), em períodos de escassez de néctar.

Procedimento de coleta

Trinta dias após a instalação dos apiários experimentais, efetuou-se a raspagem de todas as colônias. Essa própolis foi desprezada, com o objetivo de isentar a primeira amostragem de qualquer contaminação eventualmente existente, advinda dos locais de onde os enxames foram transferidos.

Durante doze meses consecutivos (setembro de 2000 a agosto de 2001), foi coletada, mensalmente, toda a própolis produzida pelas cinco colônias, nos três apiários. No momento da coleta, usou uma melgueira extra, vazia, para a qual eram transferidos os quadros da melgueira experimental, de modo a facilitar a raspagem da própolis acumulada

nas frestas laterais existentes. Essa raspagem se dava sobre uma mesa, devidamente higienizada, com o uso de formão de aço inoxidável.

As amostras mensais eram armazenadas individualmente, em frascos de vidro identificados segundo o local, a data e a colônia. Características organolépticas das amostras (cor, maleabilidade e odor) eram anotadas em fichas de campo. Posteriormente, todas as amostras eram pesadas e estocadas em freezer, a -20°C , para futuras análises.

Também foram coletados mensalmente, após a coleta da própolis, cerca de cinco ramos de cada espécie vegetal que estivesse em florescimento, num raio de aproximadamente três quilômetros em volta dos apiários experimentais. Parte dos ramos coletados de cada espécie vegetal foi fixada em FAA₅₀ imediatamente após a coleta, para confecção do laminário de referência a ser utilizado para identificação posterior dos fragmentos vegetais observados na própolis através de microscopia óptica. Os ramos restantes foram herborizados. As exsiccatas foram depositadas no Herbário do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa sob o código VIC e as espécies identificadas por especialistas. No momento da coleta, algumas informações relevantes foram devidamente registradas em fichas de campo, tais como porte, presença ou ausência de secreção, cor da flor e odor, além de local e data.

As vegetações onde os três apiários experimentais foram instalados foram caracterizadas por meio de listagem florística e aspectos fisionômicos de cada região.

Laminário de referência

Os ramos vegetais provenientes dos três apiários experimentais, coletados durante o período de um ano, foram fixados em FAA₅₀ e estocados em etanol 70% (Johansen, 1940). Estas amostras foram processadas para a confecção do laminário de referência. Todos os procedimentos do preparo e análise do laminário foram realizados no Laboratório de Anatomia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa.

Dos materiais fixados, foi isolada a região mediana das folhas para serem cortadas em micrótomo de mesa (cortes transversais). Esses cortes foram corados com fucsina e azul de astra (Gerlach, 1969) e as lâminas montadas em resina sintética. Porções da lâmina foliar foram diafanizadas conforme metodologia usual (Johansen, 1940) para observação das

características epidérmicas em vista frontal. No caso das espécies que apresentaram folhas compostas foram feitos cortes transversais da região mediana dos folíolos centrais e para folhas recompostas os cortes transversais foram feitos na região mediana dos foliólulos centrais.

Objetivando-se averiguação mais detalhada dos caracteres anatômicos dos primórdios foliares de *Baccharis dracunculifolia* e de *Myrsine umbellata*, ápices dessas duas espécies foram incluídos em metacrilato. Optou-se por esse procedimento por ser a primeira espécie predominante em duas das regiões estudadas e a segunda por tratar-se de uma nova espécie descrita como fonte de própolis.

Laminário da própolis

Usou-se a técnica de inclusão de própolis em metacrilato, descrita no Capítulo 2.

As amostras de própolis obtidas nas cinco colônias de cada local foram homogeneizadas, não sendo considerado assim o fator colônia.

Para cada um dos três locais de coleta, amostras compostas, representativas dos doze meses foram preparadas, obtendo-se três blocos de metacrilato para Itapecerica, três para Virginópolis e três para Paula Cândido, nos quais foram contemplados, para cada local, todos os meses do ano, em partes iguais. Para otimizar o tempo e detalhamento das observações, apenas os cortes obtidos de um dos bloco de amostra composta de cada local foram inteiramente analisados (cerca de 150 cortes) e os resultados registrados e considerados na pesquisa. Esse procedimento foi adotado em função das semelhanças dos perfis em termos de fragmentos vegetais encontrados nos três blocos de um mesmo local, o que demonstrou coerência e confiabilidade no protocolo elaborado.

Para a região de Itapecerica, prepararam-se, além das amostras compostas, amostras individuais obtidas durante os doze meses de coleta. Portanto, dessa região foram confeccionados doze blocos de metacrilato, um bloco para cada mês.

Cada bloco de própolis incluída em metacrilato foi inteiramente cortado em micrótomo rotativo de avanço automático (RM 2155 – Leica), com navalhas de vidro. Cortes seriados de 12 µm de espessura foram distendidos em recipiente com água e posteriormente transferidos para lâminas histológicas. Colocaram-se 15 cortes em cada

lâmina, em seqüência preestabelecida. Depois de secas, as lâminas foram coradas com azul de toluidina pH 4 (Vidal, 1977), permanecendo submersas no corante por 18 minutos, em temperatura ambiente. Após secas em suportes verticais, também em temperatura ambiente, as lâminas foram montadas com resina sintética Permout, as quais após prontas e secas foram arquivadas em caixas de madeira, constituindo-se, assim, em laminário permanente.

Os resultados referentes à identificação das espécies vegetais constituintes da própolis foram obtidos confrontando-se os caracteres anatômicos dos fragmentos presentes no laminário de própolis incluída em metacrilato com os descritos para o laminário de referência.

Microscopia de luz

Os caracteres anatômicos das espécies que constituíram o laminário de referência foram observados em microscópio de luz, sendo concomitantemente descritos e registrados em planilha própria, a fim de facilitar documentações fotográficas posteriores.

Os cinco cortes centrais de cada lâmina de própolis e de todas as lâminas produzidas a partir de cada bloco de metacrilato foram observados. As informações relativas aos tipos de fragmentos de tecidos vegetais encontrados foram devidamente anotadas em fichas previamente preparadas. Para o registro fotográfico e captura de imagens do material analisado, foi utilizado fotomicroscópio Olympus AX-70 equipado com sistema U-Photo e câmara filmadora acoplada a um monitor de vídeo. O software utilizado no monitoramento das imagens foi o Image Pro Plus. O recurso de polarização foi, eventualmente, utilizado.

Avaliações anatômicas desses registros foram comparadas às obtidas no laminário de referência, confeccionado com o material coletado nas respectivas regiões experimentais. Confrontando tais informações, foi possível identificar as espécies vegetais constituintes das amostras de própolis analisadas.

Observações de campo

Nos arredores do apiário experimental localizado no Município de Paula Cândido, foram feitas filmagens (Panasonic – NV/M300) e fotografias (Canon - EOS /Rabel -G e

Sony – Digital Mavica/MVC FD88), com o objetivo de registrar o comportamento de forrageamento das abelhas na coleta de matéria-prima para produção de própolis.

A fim de identificar plantas de *Baccharis* quanto ao sexo, fora das épocas de floração, foram utilizadas placas de alumínio presas aos ramos de algumas plantas, nas quais constavam as marcações obtidas durante a floração.

Efetuuou-se o acompanhamento do comportamento de coleta, desde a chegada do inseto à planta, até o vôo para a colônia, registrando-se dessa forma tanto o processo de coleta como o tempo necessário para tal. Durante essas observações, foram fixadas em FAA₅₀ amostras de material coletado pelas abelhas em *Baccharis dracunculifolia*, para averiguação do processo de fragmentação dos ápices foliares. Usou-se uma pinça para captura de abelhas que estavam em processo de coleta, as quais eram introduzidas em vidros de penicilina, devidamente identificados segundo a planta na qual havia sido feita a coleta, contendo fixador.

O material vegetal assim coletado, correspondendo a fragmentos vegetais aderidos às diferentes partes do corpo da abelha e o que restava dos ápices coletados, foi observado e fotografado em lupa (Leica MZ6). Algumas bolotas foram imediatamente retiradas das corbículas e acondicionadas em *ependorfs*, com as devidas identificações, e mantidas congeladas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas Tabelas 1, 2 e 3 estão relacionadas todas as espécies coletadas, no período de um ano, em Itapecerica, em Virginópolis e em Paula Cândido, respectivamente. Encontram-se também resumidos nessas tabelas os caracteres anatômicos das espécies, considerados importantes para a identificação da própolis.

O aspecto panorâmico dos cortes obtidos com a própolis coletada em Itapecerica (Figura 1), em Paula Cândido (Figura 2) e em Virginópolis (Figura 3) ilustra o conteúdo e diversidade dos fragmentos encontrados.

Caracterização da vegetação de Itapecerica

A vegetação caracteriza-se por ser muito antropizada (com pastagens e talhões de eucalipto) e pela ocorrência de Cerrado *sensu lato*, nas partes altas dos interflúvios. Estão presentes ainda fragmentos de Floresta Estacional Semidecidual nas baixadas e bacias de rios, além de vegetação característica de processo de sucessão.

Caracterização organoléptica da própolis de Itapecerica

Considerando-se a cor, o aroma e o aspecto das amostras de própolis coletadas, poucas variações foram observadas (Tabela 4). A própolis produzida de setembro/2000 a maio/2001 foi de coloração totalmente verde, bastante aromática e maleável à temperatura ambiente (quebradiça, mas não ressecada). Apenas durante os meses de junho, julho e agosto, observaram-se pequenas variações quanto às suas características sensoriais, constatando-se umidade excessiva na face interna da própolis produzida nas frestas, passando de totalmente verde a verde na face externa e amarelada ou marrom na face interna, superficialmente. Comprovou-se que o perfil de espécies vegetais que constituem a própolis produzida durante esses meses não foi alterado, sugerindo que fatores climáticos estejam relacionados a essas características. A temperatura mais baixa dessa época de inverno, provavelmente, dificulta a evaporação da umidade que se forma internamente na colônia, levando à condensação e aparecimento de pequenas gotículas que se acumulam

Tabela 1. Espécies vegetais coletadas no período de um ano no Município de Itapecerica (MG)

nº VIC	Família	Espécie	Epiderme		Posição do Estômato	Mesofilo		T.vascular Tipo feixe	Estrutura secretora
			Forma	Indumento		Tipo	Cristais		
26822	Anacardiaceae	<i>Lythraea molleoides</i>	R	*	Ab	Is	M	C	Df
26824	Anacardiaceae	<i>Mangifera indica</i>	R	*	Ab+Ad	Is	M,D	C	Df
26890	Asteraceae	<i>Ageratum fastigiatum</i>	Si	S	Ab	Do	M,D	C	Hd,Df,Dx
26906	Asteraceae	<i>Baccharis calvescens</i>	R	S,T,P	Ab	Do	*	C	Hd,Df
25529	Asteraceae	<i>Baccharis conyzoides</i>	Si	S,T	Ab+Ad	Is	*	C	Hd,Df
25536	Asteraceae	<i>Baccharis dracunculifolia</i>	R	S,T	Ab+Ad	Is	*	C	Df
25249	Asteraceae	<i>Baccharis trimera</i>	R	S,T	Ab+Ad	Is	*	C	Df
26882	Asteraceae	<i>Bidens segetum</i>	Si	S,T	Ab+Ad	Do	*	C	Hd,Df,Dx
26883	Asteraceae	<i>Eupatorium crenulatum</i>	R	S	Ab+Ad	Is	*	C	Hd,Df,Dx
26884	Asteraceae	<i>Eupatorium maximiliani</i>	Si	S,T	Ab	Do	*	C	Hd,Dx
26887	Asteraceae	<i>Eupatorium squalidum</i>	Si	S,T	Ab	Do	*	Bi	Hd,Dx
25231	Asteraceae	<i>Gochnatia polymorpha</i>	R	S,T	Ab	Do	*	C	*
26903	Asteraceae	<i>Vernonia polyanthes</i> Less.	R	S,T	Ab	Do	*	C	Hd, Id
25230	Boraginaceae	<i>Cordia verbenaceae</i>	R	S,T,P	Ab	Do	*	C	*
25528	Campanulaceae	<i>Lobelia sp1</i>	R	T	Ab+Ad	Do	*	C	Hd
25538	Euphorbiaceae	<i>Maprounea guianensis</i>	R	S,T,P	Ab	Do	*	C	*
26832	Labiatae	<i>Labiatae sp1</i>	R	S,T	Ab	Do	*	C	Hd,Id
26834	Lauraceae	<i>Persea sp1</i>	R	T	Ab	Do	*	C	Id
25539	Lythraceae	<i>Cuphea sp1</i>	Si	T	Ab+Ad	Do	*	Bi	*
25540	Lythraceae	<i>Cuphea sp2</i>	Si	T	Ab+Ad	Do	*	Bi	*
25541	Malpighiaceae	<i>Byrsonima intermedia</i>	R	T	Ab	Do	D	Bi	*
25543	Malvaceae	<i>Sida sp1</i>	Si	S,T	Ab+Ad	Do	D	C	Hd
25233	Melastomataceae	<i>Miconia sp1</i>	R	T	Ab	Do	D	Bi	*
26863	Melastomataceae	<i>Tibouchina sp1</i>	Si	S,T,P	Ab+Ad	Do	D	Bi	Id
26843	Myrsinaceae	<i>Myrsine umbellata</i>	R	S,T	Ab	Do	*	C	Ca
25234	Myrtaceae	<i>Myrtyaceae sp1</i>	Si	T	Ab	Do	M	Bi	Ca
26845	Onagraceae	<i>Ludwigia sp1</i>	R	*	Ab+Ad	Do	D	Bi	Hd,Id
26846	Proteaceae	<i>Roupala montana</i>	R	S,T	Ab	Do	M	C	*
26847	Sapindaceae	<i>Sapindaceae sp1</i>	R	S,T	Ab	Do	M	C	*
25545	Scrophulariaceae	<i>Scorpioides dulcis</i>	Si	S,T,P	Ab+Ad	Do	*	C	Hd
26848	Smilacaceae	<i>Smilacaceae sp1</i>	Si	*	Ab	Do	Hm	*	Id

Ab: hipostomática; **Ab+Ad:** anfiestomática; **Bi:** bilateral; **C:** colateral; **Ca:** cavidade; **D:** drusa; **Df:** ducto secretor no lado do floema; **Do:** dorsiventral; **Dx:** ducto secretor no lado do xilema; **Hd:** hidatódio; **Hm:** homogêneo; **Id:** idioblasto; **Is:** isobilateral; **M:** monocristal; **P:** papila; **R:** contorno reto ou levemente ondulado; **S:** tricoma secretor; **Si:** contorno sinuoso; **T:** tricoma tector; * não-visualizado.

Tabela 2. Espécies vegetais coletadas no período de um ano, no Município de Paula Cândido (MG)

nº VIC	Família	Espécie	Epiderme		Estômato		Mesofilo		T.vascular Tipo feixe	Estrutura secretora
			Forma	Indumento	Posição	Tipo	Tipo	Cristais		
26820	Amaranthaceae	<i>Alternanthera brasiliana</i> L.	R	T	Ab+Ad	1	Do	D	C	
26821	Amaranthaceae	<i>Alternanthera</i> sp1	R	T	Ab+Ad	1	Is	D	C	
26879	Asteraceae	<i>Achyroline satureoides</i>	Si	T	Ab	4	Do		C	Hp
25553	Asteraceae	<i>Baccharis dracunculifolia</i>	R	T S	Ab+Ad	5	Do		C	Hm Duf
25256	Asteraceae	<i>Baccharis conyzoides</i>	Si	T S	Ab	4	Do		C	Dux Duf
25288	Asteraceae	<i>Bidens pilosa</i>	Si	T	Ab+Ad	4	Do		C	Hm Duf
25286	Asteraceae	<i>Emilia sonchifolia</i>	Si	T	Ab+Ad	4	Ho		C	Hm Duf
26885	Asteraceae	<i>Eupatorium maximiliane</i>	Si	T S	Ab	4	Do		C	Hm Dux
25556	Asteraceae	<i>Eupatorium</i> sp1	Si	T	Ab+Ad	4	Ho		C	Hm Dux
25555	Asteraceae	<i>Sonchous oleraceus</i>	Si	T	Ab+Ad	4	Do		C	Hm Ca
25257	Asteraceae	<i>Vernonia scorpioides</i>	Si	T S	Ab	4	Do		C	Hm Ca
	Asteraceae	<i>Vernonia</i> sp1	R	T S	Ab	2	Do		C	
26825	Bignoniaceae	<i>Pyrostegia venusta</i>	R	T	Ab	4	Do		C	N
25289	Cupressaceae	<i>Cupressus</i> sp1	R		Ab+Ad		Ho		Ac	Du
25559	Lamiaceae	<i>Ocimum</i> sp1	Si	T S	Ab+Ad	3	Do	D	C	Hm Ca
26829	Lamiaceae	<i>Ocimum</i> sp2	Si	T S	Ab+Ad	3	Do	M D	C	
25560	Leg.Mimosoideae	<i>Stryphnodendron guianense</i>	R	T S	Ab	2	Do	M D	C	
25561	Leg.Mimosoideae	<i>Piptadenia gonacantha</i>	Si	T	Ab+Ad	2	Do	M	C	
26842	Malpighiaceae	<i>Malpighiaceae</i> sp1	R	T S P	Ab	2	Do	D	C	
25568	Malvaceae	<i>Sida rhombifolia</i> L.		T S	Ab+Ad		Do		C	Du
25567	Malvaceae	<i>Sida spinosa</i>		T S	Ab+Ad		Do	D	C	Id,Du
25544	Malvaceae	<i>Sida rhombifolia</i> L.	R	T S	Ab+Ad	1	Do	D	C	Du
	Myrsinaceae	<i>Myrsine umbellata</i>	R	S,T	Ab	?	Do	*	C	Ca
25569	Oxalidaceae	<i>Averrhoa carambola</i> L.	R	T	Ab	2	Do	M	C	
25570	Rosaceae	<i>Eriobotrya japonica</i> Lindl.	R	T	Ab	4	Is Cs	M D	C	Id,Hm
26857	Rubiaceae	<i>Rubiaceae</i> sp1	R	T P	Ab	2	Do		C	
25258	Rubiaceae	<i>Rubiaceae</i> sp2	R	T	Ab	2	Ho		C	
25292	Verbenaceae	<i>Aegiphila selowiana</i>	Si	T	Ab	4	Do	D	C	N
25259	Verbenaceae	<i>Lantana camara</i>	Si	T S	Ab	4	Do		C	

Ab: hipostomática; **Ab+Ad:** anfiestomática; **Ac:** anficrival; **C:** colateral; **Ca:** cavidade; **Cs:** crescimento secundário na nervura central; **D:** drusa; **Do:** dorsiventral; **Du:** ducto secretor; **Duf:** ducto secretor no lado do floema; **Dux:** ducto secretor no lado do xilema; **Ho:** homogêneo; **Hp:** hidatódio no ápice da lâmina foliar; **Hm:** hidatódio na margem da lâmina foliar; **Id:** idioblasto; **Is:** isobilateral; **M:** monocristal; **N:** nectário extrafloral na lâmina foliar; **P:** papila; **R:** contorno reto ou levemente ondulado; **S:** tricoma secretor; **Si:** contorno sinuoso; **T:** tricoma tector; **1:** amisocítico; **2:** paracítico; **3:** diacítico; **4:** anomocítico; **5:** tetracítico; ***** não-visualizado.

Tabela 3. Espécies vegetais coletadas no período de um ano, no Município de Virginópolis (MG)

nº VIC	Família	Espécie	Epiderme		Posição do Estômato	Mesofilo		T.vascular Tipo feixe	Estrutura secretora
			Forma	Indumento		Tipo	Cristais		
26819	Apocynaceae	<i>Apocynaceae sp1</i>	R	T	Ab+Ad	Do	D	Bi	*
26893	Asteraceae	<i>Ageratum fastigiatum</i>	Si	T S	Ab+Ad	Do	*	C	Hd Dx
26889	Asteraceae	<i>Ageratum conyzoides</i>	Si	T S	Ab	Do	*	C	Hd Dx
26878	Asteraceae	<i>Alomia fastigiata</i>	Si	T S	Ab+Ad	Do	*	C	Hd Dx
26904	Asteraceae	<i>Baccharis calvescens</i>	R	T	Ab	Do	*	C	Df
25552	Asteraceae	<i>Baccharis dracunculifolia</i>	R	T S	Ab+Ad	Is	*	C	Df
26925	Asteraceae	<i>Baccharis trimera</i>	R	S	Ab+Ad	Ho	*	C Cs	Df
26886	Asteraceae	<i>Eupatorium squalidum</i> DC.	Si	T S	Ab	Do	*	C	Hd Dx Df
26896	Asteraceae	<i>Vernonia membranaceae</i>	Si	T S	Ab	Do	*	C	*
26900	Asteraceae	<i>Vernonia polyanthes</i> Less.	R	T S	Ab	Do	*	C	Hd La
26899	Asteraceae	<i>Vernonia scorpioides</i>	Si	T S P	Ab+Ad	Do	*	C	Hd
25558	Euphorbiaceae	<i>Euphorbiaceae sp1</i>	R	T	Ab	Do	D	C Es	La
25250	Labiatae	<i>Leonurus sibiricus</i> L.	Si	T S	Ab+Ad	Do	*	C	Ca
26833	Lauraceae	<i>Nectandra rigida</i>	R	T	Ab	Do	*	C	*
25563	Leg.	<i>Leg. Mimosoideae sp1</i>	*	S	*	Do	*	C	*
	Mimosoideae								
26836	Leg.	<i>Phaseolus vulgaris</i>	*	T	Ab+Ad	Do	*	C	*
	Papilionoideae								
25566	Malvaceae	<i>Sida sp1</i>	R	T	Ab+Ad	Do	M	C	*
25262	Myrtaceae	<i>Myrtaceae sp1</i>	*	T	Ab	Do	D	Bi	Ca
25571	Verbenaceae	<i>Lantana sp1</i>	*	T S	Ab	Do	*	C	Hd
25573	Verbenaceae	<i>Stachytarpheta sp1</i>	*	T	Ab	Do	*	C	*
26855	Rubiaceae	<i>Rubiaceae sp1</i>	*	T	Ab	Do	*	C	*

Ab: hipostomática; **Ab+Ad:** anfiestomática; **Bi:** bicolateral; **C:** colateral; **Ca:** cavidade; **Cs:** crescimento secundário na nervura central; **D:** drusa; **Df:** ducto secretor no lado do floema; **Do:** dorsiventral; **Dx:** ducto secretor no lado do xilema; **Es:** esclereídeo; **Hd:** hidatódio; **Ho:** homogêneo; **Is:** isobilateral; **La:** laticífero; **M:** monocristal; **P:** papila; **R:** contorno reto ou levemente ondulado; **S:** tricoma secretor; **Si:** contorno sinuoso; **T:** tricoma tector; * não-visualizado.

Figuras 1 a 3 – Vistas panorâmicas de cortes de amostras de própolis incluídas em metacrilato, oriundas dos três apiários experimentais. 1 – Fragmentos de folhas e tricomas de *Baccharis dracunculifolia* presentes na própolis de Itapecerica. 2 - Fragmentos de folhas e tricomas de *B dracunculifolia* presentes na própolis de Paula Cândido. 3 – Fragmentos de tecido vegetal presentes na própolis de Virginópolis. Du = ducto. Fr = fragmento de folha. Me = mesofilo. Mt = metacrilato. Re = resina. Tq = traqueíde. Tr = tricoma.

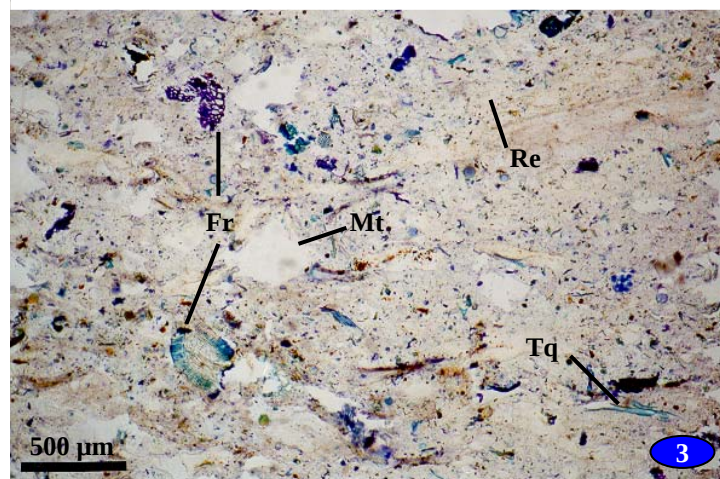
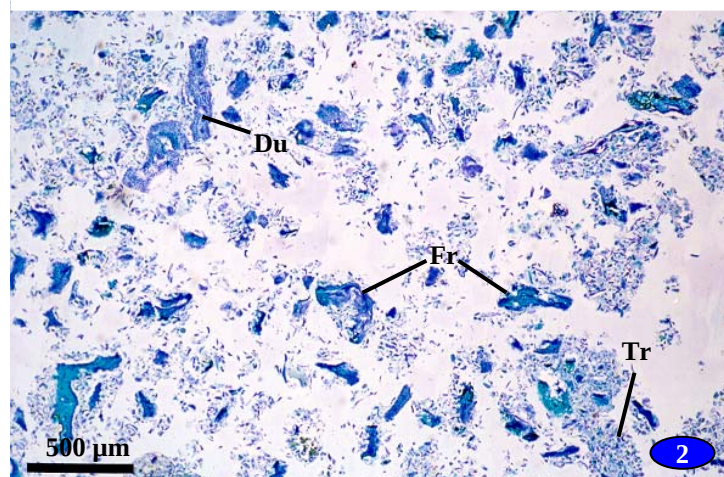
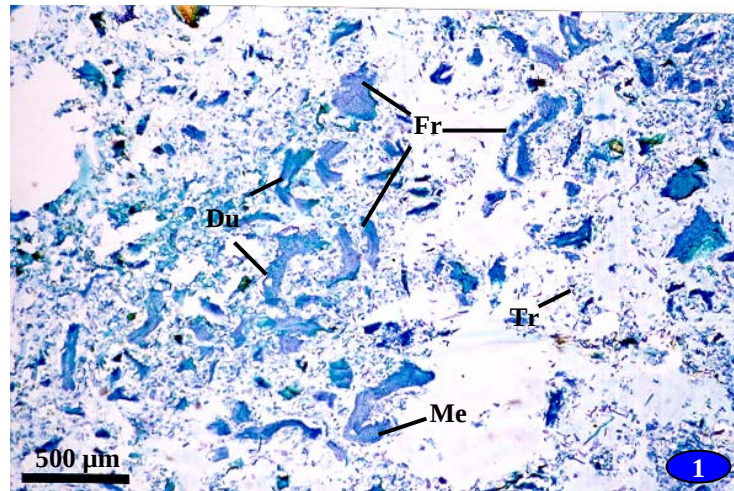


Tabela 4. Características sensoriais das amostras de própolis coletadas no Município de Itapequerica ao longo de um ano

Mês/Ano	Cor	Aroma	Aspecto
Setembro/ 2000	Verde	Muito aromática	Resinosa e quebradiça (não-ressecada)
Outubro/ 2000	Verde	Muito aromática	Resinosa e quebradiça (não-ressecada)
Novembro/ 2000	Verde	Muito aromática	Resinosa e quebradiça (não-ressecada)
Dezembro/ 2000	Verde	Muito aromática	Resinosa e quebradiça (não-ressecada)
Janeiro/ 2001	Verde	Muito aromática	Resinosa e quebradiça (não-ressecada)
Fevereiro/ 2001	Verde	Muito aromática	Resinosa e quebradiça (não-ressecada)
Março/ 2001	Verde	Muito aromática	Resinosa e quebradiça (não-ressecada)
Abril/ 2001	Verde	Muito aromática	Resinosa e quebradiça (não-ressecada)
Maio/ 2001	Verde	Muito aromática	Resinosa e quebradiça (não-ressecada ou ressecada)
Junho/ 2001	Verde na face externa e amarelada ou marrom na face interna	Muito aromática	Resinosa e quebradiça (não-ressecada)
Julho/ 2001	Verde na face externa e amarelada ou marrom na face interna	Muito aromática	Resinosa e quebradiça (não-ressecada)
Agosto/ 2001	Verde na face externa e amarelada ou marrom na face interna	Muito aromática	Resinosa e quebradiça (não-ressecada)

internamente na melgueira e, conseqüentemente, também na própolis depositada nas frestas. Já na época chuvosa, a temperatura ambiente é mais elevada, o que promove a rápida evaporação da água que poderia se acumular internamente na colônia. Assim, a própolis produzida permanece com coloração totalmente verde e muito aromática, características essas compatíveis com a própolis de maior valor comercial, tanto no mercado interno como no externo, principalmente neste último. Ressalte-se que não existe um padrão geral estabelecido pelas empresas que comercializam produtos apícolas para o processo de classificação comercial adotado na avaliação da própolis. Todavia, a própolis cuja coloração é integralmente verde, não-pegajosa e de aroma característico e intenso é prioritariamente escolhida e inserida na categoria classificatória mais elevada do produto.

Avaliação da origem botânica pela análise microscópica da própolis de Itapecerica

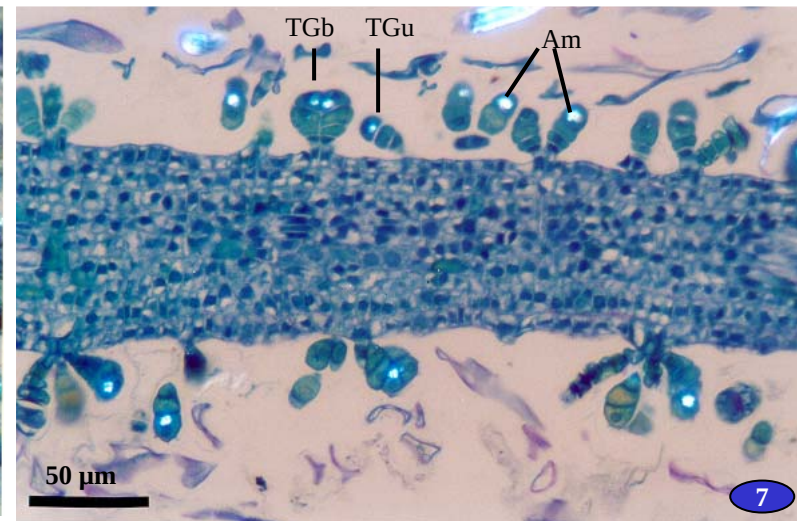
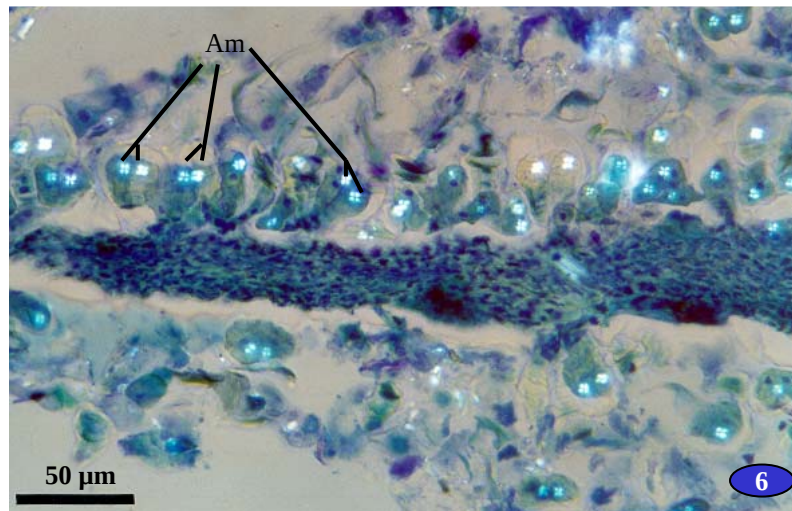
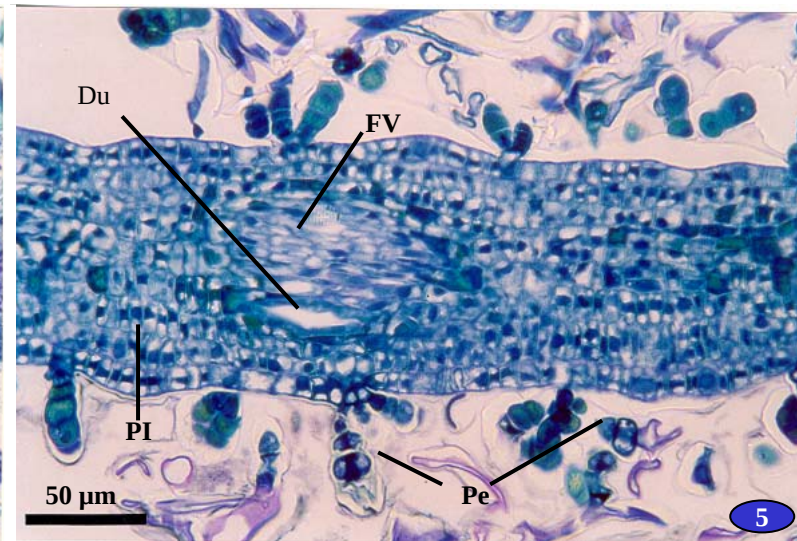
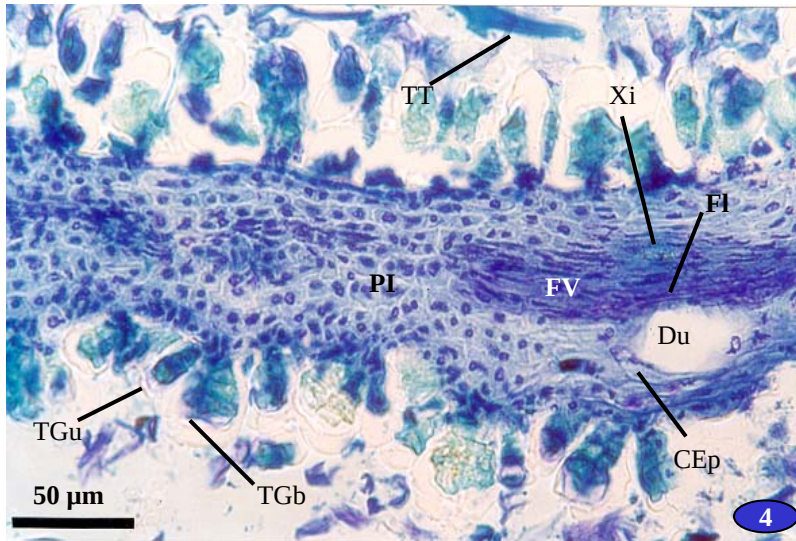
O aspecto panorâmico típico da própolis oriunda de Itapecerica demonstra riqueza de fragmentos grandes de folhas (Figura 1). Dentre os fragmentos, *Baccharis dracunculifolia* foi identificada como a espécie mais abundante e predominante em todas as amostras estudadas dessa região.

Trata-se de uma espécie dióica, arbustiva, lenhosa, de até quatro metros de altura. É comum em áreas de cerrado, pastagens abandonadas e áreas em processo de sucessão (Araújo et al., 1995). A grande concentração de espécies de *Baccharis* encontradas no Brasil e Montanhas Andinas indicam essas áreas como centro de origem do gênero (Boldt, 1989). Anatomicamente, *B. dracunculifolia* apresenta dois tipos de tricomas secretores (uni e bisseriados), um tipo de tricoma tector e ductos voltados para o floema. Observa-se a forma freqüente com que os tricomas tectores aparecem parcialmente destruídos, presos ou não aos seus respectivos pedúnculos.

Outra característica marcante é o estágio de desenvolvimento jovem dos fragmentos. As células do mesofilo encontram-se meristemáticas e o parênquima clorofiliano não está diferenciado (Figura 4). Essas características anatômicas foram confirmadas pela análise do laminário de referência (Figura 5) e estão de acordo com os registros da literatura para a espécie (Castro, 1987).

Grãos de amido foram visualizados em luz polarizada, como estruturas brilhantes nas células apicais dos tricomas glandulares de *B. dracunculifolia* nas amostras de própolis (Figura 6). Tais estruturas foram confirmadas tanto no laminário

Figuras 4 a 7 – Cortes de amostras de própolis originária de Itapecerica incluídas em metacrilato e cortes histológicos de folha de *B. dracunculifolia*. 4 e 6 – Fragmento de folha de *B. dracunculifolia* em própolis em luz comum e em luz polarizada, respectivamente. 5 e 7 - Fragmento de folha de *B. dracunculifolia*, em luz comum e em luz polarizada, respectivamente. Am = amido. CEp = célula epitelial. Du = ducto. Fl = floema. FV = feixe vascular. Pe = pedúnculo. TGb = tricoma glandular biseriado. TGu = Tricoma glandular uniseriado. TT = tricoma tector. Xi = xilema.



obtido com ápices foliares incluídos em metacrilato (Figura 7), quanto naquele obtido por cortes no micrótomo de mesa. Esse registro é inédito para *B. dracunculifolia*, podendo constituir-se em um caráter adicional na identificação desse táxon e de utilidade na distinção de espécies de *Baccharis* presentes na própolis. Hidatódios puderam também ser visualizados (Figura 8).

Nas pesquisas sobre a origem botânica da própolis descritas na literatura nunca se enfatizou a presença de grãos de amido nas células apicais dos tricomas secretores, mesmo quando a presença de *Baccharis dracunculifolia* era enfatizada. Esse fato demonstra um aspecto positivo quanto à utilização do uso da microscopia de luz polarizada como recurso nessas análises.

Outras espécies foram identificadas, entretanto, os fragmentos foram menos incidentes nas amostras dessa região.

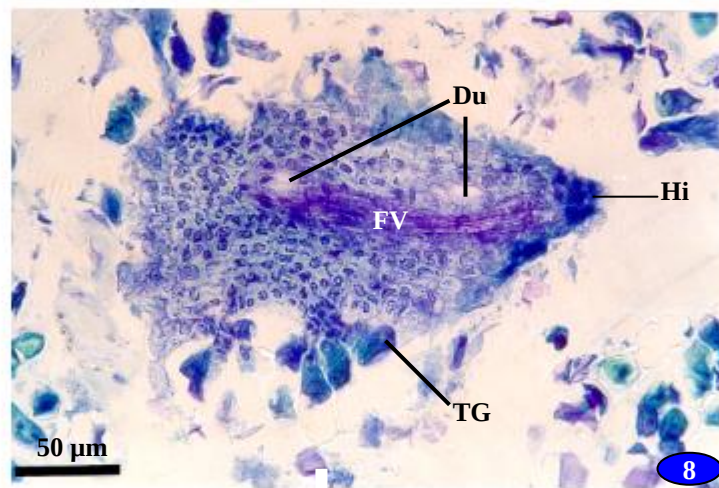
Fragmentos de *Baccharis calvescens* também estavam presentes (Figura 9). A espécie se caracteriza por apresentar mesofilo diferenciado, cujas células do parênquima paliádico e lacunoso são distintas, grandes ductos voltados para o floema são evidentes e na epiderme os tricomas são pouco freqüentes (Figura 10). As estruturas anatômicas observadas já foram descritas em trabalhos anteriores (Claro, 1994).

Foi identificado apenas um fragmento de *Baccharis trimera* nas amostras analisadas, tratando-se de um fragmento de caule que apresenta epiderme unisseriada, tecido de sustentação subepidérmico e um pequeno ducto voltado para a porção central (Figura 11). Essas características foram confirmadas pelo laminário de referência (Figura 12). Trata-se de espécie denominada popularmente de carqueja, a qual apresenta caule fotossintetizante e folhas muito reduzidas. A relevância do registro de apenas um fragmento quanto à contribuição para a composição do produto é questionável. Todavia, essa constatação informa a possibilidade de coleta de fragmentos dessa espécie por *A. mellifera* para produção de própolis. A constatação de coleta na região do caule principal, considerando-se a limitada força das mandíbulas das abelhas, sugere que esse fragmento seja advindo de região meristemática caulinar, por ser mais tenra.

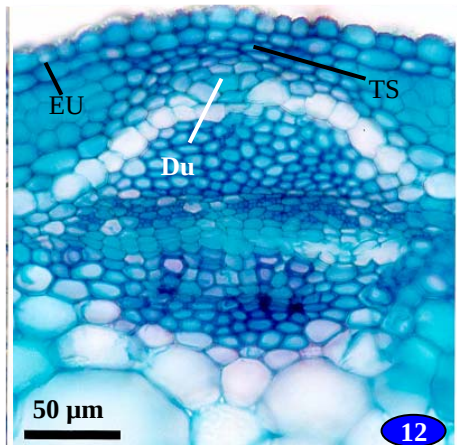
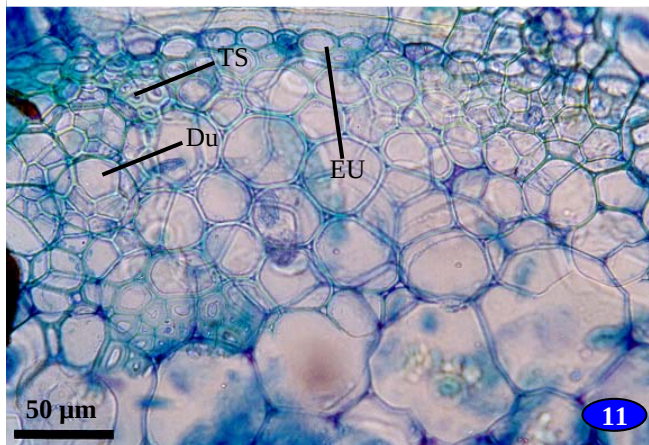
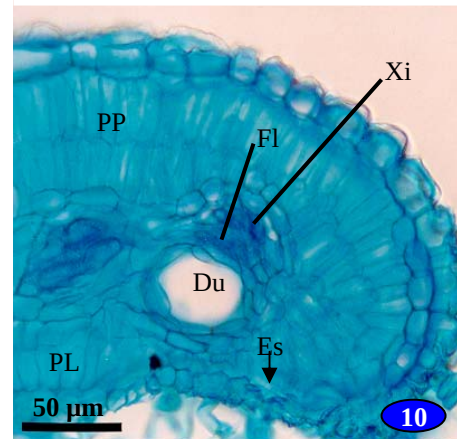
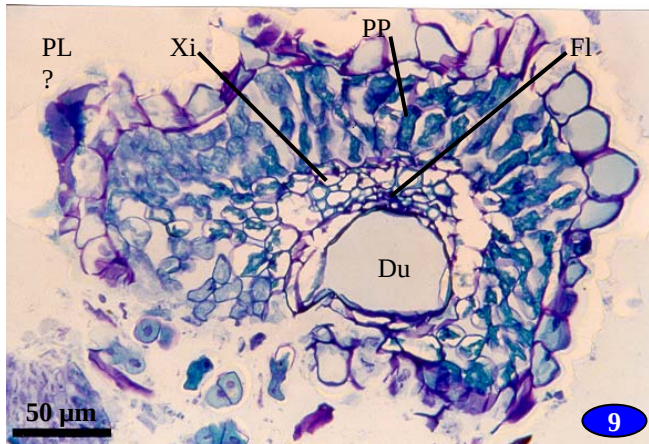
Myrsine umbellata foi identificada em função da presença de ductos secretores próximos à epiderme e idioblastos cristalíferos contendo drusas, que foram visualizadas em luz polarizada (Figura 13). Esses caracteres foram confirmados pelo laminário de referência (Figuras 14, 15 e 16).

Tricomas secretores dessa espécie não foram visualizados nas amostras de própolis analisadas, possivelmente devido à sua fragmentação na superfície epidérmica.

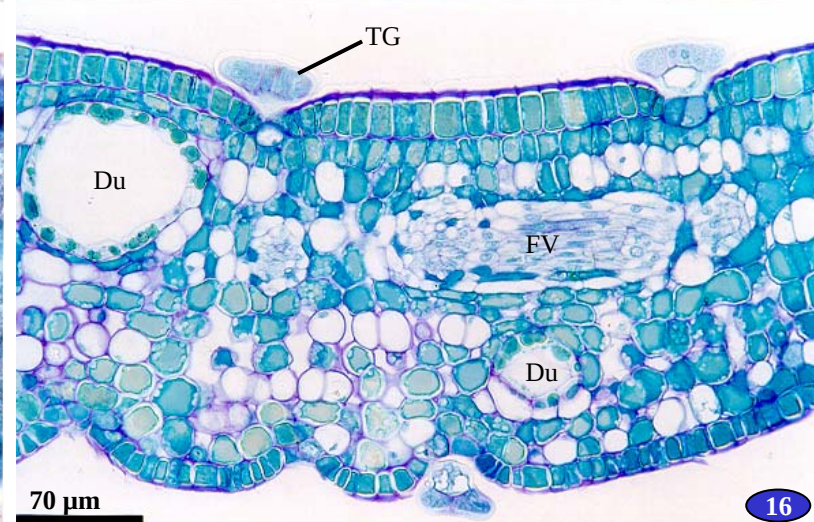
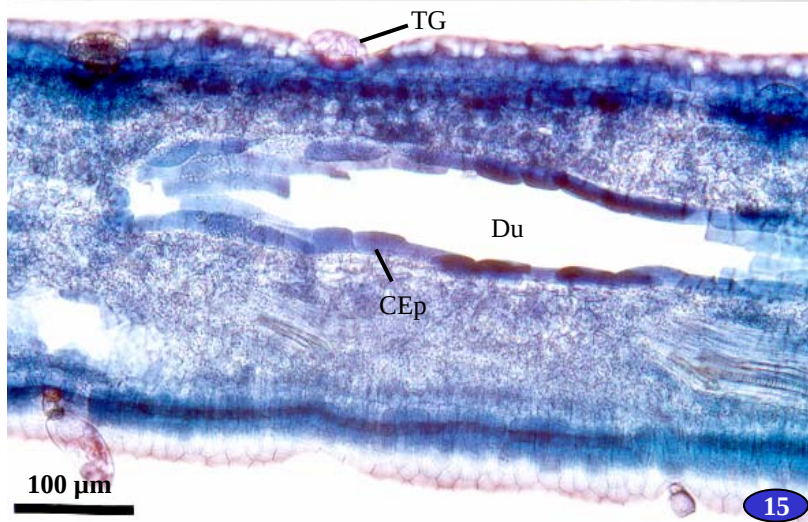
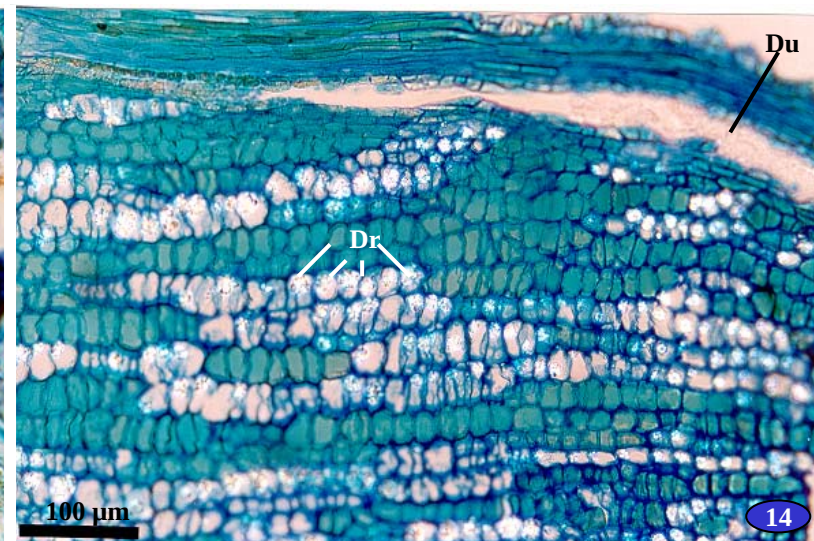
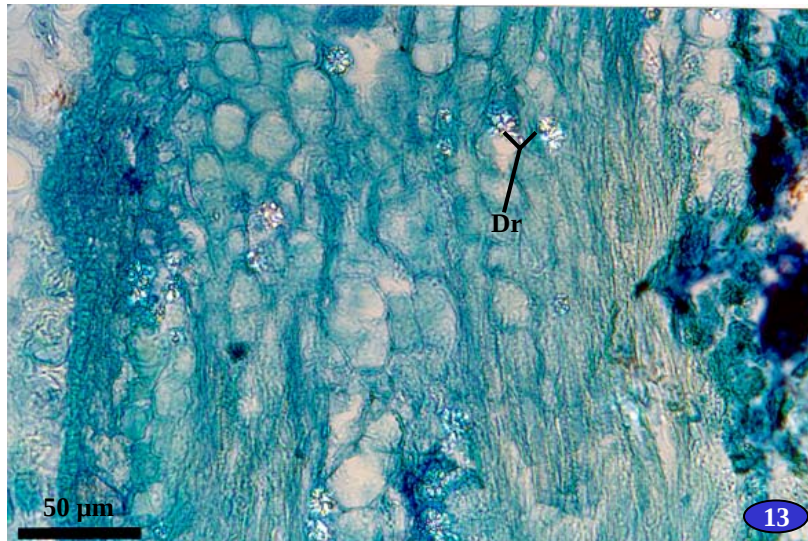
Figuras 8 – Corte da própolis de Itapecerica incluída em metacrilato, evidenciando um hidatódio em folha de *B. dracunculifolia*. Du = ducto. Hi = hidatódio. TG = tricoma glandular.



Figuras 9 a 12 – Cortes de amostras de própolis incluídas em metacrilato e cortes histológicos de espécies de *Baccharis*. 9 – Fragmento de folha de *B. calvescens* em própolis de Itapecerica. 10 - Corte a mão livre da folha de *B. calvescens*. 11 - Fragmento de folha de *B. trimera* em própolis de Itapecerica. 12 - Seção transversal de caule de *B. trimera*, corte a mão livre. Du = ducto. Es = estômato. EU = epiderme uniseriada. Fl = floema. PP = parênquima paliçádico. TS = tecido de sustentação. Xi = xilema.



Figuras 13 a 16 – Cortes de amostras de própolis e cortes histológicos de folha de *Myrsine umbellata*, incluídos em metacrilato. 13 – Fragmento de folha de *M. umbellata* em própolis de Itapecerica, incluída em metacrilato. MAG. 100x. 11- Fragmento de folha de *M. umbellata*, incluída em metacrilato. MAG. 50x. 12 – Seção longitudinal de folha de *M. umbellata*, corte a mão livre. MAG. 50x. 13 - Seção transversal de folha de *M. umbellata* incluída em metacrilato. MAG. 75x. CEp= célula epitelial. Du = ducto. Dr = drusa. FV = feixe vascular. TG = tricoma glandular.



A presença de fragmentos de *Myrsine umbellata* na própolis não havia sido anteriormente descrita e as características anatômicas observadas sugerem importante contribuição em termos de constituintes químicos advindos dessa espécie, em função das características apresentadas pelas estruturas secretoras internas e externas observadas no laminário de referência (Figuras 15 e 16).

Embora se encontrem descritas na literatura estruturas secretoras do gênero *Myrsine* (Solereder, 1908, Metcalfe e Chalk, 1950, Fahn, 1979) e de *M. umbellata* (Otegui e Maldonado, 1999), tais estudos contemplaram unicamente avaliações morfológicas e anatômicas. Não foram encontrados trabalhos que abordem especificamente a natureza química dos constituintes presentes em *M. umbellata*.

As características apresentadas pelas estruturas secretoras internas e externas observadas no laminário de referência para *M. umbellata* (Figura 15) indicam que o potencial resinífero da espécie não deve ser negligenciado.

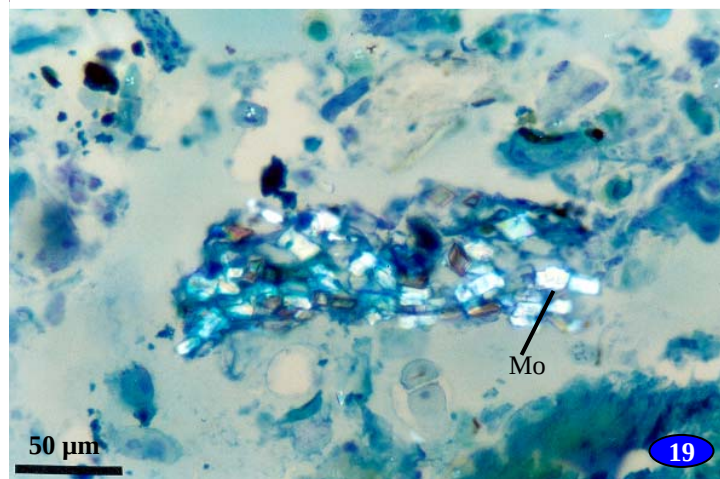
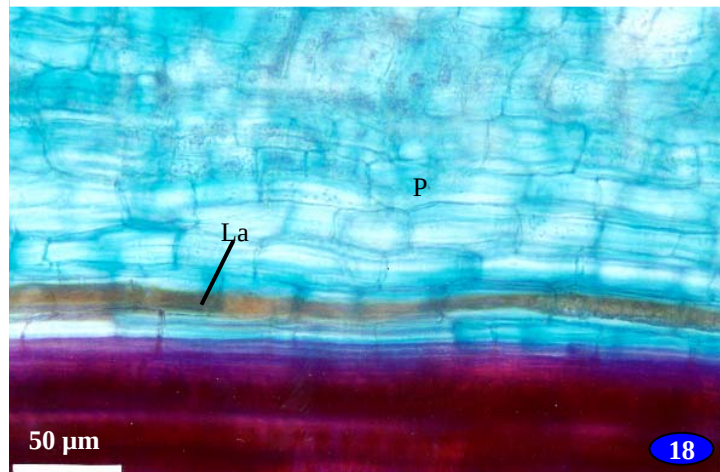
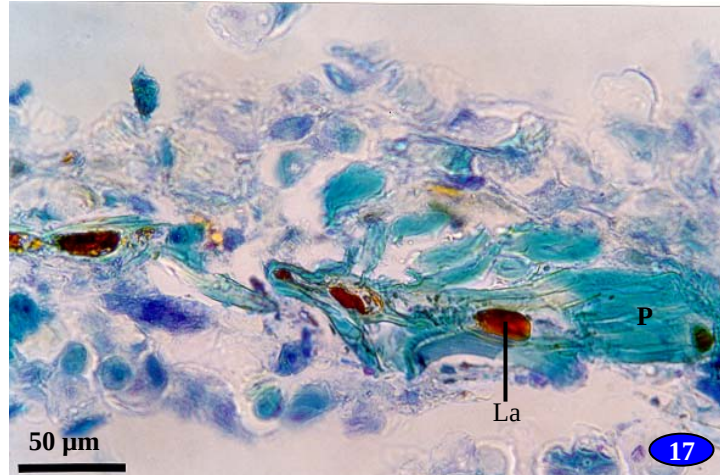
Fragmentos com laticíferos (Figura 17) semelhantes aos observados no laminário de referência em *Vernonia polyanthes* (Figura 18) foram também encontrados. No entanto, designou-se esse tipo de fragmento como tipo morfológico A, em função da escassez de características anatômicas passíveis de análise. Foi observado um fragmento também não identificado, designado tipo morfológico B, constituído por células repletas de monocristais visualizados em polarização (Figura 19).

Fica claro que, embora as amostras tenham apresentado, durante a maior parte do ano, características sensoriais compatíveis com aquelas enaltecidas pelo mercado de própolis, houve contribuição de outras espécies vegetais, além de *B. dracunculifolia*, contribuição esta que não pode ser desprezada. Tais fragmentos, apesar de presentes em menor incidência, quando comparados aos de *B. dracunculifolia*, comprovam a necessidade de avaliações mais criteriosas para a averiguação das espécies que constituem a própolis.

Os resultados ora apresentados confirmam a preferência das abelhas em coletar *B. dracunculifolia*, especialmente por ser uma espécie abundante na vegetação dessa região.

Bastos (2001), estudando amostras de própolis também produzidas em Minas Gerais, pelo do procedimento analítico proposto por Warakomska e Maciejewicz (1992), confirmou que a própolis verde das localidades avaliadas originaram-se de *B. dracunculifolia*, por possuírem inúmeros fragmentos dessa planta em seu sedimento. Essa confirmação foi realizada por meio de estudo anatômico, utilizando microscopia

Figuras 17 a 19 – Cortes de amostras de própolis de Itapecerica incluídas em metacrilato e corte histológico de folha de *Vernonia polyanthes*. 17 – Fragmento de tecido vegetal contendo laticíferos na própolis. 18- Seção longitudinal de folha de *V. polyanthes*, corte a mão livre. 19 – Fragmento de tecido vegetal contendo monocristais na própolis. La = laticífero. Mo = monocristais. P = parênquima.



fotônica e microscopia eletrônica de varredura. Segundo a autora, a própolis verde e de aspecto resinoso e quebradiço apresenta em sua análise microscópica 90 a 100% de fragmentos epidérmicos, tricomas glandulares e tectores somados e até 1% de outras fontes resiníferas. Índices maiores que 1% de estruturas de *Vernonia polyanthes* alteram, segundo a autora, a coloração e o aspecto das amostras. Amostras de própolis com fragmentos de *V. polyanthes*, escamas de *Vellozia* spp. e/ou elementos de periderme, apresentavam coloração escura e aspecto pegajoso.

Tal afirmação não condiz com os resultados ora obtidos, pois o aspecto da própolis verde analisada se manteve constante, mesmo havendo contribuição de outras espécies, apesar de não terem sido feitas avaliações quantitativas nessa pesquisa, quanto ao número de tricomas presentes. Argumentos foram levantados, qualificando como imprecisos os procedimentos que procuram quantificar estruturas morfológicas em análises de própolis, o que dificultaria interpretações sobre a contribuição relativa de cada espécie na composição do produto (Freire, 2000). Uma das dificuldades observadas pelo autor, o qual também utilizou técnica analítica baseada na proposta de Warakomska e Maciejewicz (1992) para analisar própolis de regiões de cerrado de Minas Gerais, foi o fato de haver adensamentos de tricomas tectores e glandulares no sedimento analisado, os quais atingiam freqüentemente mais de um plano de visualização na lâmina, dificultando sobremaneira a contagem. Ainda nesse tipo de análise, há que se considerar que tais estruturas encontram-se, muitas vezes, fragmentadas, principalmente os tricomas tectores em função de sua extensão e fragilidade. Outra questão pertinente a essa abordagem diz respeito à possibilidade de diferenças quantitativas quanto ao número das estruturas presentes na superfície epidérmica, não só de *Baccharis* como de inúmeras espécies que as possuem. Variações expressivas podem ocorrer, em função de fatores ambientais adversos, envolvendo, segundo Uphof (1962), aspectos tanto fisiológicos como ecológicos (manutenção de umidade, proteção contra luminosidade excessiva e herbivoria, dentre outros). Esses conhecimentos sugerem a necessidade de ponderações e avaliações críticas quanto à possibilidade de sub ou superestimativas em que se possa incorrer, ao adotar-se o critério de contagem de tricomas para o estabelecimento de interpretações sobre a contribuição de espécies vegetais na composição da própolis.

Analogamente à presença de fragmentos de *M. umbellata*, *Baccharis calvescens* também não havia sido anteriormente descrita como fonte de própolis. Certamente, a possibilidade de avaliações anatômicas mais detalhadas proporcionadas pela técnica

analítica utilizada foi fator preponderante para essas constatações. Algumas das características mais marcantes na diferenciação de tais fragmentos em relação aos de *B. dracunculifolia*, são aquelas apresentadas pela epiderme foliar que é papilosa e apresenta escassez de tricomas. Outra característica diferencial está associada ao mesofilo, que em *B. calvescens* é dorsiventral e em *B. dracunculifolia* é isobilateral, todavia, essa característica só pode ser observada quando cortes são efetuados em regiões de ductos.

A coleta de fragmentos de *B. trimera* pelas abelhas só foi observada no mês de março de 2001, sendo portanto ocasional.

Os resultados apresentados comprovam informações que constam na literatura quanto à preferência de coleta de ápices de *B. dracunculifolia*, por abelhas *A. mellifera* africanizadas para produção de própolis no Brasil, em regiões onde essa espécie vegetal é freqüente.

Também Freire (2000), analisando amostras de própolis provenientes de Itapecerica produzidas em agosto, setembro e outubro, observou tricomas tectores, tricomas glandulares e ápices foliares com ductos, todos caracteristicamente pertencentes a *B. dracunculifolia*, não tendo sido mencionada a origem da resina que constituiria a própolis, no que diz respeito às estruturas secretoras citadas. Pela técnica de Warakomska e Maciejewicz (1992), modificada, o autor identificou, além dos fragmentos de *B. dracunculifolia*, fragmentos de *Vernonia*. Fragmentos de outras espécies não foram identificados, provavelmente em função das limitações proporcionadas pela técnica utilizada.

Bastos (2001) afirmou que a coleta de resinas dos ápices vegetativos de *B. dracunculifolia* é feita pelas abelhas quando a planta não está em floração. Ademais, a autora concluiu que os grãos de pólen presentes nas amostras de própolis, além de indicarem a origem geográfica, podem ser utilizados como marcadores para elucidação das possíveis fontes de resina (no estudo foram indicados, além de *Baccharis dracunculifolia*, *Astronium* spp., *Eucalyptus* sp., *Hyptis* sp. e *Vernonia polyantes*).

Já em 1932, Jungkunz, citado por Ghisalberti (1979), ao conduzir o primeiro estudo sobre pólen encontrado na fração insolúvel de amostras de própolis, não concluiu a origem do produto em função dos tipos polínicos encontrados, muito embora tenha constatado a presença de pólen das leguminosas *Lupinus*, *Onobrychis* e *Robinia*. Quase cinco décadas depois, D'Albore (1979) constatou ser possível utilizar esse elemento como indicativo da origem geográfica do produto e, para Barth et al. (1999), em alguns

casos também da origem florística e estacional das amostras. Na interpretação desses autores, o pólen presente na própolis pode ter três origens: (a) vir com o vento, aderindo à resina das exsudações vegetais; (b) estar presente como contaminante, colhido em separado pelas abelhas para armazenamento dentro da colméia; (c) estar aderido ao corpo das abelhas durante trabalhos de campo ou mesmo no interior da colméia.

Exceto quando ocorrem secreções resinosas em estruturas florais, conforme demonstrado por Thomás-Barberán et al. (1993) para *Clusia minor* e *Clusia major*, é possível realmente utilizar a análise polínica da própolis como uma das ferramentas para averiguação da sua origem botânica. Até o momento, tal caso constitui exceção, pois, em geral, os polens presentes na própolis representam contaminações de diversas origens, conforme já mencionado em diversos estudos e detalhado por D'Albore (1979), Barth (1998) e Barth et al. (1999).

Embora com menor frequência, observações de campo efetuadas nesta pesquisa comprovaram que *A. mellifera* também faz coleta em primórdios foliares de *B. dracunculifolia* durante a floração. A diminuição na frequência de visita para coleta ocorre, provavelmente, em função da considerável queda de disponibilidade de ápices foliares, já que houve indução dos meristemas para formação de flores, em detrimento de crescimento vegetativo do indivíduo.

Diante desse fato, não se deve descartar a possibilidade de modificações no perfil químico da própolis produzida em época de floração de *B. dracunculifolia*, seja por mudanças no padrão de alocação de metabólitos secundários durante esse período ou mesmo pela coleta de matéria-prima em outras fontes vegetais mais disponíveis no momento, as quais garantiriam maior otimização na busca do recurso em questão, significando redução de custo com maximização de benefícios para o inseto.

Mann (1987) sugeriu que as rotas metabólicas dos compostos secundários são ativadas, possivelmente, durante alguns estágios particulares de crescimento e de desenvolvimento dos vegetais. De acordo com Robbers et al. (1996), além da ontogenia, fatores como hereditariedade e ambiente influenciam processos de biossíntese, transporte, estocagem e degradação de compostos secundários.

Com relação à presença dos diferentes tipos de fragmentos vegetais presentes nas amostras de própolis coletadas ao longo do ano, apenas fragmentos de *B. dracunculifolia* (com maior incidência) e de *B. calvescens* (com menor incidência) estavam presentes em todos os meses. Fragmentos de *M. umbellata* só foram observados nos meses de fevereiro, setembro e dezembro. Já aquele característico de *B.*

trimera só foi visualizado na própolis obtida no mês de março. O tipo morfológico A esteve presente unicamente no mês de fevereiro. Essas observações demonstram que a coloração amarela ou marrom da face interna da própolis produzida nos meses de junho, julho e agosto não é consequência da contribuição de novas fontes vegetais, já que nessa época observou-se presença apenas de fragmentos de *B. dracunculifolia* e de *B. calvenscens*. Tal fato comprova que conclusões acerca da origem da própolis baseadas principalmente em avaliações sensoriais podem ser equivocadas. Nesses meses o aroma permaneceu característico, embora menos exacerbado e a maleabilidade se manteve.

A amostra composta confeccionada com própolis produzida ao longo do ano mostrou-se representativa, já que os diferentes fragmentos observados mês a mês foram visualizados na análise microscópica.

Caracterização da vegetação de Paula Cândido

É uma região com predomínio de fragmentos de Floresta Estacional Semidecidual Montana, com porções alteradas por ação antrópica nas bordas desses fragmentos, que se encontram em fase inicial de sucessão.

Caracterização organoléptica da própolis de Paula Cândido

Embora nesse apiário tenha predominado a produção de própolis de coloração verde, aromática e quebradiça não-ressecada à temperatura ambiente, as amostras apresentaram características diferenciadas em alguns meses, conforme apresentado na Tabela 5. Observaram-se variações no período de janeiro a julho. Assim como descrito e discutido para a região de Itapecerica, na época de inverno a própolis apresentou-se com a face interna amarelada. Diferenças sutis quanto à diminuição na intensidade da coloração verde e do aroma das amostras foram constatadas fora da época de inverno, quando comparada à própolis de Itapecerica produzida na mesma época.

Tabela 5. Características sensoriais das amostras de própolis coletadas no Município de Paula Cândido ao longo de um ano

Mês/Ano	Cor	Aroma	Aspecto
Setembro/ 2000	Verde	Aromática	Resinosa e quebradiça (não-ressecada)
Outubro/ 2000	Verde	Muito aromática	Resinosa e quebradiça (não-ressecada)
Novembro/ 2000	Verde	Muito aromática	Resinosa e quebradiça (não-ressecada)
Dezembro/ 2000	Verde	Muito aromática	Resinosa e quebradiça (não-ressecada)
Janeiro/ 2001	Verde ou marrom	Muito aromática ou pouco aromática	Resinosa e quebradiça (não-ressecada) ou pegajosa
Fevereiro/ 2001	Verde na face externa e amarelada na face interna	Aromática	Resinosa e quebradiça (não-ressecada)
Março/ 2001	Verde	Muito aromática	Resinosa e quebradiça (não-ressecada)
Abril/ 2001	Verde, marrom ou avermelhada	Muito aromática ou aromática	Resinosa e quebradiça (não-ressecada)
Maió/ 2001	Verde na face externa e amarelada na face interna	Aromática	Resinosa e quebradiça (não-ressecada ou ressecada)
Junho/ 2001	Parda, marrom ou avermelhada	Aromática	Resinosa e quebradiça (ressecada)
Julho/ 2001	Verde ou marrom	Muito aromática ou pouco aromática	Resinosa e quebradiça (não-ressecada) ou pegajosa
Agosto/ 2001	Verde	Muito aromática	Resinosa e quebradiça (não-ressecada)

Avaliação da origem botânica pela análise microscópica da própolis de Paula Cândido

Na própolis dessa região, apesar das pequenas diferenças de cor ocorridas no início do inverno, houve predominância de fragmentos de primórdios foliares de *B. dracunculifolia*, na amostra composta confeccionada e analisada (Figura 2). *B. dracunculifolia* é abundante na vegetação da região, porém em menor intensidade do

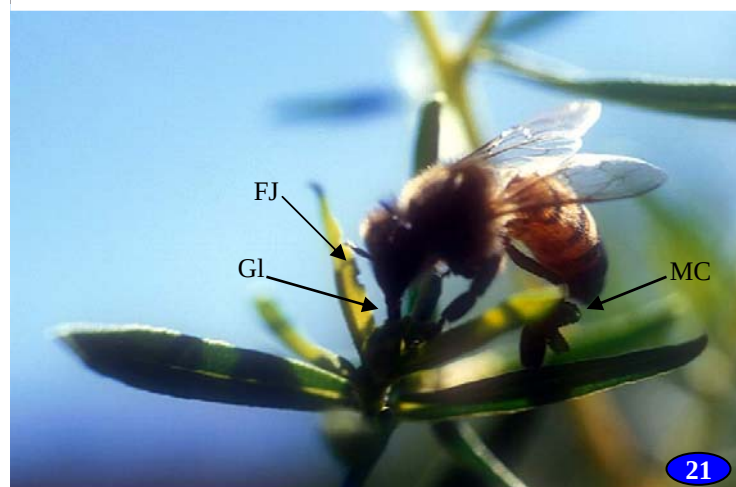
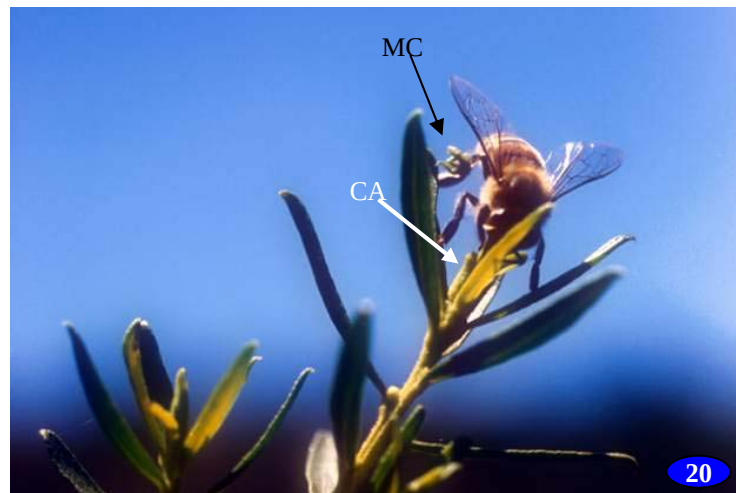
que na região de Itapecerica, embora não tenha sido elaborado um censo quanto à densidade da espécie por área.

Documentou-se a coleta de ápices foliares de *B. dracunculifolia* pelas abelhas para produção de própolis, tanto por meio de registros fotográficos (Figuras 20 e 21) como de filmagens. Observou-se que as abelhas apresentavam comportamento seletivo quanto à escolha do ápice a ser coletado, tanto em plantas masculinas como em plantas femininas. Ápices completamente íntegros e viçosos eram muitas vezes rejeitados, em detrimento da escolha de outros de aparência semelhante. Fatores semioquímicos parecem estar envolvidos nesse processo, já que o procedimento de escolha ocorria após o inseto tocar os ápices com suas antenas por alguns segundos. Provavelmente, esse comportamento seja acionado pelas estruturas sensoriais presentes nas antenas das abelhas, as quais apresentam considerável capacidade de percepção olfativa.

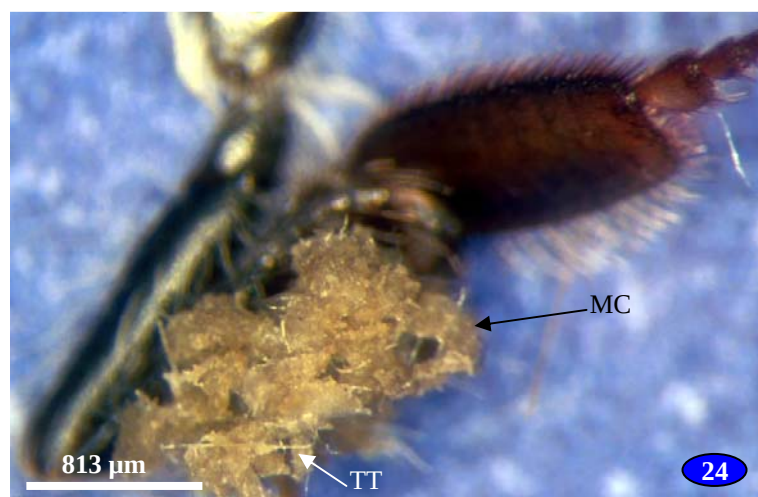
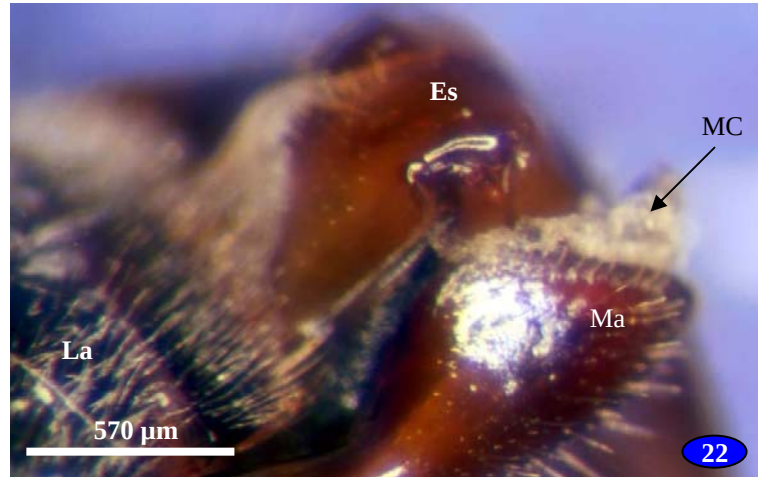
Sabe-se que óleos voláteis são importantes constituintes químicos de *Baccharis*, um gênero amplamente estudado do ponto de vista químico (Labbe et al., 1986, Zdero et al., 1986, Weyerstahl et al., 1995a, b, Loayza et al., 1995). Os óleos voláteis são utilizados até mesmo para fins de Sistemática, conforme estudo conduzido no Brasil por Ferracini e Paraíba (1985), incluindo sete espécies de *Baccharis*. Certamente, a volatilização desses constituintes está envolvida no processo de atração das abelhas. Constatações de Santos (1996) e de Pires et al. (2002) comprovam maior frequência de coleta em horários mais quentes do dia. Em estudo desenvolvido recentemente na mesma localidade (Paula Cândido), Pires et al. (2002), ao monitorarem 60 plantas marcadas, 30 de cada sexo, observaram que há diferença na preferência entre plantas masculinas e femininas de *B. dracunculifolia* na coleta de ápices foliares pelas abelhas: 55,9% e 44,1% de abelhas, respectivamente. Estudos devem ser conduzidos para que se confirmem tais resultados, associando-os a avaliações fitoquímicas.

O tempo gasto pelas abelhas desde o início da coleta até a deposição do material coletado nas corbículas era de aproximadamente sete minutos. O comportamento de coleta observado foi condizente com os já descritos na literatura, para coleta de resinas ou ápices de *Populus* (Meyer, 1956, Catorini, 1963, Gary, 1993) e de *B. dracunculifolia* (Bastos, 2001), com pequenas variações e mais detalhamento: as abelhas cortam com as mandíbulas fragmentos dos ápices vegetativos apicais (Figura 22) e, com o auxílio do primeiro par de patas, transferem esses fragmentos para as patas medianas (Figura 23) e em seguida para as corbículas opostas (Figura 24). Eventualmente, esse movimento de

Figuras 20 e 21 – *Apis mellifera* (africanizadas) coletando ápices vegetativos de *Baccharis dracunculifolia* em Paula Cândido. AI = ápice íntegro. CA = coleta de ápice. FJ = folha jovem. Gl = glossa. MC = material coletado.



Figuras 22 a 24 – Fragmentos de ápices vegetativos apicais de *Baccharis dracunculifolia* aderidos em diferentes estruturas anatômicas de *Apis mellifera* (africanizadas), durante o procedimento de coleta, observados em microscópio estereoscópico. 22 – Fragmentos de ápice vegetativo de *B. dracunculifolia* aderidos à mandíbula. Aumento 64x. 23 - Fragmentos de ápice vegetativo de *B. dracunculifolia* aderidos à região tarsal da pata mediana. Aumento 32x. 24 – Fragmentos de ápice vegetativo de *B. dracunculifolia* aderidos à corbícula. Aumento 20x Es = estipe. La = labro. Ma = mandíbula. MC = material coletado. Co = corbícula. TT = tricoma tector.



transferência das patas medianas ocorre para as corbículas do mesmo lado. Raramente a transferência do material ocorre diretamente do primeiro par de patas para as corbículas.

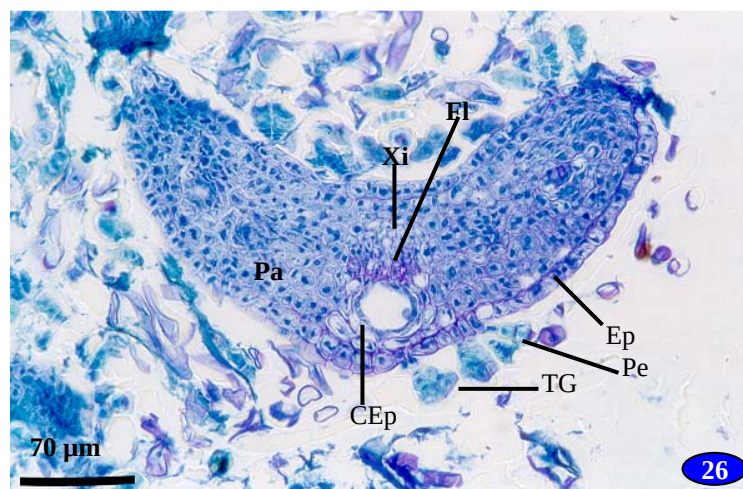
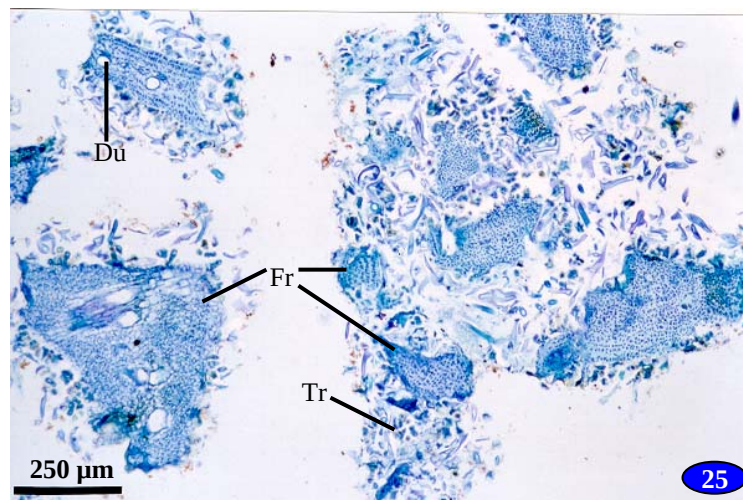
Os fragmentos apresentavam consistência pegajosa, quando presentes nas mandíbulas, desde o início da coleta, o que induz ao raciocínio de que já ocorre extravasamento de substâncias resinosas advindas de estruturas secretoras externas (tricomas) e também internas (ductos). As Figuras 25 e 26 ilustram a intensidade de fragmentação do material depositado nas corbículas, demonstrando haver cortes também na região dos ductos.

A fragmentação promovida pelas mandíbulas das abelhas se dá desde o início do processo de coleta dos ápices foliares de *B. dracunculifolia*, havendo repetidos movimentos de compactação do material coletado pelas abelhas, tanto durante a sua deposição nas corbículas, como posteriormente na transferência e deposição na colméia. O aspecto de fragmentação do material coletado é praticamente o mesmo, quando avaliado em microscopia de luz, desde o início desse processo até o seu término (Figuras 25 e 26).

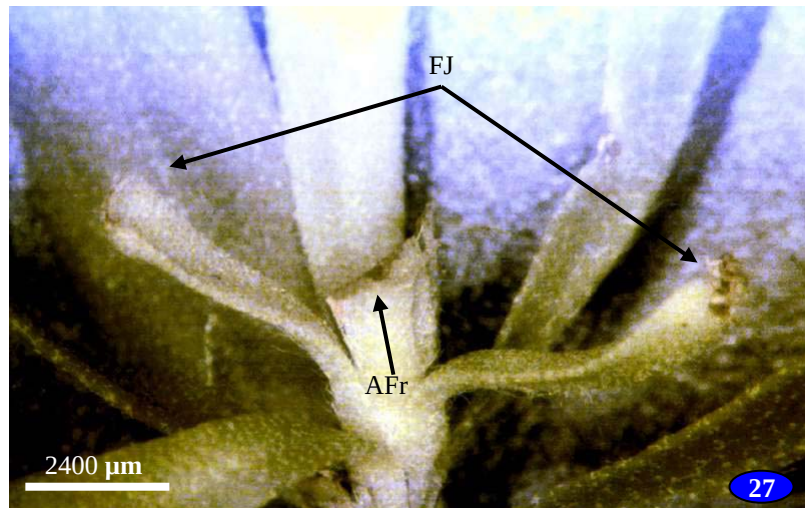
Oliveira e Bastos (1998), ao desenvolverem estudos morfo-anatômicos da folha de *B. dracunculifolia*, visando à identificação da origem botânica da própolis, observaram tricomas glandulares e tectores dessa espécie presentes nos sedimentos de própolis analisados, não sendo encontrados fragmentos foliares com feixes vasculares ou canais secretores desenvolvidos. Por conseguinte, as autoras concluíram que as abelhas coletaram resinas produzidas por tricomas glandulares localizados em ápices vegetativos. Tais afirmações não condizem com as observações deste estudo. Grande parte do conteúdo amorfo que aparece invariavelmente em todas as amostras analisadas da região em pauta provém, certamente, do extravasamento do conteúdo resinífero que ocorre após a fragmentação de estruturas secretoras não só externas (tricomas glandulares) como também internas (ductos).

Ao final da coleta, os ápices encontram-se, em geral, completamente dilacerados, conforme pode ser observado na Figura 27. Ao lado do ápice recém coletado, é possível observar que houve coleta também nas bordas de lâminas foliares muito jovens, região onde se situam os hidatódios. Segundo Castro (1987), essas estruturas secretoras se localizam, principalmente, no terço superior das lâminas foliares. Maior frequência de coleta em lâminas muito jovens foram observadas em épocas de menor disponibilidade de ápices foliares.

Figuras 25 e 26 – Cortes de fragmentos de ápices foliares de *B. dracunculifolia*, depositados na corbícula de abelha *A. mellifera* (africanizada), incluídos em metacrilato. 25 – vista geral de fragmentos de primórdios foliares de *B. dracunculifolia* depositados na corbícula. 26- Seção transversal de região de nervura central de folha de *B. dracunculifolia* de material depositado na corbícula. CEp = célula epitelial. Du = ducto. Ep = epiderme. Fl = floema. Fr = fragmento foliar. Pa = parênquima. Tr = tricomas. Pe = pedúnculo.



Figuras 27 e 28 –Ápice foliar de *B. dracunculifolia* após fragmentação ocorrida no processo de coleta pela abelha e ramo de planta de *B. dracunculifolia* intensamente visitada. 27 – aspecto de ápice foliar e folhas jovens de *B. dracunculifolia* após coleta para produção de própolis, observados em microcópio estereoscópico. Aumento 10,08x. 28- Aspecto de ramificação apresentado por planta de *B. dracunculifolia* intensamente visitada. AFr = ápice fragmentado. FJ = folha jovem. GA = gemas apicais.

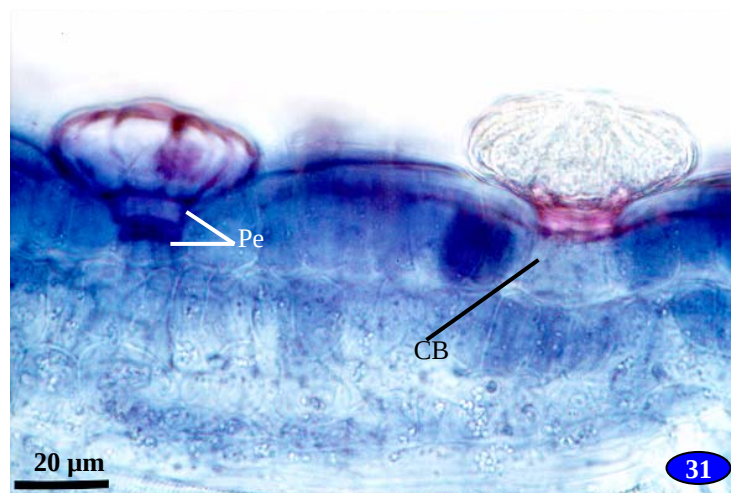
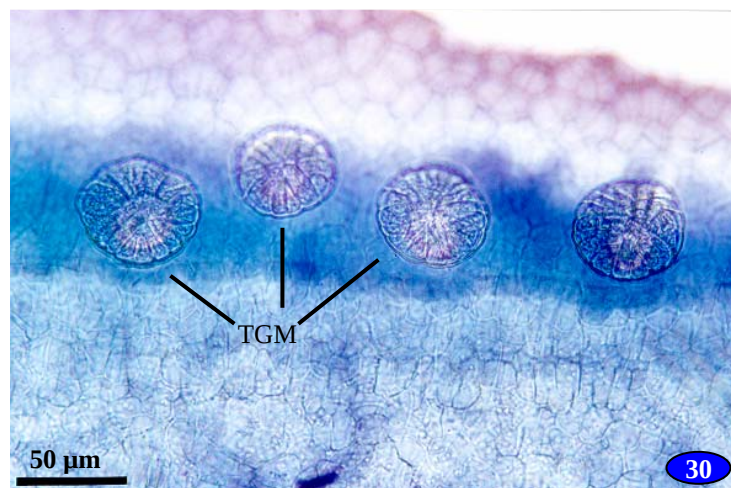
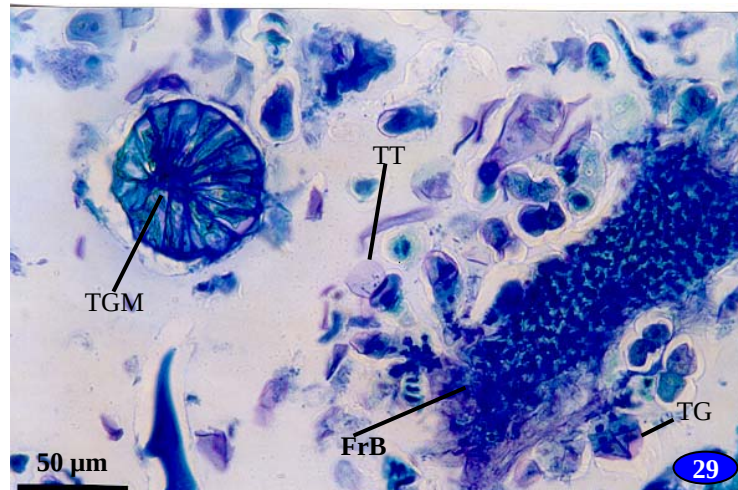


Embora não existam estudos específicos sobre as consequências dessas coletas efetuadas por *A. mellifera* no desenvolvimento posterior das plantas de *B. dracunculifolia*, na Figura 28 observa-se evidente ramificação em plantas intensamente visitadas. Possivelmente, essa ramificação ocorre em função do dano causado pelas abelhas aos ápices vegetativos, o que poderia ser um estímulo para a ativação das gemas laterais e produção de novos ramos. Trata-se de uma relação intrigante, que merece estudos mais detalhados, nos quais devem ser avaliadas as consequências causadas às plantas, se positivas ou negativas. Tais conjecturas não fazem parte do objetivo principal deste trabalho.

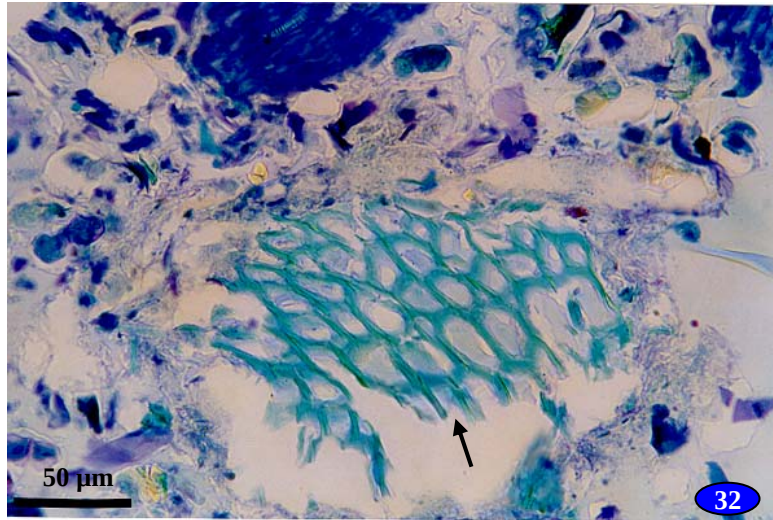
Tricomas glandulares de *M. umbellata* estavam presentes na própolis dessa região, podendo ser observada a sua porção apical cortada transversalmente (Figura 29). A compatibilidade dessas características foi constatada em cortes paradérmicos do laminário de referência (Figura 30). Esses tricomas são multicelulares, formados por uma célula na base, duas no pedúnculo e o ápice multisseriado (Figura 31).

Outros fragmentos foram também visualizados, embora com menor incidência. Suas características anatômicas indicam tratarem-se de lenho de gimnosperma (Figura 32). Essas características são compatíveis com aquelas observadas nos cortes obtidos de amostras da madeira utilizada na confecção das colméias. Tais observações suscitam dúvidas quanto à origem desses fragmentos, cuja presença pode ser consequência de contaminação das amostras de própolis ou resultante da coleta de resinas que exsudavam de espécies de gimnospermas.

Figuras 29 a 31 – Corte de amostra de própolis de Paula Cândido incluída em metacrilato e cortes histológicos de folha de *Myrsine umbellata*. 29 – Seção transversal da porção apical de tricoma glandular de *Myrsine umbellata* e fragmento foliar de *B. dracunculifolia* presentes na própolis. 30 – vista de fragmento foliar de *M. umbellata* contendo tricomas glandulares multicelulares, corte a mão livre. 31- Seção longitudinal de folha de *M. umbellata*, corte a mão livre. CB = célula basal. FrB = fragmento foliar de *B. dracunculifolia*. Pe = pedúnculo. TG = tricoma glandular. TGM = tricoma glandular multicelular.



Figuras 32 – Vista transversal de traqueíde presente em própolis de Paula Cândido incluída em metacrilato. A seta aponta a estrutura mencionada.



Caracterização da vegetação de Virginópolis

A região de Virginópolis caracteriza-se pela presença de fragmentos de Mata de Floresta Estacional Semidecidual Aluvial, em início de sucessão secundária, tendo em suas proximidades pequeno reservatório artificial de água, além de pastagens abandonadas.

Caracterização organoléptica da própolis de Virginópolis

A própolis produzida durante o período de coleta apresentou características sensoriais bastante variáveis: coloração preta, marrom-escura ou marrom-clara com pontuações esbranquiçadas, predominando esta última característica (Tabela 6). A própolis preta não apresentava aroma característico e era excessivamente pegajosa à temperatura ambiente, o que dificultava sobremaneira sua coleta. A própolis marrom-clara possuía aroma suave, mas não característico, apresentando partes um pouco pegajosas e partes quebradiças e ressecadas. Embora a classificação adotada comercialmente para a avaliação da própolis seja individualizada, diferindo conforme a empresa, as características apresentadas pela própolis dessa região não são, em nenhuma época do ano, compatíveis com a própolis atualmente comercializada. Em função de suas características e do atual sistema de classificação do produto, as amostras produzidas durante todo o ano seriam rejeitadas.

Esporadicamente, foi possível observar material esbranquiçado nas corbículas de abelhas das caixas desse local (Figuras 33 e 34), o qual se esfarelava ao toque, inviabilizando a coleta. As características da própolis produzida com esse tipo de material encontram-se nas Figuras 33 a 35.

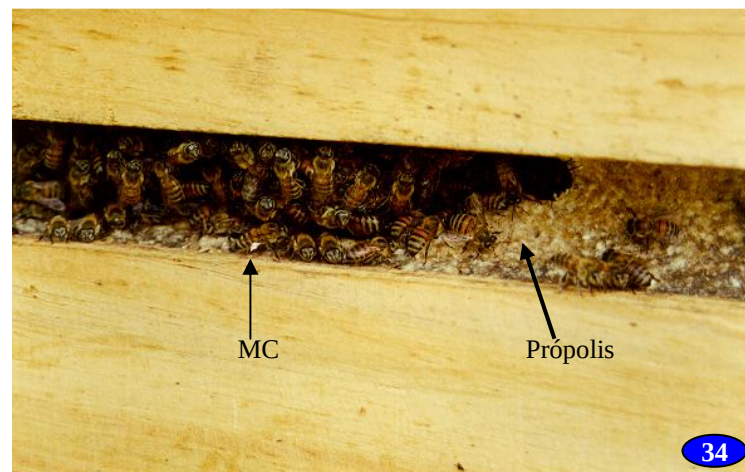
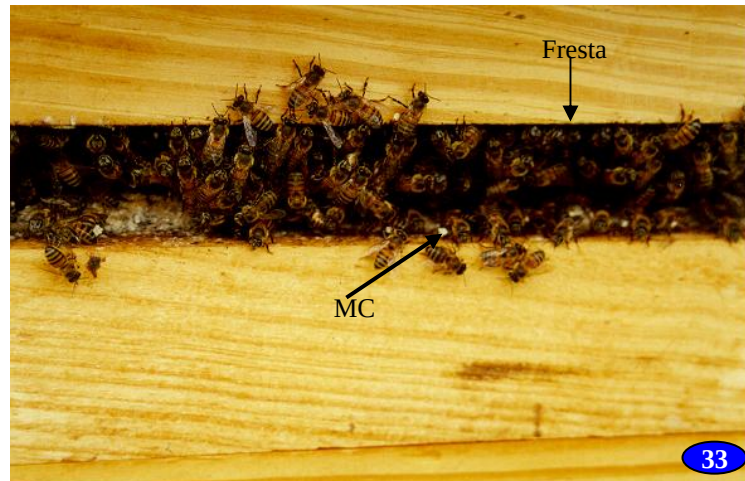
Avaliação da origem botânica pela análise microscópica da própolis de Virginópolis

Na análise da amostra composta, foi possível constatar que a própolis produzida nessa região possui diversidade de tipos morfológicos superior àquela observada em Itapequerica e Paula Cândido. Embora a diversidade seja maior, observa-se a presença de poucos fragmentos vegetais íntegros (passíveis de análises anatômicas) e de grande quantidade de resina amorfa entremeando-os (Figura 3).

Tabela 6. Características sensoriais das amostras de própolis coletadas no Município de Virginópolis ao longo de um ano

Mês/Ano	Cor	Aroma	Aspecto
Setembro/ 2000	Preta	Pouco aromática e não característico	Pegajosa brilhante
Outubro/2 000	Marrom e preta, acinzentada ou preta com muitas pontuações brancas	Pouco aromática e não característico	Pegajosa brilhante ou pegajosa opaca
Novembro/ 2000	Marrom com muitas pontuações brancas	Pouco aromática e não característico	Pegajosa brilhante ou pegajosa opaca
Dezembro/ 2000	Marrom com muitas pontuações brancas	Pouco aromática e não característico	Pegajosa brilhante ou pegajosa opaca
Janeiro/ 2001	Marrom com muitas pontuações brancas	Pouco aromática e não característico	Pegajosa brilhante ou pegajosa opaca
Fevereiro/ 2001	Marrom com muitas pontuações brancas	Pouco aromática e não característico	Pegajosa brilhante ou pegajosa opaca
Março/ 2001	Marrom com muitas pontuações brancas	Pouco aromática e não característico	Pegajosa brilhante ou pegajosa opaca
Abril/ 2001	Marrom com algumas pontuações brancas	Pouco aromática e não característico	Pegajosa brilhante ou pegajosa opaca
Maió/ 2001	Marrom com algumas pontuações brancas	Pouco aromática e não característico	Pegajosa brilhante, pegajosa opaca ou quebradiça ressecada
Junho/ 2001	Marrom com algumas pontuações brancas	Pouco aromática e não característico	Pegajosa brilhante, pegajosa opaca ou quebradiça ressecada
Julho/ 2001	Preta ou marrom com algumas pontuações brancas	Pouco aromática e não característico	Pegajosa brilhante
Agosto/ 2001	Preta, preta e marrom ou preta e marrom com algumas pontuações brancas	Pouco aromática e não característico	Pegajosa brilhante ou pegajosa opaca

Figuras 33 a 35 – Material esbranquiçado presente nas corbículas de *Apis mellifera* (africanizadas) e processo de deposição de própolis na fresta existente nas melgueiras das caixas instaladas em Virginópolis. 33 – abelhas chegando do campo com material esbranquiçado na corbícula e início de deposição de própolis na fresta de uma melgueira. 34 – própolis depositada na fresta da melgueira contendo pontuações brancas. 35 – fresta completamente preenchida pela própolis contendo pontuações brancas. MC = material coletado. A seta branca indica a deposição de própolis nas frestas.



Foi possível visualizar tricomas tectores soltos (Figura 36) que se assemelham aos observados em *Vernonia polyanthes* (Figura 37). Foram identificados filamentos multicelulares semelhantes a algas (Figura 38), as quais poderiam estar presentes em superfícies de cascas de árvores que estivessem exsudando algum tipo de secreção atrativa para as abelhas. Entretanto a identificação desses organismos deve ser confirmada por especialistas. Fragmentos de lenho de gimnospermas também foram observados (Figura 39), os quais se assemelham aos cortes de amostras da madeira utilizada na confecção das colméias (Figura 40).

Material de *B. dracunculifolia* e *B. calvescens* foi identificado na própolis dessa região, com baixa incidência de fragmentos epidérmicos. Vale salientar que espécies de *Baccharis* são pouco frequentes no local.

Todos os outros fragmentos visualizados foram designados “tipos morfológicos”, por não ter sido possível a sua identificação.

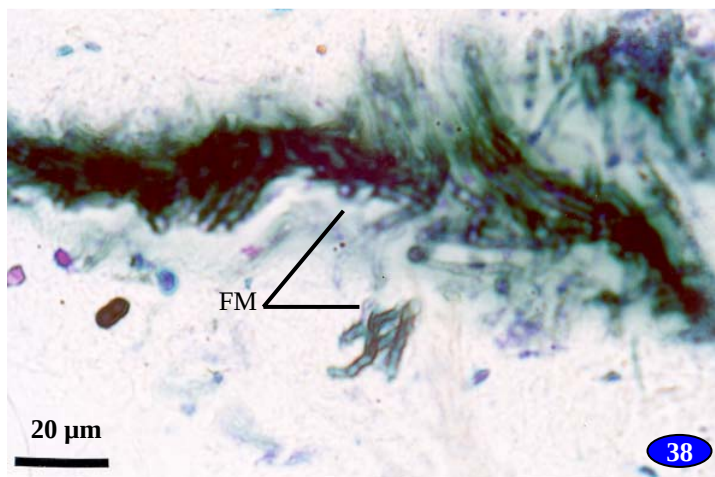
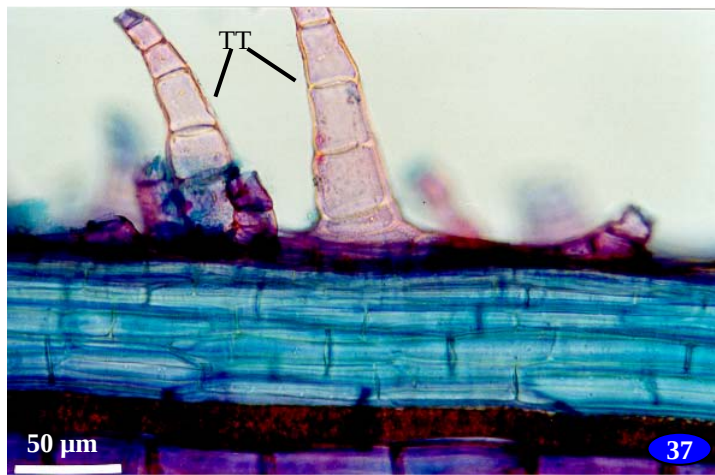
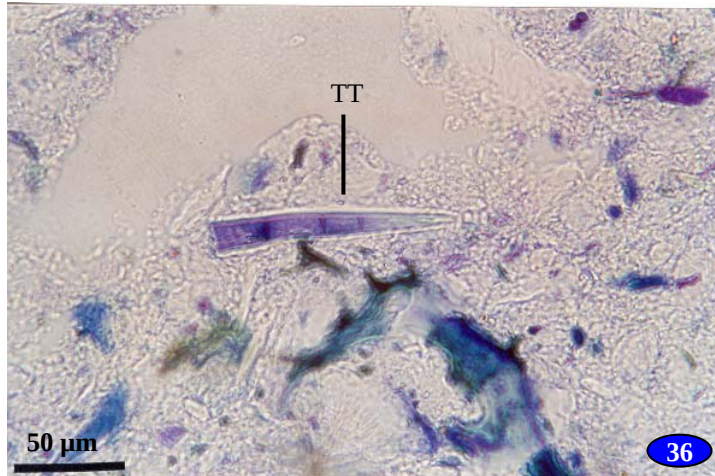
O tipo morfológico C (Figura 41) apresenta epiderme em paliçada e parênquima incolor interno à epiderme. Observado em microscopia de polarização, o tipo morfológico D (Figura 42) é constituído por um conjunto de células de parede espessa e lignificada, semelhante a fibras, que podem ser porções de diferentes órgãos vegetais. O tipo morfológico E (Figuras 43 e 44) é constituído por uma camada de células epidérmicas papilosas e células subepidérmicas em paliçada. Esse tipo morfológico apresenta características semelhantes às observadas em cortes histológicos de anteras. Entretanto, tal hipótese deve ser confirmada.

Não houve predominância de nenhum dos tipos morfológicos encontrados. Essas constatações sugerem que nessa região, além de obterem matéria-prima para produção de própolis em estruturas secretoras como as presentes em *Vernonia* e em *B. dracunculifolia* e *B. calvescens*, as abelhas também coletaram secreções advindas de exsudados ou mesmo estruturas secretoras de outras espécies vegetais não identificadas.

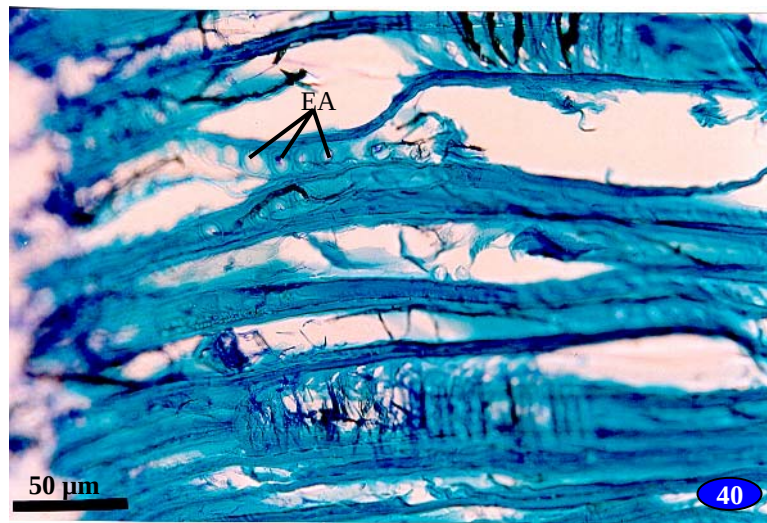
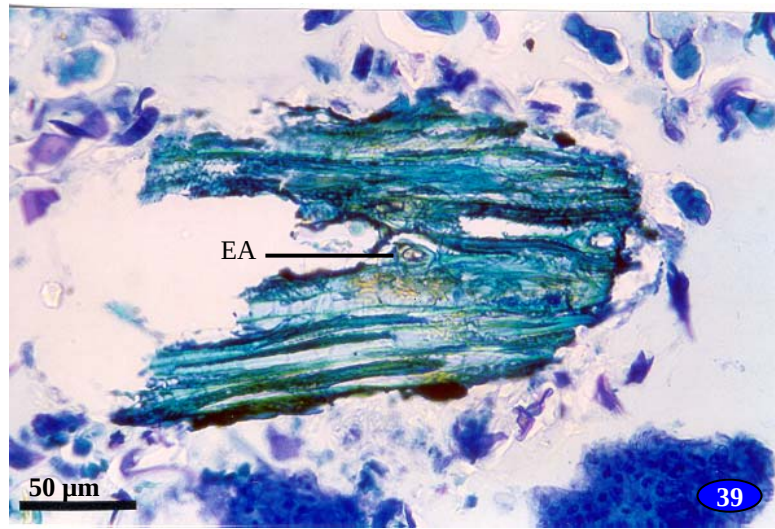
É interessante destacar que, em coletas realizadas nos meses de agosto, setembro e outubro, Freire (2000) não observou nas amostras de própolis, oriundas dessa mesma região, qualquer outro tipo de fragmento, além de traqueídes de *Pinus* spp. e estruturas secretoras de *Vernonia*, com a predominância destas.

A técnica de inclusão da própolis em metacrilato garantiu, como se pode constatar, a possibilidade de visualização de grande diversidade de fragmentos, muitos dos quais, embora não identificados, indicam a possibilidade de contribuição de muitas espécies como fonte para produção de própolis.

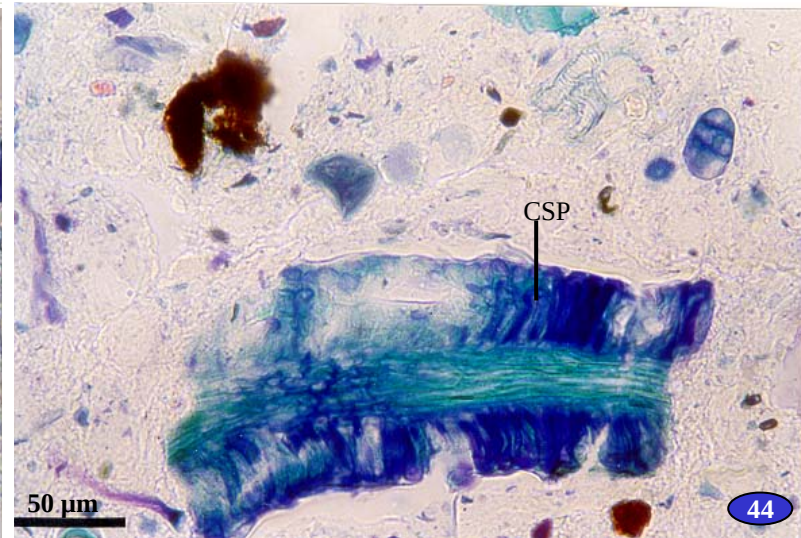
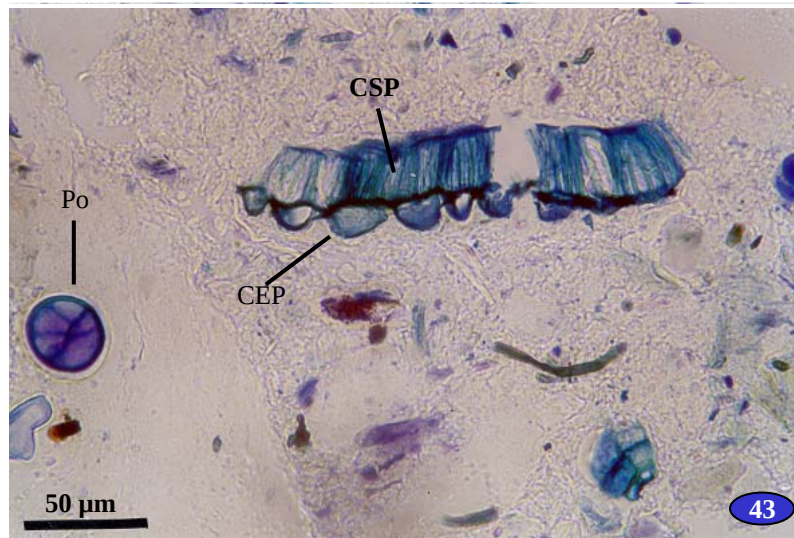
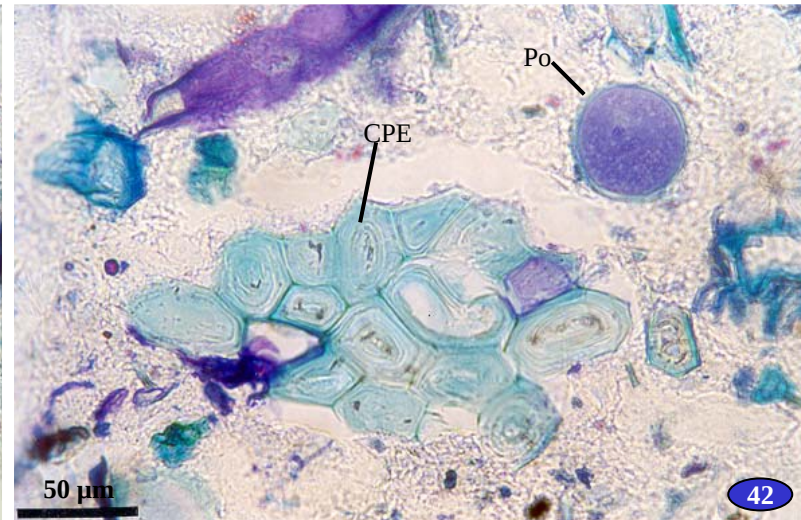
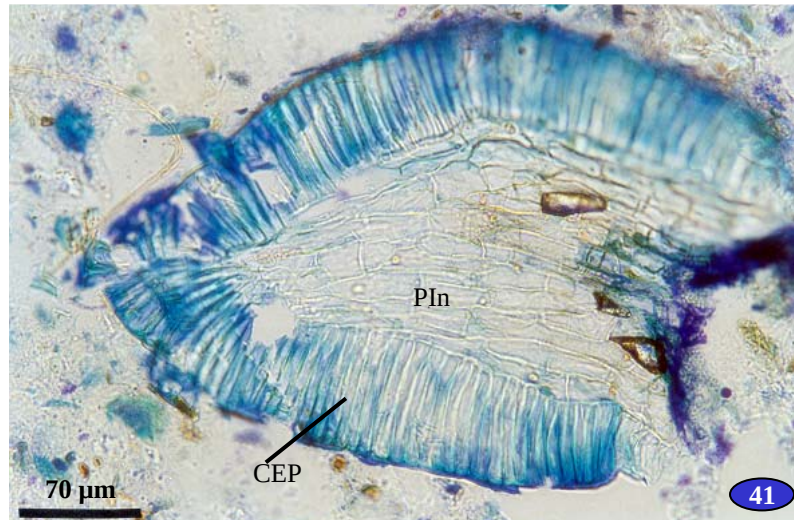
Figuras 36 a 38 – Cortes de amostras de própolis de Virginópolis incluída em metacrilato e corte histológico de folha de *Vernonia polyanthes*. 36 – Seção longitudinal da porção apical de tricoma tector de *V. polyanthes* presente na própolis. 37 – Seção longitudinal de folha de *V. polyanthes*, corte a mão livre. 38- Filamentos multicelulares presentes na própolis. FM = filamentos multicelulares. TT = tricomas tectores.



Figuras 39 e 40 – Corte de própolis de Virginópolis e corte de fragmento da madeira utilizada na confecção das caixas deste apiário experimental, incluídos em metacrilato. 39 – Seção transversal de traqueídeos de Gimnosperma presente na própolis de Virginópolis. 40 – Seção longitudinal de fragmento da madeira utilizada na confecção das caixas. EA = estruturas areoladas.



Figuras 41 a 44 – Cortes de amostras de própolis de Virginópolis, incluídos em metacrilato. 41 – Fragmento de tecido vegetal com epiderme em paliçada e parênquima incolor. 42 – Fragmento de tecido vegetal visualizado em microscopia de polarização, com parede espessa e lignificada. 43 e 44 – Fragmentos de tecido vegetal com células epidérmicas papilosas e células subepidérmicas em paliçadas. CEP = células epidérmicas papilosas. CPE = células de parede espessa. CSP = células subepidérmicas em paliçadas. PIn = parênquima incolor. Po = pólen.



CONCLUSÕES

No Estado de Minas Gerais, abelhas africanizadas *Apis mellifera* coletam matéria-prima para produção de própolis preferencialmente em ápices foliares de *B. dracunculifolia*, quando essa espécie é freqüente na vegetação.

B. calvescens e *M. umbellata* atraem as abelhas para produção de própolis, sendo espécies integrantes da constituição da própolis verde de regiões de cerrado antrópico e de vegetação típica de sucessão em Minas Gerais. Suas características anatômicas indicam potenciais resiníferos importantes que devem ser avaliados e nunca negligenciados, simplesmente por serem menos incidentes nas amostras. Esse raciocínio deve ser considerado para qualquer espécie que venha a ser identificada como constituinte da própolis.

Além de *B. dracunculifolia*, outras espécies atraem as abelhas em regiões de cerrado antrópico em Minas Gerais, podendo haver coleta em outros órgãos vegetais além da lâmina foliar, a exemplo do que se observou em relação a *B. trimera*.

A técnica de inclusão da própolis em metacrilato é promissora. Foi possível visualizar grande diversidade de fragmentos, alguns dos quais, embora não identificados, indicam a possibilidade de contribuição de diversas espécies como fonte para produção de própolis. Esses resultados demonstram a importância da continuidade no aperfeiçoamento das técnicas atuais.

Os tipos morfológicos não identificados devem ser averiguados, podendo ser o ponto de partida para futuras descobertas importantes quanto à origem da própolis.

As características de fragmentação observadas indicam que conteúdos advindos de estruturas secretoras internas das espécies vegetais presentes na própolis também contribuem de forma importante para a sua constituição, além dos conteúdos originados em estruturas secretoras externas.

A técnica analítica utilizada, além de permitir o detalhamento das características anatômicas dos fragmentos vegetais, possibilitou estabelecer inferências quanto à coleta de exsudados. Foi possível contrastar os fragmentos em relação às massas amorfas presentes.

O uso de luz polarizada pode ser importante em observações microscópicas de fragmentos vegetais presentes em própolis, auxiliando na identificação de caracteres indicadores de táxons vegetais.

A avaliação da origem botânica da própolis, fundamentada unicamente nas características organolépticas do produto, pode incorrer em equívocos, devendo ser complementada com estudos mais detalhados.

Análises anatômicas devem ser confrontadas tanto com os respectivos perfis químicos das amostras quanto com o das secreções das espécies encontradas. Assim, pode-se estabelecer inferências sobre a contribuição relativa dos fragmentos identificados. Esse procedimento, embora mais complexo, gera maior confiabilidade em termos de resultados, considerando a aplicação farmacológica do produto.

A identificação de espécies constituintes da própolis gera subsídios para a elaboração, em longo prazo, de uma lista de espécies vegetais atrativas para a produção de própolis. Esse procedimento viabilizaria a instalação de apiários em locais apropriados ou em pastos apícolas preparados para este fim. Essa estratégia facilitaria a previsão de safras importantes com maior homogeneidade quanto aos efeitos farmacológicos apresentados.

Estudos sobre a origem botânica da própolis em diferentes regiões, inclusive de vegetações semelhantes, não devem ser dissociados de averiguações de possíveis variações dos constituintes químicos em função de aspectos fenológicos das espécies vegetais e de variações climáticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Araújo, A. M., Fernandes, G. W., Bedê, L. C. 1995. Influência do sexo e fenologia de *B. dracunculifolia* D. C. (Asteraceae) sobre insetos herbívoros. *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 39, n. 2, p. 347-353.
- Barth, O. M. 1998. Pollen analysis of Brazilian propolis. *Grana*, v. 37, p. 97-101.
- Barth, O. M., Dutra, V. M. L., Justo, R. L. 1999. Análise polínica de algumas amostras de própolis do Brasil meridional. *Ciência rural*, v. 29, n.4, p. 663-667.
- Bastos, E. M., Del Carmen, V. 1999. Potencial resinífero de *Baccharis dracunculifolia* DC., para produção de própolis por abelhas *Apis mellifera*. In: 50^o Congresso Nacional de Botânica. Anais...Blumenau, santa Catarina. p. 168.
- Bastos, E. M. A. F. 2001. Origem botânica e indicadores de qualidade da “própolis verde” produzida no Estado de Minas Gerais. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo/Faculdade de Filosofia Ciências e Letras (tese de Doutorado), 137p.
- Boldt, P. E. 1989. *Baccharis* (Asteraceae): A review of its taxonomy, phytochemistry, ecology, economic status, natural enemies and the potential for its biological control in the United States. USDA, Agricultural Research Services, Texas. 33 p.
- Castro, M. M. 1987. Estruturas secretoras em folhas de espécies da família Asteraceae: aspectos estruturais e histoquímicos. São Paulo: Universidade de São Paulo/Instituto de Biociências (tese de Doutorado), 118p.
- Catorini, P. E. 1963. Le api e gli uomini. *Fitoterapia*, v. 34, p. 85-93.
- D'albore, G. R. 1979. L'origine géographique de la propolis. *Apidologie*, v.10, n. 3, p. 241-267.
- Dell, B. , McComb, A. J. Plant resins – Their formation, secretion and Possible functions. *Advances in Botanical Research*, v.6, p.278-316, 1978.

- Cattorini, P. E. 1963. Bees and men. *Fitoterapia*, v. 34, p.85-93.
- Fahn, A. Secretory tissues in plants. London: Academic Press. 1979, 302p.
- Ferracini, V. F., Paraiba, L. C. 1995. Essential Oils of seven Brazilian *Baccharis* species. *Journal of Essential Oil Research*, v , 7, p. 355-367.
- Freire, U. C. 2000. Origem da própolis verde e preta produzida em Minas Gerais. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa (dissertação de Mestrado), 50p.
- Gary, N. E. 1993. Activities and behavior of honey bees. In: The hive and the honey bee. J. M. Graham (ed.). Michigan, Chelsea, p. 269-361.
- Gerlach, G. 1969. Botanische Mikrotechnik, eine Einfuhrung. Gorg Thieme, Stuttgart.
- Ghisalberti, E. L. 1979. Propolis: a review. *Bee World*, v. 60, p. 59-84.
- Johansen, D. A. 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill Book Co. Inc., New York.
- Labbe, C., Roviroso, J., Faini, F., Mahu, M., San-Martin, A., castillo, M. 1986. Secondary metabolites from chilean *Baccharis* species. *Journal of Natural Products*, v. 49, n. 3, p. 517-518.
- Loayza, I., Abujder, D., Aranda, R., Jakupovic, J., Collin, G., Deslauriers, H., Jean, F. I. 1995. Essential oils of *Baccharis salicifolia*, *B. latifolia* and *B. dracunculifolia*. *Phytochemistry*, v. 38, n. 2, p. 381-389.
- Mann, J. 1987. Secondary metabolism. 2 ed. Oxford: Clarendon Press. 374p.
- Maciel, M. A. M., Pinto, A. C., Veiga Jr., V. F. 2002. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, v.25, n.3, p. 429-438.
- Meyer, W. 1956. Propolis bees and their activities. *Bee World*, v. 37, p. 25-36.

- Metcalf, C. R., Chalk, L. Anatomy of the dicotyledons. v. 2, Clarendon Press: Oxford, 1950, 1500 p.
- Montenegro, G., Timmermann, B. N., Peña, R., Mujica A. M., Avila, G. 2000. Pollen grains and vegetative structures in propolis as indicators of potential drugs in Chilean plants. *Phyton International Journal of Experimental Botany*, v. 66, p. 15-23.
- Montenegro, G., Peña, R., Avila, G, Timmermann, B. N. 2001a. Botanical origin and seasonal production of propolis in hive of Central Chile. *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo*, v. 19, p. 1-6.
- Montenegro, G., Peña, R., Timmermann, B. N., Mujica, A. M., Avila, G. 2001b. Botanical resources for propolis in an apiary network in Central Chile. *Phyton International Journal of Experimental Botany*, 50th anniversary, p. 191-201.
- Oliveira, V. C., Bastos, E. M. 1998. Aspectos morfo-anatômicos da folha de *Baccharis dracunculifolia* DC. (Asteraceae) visando à identificação da origem botânica da própolis. *Acta Botânica Brasileira*, v. 12, n. 3, p. 431-439, suplemento.
- Otegui, M., Maldonado, S. 1999. Leaf morphology of *Myrsine* L. species (Myrsinaceae) from South Cone of South America. *Candollea*, v. 53, n. 2, p. 349-363.
- Pereira, A. dos S., Seixas, F. R. M. S., Neto, R. de A. 2002. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas. *Química Nova*, v.25, n.2, p. 321-326.
- Pires, C. V., Teixeira, E. W., Message, D. 2002. Avaliação de preferência entre plantas de *Baccharis dracunculifolia* por abelhas *Apis mellifera* (africanizadas) para coleta de própolis e determinação de horário e temperatura de maior coleta. In: 5^o Encontro sobre abelhas. Anais...Ribeirão Preto, São Paulo. p. 342.
- Robbers, J. E., Speedie, M. K., Tyler, V. E. 1996. Pharmacognosy and pharmacobiotechnology. Baltimore: Williams & Wilkns. 198p.

- Santos, M. A. 1996. Estudo de forrageamento de própolis em abelhas africanizadas, *Apis mellifera* L. 1758. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa (dissertação de Mestrado), 59p.
- Santos, M. A., Message, D. 1997. Comportamento de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) na coleta de própolis em colônias de observação e em alecrim (*Baccharis dracunculifolia* D. C.). In: 16^o Congresso Brasileiro de Entomologia. Anais... Salvador, Bahia. p. 90.
- Solereider, H. Systematic anatomy of the dicotyledons. A handbook for laboratories of pure and applied Botany. Transl. by L. A. Boodle & F. G. Fritsch. v. 2, Clarendon Press: Oxford, 1908, 1182 p.
- Tomás-Barberán, F. A., Garcia-Viguera, C., Vit-Oliver, P., Ferreres, F., Tomás-Lorente, F. 1993. Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. *Phytochemistry*, v. 34, p. 191-196.
- Uphof, J. C. Th. 1962. Plant hairs. Gebruder Borntraeger (ed.). Berlin, Nikolassee, 292 p.
- Valcic, S., Montenegro, G., Timmermann, B. N. 1998. Lignans from Chilean propolis. *Journal of Natural Products*, v.61, p. 771-775.
- Valcic, S., Montenegro, G., Mujica, A. M., Avila, G., Franzblau, S., Singh, M. P., Maiese, W. M., Timmermann, B. N. 1999. Phytochemical, morphological, and biological investigations of propolis from Central Chile. *Zeitschrift fur Naturforschung*, v. 54c, p. 406-416.
- Vickery, M. L., Vickery, B. V. 1981. Secondary plant metabolism. London: Macmillan Press. 335p.
- Vidal, B. C. 1977. Acid glycosaminoglycans and endochondral ossification: microspectrophotometric evolution and macromolecular orientation. *Cell Molecular Biology*, v. 22, p. 45-64.

- Warakomska, Z., Maciejewisk, W. 1992. Microscopic analysis of propolis from Polish regions. *Apidologie*, v. 23, p. 277-283.
- Weyerstahl, P., Christiansen, C., Marschall, H. 1995. New sesquiterpene ethers and other constituents isolated from brazilian vassoura oil. *Liebigs Ann.*, p. 1039-1043.
- Weyerstahl, P., Marschall, H., Schneider, K. 1995. Synthesis of rac-cis- and – tans-dracunculifoliol and their 10-epimers. *Liebigs Ann.*, p. 231-240.
- Zdero, C., Bohlmann, F., King, R. M., Robinson, H. 1986. Diterpene glycosides and other constituents from argentinian *Baccharis* species. *Phytochemistry*, v. 25, n. 12, p. 2841-2855.

CAPÍTULO 4

Avaliação da atividade antibacteriana, antioxidante e antiviral da própolis originária de três regiões de Minas Gerais

Resumo – A ação da própolis na prevenção e tratamento de diversas enfermidades e a atividade de amplo espectro apresentada pelo produto contra diferentes microorganismos de distintos graus de patogenicidade para o homem e outros animais têm sido amplamente divulgadas. Todavia, pesquisas visando vincular a origem do produto aos diversos efeitos farmacológicos constatados são escassas. Objetivou-se, com esse trabalho, avaliar o efeito de extratos metanólicos de amostras de própolis obtidas em três regiões do Estado de Minas Gerais, bem como a sazonalidade da produção quanto às atividades antimicrobiana, antioxidante e antiviral. Para isso, estudos “in vitro” foram conduzidos, usando-se bactérias associadas à mastite bovina (linhagens de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos clínicos e ATCC-25923) e vírus de importância veterinária (herpes vírus bovino tipo 1, BHV-1 e herpes vírus suíno tipo 1, PRV), além de terem sido efetuados testes de atividade antioxidante (com o uso do radical DPPH). O teor de fenóis totais das amostras estudadas foi previamente avaliado. Os resultados mostraram-se promissores quanto à possibilidade de utilização da própolis cuja principal fonte vegetal seja *B. dracunculifolia*, como agente antioxidante e antibacteriano (para *S. aureus*). A associação de elevado teor de triterpenóides e de alguns compostos fenólicos em amostras de própolis pode garantir atividade anti-BHV-1 e anti-PRV. Constatou-se ainda que a sazonalidade é fator determinante na atividade biológica da própolis. Amostras de própolis com conteúdo semelhante de substâncias fenólicas apresentaram atividades biológicas diferenciadas, sugerindo a presença de certos compostos ativos em concentrações diferentes entre as amostras. Amostras de própolis de origem botânica e perfis químicos semelhantes podem apresentar diferenças quanto à eficiência na inibição da multiplicação de *S. aureus*. Entretanto, bactérias da mesma espécie podem apresentar sensibilidades diferentes ao mesmo extrato de própolis. Embora amostras de própolis com teor mais elevado de substâncias fenólicas sejam mais eficientes na inibição de *S. aureus*, os resultados sugeriram possível sinergismo desses compostos com triterpenos.

Palavras-chave: *Apis mellifera*, atividade antibacteriana, atividade antioxidante, atividade antiviral, origem botânica, própolis, sazonalidade.

INTRODUÇÃO

Os registros de uso da própolis na medicina popular são milenares, sendo utilizada de diversas formas pelos assírios, gregos, romanos, incas e egípcios (Pereira et al., 2002). Para médicos europeus dos séculos XVI em diante, particularmente russos e poloneses, a própolis encontrou emprego como anti-séptico, antibacteriano e antiacne, sendo também empregada por odontólogos em tratamento de abscessos e gengivas hemorrágicas, bem como candidíase e halitose. Receitaúrios chineses antigos apontam o produto como ativo em doenças coronárias e disfunções hematológicas (Northemberg, 1997). As evidências de atividades terapêuticas da própolis vêm se acumulando ao longo dos anos, sendo evidenciadas tanto por experimentos “in vitro” como por estudos de casos clínicos. Todavia, os relatos de casos clínicos se restringem quase completamente à Europa Oriental, onde se constata tradição no consumo do produto, com maior intensidade de relatos durante e após a II Guerra Mundial.

Atividades detectadas no passado são hoje confirmadas em centenas de publicações. Em artigo de revisão recente, Banskota et al. (2001) enumeraram as diversas atividades farmacológicas associadas à própolis, dentre as quais encontram-se focalizadas as atividades hepatoprotetora (González et al., 1994, Ramirez et al., 1994, González et al., 1995, Basnet et al., 1996, Mahran et al., 1996, Sharma et al., 1997, Rodriguez et al., 1997, Lin et al., 1997), antitumoral (Matsuno, 1995, Mitamura et al., 1996, Banskota et al., 1998, Banskota et al., 2000a, Lee et al., 2000), antioxidante (Matsushige et al., 1995, Matsushige et al., 1996, Basnet et al., 1997, Mirzoeva et al., 1995, Banskota et al., 2000b), antibacteriana (Bankova et al., 1995, Bankova et al., 1996, Antunes et al., 1996, Sosa et al., 1997, Mirzoeva et al., 1997, Pinto et al., 2001, Santos et al., 2002, Pinto et al., 2003), antiviral (Amoros et al., 1992a, Amoros et al., 1992b, Kujumgiev et al., 1999, Vynograd et al., 2000, Ito et al., 2001) e antinflamatória (Krol et al., 1996, Ledon, 1997, Song et al., 2002). Além dessas atividades, outras propriedades biológicas foram também relatadas, por exemplo a ação na mobilidade de macrófagos (Tatefuji et al., 1996), dentre outras. A maioria dos autores vincula o amplo espectro de atuação do produto à sua complexidade de composição e diversidade de constituintes químicos. Conforme discutido por esses estudiosos, genericamente, os compostos fenólicos podem ser responsabilizados por grande

parte das atividades biológicas apresentadas, sendo as substâncias flavonoídicas, o grupo mais atuante na própolis europeia (Greenaway et al., 1990, García-Viguera et al., 1993, Bankova et al., 1994). Já na própolis produzida em regiões tropicais, esse grupo de compostos é menos incidente, prevalecendo outros grupos fenólicos (Midorikawa et al., 2001). Revisões específicas que visam abordar o perfil químico do produto encontram-se disponíveis, sendo a mais recente conduzida por Bankova et al. (2000), a qual inclui abordagens de constituintes de própolis de zonas temperadas e de zonas tropicais. Recentemente, Midorikawa et al. (2001), utilizando técnica analítica sofisticada (cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas), identificaram grande diversidade de compostos, concluindo que *B. dracunculifolia* poderia ser uma importante fonte de própolis no Brasil.

Além da evidência do relacionamento de certos compostos, individualmente, com algumas das atividades já estudadas, existe, certamente, importante efeito do sinergismo dos constituintes presentes. De acordo com Williamson (2001), embora se constitua em prática entre os cientistas extrair e investigar compostos de origem vegetal, visando encontrar uma entidade química responsável por um determinado efeito biológico, tais estudos chegam, muitas vezes, a resultados não conclusivos. Para o autor, as interações sinérgicas podem explicar a eficácia de pequenas doses de produtos de origem vegetal, não se devendo negligenciar a possibilidade de interações tanto positivas quanto negativas entre os constituintes de um extrato complexo.

Apesar de os trabalhos confirmarem as evidentes atividades biológicas já testadas, com avanços alcançados quanto à identificação de constituintes da própolis, constata-se a escassez de estudos que permitam associar esses tipos de resultados às respectivas origens das amostras utilizadas. Sabe-se que a origem botânica das substâncias naturais coletadas pelas abelhas para elaboração da própolis tem influência marcante, tanto no aspecto qualitativo como quantitativo, da composição química do produto final (Guisalberti et al., 1979, Jeanne, 1984, Cheng et al., 1996, Asis, 1991, Bankova et al., 1992, Gary, 1993, Tomás-Barberan, 1993) e que, portanto, própolis oriunda de regiões geográficas diferentes, com vegetação e clima diferentes, apresentam também composições químicas distintas (Park et al., 1995, Park et al.1997, Park et al.1998a, Kujumgiev et al., 1999). A

sazonalidade é outro fator importante a ser considerado, uma vez que fatores fenológicos influenciam a síntese de diversos compostos secundários.

Apenas com o redirecionamento da pesquisa nessa área científica será possível vincular a atividade do produto ao local e época de produção. Sendo assim, este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito de extratos metanólicos de amostras de própolis obtidas em três regiões do Estado de Minas Gerais, bem como a sazonalidade da produção quanto às atividades antimicrobiana, antioxidante e antiviral.

MATERIAL E MÉTODOS

Própolis

Amostras de própolis produzidas por *Apis mellifera* (africanizadas) foram coletadas mensalmente, durante um ano, em três apiários experimentais, localizados nos Municípios de Itapecerica (20°32'S, 45°13'O), Paula Cândido (20°49'S, 42°54'O) e Virginópolis (18°50'S, 42°43'O), em Minas Gerais, conforme descrito detalhadamente no Capítulo 3.

Para cada um dos três locais de coleta, amostras compostas, representativas dos doze meses foram preparadas, obtendo-se um *pool* anual para a própolis coletada em Itapecerica, um *pool* anual para a própolis coletada em Virginópolis e um *pool* anual para a própolis coletada em Paula Cândido. Na formação desses *pools* anuais, foram contemplados, para cada local, todos os meses do ano, em partes iguais. As amostras de própolis obtidas nas cinco colônias de cada apiário foram homogeneizadas mensalmente, não sendo considerado assim o fator colônia.

Apenas para a região de Itapecerica, prepararam-se, além das amostras compostas, amostras mensais obtidas durante os doze meses de coleta.

Além das amostras de própolis obtidas nos três apiários experimentais, uma amostra de própolis obtida também na região de Paula Cândido, porém em colônia que não pertencia ao experimento, foi submetida a processo de extração, e um composto daí isolado, o acetato de bauerenila, apresentado no Capítulo 5, foi utilizado nos testes biológicos. As características organolépticas diferenciadas apresentadas por essa amostra de própolis, em relação às outras obtidas nas colméias do apiário experimental localizado na mesma região, despertaram o interesse em incluí-la na pesquisa. Essas características eram semelhantes às aquelas apresentadas pela própolis obtida em Virginópolis, que se encontra ilustrada nas Figuras 33 a 35 do Capítulo 3: coloração marrom-claro, com muitas pontuações brancas, contendo partes muito pegajosas, de aroma suave e não característico de própolis.

Obtenção dos extratos metanólicos secos de própolis (EMSs) e do Acetato de Bauerenila (AcB)

As amostras obtidas durante os doze meses consecutivos na região de Itapecerica, bem como os três *pools* anuais obtidos em cada apiário experimental foram submetidos a processos de extração seqüenciais com solventes orgânicos, no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Botânica da USP. As amostras foram pulverizadas, com exceção da própolis produzida em Virginópolis que, por ser pegajosa, foi cortada em pequenos pedaços (2-3mm) e triturada em almofariz. Cinco gramas de própolis foram extraídas inicialmente com hexano, durante três horas, sob refluxo, em banho-maria a 60°C. Posteriormente, as amostras foram extraídas com metanol em extrator Soxhlet (Fisatom), também durante três horas. Os extratos metanólicos assim obtidos foram levados à geladeira, durante no mínimo duas horas, para que houvesse a separação da cera presente. Em seguida os extratos foram filtrados e o resíduo retido no papel de filtro (cera) foi reservado. O filtrado foi concentrado em evaporador rotativo (Büch) e em seguida solubilizado e filtrado com metanol a quente. O material retido no papel de filtro foi também reservado (resíduo livre de cera) e o filtrado foi novamente levado à geladeira, por no mínimo duas horas, para separar qualquer resíduo de cera restante. O filtrado foi finalmente concentrado em evaporador rotativo, ressolubilizado em metanol, transferido para pequenos frascos previamente pesados e o solvente eliminado em banho-maria, a 40°C, com ventilação forçada. Após a obtenção do peso constante de cada frasco com os respectivos extratos, o seu conteúdo passou a ser designado extrato metanólico seco (EMS). Tal procedimento resultou na obtenção de EMS-It (extrato metanólico seco de Itapecerica, resultante do *pool* das amostras do ano todo desse local), EMS-PC (extrato metanólico seco de Paula Cândido, resultante do *pool* das amostras do ano todo desse local) e EMS-V (extrato metanólico seco de Virginópolis, resultante do *pool* das amostras do ano todo desse local), além dos EMSs mensais obtidos separadamente com as amostras coletadas em Itapecerica, ao longo dos doze meses (janeiro: EMS-Itjan, fevereiro: EMS-Itfev, março: EMS-Itmar, abril: EMS-Itabr, maio: EMS-Itmai, junho: EMS-Itjun, julho: EMS-Itjul, agosto: EMS-Itago, setembro: EMS-Itset, outubro: EMS-Itout, novembro: EMS-Itnov, dezembro: EMS-Itdez).

O processo de extração utilizado para a própolis obtida em colônia que não pertencia ao apiário experimental de Paula Cândido foi diferenciado: por ser pegajosa, a própolis foi cortada em pequenos pedaços (2-3mm) e triturada em almofariz. O processo de extração utilizado também foi diferente: inicialmente foi efetuada a extração em metanol durante 3h e posteriormente o cartucho com o resíduo extraído em metanol foi submetido a nova extração, por mais 3 h, com clorofórmio. O extrato foi concentrado em evaporador rotativo e retomado e filtrado em metanol a quente. Após esfriar, obteve-se um resíduo. Cerca de 1 g do resíduo dissolvido em clorofórmio foi previamente analisado em cromatografia em camada delgada, utilizando-se placas de gel de sílica G (Merck 60, F₂₅₄). Os triterpenóides lupeol e ácido ursólico foram usados como compostos de referência, sendo utilizada a mistura clorofórmio:éter etílico:acetato de etila (30:40:40) como fase móvel. A revelação foi feita com o uso do reagente Carr-Price (Harborne, 1984), normalmente empregado para triterpenóides, e aquecimento em estufa a 100 °C. Após recristalização do composto em clorofórmio:metanol (5:2), 1 µL de solução clorofórmica foi injetada em cromatógrafo a gás (Hewlett Packard 5890 Serie II Plus) acoplado a espectrômetro de massas (Hewlett Packard 5989B). A estrutura do composto obtido foi elucidada com base em análises espectroscópicas de infravermelho, ressonância magnética nuclear de ¹³C e de ¹H, conforme detalhado no Capítulo 5 .

Obtenção do teor de fenóis totais dos EMSs

A quantificação do teor de substâncias fenólicas totais foi efetuada segundo Woisky e Salatino (1998), com algumas modificações, com o uso do método Folin-Ciocalteu.

Foram preparadas soluções etanólicas, a 400 ppm, dos EMS resultantes do *pool* das amostras de própolis coletadas durante o ano todo, em cada apiário experimental (EMS-It, EMS-PC e EMS-V), além dos EMSs mensais obtidos separadamente com as amostras coletadas em Itapeçerica, ao longo dos doze meses.

Construiu-se curva-padrão usando-se soluções etanólicas de ácido gálico (Analyticals) em concentrações 1,5 a 5,0 µg/mL. Transferiu-se para um balão volumétrico de 50 mL, com 35 mL de água destilada, uma alíquota correspondente a cada concentração e 6 mL do reagente de Folin-Ciocalteu. Após agitação suave e intervalo de

aproximadamente 10 minutos, acrescentaram-se 6 mL de solução de carbonato de sódio a 20%. Agitou-se por alguns segundos, após acerto do volume final com água destilada. Transcorrido o tempo de duas horas, efetuou-se a leitura das soluções em espectrofotômetro (Analítica - GBc 911A) em 760 nm. A equação da curva padrão foi obtida usando-se o método dos quadrados mínimos, no programa estatístico SAS (1990).

Uma alíquota de 1 mL das soluções etanólicas dos extratos testados foi transferida para balão volumétrico de 50 mL, com 35 mL de água destilada e 6 mL do reagente de Folin-Ciocalteu. A partir de então, prosseguiu-se realizando os mesmos procedimentos adotados para a construção da curva do ácido gálico.

Calculou-se o teor de fenóis totais dos extratos, expressos como ácido gálico, com o uso da curva-padrão obtida. Todos os testes foram feitos em triplicata e os resultados foram representados pela média aritmética.

Atividade antibacteriana dos extratos metanólicos e do acetato de bauerenila

Bactérias

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Microbiologia Industrial do Departamento de Microbiologia da UFV.

Foram utilizados três isolados de *Staphylococcus aureus* (T-V, V-I e V-IV) e ATCC 25923, pertencentes a uma coleção de bactérias isoladas de vacas com mastite (Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa). Os isolados foram classificados segundo técnicas específicas (Pinto et al., 2001; Pinto et al., 2002), para as quais apresentaram resultados positivos para os seguintes testes: hemólise em ágar-sangue; prova de catalase (Holberg, 1973); prova de coagulase (Schalm et al., 1971); reação de desoxirribonuclease (DNase) (Kowalski, 1977) em ágar-DNase; fermentação do manitol, em ágar sal-manitol; crescimento anaeróbico em meio líquido de tioglicolato de Brewer (Evans e Kloos, 1972) e reação de Voges-Proskauer (Bier, 1985).

Determinação da concentração inibitória mínima (MIC)

A atividade antibacteriana foi avaliada pela determinação da MIC, com adaptações do procedimento adotado e descrito por Moreira (2002): todos os testes foram feitos usando-se o método da diluição em meio líquido. As culturas foram conservadas em glicerol 20% e mantidas congeladas em ultrafreezer, a -86°C . Usou-se caldo BHI (Difco) de infusão de cérebro e coração, para reativação dos microorganismos, os quais foram incubados a 37°C , durante 14 a 16 horas. As culturas foram diluídas em caldo BHI, para 10^5 UFC/mL, ao atingirem densidade óptica (D.O.) líquida de 0,3 em 560 nm, correspondendo a 10^9 UFC/mL. O caldo BHI foi utilizado como padrão para leitura em espectrofotômetro (Spectrome 20D – Milton Roy).

Foram utilizadas placas de microtitulação (Nunclon-Delta), com 96 orifícios. Admitindo-se o volume máximo de 300 μL a ser utilizado por orifício (evitando-se, dessa forma, possíveis contaminações), adotou-se o procedimento de colocar 230 μL de cultura diluída por orifício e 70 μL dos EMSs testados, nas diferentes concentrações, em triplicata.

Os EMSs resultantes do *pool* das amostras do ano todo de cada apiário experimental (EMS-It, EMS-PC e EMS-V) foram testados com os três isolados e com a linhagem ATCC, podendo-se, dessa forma, confrontar as possíveis diferenças apresentadas pelos extratos produzidos com a própolis produzida nos três locais. Já os doze EMSs obtidos mensalmente em Itapecerica foram testados apenas com a ATCC, objetivando averiguar as possíveis diferenças, em termos de atividade antimicrobiana, apresentadas pelos extratos ao longo do ano. O composto isolado, acetato de bauerenila (AcB), foi testado apenas com a linhagem ATCC.

Os EMSs foram solubilizados com etanol absoluto (Merck) e filtrados em membrana (Schleicher e Schuell) com poro de 0,45 μm de diâmetro, com o objetivo de padronizar a limpidez dos extratos ressuspensos. Todos os controles necessários foram feitos, inclusive os das culturas acrescidas de etanol, correspondentes às diferentes concentrações utilizadas com os EMSs testados.

Aparelho leitor de ELISA (Titertek multiskan, Plus-MkII), com filtro de comprimento de onda compatível ao adotado no preparo das culturas, foi utilizado para o acompanhamento do crescimento bacteriano. As leituras foram feitas imediatamente após o

preparo de cada placa, duas horas após o preparo e, posteriormente, em intervalos de uma hora. As leituras se prolongaram até duas horas após o início da fase estacionária.

A média aritmética das densidades ópticas das triplicatas foi utilizada para a construção dos gráficos. A MIC foi determinada como a menor concentração da droga que impedia o crescimento bacteriano até duas horas após o tempo correspondente ao início da fase estacionária do controle da cultura em BHI sem EMS ou metanol.

Visando à constatação de diferenças significativas entre os EMSs dos três locais, para os três isolados e para a linhagem ATCC, as densidades ópticas que correspondiam às concentrações mínimas inibitórias obtidas em cada teste foram selecionadas, tomando-se suas triplicatas, em todas as leituras, como repetições. Procedeu-se em seguida a análise de variância, por meio de modelo que incluiu o efeito fixo de local e hora como covariável, além do efeito aleatório do erro.

Para verificar a existência de possíveis diferenças entre os EMSs obtidos nos doze meses de coleta de própolis na região de Itapecerica, adotou-se o mesmo procedimento, sendo, no entanto, efetuada análise de variância dos dados referentes apenas à linhagem ATCC, por meio de modelo estatístico que continha, além do efeito fixo de mês de coleta, o efeito de hora como covariável e o efeito aleatório do erro.

Foi efetuada ainda análise de variância visando averiguar possíveis diferenças entre as bactérias com o extrato obtido em cada local. Para esse modelo estatístico incluiu-se o efeito fixo de bactéria e hora como covariável, além do efeito aleatório do erro.

Os graus de liberdade referentes a todas as fontes de variação estudadas foram decompostos em contrastes e avaliados por meio do teste F no nível de significância de 5%. Todas as análises foram realizadas usando-se o procedimento GLM do pacote estatístico SAS (1990).

Atividade antioxidante dos EMSs e do AcB

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Secagem e Pigmentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFV.

Utilizou-se solução etanólica (etanol absoluto Merck) 0,1 mM do radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) para a avaliação da atividade antioxidante dos EMSs e do acetato

de baurenilla AcB. Os extratos testados (EMS-It, EMS-PC e EMS-V, além dos doze EMSs obtidos mensalmente com a própolis da região de Itapeceira) foram solubilizados em etanol absoluto a 200 ppm. O AcB foi solubilizado em cloreto de metila (Synth). Posteriormente, triplicatas foram preparadas na proporção 1:6 (v:v), com as soluções etanólicas dos extratos e com a solução de DPPH, mantendo-se o intervalo de três minutos entre amostras. Os controles foram feitos misturando-se etanol e DPPH, também na proporção 1:6 (v:v). Ao final do preparo, cada amostra era mantida ao abrigo da luz, durante 30 minutos. Transcorrido esse tempo, efetuaram-se leituras em espectrofotômetro (Analítica - GBc 911A) a 517 nm, para avaliação da variação da absorbância. Como controle positivo, foi utilizada solução etanólica de 2,6-di-*t*-butil-4-metilfenol ou butilidroxitolueno (BHT) a 200 ppm.

Os resultados foram expressos conforme proposto por Germano et al. (2002), considerando-se a porcentagem de inibição promovida pelas amostras testadas na produção de radicais livres, segundo a fórmula: % inibição = (absorbância da solução de DPPH) – (absorbância do DPPH+amostra testada)/absorbância da solução de DPPH x 100.

A averiguação de possíveis diferenças de atividade antioxidante dos EMSs obtidos nos doze meses de coleta de própolis na região de Itapeceira foi efetuada pela análise de variância das leituras de absorbância, por meio de modelo estatístico que continha o efeito fixo de mês de coleta e o efeito aleatório do erro. Os graus de liberdade referentes a essa fonte de variação foram decompostos em contrastes e avaliados por meio do teste F em nível de significância de 5%. Todas as análises foram realizadas usando-se o procedimento GLM do SAS (1990).

Atividade antiviral dos EMSs e do AcB

Optou-se por utilizar o vírus herpes bovino tipo 1 (BHV-1) e o vírus herpes suíno tipo 1 (PRV) em função da importância veterinária desses patógenos. O BHV-1 está associado a diversas manifestações clínicas em bovinos (rinotraqueíte infecciosa bovina, vulvovaginite pustular, enterite, entre outras) e o PRV à enfermidade conhecida como Doença de Aujeszky. Ambos pertencem à mesma subfamília do vírus herpes humano tipo 1

ou herpes simplex tipo 1 (HSV-1) (*Alfaherpesvirinae*), o qual tem sido extensivamente estudado.

Manutenção de culturas de células, obtenção da suspensão estoque dos vírus e titulação dos vírus

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Virologia do Departamento de Veterinária da UFV. Foram testados os efeitos dos EMS-It, EMS-PC, EMS-V e do AcB na multiplicação do BHV-1 e do PRV, em cultura de células de rim bovino de Madin-Darby (MDBK) e de células de rim de macaco verde da África (VERO). Os EMSs e o AcB foram solubilizados em dimetil sulfoxido (DMSO), 10 mg/mL e estocados a 4°C.

Para a manutenção das culturas de células, obtenção da suspensão estoque dos vírus e procedimento de titulação dos vírus, utilizou-se a metodologia de rotina adotada no Laboratório de Virologia do Departamento de Veterinária da UFV, descrita por Soares (2003). Células VERO e MDBK foram cultivadas em garrafas de plástico ou de vidro a 37 °C, com 5% de CO₂, em meio mínimo de Eagle (MEM) (Gibco BRL) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (células VERO) ou 5% de soro eqüino (SE) (células MDBK), 500 UI de penicilina, 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina, 0,1% de anfotericina e 0,25% de bicarbonato de sódio. Após a confluência da cultura, as células foram lavadas com tampão salino fosfato (PBS) e individualizadas com solução de tripsina a 0,25% diluída em verseno. As células foram ressuspensas em meio de cultura e transferidas em quantidades iguais para três novas garrafas.

Para a obtenção da suspensão estoque dos vírus PRV e BHV-1, culturas de células VERO e MDBK recém-confluentes tiveram seu meio descartado e em seguida foi adicionado o vírus PRV ou BHV-1, com multiplicidade de infecção (MOI) equivalente a 0,1. As culturas foram mantidas a 37 °C, em atmosfera de CO₂ (5%) por uma hora sob agitações periódicas de 15 em 15 minutos. Novo volume de MEM suplementado foi adicionado às culturas, que foram novamente incubadas. As culturas foram mantidas incubadas até o aparecimento do efeito citopático, e após a lise de cerca de 90% das células, as culturas foram congeladas a -20 °C e em seguida descongeladas. Imediatamente,

alíquotas de 200 µL do meio de cultura foram transferidas para criotubos, que foram estocados em nitrogênio líquido.

Os vírus foram titulados pelo método da dose infectante de cultura de tecido a 50% (TCID₅₀), segundo Reed e Muench (1938), infectando-se culturas de células com diluições seriadas das suspensões virais. Foram utilizadas microplacas de 96 orifícios, sendo transferidas alíquotas de 50 µL/orifício de culturas de células confluentes. A diluição seriada dos vírus foi feita a partir de 100 µL de vírus, usando-se o meio MEM não suplementado como diluente (900 µL), até diluição igual a 10⁻⁸. Foram adicionados à microplaca 50 µL de cada diluição, em todos os orifícios de uma mesma coluna, seqüencialmente, da coluna 2 a 9 (diluição 10⁻¹ à diluição 10⁻⁸). A coluna 1 foi utilizada como controle e nos orifícios desta foram adicionados 50 µL de MEM. O título viral foi calculado pelo aparecimento do efeito citopático 72 horas após a infecção.

Avaliação do efeito citotóxico dos EMSs e do AcB

Os efeitos citotóxicos foram previamente avaliados segundo Brito e Lagrota (1981), com modificações. Células VERO e MDBK foram transferidas para microplacas de 96 orifícios. Adotou-se o procedimento de contagem de células em câmara de Neubauer ao efetuar-se a tripsinização (Sanches, 1997), de modo a garantir a transferência de 2x10⁴ células/orifício. A microplaca foi incubada a 37 °C, com 5% de CO₂, durante o tempo necessário para a formação da monocamada (aproximadamente 18 horas). Transcorrido esse tempo, as células foram tratadas com 100 µL dos EMSs ou do AcB, em diferentes concentrações, em triplicata. Foram usados como parâmetro as concentrações descritas por Amoros et al. (1992a, b). As microplacas foram novamente incubadas e monitoradas diariamente sob microscopia óptica (microscópio invertido), durante 72 horas. A concentração máxima não-tóxica para as células MDBK e VERO, para cada extrato testado e para o AcB, foi determinada como a maior concentração que permitia a integridade da morfologia celular e manutenção da monocamada, sem que houvesse granulação ou vacuolização do citoplasma, características essas observadas nos orifícios-controle não-tratados.

Avaliação do efeito dos EMSs e do AcB sobre o título viral

Após obtenção da concentração máxima não-tóxica de cada EMS e do AcB para células MDBK e células VERO, foi possível testar o seu efeito na multiplicação viral. A redução do título viral foi avaliada usando-se microplacas com 50 µL de suspensão de células/orifício. Adotando-se a técnica de contagem de células, conforme descrito, foi possível garantir a quantidade de 2×10^4 células/50 µL. As células foram incubadas a 37°C, com 5% de CO₂, por aproximadamente 18 horas. Foram adicionados em cada orifício 100 µL de MEM com os extratos a serem testados, na concentração máxima não-tóxica pré-determinada e 50 µL de vírus PRV ou BHV-1, em diferentes diluições (10^{-3} a 10^{-8}), em quatro repetições por diluição. As placas foram monitoradas sob microscopia óptica durante 72 horas e a atividade antiviral dos extratos foi determinada pelo título viral, comparado com o controle.

Avaliação da atividade virucida dos EMSs e do AcB

As atividades virucidas dos EMSs e do AcB foram testadas pelo tratamento direto das suspensões virais (com PRV ou BHV-1). Soluções com concentrações de 0, 20, 80 e 150 µg/mL de cada extrato e do AcB em MEM, além de 2,5 µL de tampão n-([2-hydroxyetil]piper-azina-n'-[2-etano-ácido sulfônico]) (HEPES) 1M (Sigma), foram preparadas e incubadas com os vírus a 37°C durante uma hora. A primeira concentração (concentração igual a zero) correspondia ao controle, com MEM e sem EMS ou AcB. Usaram-se 50 µL de suspensão de vírus e 50 µL de solução com extrato nas diferentes concentrações dos vírus (10^{-3} a 10^{-8}). Transcorrido o tempo de incubação de uma hora, diluições seriadas de cada tratamento foram efetuadas (10^{-1} a 10^{-8}), usando-se MEM como diluente. A microplaca foi então preenchida com volumes de 50 µL de cada diluição efetuada, com quatro repetições por diluição. Após 72 horas de observação em microscópio óptico invertido, determinou-se o efeito do material testado no título viral, comparado ao controle.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Teor de fenóis totais dos EMSs

A curva-padrão do ácido gálico e o respectivo coeficiente de correlação obtido encontram-se na Figura 1.

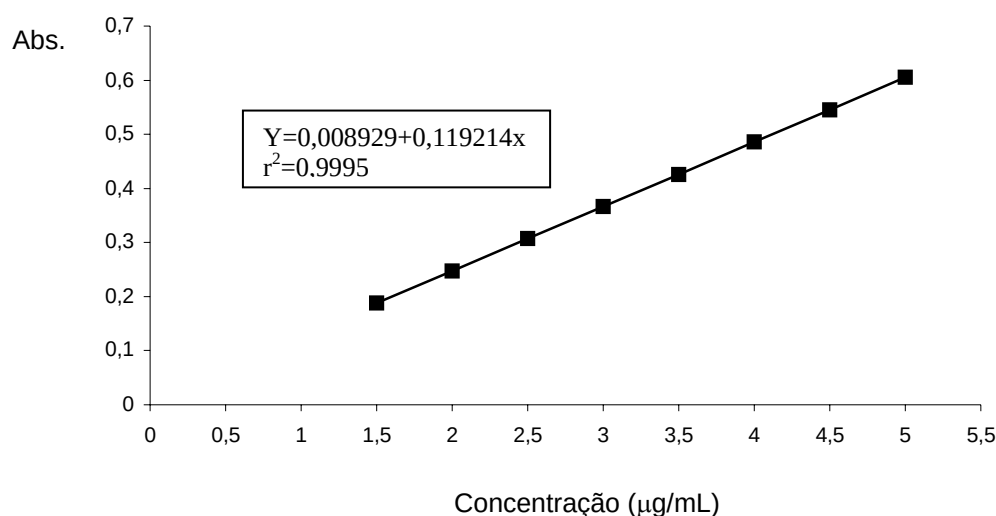


Figura 1. Curva padrão para determinação de fenóis solúveis totais, usando-se ácido gálico como substância de referência.

A obtenção de coeficiente de correlação igual a 0,9995 permitiu avaliar com segurança os teores de fenóis totais dos extratos testados, os quais encontram-se, em termos percentuais, na Tabela 1.

Comparando-se os valores obtidos nos extratos produzidos nos três apiários experimentais (EMS-It, EMS-PC e EMS-V), foi possível constatar diferenças marcantes, sendo o teor de fenóis do EMS-V bastante reduzido. Os extratos EMS-It e EMS-PC apresentaram teores semelhantes, confirmando a semelhança da origem botânica das amostras, conforme apresentado no Capítulo III. Dados preliminares obtidos em análises cromatográficas e espectrométricas (cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de

massas, CG-MS) demonstraram que os principais constituintes químicos presentes nessas amostras são ácidos fenólicos e seus ésteres derivados. Já o EMS-V apresentou perfil diferenciado, constituindo-se principalmente de triterpenóides.

Bankova et al.(1992), trabalhando com própolis da Bulgária, afirmaram serem os compostos fenólicos majoritários nas análises do produto. No entanto, além dos ácidos fenólicos e seus ésteres, muitos desses compostos eram agliconas flavonóides. Também Chrissov e Bankova (1992) afirmaram que esses são os principais grupos constituintes da própolis. Para Midorikawa et al. (2001), o conteúdo de compostos fenólicos da própolis brasileira está diretamente relacionado às suas atividades biológicas.

Considerando-se a variação observada entre teores de fenóis dos doze meses das amostras oriundas de Itapecerica, observa-se que, excetuando-se os meses de janeiro e julho, nos quais os extratos apresentaram teores inferiores (15,5 e 18,63%, respectivamente), nos meses restantes os teores obtidos variaram de 20,88% (referente ao mês de março) a 26,38% (referente ao mês de maio).

Os teores de fenóis totais encontrados por Woisky e Salatino (1998) para amostras de própolis produzidas no Estado de São Paulo variaram de 8,8 a 13,7 g/100g. Os maiores valores foram obtidos com amostras oriundas do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (10,87 e 13,72, respectivamente). Na flora predominante das regiões de coleta, conforme descrito pelos autores, destacavam-se plantações de laranja, eucalipto e flora diversificada no Estado de São Paulo. Já nos Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina a flora foi caracterizada apenas como diversificada. Embora o processo de extração adotado tenha sido semelhante ao efetuado nessa pesquisa, constata-se grande discrepância nos valores encontrados. Possivelmente a contribuição de espécies vegetais diferentes, associada a fatores climáticos, podem ter influenciado para a obtenção de tais resultados.

Analisando amostras de própolis oriundas de diferentes países, inclusive do Brasil, por meio da técnica de Folin-Ciocalteau, Bonvehí e Coll (1994) encontraram valores de substâncias fenólicas compatíveis aos obtidos neste trabalho. Excetuando-se a amostra oriunda do Uruguai, as outras 14 amostras analisadas apresentaram valores que oscilaram entre 18,7 e 33,1 g/100g. A amostra brasileira analisada apresentou valor igual a 18,7 g/100g. Curiosamente, os autores relataram a possibilidade de contribuição das seguintes espécies vegetais para as amostras oriundas do Brasil: *Citrus sinensis* L., *Coffea arabica* L.,

Saccharum officinarum L. e *Eucalyptus* spp. Não existem relatos na literatura sobre a produção de própolis a partir dessas espécies vegetais e, certamente, a origem botânica do produto constitui-se em fator determinante quanto ao perfil químico das amostras. Relato de Maldonado (2000) ilustra de forma adequada tal afirmação. O autor, ao expor o perfil da própolis argentina, apresentou variações de 0,42 a 24,53 % no teor de compostos fenólicos de amostras da região nordeste e noroeste daquele país.

Tabela 1. Teores percentuais de substâncias fenólicas totais dos extratos metanólicos secos (EMSs)

Extrato ¹	Fenóis totais ² (µg/mL)	Fenóis totais (%)
EMS-Itapecerica	1,64	20,5
EMS-Paula Cândido	1,75	21,88
EMS-Virginópolis	0,12	1,50
EMS-Itjan	1,24	15,50
EMS-Itfev	1,85	23,13
EMS-Itmar	1,67	20,88
EMS-Itabr	1,82	22,75
EMS-Itmai	2,11	26,38
EMS-Itjun	1,72	21,50
EMS-Itjul	1,49	18,63
EMS-Itago	1,75	21,88
EMS-Itset	1,84	23,00
EMS-Itout	1,75	23,88
EMS-Itnov	1,76	22,00
EMS-Itdez	1,82	22,75

¹Extratos metanólicos secos mensais obtidos com as amostras coletadas em Itapecerica, ao longo dos doze meses (janeiro: EMS-Itjan, fevereiro: EMS-Itfev, março: EMS-Itmar, abril: EMS-Itabr, maio: EMS-Itmai, junho: EMS-Itjun, julho: EMS-Itjul, agosto: EMS-Itago, setembro: EMS-Itset, outubro: EMS-Itout, novembro: EMS-Itnov, dezembro: EMS-Itdez); ²Expresso como ácido gálico.

Concentrações inibitórias mínimas dos EMSs

Embora existam outras bactérias relacionadas à mastite bovina, o *Staphylococcus aureus* é considerado um dos principais agentes patogênicos associados à enfermidade, a qual se constitui em uma das principais doenças do rebanho leiteiro brasileiro na atualidade. Essa bactéria apresenta resistência a diversos antibióticos sintéticos conhecidos, motivo pelo qual foi escolhida para os testes antibacterianos conduzidos nesta pesquisa.

As MICs obtidas para os EMSs das amostras coletadas nos três apiários experimentais encontram-se apresentadas na Tabela 2. Assegurou-se a padronização dos resultados obtidos com os três isolados e com a ATCC diante dos extratos testados, adotando-se o seguinte critério: considerou-se a MIC como a menor concentração de cada EMS que impedia totalmente o crescimento bacteriano, até duas horas após o início da fase estacionária, tomando-se como parâmetro a curva de crescimento do controle com meio de cultura, sem extrato.

Considerando-se o fato de as concentrações inibitórias mínimas terem sido obtidas em diferentes experimentos, por meio de valores comparados de densidades ópticas de uma mesma microplaca para cada experimento, adotou-se procedimento estatístico que visou possibilitar comparações entre todos os experimentos efetuados. Dessa forma, usando-se as densidades ópticas que correspondiam às concentrações inibitórias mínimas obtidas em cada teste (tomando-se suas triplicadas), foi possível averiguar a existência ou ausência de diferenças significativas entre os EMSs das três localidades, para os três isolados e para a ATCC. A decomposição em contrastes dos graus de liberdade referentes a todas as fontes de variação estudadas, usando-se o teste F, possibilitou a avaliação da eficiência dos extratos na inibição das bactérias, conforme apresentado na Tabela 3.

Constata-se que os extratos oriundos de Itapecerica e de Paula Cândido superaram o extrato oriundo de Virginópolis para todas as bactérias estudadas. Excetuando-se o isolado T-V, para o qual o EMS-PC foi tão eficiente quanto EMS-It, para os outros isolados e para a ATCC, o EMS-It mostrou-se mais eficiente na inibição da multiplicação bacteriana.

Tabela 2. Concentração inibitória mínima (MIC) dos extratos metanólicos secos (EMS) obtidos com própolis de Itapecerica, Paula Cândido e Virginópolis (MG), para três isolados de *Staphylococcus aureus* e para a ATCC (25923)

EMS	<i>Staphylococcus aureus</i>	MIC (mg/mL)
Itapecerica	ATCC	0,12
	T-V	0,30
	V-I	0,30
	V-IV	0,07
Paula Cândido	ATCC	0,22
	T-V	0,30
	V-I	0,30
	V-IV	0,07
Virginópolis	ATCC	0,11
	T-V	0,27
	V-I	0,31
	V-IV	0,11

Os resultados de avaliação da origem botânica dos extratos oriundos de Itapecerica e de Paula Cândido apresentados no Capítulo 3, bem como o conteúdo de substâncias fenólicas totais, demonstram a sua semelhança. Além disso, os perfis químicos observados nos resultados preliminares obtidos por meio de CG-MS corroboram essas constatações. Já o extrato oriundo de Virginópolis apresentou características diferenciadas marcantes, ao ser avaliado sob do ponto de vista botânico e químico.

Bankova et al. (1995), avaliando a atividade antibacteriana de amostras de própolis brasileira para *S. aureus*, afirmaram que a atividade constatada se devia principalmente aos compostos fenólicos presentes. Posteriormente esses autores isolaram compostos antibacterianos da própolis brasileira incluindo quatro ácidos diterpênicos tipo labdano (Bankova et al., 1996). Banskota et al. (2001) reportaram a atividade anti-*Helicobacter pylori* de compostos fenólicos e de diterpenos tipo labdano presentes em própolis.

Na Tabela 4, encontram-se as concentrações inibitórias mínimas obtidas ao serem testados os extratos dos doze meses de coleta na região de Itapecerica. Ressalte-se que esses valores foram utilizados apenas para indicar as densidades ópticas a serem utilizadas no procedimento estatístico proposto, o qual possibilitou estabelecer comparações entre as diferentes microplacas utilizadas.

Tabela 3. Eficiência dos extratos metanólicos secos (EMSs) obtidos com própolis das três localidades, para três isolados de *Staphylococcus aureus* e para ATCC (25923)

<i>S. aureus</i>	Eficiência dos EMSs na inibição da bactéria ¹
ATCC	EMS-It ^a > EMS-PC ^b > EMS-V ^c
T-V	EMS-Ita ^a = EMS-PC ^a > EMS-V ^b
V-I	EMS-Ita ^a > EMS-PC ^b > EMS-V ^c
V-IV	EMS-Ita ^a > EMS-PC ^b > EMS-V ^c

¹ Extratos acompanhados da mesma letra, na mesma linha, não diferem em nível de 5%.

Adotando-se o mesmo procedimento estatístico descrito anteriormente, foi possível avaliar a eficiência dos EMS obtidos nos doze meses de coleta de própolis na região de Itapeccerica, diante da ATCC, conforme apresentado na Tabela 5. Observou-se que a eficiência apresentada pelos extratos, nos diferentes meses em que foram produzidos, foi variável, constatando-se a seguinte ordem: EMS-Itjul > EMS-Itmai > EMS-Itjun > EMS-Itago = EMS-Itnov = EMS-Itmar > EMS-Itout > EMS-Itdez > EMS-Itabr > EMS-Itfev > EMS-Itset > EMS-Itjan.

Sforcin et al. (2000), ao avaliarem o efeito sazonal da própolis brasileira na atividade antimicrobiana, não encontraram diferenças significativas entre própolis produzidas em diferentes estações, embora todas tenham apresentado considerável atividade para bactérias Gram-positivas. Nesta pesquisa, as atividades foram também evidenciadas, havendo diferenças ($p < 0,05$) entre alguns meses sem que houvesse relação direta com a estação do ano.

Diversos estudos evidenciam que as bactérias Gram-positivas apresentam maior sensibilidade à própolis, quando comparadas com bactérias Gram-negativas. Estudando a atividade antimicrobiana de constituintes fenólicos da própolis européia Serra e Escola (1995), citados por Banskota et al. (2001), constataram que para inibir *Staphylococcus aureus* eram necessários 60 a 80 µg/mL de própolis, enquanto para inibir *Escherichia coli* a concentração necessária era dez vezes maior. Sosa et al. (1996) observaram que amostras de própolis inibiam o crescimento de algumas bactérias Gram-positivas, não afetando o

crescimento de bactérias Gram-negativas. Os autores justificam tais constatações em função das diferenças existentes na constituição da parede celular desses microorganismos.

A sensibilidade dos três isolados e da ATCC, em relação aos extratos obtidos nas três localidades, pôde também ser comparada, conforme apresentado na Tabela 6. O isolado V-IV demonstrou maior sensibilidade aos extratos testados, seguido da ATCC. Essa constatação demonstra que esse isolado, embora sujeito às adversidades do meio no qual foi obtido, apresenta mecanismos de defesa menos eficientes que a própria ATCC, o que comprova diferenças na resistência entre bactérias de mesma espécie. O isolado V-I foi o mais resistente para o EMS-It e para o EMS-V, sendo o isolado T-V o mais resistente para o EMS-PC.

Pinto et al. (2001), utilizando a técnica de antibiograma em discos de papel de filtro com sobrecamada de meio de cultura, testou o efeito da própolis oriunda de Itapecerica sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. Os autores observaram que o extrato metanólico (100 mg/mL) apresentou menor capacidade para inibir as amostras bacterianas testadas, quando comparado ao extrato etanólico preparado (também a 100 mg/mL). O fato de as extrações terem sido sequenciais, sendo a fração etanólica obtida primeiro, pode, segundo os autores, ter garantido a presença de maior concentração de compostos bioativos na fração etanólica. Os isolados V-I e V-IV desta pesquisa também foram testados pelos autores os resultados obtidos com essas bactérias não foram compatíveis: V-IV estava incluída no grupo de maior resistência aos extratos alcoólicos testados. Já o isolado V-I estava entre os menos resistentes. Todavia, os autores confirmaram que amostras diferentes de uma mesma espécie bacteriana diferem quanto à sensibilidade à própolis. Posteriormente, esses mesmos autores confirmaram tal observação. Pinto et al. (2003), estudando o efeito de extratos etanólicos de própolis oriunda de Itapecerica, obtidos com álcool 70, 80 e 95%, sobre amostras de *S. aureus* isoladas do leite de vacas com mastite, verificaram que concentrações de 3,0 e 2,0 mg/mL inibiram de forma semelhante às três amostras de bactérias testadas. Os extratos demonstraram a mesma eficiência em termos de inibição. Comparando as duas concentrações para a amostra V-I, a concentração de 3,0 mg/mL foi mais eficiente, diminuindo o número de UFC/mL ($p < 0,05$). Na Tabela 2, observa-se que o mesmo isolado foi inibido eficientemente pelo EMS-It na concentração de 0,3 mg/mL, correspondendo a

Tabela 4. Concentração inibitória mínima (MIC) dos extratos metanólicos secos oriundos de Itapecerica (EMS-It) obtidos nos doze meses de coleta, para a linhagem de *Staphylococcus aureus* ATCC (25923)

Extrato ¹	MIC (mg/mL)
EMS-Itjan	0,30
EMS-Itfev	0,30
EMS-Itmar	0,30
EMS-Itabr	0,26
EMS-Itmai	0,30
EMS-Itjun	0,32
EMS-Itjul	0,32
EMS-Itago	0,26
EMS-Itset	0,26
EMS-Itout	0,26
EMS-Itnov	0,26
EMS-Itdez	0,26

¹ Extratos metanólicos secos mensais obtidos com as amostras coletadas em Itapecerica, ao longo dos doze meses (janeiro: EMS-Itjan, fevereiro: EMS-Itfev, março: EMS-Itmar, abril: EMS-Itabr, maio: EMS-Itmai, junho: EMS-Itjun, julho: EMS-Itjul, agosto: EMS-Itago, setembro: EMS-Itset, outubro: EMS-Itout, novembro: EMS-Itnov, dezembro: EMS-Itdez).

uma concentração dez vezes inferior. É importante ressaltar que a metodologia de extração adotada (uso de extrator Soxhlet, além de sequência de extração diferenciada), associada ao fato de o EMS-It ter sido preparado com amostra composta obtida ao longo de um ano no local, podem ter influenciado sobremaneira a obtenção de extratos com perfis químicos diferentes (qualitativa e quantitativamente). As diferentes técnicas utilizadas (contagem de UFC/mL em placas contendo “Plate Count Agar” e método de diluição em meio líquido com avaliação de D.O. em leitora de Elisa) também podem ter contribuído para essas diferenças. Fato interessante relacionado ao isolado V-I pôde ainda ser constatado: até mesmo o EMS-V, que apresentou perfil químico diferenciado, constituindo-se principalmente de triterpenóides, mostrou-se eficiente na inibição do microorganismo a

Tabela 5. Eficiência dos extratos metanólicos secos oriundos de Itapecerica (EMS-It) obtidos nos doze meses de coleta, para a linhagem de *Staphylococcus aureus* ATCC (25923)

Extrato ¹	D.O. ²
EMS-Itjul	0,344 ^a
EMS-Itmai	0,371 ^b
EMS-Itjuh	0,410 ^c
EMS-Itago	0,440 ^d
EMS-Itnov	0,444 ^d
EMS-Itmar	0,444 ^d
EMS-Itout	0,467 ^e
EMS-Itdez	0,483 ^f
EMS-Itabr	0,502 ^g
EMS-Itfev	0,554 ^h
EMS-Itset	0,574 ⁱ
EMS-Itjan	0,690 ^j

¹ Extratos metanólicos secos mensais obtidos com as amostras coletadas em Itapecerica, ao longo dos doze meses (janeiro: EMS-Itjan, fevereiro: EMS-Itfev, março: EMS-Itmar, abril: EMS-Itabr, maio: EMS-Itmai, junho: EMS-Itjun, julho: EMS-Itjul, agosto: EMS-Itago, setembro: EMS-Itset, outubro: EMS-Itout, novembro: EMS-Itnov, dezembro: EMS-Itdez); ²Valores de densidade óptica (D.O.) acompanhados da mesma letra são iguais no nível de 5%.

uma concentração quase dez vezes inferior à encontrada por aqueles autores. A ação de triterpenóides em bactérias foi discutida por Taylor (1984), citado por Mahato et al. (1992).

Concentrações inibitórias mínimas do AcB

Usando-se o mesmo critério e procedimento adotados para os EMSs em relação às bactérias testadas, constatou-se que a MIC dessa substância é superior a 0,7 µg/mL.

Tabela 6. Concentração inibitória mínima dos extratos metanólicos secos (EMSs) obtidos nas três localidades, para os três isolados de *Staphylococcus aureus* e para a linhagem ATCC (25923)

EMSs	<i>Staphylococcus aureus</i>	D.O. ¹
Itapecerica	V-IV	0,274 ^a
	ATCC	0,467 ^b
	T-V	0,799 ^c
	V-I	0,806 ^c
Paula Cândido	V-IV	0,230 ^a
	ATCC	0,368 ^b
	V-I	0,777 ^c
	T-V	0,804 ^c
Virginópolis	V-IV	0,182 ^a
	ATCC	0,256 ^b
	T-V	0,723 ^c
	V-I	0,745 ^d

¹Valores de densidade óptica (D.O.) acompanhados da mesma letra, para o mesmo extrato metanólico seco, não diferem em nível de 5%.

Doses mais elevadas de DMSO testadas como controle, para garantir a expressão dos resultados de concentrações mais elevadas do AcB, não puderam ser utilizadas, em função da turbidez causada no meio. Essa turbidez inviabilizou a determinação exata da MIC para a substância, uma vez que os valores de D.O. não correspondiam unicamente à detecção da multiplicação bacteriana, havendo interferência do soluto em suspensão no meio. Propõe-se adaptações da técnica para que concentrações mais elevadas do composto possam ser testadas futuramente.

Atividade antioxidante dos EMSs e do AcB

Os resultados obtidos com os testes de atividade antioxidante dos EMSs e do AcB, bem como do BHT, utilizado como controle, encontram-se na Figura 2.

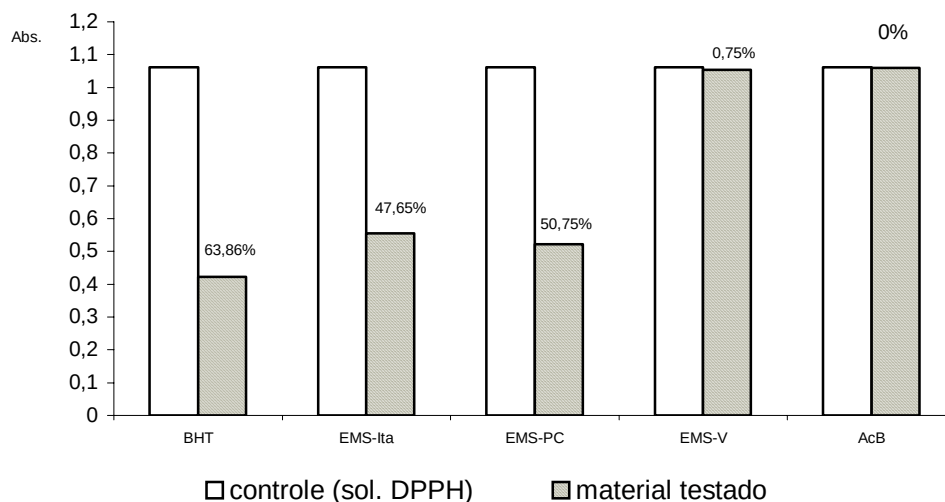
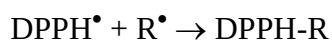
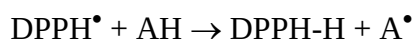


Figura 2. Efeito antioxidante dos extratos metanólicos obtidos com própolis de Itapecerica (EMS-It), de Paula Cândido (EMS-PC) e de Virginópolis (EMS-V), Minas Gerais, bem como do acetato de bauerenila (AcB) e do butilidroxitolueno (BHT) sobre o radical DPPH.

Diversas metodologias têm sido propostas para a avaliação da ação antioxidante de compostos naturais e sintéticos. Testes “in vitro” permitem averiguar a habilidade com que os compostos reagem com os radicais produzidos, muito embora algumas técnicas apresentem custo elevado, além de considerável tempo para que as reações a serem avaliadas transcorram de forma eficiente.

Metodologias simples, mas igualmente informativas emergem neste campo da ciência e, conforme exposto por Aruoma e Cuppett (1997), o uso do radical 1,1–difênil-2-picril-hidrazil, ou simplesmente DPPH, surge como uma interessante alternativa. Neste caso, a atividade antioxidante é determinada usando-se o DPPH como radical livre, permitindo-se que compostos antioxidantes reajam com o radical em soluções alcoólicas. Assim, colocando-se os compostos testados em contato com solução contendo DPPH, é possível monitorar a diminuição da absorbância ocorrida durante a reação. Segundo os

propositores da técnica, Brand-Williams et al. (1995), citados por Aruoma e Cuppett (1997), em sua forma oxidada, o DPPH absorve a 515 nm, mas após redução por um antioxidante (AH) ou combinação com uma espécie radical (R•) a absorção desaparece, conforme ilustram as equações:



Constata-se a eficiência apresentada pelos extratos oriundos de Itapecerica e de Paula Cândido como agentes antioxidantes, não se observando o mesmo com o extrato oriundo de Virginópolis e para o acetato de bauerenila. Considerando-se que os fenóis do EMS-It e do EMS-PC representam parcela significativa da composição das amostras (20,5 e 21,88%, respectivamente), enquanto o EMS-V contém apenas 1,5%, pode-se sugerir que a eficiência apresentada pelos extratos de Itapecerica e de Paula Cândido na redução do radical DPPH esteja ligada à significativa presença de tais compostos. Já o AcB, um triterpenóide pentacíclico, apresentou atividade nula.

Estabelecendo-se um paralelo entre as atividades dos extratos testados e a atividade do BHT, observa-se que o EMS-It e o EMS-PC apresentam 74,4 e 79,47% da atividade do BHT, respectivamente. O butilidroxitolueno (BHT) é um dos principais antioxidantes sintéticos utilizados na indústria de alimentos, além do butilidroxianisol (BHA), do *t*-Butilidroquinona (TBHQ) e do galato de propila (GP), sendo todos compostos fenólicos (Nawar, 1996). Em razão do elevado custo e dos potenciais efeitos toxicológicos desses compostos, tem-se intensificado a busca de substâncias naturais que possam substituí-los, principalmente aquelas de origem vegetal. Um grande número de estudos tem demonstrado que o BHT, por exemplo, pode causar hemorragias internas e externas se utilizado em altas concentrações (Ito et al., 1986), devendo-se manter controle rigoroso quanto às doses utilizadas.

Nesse contexto, a própolis surge como um possível substituto para esses compostos, podendo ser também utilizada em combinações que visem diminuir as doses necessárias de antioxidantes sintéticos em alimentos. Resultados promissores apresentados em trabalhos desenvolvidos nessa área encontram-se freqüentemente em discussões que envolvem o teor

de flavonóides de extratos etanólicos de própolis (Krol et al., 1990, Pascual et al., 1994). Sabe-se, no entanto, que diferentemente da própolis produzida em regiões temperadas, a própolis oriunda dos trópicos apresenta, geralmente, baixo teor de flavonóides. Nesta pesquisa, resultados preliminares de análises efetuadas em CG-MS com os extratos demonstraram que os ácidos fenólicos são os compostos majoritários do EMS-It e do EMS-PC, os quais apresentaram elevada atividade antioxidante. De acordo com Stuckey (1972), os antioxidantes fenólicos são antioxidantes primários, ou seja, reagem com radicais lipídicos de alta energia, convertendo-os em produtos termodinamicamente mais estáveis. Nesse sentido, Nagai et al. (2002), ao avaliarem propriedades antioxidantes de extrato aquoso de própolis importada do Brasil, concluíram que o teor de fenóis presente no extrato (16,8%) foi responsável pela elevada atividade quanto à inativação do radical DPPH. Diante dos resultados obtidos, os autores afirmaram que o extrato aquoso de própolis pode ter um futuro promissor, podendo ser utilizado em pacientes portadores de diversas enfermidades como câncer, doenças cardiovasculares e diabetes. Ressalva importante foi efetuada quanto à necessidade da identificação dos compostos responsáveis pela atividade avaliada e variação da composição do produto, em função do clima e da flora do local de origem.

Park e Ikegak (1998), estudando a atividade antioxidante de extratos etanólicos de própolis oriunda do Estado de Minas Gerais em diversas concentrações (10-95%) e de extrato aquoso de amostras de mesma origem, afirmaram que concentrações hidroalcoólicas de 70 e 80% foram mais eficientes (seguidas de 90, 60, 50 e 40%, nesta ordem). O extrato aquoso e a concentração de etanol 20% apresentaram as piores atividades. Os resultados foram atribuídos à presença de flavonóides nas amostras, embora as análises de cromatografia líquida de alta eficiência realizadas indicaram apenas traços de quercetina e pinocembrina no extrato aquoso.

Russo et al. (2002) evidenciaram importante contribuição do éster feniletílico do ácido cafeico (CAPE) na atividade antioxidante de própolis italiana, ao compararem a atividade de extratos etanólicos isentos ou não desse composto fenólico. O CAPE estaria também relacionado à atividade antiinflamatória de extratos etanólicos de própolis (Rossi et al., 2002, Borrelli et al., 2002) e à prevenção de tumores intestinais de extrato produzido com o uso de propilenoglicol (Ceschel et al., 2002). Por meio de técnicas de biologia

molecular, Natarajan et al. (1996) verificaram que o CAPE é um potente inibidor específico do fator de transcrição NF- κ B, identificado em vários organismos (insetos e mamíferos). Segundo os autores, essa constatação poderia explicar uma das formas de ação desse composto quanto à sua atividade antiinflamatória e imunomodulatória.

A capacidade apresentada pela própolis na remoção de radicais livres também estaria, segundo Scheller et al. (1990) e González et al. (1995), envolvida em efeitos terapêuticos de ativação do sistema imunológico e atividade hepatoprotetora. De acordo com González et al. (1995), os radicais livres podem ser gerados por sistemas como o citocromo P₄₅₀, durante a metabolização de xenobióticos. Alguns estudiosos, testando o efeito hepatoprotetor de extratos de própolis, após ingestão de paracetamol (N-acetilcisteína) por ratos, evidenciaram a capacidade protetora dos extratos. González et al. (1994) comprovaram esse efeito, utilizando extrato etanólico de própolis oriunda de Cuba, por meio de estudos histológicos. O extrato de própolis exerceu efeito hepatoprotetor quando administrado 30 minutos antes ou duas horas após a ingestão da droga. Também Said (2001) constatou que extratos de amostras de própolis oriundas da região de Itapeverica (MG) apresentaram atividade hepatoprotetora nas intoxicações agudas provocadas por paracetamol. Basnet et al. (1996), utilizando galactosamina, verificou a possibilidade de prevenir o efeito hepatotóxico provocado pela droga utilizando extrato aquoso de própolis brasileira. Estudos comprovando a capacidade da própolis em inibir quadros de diabetes (proteção de células β do pâncreas que secretam insulina) apresentam discussões fundamentadas na capacidade de seus constituintes quanto ao poder redutor sobre radicais livres. A estreptozocina (STZ) também estimula a produção de radicais livres, o que leva à destruição e disjunção das células β do pâncreas, podendo esse xenobiótico ser utilizado como agente indutor da diabete (Turk et al., 1993, Kaneto et al., 1995). Matsushige et al. (1996) comprovaram que extrato aquoso de própolis importada do Brasil inibiu a destruição de células β do pâncreas, de forma mais eficiente do que o extrato metanólico, ao utilizar STZ como indutor. Matsuno et al. (1997), trabalhando com uma mistura de amostras de própolis oriundas de São Paulo, Paraná e Santa Catarina, isolaram o composto PRF-1 que apresentou elevada atividade antioxidante. A porcentagem de inibição relativa foi dose-dependente e variou de 32,5 a 93,7%, ao serem testadas concentrações

entre 0,1 e 100 mg/mL do composto. Embora a sua estrutura química não tenha sido completamente elucidada, os autores afirmaram tratar-se de composto fenólico.

Os resultados da avaliação de possíveis diferenças de atividade antioxidante dos EMSs obtidos nos doze meses de coleta de própolis na região de Itapecerica encontram-se ilustrados na Figura 3. Observam-se variações na magnitude dessa atividade apresentada pelos extratos.

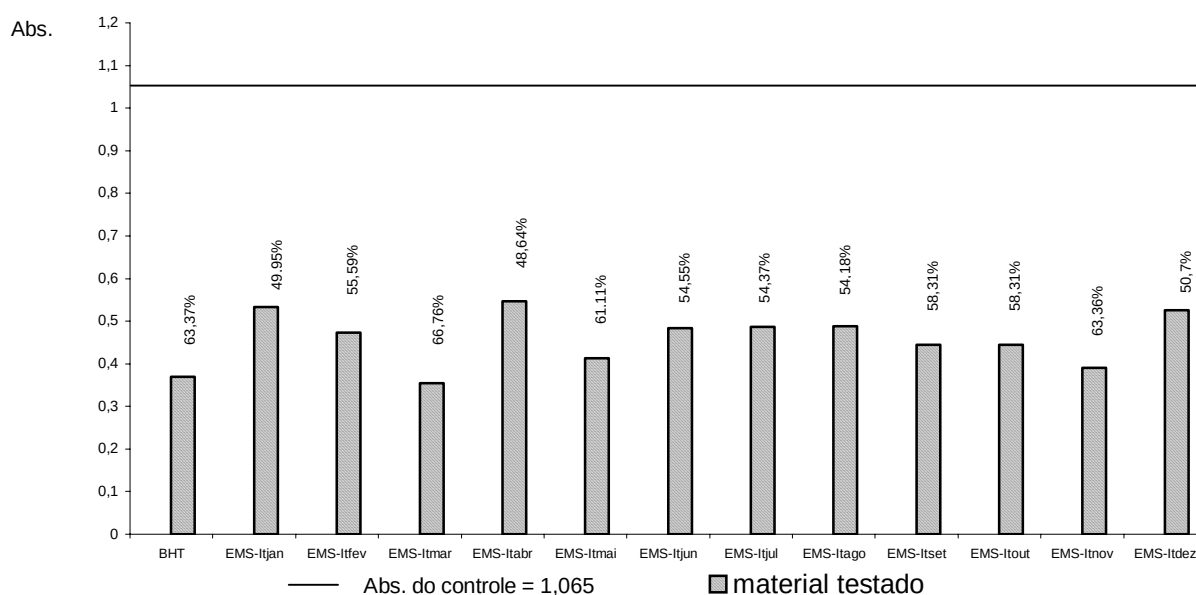


Figura 3. Efeito redutor sobre o radical DPPH de extratos metanólicos secos de amostras de própolis de Itapecerica (MG) ao longo de um ano (janeiro: EMS-Itjan, fevereiro: EMS-Itfev, março: EMS-Itmar, abril: EMS-Itabr, maio: EMS-Itmai, junho: EMS-Itjun, julho: EMS-Itjul, agosto: EMS-Itago, setembro: EMS-Itset, outubro: EMS-Itout, novembro: EMS-Itnov, dezembro: EMS-Itdez).

A análise de variância das leituras de absorbância (usando-se modelo estatístico que continha o efeito fixo de mês de coleta e o efeito aleatório do erro) revelou diferenças significativas em nível de 5%, quando os graus de liberdade referentes a essa fonte de variação foram decompostos em contrastes e avaliados por meio do teste F. Por essa

análise, constatou-se que EMS-Itmar e EMS-Itnov foram os mais eficientes quanto ao efeito redutor sobre o radical DPPH, assemelhando-se, inclusive, à atividade do BHT em nível de 5%. Já os extratos menos eficientes foram EMS-Itjan, EMS-Itabr e EMS-Itdez, semelhantes entre si e diferentes dos demais.

Confrontando-se tais resultados com os teores de fenóis totais obtidos, constata-se que não há relação direta entre o conteúdo de fenóis e o efeito redutor dos extratos. O EMS-Itmai, detentor do maior conteúdo de fenóis (26,38%), embora tenha apresentado considerável atividade antioxidante foi diferente estatisticamente do grupo de maior efeito já mencionado (semelhante ao BHT).

Por outro lado, os meses cujos extratos apresentaram os menores teores de fenóis foram janeiro, julho e março, com 15,5, 18,63 e 20,88%. Observa-se que embora o EMS-Itjan também faça parte do grupo de menor atividade antioxidante, EMS-Itmar assemelha-se ao BHT. Esses resultados confirmam a hipótese de ausência de relação direta do teor de fenóis e da atividade antioxidante testada, sugerindo a possibilidade de existência de compostos específicos de maior ou menor atividade que, dependendo da sua concentração no extrato podem interferir significativamente, aumentando ou diminuindo os valores obtidos quanto ao efeito redutor, ao utilizar-se o radical DPPH. Análise cromatográficas futuras poderão confirmar ou invalidar tais hipóteses.

Ressalte-se que neste estudo avaliou-se apenas a habilidade dos EMSs e do AcB na redução de radicais livres. Todavia, não se deve deixar de considerar que, em função da diversidade de mecanismos já comprovados de oxidação existente em sistemas biológicos (Halliwell e Gutteridge, 1993, Gordon, 1996), a utilização de outros métodos químicos poderia facilitar e/ou complementar o entendimento dos mecanismos de ação dos constituintes da própolis.

Efeito antiviral dos EMSs e do AcB

Efeito citotóxico dos EMSs e do AcB

Os efeitos citotóxicos dos EMSs e do AcB foram avaliados de forma a se obter as concentrações máximas não-tóxicas para as células VERO e MDBK. Os EMSs das

amostras compostas dos doze meses de coleta, de cada apiário experimental, apresentaram toxicidade para células VERO e MDBK equivalente a 20 µg/mL. Em células MDBK o AcB foi mais tóxico, apresentando concentração máxima não-tóxica de 15µg/mL (Tabela 7).

Tabela 7. Toxicidade dos extratos metanólicos secos (EMSs) e do acetato de bauerenila para as células VERO e MDBK

Material testado	Concentração máxima não-tóxica (µg/mL)	
	VERO	MDBK
EMS-Itapecerica	20	20
EMS-Paula Cândido	20	20
EMS-Virginópolis	20	20
Acetato de Bauerenila	20	15

Amoros et al. (1992a), ao avaliarem a atividade antiviral *in vitro* de amostras de própolis produzidas nos arredores de Rennes (França), constataram que a concentração de 30 µg/mL de bálsamo de própolis foi a concentração máxima que não causou efeito tóxico às células VERO. Essa concentração, embora menos tóxica, é muito próxima dos resultados apresentados neste trabalho. Vale salientar que o bálsamo utilizado pelos autores foi obtido após extração em etanol (80%), à temperatura ambiente, durante 18 horas com posterior evaporação do solvente. Os flavonóides foram os principais constituintes presentes nas amostras estudadas. Com o uso de extrator Soxhlet, conforme descrito para o preparo dos extratos testados nesta pesquisa, a extração efetuada é mais eficiente, havendo possibilidade de obtenção de alguns constituintes em maior concentração. Ainda, a origem do produto deve ser considerada ao confrontarem-se tais resultados, sendo determinante quanto aos constituintes químicos presentes nas amostras. Os extratos metanólicos secos obtidos em Itapecerica e em Paula Cândido apresentaram teor de fenóis de 20,5% e de 21,88%, respectivamente, enquanto o teor obtido para o extrato metanólico seco de Virginópolis foi apenas de 1,5%. Dados preliminares referentes à composição desses extratos, analisados por CG-MS, confirmaram tais resultados e indicaram que os ácidos fenólicos são os

principais constituintes presentes no EMS-It e no EMS-PC, com poucos flavonóides presentes. Para o EMS-V, o perfil químico é bastante diferenciado, constituindo-se principalmente de triterpenóides.

Ito et al. (2001) constataram que concentrações de 0,2 a 100 µg/mL ou mais de compostos isolados de própolis produzida na Região Sul do Brasil promoveram efeito citotóxico em células TH9. Dentre os compostos testados estavam presentes triterpenóides, além de compostos aromáticos. Não se observou relação entre a classe do composto testado e a concentração causadora de efeito citotóxico.

Dados publicados pela literatura especializada apresentam variações em relação ao teor de flavonóides presentes na própolis brasileira. Alguns autores, como Park et al. (1998) e Koo et al. (1999), atribuíram ao conteúdo dos flavonóides pinocembrina, crisina, acacetina e galangina de amostras de própolis oriundas da Região Sul do Brasil a maior eficiência cariostática por eles observada. Contudo, resultados obtidos por Woisky et al. (1998) indicaram que o conteúdo de flavonóides de amostras também originárias de municípios localizados na Região Sul do Brasil é considerado baixo (6,79 g/100g de própolis bruta) e inferior ao conteúdo observado em amostras de regiões temperadas. Também Bovehí & Coll (1994) e Bovehí et al. (1994), ao analisarem amostras oriundas da China, Uruguai e Brasil, constataram que os menores valores encontrados para as análises do teor de flavonóides correspondiam às amostras brasileiras.

Efeito no título viral

Os efeitos dos materiais testados em relação à multiplicação do vírus PRV, usando-se células VERO, e do vírus BHV-1, usando-se células MDBK, encontram-se na Tabela 8. Observou-se que 72 horas após a infecção, a concentração de 20 µg/mL de EMS-V, de EMS-PC e de AcB, diante do vírus PRV, promoveu diminuição do título viral, quando comparado com o controle. A magnitude dessa diminuição foi variável (90%, 85,2% e 40,8%, respectivamente), sendo a melhor atividade apresentada pelo EMS-V. Já o EMS-It promoveu aumento da ordem de 46,35% no título do vírus. A mesma tendência não foi observada quando se testaram os extratos metanólicos secos (20 µg/mL) e o AcB (15 µg/mL) com o vírus BHV-1, muito embora ambos pertençam à família

Herpesviridae, subfamília *Alfaherpesvirinae*, sendo, segundo Murphy et al. (1999), revestidos e constituídos de DNA com fita dupla linear. Os resultados revelaram que para o vírus BHV-1 os títulos foram os mesmos ou superiores aos observados para os respectivos controles.

Tabela 8. Efeito dos extratos metanólicos secos e do acetato de bauerenila na multiplicação dos vírus PRV (com células VERO) e BHV-1 (com células MDBK)

Origem e concentração ¹ dos extratos	Efeito sobre o título viral ²	
	PRV (VERO)	BHV-1 (MDBK)
EMS-Itapecerica (20 µg/mL)	+46,35	*
EMS-Paula Cândido (20 µg/mL)	-85,20	+85,50
EMS-Virginópolis (20 µg/mL)	-90,00	+32,33
Acetato de bauerenila (20 e 15 µg/mL)	-40,80	*

¹Concentração máxima não-tóxica de cada material testado, para cada tipo de célula; ²Porcentagem de inibição causada pelo material testado, em relação ao controle, determinada pela avaliação do efeito citopático (ECP); + representa aumento do título viral; - representa diminuição do título viral; * representa inalteração do título viral.

Saliente-se que os testes foram realizados com células de diferentes linhagens para os dois vírus testados, podendo o tipo de célula ser uma importante fonte de variação. Avaliações morfológicas foram empregadas para a identificação de presença ou ausência de efeito citopático, não tendo sido efetuados testes que avaliassem o estado fisiológico das células utilizadas. Esses fatores, associados à formação de sinsícios mais evidentes promovidos pelo vírus PRV, podem ter contribuído para a obtenção de tais resultados.

Constatou-se que, embora haja importante contribuição de triterpenóides na composição do EMS-V, ácidos fenólicos estão também presentes em pequenas quantidades. Estas observações sugerem a existência de importante sinergismo entre esses compostos quanto à atividade antiviral observada, já que o AcB, um triterpenóide pentacíclico, apresentou menor atividade frente ao PRV. Por outro lado, apesar do EMS-PC ter apresentado considerável atividade diante desse vírus, o EMS-It não apresentou a mesma tendência, apesar dos perfis químicos semelhantes desses extratos, quanto às principais classes de compostos presentes.

Amoros et al. (1992b), ao efetuarem combinações entre flavonóides presentes na própolis francesa, constataram interações sinérgicas entre duas ou mais classes desses constituintes contra o herpesvírus simplex tipo 1 (HSV-1). Os autores afirmaram que o sinergismo observado por meio das combinações efetuadas pode explicar porque a própolis é mais ativa do que seus componentes quando avaliados individualmente. Para Ahmad et al. (1986) e Ayisi et al. (1985), citados por Amoros et al. (1992b), a teoria do efeito da combinação de drogas sugere que apenas drogas com diferentes modos de ação podem exibir sinergismo e que tal sinergismo pode resultar de bloqueios sequenciais ou de inibições concorrentes ou complementares das drogas.

Ito et al. (2001), testando a atividade anti-HIV de compostos isolados de própolis brasileira produzida no Município de Uruguaiana (em células TH9), constataram a presença de um tripterpenóide com elevada atividade (quantidade inferior a 0,1 µg/mL de ácido morônico foi suficiente para inibir a replicação viral, considerando 50% de células afetadas). Em função da abundância de *Myrceugenia euosma* (Myrtaceae) na região, os autores sugeriram que o produto teria se originado dessa espécie vegetal. No entanto, outros triterpenóides testados, além de outras classes de compostos isolados, não apresentaram resultados satisfatórios, observando-se pouca ou nenhuma ação.

Efeito virucida dos EMSs e do AcB

Avaliações do efeito direto dos extratos metanólicos secos e do acetato de bauerenila sobre os vírus PRV e BHV-1 encontram-se apresentados na Tabela 9.

As concentrações dos materiais testados foram estipuladas por abrangerem concentrações menores, iguais ou maiores do que as determinadas como concentrações máximas não-tóxicas de cada material testado, para cada célula. É importante salientar que ao terem sido efetuadas diluições seriadas das concentrações testadas, juntamente com os vírus após a incubação, foi possível eliminar o efeito tóxico sobre as células.

Tabela 9. Efeito dos extratos metanólicos secos (EMSs) e do acetato de bauerenila no título viral, após incubação prévia, com o uso de diferentes concentrações¹

Material testado	Concentração do material testado (µg/mL) com PRV (cél. VERO)			Concentração do material testado (µg/mL) com BHV-1 (cél. MDBK)		
	20	80	150	20	80	150
EMS-Itapecerica	+32,33	*	*	+46,52	-87,4	+43,52
EMS-Paula Cândido	-56,33	+46,35	+46,35	+21,03	-81,30	-40,83
EMS-Virginópolis	-72,53	-72,53	+94,11	*	-68,83	-78,17
Acetato de Bauerenila	+68,31	+95,32	-78,65	*	+32,33	+32,33

¹Porcentagem de inibição causada pelo material testado, em relação ao controle, determinada pela avaliação do efeito citopático (ECP); + representa aumento do título viral; - representa diminuição do título viral; * representa manutenção do título viral.

Embora não tenha sido possível observar efeitos proporcionais nos títulos virais com o aumento das concentrações testadas, para o vírus PRV, constatou-se que, com as maiores concentrações, houve decréscimos da ordem de até 72,53% e 78,65% dos títulos virais, obtidos com o EMS-V e com o AcB, respectivamente. Já com o vírus BHV-1, os maiores valores de diminuição do título viral foram apresentadas pelo EMS-It e EMS-V, também com as maiores concentrações.

Amoros et al. (1992a), utilizando células VERO, constatou evidências da atividade “in vitro” da própolis francesa contra poliovírus (PV) e herpesvírus humano (HSV), enquanto o vírus da estomatite vesicular (VSV) e adenovírus foram menos susceptíveis.

Uma análise da literatura científica quanto às pesquisas que objetivaram avaliar a atividade antiviral da própolis revela acentuadas discrepâncias quanto aos resultados obtidos. Para Amoros et al. (1992b), muitas dessas divergências podem ser explicadas pela grande variação de metodologias adotadas, além das diferentes linhagens de vírus e de células utilizadas. Ainda, protocolos diferentes adotados para uma mesma técnica, por exemplo tempo de incubação do vírus com as drogas testadas ou mesmo diversos índices adotados para a interpretação dos resultados obtidos, dificultam o estabelecimento de parâmetros comparativos. Em geral, adota-se como critério de interpretação considerar aumentos ou diminuições do título viral da ordem de até duas unidades logarítmicas na

base 10 simplesmente como inexistência de atividade antiviral. Os autores citados, por exemplo, chegam a estabelecer discussões diferenciadas para a adoção de diferentes critérios dentro de um mesmo trabalho.

Nesta pesquisa, apresentaram-se apenas os resultados constatados em termos percentuais, ao compararem-se os títulos virais obtidos com os diferentes extratos testados e com o AcB, em relação ao controle. Saliente-se, conforme já descrito, que a avaliação do efeito citopático foi feita comparando-se a morfologia celular nos orifícios controles com aquelas observadas nas células que haviam sido tratadas com EMS ou AcB. Os orifícios eram observados em toda a sua extensão, e o tratamento, que não permitia a integridade da morfologia e viabilidade celular, havendo perda da monocamada, granulação ou vacuolização do citoplasma, era considerado como portador de efeito citopático. Por tratar-se de avaliação qualitativa, não foi considerada prudente a adoção de parâmetros quantitativos (faixas de níveis percentuais) quanto ao efeito citopático observado, conforme sugerido por Kujumgiev et al. (1999) ao estudar a atividade antiviral de amostras de própolis de diferentes países e regiões.

Como alternativa, técnicas colorimétricas podem também ser utilizadas para detecção de células viáveis (Serkedjieva e Ivancheva, 1999, Mosmann, 1983). Investigando a atividade antiviral de algumas espécies do gênero *Hipericum*, Schmitt et al. (2001) propuseram o uso de técnicas de biologia molecular para obtenção de informações mais detalhadas quanto à forma de atuação de diferentes compostos na replicação viral. Trata-se de técnicas mais poderosas, que, embora mais dispendiosas e demoradas, produzem resultados mais acurados.

Brito e Lagrota (1981), ao avaliarem o emprego de microtécnicas na triagem de substâncias antivirais (naturais e sintéticas), concluíram que alguns extratos de plantas podem não apresentar atividade, embora contenham uma grande variedade de compostos. Segundo as autoras, esses compostos podem estar presentes em baixas concentrações, impedindo que uma substância ativa revele seu potencial antiviral.

Resultados de atividade antiviral “in vivo” com o uso de própolis são praticamente inexistentes. Objetivando avaliar a eficácia do uso de ungüento à base de própolis em humanos portadores de vírus herpes simplex tipo 2 (HSV-2), Vynograd et al. (2000) constataram melhores benefícios proporcionados pelo ungüento, quanto à cicatrização das

lesões herpéticas com redução dos sintomas locais, quando comparado à droga aciclovir. A própolis utilizada foi produzida no Canadá e extraída com água e posteriormente com etanol. Embora não tenham sido efetuadas análises químicas do produto utilizado, os autores atribuíram os efeitos obtidos ao provável conteúdo de flavonóides presentes.

Os processos de extração diferenciados adotados para o preparo de extratos de própolis, associados aos fatores fenológicos e de origem botânica e geográfica do produto, contribuem sobremaneira para a amplitude dos resultados publicados.

CONCLUSÕES

Amostras de própolis com conteúdo semelhante de substâncias fenólicas apresentam atividades biológicas diferenciadas, sugerindo a presença de certos compostos ativos em concentrações diferentes entre as amostras.

Amostras de própolis de origem botânica e perfil químico semelhantes podem apresentar diferenças quanto à eficiência na inibição da multiplicação de *S. aureus*. Ainda, bactérias de uma mesma espécie podem apresentar sensibilidades diferentes à um mesmo extrato de própolis.

Embora amostras de própolis com teores mais elevados de substâncias fenólicas sejam mais eficientes na inibição de *S. aureus*, os resultados sugeriram possível sinergismo desses compostos com triterpenos.

A sazonalidade é um fator determinante na atividade biológica da própolis.

Os resultados mostraram-se promissores quanto à possibilidade de utilização da própolis que tem como principal fonte *B. dracunculifolia*, como agente antioxidante e antibacteriano (em relação a *S. aureus*).

A associação de elevado teor de triterpenóides e de alguns compostos fenólicos em amostras de própolis pode lhes garantir atividade anti-BHV-1 e anti-PRV. Sugere-se, neste sentido, a proposição de pesquisas futuras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amoros, M., Sauvager, F., Girre, L., Cormier, M. 1992a. *In vitro* antiviral activity of propolis. *Apidologie*, v. 23, p. 231-240.
- Amoros, M., Simões, C. M. O., Girre, L. 1992b. Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. *Journal of Natural Products*, v. 55, n. 12, p. 1732-1740.
- Antunes, R. M. P., catao, R. M. R., Ceballos, B. S. O., 1996. Antimicrobial activity of propolis. *Revista Brasileira de Farmacologia*, v. 77, p. 15-18.
- Aruoma, O. I., Cuppett, S. L. 1997. Antioxidant Methodology: *In vivo* and *in vitro* concepts (ed.). Illinois, Aocs Press, 241p.
- Asis, M. 1991. Propoleo – El oro purpura de las abejas. 1 reimpress. Ciudad de La Habana. Centro de Información y Documentación Agropecuario (CIDA), 256p.
- Bankova, V., Dyulgerov, A., Popov, S. 1992. Propolis produced in Bulgaria and Mongolia: phenolic compounds and plant origin. *Apidologie* 23:79-85.
- Bankova, V., Popov, S. 1994. Phenolics in Albanian poplar buds and their relationship to propolis. *Fitoterapia* 65 (4): 323-330.
- Bankova, V., Dyulgerov, A., Popov, S. 1992. Propolis produced in Bulgaria and Mongolia: phenolic compounds and plant origin. *Apidologie*, v. 23, p. 79-85.
- Bankova, V., Christov, R., Kujumgiev, A., Marcucci, M. C., Popov, S. 1995. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. *Zeitschrift fur Naturforschung*, v. 50, n. 3-4, p. 167-172.

- Bankova, V., Marcucci, M. C., Simova, S., Nikolova, N., Kujumgiev, A., Popov, S. 1996. Antibacterial diterpenic acids from Brazilian propolis. *Zeitschrift fur Naturforschung*, v. 51, n. 5-6, p. 277-280.
- Bankova, V. S., Castro, S. L., Marcucci, M. C. 2000. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, v. 31, p. 3-15.
- Banskota, A. H., Tezuka, Y., Praisain, J. K., Matsushige, M., Saiki, I., Kadota, S. 1998. Chemical constituents of Brazilian própolis and their cytotoxic activities. *Journal of Natural Products* 61: 896-900.
- Banskota, A. H., Tezuka, Y., Midorikawa, K., Matsushige, K., Kadota, S. 2000a. Two novel cytotoxic benzofuran derivatives from Brazilian propolis. *Journal Natural Products*, v. 63, p. 1277-1279.
- Banskota, A. H., Tezuka, Y., Adnyana, I. K. 2000b. Biological evaluation of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 72, p. 239-246.
- Banskota, A. H., Tezuka, Y., Kadota, S. 2001. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytotherapy Research* 15: 1-11.
- Basnet, P., Matsushige, K., Hase, K., Kadota, S., Namba, T. 1996. Four di-O-caffeoyl quinic acid derivatives from propolis. Potent hepatoprotective activity in experimental liver injury models. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 19, p. 1479-1484.
- Basnet, P., Matsuno, M., Neidlein, R. 1997. Potent free radical scavenging activity of propol isolated from Brazilian peopolis. *Zeitschrift fur Naturforschung*, v. 52c, p. 828-833.
- Bier, O. 1985. Técnicas bacteriológicas. In: Bier, O. Microbiologia e imunologia. 24 ed. São Paulo: melhoramentos, 1985, p. 919-998.

- Bonvehí, J. S. & F. V Coll. 1994. Phenolic composition of propolis from China and South America. *Zeitschrift fur Naturforschung*, v. 49c, p. 712-718.
- Bonvehí, J. S., F. V Coll & R. E. Jorda. 1994. He composition, activitie components and bacteriostact activity of propolis in dietetic. *Journal of the American Oil Chemistry Society*, v. 71, p. 529-532.
- Borelli, F., Izzo, A. A., Di Carlo, G., Russo, A., Maiello, F. M., Calasso, F., Mascolo, N. 2002. Effect of a propolis extract and caffeic acid ´phenethyl ester on formation of aberrant crypt foci and tumors in the rat colon. *Fitoterapia*, v. 73, p. 38-43.(Supplement 1).
- Brito, M. A. V. P., Lagrota, M. H. C. 1981. Emprego de microtécnica na triagem de substâncias antivirais. *Revista de Microbiologia*, v. 12, n. 3, p. 65-69.
- Ceschel, G. C., Maffei, P., Sforzini, A., Borgia, S. L., Yasin, A., Ronchi, C. 2002. *In vitro* permeation through porcine buccal mucosa of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) from a tropical mucoadhesive gel conteining propolis. *Fitoterapia*, v. 73, p. 44-52.(Supplement 1).
- Cheng, P. C., Wong, G. 1996. Honey bee propolis: Prospects in medicine. *Bee World* 77:8-15.
- Evans, J. B., Kloos, W. E. 1972. Use of shake cultures in a semisolid thioglycolate medium for differentiating staphylococci from micrococci. *Applied Microbiology*, v. 23, n. 2, p. 326-331.
- García-Viguera, C., Ferreres, F., Tomás-Barberán, F. A. 1993. Study of Canadian propolis by GC-MS e HPLC. *Zeitschrift fur Naturforschung* 48c: 731-735.
- Gary, N. E. 1993. Activities and behavior of honey bees. In: The hive and the honey bee. J. M. Graham (ed.). Michigan, Chelsea, p. 269-361.

- Germano, M. P., Pasquale, R., D'Angelo, V., Catania, S., Silvari, V., Costa, C. 2002. Evaluation of extracts and isolated fraction from *Capparis spinosa* L. buds as an antioxidant source. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, v. 50, p. 1168-1171.
- Ghisalberti, E. L. 1979. Propolis: a review. *Bee World* 60: 59-84.
- González, R., Remírez, D., Rodríguez, S., González, A., Anchieta, O., Merino, N., Pascual, C. 1994. Hepatoprotective effects of propolis extract on paracetamol-induced liver damage in mice. *Phytotherapy Research*, v. 8, p. 229-232.
- González, R., Corcho, I., Remírez, D., Rodríguez, S., Anchieta, O., Merino, N., González, A., Pascual, C. 1995. Hepatoprotective effects of propolis extract on carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. *Phytotherapy Research*, v. 9, p. 114-117.
- Gordon, M. H. 1996. Dietary antioxidants in disease prevention. *Natural Products Reports*, p. 265-272.
- Grange, J. M., Davey, R. M. 1990. Antibacterial properties of propolis (bee glue). *Journal of the royal Society of medicine*, v. 83, p. 159-160.
- Greenaway, W., Scaysbrook, T., Whatley, F. R. 1990. The composition and plant origin of propolis: a report of work at Oxford. *Bee World* 71: 107-118.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. 1993. Free radicals as useful species. In: Free radicals in biology and medicine. Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (eds.). Oxford, Clarendon Press, p. 366-415.
- Harborne, J. B. 1984. Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plant analysis. Second edition. Chapman and Hall, New York, 1984, 124p.
- Holmberg, O. 1973. *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine milk. *Acta*

Veterinaria Scandinavia, p. 1-144.(Supplement, 45).

Ito, N., Hirose, M., Fukushima. 1986. Studies on antioxidants their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogens. *Food Chemistry Toxicology*, v. 24, p. 1071.

Ito, J., Chang, F. R., Wang, H. K., Park, Y. K., Ikegaki, M., Kilgore, N., Lee, K, H. 2001. Anti-AIDS agents. 48. Anti-HIV activity of moronic acid derivatives and the new melliferone-related triterpenoid isolated from Brazilian propolis. *Journal of Natural Products*, v. 64, p. 1278-1281.

Jéane, F. 1984. La propolis et sa récolte par l'apiculteur. *Bulletin Technique Apicole* 11: 45-46.

Kaneto, H., Fujii, J., Seo, H. G., Suzuji, K., Matsuoka, T., Nakamura, M., Tatsumi, H., Yamasaki, Y., Kamada, T. 1995. Apoptotic cell death triggered by nitric oxide in pancreatic β -cells. *Diabetes*, v.44, p. 733-738.

Koo, M. H., Rosalen, P. L., Cury, J. A., Park, Y. K., Ikegaki, M., Sattler, A. 1999. Effects of *Apis mellifera* propolis from two Brazilian regions on caries development in desalivated rats. *Caries Research*, v. 33, p. 393-400.

Kowalski, J. J. 1977. Microbial agents and bovine mastitis. *Journal American Veterinary Medical association*, v. 170, n. 10, p. 1175-1177.

Krol, W., Czuba, Z., Scheller, S., Gabrys, J., Grabiec, S., Shani, J. 1990. Antioxidant property of ethanolic extract of propolis (EEP) as evaluated by inhibiting the chemiluminescence oxidation of luminol. *Biochemistry International*, v. 21, p. 593-597.

Krol, W., Schller, S., Czuba, Z. 1996. Inhibition of neutrophils chemiluminescence by ethanol extract of propolis (EEP) and phenolic components. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 55, p. 19-25.

- Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., bankova, V., Christov, R., Popov, S. 1999. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 64, n. 3, p. 235-240.
- Lee, Y. J., Liao, P. H., Chen, W. K., Yang, C. Y. 2000. Preferential cytotoxicity of caffeic acid phenethyl ester analogues on oral cancer cells. *Cancer Letters*, v. 153, p. 51-56.
- Lin, S. C., Lin, Y. H., Chen, C. F., Chung, C. Y., Hsu, S. H. 1997. The hepatoprotective and therapeutic effects of propolis ethanol extract on chronic alcohol-induced liver injuries. *The Americam Journal of Chinese Medicine*, v. 25, p. 325-332.
- Mahato, S. B., Kundu, A. P. 1994. ¹³C NMR spectra of Pentacyclic triterpenoids – A compilation and some salient features. *Phytochemistry*, v. 37, n.6, p. 1517-1575.
- Mahran, L. G., El-Khatib, A. S., Agha, A. M., Khayal, M. T. 1996. The protective effect of aqueous propolis extract on isolated rat hepatocytes against carbon tetrachloride toxicity. *Drug Experience Clinical Research*, v. 22, p. 309-316.
- Maldonado, I. L. 2000. Perfil de los propóleos argentinos. In: Congresso Internacional de propóleos. Anais...Buenos Aires, Argentina. p. 11-17.
- Matsuno, T. 1995. A new clerodane diterpenoid isolated from propolis. *Zeitschrift fur Naturforschung*, v. 50c, p. 93-97.
- Matsuno, T., Chen, C., Basnet, P. A. 1997. A tumouricidal and antioxidant compound isolated from na aqueous extract of propolis. *Medical Science Research*, v. 25, p. 583-584.
- Matsushige, K., Kusumoto, I. T., Yamamoto, Y., Kadota, S., Namba, T. 1995. Quality evaluation of propolis. 1. A comparative study on radical scavening effects of propolis

- and vespae nidus. *Journal of Traditional Medicines*, v. 12, p. 45-53.
- Matsushige, K., Basnet, P., Hase, K., Kadota, S., Tanaka, K., Namba, T. 1996. Propolis protects pancreatic β -cells against the toxicity of streptozotocin (STZ). *Phytomedicine*, v. 3, p. 203-209.
- Midorikawa, K., Banskota, A. H., Tezuka, Y., Nagaoka, T., Matsushige, K., Message, D., Huertas, A. A. G., Kadota, S. 2001. Liquid Chromatography-mass spectrometry analysis of propolis. *Phytochemical Analysis*, v. 12, p. 366-373.
- Mirzoeva, O. K., Grishanin, R. N., calder, P. C. 1997. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potencial and motility of bacteria. *Microbiology Research*, v. 152, n. 3, p. 239-246.
- Mitamura, T., Matsuno, T., Sakamoto, S. 1996. Effects of a new clerodane diterpenoid isolated from propolis on chemically induced skin tumours in mice. *Anticancer Research*, v. 16, p. 2669-2672.
- Moreira, M. A. S. 2002. Mecanismos de resistência aos antimicrobianos em *Escherichia coli* e em *Enterobacter cloacae*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa (tese de Doutorado), 109p.
- Murphy, F. A., Gibbs, E. P., Horzinek, M. C., Studdert, M. J. 1999. *Veterinary Virology*, 3 ed., Academic Press.
- Nagai, T., Inoue, R., Inoue, H., Suzuki, N. 2003. Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. *Food Chemistry*, v. 80, p. 29-33.
- Natarajan, K., Singh, S., Terrence, R. B., Grunberger, D., Aggarwal, B. B. 1996. Caffeic acid phenethyl ester is a potent specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF- κ B. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of*

- America*, v. 93, p. 9090-9095.
- Nawar, W. W. 1996. Lipids. In: food Chemistry. Fennema, O. R. (ed.). New York, Marcel Dekker Inc., p. 226-319.
- Northenberg, M. 1997. Própolis enfrenta um desafio das pesquisas. *Química e Derivados*, 348: 24-28.
- Park, Y. K., M. H. Koo, H. H. Sato & J. L. Contado. 1995. Estudo de alguns componentes da própolis coletada por *Apis mellifera* no Brasil. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, v. 3, p. 1253-1259.
- Park, Y. K., M. H. Koo, M. Ikegaki & J. L. Contado. 1997. Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, v. 40, p. 97-106.
- Park, Y. K. & M. Ikegaki. 1998. Preparation of water and ethanolic extracts of propolis and evaluation of the preparations. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 62, p. 2230-2232.
- Pascual, C., Gonzalez, R., Torricella, R. G. 1994. Scavenging action of propolis extract against oxygen radicals. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 41, p. 9-13.
- Pereira, A. dos S., Seixas, F. R. M. S., Neto, R. de A. 2002 Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas. *Química Nova*, v.25, n.2, p. 321-326.
- Pinto, M. S., Faria, J. E., Message, D., Cassini, S. T. A., Pereira, C. S., Gioso, M. M. 2001. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. *Brazilian Journal Veterinary Research Science*, v. 38, n. 6, p. 278-283.

- Pinto, M. S., Faria, J. E., Cassini, S. T. A., Message, D., Pereira, C. S. 2003. Curva de sobrevivência de bactérias isoladas do leite de vacas com mastite a três extratos etanólicos de própolis. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, prelo.
- Reed, L. J., Muench, H. 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *The American Journal of Hygiene*, v. 27, n. 3, p. 493-497.
- Remírez, D., González, A., Rodriguez, S. 1994. Hepatoprotective effects of the Cuban red propolis on the toxicity induced in mice by the administration of acetaminophen. *Revista Cubana de Farmacologia*, v. 28, p. 45-54.
- Rodriguez, S., Anchieta, O., Ramos, M. E., Remírez, D., Rojas, E., González, R. 1997. Effects of Cuban red propolis on galactosamine-induced hepatitis in rats. *Pharmacological Research*, v. 35, p. 1-4.
- Rossi, A., Longo, R., Russo, A. , Borelli, F., Sautebin, L. 2002. The role of the phenethyl ester of caffeic acid (CAPE) in the inhibition of rat lung cyclooxygenase activity by propolis. *Fitoterapia*, v. 73, p. 30-37.(Supplement 1).
- Russo, A. , Longo, R., Vanella, A. 2002. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia*, v. 73, p. 21-29.(Supplement 1).
- Said, R. A. 2001. Atividade hepatoprotetora de diferentes concentrações dos extratos aquosos e etanólicos da própolis, nas intoxicações agudas por acetaminofen, em camundongos.. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa (tese de doutorado), 87p.
- Sanches, N. M. 1997. Cultura de células animais. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa (mimiografado), 35p.
- Santos, F. A., Bastos, E. M. A., Uzeda, M., Carvalho, M. A. R., Farias, L. M., Moreira, E. S. A., Braga, F. C. 2002. Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions

- against oral anaerobic bacteria. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 80, p. 1-7.
- Schalm, O. W., Carrol, E. J., Jain, N. C. 1971. Bovine Mastitis. Philadelphia: Lea e febirger, 1971. 360p.
- Sharma, M., Pillai, K. K., Husain, S. Z., Giri, D. K. 1997. Protecive role of propolis against alcohol-carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Indian Journal Pharmacology*, v. 29, p. 76-81.
- Scheller, S., Wilczok, T., Imielski, S., Krol, W., Gabrys, J., Shani, J. 1990. Free radical scavenging by ethanol extract of propolis. *International Journal of Radiation Biology*, v. 57, p. 461-465.
- Schmitt, A. C., Ravazzolo, A. P., Poser, G. L. 2001. Investigation of some *Hypericum* species native to Southern of Brazil for antiviral activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 77, p. 239-245.
- Serkedjieva, J., Ivancheva, S. 1999. Antiherpes virus activity of extracts from the medicinal plant *Geranium sanguineum* L. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 64, p. 59-68.
- Sforcin, J. M., Fernandes Jr., A., Lopes, C. A. M., Bankova, V., Funari, S., R., C. 2000. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 73, p.243-249.
- Soares, J. A. P. 2003. Efeito de flavonóides na multiplicação de BHV-1 e PRV em cultura de células MDBK e VERO. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa (monografia), 38p.
- Song, Y. S., Park, E. H., Hur, G. M., Ryu, Y. S., Kim, Y. M., Jin, C. 2002. Ethanol extract of propolis inhibits nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 80, p. 155-161.

- Sosa S., Baricevic, D., Cinco, M., Padovan, D., Tubaro, A., Della, L. R. 1997. Preliminary investigation on the anti-inflammatory and anti-microbial activities of propolis. *Pharmaceutical Pharmacology Letters*, v. 7, p. 168-171.
- Stuckey, B. N. 1972. Antioxidants as food stabilizers. In: The handbook of food additives. Furia, T. E. Cleveland, CRC Press, p. 185-223.
- Tatefuji, T., Izumi, N., Ohta, T., Arai, S., Ikeda, M., Kurimoto, M. 1996. Isolation and identification of compounds from Brazilian propolis which enhance macrophage spreading and mobility. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 19, p. 966-970.
- Tomás-Barberán, F. A., Garcia-Viguera, C., Vit-Oliver, P., Ferreres, F., Tomás-Lorente, F. 1993. Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. *Phytochemistry* 34: 191-196.
- Turk, J., Corbett, J. A., Ramanadham, S., Bohrer, A., McDaniel, M. L. 1993. Biochemical evidence for nitric oxide formation from streptozotocin in isolated pancreatic islets. *Biochemical Biophysical Research Communication*, v. 197, p. 1458-1464.
- Vynograd, N., Vynograd, I., Sosnowski, Z. 2000. A comparative multi-centre study of the efficacy of propolis, acyclovir and placebo in the treatment of genital herpes (HSV). *Phytomedicine*, v. 7, n. 1, p. 1-6.
- Williamson, E. M. 2001. Synergy and other interactions in phytomedicines. *Phytomedicine*, v. 8, n. 5, p. 401-409.
- Woisky Do Rio, R. G.; Salatino, A. 1998. Analysis of propolis: some parameters and procedure for chemical quality control. *Journal of Apicultural Research*, v. 37, n. 2, p. 99-105

CHAPTER 5

Pentacyclic Triterpenoid Bauer-7-en-3 β -yl acetate Isolated from Brazilian Propolis

Érica Weinstein Teixeira^{1,2} Dejour Message¹, Giuseppina Negri³, and Antonio Salatino⁴

Abstract - The triterpenoid pentacyclic Bauer-7-en-3 β -yl acetate was isolated by the first time from brazilian propolis and represented 7% of the dry mater of the sample analysed. The structure of the compound was elucidated on the basis of spectroscopic analysis (IV, RMN ¹H and ¹³C and mass spectrometry).

Key words: *Apis mellifera*, composition, propolis, triterpenes.

¹ DBA/UFV, Viçosa-MG, Brazil. E-mail: erica1705@terra.com.br ; dmmessage@mail.ufv.br;

² DPRTA do Vale do Paraíba/APTA – SAA/SP

³ Doutora em Ciências/Química Orgânica. E-mail: negrijun@terra.com.br

⁴ Dept. de Botânica/Inst. de Biociências/USP, São Paulo, Brazil. E-mail: asalatin@ib.usp.br

INTRODUCTION

Propolis is a hive product, formed by a complex mixture of beeswax, plant exudates collected by *Apis mellifera* and a suite of other substances (Bankova et al., 2000). Biological activities, such as anticancer, antioxidant, anti-inflammatory and antibiotic (towards bacteria, virus and fungi) have been reported for propolis and its constituents (Banskota et al., 1998, 2001a,b; Burdock, 1998). Interest in its biological properties have stimulated investigations about chemical composition of propolis. Many compounds have been identified in propolis, among which phenolics predominate (Bankova et al., 2000; Miridorikawa et al., 2001). Triterpenoids are ubiquitous non-steroidal secondary metabolites of terrestrial and marine flora and fauna, occurring in the free form as well as in the forms of ether, ester and glycoside. As the name implies, triterpenoids are isopentenoids composed of thirty carbon atoms and may possess acyclic, mono, di, tri, tetra or pentacyclic carbon skeletons. Isoprenoids, such as pentacyclic triterpenoids, have been obtained from propolis in chloroform extracts (Negri et al., 2000, 2003b). Besides, some triterpenic alcohols, such triterpenic alcohols of amyrin type and cycloartenol, have been found in propolis from Brazil and Egypt (Bankova et al., 2000; Ito et al., 2001). Two new long-chain alkanolic acid esters of lupeol were isolated together with amyrins, cycloartenol and lupeol from Brazilian propolis produced with resin collected from alecrim plants (Furukawa et al., 2002). The “green propolis” have yielded predominantly prenylated chromane and phenylpropanoid derivatives, but differently, other types of propolis have yielded different classes of natural products, including triterpenoid alcohols, because it is necessary to make a continuing effort to characterize the different types of propolis. In this work, we are going to report for the first time the isolating of the triterpenoid Bauer-7-en-3 β -yl acetate, which was obtained in high amounts as the unique triterpenoid in one sample of propolis that do not belong of the type of the propolis denominated the “Green propolis”. There has been continued interest in the biological activity of triterpenoids and triterpenoid saponins toward sweetness and anti-HIV, hypoglycaemic, hypotensive, hypocholesterolaemic, antiatherosclerotic and antithrombotic activities (Connolly and Hill, 2001).

MATERIALS AND METHODS

Propolis

Propolis samples produced by *Apis mellifera* (africanized) were collected in the dry season (august/1999), in Paula Cândido, Minas Gerais, Brazil. Seasonal Semideciduous Mountain Forest fragments and its borders, with characteristic succession vegetation, characterize the vegetation at the region.

Extraction

The samples were cut in small peaces (about 2-3mm) and the extract were made with 5 g of sample, which were treated first with methanol and after with chloroform in a Soxhlet extractor during 3 hours, with each solvent. The obtained extract was concentrated, solubilized and filtered in methanol under heating. This compound was obtained as a white crystal, that precipitated into the extract. A small amount (about 1g) of the residue retained on filter paper was previously tested by TLC, dissolved in chloroform and incorporated in silicagel (Merck 60- F₂₅₄). Different triterpenoids were used as reference compounds (ursolic acid and lupeol). A mixture of CHCl₃:Et₂O:AcEt (30:40:40) was used as eluent. TLC is practically always carried out on layers of silica gel. The revelation was made using the most popular TLC employed for triterpenoids, the Carr-price reagent (Harborne, 1984), i.e, 20% antimony chloride in chloroform. A range of colours were produced, on heating sprayed plates for 10 minutes at 100° C. The recrystalization was made using chloroform:methanol (5:2).

Dry residue free of volatile substances

The method adopted was that described by Woisky and Salatino (1998): 5 g of powdered samples were heated in an oven at 105°C for 5 h, cooled to room temperature and placed in a desiccator until constant weight.

Apparatus

IR spectra were obtained with a RX IFT-IR Perkin-Elmer spectrophotometer, in KBr tablet. EIMS spectra were obtained with a Hewlett Packard 5989B spectrometer, interface with a Hewlett Packard gas chromatograph 5890 Series II Plus operating in split mode and using a direct inlet system at a ionization voltage of 70 eV. ^1H NMR (CDCl_3 – 500 MHz) and ^{13}C NMR (CDCl_3 , 500 MHz) spectra were obtained with a Bruker Avance DPX-500.

GC/MS analyses

1 μL of chloroformic solutions was injected into the gas chromatograph. An HP-5 fused silica capillary column (30 m x 0.25 mm), mass selective detector, He as a carrier gas at 32 cm min^{-1} and split ratio 1:10 were used. Oven temperatures ranged from 100 to 350 $^\circ\text{C}$ at 10 $^\circ\text{C min}^{-1}$, ending with an isothermal period of 15 minutes. Injector and detector temperature was 300 $^\circ\text{C}$.

Spectral data of isolated compound

3- β -OAc-BAUERENYL ACETATE or Bauer-7-en-3 β -yl acetate: White crystal. Melting point - 260-5 $^\circ\text{C}$. IR (KBr) ν_{max} . 2948.96, 2850.1, 1732.79 (C=O, acetate) and 1249.6 (C-O) cm^{-1} . EIMS m/z (rel.int.%) 468 (5%) (M^+ , $\text{C}_{32}\text{O}_2\text{H}_{52}^+$), 453 (4%) (M^+ - CH_3), 289 (92%, $\text{C}_{19}\text{O}_2\text{H}_{29}^+$), 229 (100%, $\text{C}_{17}\text{H}_{25}^+$) (Shiojima et al., 1992). ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) ppm: δ 5.387 (1H,d, J = 2.1 Hz, H-7), 4.516 (1H, dd, J = 2.1 and 2.1 Hz, H-3), 2.055 (3H, s, $(\text{CH}_3)_2$ linked to C=O group). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 500 MHz) ppm: δ 171.03 (C=O), 145.45 (C - 8), 116.24 (C - 7), 81.15 (C - 3), 36.51 (C - 1), 24.19 (C - 2), 37.68 (C - 4), 50.55 (C - 5), 23.96 (C - 6), 48.13 (C - 9), 34.86 (C - 10), 16.81 (C - 11), 32.36 (C - 12), 37.72 (C - 13), 41.25 (C - 14), 28.87 (C - 15), 31.51 (C - 16), 32.04 (C - 17), 54.89 (C - 18), 35.18 (C - 19), 38.01 (C - 20), 29.19 (C - 21), 37.75 (C - 22), 27.50 (C - 23), 15.87 (C - 24), 13.03 (C - 25), 23.66 (C - 26), 22.66 (C - 27), 31.93 (C - 28), 25.64 (C - 29), 22.54 (C - 30), 22.48 (C - 32).

RESULTS AND DISCUSSION

The Bauer-7-en-3 β -yl acetate (Figure 1) was isolated as a white crystal. The molecular formula is C₃₂O₂H₅₂ and the IR spectrum showed the presence of a carboxylic acid group in 1732.79 cm⁻¹. In the ¹H NMR spectrum, double bond was indicated by signal at δ 5.40 ppm (1H,d, J = 2.1 Hz, H-7), the presence of a proton in carbon 3 linked to acetate group at δ 4.51 (1H, dd, J = 2.1 and 2.1 Hz, H-3) and the presence of acetate group was indicated by signal at 2.05 δ (3H, s, (CH₃)₃ linked to C=O group). In the ¹³C NMR spectrum, the principal chemical shifts are the signal at δ 171.03 (C=O), indicating the presence of carbonyl group, the signals at δ 145.45 (C - 8) and at δ 116.24 (C - 7), indicating the double bond among carbons seven and eight and the signal at δ 81.15 (C -3) indicating that the acetate group is linked to position 3 of bauerane skeleton. The data are according to Mahato and Kundu, 1994. The sample of propolis, in which this compound was isolated, is different of the “green propolis” and in this sample, the derivatives of cinnamic and benzoic acids were not found. In this way, it is necessary to make a continuing effort to characterize the different types of propolis.

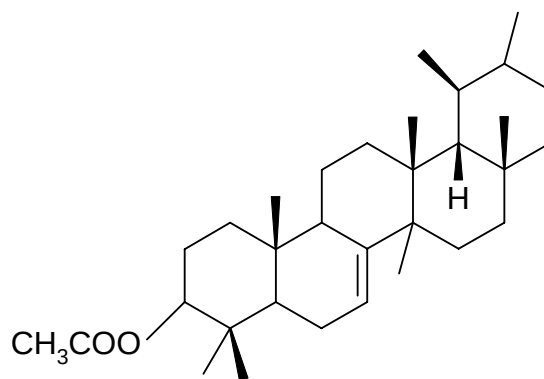


Figure 1 - 3- β -OAc-BAUERENYL ACETATE

REFERENCES

- Bankova, V. S., De Castro, S. L., Marcucci, M. C. 2000. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, v. 31, n. 1, p. 3-15.
- Banskota, A. H., Tezuka, Y., Prasain, J. K., Matsushige, K., Saiki, I., Kadota, S. 1998. Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities. *Journal of Natural Products*, v. 61, n.8, p. 896-900.
- Banskota, A H, Tezuka, Y; Adnyana, I K; Ishii, E; Midorikava, K; Matsushige, K; Kadota, S. 2001a. Hepatoprotective and anti-*Helicobacter pylori* activities of constituents of Brazilian propolis. *Phytomedicine*, v. 8, n.1, p.16-23.
- Banskota, A. H., Tezuka, Y., Kadota, S. 2001b. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytotherapy Research*, v. 15, n. 6, p. 561-571.
- Burdock, G. A. 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food and Chemical Toxicology*, v. 36, n. 2, p. 347-363.
- Connolly, J. D., Hill, R. A. 2001. Triterpenoids. *Natural Product Report*, v. 18, n. 5, p. 560-578.
- Furukawa, S; Takagi, N; Ikeda, T; Ono, M; Nafady, A M; Nohara, T; Sugimoto, H; Doi, S; Yamada, H. 2002. Two novel long-chain alkanoic and esters of lupeol from alecrim-propolis. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 50, n. 3, p. 439-440.
- Harborne, J. B. 1984. Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plant analysis. Second edition. Chapman and Hall, New York, 1984, 124p.

- Ito, J.; Chang, F. R., Wang, H. K., Park, Y K; Ikegaki, M., Kilgore, N., Lee, K. H. 2001. Anti AIDS agents – Anti – HIV activity of moronic acid derivatives and the new melliferone-related triterpenoid isolated from Brazilian propolis. *Journal of Natural products*, v. 64, n. 10, p. 1278-1281.
- Mahato, S. B., Kundu, A. P. 1994. ¹³C NMR spectra of Pentacyclic triterpenoids – A compilation and some salient features. *Phytochemistry*, v. 37, n. 6, p. 1517:1575.
- Midorikawa, K., Banskota, A. H., Tezuka, Y., Nagaoka, T., Matsushige, K., Message, D., Huertas, A. A. G., Kadota, S. 2001. Liquid chromatography-mass spectrometry analysis of propolis. *Phytochemical Analysis*, v. 12, n. 3, p. 366-373.
- Negri, G., Marcucci, M. C., Salatino, A., Salatino, M. L. F. 2000. Comb and propolis waxes from Brazil: Triterpenoids in propolis waxes. *Journal Apicultural Research*, v. 39, n. 1-2, p. 86-88.
- Negri, G., Salatino, M. L. F., Salatino, A. 2003a. “Green propolis”: unreported constituents and a novel compound from chloroform extract. Submitted for publication in *Journal Apicultural Research*.
- Negri, G., Salatino, M. L. F., Salatino, A. 2003b. Unusual chemical composition of a sample of Brazilian propolis, as assessed by analysys of chloroform extract. Submitted for publication in *Journal Apicultural Research*.
- Shiojima, K., Arai, Y., Masuda, K., Takase, Y., Ageta, T., Ageta, H. 1992. Mass spectra of Pentacyclic Triterpenoids. *Chemical and Pharmaceutical Bulletim*, v. 40, n. 14, p.1683-1690.

Woisky Do Rio, R. G., Salatino, A. (1998). Analysis of propolis: some parameters and procedure for chemical quality control. *Journal of Apicultural Research*, v. 37, n. 2, p. 99-105.

CONCLUSÕES GERAIS

Própolis com características organolépticas diferentes das valorizadas pelo mercado podem apresentar atividades biológicas importantes, as quais devem ser averiguadas a fim de se evitar o desmerecimento de considerável parcela da produção nacional.

Avaliações das atividades biológicas da própolis devem estar atreladas a estudos da origem botânica e perfil químico do produto. Desta forma, as informações geradas subsidiarão a indicação de ações farmacológicas específicas, passíveis de serem reproduzidas.

A técnica de inclusão de própolis em metacrilato permite segurança no diagnóstico da origem botânica em virtude da nitidez e detalhamento das características anatômicas observadas nos fragmentos de tecidos vegetais e estruturas secretoras internas e externas presentes, as quais se constituem em importantes indicadores de táxon.