



**AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE  
DE SÃO PAULO**

**APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE IRRADIAÇÃO GAMA PARA  
PRESERVAÇÃO DE PRÓPOLIS**

**ANDRÉA HARUMI MATSUDA**

Dissertação apresentada como parte  
dos requisitos para obtenção do Grau de  
Mestre em Ciências na Área de  
Tecnologia Nuclear -Aplicações.

Orientadora:  
Dra. Nélida Lúcia Del Mastro

**São Paulo  
2002**

**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES**

**Autarquia Associada à Universidade de São Paulo**

**APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE IRRADIAÇÃO GAMA  
PARA PRESERVAÇÃO DE PRÓPOLIS**

**ANDRÉA HARUMI MATSUDA**



**Dissertação apresentada como  
parte dos requisitos para obtenção  
do grau de Mestre em Ciências na  
Área de Tecnologia Nuclear -  
Aplicações**

**Orientadora:  
Dra. Nélida Lúcia Del Mastro**

**São Paulo  
2002**

*Dedico este trabalho aos meu pais,  
Norihito e Haruko, à minha irmã  
gêmea Adriana por estarem sempre ao  
meu lado me apoiando e me  
incentivando*

*Ao meu marido Fabio por todo seu  
amor e companheirismo*

## AGRADECIMENTOS

*À Dra. Nélide Lucia Del Mastro pela orientação, confiança, amizade e estímulo na realização deste trabalho;*

*Ao Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares – IPEN-CNEN/SP, pela possibilidade de realizar este trabalho;*

*À Fapesp pelo suporte financeiro;*

*À Empresa MN Própolis Indústria, comércio e Exportação Ltda., pelo fornecimento das amostras de própolis e utilização do laboratório de controle de qualidade;*

*À MSc. Izilda Cruz de Araújo e Flávia de Assis Souza pelo auxílio na realização das análises físico-químicas;*

*À Adriana Matsuda e Elisa Yonamine por toda ajuda na realização das análises microbiológicas;*

*À Universidade Estadual Paulista – Instituto de Biociências de Rio Claro/Centro de estudos de insetos sociais, pela orientação na realização das análises microbiológicas.*

*Aos Engenheiros Elizabeth Sebastiana Ribeiro Somessari e Carlos Gaia da Silveira do Centro de Tecnologia das Radiações do IPEN-CNEN/SP pela colaboração na irradiação das amostras;*

*Aos bolsistas-amigos pela amizade, contribuições e momentos de descontração;*

*A todos que de alguma forma contribuíram no desenvolvimento deste trabalho.*

**Muito obrigada!**

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
Listas de Tabelas	viii
Listas de Figuras	viii
Resumo	xii
Abstract	xiii
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	
1.1 Considerações gerais	1
1.2 Objetivo	3
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	
2.1 Própolis	4
2.1.1 Definição, função e origem da própolis	4
2.1.2 Características sensoriais e físicas da própolis	5
2.1.3 Composição química da própolis	6
2.1.4 Propriedades biológicas	10
2.1.5 Atividades terapêuticas da própolis	11
2.1.6 Regiões produtoras	11
2.1.7 Controle de qualidade	12
2.1.7.1 Análises físico-químicas	13
2.1.7.2 Análise de compostos fenólicos	14
2.1.7.3 Análises microbiológicas	15
2.2 A técnica de irradiação na preservação de alimentos	17
2.2.1 Situação global	17

2.2.2	Fontes de irradiação	18
2.2.3	Mecanismo de ação da irradiação	19
2.2.4	Aspecto nutricional	22
2.2.5	Aplicações	23
2.2.6	Legislação na área de irradiação de alimentos	25
2.3	Microbiologia dos alimentos	26
2.3.1	Fontes de contaminação dos alimentos	26
2.3.2	Efeitos da radiação nos microorganismos	27
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	
3.1	Material	30
3.1.1	Amostras de própolis	30
3.2	Métodos	31
3.2.1	Irradiação das amostras	31
3.2.2	Análise microbiológica da própolis	33
3.2.2.1	Determinação do Número Mais Provável	33
3.2.2.2	Contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos	34
3.2.2.3	Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp	35
3.2.2.4	Pesquisa de bolores e leveduras	35
3.2.3	Análises físico-químicas da própolis	36
3.2.3.1	Obtenção do extrato etanólico de própolis	36
3.2.3.2	Identificação dos compostos fenólicos por espectro de absorção na região do ultravioleta	37
3.2.3.3	Determinação quantitativa de flavonóides totais por espectrofotometria de absorção molecular	37

3.2.3.4	Determinação semi-quantitativa de compostos fenólicos da própolis por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	38
3.2.3.5	Análise de resíduo seco	39
3.2.3.6	Análise do teor de umidade	40
3.2.3.7	Determinação do teor de cinzas	41
3.2.3.8	Determinação da massa mecânica	41
3.2.3.9	Determinação do teor de cera	42
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	
4.1	Análise microbiológica da própolis	44
4.2	Análises físico-químicas	46
4.2.1	Análise do teor de flavonóides totais	47
4.2.1.1	Análise do teor de flavonóides totais por espectrofotometria	47
4.2.2	Espectro de absorção da própolis	49
4.2.3.	Determinação semi-quantitativa de compostos fenólicos individuais	50
4.2.4	Análise de resíduo seco	53
4.2.5	Análise do teor de umidade	54
4.2.6	Análise do teor de cinzas	55
4.2.7	Determinação da massa mecânica	56
4.2.8	Determinação do teor de cera	57
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	59
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	60



**LISTA DE TABELAS**

	<b>Página</b>
<b>Tabela 1</b> Compostos isolados na própolis bruta	9
<b>Tabela 2</b> Critérios de aceitação para a própolis bruta	16
<b>Tabela 3</b> Faixas de dose de radiação ionizante utilizada para diferentes objetivos	24
<b>Tabela 4</b> Doses letais aproximadas de radiação ionizante expressas em kGy	29
<b>Tabela 5</b> Resultado da análise microbiológica da amostra 1 de própolis submetidas a diferentes doses de radiação gama	45
<b>Tabela 6</b> Resultado da análise microbiológica da amostra 2 de própolis submetidas a diferentes doses de radiação gama	45
<b>Tabela 7</b> Teor de flavonóides totais (mg/g) de amostras de própolis irradiadas	48
<b>Tabela 8</b> Tempo de retenção (minutos) dos padrões	50
<b>Tabela 9</b> Análise de resíduo seco (w/v %) das amostras de própolis irradiadas	53

<b>Tabela 10</b>	Teor de umidade (m/m%) das amostras de própolis submetidas a diferentes doses de radiação gama	54
<b>Tabela 11</b>	Teor de cinzas das amostras de própolis irradiadas	55
<b>Tabela 12</b>	Análise de massa mecânica (m/m%) das amostras de própolis irradiadas	56
<b>Tabela 13</b>	Teor de cera das amostras de própolis irradiadas e não irradiadas (m/m%)	57

**LISTA DE FIGURAS**

	<b>Página</b>
<b>Figura 1</b> Estruturas químicas de compostos fenólicos	8
<b>Figura 2</b> Diagrama de um cromatógrafo líquido	15
<b>Figura 3</b> Amostras de própolis “in natura”	30
<b>Figura 4</b> Amostras de própolis acondicionadas em frascos de vidro	31
<b>Figura 5</b> Fotografias da fonte de $^{60}\text{Co}$ (Gamamacell 220 AECL) utilizadas na irradiação das amostras de própolis	32
<b>Figura 6</b> Blender para moagem das amostras de própolis	32
<b>Figura 7</b> Imagens da obtenção dos extratos etanólicos de própolis	36
<b>Figura 8</b> Espectrofotômetro de absorção molecular	38
<b>Figura 9</b> Cromatógrafo HPLC utilizado para a determinação de compostos fenólicos da própolis	39
<b>Figura 10</b> Analisador de umidade	40
<b>Figura 11</b> Extrator Soxhlet utilizado na análise de massa mecânica	42

<b>Figura 12</b>	Esquema de filtração do extrato obtido em Extrator Soxhlet	43
<b>Figura 13</b>	Esquema de secagem dos papéis de filtro	43
<b>Figura 14</b>	Curva de calibração da quercetina	47
<b>Figura 15</b>	Espectros de absorção dos extratos etanólicos da própolis a) amostra 1 b) amostra 2	49
<b>Figura 16</b>	Cromatogramas da amostra 1 de própolis obtidas pela técnica cromatografia líquida de alta eficiência	51
<b>Figura 17</b>	Cromatogramas da amostra 2 de própolis obtidas pela técnica cromatografia líquida de alta eficiência	52

# APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE IRRADIAÇÃO GAMA PARA PRESERVAÇÃO DE PRÓPOLIS

**Andréa Harumi Matsuda**

## RESUMO

A irradiação vem sendo reconhecida como um método eficiente na redução de microrganismos patogênicos e deteriorantes dos alimentos. A própolis é um material resinoso formado pelas abelhas a partir de produtos do seu metabolismo e de resinas de plantas. O objetivo deste trabalho foi à aplicação da técnica de irradiação gama na preservação da própolis, avaliando-se sua eficiência na redução da carga microbiana. Foram analisadas também as mudanças no teor de flavonóides totais, compostos fenólicos e demais propriedades exigidas na caracterização e qualificação da própolis brasileira. As amostras de própolis provenientes da região de Juiz de Fora, Minas Gerais, foram irradiadas, utilizando-se uma fonte de  $^{60}\text{Co}$ , geralmente com doses crescentes de 0 a 10kGy para as análises microbiológicas e doses de 5,0; 7,0; e 10,0kGy para as análises físico químicas. As análises físico-químicas realizadas foram: determinação quantitativa de flavonóides totais, determinação semi-quantitativa de compostos fenólicos (artepelin C, kaenferol, crisina, galangina e quercetina), análise de resíduo seco, umidade, teor de cinzas, massa mecânica e ceras. A radiação ionizante mostrou-se eficiente na redução da carga microbiana. A determinação de coliformes totais apresentou uma drástica diminuição, a partir da dose de 3kGy, e com relação a bactérias aeróbias mesófilas observou-se uma redução sistemática nas contagens atingindo valores  $<10$  UFC/g para dose de 10kGy; ocorrendo o mesmo comportamento para bolores e leveduras. Os ensaios para salmonelas foram negativos para todas as amostras. Não houve alteração significativa no teor de flavonóides totais e na composição de compostos fenólicos como consequência da aplicação da radiação. As análises complementares como resíduo seco, teor de umidade, cinzas, massa mecânica e cera também não mostraram alteração após a irradiação com a dose máxima de 10kGy, ficando os resultados dentro do padrão exigido pela legislação brasileira

## **APPLICATION OF GAMMA IRRADIATION TECHNIQUE FOR THE PRESERVATION OF PROPOLIS**

**Andréa Harumi Matsuda**

### **ABSTRACT**

Irradiation has been recognized as an efficient method for the reduction of deteriorating and pathogenic microorganisms in foods. Propolis is a resinous product made by bees from material processed by the bee's own metabolism and resins from plants. The aim of this work was the application of gamma irradiation technique for the preservation of propolis, because of its efficiency in the reduction of the microbial load. The changes on the total flavonoids content, phenolic compounds and other characteristics required for the qualification and characterization of Brazilian própolis were also analysed. Propolis samples from Juiz de Fora region, Minas Gerais, were irradiated in a  $^{60}\text{Co}$  source, with doses from 0 to 10kGy for the microbiological analyses and 5.0, 7.0 and 10.0kGy for the physico-chemical analyses. The physico-chemical that have been made were: determination of total flavonoids content, semi-quantitative determination of phenolic compounds (artepelin-C, kaempferol, chrysin, galangin and quercetin), dry matter analysis, humidity, ash content, mechanical mass and waxes. The ionizing radiation has shown to be efficient in the reduction of the microbial load. Total coliforms determination showed a great reduction with the dose of 3kGy and concerning mesophile aerobic bacteria a systematic reduction was observed, achieving values  $<10$  UFC/g for the dose of 10kGy; similar results was obtained for molds and yeasts. Salmonella assays were negative for all samples. There was no significant alteration on total flavonoids contents nor on the composition of phenolic compounds as a consequence of radiation application at the assayed conditions. The complementary analyses of dry matter and humidity contents, ashes, mechanical mass and waxes did not shown changes after irradiation even with the maximum dose of 10kGy, remaining the results within the standards required by the Brazilian legislation.

## 1- INTRODUÇÃO

### 1.1 – Considerações gerais

A própolis é um dos produtos naturais classificados como alimento funcional. Define-se como alimento funcional, qualquer alimento natural modificado ou ingrediente de alimentação que proporcione algum benefício para saúde, além da função nutricional básica de participação no metabolismo primário. Nos últimos anos, o número de alimentos funcionais que apresentam benefícios em potencial para saúde tem revelado um crescimento acelerado. Por tratar-se de uma categoria limítrofe situada entre alimento e medicamento, tem atraído a atenção da comunidade científica e profissionais da saúde para estudos que comprovem a eficácia dos alimentos funcionais na prevenção de várias enfermidades. Dentro deste contexto, os produtos apícolas mel, pólen, geléia real e a própolis vem despertando maior interesse dentro da área alimentícia<sup>(1,2)</sup>.

Própolis é o termo genérico dado para uma resina de coloração e consistência variada, coletada pelas abelhas da espécie *Apis mellifera* de diversas partes da planta como broto, botões florais e, também, de exsudados resinosos. Possui diversas atividades biológicas, tais como: antibacteriana, antiviral, fungicida, antitumoral entre outros<sup>(3)</sup>. Já foram encontrados, pelo menos, 200 compostos em diferentes amostras de própolis, com mais de 100 em cada, incluindo: ácidos fenólicos e ésteres, flavonóides (flavonas, flavononas, flavonols, dihidroflavonols, chalconas), terpenos, sesquiterpenes, entre outras<sup>(4,5)</sup>.

Durante o manuseio, desde a operação de retirada da colméia, separação de contaminantes macroscópicos (folhas, madeiras, insetos, etc.), a própolis pode sofrer contaminação por microrganismos, cujo crescimento pode ser favorecido pelo

armazenamento em condições inadequadas (temperatura, umidade, tipo de embalagem), prejudicando o valor comercial do produto.

Dentre muitas técnicas de esterilização, a irradiação gama vem sendo reconhecida como um método eficiente na redução de microorganismos patogênicos e deteriorantes dos alimentos. Esta técnica, quando aplicada em alimentos, apresenta uma série de efeitos benéficos, incluindo o retardo no amadurecimento e prevenção de deterioração. Elimina insetos, parasitas, bactérias patogênicas, mofo e leveduras; e, como altas doses, esteriliza o produto que permite a estocagem em ambientes não refrigerados por longos períodos. A vida de prateleira de muitas frutas, vegetais e carnes podem ser estendidos por irradiação. O tipo de irradiação utilizado no tratamento de alimentos se limita as radiações provenientes dos raios gama de alta energia, os raios X e os elétrons acelerados. Essas radiações se denominam radiações ionizantes, porque sua energia é suficientemente alta para remover os elétrons dos átomos e moléculas, e para convertê-los em partículas carregadas eletricamente, que se denominam íons<sup>(6)</sup>.

As radiações ionizantes produzem mudanças químicas que podem matar ou inativar microorganismos. Muitas aplicações são realizadas com o intuito de apenas causar redução dos microorganismos presentes em número e variedade, fundamentalmente eliminar o risco de incidência de doenças transmitidas por produtos alimentícios. A aplicação de doses entre 2 e 7 kGy de radiação de Cobalto-60 resulta em uma destruição considerável de microorganismos presentes nos alimentos, praticamente eliminando patógenos. A vida de prateleira de alimentos podem, deste modo, ser estendida, eliminado ou reduzindo a ameaça de doenças causadas por organismos patogênicos<sup>(7)</sup>.

No caso da própolis, não há registro na literatura de trabalhos realizados com o intuito de descontaminá-la por meio da irradiação. Apenas um grupo de pesquisadores poloneses descreveram experimentos realizados na descontaminação de mel de abelhas por radiação<sup>(8)</sup>.



## 1.2 - Objetivo

Este trabalho tem por objetivo a aplicação da técnica de irradiação gama na preservação da própolis. Serão avaliados: a eficiência na redução da carga microbiana e as mudanças no teor de flavonóides totais, compostos fenólicos e demais propriedades exigidas na caracterização e qualificação da própolis brasileira (normativa nº03 Anexo VI de 19 de Janeiro de 2001)<sup>(9)</sup>.

## 2 - REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 - Própolis

#### 2.1.1– Definição, função e origem da própolis

O nome própolis é derivado do grego pro (em defesa) e polis (cidade), o que quer dizer, em defesa da cidade ou da colméia<sup>(3,10)</sup>. As abelhas usam esta substância para protegerem-se insetos e microorganismos, empregando-a para fechar frestas e cavidades, no preparo de locais assépticos para a postura da abelha rainha. A própolis é também utilizada para embalsamar insetos invasores, evitando dessa forma a decomposição desses organismos que acarretariam no crescimento de bactérias e outros microorganismos prejudiciais à colméia<sup>(3,10,11)</sup>. A própolis serve também para manter a temperatura estável dentro das colméias<sup>(10,11,12)</sup>.

Os primeiros estudos sobre a origem da própolis datam do início do século XX, com os trabalhos de Helfenberg<sup>(13)</sup> que mostrou que as abelhas coletam resinas de ramos, folhas, botões de bétula, hulmos e plantas contendo bálsamo e de Joubert<sup>(14)</sup> que comprovou a origem vegetal da própolis.

A colméia pode ser vista como uma pequena cidade que possui organização social definida, onde seus habitantes possuem tarefas e atribuições específicas, e não são vistos como seres isolados. É composta por uma rainha, vários machos ou zangões e pelas operárias. A rainha tem função reprodutiva, chega a pôr 2000 ovos por dia e é fecundada pelo macho; este se alimentam de mel preparado pelas operárias, que estão em maior número na colméia e são responsáveis pela produção de mel, geléia real e própolis, defendem a colméia contra invasões, mantêm a limpeza e fabricam os favos<sup>(15,16)</sup>.

Atualmente, sabe-se que a própolis é formada a partir de produtos do metabolismo das abelhas (ceras), de resinas de plantas (flavonóides, ácidos fenólicos, etc.), de materiais que foram introduzidos durante a elaboração da própolis e substâncias coletadas que sofreram algum tipo de modificação na sua estrutura por alguma enzima presente na saliva das abelhas<sup>(4,17,18,19)</sup>.

Vários pesquisadores relataram o mecanismo de coleta e deposição de resina por abelhas operárias dentro da colméia. Segundo os trabalhos de Cattorini<sup>(20)</sup>, gemas das plantas que se desenvolvem nos ramos atraem as abelhas coletoras que rompem pedaços de resinas, usando as pernas posteriores e as peças bucais. Essas resinas são umedecidas com a língua, formando pequenas esferas pelas mandíbulas. Essas esferas são transferidas da mandíbula para a corbícula, que é uma parte externa posterior da tíbia. Quando a corbícula está totalmente tomada, as abelhas finalmente depositam a resina na colméia. Enquanto as abelhas depositam a resina na corbícula, elas podem também estar elaborando a própolis com a mandíbula.

### **2.1.2- Característica sensoriais e físicas da própolis<sup>(9,13)</sup>**

A coloração da própolis, dependendo de sua procedência, varia de marrom escuro passando a uma tonalidade esverdeada até ao marrom avermelhado. Possui um odor característico que pode variar de uma amostra para outra, assim como existem amostras que não apresentam nenhum odor. O sabor é característico, variando de suave balsâmico a forte e picante, dependendo da origem botânica. O ponto de fusão varia entre 60-70°C e pode atingir, em alguns casos, até 100°C. A própolis é uma substância de consistência rígida à uma temperatura de aproximadamente 15°C, tornando-se maleável a partir de 30°C. Alguns solventes, tais como: éter, etanol, acetona, tolueno e tricloroetileno, permitem a solubilização de muitos constituintes. A parte insolúvel é constituída de matéria orgânica, tecidos vegetais, grãos de pólen e outros. Os compostos solúveis da própolis são constituídos por materiais cerosos, bálsamos, óleos essenciais e derivados fenólicos.

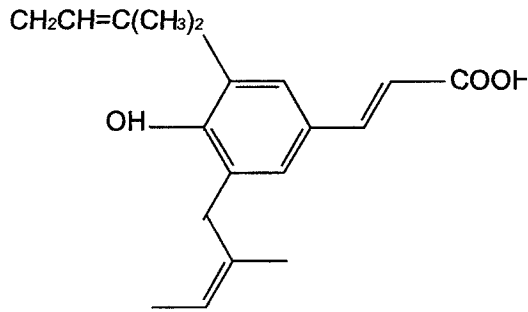
### 2.1.3– Composição química da própolis

A composição química da própolis é muito complexa e variada, estando intimamente relacionada com a ecologia vegetal de cada região visitada pelas abelhas. Tradicionalmente, considera-se que a própolis contém: 50-60% de resinas e bálsamos, 30-40% de ceras, 5-10% de óleos essenciais, 5% de grãos de pólen, além de microelementos como alumínio, cálcio, estrôncio, ferro, cobre, manganês e quantidades de traços de vitaminas B1, B2, B6, C e E<sup>(3,4)</sup>. Atualmente, cerca de 160 componentes já foram identificados, principalmente compostos fenólicos. A maioria dos compostos fenólicos identificados pertencem a dois grandes grupos: 1) fenilpropanóides (ácidos hidroxicinâmicos, flavonóides, ligninas, entre outros) e 2) terpenóides (mono, sesqui, di e triterpenóides), cuja composição varia de acordo com a flora da região produtora<sup>(5,21,22,23,24,25)</sup>, a variedade da abelha rainha e ainda, com a variação sazonal<sup>(26,27)</sup>.

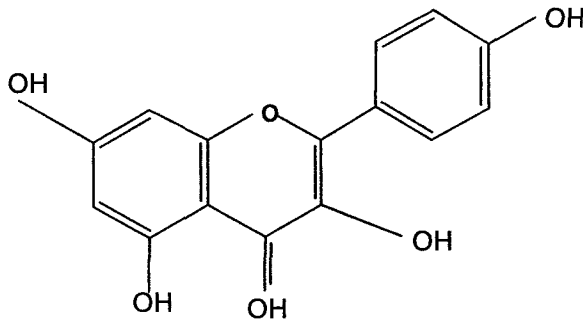
Os flavonóides podem ser quimicamente definidos como compostos que possuem em comum o núcleo benzopirano ou cromano, e são pigmentos responsáveis pela coloração de flores e frutos. Possuem espectros de absorção característicos, devido ao núcleo benzopirona. A presença de hidroxilas no núcleo aumenta o efeito batocrômico, deslocando os espectros de absorção no sentido de comprimento maiores<sup>(28)</sup>.

As classes de flavonóides mais freqüentemente encontradas na própolis são representadas pelas flavonas, flavonóis, diidroflavonóis, flavanonas, chalconas e diidrochalconas<sup>(4,29,30)</sup>.

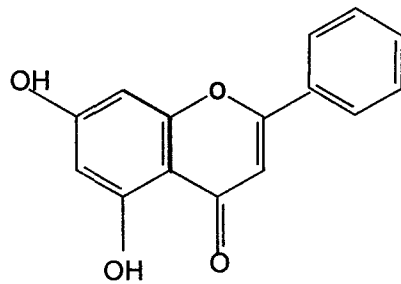
Alguns compostos fenólicos utilizados para estabelecer a qualidade da própolis são: artepelin-C, canferol, crisina, galangina e quercetina. As estruturas químicas podem ser visualizadas na figura 1<sup>(31)</sup>.

**Artepinin-C**

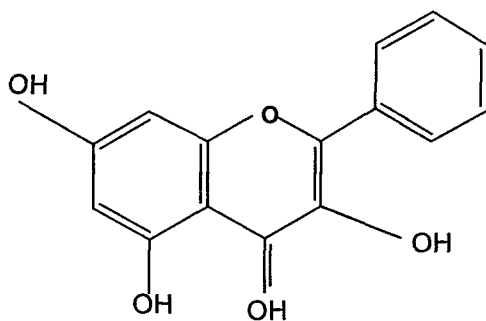
Nome químico: ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico

**Canferol**

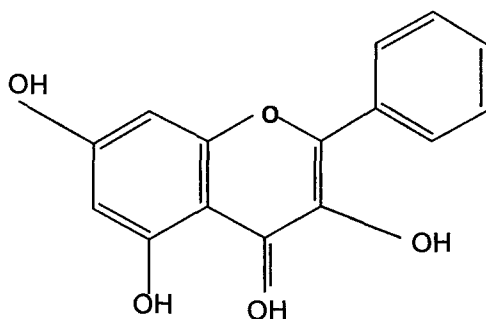
Nome químico: 3,5,7, triidroxi-2-(4-hidroxifenil)-4H-1-benzopirano-4-ona; 3, 4, 5, 7-tetraidroxiflavona.

**Crisina**

Nome químico: 5,7-diidroxi-2-fenil-4H-1-benzopirona-4-ona; 5,7-diidroxi-flavona

**Galangina**

Nome químico: 3,5,7-triidroxi-2-fenil-4H-1-benzopirona-4-ona; 3,5,7-triidroxi-4H-1-benzopirano-4-ona; 3,5,7-triidroxi-4H-1-benzopirano-4-ona; 3,5,7-triidroxi-4H-1-benzopirano-4-ona; 3,5,7-triidroxi-4H-1-benzopirano-4-ona

**Quercetina**

Nome químico: 2-(3,4-diidrofênil)-3,5,7, triidroxi-4H-1-benzopirano-4-ona; 3, 3', 5, 7-pentaidroxi-4H-1-benzopirano-4-ona; 3, 3', 5, 7-pentaidroxi-4H-1-benzopirano-4-ona; 3, 3', 5, 7-pentaidroxi-4H-1-benzopirano-4-ona; 3, 3', 5, 7-pentaidroxi-4H-1-benzopirano-4-ona

Figura 1– Estruturas químicas de compostos fenólicos

Outros componentes, como derivados do benzaldeído, compostos heteroaromáticos<sup>(32)</sup>, compostos terpênicos<sup>(33)</sup>, minerais e aminoácidos<sup>(34,35,36)</sup>, estão presentes em menores quantidades. Exemplos de compostos já isolados na própolis podem ser visualizados na tabela 1.

Tabela 1- Compostos isolados na própolis bruta<sup>(4,30)</sup>

ESTRUTURA BÁSICA	COMPOSTO
Álcoois	Álcool cinâmico, glicerol, hidroquinona, isobutanol, álcool prenílico
Aldeídos	Benzaldeído, Aldeído caprício, Hidroxibenzaldeído, Isovanilina
Ácidos alifáticos e ésteres alifáticos	Ácido acético, ácido butírico, ácido fumárico, ácido isobutírico.
Aminoácidos	Alanina, ácido glutâmico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, tirosina, cistina, prolina,
Ácidos Aromáticos	Ácido benzóico, ácido caféico, ácido cumárico, ácidos ferúlico, ácido gálico
Ésteres Aromáticos	Acetato de benzila, benzoato de benzila, cafeato de benzila
flavanonas	Naringenina, alpinetina pinobansquina, pinocembrina, pinostrombina
Flavonas e flavonóis	Acacetina, apigenina, crisina, galangina, canferol, quercetina, ramnetina
Ácidos graxos	Ácido esteárico, ác. láurico, ác. linoléico, ác. cerótico, ác. oléico, ác. palmítico.
Terpenóides	$\beta$ -bisabolol, geraniol, farnesol
Açúcares	Frutofuranose, sacarose, xilitol.
Minerais	Mg, Ca, Zn, Cd, Al, Pb, Fe, Mn

### 2.1.4– Propriedades biológicas

A atividade biológica da própolis está diretamente relacionada com a presença de substâncias específicas e, dada a possibilidade de conter diferentes componentes de acordo com a região de coleta, é comum encontrar própolis com diferentes atividades biológicas: a antimicrobiana, cicatrizante, anestésica, antiinflamatória<sup>(3,11,28)</sup>, anticariogênica<sup>(37,38,39)</sup>, antitumorais<sup>(40,41,42)</sup>, citotóxica<sup>(43,44,45)</sup> e antiviral<sup>(46,47,48,49,50)</sup>

A atividade antibacteriana da própolis é atribuída à ação dos flavonóides, ácidos aromáticos e seus ésteres presentes na resina<sup>(51)</sup>. O ácido caféico demonstrou atividade contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas vulgaris* e o ácido ferúlico contra algumas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas<sup>(3)</sup>. A galangina, pinocembrina e pinostrobina têm sido reconhecidos como os flavonóides de maior atividade antibactericida<sup>(52)</sup>. O ácido ferúlico e caféico também contribuem para a ação bactericida da própolis<sup>(10)</sup>. GRANGE e DAVEY<sup>(53)</sup> observaram que a própolis possui atividade maior contra bactérias gram positivas, mostrando uma atividade limitada contra algumas bactérias Gram negativas<sup>(53)</sup>.

Kedzia e colaboradores<sup>(54)</sup>, Krol e colaboradores<sup>(55)</sup> e Scheller e colaboradores<sup>(56)</sup> observaram que o mecanismo da atividade antimicrobiana é muito complexa e que pode estar associado ao efeito sinérgico entre flavonóides, hidroxiácidos e sesquiterpeno.

Debiaggi e colaboradores<sup>(46)</sup> estudaram o efeito de flavonóides da própolis sobre a capacidade de infecção e replicação de certas cepas do vírus da herpes, adenovírus e rotavírus. Foi avaliada a citotoxicidade dos flavonóides constituintes da própolis, como crisina, canferol, acetina, galangina e quercetina.

Millet-Clerk e colaboradores<sup>(57)</sup> observaram que a própolis apresentou um importante potencial antifúngico contra espécies do gênero *Trichophyton* e *Mycrosporium*, na presença de proprilenoglicol que mostrou um sinergismo com a própolis. Efeitos sinérgicos do extrato etanólico de própolis associado a drogas antifúngicas contra *Candida albicans*, também foram comprovados<sup>(4)</sup>.



O estudo das atividades biológicas requer o conhecimento prévio da composição da própolis, pois é ela que determina a natureza dos efeitos biológicos. Deve-se levar em consideração que algumas própolis podem apresentar a maior parte de suas atividades simultaneamente, enquanto que outras podem apresentar uma atividade biológica quase nula. Por esta razão, não se pode generalizar as propriedades biológicas de cada tipo de própolis<sup>(28)</sup>.

### 2.1.5 - Atividades terapêuticas da própolis

A própolis possui propriedades anti-inflamatórias que foram descritas principalmente contra doenças do sistema muscular-articular e outros tipos de inflamações, infecções, reumatismos e torções<sup>(3,4)</sup>. Foi utilizada na dermatologia como na cicatrizante de ferimentos, regenerador de tecidos, no tratamento de queimaduras, neurodermites, eczemas, dermatite de contato, úlceras externas, lepra, *Herpes simplex*, *zoster* e *H. genitalis*, além dos pruridos e dermatófitos<sup>(58,59)</sup>. Demonstrou ser efetiva contra doenças do aparelho digestivo, indicando uma grande atividade hepato-protetora e um agente anti-úlceras<sup>(60)</sup>. Na odontologia foi utilizada como anestésico e foi empregada em dentifrícios, preparações para lavagem bucal, tratamento de gengivites, quelite e na pós-extração dentária<sup>(61,62)</sup>. São também conhecidas as suas propriedades anti-sépticas, adstringentes, hipotensivas e citotásticas<sup>(3)</sup>.

### 2.1.6– Regiões produtoras

No Brasil, praticamente pode haver produção da própolis em toda sua extensão, porém, sua qualidade varia de uma região para outra em função de diversos fatores ambientais.

Conhece-se própolis das regiões Nordeste (Bahia), Norte (Amazonas), Centro-Oeste (Mato Grosso, Goiás), Sudeste (São Paulo, Minas Gerais), Sul (Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul), de características variadas conforme a região.

Entretanto, a área de produção da própolis de qualidade internacionalmente reconhecida é a proveniente da região sudeste, principalmente o estado de Minas Gerais.

### **2.1.7– Controle de qualidade**

Para assegurar que um produto com qualidade chegue às mãos dos consumidores, devem ser estabelecidas normas específicas para todas as fases de produção da própolis e obtenção de seus derivados. Após a coleta, controles específicos devem ser realizados na própolis bruta. A análise de aspectos físicos (cor, odor, sabor, estrutura, consistência) possibilita a avaliação inicial da qualidade do material analisado. Os aspectos químicos do material bruto devem ser realizados utilizando-se técnicas específicas<sup>(63)</sup>.

A demanda crescente no consumo da própolis como alimento suplementar, principalmente a partir do início da década de 90, vem exigindo o estabelecimento de normas de controle de qualidade até então inexistentes, principalmente, para atender e competir no mercado internacional. Nesse sentido, as entidades governamentais, responsáveis por essa área, desenvolveram e estabeleceram regulamentos técnicos de Identidade e Qualidade de produtos apícolas, inclusive da própolis, e publicados em Janeiro de 2001<sup>(9)</sup>.

### 2.1.7.1 - Análises físico-químicas

- a) Análises macroscópicas: aspectos gerais como cor, aparência (viscosa, mais dura, etc.), cheiro, etc..
- b) Teor de cera: todas as amostras de própolis apresentam cera em sua composição, cujo teor pode variar de uma amostra para outra.
- c) Teor de resíduo: o teor de resíduo seco insolúvel em álcool etílico também pode variar de uma amostra para outra.
- d) Teor de extrato etanólico (EEP): é o obtido quando se faz a maceração da própolis em álcool etílico, após a retirada da cera e do resíduo.
- e) Umidade: é importante avaliar o teor de umidade, pois, se a amostra estiver com um índices elevados, ocorrerá o crescimento de fungos sobre a mesma (especialmente quando se retira do freezer e se embala), e se tornará imprópria para o consumo e comércio.
- f) Teor de cinzas: é toda matéria de origem mineral existente na amostra. O teor de cinzas é obtido ao se calcinar a própolis, eliminando-se toda a matéria orgânica. No material resultante estão presentes metais como potássio, chumbo, cádmio, cobre, zinco, estanho, entre outros.
- g) Propriedades redutoras (índice de redução): após um determinado período de tempo, a amostra passa a exercer o poder antioxidante. Por este motivo, a própolis é utilizada em alguns países como antioxidante em embalagens de alimentos.
- h) Fenóis totais: substâncias fenólicas como ácidos (caféico, ferúlico, p-coumárico, etc..), ésteres (cafeato de feniletila, p-cumarato de benzila, etc..) e flavonóides (quercetina, canferol, galangina, pinocembrina, etc..).

- i) Flavonóides totais: é a determinação específica da presença de flavonóides em própolis avaliada pelo teor de quercetina.
- j) Massa mecânica: resíduo remanescente da extração dos componentes da própolis com álcool etílico<sup>(64)</sup>.

Os requisitos físico-químicos que a própolis deve atender são<sup>(9)</sup>:

- Umidade: máximo de 8%
- Cinzas: máximo de 5%
- Ceras: máximo de 25%
- Massa mecânica: máximo de 40%

#### 2.1.7.2 – Análise de compostos fenólicos

O método reconhecidamente mais adequado para a análise de compostos fenólicos é a cromatografia líquida de alta eficiência.

A cromatografia de alta performance (HPLC, “high pressure liquid chromatography”) envolve a utilização de instrumental sofisticado e constitui hoje uma das principais técnicas analíticas, com vantagens muito significativas sobre as outras técnicas cromatográficas.

Neste método, usam-se colunas de diâmetro pequeno empacotadas com a fase estacionária sob a forma de micropartículas. Este tipo de coluna é muito eficaz, mas oferece uma grande resistência ao fluxo da fase móvel, ou seja, ocorre uma grande queda de pressão ao longo da coluna. Por esta razão é necessário empregar-se sistemas de bombeamento do eluente através da coluna com pressão alta, para fazer fluir a fase móvel com uma velocidade razoável. O esquema do cromatógrafo líquido pode ser visualizado na figura 2.

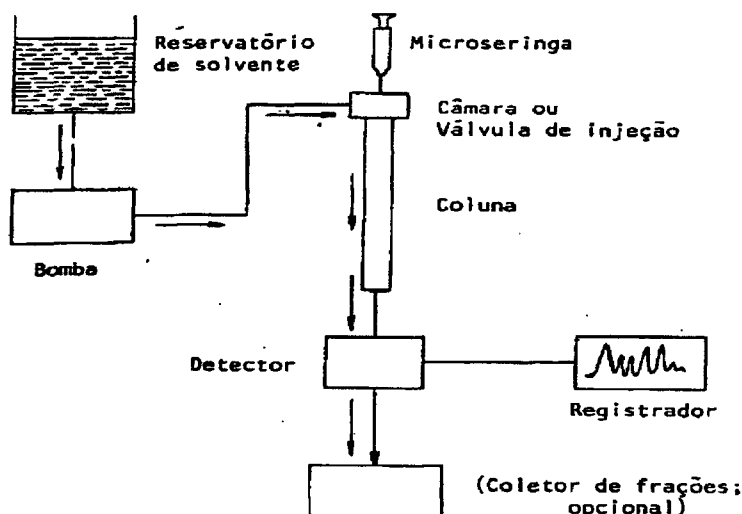


Figura 2. Diagrama de um cromatógrafo líquido

Inicialmente a coluna é eluída sob pressão durante algum tempo com um solvente escolhido para que as condições de equilíbrio sejam atingidas. O solvente eluído da coluna, ao passar pelo detector, gera um sinal que no registro gráfico corresponde à linha base (zero). A amostra em análise é injetada diretamente na coluna através de seringa de alta pressão ( $< 100$  atm); sob pressões mais elevadas são utilizadas válvulas de injeção. Os componentes da mistura são fracionados dentro da coluna e sua eluição monitorada por medidas físicas no detector (absorbância e índice de refração). Coluna e detector devem, necessariamente, estar contidos em ambiente termostatizado. Cada componente eluído gera um sinal ao passar pelo detector, o qual é em seguida amplificado e registrado<sup>(65)</sup>.

### 2.1.7.3 – Análises Microbiológicas

Além de análises químicas, é de suma importância a realização de ensaios microbiológicos nas amostras de própolis. As análises que foram realizadas estavam baseadas na legislação para produtos apícolas, mais especificamente na do mel<sup>(66)</sup>. Desde janeiro de 2001, foi abolida a legislação para produtos apícolas, ficando estabelecido os

critérios das Boas Práticas de Fabricação (Portaria 368 de 04/09/97)<sup>(67)</sup>. Entretanto, é conveniente um controle microbiológico interno nas indústrias para um maior controle e garantia da qualidade por exigências do mercado internacional e seguindo tendências de aprimoramento da qualidade do produto nacional. Os critérios seguidos encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 – Critérios de aceitação para a própolis bruta<sup>(66)</sup>

Análise	Critério de aceitação
Coliformes totais (NMP/g)	n=5 c=0 m=0 (ausência)
<i>Salmonella sp – shigella sp</i> em 25g	n=10 c=0 m=0 (ausência)
Bacterias aeróbias mesófilas (Contagem padrão em placas) (UFC/g)	_____
Bolor e levedura	n=5 c=10 M=100

Onde: a) n = é o número de unidades a serem coletadas e analisadas individualmente;

b) c = é o número de unidades que pode apresentar resultado entre os valores de m e M (plano de três classes). Quando o valor de c for igual a zero, existe apenas um valor de tolerância (plano de duas classes);

c) m = é o limite inferior (mínimo) aceitável. É o limite que separa uma qualidade satisfatória de uma qualidade marginal;

d) M = é o limite superior (máximo) aceitável para um dado critério microbiológico.

## 2.2– A Técnica de irradiação na preservação de alimentos

### 2.2.1 – Situação global<sup>(68,69)</sup>

Apesar do alto nível de segurança dos produtos alimentícios fornecidos para consumo, os perigos e riscos microbiológicos continuam existindo, observados nos números expressivos das estatísticas de incidência de enfermidades transmitidas por alimentos.

Ao lado destes problemas, registram-se perdas de alimentos em grandes quantidades devido à deterioração, constituindo um grande problema que atinge, principalmente, países em desenvolvimento. Estima-se que cerca de 50% dos produtos perecíveis como carne e frango, peixes e frutos-do-mar, frutas e vegetais, sejam perdidos antes de atingirem o consumidor final.

Grande parte das perdas se deve à infestação por insetos, que até recentemente era combatida através de fumigação utilizando-se compostos químicos. Estas perdas contribuem diretamente para agravar os problemas de desnutrição e aumentar o nível de fome da população em geral causando, conseqüentemente, a diminuição da produtividade e aumentando a predisposição a enfermidades.

Na esfera do comércio internacional, são interpostas barreiras dificultando a exportação de alimentos produzidos por países em desenvolvimento, afetando ainda mais suas economias.

Frente a esta situação, a irradiação de alimentos constitui importante método capaz de diminuir as perdas econômicas decorrentes da deterioração e a eliminação de insetos e microorganismos patogênicos, aumentando o nível de segurança dos alimentos e favorecendo a aceitação dos produtos exportados pelos países em desenvolvimento.

É importante destacar que a irradiação dos alimentos não substitui a manipulação adequada dos produtos, pois não é capaz de melhorar a qualidade de um produto cuja qualidade seja duvidosa; o procedimento não devolve suas propriedades sensoriais normais, ou seja, não elimina odores e sabores desagradáveis, assim como o mau aspecto dos alimentos decompostos. Também, não é capaz de prevenir a contaminação posterior que pode ocorrer durante a estocagem ou o processamento do alimento irradiado.

### 2.2.2 – Fontes de irradiação

A irradiação de alimentos requer uma exposição controlada e cuidadosa frente a radiação ionizante de energia conhecida. A exposição deve ser adequada para produzir um resultado desejado, evitando, ao mesmo tempo, a degradação do alimento<sup>(7)</sup>.

A legislação brasileira, que tem como base as recomendações da Comissão do Codex Alimentarius, estabelece que: *“Poderão ser utilizadas nos alimentos as irradiações ionizantes, em geral, cuja energia seja inferior ao limiar das reações nucleares que poderiam induzir radioatividade no material irradiado”* <sup>(70)</sup>. Dessa maneira, as fontes de radiação utilizadas para a irradiação de alimentos são: os raios gama dos radionuclídeos  $^{60}\text{Co}$  ou  $^{137}\text{Cs}$ ; raios-X gerados por máquinas com energia máxima de 5MeV e feixes de elétrons com uma energia máxima de 10MeV. Dos radionuclídeos o Césio-137 praticamente não é mais utilizado, devido a sua baixa disponibilidade. O Césio-137 é produzido como resultado da fissão do urânio e pode se recuperar como subproduto do reprocessamento do combustível nuclear. Vários países planejaram a construção de usinas de reprocessamento em grande escala nos anos 60 e 70, época na qual se generalizou o uso do  $^{137}\text{Cs}$  como fonte de raios gama. Entretanto, por diversas razões, as usinas de reprocessamento não chegaram a ser construídas, de modo que não se dispõe de  $^{137}\text{Cs}$  nas quantidades que se requer para a irradiação comercial dos alimentos. Dessa forma, o  $^{60}\text{Co}$  é a única fonte de raios gama de interesse prático<sup>(6,71)</sup>.



As vantagens da fonte  $^{60}\text{Co}$  são<sup>(6,72,73)</sup>:

- Alta penetração e dose uniforme, permitindo o tratamento de produtos de tamanho, forma e densidades variáveis;
- Uso comprovado por longa data em aplicações industriais;
- Fácil utilização da fonte;
- Baixo risco ambiental.

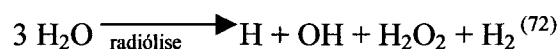
Desvantagens:

- Meia-vida de 5,263 anos, o que significa que 12% da atividade da fonte deve ser substituída anualmente para manter a potência original;
- Baixa taxa de dose.

### 2.2.3– Mecanismo de ação da irradiação

A irradiação elimina contaminantes microbianos por inativação do material genético dos microrganismos ou parasita contaminantes dos alimentos. O efeito mais importante é a interação da radiação com as moléculas de água através da produção de radicais e íons que atacam o DNA dos microrganismos<sup>(7,74)</sup>.

A radiação ionizante pode afetar diretamente os microrganismos por interação com as moléculas no interior da célula, ou indiretamente por meio dos efeitos inibidores de radicais livres produzidos pela radiólise da água:



Quando a radiação ionizante é absorvida por um material biológico, esta irá atuar diretamente num alvo crítico na célula. As moléculas de ácido nucléico podem ser excitadas e ionizadas, iniciando uma cadeia de eventos que provocará uma mudança

biológica e a morte da célula, se as mudanças forem suficientemente sérias. Este fato chama-se efeito direto da radiação, o qual é um processo importante quando esporos ou microrganismos são irradiados. Alternativamente, a radiação pode interagir com outros átomos ou moléculas na célula, particularmente com a água, para produzir radicais livres, os quais podem se difundir o suficiente para atingir e danificar o DNA. Este efeito indireto da radiação é importante em células vegetativas, nas quais o citoplasma contém cerca de 80% de água. A interação química dos radicais livres com os ácidos nucleicos e suas bases constituintes já foi elucidada em detalhes consideráveis e, a base química da biologia da radiação está bem estabelecida<sup>(75)</sup>.

A característica da radiação de alta energia é causar ionização no meio em que é absorvida, ou seja, é capaz de remover elétrons de suas órbitas em átomos ou moléculas. Por esta razão é denominada de radiação ionizante. As radiações ionizantes cedem sua energia ao meio no qual se difundem, mediante múltiplos processos de interação. A energia cedida é gasta na excitação e na ionização de moléculas gerando reações químicas que podem provocar modificações permanentes na estrutura físico-química do material irradiado<sup>(76,77)</sup>.

Estes efeitos indiretos desempenham o papel mais importante pois, na ausência de água, para se conseguir a mesma letalidade são necessárias doses 2-3 vezes maiores. A eliminação do oxigênio também aumenta em 2-4 vezes a resistência microbiana e isso é resultado da capacidade do oxigênio em participar de reações de radicais livres e impedir a reparação de lesões induzidas pela radiação<sup>(73)</sup>.

Nos processos industriais é fundamental que se conheça a quantidade de energia absorvida pelo material quando ele é exposto à radiação ionizante, isto porque, os efeitos químicos, físicos e biológicos causados pela radiação nos materiais são dependentes da energia absorvida. A dose absorvida, ou simplesmente dose, é a quantidade de energia absorvida por unidade de massa do material irradiado. A unidade utilizada denomina-se Gray (Gy), onde 1Gy é equivalente à energia de 1 joule absorvido por 1 kg de material<sup>(75,76)</sup>.

É importante salientar que as radiações autorizadas para serem aplicadas em alimentos não possuem energia suficiente para provocar qualquer reação nuclear na matéria e, portanto, não deixam nenhum resíduo radioativo no material após a irradiação. Por essa razão, o alimento ou qualquer outro material submetido a esse tipo de radiação não se torna radioativo<sup>(76,78)</sup>.

Durante o processo de irradiação, expõem-se os alimentos à fonte de energia, de modo que absorvam uma dose precisa e específica. Para isso, é necessário conhecer a produção de energia da fonte por unidade de tempo, dispor de uma relação definida entre a fonte e o material irradiado, e expor o material durante um período de tempo determinado. Em nenhum momento, durante o processo de irradiação, o alimento entra em contato com a fonte de radiação. As instalações para irradiação de alimentos variam de acordo com o projeto e a disposição física a que se destinam, porém, existem dois tipos básicos: radiação descontínua e radiação contínua. No primeiro tipo, irradia-se uma quantidade determinada de alimentos por um período de tempo estabelecido. Em seguida, retira-se o alimento da câmara e coloca-se outra carga para irradiação. Nas instalações de irradiação contínua, o alimento atravessa a câmara a uma velocidade controlada e calculada para garantir que todo o alimento receba exatamente a dose prevista.

As instalações de irradiação descontínua são mais simples de projetar e de manusear quando comparada com as de irradiação contínua, além, de serem mais flexíveis. Podem-se empregar doses mais variadas e são mais utilizadas em trabalhos experimentais. As instalações de irradiação contínua, por sua vez, são mais usadas para tratamentos de grandes quantidades de produto, especialmente, para um tipo de alimento a uma dose determinada. A indústria alimentícia normalmente prefere esse tipo de irradiação, em parte, porque permite uma economia apreciável<sup>(79)</sup>.

#### 2.2.4. – Aspecto nutricional

Um dos aspectos mais importantes a ter em conta na hora de avaliar a aceitabilidade dos alimentos irradiados é se estes são equivalentes aos processados pelos métodos tradicionais em relação ao aspecto nutricional. A irradiação de alimentos pode induzir mudanças tanto nos macronutrientes como nos micronutrientes, mas se tratam de pequenas variações e não é a única técnica que pode provocar tais mudanças. Muitos dos processos a que são submetidos os alimentos, em especial a cocção e o aquecimento em geral, também causam perdas de nutrientes, freqüentemente maiores àqueles submetidos à irradiação. O valor calórico dos alimentos depende das proteínas, dos carboidratos e dos lipídios que contêm. Com doses de irradiação de até 10kGy não se observa uma destruição significativa nesses macronutrientes. Apesar de análises químicas realizadas revelarem efeitos com doses de até 50kGy, tais efeitos são insignificantes<sup>(7)</sup>.

Dentre os micronutrientes, algumas vitaminas são bastante sensíveis à radiação ionizante enquanto que outras não são. As vitaminas solúveis em água como a tiamina e o ácido ascórbico são as menos resistentes à ação da radiação. Niacina e piridoxina são relativamente estáveis, sendo que dentre as insolúveis em água, a vitamina A e E são mais sensíveis aos efeitos da radiação<sup>(80)</sup>.

A adequação nutricional dos alimentos irradiados é sumarizada em muitas revisões, as quais nos mostram claramente que as alterações ocorridas nos alimentos são mínimas ou mesmo, em alguns casos, nulas quando se é respeitada a dose certa para cada tipo de alimento<sup>(81)</sup>. Em geral, o processo de irradiação nas doses recomendadas, acarreta poucas alterações químicas nos alimentos. Nas doses de até 1kGy, as perdas nutricionais são consideradas insignificantes<sup>(82,83)</sup> e nenhuma das alterações conhecidas encontradas nos alimentos irradiados é nociva ou perigosa, estando dentro dos limites encontrados normalmente para alimentos<sup>(76)</sup>.

A temperatura de irradiação, a exposição ao ar e as condições de armazenamento são fatores que podem influenciar no conteúdo de nutrientes. Em muitos casos, a irradiação

à temperatura baixa em ausência de oxigênio ajuda a reduzir as perdas de vitaminas dos alimentos, e o armazenamento dos alimentos irradiados em locais fechados à temperatura baixa também contribuem para prevenir sua decomposição posterior<sup>(7)</sup>. A combinação de uma baixa dose de radiação com um processo térmico adequado não só diminui os efeitos deletérios nas propriedades organolépticas do produto como, ainda controla os possíveis patógenos transmitidos por alimentos<sup>(84)</sup>.

A variação do valor nutritivo do alimento causada pela irradiação depende de vários fatores, entre eles a dose a qual o alimento é exposto, o tipo de alimento, a sua embalagem, as condições de tratamento, temperatura e armazenamento<sup>(82,83)</sup>. Os métodos utilizados atualmente no tratamento de alimentos, tais como o aquecimento, congelamento, tratamento com substâncias químicas, vácuo ou a irradiação, não são destinados a substituir as boas práticas de higiene; estas devem ser seguidas na preparação dos alimentos, independentemente de serem tratados por radiação ou por qualquer outro método<sup>(85)</sup>. De acordo com a OMS, alimentos irradiados produzidos de acordo com as boas práticas de fabricação, 'GOOD MANUFACTURING PRACTICES – GMP'<sup>(81,86)</sup>, podem ser considerados saudáveis e de qualidade nutricional adequada.

### **2.2.5. - Aplicações**

Muitas das aplicações práticas da irradiação de alimentos estão relacionadas com a sua conservação. A irradiação inativa os organismos que decompõem os alimentos, em particular as bactérias, os fungos. É muito eficaz para prolongar o tempo de conservação de frutas frescas e hortaliças, pois, controla as mudanças biológicas normais associadas à maturação, à germinação e, por último, ao envelhecimento. A irradiação também destrói os microorganismos causadores de doenças, inclusive os parasitas e os insetos que deterioram os alimentos armazenados<sup>(79)</sup>.

A irradiação pode ser aplicada em alimentos já embalados o que evita a recontaminação ou a reinfestação. A qualidade do alimento irradiado, bem como o de

qualquer outro alimento, é função da qualidade do produto original, que deverá ser produzido segundo as boas práticas de fabricação<sup>(74)</sup>.

Dependendo do tipo de alimento e a dose de irradiação, a energia ionizante pode ter uma variedade de funções, como mostra a Tabela 3.

Tabela 3. Faixas de doses de radiação ionizante utilizadas para diferentes objetivos<sup>(72,73,87)</sup>

<b>Objetivos</b>	<b>Dose (kGy)</b>	<b>Exemplos de Produtos Irradiados</b>
<b>Dose baixa (até 1kGy)</b>		
(a) inibição da germinação	0,05-0,15	Batatas, cebolas, alho, raiz forte
(b) inativação de insetos e de parasitas	0,15-0,5	Cereais e legumes, frutas frescas e secas, carne e peixe seco, carne de porco fresca
(c) retardamento do processo de amadurecimento	0,5-1,0	Frutas e vegetais frescos
<b>Doses médias (1-10kGy)</b>		
(a) aumento da vida de prateleira	1,5-3,0	Peixe fresco, morangos, etc..
(b) eliminação de microorganismos esporulados e patogênicos	2,0-5,0	Frutos do mar frescos e congelados, aves e carnes cruas ou congeladas, etc..
(c) melhoria de propriedades tecnológicas dos alimentos	2,0-7,0	Uvas (aumento do rendimento do suco), vegetais desidratados (reduzindo o tempo de cozimento)
<b>Doses altas (a partir de 10 Gy)</b>		
(a) descontaminação de aditivos e ingredientes	10-50	Preparações enzimáticas, gomas naturais, temperos, ..
(b) esterilização industrial (em combinação com aquecimento brando)	30-50	Alimentos prontos, dietas hospitalares, ingredientes para a indústria de alimentos, frutos do mar, carne,.

### 2.2.6. – Legislação na área de irradiação de alimentos

No Brasil, normas básicas para alimentos irradiados foram estabelecidas pelo Decreto-lei nº 72.718 de 2 de agosto de 1973. As portarias nº09 e nº30, aprovadas posteriormente pela Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos foram revogadas pela Resolução RDC nº21, de 26 de janeiro de 2001<sup>(88)</sup>. Portanto, não há mais restrições em relação às doses a serem aplicadas, não mais vigorando a lista restrita de alimentos autorizados para serem irradiados que constavam na legislação anterior<sup>(70,87,89)</sup>. Paralelamente, o próprio Codex Alimentarius está revendo a eliminação de restrições em relação às doses de acordo com a proposta do Grupo Internacional Sobre Irradiação de Alimentos (ICGFI) levando em consideração o relatório da Organização Mundial da Saúde<sup>(90)</sup>.

O ICGFI foi criado em 1984 pela Organização Mundial da Saúde (WHO), conjuntamente com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) e a Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA), para estudar as diversas aplicações da irradiação de alimentos. Esse grupo vem acompanhando a evolução da aplicação dessa tecnologia a nível mundial. O Brasil, junto com mais 44 países, faz parte desse grupo<sup>(71)</sup>.

Os países da América do Sul produzem uma grande variedade de alimentos, entretanto, em muitos casos, há deficiências na preservação, estocagem e condições sanitárias. Dessa forma, a irradiação de alimentos pode contribuir muito para o desenvolvimento agrícola destas regiões. Somente os países Brasil, Chile e Argentina têm legislações sobre irradiação de alimentos e estas regulamentações diferem entre si principalmente em termos de alimentos que podem ser irradiados e doses aplicadas<sup>(91,92)</sup>.

## 2.3 – Microbiologia dos alimentos<sup>(93)</sup>

Os microrganismos podem ser classificados em três grupos distintos, dependendo do tipo de interação existente entre eles e os alimentos:

1 – Os microrganismos em alimentos são causadores de alterações químicas prejudiciais, resultando no que chamamos “deterioração microbiana”. A deterioração resulta em alterações de cor, odor, sabor, textura e aspecto do alimento. Essas alterações são conseqüências da atividade metabólica natural dos microrganismos, utilizando o alimento como fonte de energia.

2 - Os microrganismos presentes nos alimentos podem representar um risco à saúde. Estes microrganismos são genericamente denominados “patogênicos”. As características das doenças que esses microrganismos causam dependem de uma série de fatores inerentes ao alimento, ao microrganismo patogênico em questão e ao indivíduo a ser afetado.

3 - Os microrganismos presentes nos alimentos causam alterações benéficas em um alimento, modificando suas características originais de forma a transformá-lo em um novo alimento. A este grupo pertencem aqueles microrganismos que são intencionalmente adicionados aos alimentos para que determinadas reações químicas sejam realizadas. Muitos destes microrganismos já estão naturalmente presentes, não sendo necessário adicioná-los ao alimento, mas sim estimular seletivamente sua atividade biológica.

### 2.3.1 - Fontes de contaminação dos alimentos<sup>(93)</sup>

a – Solo e água: estes dois ambientes são considerados em conjunto, pois muitos dos microrganismos neles presentes têm várias características em comum. Microrganismos de solo podem, através do vento, contaminar o ar e posteriormente, chegar até os corpos



hídricos através da chuva. A água da chuva pode também remover microorganismos do solo e transferi-los para os corpos hídricos.

b – Plantas: poucos microorganismos presentes no solo e na água têm capacidade de sobreviver e multiplicar na superfície das plantas. Para que isso seja possível, é necessário que os microorganismos apresentem um mecanismo de adesão à superfície das plantas e que possam obter os nutrientes necessários.

c – Utensílios: recipientes, bandejas, facas, tábuas, etc., são as principais fontes de contaminação. Sua higienização inadequada resulta em transmissão de microorganismos de um alimento para outro (contaminação cruzada).

d – Manipuladores de alimentos: a microbiota das mãos e roupas dos manipuladores pode ser oriundos do solo, água, poeira e outros ambientes. Outras fontes importantes são as fossas nasais, a boca e a pele.

### 2.3.2 – Efeitos da radiação nos microorganismos

A eficácia da ação bactericida e fungicida de uma determinada dose de radiação depende dos seguintes fatores:

1 – Tipo e espécie de microorganismos

2 - Número de microorganismos (ou esporos) existentes inicialmente.

3 - Composição do alimento. É possível que alguns constituintes do alimento, por exemplo, as proteínas, a catalase e as substâncias redutoras (nitritos, sulfitos e compostos sulfidrilicos) exerçam sobre os microorganismos uma ação protetora.

- 4 - Existência ou falta de oxigênio. O efeito causado pela existência de oxigênio livre é variável para cada microorganismo, oscilando desde a produção de efeito nenhum até a sensibilização do microorganismo.
- 5 - Estado físico do alimento durante a irradiação. Tanto a quantidade de umidade como a temperatura do alimento exerce uma influência diferente nos microorganismos.
- 6 - Fatores próprios dos microorganismos. A idade, a temperatura de crescimento e a da esporulação, e o estado (células vegetativas ou esporuladas) podem influir no nível de sensibilidade dos microorganismos<sup>(94)</sup>.

Geralmente os organismos mais simples são mais resistentes aos efeitos da radiação ionizante. Por exemplo, os vírus são mais resistentes do que as bactérias, as quais são mais resistentes que os fungos que, por sua vez, são mais resistentes que os seres humanos. Portanto, doses que eliminarão todos os bolores não destruirão todas as bactérias<sup>(73,95)</sup>.

As bactérias Gram negativas, tanto as deteriorantes como as patogênicas, são geralmente mais sensíveis do que as bactérias Gram positivas. A diferença na resistência do microorganismo não se restringe somente aos gêneros, mas também entre linhagens de uma mesma espécie<sup>(96)</sup>.

A tabela 4, apresenta dados de diferentes procedências, relativos às doses aproximadas de radiação necessárias para destruir diferentes tipos de microorganismos.

Tabela 4 – Doses letais aproximadas de radiação ionizante expressadas em kGy<sup>(94)</sup>

Organismos	Doses letais aproximadas	Microorganismos	Doses letais aproximadas
Humanos	0.0056-0.0075	Bactérias Gram negativas	
Insetos	22-93	<i>Escherichia coli</i>	1.0-2.3
Vírus	10-40	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1.6-2.3
Leveduras (fermentativas)	4-9	<i>Enterobacter aerogenes</i>	1.4-1.8
<i>Torula cremoris</i>	4.7	Gram positiva	
<i>S. cerevisiae</i>	5	<i>Lactobacillus spp.</i>	0.23-0.38
<i>Candida krusei</i>	11.6	Esporos bacterianas	3.1-3.7
Mofos	1.3-11	<i>Bacillus subtilis</i>	12-18
<i>Penicillium spp.</i>	1.4-2.5	<i>Bacillus coagulans</i>	10
<i>Aspergillus spp.</i>	1.4-3.7	<i>Clostridium botulinum</i> (A)	19-37
<i>Rhizopus sp.</i>	10	<i>Clostridium botulinum</i> (E)	15-18
<i>Fusarium sp.</i>	2.5	<i>Clostridium perfringens</i>	3.1
Microorganismos patogênicos			
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1.4	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	10-17
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.4-7.0		
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	4.2		
<i>Salmonella sp.</i>	3.7-4.8		

### 3 - MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 - Material

##### 3.1.1- Amostras de própolis

Foram utilizadas 2 amostras de própolis “in natura” de *Apis mellifera*, da região de Juiz de Fora, Minas Gerais, concedidas pela Empresa MN Própolis Indústria Comércio e Representações Ltda, Mogi das Cruzes, SP (vide Figura 3).



Figura 3 – Amostras de própolis “in natura”

## 3.2 – Métodos

### 3.2.1- Irradiação das amostras

Amostras de aproximadamente 100g de própolis, “in natura” de granulometria variada, entre 100 e 220 mesh, acondicionadas em frascos de vidro (Figura 4), foram irradiadas com doses de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7 e 10kGy no caso das análises microbiológicas. Especificamente para a determinação de compostos fenólicos, foram aplicadas doses de 5, 7 e 10kGy.

Utilizou-se uma fonte de  $^{60}\text{Co}$  (Figura 5) (Gammacell 220 AECL – Atomic Energy of Canada Ltd), localizada no Centro de Tecnologia das Radiações do IPEN – CNEN/SP, com taxa de dose ao redor de 5,84kGy/h. O fator de uniformidade de dose foi de 1.13. As irradiações foram realizadas à temperatura ambiente, que oscilou entre 19°C e 28°C.

Antes de serem analisadas, as amostras foram trituradas num “blender”, modelo SM-KM 30 marca Sanyo (Figura 6).



Figura 4 – Amostras de própolis acondicionadas em frascos de vidro



Figura 5 – Fotografias da fonte de  $^{60}\text{Co}$  (Gammacell 220 AECL) utilizada para a irradiação das amostras de própolis



Figura 6 – Blender para moagem das amostras de própolis

### 3.2.2– Análise microbiológica da própolis

As amostras de própolis após o processo de irradiação foram submetidas às seguintes análises: contagem de coliformes totais, de bactérias aeróbias mesófilas, de bolores e leveduras e Pesquisa de *Salmonella*. As análises foram realizadas em triplicata.

A análise microbiológica foi realizada de acordo com a metodologia descrita no manual do ICMSF<sup>(97)</sup> (International Commission Microbiological Specifications fo Foods), e no Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos<sup>(98)</sup>.

Preparo das amostras para análise: inicialmente, 25g de cada amostra foram homogeneizadas em 225mL de água peptonada 0,1% ( Merck), obtendo-se uma diluição de  $10^{-1}$ .

#### 3.2.2.1 – Determinação do Número Mais Provável<sup>(97,98)</sup>

- Teste presuntivo para Coliformes

As diluições  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  foram realizadas adicionando-se 10mL da diluição  $10^{-1}$  em 90mL de água peptonada 0,1% estéril e 10mL da diluição  $10^{-2}$  em 90mL de água peptonada 0,1% estéril, respectivamente. Para as amostras submetidas às doses de 5, 7, e 10kGy; inocularam-se 10mL da diluição  $10^{-1}$ , em cada um dos 3 tubos de caldo lauril sulfato triptose (Merck) de concentração dupla, 1mL em cada um dos 3 tubos de caldo lauril concentração simples e 0,1mL em cada um dos 3 tubos de caldo lauril concentração simples. Para as doses de 2, 3 e 4kGy repetiu-se o mesmo procedimento, utilizando-se somente caldo lauril sulfato triptose concentração simples, partindo-se da diluição  $10^{-2}$  e para as doses de 0 e 1kGy, partiu-se da diluição  $10^{-3}$ .

Os tubos foram incubados a 35-37°C por 24h. Após esse tempo os tubos que não apresentaram produção de gás foram reincubados por mais 24h.

- Teste confirmativo para Coliformes

Com o auxílio de uma alça de platina, transferiram-se 2 alçadas do inóculo dos tubos de caldo lauril sulfato triptose com produção gás para tubos de Caldo VB (Caldo Verde-Brilhante - Merck). Em seguida, estes foram incubados a 35-37°C por 24h, considerando-se positivos os tubos que apresentarem produção de gás. Os tubos negativos foram reincubados por mais 24h

Para expressão dos resultados, consultou-se a tabela de número mais provável<sup>(99)</sup> (NMP) de coliformes por grama de amostra.

### 3.2.2.2 -Contagem total de microorganismos aeróbios mesófilos (contagem padrão em placas – CPP) – Método de semeadura em profundidade<sup>(97,98)</sup>

Após o preparo das diluições decimais seriadas em água peptonada 0,1% ( $10^{-2}$  a  $10^{-4}$ ); 1mL de cada diluição foi dispensada nas placas de Petri, adicionando-se em seguida 15mL de ágar padrão para contagem (Merck), previamente fundido e resfriado a 45°C. As placas foram invertidas e incubadas a 35-37°C por 48h. Decorrido esse tempo, a contagem das colônias foi realizada nas placas que possuíam o número de colônias entre 30 e 300, e relatadas como unidades formadoras de colônias, UFC/g de própolis.

Para o cálculo do número de UFC por grama do produto, multiplicou-se o valor encontrado pelo fator de diluição correspondente.



### 3.2.2.3 – Pesquisa de *Salmonella* sp<sup>(98)</sup>

Na análise de salmonela, o pré-enriquecimento foi realizado homogeneizando-se 25g de própolis em 225mL de água peptonada tamponada 1% (Merck), incubando-se em seguida 35-37°C por 18-24h.

Posteriormente, na etapa de enriquecimento seletivo, 1,0mL de APT 1% foi transferido para o meio de caldo selenito cistina (Merck) e 0,1 mL para o caldo Rappaport Vassiliadis (Merck) e, ambos incubados a 42°C por 48h.

Na semeadura seletiva, o isolamento das colônias foi realizada em meios seletivos e diferenciais, utilizando-se ágar Rambach e ágar XLD (Merck). Ambas as placas foram invertidas e incubadas a 35-37° por 24h.

Para a confirmação preliminar das colônias típicas, foram feitos testes bioquímicos, inoculando-se as colônias suspeitas, no máximo 5 por placa, no meio de identificação presuntiva de bacilos intestinais gram negativos, conhecido como IAL<sup>(100)</sup>. Nos casos onde o meio IAL apresentar características típicas de *Salmonella* sp, será necessário realizar os testes sorológicos para confirmação definitiva, por meio de aglutinação em lâmina com soro polivalente somático e flagelar.

### 3.2.2.4 – Pesquisas de Bolores e Leveduras – Método do plaqueamento em profundidade<sup>(97,98)</sup>

Preparou-se, inicialmente, o meio de cultura ágar batata dextrose (Merck). No instante do uso, estando o meio fundido e mantido a 45°C, adicionou-se 0,2mL de ácido tartárico a 10%, a fim de reduzir o pH do meio para 3,5. Em seguida, efetuaram-se a homogeneização e a diluição seriada adequada da amostra.

Transferiu-se 1mL de cada diluição ( $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ ) para placas de petri estéreis, vertendo-se em seguida, o ágar batata dextrose acidificado em cada uma delas. Homogeneizou-se adequadamente o inóculo com o meio e, após a solidificação, as placas foram invertidas e incubadas, a 25°C por 3-5 dias. Decorrido o tempo de incubação, fez-se enumeração das colônias que se desenvolveram.

Para o cálculo do número de UFC por grama de amostra, multiplicou-se o número significativo encontrado pelo fator de diluição.

### 3.2.3 – Análises físico-químicas da própolis

#### 3.2.3.1 - Obtenção do Extrato Etanólico

Pesou-se 40g de amostra, previamente triturada, em um béquer de vidro Pyrex, adicionou-se 80mL de etanol a 80% e este foi mantido sob agitação por 3h. Em seguida, filtrou-se a vácuo, usando um filtro de 90mm, obtendo-se o extrato etanólico de própolis (figura 7). Seguiu-se o mesmo procedimento para amostras irradiadas e não irradiadas.

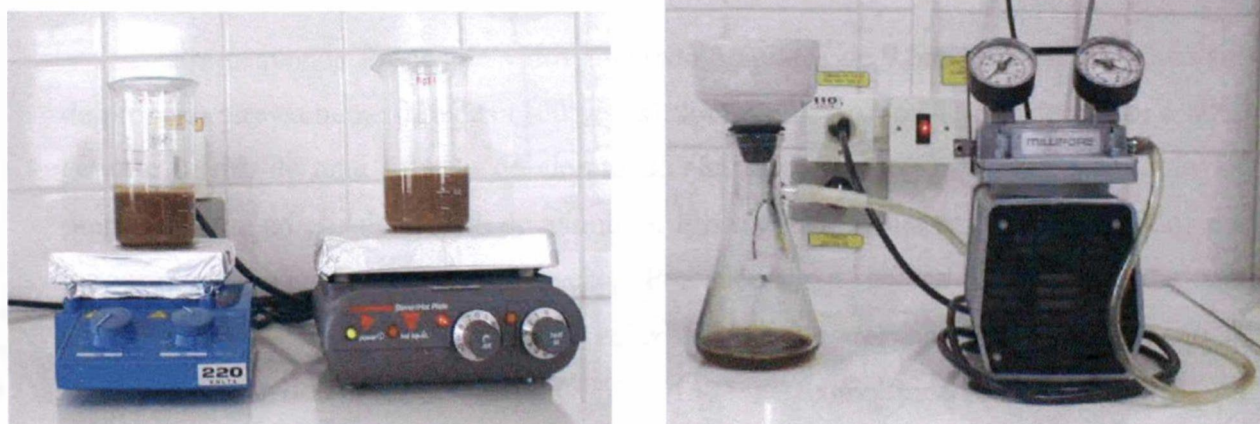


Figura 7 – Imagens da obtenção do extrato etanólico de própolis

### 3.2.3.2.- Identificação dos compostos fenólicos por espectro de absorção na região Ultravioleta

Foi pipetada uma alíquota de 5 $\mu$ L do extrato etanólico obtido segundo o procedimento descrito em 3.2.3.1 e diluiu-se cerca de 10.000 vezes com álcool etílico absoluto. Foi levantado o espectro entre 195 a 450nm utilizando-se um espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV – 1601 PC , usando-se celas de quartzo de 1cm de caminho óptico. Os extratos deveriam apresentar picos entre 250 e 350nm.

### 3.2.3.3.-Determinação quantitativa de flavonóides totais por espectrofotometria de absorção molecular<sup>(101,102)</sup>

Verificou-se a influência da radiação na composição química da própolis irradiada, medindo-se a concentração dos flavonóides totais. A determinação de flavonóides totais foi realizada utilizando-se como referência a quercetina. A curva de calibração foi feita usando-se uma solução padrão de quercetina 1mg/mL em etanol absoluto, no intervalo de 0,01mg/mL a 0,1mg/mL. Foi estabelecida a equação da reta através de regressão linear.

Em pequenos frascos de vidro contendo alíquotas de 0,5mL do extrato etanólico de própolis, previamente diluídas (100 vezes), foram adicionados 4,3mL de etanol a 80% (v/v), e 0,1mL de uma solução de cloreto de alumínio 2% (m/v). O frasco controle foi preparado sem adição de cloreto de alumínio. Em seguida, foram agitados e deixados em repouso por 40 minutos, para reação. Procedeu-se à leitura da absorbância em comprimento de onda de 425nm, em celas de 1cm de caminho óptico, utilizando-se espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV – 1601 PC como ilustrado na Figura 8. As análises foram realizadas em triplicata.

Para a determinação da significância estatística dos resultados do teor de flavonóides totais foi aplicado o teste T (Student) a nível de segurança de 5%, com auxílio do programa Statistic for Windows versão 6.0.



Figura 8 – Espectrofotômetro de absorção molecular

#### 3.2.3.4 –Determinação semi-quantitativa de compostos fenólicos da própolis por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A análise por HPLC foi realizada pipetando-se uma alíquota de 5 $\mu$ L do extrato etanólico e diluindo-a em 10mL de metanol, de modo a obter uma solução 2000 vezes diluída; em seguida foi filtrada, através de membrana com poro de 0,45 $\mu$  (Millipore). O volume da amostra (loop) foi 20 $\mu$ L. As análises foram realizadas utilizando-se cromatógrafo líquido de alta eficiência modelo SPD – 10A e equipado com coluna de fase reversa modelo Shimpack CLC-ODS(m) de 150 x 4,6 mm de dimensão e acoplado a um detector ultravioleta modelo SPD – 10AVP (faixa de comprimento de onda 190-600nm) operando a 275nm, 2 bombas modelo LC – 10ADVP e desgaseificador de membrana, modelo DGU – 12A, marca Shimadzu (Figura 9). A fase móvel utilizada foi metanol: água:ácido acético glacial (64: 33: 03), com fluxo de 1mL/min, temperatura da coluna

37°C. O sistema foi isocrático<sup>(103)</sup>. Realizaram-se as análises em triplicata. O tempo de retenção de cada componente foi obtido mediante injeção de cada padrão isoladamente.



Figura 9 – Cromatógrafo HPLC utilizado para a determinação de compostos fenólicos da própolis

#### 3.2.3.5 - Análise de resíduo seco das amostras de própolis (m/v%)<sup>(104)</sup>

Do extrato etanólico de própolis obtido no item 3.2.3.1 pipetou-se uma alíquota de 1mL em uma cápsula de porcelana, previamente seca em estufa por 2h, resfriada em dessecador até a temperatura ambiente e pesada. Primeiramente, evaporou-se o álcool em banho-maria, seguidamente em estufa por 1h à 105°C. Decorrido esse tempo, as cápsulas foram retiradas da estufa e esfriadas em dessecador. Realizaram-se as análises em triplicata.

Cálculo da porcentagem de resíduo seco (%):

$$\text{Resíduo seco\%} = \frac{100 \times N}{A}$$

Onde: N = massa (g) de resíduo seco

A = n° de mL da amostra

### 3.2.3.6 – Análise do teor de umidade

A análise do teor de umidade foi realizada utilizando-se um analisador de umidade modelo MB200 marca OHAUS (Figura 10). Pesou-se 5g de amostra de própolis, previamente triturada, que foi levada até peso constante por aquecimento à 105°C por no mínimo 1 hora. Realizaram-se as análises em triplicata.



Figura 10 – Analisador de umidade

### 3.2.3.7 – Determinação do teor de cinzas<sup>(104)</sup>

A determinação do teor de cinzas foi realizada com base nas Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz, para determinação do material inorgânico presente nas amostras de própolis submetidas a diferentes doses de radiação gama.

Pesou-se 1g de amostra de própolis em cápsulas de porcelana, previamente aquecidas em mufla a 550°C, resfriadas em dessecador até a temperatura ambiente e pesadas. A amostra foi carbonizada em estufa a 105°C por 2 horas e em seguida submetida ao processo de incineração em mufla a 550°C por 4-5 horas. Decorrido o tempo, as cápsulas foram retiradas e resfriadas em dessecador até a temperatura ambiente e pesadas. Realizaram-se as análises em triplicata.

### 3.2.3.8 - Determinação da massa mecânica<sup>(105)</sup>

Em cartucho de celulose para Soxhlet, pesou-se cerca de 3,5g (P<sub>1</sub>) da amostra de própolis irradiada, previamente triturada, protegendo o material pesado com um chumaço de algodão e transferindo-o para o extrator Soxhlet (Figura 11). A extração foi feita utilizando-se 90mL de etanol a 96% no período de 4-6 horas. Posteriormente, transferiu-se o extrato ainda quente para um béquer de 250mL, e lavando o balão com duas porções de 5mL de etanol 96% e adicionando-as no béquer, reservando o extrato obtido.

Secou-se o cartucho em estufa a 105°C por 2 horas; em seguida, removeu-se o resíduo em um vidro de relógio, pesando-o (P<sub>2</sub>). Realizaram-se as análises em triplicata.





Figura 11 – Extrator Soxhlet utilizado para análise de massa mecânica

Cálculo da porcentagem de massa mecânica (MM):

$$\%MM = \frac{P_2 \times 100}{P_1}$$

Onde:  $P_1$  = peso inicial da amostra (g)

$P_2$  = peso do resíduo do cartucho (g)

### 3.2.3.9 – Determinação do teor de cera<sup>(105)</sup>

Com o extrato obtido em extrator Soxhlet, item 3.2.3.8, fez-se à determinação do teor de cera, colocando-o em freezer por 24 horas. Em seguida, filtrou-se a frio (Figura 12), por papel de filtro nº03, previamente pesado ( $P_4$ ), recolhendo o filtrado em balão volumétrico de 100mL. Secou-se o papel de filtro à temperatura ambiente, por 24 horas (Figura 13). Decorrido o tempo, o mesmo foi colocado em estufa a 50°C, por 10 minutos, e



esfriado em dessecador, efetuando-se em seguida a pesagem ( $P_5$ ). Realizaram-se as análises em triplicata.

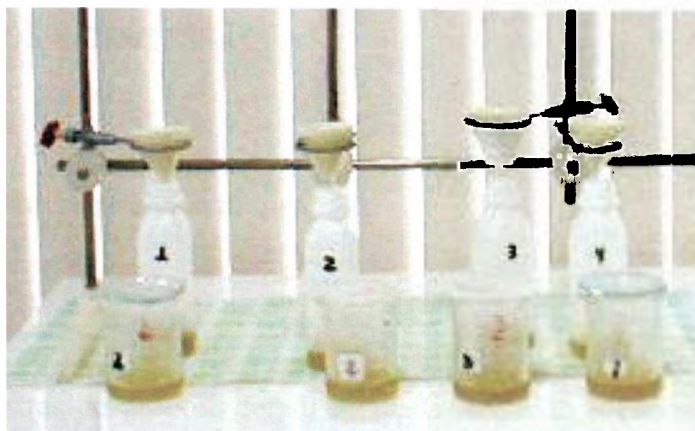


Figura 12 – Esquema de filtração do extrato obtido em Extrator Soxhlet

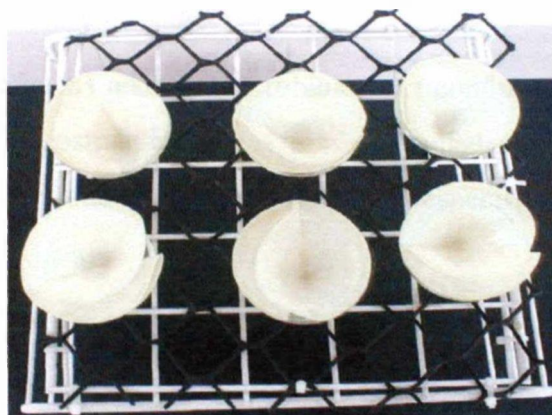


Figura 13 – Esquema de secagem dos papeis de filtro

Cálculo da porcentagem de cera:

$$\% \text{ cera} = \frac{(P_5 - P_4)}{P_1}$$

Onde:  $P_1$  = massa inicial da amostra

$P_4$  = peso do papel de filtro

$P_5$  = peso do papel de filtro + cera

## **4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 - Análise microbiológica da própolis**

As amostras de própolis foram irradiadas segundo o procedimento descrito no item 3.2.1, variando-se a dose de 0 a 10kGy, a fim de se verificar a eficiência da radiação na redução da carga microbiana.

Foram realizadas análises microbiológicas conforme o procedimento descrito no item 3.2.2, nas amostras irradiadas e não irradiadas e, os resultados referentes às amostras 1 e 2 encontram-se nas Tabelas 5 e 6, respectivamente.

Tabela 5 – Resultado da análise microbiológica da amostra 1 de própolis submetida a diferentes doses de radiação gama.

Dose (kGy)	Coliformes Totais (NMP/g)	Bact. Aerb. Mesófilas (UFC/g)	Bolor e Levedura (UFC/g)
0	$4,6 \times 10^2$	$(1,7 \pm 0,16) \times 10^5$	$> 5,0 \times 10^3$
1	$1,5 \times 10^2$	$(8,1 \pm 0,6) \times 10^4$	$(1,9 \pm 0,5) \times 10^3$
2	$4,6 \times 10$	$(2,3 \pm 1,0) \times 10^4$	$(3,7 \pm 1,0) \times 10^2$
3	$4,3 \times 10^0$	$(5,5 \pm 1,3) \times 10^3$	$(3,7 \pm 1,0) \times 10^2$
4	$1,5 \times 10^0$	$(4,0 \pm 1,3) \times 10^2$	$(2,0 \pm 1,0) \times 10^1$
5	0,04	$(1,6 \pm 0,1) \times 10^2$	< 10
7	<0,03	< 10	< 10
10	<0,03	< 10	< 10

Tabela 6 – Resultado da análise microbiológica da amostra 2 de própolis submetidas a diferentes doses de radiação gama.

Dose (kGy)	Coliformes Totais (NMP/g)	Bact. Aerb. Mesófilas (UFC/g)	Bolor e Levedura (UFC/g)
0	$2,4 \times 10^2$	$(6,7 \pm 2,2) \times 10^4$	$(1,5 \pm 0,5) \times 10^4$
1	$1,5 \times 10^2$	$(2,3 \pm 1,0) \times 10^4$	$(3,7 \pm 2,2) \times 10^3$
2	$2,4 \times 10$	$(2,4 \pm 0,6) \times 10^3$	$(7,4 \pm 1,5) \times 10^2$
3	$2,3 \times 10^0$	$(6,0 \pm 2,2) \times 10^2$	$(2,0 \pm 0,6) \times 10^2$
4	$0,9 \times 10^0$	$(2,3 \pm 0,5) \times 10^2$	$(4,1 \pm 1,0) \times 10^1$
5	0,07	$(5,5 \pm 1,1) \times 10^1$	< 10
7	<0,03	< 10	< 10
10	<0,03	< 10	< 10

Observa-se pelos resultados obtidos das Tabelas 5 e 6 que houve uma redução na carga microbiana da própolis com aumento da dose. Verifica-se que essa redução é semelhante para todos os microrganismos estudados. Assim, com relação aos coliformes totais, nota-se uma diminuição mais drástica a partir da dose de 3kGy em ambas as amostras ensaiadas. No caso das bactérias aeróbias mesófilas observa-se uma redução sistemática das contagens com o aumento da dose até atingir valores <10 UFC/g. Bolores e leveduras apresentaram um comportamento semelhante. Os ensaios para salmonelas foram negativos para todas as amostras

Comparando os dados obtidos na análise microbiológica das amostras submetidas às diferentes doses de radiação aos critérios de aceitação descritos na Tabela 2 (pág. 15), pode-se deduzir que uma dose de 3kGy já seria adequada para redução da carga microbiana. Com a dose de 5kGy, atingiu-se praticamente a eliminação de todos os microrganismos estudados.

#### **4.2 – Análises físico-químicas**

A fim de verificar qualquer influência da radiação na composição química da própolis, realizaram-se diversas determinações químicas, seguindo-se as normas de qualidade e identificação de própolis estabelecidas pelo Ministério da Agricultura e do Abastecimento<sup>(9)</sup>. Dentre esses critérios, deu-se ênfase especial à determinação de flavonóides, por ser o componente ativo que confere à própolis a sua qualificação como alimento funcional.

#### 4.2.1 – Análise do teor de flavonóides totais

##### 4.2.1.1. – Análise do teor de flavonóides totais por espectrofotometria

A partir dos extratos etanólicos de própolis obtidos segundo o procedimento descrito no item 3.2.3.1, foi determinado o teor de flavonóides totais utilizando-se como referência a quercetina. A Figura 14 mostra a curva de calibração obtida utilizando-se soluções etanólicas de quercetina no intervalo de 0,01mg/mL a 0,1 mg/mL, com o seu correspondente coeficiente de correlação linear. Os resultados referentes às amostras 1 e 2 estão apresentados na Tabela 7.

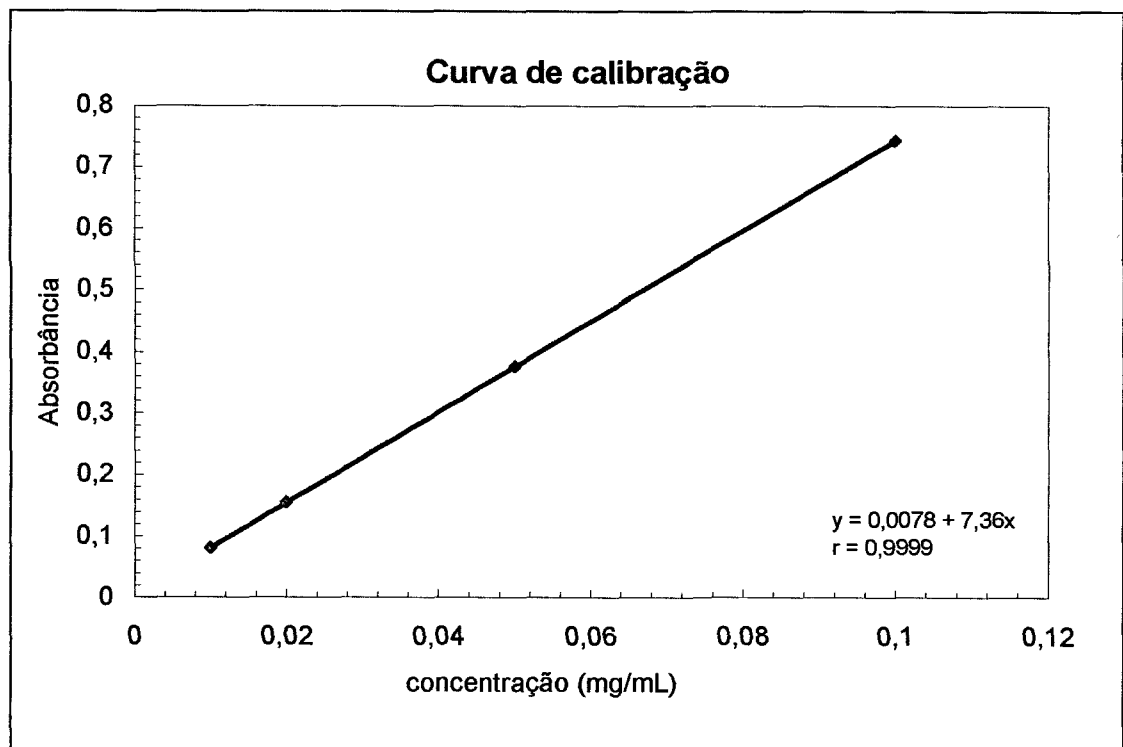


Figura 14 - Curva de calibração da quercetina

Tabela 7 – Médias\* do teor de flavonóides totais (mg/g) de amostras de própolis irradiadas.

Amostra 1	Dose (kGy)			
	0	5	7	10
Resultado 1	16,77	16,30	16,14	16,18
Resultado 2	16,53	16,06	16,10	16,18
Resultado 3	16,13	16,16	16,20	16,24
Média ± $\sigma$	16,47 <sup>a</sup> ± 0,32	16,17 <sup>a</sup> ± 0,12	16,15 <sup>a</sup> ± 0,05	16,20 <sup>a</sup> ± 0,03

Amostra 2	Dose (kGy)			
	0	5	7	10
Resultado 1	15,89	16,41	16,45	16,45
Resultado 2	16,09	16,42	16,42	16,16
Resultado 3	16,47	16,33	16,33	16,11
Média ± $\sigma$	16,15 <sup>a</sup> ± 0,29	16,38 <sup>a</sup> ± 0,07	16,40 <sup>a</sup> ± 0,06	16,24 <sup>a</sup> ± 0,2

\* Médias com letras iguais não diferem entre si significativamente

O método utilizado baseia-se na formação de complexos estáveis dos flavonóides com alumínio em metanol, ocorrendo desvio para maiores comprimentos de onda dos picos de absorção e uma intensificação da absorção. Portanto, é possível determinar a quantidade de flavonóides, evitando-se a interferência de outras substâncias fenólicas, principalmente dos ácidos fenólicos, que invariavelmente acompanham os flavonóides nos tecidos vegetais. A leitura é feita em 425nm, utilizando-se cloreto de alumínio a 2% em metanol. Nessas condições, o complexo flavonóides-alumínio absorve em comprimento de onda bem maior do que o flavonóides sem a presença do agente complexante<sup>(106,107)</sup>.

De acordo com os resultados da análise T de Student pode-se observar que não houve diferença significativa no teor de flavonóides totais com o aumento da dose de radiação aplicada. Isto significa que a radiação não provoca qualquer tipo de alteração sobre este tipo de composto, fato importante, pois os flavonóides são responsáveis por muitas ações biológicas atribuídas à própolis.

#### 4.2.2 - Espectro de absorção da própolis

Outra característica utilizada na identificação da própolis é o seu espectro de absorção na região do UV, que deve apresentar 2 picos característicos no intervalo de 195 a 450nm.

As Figuras 15a e 15b mostram os espectros de absorção na região do UV dos extratos etanólicos das amostras de própolis, de dois lotes diferentes, irradiadas e não irradiadas, segundo o procedimento descrito no item 3.2.3.2

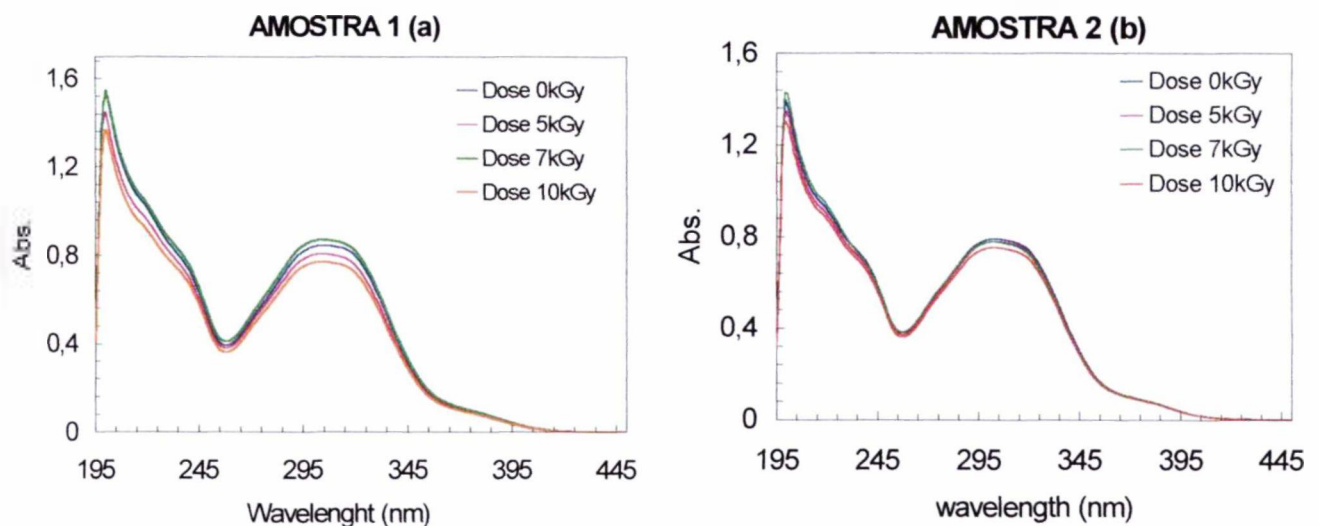


Figura 15 – Espectro de absorção dos extratos etanólicos da própolis. a) amostra 1; b) amostra 2

Pelos espectros, pode-se observar 2 picos característicos no intervalo de comprimento de onda citado, que identificam a própolis. Pode-se verificar que não houve alterações apreciáveis nos espectros de absorção entre as amostras não irradiadas e irradiadas com doses crescentes até 10kGy, indicando que não houve influência da

radiação na composição química da própolis no que diz respeito aos grupos funcionais responsáveis pela absorção na região do ultravioleta.

#### 4.2.3 – Determinação semi-quantitativa de compostos fenólicos individuais

Visto que as análises anteriores são relativas a flavonóides totais, fez-se um estudo mais detalhado de alguns compostos fenólicos individuais, usando-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência.

Neste trabalho, realizaram-se as análises segundo as condições descritas no item 3.2.3.4, identificando-se cada um dos compostos fenólicos pelo seu tempo de retenção (mediante o uso de padrões), e comparando-se as alturas dos respectivos picos, nas amostras não irradiadas e irradiadas. A Tabela 7 mostra os tempos de retenção da quercetina, canferol, crisina, galangina, Artepelin-C, padrões utilizados neste trabalho. As Figuras 15a e 15b mostram os cromatogramas obtidos com as duas amostras de própolis submetidas às diferentes doses de radiação gama, com identificação dos compostos fenólicos.

Tabela 8 - Tempo de retenção (minutos) dos padrões

Condições cromatográficas: coluna de fase reversa CLC-ODS(m) 150 x 4,6 mm I.D., fase móvel: metanol:água:ácido acético glacial (64: 33: 03), fluxo de 1mL/min, detector ultravioleta a 275nm.

<b>Padrões</b>	<b>Tempo de retenção</b>
Quercetina	2,855
Canferol	5,347
Crisina	11,559
Galangina	13,158
Artepelin-C	15,946



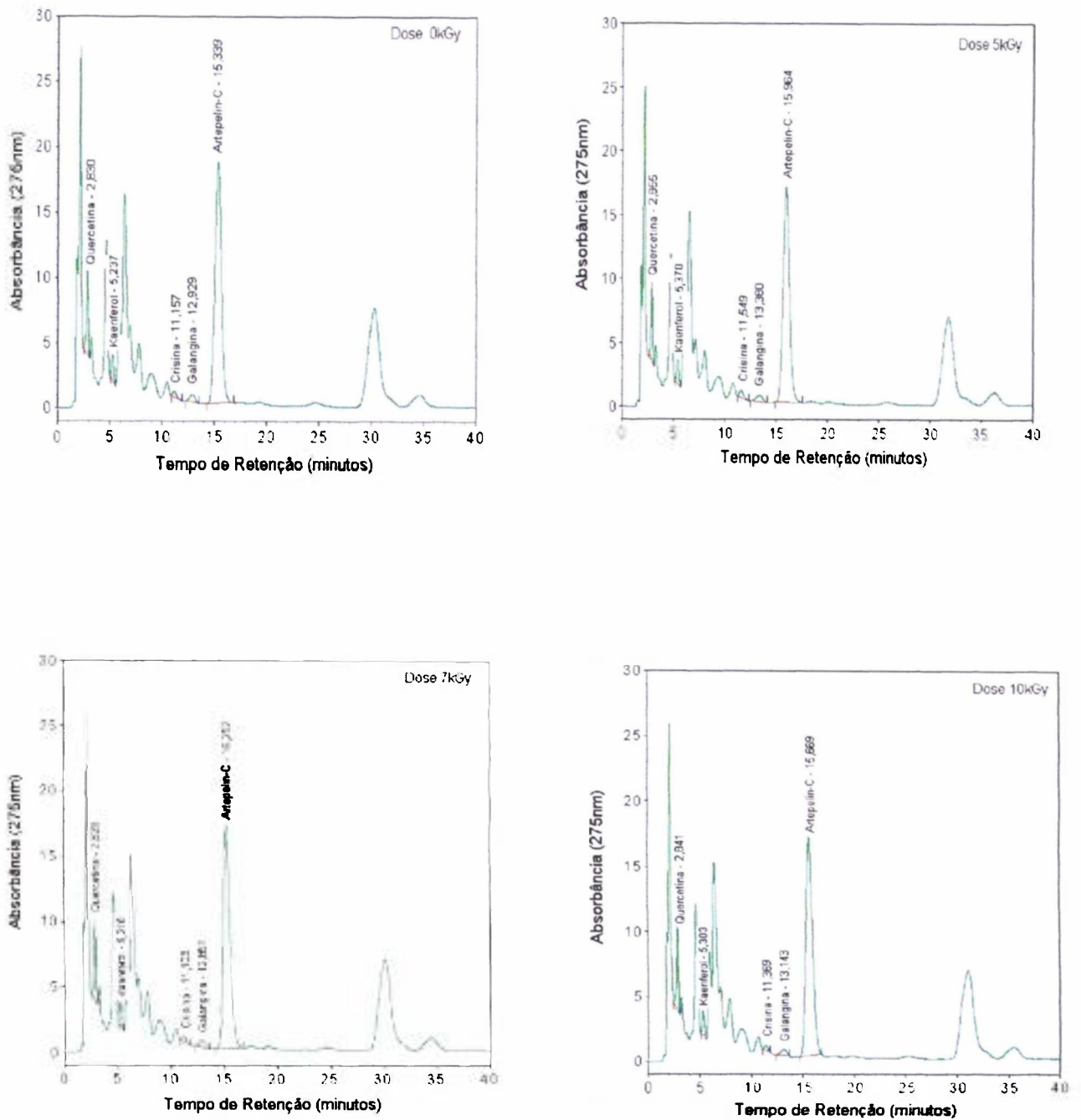


Figura 15a - Cromatogramas da amostra 1 de própolis obtidas pela técnica cromatografia líquida de alta eficiência.

Coluna de fase reversa CLC-ODS(m) 150 x 4,6 mm I.D., fase móvel: metanol:água:ácido acético glacial (64: 33: 03), fluxo de 1mL/min, detector ultravioleta a 275nm.

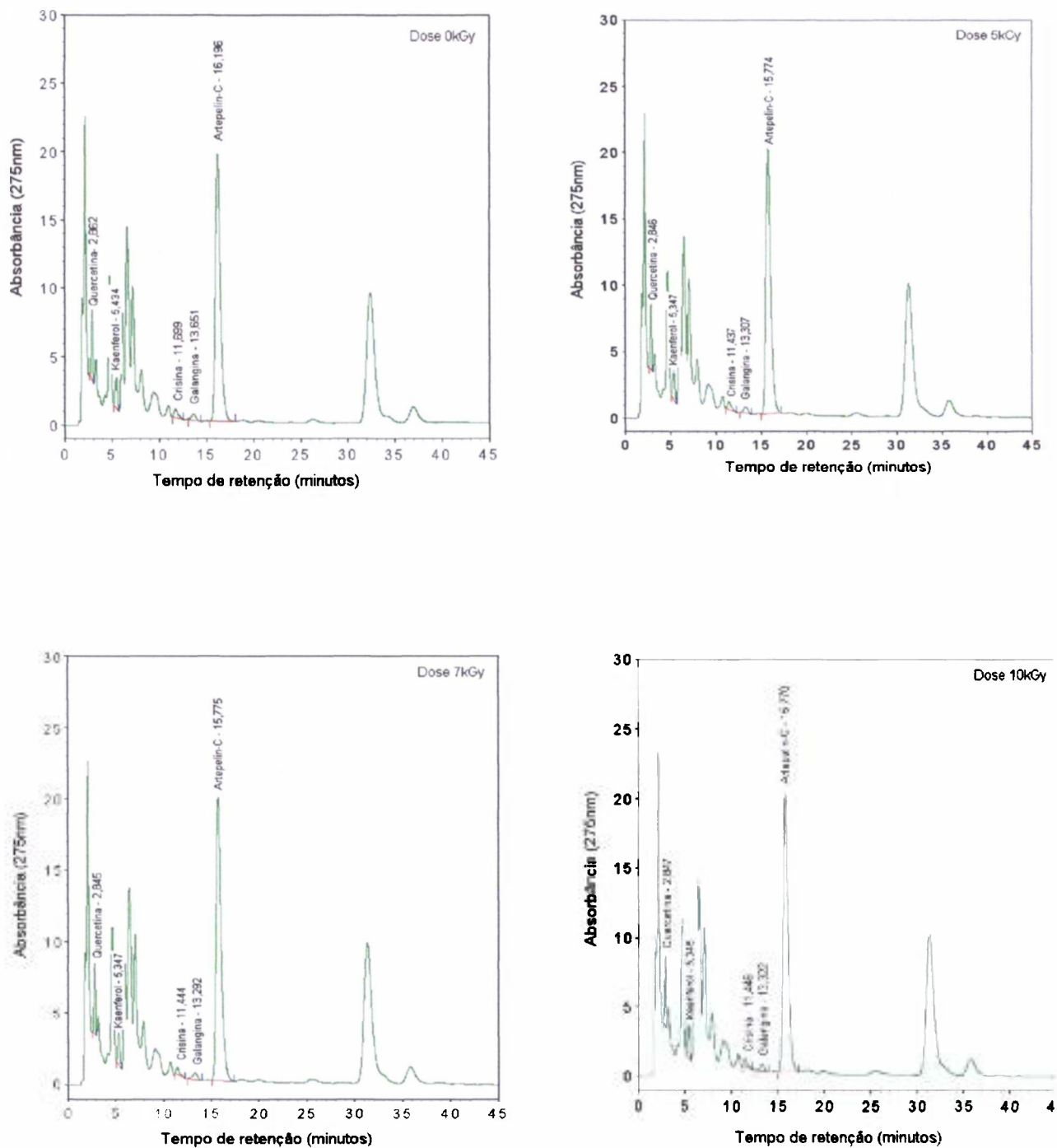


Figura 15b - Cromatogramas da amostra 2 de própolis obtidas pela técnica cromatografia líquida de alta eficiência.

Coluna de fase reversa CLC-ODS(m) 150 x 4,6 mm I.D., fase móvel: metanol:água:ácido acético glacial (64: 33: 03), fluxo de 1mL/min, detector ultravioleta a 275nm.

Pela análise dos cromatogramas obtidos, observa-se que as alturas dos picos correspondentes a quercetina, canferol, crisina, galangina e artepelin-C não sofreram alteração mesmo naquelas amostras submetidas a dose máxima de 10kGy, bem como os tempos de retenção se mantiveram inalterados. Neste trabalho limitou-se, simplesmente, à comparação dos cromatogramas e às alturas dos picos, pois, uma análise quantitativa de cada composto, em uma matriz complexa como o extrato de própolis envolveria um estudo muito mais detalhado para o estabelecimento das condições cromatográficas ideais para a quantificação de cada composto isoladamente.

#### 4.2.4 - Análise de resíduo seco

A análise de resíduo seco das amostras irradiadas foi realizada conforme procedimento descrito no item 3.2.4.1 e, os resultados referentes às amostras 1 e 2 estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Análise de resíduo seco (%m/v) das amostras de própolis irradiadas

Amostra 1	Dose (kGy)			
	0	5	7	10
Resultado 1	18,82	17,90	18,12	18,30
Resultado 2	18,96	17,98	18,26	18,50
Resultado 3	18,70	17,88	18,19	18,38
Média $\pm \sigma$	18,83 $\pm$ 0,1	17,92 $\pm$ 0,05	18,19 $\pm$ 0,07	18,39 $\pm$ 0,10

Amostra 2	Dose (kGy)			
	0	5	7	10
Resultado 1	18,74	18,72	18,89	19,05
Resultado 2	18,74	18,88	18,78	19,01
Resultado 3	18,76	18,54	18,70	19,01
Média $\pm \sigma$	18,75 $\pm$ 0,01	18,71 $\pm$ 0,17	18,79 $\pm$ 0,09	19,02 $\pm$ 0,02

Como fica evidente do exame dos resultados, não houve qualquer alteração na porcentagem de resíduo seco como consequência da aplicação do processamento por irradiação nas doses de até 10kGy.

#### 4.2.5 – Análise do teor de umidade

Na tabela 10 são apresentados os resultados da análise do teor de umidade das amostras 1 e 2 de própolis irradiadas e não irradiadas (m/m%), realizadas conforme procedimento descrito no item 3.2.3.6.

Tabela 10 - Teor de umidade (%m/m) das amostras de própolis submetidas a diferentes doses de radiação gama

Amostra 1	Dose (kGy)			
	0	5	7	10
Resultado 1	7,2	7,2	7,1	7,3
Resultado 2	7,2	7,3	7,2	7,2
Resultado 3	7,2	7,3	7,2	7,3
Média ± $\sigma$	7,2	7,2 ± 0,07	7,2 ± 0,07	7,3 ± 0,07

Amostra 2	Dose (kGy)			
	0	5	7	10
Resultado 1	7,1	7,0	7,1	7,1
Resultado 2	7,0	6,9	6,9	6,9
Resultado 3	7,2	7,0	7,0	6,9
Média ± $\sigma$	7,1 ± 0,1	7,0 ± 0,07	7,0 ± 0,1	7,0 ± 0,1

Não houve mudança na porcentagem de umidade das amostras de própolis em consequência da ação da radiação. Sendo o processo de irradiação um processo no qual não há aumento substancial da temperatura, não ocorreram mudanças significativas do conteúdo de água retido nas amostras.

#### 4.2.6 – Análise do teor de cinzas

Na tabela 11 são apresentados os resultados das análises do teor de cinzas das amostras 1 e 2 de própolis irradiadas e não irradiadas, realizadas segundo o procedimento descrito no item 3.2.3.7.

Tabela.11 – Teor de cinzas (%m/m) das amostras de própolis irradiadas

Amostra 1	Dose (kGy)			
	0	5	7	10
Resultado 1	3,5	3,1	3,1	3,3
Resultado 2	3,3	3,4	3,4	3,3
Resultado 3	3,3	3,3	3,3	3,2
Média ± $\sigma$	3,3 ± 0,1	3,2 ± 0,2	3,2 ± 0,2	3,2 ± 0,1

Amostra 2	Dose (kGy)			
	0	5	7	10
Resultado 1	3,1	3,3	3,3	3,3
Resultado 2	3,2	3,1	3,3	3,3
Resultado 3	3,1	3,4	3,3	3,3
Média ± $\sigma$	3,1 ± 0,07	3,3 ± 0,1	3,3	3,3

Como esperado, não houve variação no conteúdo de material inorgânico das amostras pela ação da radiação.

#### 4.2.7 – Determinação da massa mecânica

A determinação de massa mecânica foi realizada segundo o procedimento descrito no item 3.2.3.8 e, os resultados encontram-se na Tabela 12

Tabela 12 – Análise de massa mecânica (%m/m) das amostras de própolis irradiadas

Amostra 1	Dose (kGy)			
	0	5	7	10
Resultado 1	30,7	30,1	30,8	30,6
Resultado 2	29,9	30,3	30,3	30,6
Resultado 3	30,4	30,1	30,4	29,8
Média ± $\sigma$	30,3 ± 0,4	30,2 ± 0,1	30,5 ± 0,3	30,3 ± 0,4

Amostra 2	Dose (kGy)			
	0	5	7	10
Resultado 1	28,7	28,9	30,0	30,1
Resultado 2	28,1	28,7	30,0	29,4
Resultado 3	29,9	29,8	29,7	29,2
Média ± $\sigma$	28,9 ± 0,9	29,1 ± 0,6	29,9 ± 0,2	29,5 ± 0,5

Os resultados mostraram uma constância nos valores de massa mecânica nas amostras de própolis, mesmo após o tratamento por irradiação. Os valores encontrados estão dentro dos requisitos físico-químicos que apresenta o valor máximo de massa mecânica igual a 40%.

#### 4.2.8 - Determinação do teor de cera

A determinação do teor de cera foi feita segundo procedimento descrito no item 3.2.3.9, e os resultados estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 - Teor de cera (%m/m) das amostras de própolis irradiadas e não irradiadas

Amostra 1	Dose (kGy)			
	0	5	7	10
Resultado 1	7,8	7,9	8,2	7,9
Resultado 2	8,1	8,0	8,0	8,2
Resultado 3	7,8	7,8	7,9	8,1
Média $\pm \sigma$	7,9 $\pm$ 0,2	7,9 $\pm$ 0,1	8,0 $\pm$ 0,1	8,1 $\pm$ 0,1

Amostra 2	Dose (kGy)			
	0	5	7	10
Resultado 1	7,7	7,3	9,1	7,8
Resultado 2	7,8	7,9	8,5	8,9
Resultado 3	8,1	8,0	7,7	8,1
Média $\pm \sigma$	7,8 $\pm$ 0,2	7,7 $\pm$ 0,4	8,4 $\pm$ 0,70	8,2 $\pm$ 0,6

O conteúdo de cera da própolis inferior a 25% encontra-se dentro do limite admissível dos requerimentos físico-químicos e não foi afetado pela aplicação do tratamento de irradiação nas doses de até 10kGy.

As análises realizadas de resíduo seco, teor de umidade, cinzas, massa mecânica e ceras na própolis mostram que, além da estabilidade dos flavonóides frente à radiação ionizante, há uma grande estabilidade também para estes parâmetros. A radiação gama não provocou alterações significativas nesses valores quando comparados com as amostras não irradiadas.

Além da grande contribuição para o conhecimento da química da radiação da própolis, acreditamos ser este trabalho de grande importância para os produtores e exportadores de própolis. No Congresso Internacional de Propóleos realizado em Buenos Aires, Argentina, em setembro de 2000, do qual participamos, não houve apresentação de nenhum trabalho que mostrasse qualquer método de descontaminação da própolis. Esse fato torna este trabalho altamente original.



## 5- CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nestes ensaios permitem concluir que:

1. A dose de 5kGy permitiu a diminuição da carga microbiana - coliformes totais, aeróbios mesófilos e bolores e leveduras da própolis para níveis não detectáveis. *Salmonella* sp não foi isolada nas amostras analisadas.
  
2. A própolis apresenta grande estabilidade frente à radiação ionizante:
  - Não houve alteração significativa no teor de flavonóides totais da própolis quando submetida à irradiação com doses de até 10kGy.
  
  - Não houve variação na composição de compostos fenólicos artepelin C, kaenferol, crisina, galangina e quercetina como consequência da aplicação da radiação nas doses de até 10kGy.
  
  - Não houve alterações significativas nos resultados das análises de resíduo seco, teor de umidade, cinzas, massa mecânica e ceras como consequência da aplicação da radiação.
  
3. A aplicação do tratamento por irradiação na própolis é recomendável, uma vez que é capaz de reduzir adequadamente a carga microbiana sem contudo, afetar as propriedades que a caracterizam.

## 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - MATSUDA, S.H. Própolis – health care food. *Foods and Foods Incred. J. Jap.*, 160, p. 64-73, 1994.
- 2 - ARAI, S. Studies on functional foods in Japan – State of the art. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60(1), p. 9-15, 1996.
- 3 - GHISALBERTI, E.L. Propolis: a Review. *Bee World*. v. 60, p. 59-84, 1979.
- 4 - MARCUCCI, M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, v. 26, p. 83-99, 1995.
- 5 - GREENAWAY, W.; MAY, J.; SACAYS BROOK, T.; WHATLEY, F. R. Identification by Gas Chromatography – Mass Spectrometry of 150 compounds in propolis. *Z. Naturforsch. C.*, v. 46, p. 111-121, 1991.
- 6 - ABIA. *O Sistema e a indústria agroalimentar no brasil, diagnóstico de competitividade, indicadores e tendências*. ABIA, Departamento Agroindustrial da ABIA, São Paulo – 1993. p. 41.
- 7 - WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Safety and nutritional adequacy of irradiated food*, p. 1-17, Geneva, 1994.
- 8 - OWZARCZYK, H.B. – BOOK OF EXTENDED SYNOPSES – FAO/IAEA/WHO *International Conference on Ensuring the Safety and Quality of Food through Radiation Processing*; Antalya, Turquia, Outubro 1999.

- 9 – Brasil. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução normativa n. 03, Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade da própolis. *Diário Oficial da União*, Brasília, 19 de janeiro de 2001. Anexo VI
- 10 - DEBUYSER, E. *Própolis*. 1983. Tese (doutorado) – Faculte de Pharmacie, Universite de Nantes., France.
- 11 - MARCUCCI, M.C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. *Química Nova*, 19(5), p. 529-536, 1996.
- 12 - BANKOVA, V. S.; CASTRO, S. L.; MARCUCCI, M. C. Propolis: recent advances in chemistry plant origin. *Apidologie*, v. 31, p. 3-15, 2000.
- 13 - HELFENBERG, K.D. The analyses of beeswax in propolis. *Chemikerzeitung*, v. 31, p. 987-988, 1908.
- 14 - JAUBERT, G.F. Origin of the colour of beeswax and the composition of propolis. *C.r. hebd.acad.sci.*, v. 184, p. 1134-1136, 1926.
- 15 - DONADIEU, Y. *La propolis*. Paris: Maloine S. Éditeur, 1980.
- 16 - WINTSON, M.L. *The biology of the honey bee*. London: Havard Universiry Press., 281p, 1987.
- 17 - TULLOCH, A.P. The composition of beeswax and other waxes secreted by insects. *Lipids*, v. 5, n.2, p. 247-258, 1970.
- 18 -POPRAVKO, C.A.; SOKOLOV, I.V.; TURGOV, I.V. New natural phenolic triglycerides. *Khim.Prir.Soedin.*, v. 2, p. 169-173, 1982.

- 19 -PIEK, T. *Synthese Von Wachs bei der Honigbiene*. Doctorate thesis, Utrecht, Netherlands, 1962.
- 20 - CATTORINI, P.E. Le api e gli uomini. *Fitoterapia*, v. 34, p. 85-93, 1963.
- 21 - GREENAWAY, W.; SACAYS BROOK, T.; WHATLEY, F. R. The Composition and Plant Origins of Propolis: a report of work at Oxford. *Bee World*, v. 71, p. 107-118, 1990.
- 22 - BANKOVA, V. S.; DYULGEROV, A.; POPOV, S. S.; EVSTATIEVA, L.; KULEVA, L.; PUREB, O.; ZAMJANSAN, Z. Propolis produced in Bulgaria and Mongolia – phenolic compounds and plant-origin. *Apidologie*, 23(1), p. 79-85, 1992.
- 23 -TOMAS-BARBERAN, F. A.; GARCIA-VIGUEIRA, C.; VIT-OLIVEIRA, P.; FERRERES, F.; TOMAS-LORENTE, F. Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. *Phytochemistry*, v. 34, p. 191-196, 1993.
- 24 - PARK, Y. K.; KOO, M. H.; IKEGAKI, M.; CONTADO, J. L. Comparison of the Flavonoids aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. *Arq. Biol. Technol.*, 40(1), p. 97-106, 1997.
- 25 - BANKOVA, V.; BOUDOUROVA-KRASTEVA, G.; SFORCIN, J. M.; FRETE, X.; KUJUMGIEV, A.; MAIMONI-RODELLA, R.; POPOV, S. Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from São Paulo state. *Z. Naturforsch*, v. 54, p. 401-405, 1999.
- 26 - BANKOVA, V. S.; BOUDOUROVA-KRASTEVA, G.; POPOV, S.; SFORCIN, J. M.; FUNARI, S. R. C. Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. *Apidologie*, 29(4), p.361-367, 1998.

- 27 - SFORCIN, J. L.; FERNANDES JR., A.; LOPES, C. A. M.; BANKOVA, V. S.; FUNARI, S. R. C. – Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *J. Ethnopharmacol.*, v. 73, p. 243-247, 2000.
- 28 - PALMA, M.S., MALASPINA, O. El periódico. *Apitec*, n. 17, p. 6-10 , Set/Oct 1999.
- 29 - NAGAY, M.; GRANCAI, D. Colorimetric determination of flavanones in propolis. *Pharmazie*, v. 51, n.2, p. 100-101, 1996.
- 30 - WALKER, P., CRANE, E. Constituents of propolis. *Apidologie*, Paris, v. 18, p. 327-334, 1987.
- 31 - MERCKindex. 12. ed. Whitehouse Station, 1996. 1741p.
- 32 - BANKOVA, V.S.; POPOV, S.; MAREKOV, N.L. High-performance liquid chromatographic analysis of flavonoids from propolis. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v. 242, p. 135-143, 1982.
- 33 - GREENAWAY, W.; SCAYSBOOK, T.; WHATLEY, F.R. Headspace volatiles from propolis. *Flavour Frag. J.*, v. 4, p. 173-175, 1989.
- 34 - KULEVANOVA, S., STAFILOV, T., DOREVSKI, K. Determination of some macroelements in propolis by atomic spectrometry. *Acta Pharm.*, v. 45, p. 45-52, 1995.
- 35 - MOREIRA, T.F. Composição da própolis: vitaminas e aminoácidos. *Rev. Bras. Farmacogn.*, São Paulo, v. 1, p. 12-19, 1986.
- 36 - GONZÁLES, E., ORZALES, M.T. Estudios del propoleo: origen e importancia de los compuestos fenólicos en su composición. *Alimentaria*, Madrid, v. 283, p. 103-107, 1997.

- 37 - IKENO, K.; IKENO, T.; MIYAZAWA, C. Effects of propolis on dental caries in rats. *Caries. Res.*, 25, p. 347-351, 1991.
- 38 -PARK, Y.K.; KOO, M.H.; ABREU, J.A.S.; IKEGAKI, M.; CURY, J.A.; ROSALEN, P.L. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganism. *Cur. Microbiol.*, 34, p. 24-28, 1998.
- 39 -KOO, H.; GOMES, B.P.F.A.; ROSALEN, P.L.; AMBROSANO, G.M.B.; PARK, Y.K.; CURY, J. In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. *Arch. Oral Biol.*, 45, p. 141-148, 2000.
- 40 -SCHELLER, S.; STOJKO, A.; SZWARNOWIECKA, I.; TUSTANOWSKI, J.; OBUSZKO, Z.; Biological properties and clinical application of propolis. VI. Investigation of the influence of ethanol extracts of propolis (EEP) on cartilaginous tissue regeneration. *Arzneimittel Forschung. Drug Res.*, 27, p. 2138-2140, 1977.
- 41 - FRENKEL, K.; WEI, H.; BHIMANI, R.; YE, J.; ZADUNAISKY, J.; HUANG, M.T.; FERRARO, T.; CONNEY, A.H.; GRUNBERGER, D. Inhibition of tumor promoter-mediated processes in mouse skin and bovine lens by caffeic acid phenethyl ester. *Cancer Res.*, 53, p. 1255-1261, 1993.
- 42 -RAO, C.V.; DESAI, D.; RIVENSON, A.; SIMI, B.; AMIN,S.; REDDY, B.S. Inhibitory effect of caffeic acid esters on azoxymethane-induced biochemical changes and aberrant crypt foci formation in rat colon. *Cancer Res.*, 53, p. 4182-4188, 1993.
- 43 - GRUNDBERGER, D.; BARNERJEE, R.; EISINGER, K.; OLTZ, E.M.; EFROS, L.; CALDWELL, M.; ESTEVEZ, V.; NAKANISHI, K. Preferential citotoxicity on tumor cell by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. *Experientia*, 44, p. 230-232, 1988.

- 44 - MATSUNO, T. A new clerodane diterpenoid isolated from propolis. *Z. Naturforsch. C.*, 50, p. 93-97, 1995.
- 45 - BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; ADNYANA, I.K.; MIDORIKAWA, K.; MATSUSHIGE, K.; MESSAGE, D.; HUERTAS, A.A.G.; KADOTA, S. Cytotoxic hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. *J. Ethnopharmacol.*, 72, p. 239-246, 2000.
- 46 - DEBIAGGI, M.; TATEO, F.; PAGANI, L.; LUINI, M.; ROMERO, E.; Effects of propolis flavonoids on virus infectivity and replication. *Microbiologica.* 13, 207-213, 1990.
- 47 - SERKEDJEVS, J.; MANOLOVA, N.; BANKOVA, V. Antiinfluenza virus effect of some propolis constituents and their analogs (esters of substituted cinnamic-acids). *J. Nat. Prod.*, 55, p. 294-297, 1992.
- 48 - AMOROS, M.; LURTON, E.; BOUSTIE, J.; GIRRE, L.; SAUVAGER, F.; CORMIER, M. Comparison of the anti-herpes simplex virus activities of propolis and 3-methyl-but-2-enyl caffeate. *J. Nat. Prod.*, 57, p. 644-647, 1994.
- 49 - HARISH, Z.; RUBINSTEIN, A.; GOLODNER, M.; ELMALIAH, M.; MIZRACHI, Y. Suppression of HIV-1 replication by propolis and its immunoregulatory effect. *Drug. Exp. Cli. Res.*, 23, p. 89-96, 1997.
- 50 - VYNOGRAD, N.; VYNOGRAD, I.; SOSNOWSKI, Z.A. Comparative multi-centre study of the efficacy of propolis, acyclovir and placebo in the treatment of genital herpes (HSV). *Phytomedicine*, 7, p. 1-6, 2000.
- 51 - MERESTA, L., MERESTA, T. Effect of pH on bacterial activity of propolis. *Bull. Vet. Inst. Pulawy.*, v. 24, p. 21-25, 1980.

- 52 - PEPEJNIAK, S., JALSENIAK, I., MAYSINGER, D. Flavonoid content Propolis Extracts and growth inhibition of *Bacillus subtilis*. *Pharmazie*, Berlin, v. 40, n.2, p. 122-123, 1985.
- 53 - GRANGE, J.M.; DAVEY, R.W. Antibacterial properties of própolis (bee glue). *J. Royal Society Med.* 83, p. 159-160, 1990.
- 54 - KEDZIA, B. G., IWASZKIWCZ, J. Pharmacological investigations of ethanolic extract of propolis. *Phytoterapie*, London, v. 6, p. 7-10, 1990.
- 55 - KROL,W.; SCHELLER, S.; SHANI, J.; PIETTTSZ, G.; CZUBA, Z.; Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on the growth of *staphylococcus aureus* . *Arzneim-forsch. Drug. Res.* v. 48, p. 607-609, 1993.
- 56 -SCHELLER, S.; SZAFLARSKI, J.; TUSTANOWSKI, J.; NOLEWAJKA, E.; STOJKO, A.; Biological properties and clinical application of propolis I. *Arzneim-forsch Drug Res.* v. 27, p. 889-890, 1977.
- 57 - MILLET-CLERK,J.; MICHAEL, D.; SIMERAY,J.; CHAUMONT, J. P.; Étude préliminaire des propriétés fongistatiques de la propolis comparées à celles de quelques produits commerciaux. *Plant Méd phytoter.* 21, p. 3-7, 1987.
- 58 - HAUSEN, B.M.; WOLLENWEBER, E.; SENFF, H.; POST, B.; Propolis allergy. I. Origin, properties, usage and literature review. *Contact Dermatitis*, 17, p. 163-170, 1987.
- 59 - GOETZ, P. Monographies médicalisées de phytothérapie: própolis. *Phytoterapie*, v. 3, p. 29-30, 1990.
- 60 -KABANOV, A. N.; SUVOROV, A.M.; LESNYKH, Iu.F.; KONONOV, A.V.; LOPUSHANSKI, V.G. endoscopic treatment of duodenal ulcers with proposal. *Sov. Med.*,6, p. 92-94,1989.



- 61 - MAGRO FILHO, O.; PERRI DE CARVALHO, A.C. Application of própolis to dental sockets and skin wounds. *J. Nihon Univ.Sch. Dent*, 32, p. 4-13, 1990.
- 62 - DRAGANOVA, L.; DISHOVSKI, CH.; DISHOVSKA, Z.; SHKENDEVOV, S.; SAMNALIEV, M. In vitro and in vivo studies of drugs on the bases of propolis for local application. In: XXXII Int. Cong. Apiculture, 221, 1989, Rio de Janeiro. *Resumos...*Rio de Janeiro.
- 63 -NORMAS para la calidad Del propoleo: Espanha. Barcelona. Associação Internacionale de Pesquisa de Abejas, 1989. 15p
- 64 - MARCUCCI, M.C. Controle de Qualidade de própolis., São Paulo, 1998. v. 48  
Disponível em: <http://www.apacame.org.br>.  
Acesso em: 30 de março de 2001
- 65 - BECHARA, E. J. H. **Cromatografia Líquida Sob Alta Pressão** - São Paulo, p. 11-15, 1979.
- 66 - BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria nº 367, de 04/09/97 – Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de mel. Publicada no *Diário Oficial da União* 8 de setembro de 1997. Seção 1.
- 67 - BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria nº 368, de 04/09/97 – Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Elaboração para Estabelecimentos Elaboradores/ Industrializadores de Alimentos. Publicada no *Diário Oficial da União* 8 de setembro de 1997. Seção 1.
- 68 - *IAEA BULLETIN* Rising calls for food safety. v. 43, n.02, p.37-42, Fevereiro de 2001.

- 69 - GERMANO, M.I.S.; GERMANO P.M.L.; SPOLAORE, A.J.G. *Higiene e vigilância sanitária de alimentos*, 2001. parte 27, irradiação de Alimentos, p. 421-439.
- 70 - BRASIL. Decreto nº 72.718, de 29 de Agosto de 1973. Dispõe sobre normas gerais para a irradiação de alimentos. *Diário Oficial da União*, Brasília. D.F. 30 de Agosto de 1973.
- 71 - DEL MASTRO, N.L. Alimentos esterilizados para uso em hospitais e rações militares. *Rev. Bras. Pesqui. Desenvol.*, v. 2, n. 1, p. 1-4, 1999.
- 72 - JAY, M. J. *Modern Food Microbiology*. 6. ed. Gaithersburg, md: Aspen Publishers, 2000.
- 73 - ADAMS, M. R.; MOSS, M.O. *Microbiologia de Los Alimentos*. 1.ed. Zaragoza: Acribia, 1997.
- 74 - FARKAS, J. Principios de la irradiación de alimentos. In: LA IRRADIACION DE ALIMENTOS EN LATINOAMÉRICA, octubre 24-28, 1983, Lima, Peru. *Proceedings...*Vienna: OIEA, 1985.p. 11-23.
- 75- DIEHL, J. F. *Safety of irradiated foods*. 1. ed. New York, N.Y.:Marcel deckker, 1990.
- 76 - SATIN, M *The case of food irradiation*. International conference of the Agricultural Research Institute. p. 93-110, 1993.
- 77 - COSTA, S. O. P. *Genética molecular e de microrganismos*. São Paulo: Manole, 1997.

- 78 - MAXY, R. B. Irradiation of Food for public Health Protection. *J. Food Prot.*, v. 45, n. 4, p. 363-366, 1992.
- 79 - OMS. *La irradiación de los alimentos una técnica para conservar y preservar la inocuidade de los alimentos*. Genebra, Organización Mundial de la Salud. p. 18-23, 1989.
- 80 - MURANO, P. S. Quality of Irradiated Food. In: *Food Irradiation. A Sourcebook*. Ed. E. A. Murano. Iowa State University, Ames, Iowa, p. 63-87, 1995.
- 81 - DIEHL, J. F., JOSEPHSON, E. S. Assessment of wholesomeness of irradiated food: a review. *Acta Aliment.*, v. 23, n.2, p. 195-214, 1994.
- 82 - DIEHL, J. F. Food irradiation: is it an alternative to chemical preservatives? *food addit. contam.*, v. 9, p. 409-416, 1992.
- 83 - SINGH, H. *Wholesomeness of irradiated foods*. FIPCOS'95-9. St. Hyacinthe, Quebec, 1995.
- 84 - THAYER, D. W.; BOYD, G. Survival of *Salmonella typhimurium* ATCC14028 on the Chicken Legs or in Mechanically deboned chicken Meat Gamma Irradiated in air or vacuum at Temperature of -20 to +20 °C. *Poultry Sci.*, Champaign, v. 70, n.4, p. 1026-1033, 1991.
- 85 - MOY, J. H. Efficacy of irradiation vs thermal methods as quarantine treatments for tropical fruits. *Radiat. Phys. Chem.*, Oxford, v. 42, n.1-3, p. 269-272, 1993.
- 86 - FAO, IAEA, WHO, ICGFI *Code of good irradiation practice for insect desinfestation of dried fruits and tree nuts*. ICGFI/XI/WP - 10. 1994.

- 87 - BRASIL. Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos, da Secretária Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Portaria nº 09 de 08 de Março de 1985. *Diário Oficial da União*, Brasília. D.F. 13 de Março de 1985. Seção 1.
- 88 - BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução No. 21 de 26 de janeiro de 2001. Dispõe sobre regulamento técnico para irradiação de alimentos. *Diário Oficial da União*, Brasília, 29 de janeiro de 2001. Seção I, p.35.
- 89 - BRASIL. Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos, da Secretária Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Portaria nº 30 de 25 de Setembro de 1989. *Diário Oficial da União*, Brasília. D.F. 28 de Setembro de 1989. Seção 1.
- 90- WHO TECHNICAL REPORTS SERIES 890. *“High-dose irradiation: wholesomeness of food irradiated with doses above 10 kGy”*, WHO, Geneva, 1999.
- 91 - DEL MASTRO, N. L., Development of Food Irradiation in Brazil. *Progress in Nuclear Energy*, p. 229-248, 1999.
- 92 - OLIVEIRA, L. C., Present Situation of Food by Irradiation and the Regulatory Perspectives for Brazil. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 57, p. 249-252, 2000.
- 93 - FRANCO, M.G.D.B.; LANDGRAF, M *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Atheneu, 1996.
- 94 - FRAZIER, W.C.; WESTHOFF, D.C. *Microbiología de los alimentos*. 4.ed. ZARAGOZA: Acribia, 1993.
- 95 - MURANO, E. A. Irradiation of Fresh Meats. *Food Technol.*, p. 52-54, 1995.

- 96 - MONK, J. D.; BEUCHAT, L. R.; DOYLE, M. P. Irradiation Inactivation of Food-borne Microorganisms. *J. Food Prot.*, Ames, v. 58, n.2, p. 197-208, 1995.
- 97 - ICMSF – *Microorganisms in Food 1*. Their Significance and Methods of Enumeration. 2.ed. Zaragoza: Acribia, 2000.
- 98 - SILVA, N.; JUNQUEIRA, N.F.A; SILVEIRA, N.F.A. *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. São Paulo: varela, 1997.
- 99 – United States Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*. 6.ed. Gaithersburg, AOAC International. 1984.
- 100 - PESSOA, G. V. A.; SILVA, E. A. M. Meios de Rugai e lisina – motilidade combinados em um só tubo para a identificação presuntiva de enterobactérias. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, São Paulo, v. 32, p. 97-100, 1972.
- 101 - DOW, L Spetrophotometric determination of quercetin. *Anal. Chem.*, 31(7), p. 1184-1187, 1959.
- 102 - VENNAT, B.; GROSS, D.; POURRAT, A.; POURRAT, H. *Hamamelis virginiana*: Identification and assay of proanthocyanidins, phenolic acids and flavonoids in leaf extracts. *Pharm. Acta Helv.*, 67(1), p. 11-14, 1992.
- 103 - HAYASHI, K.; KOMURA, S.; ISAJI, N.; OHISHI, N.; YAGI, K. Isolation of antioxidative compounds from brazilian propolis: 3,4-Dihydroxy-5-prenylcinnamic Acid, a novel potent antioxidant. *Chem. Pharm. Bull.*, 47(11), p. 1521-1524, 1999.
- 104 - INSTITUTO ADOLFO LUTZ Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 3.ed. São Paulo: O Instituto, 1985. v. 1, p. 25-28.

- 105 - AOAC *Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemists*. Arlington, AOAC, 1992.
- 106 - WOISKY, R. G. *Métodos de controle químico de amostras de própolis*. São Paulo: 1996. 74p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- 107 - WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: parameters and procedures for chemical quality control. *J. Apic. Res.*, 1998.