



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

ESTUDO COMPARATIVO DE DIFERENTES EXTRAÇÕES DE  
PRÓPOLIS DOS GRUPOS 12 E 13 E SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Cleber Silveira Moraes

Biólogo

Prof. Dr. Yong Kun Park

Orientador

Tese apresentada à  
Faculdade de Engenharia de  
Alimentos da Universidade  
Estadual de Campinas, para a  
obtenção do título de Mestre em  
Ciência de Alimentos.

Campinas

2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

M791e Moraes, Cleber Silveira  
Estudo comparativo de diferentes extrações de própolis dos grupos 12 e 13 e suas atividades biológicas / Cleber Silveira Moraes. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Yong Kun Park  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Propole. 2. Extração. 3. *Dalbergia*. 4. *Baccharis*. 5. Flavonóides. I. Park, Yong Kun. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.  
(ckn/fea)

Titulo em ingles: Comparative study of different extractions of propolis groups 12 and 13

Palavras-chave em inglês (Keywords): Propolis, Extraction, *Dalbergia*, *Baccharis*, Flavonoids

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Yong Kun Park

Hélia Harumi Sato

Gláucia Maria Pastore

Fred Yukio Fujiwara

Programa de Pós-Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

## BANCA EXAMINADORA

Tese defendida e aprovada em março de 2007, pela banca examinadora constituída pelos professores:

---

Prof. Dr. Yong Kun Park  
Orientador

---

Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore  
Membro

---

Profa. Dra. Hélia Harumi Sato  
Membro

---

Prof. Dr. Fred Yukio Fujiwara  
Membro

*Não sou conformista.*

*O homem só não consegue o que não deseja.*

*Zeferino Vaz.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus.

Ao professor Yong Kun Park pela orientação, experiência e amizade transmitidas com a maior fidelidade.

À minha família, Dirceu da Silveira Moraes, Inês Boff da Silveira Moraes, Douglas Silveira Moraes e Dirceu Silveira Moraes Júnior pelo apoio emocional e financeiro.

À minha namorada Fabiane Pereira Camargo pela ajuda na realização desse trabalho, compreensão e carinho em todos os momentos.

Aos professores, Gláucia Maria Pastore, Hélia Harumi Sato, Helena Teixeira Godoy, Fred Yokio Fujiwara, que me auxiliaram com muita sabedoria na realização desse trabalho.

Aos meus amigos de trabalho, Andreas Dausch e Patrícia Fort pela amizade e auxílio na realização desse trabalho.

Aos colegas, José Alexandre Abreu, Edivaldo Pacheco e Marta Duarte pela doação de amostras e auxílio nas pesquisas.

À secretaria de Pós-graduação e ao Departamento de Ciência de Alimentos pela competência e dedicação prestadas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.

## INDICE

1	Introdução .....	1
2	Objetivos .....	3
3	Revisão Bibliográfica .....	4
3.1	Composição química .....	4
3.2	Origem botânica .....	5
3.3	Efeitos regenerativos em tecidos biológicos e cura de feridas .....	6
3.4	Atividade antiinflamatória .....	6
3.5	Efeitos analgésicos .....	10
3.6	Inibição enzimática .....	11
3.7	Atividades hepatoprotetoras .....	12
3.8	Ação hormonal .....	14
3.9	Atividades antioxidantes e anti-radicais livres .....	14
3.10	Potencial de detoxificação .....	16
3.11	Atividade inseticida .....	18
3.12	Atividade anti-parasitária .....	18
3.13	Atividade anti-bacteriana .....	19
3.13.1	Atividade contra úlcera péptica .....	22
3.13.2	Atividade contra cárie dental .....	23
3.13.3	Atividade anti-fúngica .....	26
3.14	Atividade anti-viral .....	27
3.14.1	Atividade anti-adenovírus .....	28
3.14.2	Atividade anti-HIV .....	28
3.14.3	Atividade anti-herpes .....	29
3.14.4	Atividade anti-influenza .....	30
3.14.5	Atividade anti-hepatite .....	30
3.15	Antibiótico natural na alimentação de animais .....	31
3.16	Atividade anti-tumoral .....	31
3.17	Proteção do DNA .....	35
3.18	Sinergismo da própolis com quimioterapia .....	36
3.19	Atividade imuno-moduladora .....	38
3.20	Potencial alergênico da própolis .....	41
4	Material e métodos .....	43
4.1	Coleta das amostras de própolis .....	43
4.2	Extração dos compostos químicos da própolis utilizando reagentes diferentes .....	43
4.3	Extração dos compostos fenólicos de própolis com água destilada e diferentes concentrações de etanol .....	44
4.4	Espectrofotometria na região ultravioleta-vísivel .....	44
4.5	Cromatografia em camada delgada de alta eficiência em fase reversa (CCDAE-FR) .....	44
4.6	Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) .....	45
4.7	Determinação de flavonóides totais .....	46
4.8	Determinação de compostos fenólicos totais .....	46
4.9	Determinação da atividade anti-radical (DPPH) .....	47
4.10	Determinação da atividade antimicrobiana (Antibiograma) .....	48
4.11	Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) .....	49

5	Resultados e discussão .....	52
5.1	Extração de compostos fenólicos de própolis utilizando diferentes solventes.....	52
5.2	Espectrofotometria na região ultravioleta-visível de diferentes extratos de própolis obtidos com diferentes solventes .....	53
5.3	Cromatografia em camada delgada de alta eficiência em fase reversa (CCDAE-FR) dos extratos de própolis obtidos com diferentes solventes.....	56
5.4	Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) dos extratos de própolis obtidos com diferentes solventes .....	57
5.5	Determinação da atividade antimicrobiana dos extratos de própolis obtidos com diferentes solventes.....	61
5.6	Extração de compostos fenólicos de própolis utilizando etanol em diferentes concentrações.....	63
5.7	Espectro de absorção na região ultravioleta visível dos extratos de própolis dos grupos 12 e 13 obtidos com água e diferentes concentrações de etanol	64
5.8	Cromatografia em camada delgada de alta eficiência em fase reversa (CCDAE-FR) dos extratos aquosos e dos extratos de própolis obtidos com diferentes concentrações de etanol .....	67
5.9	Determinação de fenólicos totais das própolis do grupo 12 e grupo 13.....	68
5.10	Determinação de flavonóides totais das própolis do grupo 12 e grupo 13..	69
5.11	Determinação da atividade anti-radical (DPPH) das própolis do grupo 12 e grupo 13.....	70
5.12	Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) das própolis dos grupos 12 e 13 para diferentes microrganismos.....	71
6	Conclusões .....	75
7	Referências bibliográficas .....	76

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Extratos de própolis do grupo 12 com solventes diferentes.....	52
Figura 2 Extratos de própolis do grupo 13 com solventes diferentes.....	53
Figura 3 Espectrofotometria UV-VIS de própolis do grupo 12 obtidos com diferentes solventes.....	54
Figura 4 Espectrofotometria UV-VIS de própolis do grupo 13 obtidos com diferentes solventes.....	55
Figura 5 Cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE-FR) dos extratos de própolis do grupo 12 obtidas com diferentes solventes.....	56
Figura 6 Cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE-FR) dos extratos de própolis do grupo 13 obtidas com diferentes solventes.....	57
Figura 7 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa dos extratos de própolis do grupo 12 obtidos com diferentes solventes.....	59
Figura 8 CLAE-FR mostrando a diferença na extração de compostos fenólicos da própolis do grupo 13 através de diferentes diluentes.....	60
Figura 9 Antibiograma de própolis do grupo 12 (esquerda) e própolis do grupo 13 (direita) com <i>S. aureus</i> .....	62
Figura 10 Coloração dos extratos etanólico da própolis do grupo 12 utilizando-se diferentes concentrações de etanol.....	63
Figura 11 Coloração dos extratos etanólico da própolis do grupo 13 utilizando-se diferentes concentrações de etanol.....	64
Figura 12 Espectro de absorção na região UV-VIS, do extrato aquoso (0% de etanol) e extratos de própolis do grupo 12 obtidos com diferentes concentrações de etanol (10 à 100%).....	65
Figura 13 Espectro de absorção na região UV-VIS, do extrato aquoso (0% de etanol) e extratos de própolis do grupo 13 obtidos com diferentes concentrações de etanol (10 à 100%).....	66
Figura 14 Cromatografia de camada delgada dos extratos etanólicos da própolis do grupo 12 extraídos com água (0% de etanol) e diferentes concentrações de etanol (0 à 100%).....	67
Figura 15 Cromatografia de camada delgada dos extratos etanólicos da própolis do grupo 13 extraídos com água (0% de etanol) e diferentes concentrações de etanol (0 à 100%).....	68
Figura 16 Fenólicos totais em mg ácido gálico equivalente / g própolis das própolis do grupo 12 e grupo 13.....	69
Figura 17 Flavonóides totais (AlCl <sub>3</sub> ) em mg quercetina equivalente / g das própolis do grupo 12 e grupo 13.....	70
Figura 18 Atividade anti-radical das própolis dos grupos 12 e grupo 13.....	71

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Atividade anti-radical das própolis dos grupos 12 e grupo 13. ....	71
Tabela 2 Concentração mínima inibitória (MIC) em $\mu\text{g/mL}$ de própolis do grupo 12 e grupo 13 contra vários microrganismos patogênicos .....	73
Tabela 3 Concentração mínima inibitória ( $\mu\text{g/mL}$ ) de própolis dos grupos 12 e 13 em comparação com antibióticos comerciais para diferentes bactérias. ....	73

## RESUMO

Própolis é uma substância resinosa elaborada por abelhas da espécie *Apis mellifera* e usada como revestimento da colméia. Para a produção da própolis as abelhas usam a matéria prima coletada de diversas partes da planta como broto, botões florais, exsudatos resinosos e outras partes do tecido vegetal. A própolis é utilizada na medicina popular há 300 anos antes de Cristo principalmente por apresentar propriedades antimicrobiana, antiinflamatória e cicatrizante. Nos últimos anos foi demonstrado que alguns tipos de própolis apresentam atividade antioxidante, hipotensiva, anestésica, anticâncer, anti-HIV e anticariogênica.

A composição química da própolis está intimamente relacionada com sua origem botânica, sendo que em média, 60% da própolis é formada por resinas e bálsamos, 30-40% de ceras, 5-10% de óleos essenciais e 5% de grãos de pólen.

As própolis brasileiras são classificadas em 13 grupos conforme sua composição físico-química, que é diretamente relacionada com a planta utilizada pelas abelhas para coleta das resinas e exsudatos. Nesse trabalho foi escolhido as própolis dos grupos 12 e 13, por serem as mais comercializadas no Brasil, além de possuírem alta atividade biológica.

As própolis dos grupos 12 e 13 possuem colorações diferenciadas, que variam de esverdeada à avermelhada, respectivamente. Própolis do grupo 12 é provinda de folhas jovens de *Baccharis dracunculifolia* e a própolis do grupo 13 de exsudatos do caule de *Dalbergia ecastophyllum*. O resultado dessa tese mostra que apesar das diferenças das própolis dos grupos 12 e 13, ambas possuem similaridade quanto a suas atividades biológicas. A variação de compostos

fenólicos totais e atividades biológicas das própolis são devido a fonte botânica utilizada pelas abelhas e a concentração e diluente utilizado para a extração.

Nesse trabalho foram avaliadas as quantidades de compostos fenólicos e flavonóides nas própolis do grupo 12 e grupo 13 e suas atividades biológicas em extratos obtidos usando diferentes solventes e diferentes concentrações.

## ABSTRACT

Propolis is a resinous substance produced by the honeybee *Apis mellifera*. It is used by the bees to seal of holes and to protect the beehive. To produce propolis the honeybee uses resins of leaf buds and buds, resinous exudates and other parts of plant tissues. Propolis is used as a folk medicine since 300 BC. Numerous biological properties have been found including anti-microbial, anti-inflammatory and cicatrizant. Recently, studies revealed that propolis also has antioxidant, hipotensive, anaesthetic, anti-cancer, anti-HIV and anti-cariogenic activities.

The chemical composition of propolis depends on its botanical origin. In average it contains 60% resins and balms, 30-40% wax, 5-10% essential oils and 5% pollen.

The Brazilian propolis is classified into 13 distinct groups according to their chemical composition, which is directly related to the plants used to collect resins and exudates. In this study, propolis of group 12 and 13 were chosen, as they are the most commercialized in Brazil and show high biological activity.

Propolis of group 12 and 13 show different colors, that vary from greenish to reddish, respectively. Propolis of group 12 is made of resins found on leaf buds of *Baccharis dracunculifolia*. Propolis of group 13 is made of exudates of *Dalbergia ecastophyllum*. The results of this thesis demonstrate that despite the differences between propolis of group 12 and 13, they both show similar biological activities. The variation of phenolic compounds and of the biological activities depends on the botanical origin visited by the honeybee, the concentration and kind of solvent used for the extraction process.

In this work phenolic compounds and flavonoids of propolis group 12 and 13 were quantitatively studied and the biological activities of different extracts, using different solvents and concentrations, evaluated.

# 1 Introdução

Há uma longa história do uso da própolis, que começou há 300 anos antes de Cristo, onde a própolis era utilizada pelos egípcios para mumificação dos faraós, porém recebeu dos gregos o nome própolis, que significa “pro” “a favor” e “polis” “cidade”, pelo fato de que os gregos a utilizavam para cicatrização de feridas (Ayala *et al.*, 1985; Bankova *et al.*, 1983; Dobrowolski *et al.*, 1991; Esser, 1986; Ghisalberti, 1979; Hausen *et al.*, 1987).

Na atualidade a própolis é usada como remédio caseiro e de uso estético, principalmente depois de constatado que a própolis possui várias atividades biológicas como ação antiséptica, antimicótica, bacteriostática, antiinflamatória, antioxidante, sendo utilizada nos tratamentos de queimaduras, dermatites, úlceras, psoríase, herpes e pruridos porque promove a regeneração de tecidos. A própolis é também utilizada contra reumatismo, gengivites, estomatites, apresentando ação anestésica cinco vezes mais eficaz que a cocaína. Recentemente a própolis passou a ser utilizada como um constituinte de alimentos saudáveis e como alimento funcional (Ayala *et al.*, 1985; Bankova *et al.*, 1983; Burdock, 1998; Dobrowolski *et al.*, 1991; Esser, 1986; Ghisalberti, 1979; Hausen *et al.*, 1987).

Própolis é elaborada por abelhas melíferas (*Apis mellifera*) a partir de vários tipos de botões florais, folhas novas e exsudatos de várias plantas. Esta resina é mastigada e durante a mastigação é adicionado enzimas salivares e cera. A própolis resultante é usada como um cimento na reparação de rachaduras na colméia e pode servir como proteção contra insetos intrusos ou pequenos animais

que conseguiram entrar, foram picados, morreram e podem começar a se decompor (Ghisalberti, 1979).

A composição química da própolis é complexa e pode conter mais de 300 componentes diferentes em sua estrutura, estando diretamente relacionada com a fonte botânica utilizada pelas abelhas para coleta de resinas, exsudatos e outros materiais. De modo geral 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 pequenas quantidades de vitaminas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, C e E (Ghisalberti, 1979).

As própolis brasileiras são classificadas em 13 grupos conforme sua composição físico-química, que é diretamente relacionada com a planta utilizada pelas abelhas (Daugusch *et al.*, 2006).

Na Europa a própolis é considerada como um produto medicinal e em outros países como Japão ou Estados Unidos, é considerada como aditivo alimentar de baixa restrição (Bankova *et al.*, 2000; Burdock, 1998; Greenaway *et al.*, 1991; Marcucci, 1995).

## 2 Objetivos

Este trabalho teve o objetivo avaliar a quantidade de compostos fenólicos e flavonóides presentes na própolis dos grupos 12 e 13, e testar suas atividades biológicas, tal como atividade antimicrobiana através de análises microbiológicas por antibiograma e MIC (concentração mínima de inibição) da própolis contra *Staphylococcus aureus*, atividade anti-radical e atividade antioxidante.

Nesse trabalho foram testadas extrações de própolis com diferentes solventes, como metanol, etanol, acetato de etila, hexano, clorofórmio e acetona, com o intuito de selecionar os solventes com maior potencial de extração de compostos fenólicos.

Foi estudada a concentração de etanol adequada para maior extração de compostos com atividades biológicas de própolis dos grupos 12 e 13, com a finalidade de obtenção de extratos alcoólicos de própolis para comercialização.

## 3 Revisão Bibliográfica

### 3.1 Composição química

A composição química da própolis depende fortemente da estação do ano (Sforcin *et al.*, 2001) e de sua origem botânica (Bankova *et al.*, 2000). Própolis vindo de zona temperada é geralmente composto com 50-60% de resinas e bálsamos, 30-40% de cera, 5-10% de essência e óleos aromáticos, 5% de pólen, e 5% de outras substâncias, como ácidos alifáticos, ésteres, ácidos aromáticos, ácidos graxos, carboidratos, aldeídos, amino ácidos, cetonas, chalconas, diidrochalconas, terpenóides, vitaminas (B1, B2, B6, C e E ) e minerais (alumínio, antimônio, cálcio, césio, cobre, ferro, lítio, manganês, mercúrio, níquel, prata, vanádio e zinco) (Almeida e Menezes, 2002; Ghisalberti, 1979).

Há um tipo de própolis que é coletada por abelhas indígenas sem ferrão (*Meliponinae*) na América do Sul, que contém material resinoso de plantas misturado com cera de abelhas e terra, que é denominado de “geoprópolis” (Bankova *et al.*, 1998).

Própolis da região tropical contém flavonóides, di e triterpenos, lignina e outras substâncias fenólicas, ácido prenil-p-cumárico, acetofenonas, açúcares, açúcares-álcoois, ceras, vitaminas e minerais. Também são encontrados vários compostos voláteis como monoterpenos e sesquiterpenos (Bankova *et al.*, 1994).

Os flavonóides agliconas contido nas própolis do Brasil variam conforme a região (Park *et al.*, 1997) e a composição química em geral depende da espécie de abelhas (Koo e Park, 1997). A composição química da própolis da mesma região, mas coletada de três diferentes espécies de abelhas melíferas foi

comparada e diferenças significativas na composição química foram encontradas (Silici e Kutluca, 2005).

### **3.2 Origem botânica**

Há diferenças significativas na composição da própolis dependendo da época do ano, condições geográficas e principalmente da origem botânica (Sforcin *et al.*, 2001). Própolis de zonas temperadas são feitas de exsudatos de botões florais principalmente de álamo e betula. Álamo é a principal origem botânica das própolis da América do Norte (Garcia-Vigueira *et al.*, 1993), Europa (Greenaway *et al.*, 1987) e as partes não tropicais da Ásia (Chi *et al.*, 1996). Na região nordeste da Rússia, botões de betula (*Betula verrucosa*) foram identificadas como a principal origem botânica das própolis (Popravko e Sokolov, 1980).

Em relação a própolis da região tropical, existe maior variação. Através de observações no comportamento de abelhas melíferas e análises fitoquímicas foi demonstrado que a própolis da Venezuela contém os mesmos poliprenil benzofenonas como os encontrados nas resinas de *Clusia major* e *Clusia minor* (*Guttiferea*) (Tomás-Barberán *et al.*, 1993). A planta usada para a coleta de exsudatos ou resinas para a preparação da própolis no deserto de Sonora (América do Norte) é a *Ambrosia deltoídea* (Wollenweber *et al.*, 1997), na Austrália é a *Xanthorrhoea* sp. (Ghisalberti *et al.*, 1978) e no Brasil a *Araucária* ssp (Bankova *et al.*, 1996) e *Baccharis dracunculifolia* (Park *et al.*, 2004).

### **3.3 Efeitos regenerativos em tecidos biológicos e cura de feridas**

(Ozturk *et al.*, 1999), demonstrou que a acetilcolina (Ach) e a própolis facilitam a cura de ferida da córnea em ratos comparados como grupo controle, que recebeu administração de solução salina. De acordo com (Peruchi *et al.*, 2000) o processo de reparo por incisão cutânea começou com a liberação de sangue e formação de coágulo sanguíneo. A própolis pode atuar positivamente nas feridas favorecendo a cura devido ao efeito antisséptico, com propriedades curadoras e analgésicas. (Bretz *et al.*, 1998), usou hidróxido de cálcio e própolis na avaliação potencial de cura da própolis expondo pulpas dentais de ratos. Ambas substâncias testadas tiveram efeito em manter os agentes inflamatórios e células mibrobianas em baixas concentrações. Os efeitos do enxágue bucal contendo própolis no reparo tecidual depois do procedimento cirúrgico dental (sulcoplastia) em humanos foi testado (Magro-Filho e Carvalho, 1994). (Magro-Filho e Carvalho, 1994) observou que o uso de própolis acelera a formação de tecido conectivo em situações pós-operatórias.

(Stojko *et al.*, 1978) constatou o aumento da regeneração de tecido ósseo em ratos que receberam a administração de própolis.

### **3.4 Atividade antiinflamatória**

A inflamação é ativada pela liberação de mediadores químicos iniciado pelo tecido injuriado e células migratórias (Rankin *et al.*, 1996; Serhan e Chiang, 2004). Entre a identificação dos mediadores do processo inflamatório, estão: aminas vasoativas (histaminas e serotoninas), eicosanóides (metabólitos do ácido

araquidônico, prostaglandinas e leucotrienos), fatores de agregação de plaquetas (PAF), citocinas (interleucina e TNF), quininas (bradiquinina), radicais livres de oxigênio, entre outros (Czermak *et al.*, 1998; Ohishi, 2000). Essas substâncias são produzidas por células inflamatórias que incluem os leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos, basófilos), células endoteliais, mastócitos, macrófagos, monócitos e linfócitos (Fiala *et al.*, 2002). A própolis e seus subprodutos que têm propriedades antiinflamatórias são descritas em diferentes modelos de inflamação, incluindo o formaldeído induzindo artrites, edema de pata induzido por prostaglandina PGE2, carragenina ou radiação (Dobrowolski *et al.*, 1991; El-Ghazaly e Khayyal, 1995; Park e Kahng, 1999; Park e Woo, 1996), como também inflamação aguda induzida por zinomazan (Ivanovska *et al.*, 1995). Em vários desses estudos foram observados que própolis apresenta efeito similar a drogas antiinflamatórias usadas como controles positivos em experimentos. Foi descrito na literatura que durante a fase aguda da inflamação, o principal fenômeno de ativação do processo é a produção local de prostaglandinas (especialmente PGE2) e leucotrienos derivados do ácido araquidônico. Esses prostanóides são relativamente instáveis e notoriamente não seletivos na interação com vários subtipos de receptores prostanóides como demonstrado em amostras preparadas de tecidos isolados (Coleman *et al.*, 1994; Hata e Breyer, 2004).

Inflamação no organismo é responsável por danos no tecido. É uma forma de nos proteger contra injúria e infecção (Gallin, 1989). Depois da danificação do tecido ocorrido pelo agente de injúria, parte do tecido danificado deve ser removido, assim o corpo pode começar o processo de cura. Se o agente de injúria não pode ser eliminado completamente a inflamação aguda pode progredir para

um estágio crônico com dor, rubor e inchaço (Vane e Botting, 1996). Vários estudos têm demonstrado que a própolis é um agente antiinflamatório potente nas inflamações, aguda e crônica (Ledón *et al.*, 1997; Uzel *et al.*, 2005). O ácido araquidônico é um precursor de prostaglandina. Esse ácido graxo é armazenado como um fosfoglicerídeo na membrana celular e é convertido para prostaglandinas por ciclooxigenases depois de ter ocorrido danos no tecido. A prostaglandina então é responsável por iniciar a inflamação. Algumas substâncias da própolis são capazes em inibir a enzima ciclooxigenase e assim a inflamação (Sigal e Ron, 1994). Há diferentes mecanismos para agentes antiinflamatórios. Os esteróides inibem a liberação de ácido araquidônico para os fosfolipídeos da membrana celular e assim bloqueiam a produção de eicosanóides (Mirzoeva e Calder, 1996). Drogas antiinflamatórias não esteróides (NSAIDs) bloqueiam a enzima ciclooxigenase, assim o ácido araquidônico não pode ser transformado em prostaglandina. Crisina, uma substância isolada da própolis suprime a expressão da ciclooxigenase-2 por inibição de um fator nuclear para produção de IL-6(NF-IL6) DNA-ligado ativo (Woo *et al.*, 2005). Há várias vias alternativas que também devem ser bloqueadas para inibição efetiva dos responsáveis pela inflamação. Flavonóides e uma relação de compostos isolados da própolis foram também mostrados como inibidores da enzima por peroxidação de ácido araquidônico (Baumann *et al.*, 1980). A cortisona do hormônio esteróide também possui atividade antiinflamatória bloqueando essas enzimas (Goodwin, 1994). Na própolis do álamo europeu flavononas, flavonas, ácidos fenólicos e seus ésteres foram identificados como principais compostos com atividade antiinflamatória (Bankova, 2005).

Asma é uma desordem crônica dos pulmões. Uma inflamação crônica das vias aéreas que causa dificuldade de respiração, respiração ofegante e tosse. A inflamação das vias aéreas, as tornam as pessoas hipersensíveis, assim estímulos como pó, pólen, fumaça de cigarro, exercícios ou estresse, podem causar inchaço das vias aéreas e causar sintomas típicos da asma (Barnes, 1996). Sabe-se que na própolis há um potente produto antiinflamatório natural com enzimas inibidoras, que são efetivas para aplicações em pacientes com asma em comparação com glicocorticóides, que tem uma atividade antiinflamatória geral (Barnes, 1995). A própolis vermelha de Cuba, na concentração de 50 mg/Kg mostrou efeito antiinflamatório em teste de granuloma com pedaços de algodão e em teste de óleo-indução de edema com doses de 2,5 µL (25%), utilizando-se ratos. A permeabilidade nos capilares peritoniais foi testado com uma dose de 10 mg/kg (Ledón *et al.*, 1997). Foi demonstrado que o isoflavonóide ácido fenilcafeico éster (CAPE) reduz as injúrias da inflamação do tecido pulmonar de ratos (Koksel *et al.*, 2005; Koksel *et al.*, 2006).

Estudos executados com preparação de tecido de pulmões de porcos utilizando-se albumina de ovo mostraram que própolis apresentou efeito inibitório nas prostaglandinas, leucotrienos e histaminas liberadas, ajudando a melhorar os efeitos antiinflamatórios em experimento *in vitro* (Khayyal *et al.*, 1993). Similarmente, (Mirzoeva e Calder, 1996) demonstraram que própolis e muitos dos seus subprodutos induzem a supressão da produção de prostaglandinas, incluindo os leucotrienos, sendo CAPE o composto bioativo mais forte para esse efeito.

Foi também demonstrado que a própolis promoveu a inibição da enzima hialuronidase, contribuindo para os efeitos antiinflamatórios e regenerativos no

processo de cura (Ikegaki *et al.*, 1999). Quatorze extratos de própolis comerciais brasileiros de várias áreas do país foram analisados de acordo com o modelo de edema na orelha induzido por ácido araquidônico em ratos. Uma vez testados, quatro amostras apresentaram efeitos antiinflamatórios similares aos produzidos pela indometacina (Menezes *et al.*, 1999) variando significativamente dependendo da procedência da amostra de própolis.

### **3.5 Efeitos analgésicos**

Analgésicos são drogas aliviadoras da dor que não alteram as funções dos aparatos sensoriais ou bloqueio da condução do impulso nervoso (insensibilidade de dor sem perder a consciência). Eles são classificados em dois grupos de acordo com seus mecanismos de alívio de dor: os opióides, atuam como receptores na inibição de dor no cérebro, e os não opióides, inibem a síntese de prostaglandinas (de Campos *et al.*, 1998). O efeito antiinflamatório e analgésico da própolis parece estar relacionado principalmente com o mecanismo de síntese de prostaglandinas (de Campos *et al.*, 1998). Os efeitos analgésicos da própolis da Bulgária, cuja fonte botânica é o álamo, foram testados em ratos e *in vitro* usando músculos lisos das vias aéreas ou musculatura lisa da traquéia. O ID<sub>(50)</sub> foram 7,4 mg/kg de indução de ácido acético para contorções abdominais. Com uma dose de 100 mg/kg de própolis houve redução significativa da sensibilidade de dor dos ratos em testes com formol. Doses de 40 mg/kg foram efetivas em testes com prato quente em ratos (Ledón *et al.*, 1997). Extratos alcoólicos e aquosos de própolis da Coreia mostraram um forte efeito analgésico, que foi comparado com o ácido acetilsalicílico (Han *et al.*, 2002; Park e Kahng, 1999).

### **3.6 Inibição enzimática**

Inibição enzimática normalmente ocorre quando um composto inibidor interage com uma enzima, e resulta em menor formação de produto. Usualmente o composto inibidor apresenta estrutura similar ao do substrato. São distinguidas duas formas de inibição: inibição competitiva e inibição não competitiva. Inibição competitiva ocorre quando o composto inibidor combina com a enzima no mesmo lugar de ligação do substrato. Inibição não competitiva ocorre quando o composto inibidor combina com a enzima em lugares diferentes e mudam a estrutura da enzima assim essa não pode sofrer a reação usual. O controle alostérico é usado pelas células para regular uma via metabólica importante. Essas moléculas pequenas reguladoras interagem com o sítio alostérico afetando a conformação do sítio ativo e a enzima pode ser inibida ou ativada.

Própolis mostrou inibir a divisão celular e a síntese de algumas proteínas. A inibição da expressão da telomerase pode conduzir a um longo período de vida. O encurtamento do nível crítico do telômero resulta em uma senescência de células normais e apoptose. Encurtamento de telômero e a ação de radicais livres são conhecidos como responsáveis pela ação de senescência celular. Própolis pode ter dois caminhos possíveis para prolongar o tempo de vida: Primeiro pela inibição da expressão das telomerasas e segundo por eliminar radicais livres (Gunduz *et al.*, 2005).

Ciclosporina A (CsA) é um imunossupressor que é usado depois de transplantes cirúrgicos. Infelizmente, estresse oxidativo leva a cardiotoxicidade de CsA. O éster do ácido fenil cafeico (CAPE), composto que foi encontrado em

própolis, foi testado com sucesso na redução do estresse oxidativo reduzindo a não desejada cardiotoxicidade de CsA (Rezzani *et al.*, 2005).

### **3.7 Atividades hepatoprotetoras**

Danos hepáticos podem ser causados por compostos como acetaminofenol, devido a geração de radicais livres celulares, que interagem com componentes da membrana plasmática (Banskota *et al.*, 2001). Apoptose hepatocítica e transmigração neutrofílica podem ser em parte responsáveis pela inflamação e também liderar a necrose do hepatócito (Banskota *et al.*, 2001). A inoculação de paracetamol danificou o fígado de ratos examinados. Própolis vermelha cubana reduz os danos hepáticos significativamente. Danos no fígado é normalmente acompanhado por uma elevação do nível de aminotransferases no soro. A atividade da alanina aminotransferase (ALT) no soro e a concentração reduzida de glutathiona (GSH), foram ambas reduzidas quando a própolis foi aplicada (Gonzalez *et al.*, 1994). O efeito hepatoprotetor da própolis cubana contra tetracloreto de carbono (CCL<sub>4</sub>) que pode induzir danos hepáticos, também foi demonstrado em ratos (Gonzales *et al.*, 1995; Merino *et al.*, 1996).

CAPE, isolado de própolis de álamo, mostrou proteção renal e hepática em ratos contra tetracloreto de carbono (Ogeturk *et al.*, 2005; Shukla *et al.*, 2004).

(Kolankaya *et al.*, 2002) demonstraram as propriedades hepatoprotetoras de extrato etanólico de própolis contra indução de danos hepáticos por álcool em ratos e indução de danos hepáticos por tetracloreto de carbono. O extrato de própolis aquoso mostrou efeito profilático contra hepatotoxicidade aguda *in vivo* (El-Khatib *et al.*, 2002). Quatro derivados do ácido dicafeoiquinico com atividade

hepatoprotetora significativa foi isolada da própolis verde brasileira e depois testada *in vitro*, a indução de injúria em cultura de células hepáticas de ratos com CCl<sub>4</sub> (Basnet *et al.*, 1996). Própolis vermelha cubana mostrou atividade hepatoprotetora significativa contra a indução de hepatite D-GA1N em ratos (o aumento de ambas atividades de aspartato transaminase e alanina transaminase foram inibidas em uma maneira dose dependente) (Rodriguez *et al.*, 1997). Indução de injúria hepática por álcool em ratos foi significativamente reduzida por extratos etanólicos de própolis (inibição da elevação de transaminase glutâmica, transaminase pirúvica, triglicerídeos e triacilglicerídeo hepático no soro) (Lin *et al.*, 1997). Extrato etanólico de própolis mostrou atividade hepatoprotetora na injúria hepática de ratos induzida por álcool (Ramirez *et al.*, 1997). Foi mostrado um efeito hepatoprotetor de extrato etanólico de própolis contra indução de injúria hepática por álcool. De acordo com o autor, o efeito hepatoprotetor de extrato etanólico de própolis pode ser, pelo menos parcialmente, devido a inibição da peroxidação da membrana lipídica e formação de radicais livres (Liu *et al.*, 2004; Seo *et al.*, 2003). Na Europa, que possui própolis de álamo, os compostos ácido cafeico, ácido ferúlico, CAPE e seus derivados foram identificados como principais componentes com atividade hepatoprotetora. Na própolis brasileira de *Baccharis dracunculifolia*, os compostos ácido prenil p-cumárico, flavonóides, lignanas e ácido cafeoilquínico foram descritos como responsáveis pelas propriedades hepatoprotetoras (Bankova, 2005). Além das propriedades hepatoprotetoras, CAPE é também eficaz contra danos renais tubulares induzidos por lítio e estresse oxidativo (Oktem *et al.*, 2005).

### **3.8 Ação hormonal**

Hormônios são usados no tratamento de câncer prostático e mamário, pois esses tecidos requerem hormônios para crescimento e desenvolvimento. O crescimento de tecidos como o câncer pode ser inibido, se substâncias antagonizantes a esses hormônios (andrógenos, progesteronas e estrógenos) forem administradas. Própolis pode atuar como um fitormônio antagonista com os efeitos estrogênicos (Song *et al.*, 2002). O extrato de álcool ou de éter de própolis mostraram um efeito estrogênico significativo (Song *et al.*, 2002). Própolis pode ser interessante para mulheres que entraram na menopausa pois apresenta quantidade alta de isoflavonas, que atuam como substituto terapêutico hormonal (Song *et al.*, 2002) com benefícios para a densidade tecidual óssea, etc (Stojko *et al.*, 1978). Conhecendo os efeitos estrogênicos do extrato da própolis é necessário estudar se a própolis pode interferir no controle da fertilidade, controle de nascimento ou os efeitos da própolis em grávidas ou mulheres que amamentam.

### **3.9 Atividades antioxidantes e anti-radicais livres**

Própolis contém substâncias de alta atividade antioxidante como flavonóides e outros compostos fenólicos (Burda e Oleszek, 2001). Processos oxidativos produzem radicais livres que causam muitos problemas para saúde humana como câncer, doenças degenerativas do coração e são relatadas como causadoras de envelhecimento (Scheller *et al.*, 1994), diabetes (Fuliang *et al.*, 2005; Okutan *et al.*, 2005), cataratas, rugas, fragilidade óssea, falha nos rins (Ogeturk *et al.*, 2005), endurecimento das artérias e imunodeficiência (Dormandy,

1989). Radicais livres provocam danos celulares devido a formação de ligações cruzadas no DNA e nas proteínas essenciais. Quando uma fita de DNA é danificada é necessário reparo nessa fita, porém o reparo pode não ocorrer corretamente (Delmaestro, 1980). Evitar radicais livres em primeiro momento seria a melhor alternativa, mas a fonte de radicais livres pode ser muito grande: como raios solares, radiação, pesticidas em fontes da dieta como café, álcool, batatas fritas, churrasco, etc. Para evitar o estresse fisiológico, a segunda melhor coisa a fazer, é assegurar que o organismo seja bem suprido com antioxidantes. Antioxidantes previnem os danos causados por radicais livres (Freeman e Crapa, 1982). Ácido ascórbico (vitamina C), tocoferol (vitamina E) e  $\beta$ -caroteno (vitamina A) são antioxidantes muito importantes (Bisby, 1990). A primeira linha de defesa a nível molecular de radicais oxigenados no corpo humano consiste de três enzimas protetoras: superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathione peroxidase. Própolis e compostos fenólicos incluindo os flavonóides são conhecidos pela capacidade de eliminar radicais livres e pelas propriedades antioxidantes (Choi *et al.*, 2006). Artepillin C, o principal componente na própolis verde de *Baccharis dracunculifolia*, tem uma habilidade muito grande de eliminar radicais livres (Paredes-Guzman *et al.*, 2003; Shimizu *et al.*, 2004).

A ação antioxidante do extrato etanólico de própolis contra radicais oxigenados foi demonstrado em experimentos com ratos machos e fêmeas, em que se observou aumento do tempo de vida dos animais (Pascual *et al.*, 1994; Scheller *et al.*, 1994). Benzil cafetato, ácido fenil cafeico éster (CAPE) e galangina desempenham um importante papel na atividade antioxidante da própolis (Russo *et al.*, 2002). CAPE e seus análogos são também potentes inibidores de óxido

nítrico (Nagoaka *et al.*, 2003) e reduz a peroxidação em coração de ratos diabéticos (Okutan *et al.*, 2005). Ácido 3,4-diidroxi-5-prenilcinâmico foi isolado em própolis brasileira e demonstrou ser um potente antioxidante (Hayashi *et al.*, 1999). Amida do ácido cafeico amida e ésteres análogos apresentaram capacidade de eliminar radicais livres e a estrutura foi relacionada com sua atividade (Son e Lewis, 2002). Propol é outro potente composto eliminador de radicais isolado da própolis brasileira (Basnet *et al.*, 1997). Kaempferol e fenil cafetato isolados de própolis apresentaram alta atividade antioxidante (Kumazawa *et al.*, 2004). Própolis protege os tecidos contra reações oxigenantes ocasionado por compostos oxidativos. Isso foi mostrado em ratos, onde danos hepáticos e renais puderam ser prevenidos por CAPE (Oktem *et al.*, 2005). CAPE previniu contra danos renais durante um longo prazo de exposição dos ratos a frequência de 900 MHz de telefones celulares (Ozguner *et al.*, 2005) e mostrou efeitos cardioprotetores em ratos (Huang *et al.*, 2005).

### **3.10 Potencial de detoxificação**

Flavonóides, o principal componente da própolis, pode ter estrutura complexa com íons metálicos e exercer um importante papel no processo de detoxificação de metais pesados (Havsteen, 2002). Neurotoxicidade é uma mudança adversa na função do sistema nervoso central e periférico. Pode ser causado pela exposição do organismo a agentes químicos neurotóxicos como dioxina, formaldeído, PCB, pesticidas, solventes orgânicos, metais pesados, metais orgânicos, etc. Os sintomas incluem problemas de memória, vertigem, mudança de personalidade, perturbações para dormir, perda de motivação,

extrema fadiga, fadiga crônica, dor de cabeça, zunido, distúrbios visuais, dificuldades respiratórias, dores torácicas, irregularidades no coração e muitas outras desordens neurológicas e psiquiátricas. Além disso órgãos como fígado, cérebro, rins, podem ser afetados (Singer, 2002).

A CAPE bloqueia a indução neurotóxica de 6-hidroxidopamina (Montpied *et al.*, 2003) e protege contra injúrias neonatais de isquemia hipoxica no córtex, hipocampo e tálamo cerebral (Wei *et al.*, 2004). Muitas pessoas sofrem intoxicações, mas muito poucos procuram um médico com experiência em neurotoxicologia, assim esses sintomas são diagnosticados como relacionado ao estresse, psicossomático ou depressão.

A supressão da dioxina (hormônio ambiental) mediante a transformação do receptor de aril hidrocarbono por extrato etanólico de própolis foi demonstrado (Park *et al.*, 2004). Um novo teste baseado em *southwestern* ELISA foi testado para detecção de transformação de receptores aril hidrocarbono utilizando-se extrato de própolis. Isso permite uma rápida visualização dos receptores agonistas e antagonista (Fukuda *et al.*, 2004).

Estresse oxidativo e degeneração neural foram significativamente atenuados usando-se própolis em testes com ratos. A neurotoxicidade foi induzida por injeção de ácido cainico. Os autores sugeriram que os efeitos de neuroproteção poderia ser através da via de modulação de receptores de adenosina A1 no hipocampo (Kwon *et al.*, 2004). A propriedade neuroprotetora da própolis verde brasileira foi examinada *in vitro* e *in vivo* em ratos. Própolis inibiu o estresse oxidativo e protegeu culturas de células PC12 *in vitro* e protegeu rato *in vivo* de

isquemia cerebral com concentrações de 30 até 100 mg/kg (Shimazawa *et al.*, 2005).

### **3.11 Atividade inseticida**

Um inseticida é um pesticida usado para prevenir a multiplicação de insetos. Eles são amplamente usados na agricultura para aumentar a produtividade. Extrato de própolis foi usado como inseticida em *Tenebrio molitor* L. (Coleóptera: Tenebrionidae) (Garedew *et al.*, 2002). O extrato de própolis mostrou atividade biológica contra as larvas da maioria das espécies de traça (Lepitoptera: Pyralidae) (Johnson *et al.*, 1994).

### **3.12 Atividade anti-parasitária**

Protozoa ou protozoários, são organismos unicelulares, eucarióticos que têm típica estrutura interna, movem-se rapidamente com seus flagelos, embora muitos protozoas fitoflagelados são produtores de fotossíntese como algas, que são classificadas como plantas. Protozoários são classificados no sub reino do reino Protista, que também incluem as algas. Na América Central e Sul os protozoários flagelados *Trypanosoma cruzi* são causadores de tripanossomia americana ou doença de Chagas. É transmitido pelas fezes de insetos infectados, que através da picada abre um ponto de infecção e permite a passagem dos tripomastigotas metacíclicos pela pele, que é uma barreira de proteção mecânica. O tempo de incubação é em média de uma semana. Depois desse tempo os pacientes sofrem febre, edema e ampliação dos nódulos linfáticos. Pode causar a morte se o parasita se desenvolve dentro do músculo do coração causando muitas

inflamações. Durante as primeiras semanas da doença o tratamento apropriado é com Nifurtimox<sup>TM</sup> ou Benznidazole<sup>TM</sup>. Depois deste tempo, a doença pode entrar no estágio crônico onde o tratamento é avaliado como não mais efetivo (Webster, 1990). Avaliação sanguínea é necessária para evitar infecção por transfusão de sangue. Diferentes formulações de extrato de própolis foram testados em ratos infectados com *Trypanosoma cruzi* e os efeitos não foram significativos na cinética parasitêmica, ratos sobreviveram com os parasitas e alguns morreram (de Castro e Higashi, 1995). A atividade anti-protozoária de extratos etanólicos da própolis foi estudado posteriormente e os resultados foram confirmados (Starzyk *et al.*, 1997) indicando que a própolis brasileira e búlgara contendo flavonóides não mostraram atividade contra o *Trypanosoma cruzi* (Prytyk *et al.*, 2003; Salomão *et al.*, 2004).

### **3.13 Atividade anti-bacteriana**

Própolis, sendo um antibiótico natural, ganhou bastante atenção com a atual volta da tendência ao uso de produtos naturais e devido ao crescimento do número de pacientes imunodeprimidos (AIDS) (Salomão *et al.*, 2004). A atividade antimicrobiana dos extratos de própolis depende do solvente utilizado para prepará-la. Normalmente, os extratos etanólicos de própolis são usados, mas a fração aquosa também tem uma alta atividade antimicrobiana (Tosi *et al.*, 1996). Extratos aquosos da própolis turca mostraram atividade anti-bacteriana contra infecção tuberculósica em porcos guinea (Yildirim *et al.*, 2004). Extratos aquosos de própolis brasileira mostraram um efeito antibiótico contra 5 patógenos de plantas: *Agrobacterium tumefaciens*, *Clavibacter michiganensis* e *Xanthomonas axonopodis*, onde foi inibido o crescimento de 10% em solução de própolis

brasileira *in vitro*. *Erwinia chrysanthemi* foi em parte inibida, embora *Pseudomonas syringae* não tenha sido inibida (Bianchini e Bedendo, 1998). A composição química e os efeitos antimicrobianos das própolis dependem do tempo e do ano. Os efeitos sazonais da própolis brasileira na atividade anti-bacteriana foram demonstradas por Sforcin *et al.*, (2000). A atividade anti-bacteriana do extrato etanólico de própolis depende também da espécie de abelhas melíferas. Própolis coletada por três diferentes espécies de abelhas melíferas da mesma região foram comparadas e diferenciadas quanto a atividade anti-bacteriana (Silici e Kutluca, 2005). Os flavonóides pinocembrina, pinostrobin, galangina e pinobanksina são conhecidos por ter uma alta atividade anti-bacteriana (Dastidar *et al.*, 2004). Também os ácidos prenil p-cumárico, ferúlico, cafeico e ácido diterpênico e ligninas furofurano isolados da própolis brasileira foram estudadas por terem uma boa atividade anti-bacteriana (Castaldo e Capasso, 2002). Três novas flavanonas derivadas: 7-prenilpinocembrina, totarol e 7-prenilstrobinina, isoladas de amostras de própolis grega, mostraram alta atividade anti-bacteriana (Melliou e Chinou, 2004). Na própolis derivada de *Baccharis dracunculifolia* brasileira, ácido prenil p-cumárico, labdanos e diterpenos foram identificados como compostos responsáveis pela atividade anti-bacteriana. Considerando que a atividade anti-bacteriana do álamo europeu é devido a flavonols, flavonas, ácido fenólico e seus ésteres, na própolis vermelha cubana foi encontrado prenil benzofenonas, que tem maior atividade anti-bacteriana (Bankova, 2005).

Própolis e seus constituintes são ativos contra várias bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus* sp., *Bacillus subtilis*, *Micobacterium tuberculosis*, etc (Bosio *et al.*, 2000; Karimova

e Rodionova, 1963; Koo *et al.*, 2000; Krol *et al.*, 1993; Lu *et al.*, 2005; Marcucci, 1995; Oksuz *et al.*, 2005; Orkin, 1971; Pepeljnjak *et al.*, 1985; Pepeljnjak e Kosalec, 2004; Rojas *et al.*, 1993; Sawaya *et al.*, 2004; Scheller *et al.*, 1999; Uzel *et al.*, 2005; Yildirim *et al.*, 2004).

A própolis e seus constituintes são ativos também contra bactérias Gram-negativas como *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Helicobacter pylori*, *Porphyromonas gingivalis*, etc (Bankova, 2005; Banskota *et al.*, 2001; Grange e Davey, 1990; Nostro *et al.*, 2005; Orsi *et al.*, 2005; Pepeljnjak e Kosalec, 2004; Santos *et al.*, 2002; Uradzinski *et al.*, 2002; Uzel *et al.*, 2005).

Foram testadas os efeitos de compostos da própolis, como flavonóides e ácidos fenólicos, em bactérias, fungos e vírus. Há indicações que o solvente empregado para a extração da própolis pode influenciar na intensidade dessa atividade antimicrobiana. De fato, solução de glicerina, por exemplo, apresentou fraca inibição de bactérias Gram-positivas, enquanto soluções de etanol e propilenoglicol mostraram efetividade contra fungos (Castaldo e Capasso, 2002). Estudos com atividades antibióticas e anti-fúngicas foram testados usando soluções ou suspensões aquosas dos materiais a seguir: grãos de própolis contendo 300 mg de própolis por grama, chamado pelos autores de PG; barras de própolis de cor vermelha com 350 mg de própolis por barra, com média de peso de 1,2 g, chamado pelos autores de PR e barra amarela contendo 350 mg de grãos de pólen, com peso médio de 1,2 g, chamado PY. Penicilina, estreptomicina, tetraciclina, griseofulvina, metronidazol, fenilbutazona, flurbiprofeno e hidrocortizona acetato foram usados como controle por comparação. A avaliação

da atividade das substâncias testadas foi realizada nas condições *in vitro*. Os microrganismos empregados foram cinco Gram-positivos (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus viridans*, *Diplococcus pneumoniae* e *Corynebacterium diphthiae*) e cinco Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* e *Shigella flexneri*).

Os principais compostos com ação antimicrobiana encontrados na própolis são pinocembrina, pinostropina, isalpinina, pinobanksina, quercetina, naringenina, galangina e crisina. Os valores MIC usados no método de macro diluição foram 2 µg/mL para *Streptococcus sobrinus* e *Enterococcus faecalis*, 4 µg/mL para *Micrococcus luteus*, *Candida albicans* e *C. krusei*, 8 µg/mL para *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Enterobacter aerogenes*, 16 µg/mL para *Escherichia coli* e *C. tropicalis* e 32 µg/mL para *Salmonella typhimurium* e *Pseudomonas aeruginosa* (Uzel *et al.*, 2005). A utilização da própolis no tratamento de vaginites crônicas foi eficiente (Imhof *et al.*, 2005).

### **3.13.1 Atividade contra úlcera péptica**

Úlcera péptica são lesões na membrana mucosa do estômago ou duodeno. Fatores externos como infecções, estresse, uma dieta rica ou a longo prazo de drogas antiinflamatórias não esteróides (NSAIDs) pode reduzir a resistência da superfície da mucosa contra os ácidos do suco gástrico (principalmente ácido clorídrico e enzimas digestivas) e inicia uma desintegração gradual da superfície do tecido epitelial com queimação e dor (Mendoza *et al.*, 1991). Uma infecção do

trato gastrointestinal superior com bactéria *Helicobacter pylori* pode causar úlceras duodenais e gástricas. O tratamento dessas úlceras pépticas concentram-se na erradicação dessas bactérias e redução da produção do suco gástrico (Nostro *et al.*, 2005).

A efetividade da própolis na úlcera estomacal foi mostrado *in vivo* em ratos (Aripov *et al.*, 1968). Para erradicação do *H. pylori*, própolis foi testada com sucesso entre muitas outras substâncias anti-bacterianas (Gorbatenko, 1971). Luteolina, apigenina e acacetina apresentaram efeitos benéficos no tratamento de úlcera gástrica (Ciaceri e Attaguile, 1972). Extrato etanólico de própolis brasileira mostrou atividade anti-*H. pylori* devido a seus compostos fenólicos. Ácido p-cumárico, ácido 3-prenil-4diidroxicinamoiloxicinâmico e Artepillin C foram identificados como os compostos ativos (Banskota *et al.*, 2001; Hashimoto *et al.*, 1998).

### **3.13.2 Atividade contra cárie dental**

Placas dentárias são associadas com a patogenicidade de várias doenças orais que afetam a superfície dental (cáries dentais) e tecido macio (gengivites e doença periodontal); patologias orais estão entre as mais prevalentes e caras doenças que afetam a sociedade industrializada (Bowen, 2002).

Conceitualmente, placa dentária é um biofilme; o biofilme é composto de diversos microrganismos embebidos em uma matriz e é firmemente aderido a superfície do dente (Bowen, 2002). Apesar da complexa comunidade microbiana, somente específicas espécies estão envolvidas diretamente com a patogenicidade de doenças orais.

Cáries dentais resultam de uma interação de espécies de bactérias com constituintes da dieta em uma superfície dental suscetível. *Streptococcus mutans* é geralmente considerado o principal microrganismo causador da cárie, embora microrganismos adicionais possam estar envolvidos. Sacarose é considerada como o açúcar causador da cárie (Bowen, 2002). Essa patogenia oral em biofilme dental produz ácido muito rapidamente na presença de açúcares da dieta, tal como a sacarose. Uma persistência dos valores de pH baixo dentro do biofilme resulta na dissolução do esmalte da superfície dentária. Além disso, os *Streptococcus* cariogênicos são tolerantes a ácidos, sobrevivem e metabolizam nesse ambiente altamente ácido. *Streptococcus mutans* são também responsáveis pela síntese de matriz de polissacarídeos, que é crítico para a estrutura e virulência do biofilme dental. Os polissacarídeos, principalmente glucanas são sintetizados por meio de enzimas extracelulares glicosiltransferases (GTFs) usando sacarose da dieta como substrato. As GTFs liberadas pelo *Streptococcus mutans* também são absorvidas na superfície dentária; uma grande proporção de glucanas formadas *in situ* são retidas na superfície formando locais para fixação de bactérias orais (Bowen, 2002).

A própolis brasileira tem mostrado atividade antibacteriana contra muitos microrganismos orais, e exibido potente inibição da síntese de glucanas. Por exemplo, extratos etanólicos de própolis brasileira do grupo 12 inibiu *in vitro* o crescimento de estreptococos cariogênicos, tal como *S. sobrinus*, e também bactérias anaeróbicas *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* (Koo *et al.*, 2000; Park *et al.*, 1998). O extrato etanólico de própolis de grupo 12 também mostrou efeitos antibacterianos contra *Candida albicans*, que é responsável por

uma infecção fúngica comum (candidíase oral) que afeta o tecido mole dos usuários de dentaduras (Koo *et al.*, 2002). Além disso, o extrato etanólico de própolis é notavelmente efetivo na inibição da síntese de glucanas; foi mostrado mais de 80% de inibição da síntese de glucanas com concentração tão baixa quanto 100 µg extrato etanólico de própolis/mL (Koo *et al.*, 2000). Porém, foi observado que a atividade biológica da própolis brasileira contra bactérias orais mostrou alta variabilidade dependendo da origem geográfica e a diversidade da planta local. Entre as 13 própolis classificadas por Park *et al.* (2006), somente a própolis do grupo 3 (do sul do Brasil, origem botânica *Populus* sp.), 6 (do nordeste do Brasil, origem botânica *Hyptis divaricata*), e 12 (do sudeste do Brasil, origem botânica *Baccharis dracunculifolia*) exibiram atividade significativa contra *Streptococcus mutans* e também inibição da glicosiltransferase. Porém, como descrito anteriormente *Streptococcus mutans* (biofilme) em superfície dental mostrou-se mais resistente a agentes antimicrobianos do que as células em suspensão. Assim, os exames antimicrobianos clássicos (e.g. determinação MIC/MBC, método agar difusão) não são os métodos de escolha para determinação dos agentes efetivos contra o crescimento de *Streptococcus mutans*, embora eles sejam ainda usados para determinar a atividade potencial anti-bacteriana. Outro aspecto relevante da patofisiologia de *Streptococcus mutans* está relacionado com a habilidade de tolerar ácido. Um dos mecanismos que *Streptococcus mutans* desenvolveram para diminuir a influência hostil da acidificação foi aumentar a atividade da protontranslocase F-ATPase (H<sup>+</sup>-ATPase) responsável pelo abaixamento do pH (Belli e Marquis, 1991). Essa enzima associada à membrana bombeia prótons (H<sup>+</sup>) para fora da célula, mantém o pH

intracelular mais alcalino que o ambiente extracelular. Então, uma das estratégias para atenuar a virulência de bactérias cariogênicas é afetar a atividade da F-ATPase. Própolis tem um efeito inibitório no crescimento de *Streptococcus mutans* e na atividade da glicosiltransferase (Koo *et al.*, 2002). Apigenina e tt-farnesol tem sido identificadas como compostos ativos na atividade em glicosiltransferases e viabilidade dos biofilmes (Koo *et al.*, 2002). Amostras de própolis do Brasil apresentaram atividade contra glicosiltransferases e inibição do crescimento e aderência de *Streptococcus mutans* (Duarte *et al.*, 2003). Foi confirmado mais tarde que apigenina e tt-farnesol inibiram a formação de biofilmes de *Streptococcus mutans* e a produção de polissacarídeos (Koo *et al.*, 2003), *in vitro* e *in vivo* (Hayacibara *et al.*, 2005).

### **3.13.3 Atividade anti-fúngica**

A atividade anti-fúngica da própolis em diferentes espécies de *Candida* foi demonstrada por Ota *et al.*, 2001 e Uzel *et al.*, 2005, e os efeitos da época do ano na atividade das própolis brasileira em *Candida albicans* e *Candida tropicalis* foram descritos por Sforcin *et al.*, 2001. Diferentes métodos *in vitro* são usados para análise de extratos de própolis contra espécies de *Candida* (Sawaya *et al.*, 2002). A atividade anti-fúngica de extratos de própolis foram testadas *in vitro* usando-se *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans* (Chee, 2002). Própolis do Brasil e da Bulgária foram testadas contra *Paracoccidiodes brasiliensis* (Murad *et al.*, 2002). Sacuranetina isolada de *Poecilanthe parviflora*, uma leguminosa comum no Brasil, e também constituinte da própolis brasileira mostrou alta atividade anti-fúngica (Assunção *et al.*, 1968). Foi testado o efeito da própolis em

leveduras (Cizmarik e Trupl, 1975) e pinocembrina que é constituinte da própolis foi identificada como um potente anti-fúngico (Metzner *et al.*, 1979). *Aspergillus sulphureus* teve o crescimento inibido pelo extrato de própolis. Foi também mostrado que a biossíntese de ocratoxina A foi inibida (Pepeljnjak *et al.*, 1982).

Pinocembrina é conhecida por ter alta atividade anti-fúngica. Outros compostos ativos são ésteres de ácido cumárico e ácido cafeico (Dobrowolski *et al.*, 1991). A alta variabilidade de atividade anti-fúngica da própolis depende da diferente origem geográfica (Kujumgiev *et al.*, 1999). *Candida albicans*, *C. glabrata*, *Trichosporon* sp., e *Rhodotorula* sp. foram suscetíveis com baixas concentrações de solução de própolis. Própolis coletada por *Apis mellifera* tiveram maior atividade anti-fúngica que própolis coletada na mesma região por *Apis mellifera carnica* e *Apis mellifera anatolica* (Silici *et al.*, 2005).

### **3.14 Atividade anti-viral**

Um vírus é um agente infeccioso muito pequeno que precisa de célula viva para se multiplicar. Essa célula pode ser animal, vegetal ou bacteriana. Flavonóides encontrados abundantemente na própolis são conhecidos pela sua efetividade contra infectividade e replicação viral (Debiaggi *et al.*, 1990). A atividade anti-viral *in vitro* de própolis foi demonstrada (Amoros *et al.*, 1992) e a relação da atividade anti-viral da própolis e sua origem geográfica foram examinadas (Kujumgiev *et al.*, 1999). Um grande número de vírus DNA e RNA causam tumores em animais. Em humanos os principais vírus causadores tumorais são na maioria vírus de DNA, como o Papiloma vírus humano (HPV) que causa câncer genital em homens e mulheres, vírus Epstein-Barr (EBV) que

pertence ao grupo das herpes vírus, causam linfoma infantil e câncer de nariz e garganta, vírus da Hepatite B e vírus da hepatite C que causam câncer hepático.

O único conhecido vírus de RNA que causa câncer em humanos é o vírus leucêmicos de células T humana (HTLV-1). Adequadamente, a atividade anti-viral de própolis é muito importante na prevenção de câncer e muitas prevenções ou tratamentos de outras doenças virais foram relatados.

### **3.14.1 Atividade anti-adenovírus**

Os adenovírus pertencem a família dos *Adenoviridae*. Há aproximadamente 45 tipos que causam dor de garganta e febre em humanos, hepatite em cachorros e muitas outras doenças em outras espécies. O adenovírus tipo 5E1A mediante transformação e expressão de transformação fenotípica foi suprimido de forma eficaz pelo éster do ácido fenil cafeico (CAPE) (Su *et al.*, 1991). O efeito supressor do crescimento e tóxico do CAPE foi testado em 5 tipos de adenovírus transformado em células embrionárias de rato. A toxicidade seletiva do CAPE para transformação oncogênica de fibroblastos embrionários de ratos foi também examinado (Su *et al.*, 1994; Su *et al.*, 1995).

### **3.14.2 Atividade anti-HIV**

Vírus da imunodeficiência humana (HIV) causam a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Este destrói o sistema imune humano, dificultando a defesa do paciente contra outras infecções e câncer. Não há cura até agora embora muitos avanços no tratamento estejam ocorrendo. HIV é transportado pelo sangue ou seus produtos, sêmen e outras secreções genitais ou

leite materno. Há muitas infecções sistêmicas em pacientes com debilidade ou imunossupressão com HIV/AIDS. Derivados do ácido morônico e meliferone (triterpenóide) isolados da própolis brasileira mostrou atividade promissora anti-HIV (Ito *et al.*, 2001). O mecanismo putativo de ação de agentes anti-HIV de plantas foi descrito (Cos *et al.*, 2004). Expressão viral pode ser suprimida por própolis até um máximo de 98% *in vitro*. O mecanismo parece ser a inibição de entrada viral. Os efeitos anti-virais da própolis podem ser, assim como pelo Zidovudine<sup>TM</sup>, por inibição da transcriptase reversa. Não há notícias do efeito da inibição das proteases do Indinavir<sup>TM</sup> (Gekker *et al.*, 2005).

### **3.14.3 Atividade anti-herpes**

O vírus da herpes simples (HSV) é um vírus de DNA do grupo herpesviridae (incluindo o vírus Epstein-Barr, o citomegalovírus e o vírus varicela-zoster). Há dois sorotipos: HSV-1 e HSV-2. Ambos causam lesões ulcerativas e doença sistêmica. A maioria dos humanos carregam estes vírus sem nenhum sintoma. Somente entre 10-20% dos sintomas individuais ocorrem por emoções ou doença. Isso pode levar a morte em pessoas aidéticas. Própolis tem mostrado atividade anti-viral contra HSV-1 em cultura de células (Amoros *et al.*, 1992) e 3-metil 2-butenil cafeato foi identificado como responsável pela atividade anti-HSV (Amoros *et al.*, 1994). Ácido morônico tem mostrado atividade anti-herpes simples *in vitro* e *in vivo* (Kurokawa *et al.*, 1999). A atividade anti-herpes genital foi comparativamente testado com própolis, Acyclovir<sup>TM</sup> e placebo e suas efetividades foram confirmadas (Vynograd *et al.*, 2000).

#### **3.14.4 Atividade anti-influenza**

Influenza é uma infecção viral aguda do trato respiratório superior ou inferior por ortomixovírus. Sintomas comuns são febre, frio, sensação de fraqueza, dores musculares, de cabeça e abdômen. Própolis tem inibido a atividade do vírus influenza (Schevchenko *et al.*, 1972). Ácido cinâmico éster é responsável seguramente pelo efeito contra o vírus influenza (Serkedjieva *et al.*, 1992).

#### **3.14.5 Atividade anti-hepatite**

Hepatite significa “inflamação do fígado”. Há 6 tipos conhecidos de vírus da hepatite que danificam os hepatócitos: Hepatite A é uma doença hepática causada pelo vírus da hepatite A (HAV). É transmitido por via “fecal-oral”. Condições sanitárias precárias ou contato sexual com um parceiro que tem hepatite A são conhecidos como os caminhos para a infecção. Hepatite B é uma doença séria que é causada pelo vírus da hepatite B (HBV), que ataca o fígado e causa infecção vitalícia, cirrose, câncer hepático e morte. Hepatite C é uma doença causada pelo vírus da hepatite C (HCV). É encontrado no sangue de pessoas infectadas e pode ser transmitida pelo sangue ou seus produtos. Hepatite D é uma doença causada pelo vírus da hepatite D (HDV). É um vírus defeituoso que é encontrado no sangue e precisa do HBV para existir. Hepatite E é uma doença causada pelo vírus da hepatite E (HEV) e é transmitido similarmente ao HAV. GBV-C e HGV são relacionados ao HCV. Eles são considerados isolados diferentes do mesmo vírus, que é geralmente conhecido como HGV. Própolis tem

propriedades hepatoprotetoras, é evita o aumento da concentração de alanina amino transferase e malondialdeído no soro e restabelece as alterações histopatológicas do fígado. Juntos com a atividade antioxidante há um potencial benéfico para pacientes que sofrem de hepatite, embora se necessite de maior número de pesquisas e estudos clínicos.

### **3.15 Antibiótico natural na alimentação de animais**

Antibióticos são usados nos gados criando uma redução do risco de epidemia. Conforme as regulamentações do comércio e com o objetivo de evitar o desenvolvimento da resistência contra os antibióticos usados, própolis foi testada para controle de infecções na produção de carne e peixe. Os resultados não foram satisfatórios (Anderson *et al.*, 1970; Bergard, 1976).

Extratos etanólicos de própolis seca foram testados quanto ao controle de *Salmonella* em rações avícolas, porém o efeito positivo foi devido a presença de grande quantidade de álcool e não devido a própolis usada (Mazzuco *et al.*, 1996).

A preservação de produtos da carne por própolis natural foi mostrada e os efeitos de extrato etanólico de própolis na mudança de proteína documentado (Han e Park, 1995).

### **3.16 Atividade anti-tumoral**

Neoplasia é conhecida como o novo crescimento de células tumorais e usualmente, meios anormais de proliferação. Se as células proliferativas não são capazes de fagocitar as células teciduais, resultará em início do tumor que é considerado maligno. Essas aberrações celulares são comumente consequência

de mutações genéticas devido a exposição a fatores de risco ou secreções anormais de hormônios ou enzimas. O termo câncer usualmente implica malignidade (Thomas, 1986). Todo tipo de câncer tem potencial invasor de metástase, mas cada tipo específico tem característica clínica e biológica individual que devem ser estudados para um diagnóstico apropriado, tratamento e cura (DeVita *et al.*, 1997). Existem quatro caminhos para o tratamento do câncer: cirurgia, quimioterapia, radioterapia e terapia biológica (National Cancer Institute, 2004).

A citotoxicidade da própolis foi comprovada tanto em animais quanto estudos *in vitro*. Foi observado que a atividade anti-tumoral da própolis de *Baccharis dracunculifolia* está intimamente relacionado com a substância Artepillin C, e a atividade citotóxica que resultaram em apoptose de células cancerosas por fragmentação de DNA (Kimoto *et al.*, 1998). Outras hipóteses do mecanismo anti-tumoral da própolis sugerem que essa atividade podem ser associadas com a ativação na produção de linfócitos e a subsequente estimulação do sistema imune associado com a inibição da peroxidação lipídica (Kimoto *et al.*, 2001).

Artepillin C, principal composto encontrado na própolis brasileira do grupo 12 ou própolis verde, mostrou apoptose e supressão do crescimento tumoral. Artepillin C isolada da própolis verde brasileira (origem botânica: *Baccharis dracunculifolia*) e seus compostos revelaram *in vitro* citotoxicidade contra células tumorais. Depois de aplicações de injeções intra-tumorais de 500 mg de Artepillin C três vezes por semana, foram observadas apoptose histológica, e combinação da supressão de necrose e mitose. Além da inibição do crescimento tumoral, foi

observado uma elevação nas células de rato T CD4/CD8 e no número total de células de defesa (Kimoto *et al.*, 1998).

A apoptose de células leucêmicas humanas induzidas com Artepillin C foi confirmada (Kimoto *et al.*, 2001). Artepillin C, pode também ser disponível como Artepillin C sintetizado (Uto *et al.*, 2002), mostrando propriedades protetoras na carcinogênese pulmonar (Kimoto *et al.*, 2001) e preferencialmente citotoxicidade de células tumorais (Kimoto *et al.*, 2001).

O CAPE, ácido fenil cafeico éster, isolado de própolis do álamo, tem mostrado um efeito inibitório em leucemia celular humana HL-60 por indução de apoptose (Chen *et al.*, 2001) e preferencialmente na citotoxicidade de células tumorais (Orsolich *et al.*, 2005). CAPE e muitos análogos mostraram um efeito inibidor em células leucêmicas humanas HL-60 por indução de apoptose (Orsolich *et al.*, 2005). CAPE e muitos análogos da própolis de álamo holandês demonstraram responsabilidade pela atividade anti-proliferativa em linhagens celulares cancerígenas (Banskota *et al.*, 2002). Ácido cafeoilquinico da própolis brasileira, está envolvida na introdução de granulócitos diferenciados de células HL-60 (Mishima *et al.*, 2005; Mishima *et al.*, 2005). Os efeitos do CAPE na peroxidação lipídica e níveis de óxido nítrico em plasma de ratos depois de injúria térmica foi examinada (Hosnuter *et al.*, 2004). Um novo método HPLC-MS foi desenvolvido para determinação de CAPE em plasma e urina de rato (Celli *et al.*, 2004). CAPE mostrou nefrotoxicidade em ratos (Ozen *et al.*, 2004). CAPE tem propriedades quimopreventivos e um efeito inibitório no crescimento de células gliomáticas C6 *in vitro* e *in vivo* (Kuo *et al.*, 2005). Na própolis do álamo europeu, o CAPE foi identificado como composto responsável por atividade anti-tumoral. Foi

mostrado que CAPE, ácido cafeico e a solução de própolis em água, reduziriam o crescimento e potencial metastásico de carcinoma mamário transplantável em ratos (Orsolich *et al.*, 2005).

Aproximadamente 20 substâncias similares ao ester de ácido caféico (CAPE) foram testadas por Nagaoka *et al.*, 2002, em células cancerosas de rato (carcinoma 26-L5; melanoma B16-BL6; carcinoma pulmonar Lewis LLC) e humanos (fibrosarcoma HT-1080; adenocarcinoma pulmonar A549; adenocarcinoma cervical HeLA) usando 5-fluorouracil ( $EC_{50}$ : 0,02 e 0,03  $\mu$ M). Nagaoka *et al.*, 2003 verificou que não houve formação de supressão tumoral em ratos com administração de CAPE antes da inoculação. Nos ratos tratados com CAPE depois da inoculação, uma diminuição na formação do tumor pulmonar foi demonstrado por redução de 50% do peso e do número de nódulos. Deste modo, o efeito anti-metastásico da CAPE deve ser devido a citotoxicidade, inibição da atividade das células tumorais, ou bloqueio do processo invasivo, passo inicial para metástase. No mesmo estudo, usando cisplatina (CDDP), uma droga que expressa efeito anti-metastásico, os autores observaram redução significativa do peso corporal, considerado como um efeito tóxico. Em contraste, CAPE teve um pequeno impacto no peso corporal, sugerindo-se que a supressão da metástase não teve efeito tóxico significativo (Nagaoka *et al.*, 2002).

Fitzpatrick *et al.*, 2001, avaliou a apoptose induzida pelo éster do ácido fenil cafeico (CAPE) em macrófagos de rato (NR 8383) e células humanas epiteliais (SW 620). As suspensões celulares 100.000/mL e 150.000/mL respectivamente foram expostas a CAPE (3-30  $\mu$ g/mL e veículo (0,2% DMSO) por 24 horas. A fragmentação de DNA foi medida por meio de "Detector de morte celular ELISA

mais” que revelou um maior efeito indutor de apoptose em macrófagos (Fitzpatrick *et al.*, 2001).

A atividade anti-proliferativa de própolis do álamo chinês foi testada usando células tumorais e dois novos flavonóides: 2-metil butiroil pinobanksina e 6-cinamil crisina foram descritos por Usia *et al.*, (2002), que demonstraram efetividade.

Na própolis de *Baccharis dracunculifolia* os compostos identificados como ácido prenil  $\rho$ -cumárico, clerodane, diterpenos e benzofuranos apresentaram atividade anti-tumoral. Propolin C induziu apoptose por ativação de caspases em melanoma celular humano (Chen *et al.*, 2004). Baccharin e Drupanin foram isoladas de própolis brasileira e foi mostrado que esses compostos são potentes supressores de componentes tumorais (Mishima *et al.*, 2005).

### **3.17 Proteção do DNA**

Fitzpatrick *et al.*, 2001, avaliou a apoptose induzida pelo CAPE em macrófagos de rato (NR 8383) e células humanas epiteliais (SW 620). Através de fragmentação de DNA foi medida por meio do teste “ Detector de morte celular ELISA mais” que ocorre maior efeito indutor de apoptose em macrófagos quando submetidos a ação do CAPE (Fitzpatrick *et al.*, 2001). Outros investigadores mostraram que CAPE é capaz de induzir a apoptose preferivelmente, dependendo do tipo de célula usada com esse composto – efeito seletivo de apoptose, sem nenhum efeito em células normais (Chen *et al.*, 2003).

### **3.18 Sinergismo da própolis com quimioterapia**

Os efeitos biológicos também atuam em sinergismo com a quimioterapia convencional, com drogas como 5-fluorouracil (Suzuki *et al.*, 2002). Antioxidantes tem a capacidade de aumentar os efeitos das atividades de drogas anticancerígenas. Esse é um fato relevante porque reduz os efeitos não desejados causados pelos medicamentos, através da diminuição da dose administrada sem nenhum detrimento dos efeitos terapêuticos (Santos e Cruz, 2001). Suzuki *et al.*, 2002, administrou oralmente, solução aquosa de própolis (CWSP) junto a injeção subcutânea de 5-fluorouracil (5-FU) ou mitomicina C em células de carcinoma ICR inoculadas subcutaneamente em ratos, com a meta de examinar os efeitos da CWSP na progressão tumoral, a efetividade da quimioterapia, e hematopoese na circulação sanguínea. Essa associação terapêutica com própolis e agentes quimioterápicos aumentou a regressão tumoral em ratos em fase avançada, comparado com a quimioterapia isolada, ilustrando os efeitos auxiliares de CWSP oral na regressão tumoral quando combinado com agentes quimioterápicos convencionais. Além disso, a combinação terapêutica melhorou a indução da citopenia pela 5-FU, resultando em recuperação na contagem de células brancas e vermelhas do sangue. Nenhum efeito significativo foi observado em contagem de plaquetas com as dosagens isoladas de CWSP ou com controle com água, nem a redução do crescimento com administração oral de extratos aquosos isolados da própolis. Um provável mecanismo de ação da CWSP deve ser o aumento da bioavaliabilidade da 5-FU, em outras palavras, CWSP deve atuar mantendo altos os níveis de 5-FU na corrente sanguínea (Suzuki *et al.*, 2002).

De acordo com Santos e Cruz, 2001, quando associados a agentes quimioterápicos, os antioxidantes minimizam a toxicidade causada pelas drogas quando interagindo com radicais livres (Santos e Cruz, 2001).

Outros estudos recentes sugerem que suplementação nutricional com antioxidantes podem influenciar a resposta quimioterápica positivamente na redução dos efeitos causados pela quimioterapia. Também foi avaliado a eficácia anti-metastásica de compostos da própolis solúveis em água sozinha ou em combinação com quimioterápicos e ou radioterápicos podendo aumentar o potencial anti-metastásico por agentes quimioterápicos (Orsolic e Basic, 2005). Isso também sugere benefícios em potencial clínico na tentativa de usar própolis solúvel em água combinado com quimioterápicos no sentido de maximizar suas atividades anti-tumorais e minimizar os efeitos pós quimioterápicos ou radioterápicos, como também diminuir as células sanguíneas. Em adição (Padmavathi *et al.*, 2005), estudou os efeitos terapêuticos do paclitaxel e própolis (extrato etanólico) em peroxidação lipídica e sistema antioxidante usando 7,12 dimetil benzo antraceno, (DMBA) como um indutor de câncer de mama em ratos fêmeas. Foi observado que administração de paclitaxel e própolis suprimiram efetivamente o câncer de mama, diminuindo a peroxidação lipídica e aumentando as atividades antioxidantes enzimática ou não enzimática (superóxido desmutase e vitamina C por exemplo) quando comparados com terapias isoladas de paclitaxel ou própolis. A combinação de paclitaxel e própolis ofereceram máxima proteção contra DMBA indutor de carcinogênese mamária.

### **3.19 Atividade imuno-moduladora**

Terapia biológica é uma modalidade de terapia atua em conjunto com o sistema imune. Modificações das respostas biológicas são usados pelos próprios organismos para combater por exemplo o câncer, ajudando a enfrentar os processos da doença. As drogas quando usadas também podem causar diferenciação no padrão das células tumorais, facilitando o controle do tumor (Rosenthal, 2000). Essa modalidade terapêutica podem ajudar a combater o câncer ou controlar os efeitos colaterais provocados por outras opções de tratamento como a quimioterapia (National Cancer Institute, 2004). Terapia biológica e quimioterapia são modalidades de tratamentos que agem por diferentes caminhos. Enquanto o primeiro ajuda o sistema imune a combater o câncer, o último ataca diretamente as células tumorais (National Cancer Institute, 2004).

Própolis aumenta a resistência natural do corpo contra infecções por estimulação do sistema imune. A atividade celular e humoral durante toxicidade tetânica na vacinação com e sem própolis foi examinada. Foi mostrado que própolis estimula o sistema imune do corpo, o índice imunológico foi maior quando própolis foi administrada (Budarkova, 1976). O crescimento e potencial de metástase do carcinoma mamário transplantável em ratos foi significativamente reduzido por compostos polifenólicos na fração de própolis. Os autores relataram a atividade anti-tumoral principalmente como propriedade imunomoduladora dos compostos, sua citotoxicidade de células tumorais, e sua habilidade em induzir a apoptose e ou necrose (Orsolich *et al.*, 2005). (Takagi *et al.*, 2005) demonstraram

mudanças nos efeitos da irradiação e ativação imune depois de administração de própolis.

A contribuição da própolis como suplemento coadjuvante nutricional no tratamento do câncer é realmente justificado devido a características funcionais provindas de muitos e intensos estudos científicos e clínicos realizados. Dentre as várias atividades biológicas da própolis pode-se citar a atuação sinérgica com outros medicamentos quimioterápicos convencionais devido a atividade anti-tumoral, proteção do DNA, eliminador de radicais livres e imunoestimulador (Banskota *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2002).

Sempre que o organismo está exposto a um agente patológico, ele torna-se vulnerável e qualquer estímulo adicional no sistema imune torna-se muito importante. Isso pode ser feito pela dieta, por exemplo, com ingestão de grande quantidade de produtos ricos em vitaminas como suplemento alimentar. Própolis é fortemente utilizado não só pela ação terapêutica, mas também como prevenção, uma vez que possui atividade imuno moduladora.

Ansorge *et al.*, (2003), estudaram os efeitos do CAPE e dos flavonóides hesperedina e quercetina de diferentes extratos de própolis em diversas funções das células imunes humanas, como: síntese de DNA, produção de citocinas (IL-1, IL-12, IL-2, IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$ 1) e linfócitos T. Os resultados sugeriram que substâncias são capazes de aumentar a capacidade produtora de fator de crescimento transformante  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) em células T humanas. TGF- $\beta$ 1 causa a inibição do crescimento celular, diferenciação nos vários tipos celulares, sendo essa uma resposta imuno reguladora e um mediador inflamatório. Os resultados demonstraram que a própolis apresenta um efeito modulador direto nas atividades

funcionais básicas das células imunológicas provavelmente através da via imuno moduladora de células T. Isso é conhecido como um intermediário metabólico de oxigênio que são relatados em atividades macrofágicas bactericidas. Orsi *et al.*, (2000) realizou um estudo para avaliar a ativação macrofágica depois da exposição à própolis. Uma solução 10% hidroalcoólica de própolis foi administrada em ratos; o grupo controle recebeu solução fisiológica (NaCl 0,9%). Para avaliar ativação macrofágica, foi determinada a concentração de metabólicos oxigenados intermediários: peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e monóxido de nitrogênio (NO). Os ratos foram sacrificados 24 horas depois do tratamento com própolis para a avaliação das células *in vitro*. Foi observado que a própolis (5, 10 e 20  $\mu\text{g/mL}$ ) induziu o aumento da produção de  $H_2O_2$ . Nesse estudo, a própolis não induziu alterações significativas na produção de NO, com discreta inibição da concentração de 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ . A conclusão desse estudo indica que a própolis tem um importante papel na ação do sistema imunológico, especialmente por resposta imune não específica responsável por ativação macrofágica (Orsi *et al.*, 2000). Os resultados encontrados nesses estudos estão de acordo com os descritos por Than *et al.*, (2003), que testou a inibição da produção de NO, induzida por extratos aquosos e alcoólicos da própolis verde brasileira em culturas macrofágicas J774.1 de ratos. As culturas continham lipopolissacarídeos (LPS, 10  $\mu\text{g/mL}$ ), um dos ativadores da produção de NO. A produção de NO foi medida pelo acúmulo de nitrito na cultura pelo reagente Griess (Than *et al.*, 2003). Ambos, extrato aquoso e alcoólico mostraram ser potentes inibidores dependendo da dose de NO, de acordo com (Matsushige *et al.*, 1996), que usaram experimentos com extrato aquoso de própolis *in vitro* para testar a efetividade na síntese de NO..

### **3.20 Potencial alergênico da própolis**

Alergia ou hipersensibilidade significam resposta imune inadequada em um indivíduo por uma substância inofensiva. A própolis tem um potencial alergênico dependendo de sua origem botânica e composição química. As reações alérgicas causadas pela própolis baseada no álamo foram examinada extensivamente e ácido 1,1-dimetil cafeico éster, ácido fenil-3,4-diidroxicinâmico e ácido benzilsalicílico foram identificados como agentes causadores de alergias nesse tipo de própolis (Schuhmann e Grunow, 1991).

Própolis contém muitas substâncias com potencial alérgico. A dermatite de contato devido a atividade ocupacional foi descrita pela primeira vez em apicultores que diariamente entravam em contato com a própolis (Garrido Fernandez *et al.*, 2004; Gulbahar *et al.*, 2005). Mais tarde, muitos estudos sobre cosméticos que causam dermatite de contato foram publicados (Acciai *et al.*, 1990; Arvouet-Grand *et al.*, 1993). Recentemente foram publicados os resultados de “patch test” estudados em diferentes centros médicos sobre cosméticos que causam alergia. Os resultados do teste de 1995-1997 e 2000-2002 foram comparados e foi observado aumento na freqüência do “patch test” para própolis do Peru. A sensibilidade contra própolis aumentou de 0,5% para 1,4% ( $P < 0.001$ ) e bálsamo do Peru aumentou de 4,0% para 6,2% ( $P < 0.001$ ) (Hasan *et al.*, 2005). Seiscentos e cinco pacientes foram submetidos a um teste com 10% de solução de própolis baseada no álamo e vinte e cinco pacientes (4,2%) tiveram resultado positivo de alergia a própolis (Machackova, 1988). Dezenove substâncias existentes na própolis de exsudatos de folhas de brotamento de álamo foram

testadas quanto a seu potencial alérgico. Quatro cafetatos e benzil isoferrulatos foram demonstrados como sendo fortes, sete moderados e treze somente sensibilizadores. Os compostos 3-metil-2-butenil cafetato, fenil cafetato e benzil isoferrulato foram identificados como principais sensibilizadores (Hausen *et al.*, 1992). O potencial alergênico de extrato de própolis vermelha de Cuba foi estudado e os animais testados não apresentaram irritação dermatológica no teste de toxicidade dérmico e ocular, porém o teste de alergia de contato mostrou resposta moderada (presença de eritema, porém não apresentaram edemas ou outras reações alérgicas). Em humanos as reações alérgicas causadas pela própolis de Cuba foram muito baixas (Ledón *et al.*, 2002).

Farnesol é um composto químico presente na própolis de álamo, que possui potencial alergênico e então, foi decidido pela União Européia que produtos contendo farnesol devem ser etiquetados de acordo (Schnuch *et al.*, 2004). Própolis causam alergias em 5% da população através de dermatites de contato (Gulbahar *et al.*, 2005). Muitos apicultores apresentam dermatite de contato com a própolis, além disso, músicos podem também apresentar o mesmo problema devido a presença de própolis no verniz dos instrumentos musicais (Lombardi *et al.*, 2003).

## **4 Material e métodos**

### **4.1 Coleta das amostras de própolis**

Amostras de própolis do grupo 12 foram coletadas de colméias dos estados de Minas Gerais e São Paulo, e as amostras de própolis do grupo 13 foram coletadas de colméias dos estados de Alagoas, Pernambuco, Paraíba e Bahia. As amostras de própolis foram coletadas por raspagem das partes internas das caixas (melgueiras e ninhos) de abelhas *Apis mellifera* africanizada. As própolis foram coletadas usando o CPI (coletor de própolis inteligente) que difere dos demais coletores porque possui aberturas laterais na caixa, possibilitando maior facilidade para coleta da própolis, e colocadas nos lados da melgueira para facilitar a colheita da própolis. Cada amostra foi coletada de uma colméia.

Depois da colheita o material foi armazenado no congelador (-18°C) até o momento das análises.

### **4.2 Extração dos compostos químicos da própolis utilizando reagentes diferentes**

As amostras de própolis bruta, separadas por respectiva colméia, foram trituradas em almofariz com pistilo. 2 gramas de própolis triturada foram pesados em balança semi-analítica e transferidos para 6 tubos de vidro Pyrex com tampa de rosca. Nos tubos numerados de 1 a 6 foram adicionados respectivamente alíquotas de 25 mL de metanol, etanol, acetato de etila, hexano, clorofórmio e acetona. As amostras foram mantidas a 70° C por 30 minutos, sob agitação constante. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 8800 x g por 10

minutos a 5°C, em centrífuga Beckman Modelo J2-21. Os sobrenadantes foram transferidos para tubos de vidro com tampa de rosca e armazenados a 2°C.

#### ***4.3 Extração dos compostos fenólicos de própolis com água destilada e diferentes concentrações de etanol***

Amostras de 2 g de própolis em pó dos grupos 12 e 13 foram transferidos para tubos de ensaio com tampa de rosca contendo 10 mL de água destilada (0% de etanol) e de concentrações crescentes de etanol (10% a 100% de etanol 96°GL). Os tubos de ensaio foram incubados a 70°C durante 30 minutos. As amostras foram centrifugadas como descrito anteriormente e os sobrenadantes foram transferidos para tubos de ensaio com tampa de rosca e armazenados a 2°C para análise posterior das características físico-químicas e atividade antimicrobiana.

#### ***4.4 Espectrofotometria na região ultravioleta-vísivel***

O espectro de máxima absorção dos extratos etanólicos de própolis (EEP) e plantas foi determinado como descrito por (Park e Ikegaki, 1998) na faixa de 200 a 600 nm utilizando-se um espectrofotômetro Beckman Coulter modelo DU-640.

#### ***4.5 Cromatografia em camada delgada de alta eficiência em fase reversa (CCDAE-FR)***

Os extratos etanólicos de própolis (EEP) foram analisados por cromatografia em camada delgada de alta eficiência em fase reversa (CCDAE-FR) de acordo com o método descrito por (Alencar, 2002). Alíquotas de 3 µL dos EEP foram aplicadas em placas de 0,2 mm de espessura (10x10 cm) RP18F<sub>254</sub>S

(Merck Co.). Foi utilizada etanol/água (55:45, v/v) como fase móvel e tempo de desenvolvimento da cromatografia de aproximadamente 1 hora e 40 minutos. As placas foram expostas a luz ultravioleta no comprimento de onda de 254 e 366 nm, utilizando-se uma lâmpada UV Cole Parmer, modelo UVP-UVGL-58.

#### **4.6 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR)**

As análises por CLAE-FR foram feitas de acordo com o método descrito por Park *et al.*, (2002). As amostras de 20 µL do EEP foram injetadas em uma coluna YMC-Pack ODS-A (RP-18, 250 x 4,6 mm; tamanho de partícula 5 µm) instalada em um sistema de cromatografia líquida (Shimadzu Co.) composto por duas bombas (LCD-10AD) degaseificado por hélio (DGU-2A) e forno de colunas (CTO-10AS) com temperatura de 30°C. A fase móvel utilizada foi água/ácido acético (19:1 v/v) (solvente A) e metanol grau CLAE (solvente B). A vazão foi de 1,0 mL/min. O gradiente aplicado foi 30% do solvente B até 40% em 15 minutos, 50% do solvente B em 30 minutos, 60% do solvente B em 45 minutos, 75% do solvente B em 65 minutos, 90% do solvente B em 95 minutos e 30% do solvente B em 105 minutos. O tempo de corrida total foi 120 minutos. As substâncias foram determinadas pela comparação com os espectros dos padrões na região ultravioleta de 200 a 400 nm obtidos por meio do detector de arranjo de diodos (SPD-M10A).

#### **4.7 Determinação de flavonóides totais**

A determinação de flavonóides (flavonas, isoflavonas e flavonols) dos extratos de própolis e plantas foi realizada pelo método colorimétrico do cloreto de alumínio (Chang *et al.*, 2002). Amostras de 0,5 mL do extrato etanólico de própolis (1:20, v/v) foram misturadas com 1,5 mL de etanol 96%, 0,1 mL de cloreto de alumínio (10%), 0,1 mL de acetato de potássio 1 mol/L e 2,8 mL de água destilada. No tubo branco foi adicionado etanol 96% no lugar do extrato etanólico de própolis. Depois de 30 minutos, a absorbância das amostras foi medida em um espectrofotômetro Beckman Coulter modelo DU 640 a 434 nm. A concentração de flavonóides totais foi calculada como quercetina (12,5 a 200 µg/mL), diluídas em metanol absoluto. O mecanismo da formação do complexo Flavonóide-Al em solução de cloreto de alumínio foi descrito pelo (Markham, 1982). A quantidade de flavonas, isoflavonas e flavonols pode ser determinada sem interferência de outras substâncias fenólicas, principalmente de ácidos fenólicos, mesmo que eles formem complexos com  $AlCl_3$  devido a absorbância de luz desses compostos em comprimento de onda muito inferior a 434 nm (Marcucci *et al.*, 1998).

#### **4.8 Determinação de compostos fenólicos totais**

A determinação de compostos fenólicos totais dos extratos de própolis foi feita de acordo com o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu descrito por (Woisky e Salatino, 1998), usando ácido gálico como padrão. A leitura no espectrofotômetro foi feita a 740 nm. Os extratos etanólicos de própolis foram diluídos 1:100 e uma alíquota de 0,5 mL foi transferida para um tubo com tampa

de rosca. Em seguida foi adicionado 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu diluído em água destilada 1:10. Depois de 5 minutos de repouso foram adicionados 2 mL de solução 4% de carbonato de sódio e os tubos foram deixados em repouso por 2 horas no escuro total. Uma amostra em branco foi preparado nas mesmas condições e os resultados dos compostos fenólicos totais foram expressos como ácido gálico.

#### **4.9 Determinação da atividade anti-radical (DPPH)**

A medida da atividade sequestrante de radicais livres dos extratos de própolis foi determinada utilizando-se 1,1-difenil-2-picrilidrazil (DPPH), de acordo com a metodologia descrita por (Chen *et al.*, 2003; Yen e Wu, 1999). O DPPH é um radical livre estável que aceita um elétron ou um radical hidrogênio para tornar-se uma molécula diamagnética e desta forma, ser reduzida na presença de um antioxidante. Para a avaliação da atividade sequestrante de radicais livres os extratos etanólicos da própolis reagiram com o radical estável de DPPH em uma solução de etanol P.A. Merck (96%). Na forma de radical, o DPPH possui uma absorção característica a 517 nm, a qual desaparece após a redução pelo hidrogênio retirado de um composto antioxidante. Foram adicionados 4 mL dos extratos etanólicos de própolis na concentração 200 µg/ mL em tubos contendo 1 mL da solução do radical DPPH (0,5 mmol/L). A redução do radical de DPPH foi medida através do monitoramento contínuo do declínio da absorbância a 517 nm, ao abrigo da luz, até valores estáveis de absorção. A atividade anti-radical foi determinada em termos de porcentagem de inibição (PI), a qual foi calculada através da taxa de declínio da absorção da solução de DPPH com o extrato

etanólico de própolis, com a absorção da solução controle de acordo com a fórmula:

$$PI (\% \text{ inibição}) = \left[ \frac{A(0) - A(t)}{A(0)} \right] \cdot 100$$

Onde:

A(0) = Absorbância da solução referência de DPPH-etanol (96%).

A(t) = Absorbância da solução DPPH-Extrato etanólico de própolis após o tempo t em minutos.

#### **4.10 Determinação da atividade antimicrobiana (Antibiograma)**

A atividade antimicrobiana dos extratos de própolis e de plantas foram testadas usando *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 de acordo com o método descrito por Isla et al., (2005). A cultura de *S. aureus* foi inoculada em toda a superfície da placa de ágar nutriente com *swabs* estéreis. Em seguida discos de papel impregnados com extratos de própolis, foram colocados na superfície do meio de cultura e as placas foram encubadas por uma noite a 37°C. Para a preparação dos discos de papel, amostras de 10 µL de extratos de própolis e exsudatos de plantas foram aplicados em discos (5 x 1 mm) de papel Whatman nº 3, e em seguida os discos foram secos em estufa a vácuo a temperatura ambiente durante uma noite e depois incubado a 60 ° C por 4 horas.

#### **4.11 Determinação da concentração inibitória mínima (MIC)**

As determinações da concentração inibitória mínima das amostras de extratos etanólicos de própolis foram realizadas de acordo com a Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos (M7-A6, Vol. 23, no. 2) da CLSI (Clinical and Laboratorial Standards Institute) / ANVISA.

Foram utilizadas amostras de própolis dos grupos G12 e G13. Amostras de 1g de própolis in natura (incluindo cera) foram dissolvidas em 12,5 mL de etanol 80%.

Foram utilizados os antibióticos: Avilamicina, Halquinol, Lincomicina, Tilosina, Virginamicina, Tiamulina e Sulfato de Colistina na concentração de 1 mg/mL.

Foram utilizados as linhagens de microrganismos: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 13388, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Clostridium perfringens* ATCC 1324, *Salmonella thyphimurium* ATCC 14028 e *Escherichia coli* hemolítico isolado de suíno.

Foram utilizados os meios de cultura: Caldo Mueller-Hintone e caldo tioglicolato para a cultura de *C. perfringens* e caldo nutriente para ativação da *E. coli* e *S. thyphimurium*.

O inóculo foi preparado a partir da suspensão de células de crescimento recente (24 h) em solução salina, sendo a densidade ótica ajustada até turbidez correspondente a solução de Mc Farland 0,5 (625 nm, Abs entre 0,08 e 0,1). O reagente revelador utilizado foi a solução de cloreto de trifetil tetrazolium (CTT)

0,5%. A determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC) foi realizada pelo método da microdiluição.

Em uma microplaca esterilizada de 96 poços foram depositados 100  $\mu$ L de caldo Mueller-Hinton ou Caldo Tioglicolato, sendo a coluna 12 utilizada para os controles do microrganismo e de esterilidade do meio de cultura. Na coluna 1 - linha A foram acrescentados 50  $\mu$ L da solução do material a ser testado, de concentração conhecida (uma substância diferente para cada número ou coluna), sendo estes referentes ao controle de esterilidade das amostras. Em seguida, 100  $\mu$ L dos mesmos materiais foram adicionados na linha B, o conteúdo dos orifícios foram homogeneizados com o meio e transferidos para o orifício da linha C, repetindo-se este procedimento até a linha H, de modo a obter uma concentração decrescente do material. Os 100  $\mu$ L finais foram desprezados. Em seguida, 100  $\mu$ L do inóculo do microrganismo, cuja turvação foi comparada à escala de McFarland no 0,5 e diluídos para concentração final de  $10^4$  células/mL foram adicionados. As placas foram seladas com parafilm® e incubadas por 24 h à 36°C. Após este período as placas foram avaliadas e a MIC definida como a menor concentração do material capaz de impedir o crescimento da bactéria.

Controle referente a uma solução de etanol 80% foi também incluído no ensaio, para verificar os efeitos do mesmo sobre o crescimento microbiano, uma vez que tal solução foi utilizada para a solubilização da própolis.

Após o período de incubação, foram adicionados 50  $\mu$ L da solução de CTT e as placas reincubadas por 3 h para realizar a leitura dos resultados. A MIC foi definida como a menor concentração da amostra, capaz de impedir o

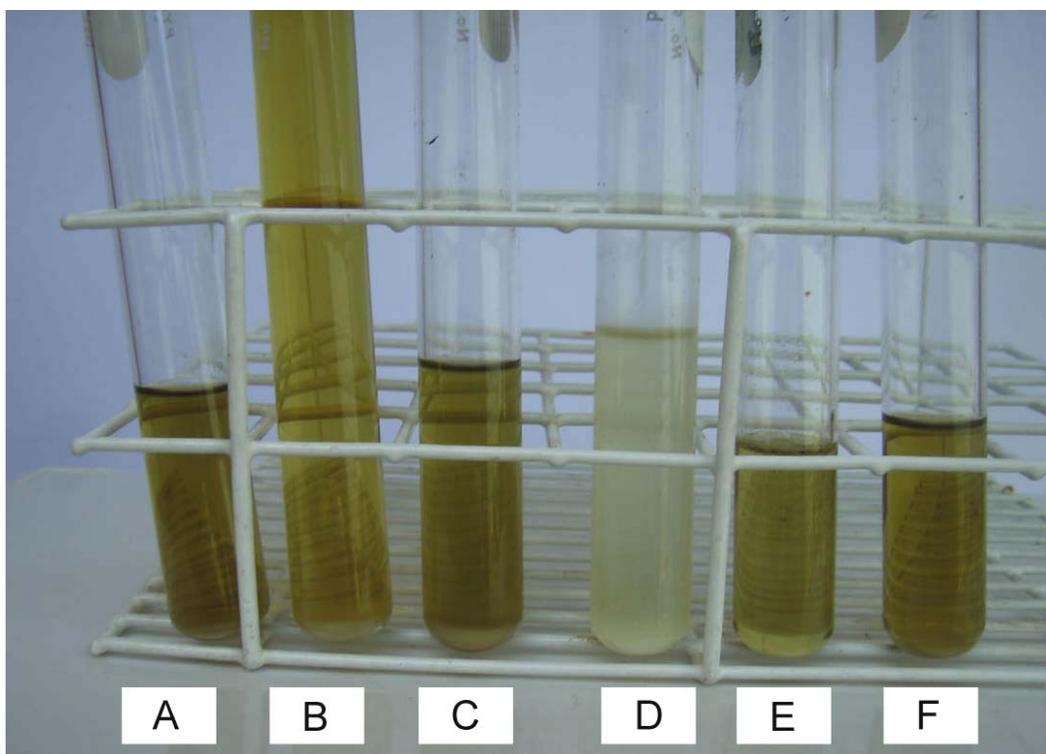
aparecimento de coloração vermelha, conferida ao meio quando as células apresentam atividade respiratória.

## 5 Resultados e discussão

### 5.1 Extração de compostos fenólicos de própolis utilizando diferentes solventes

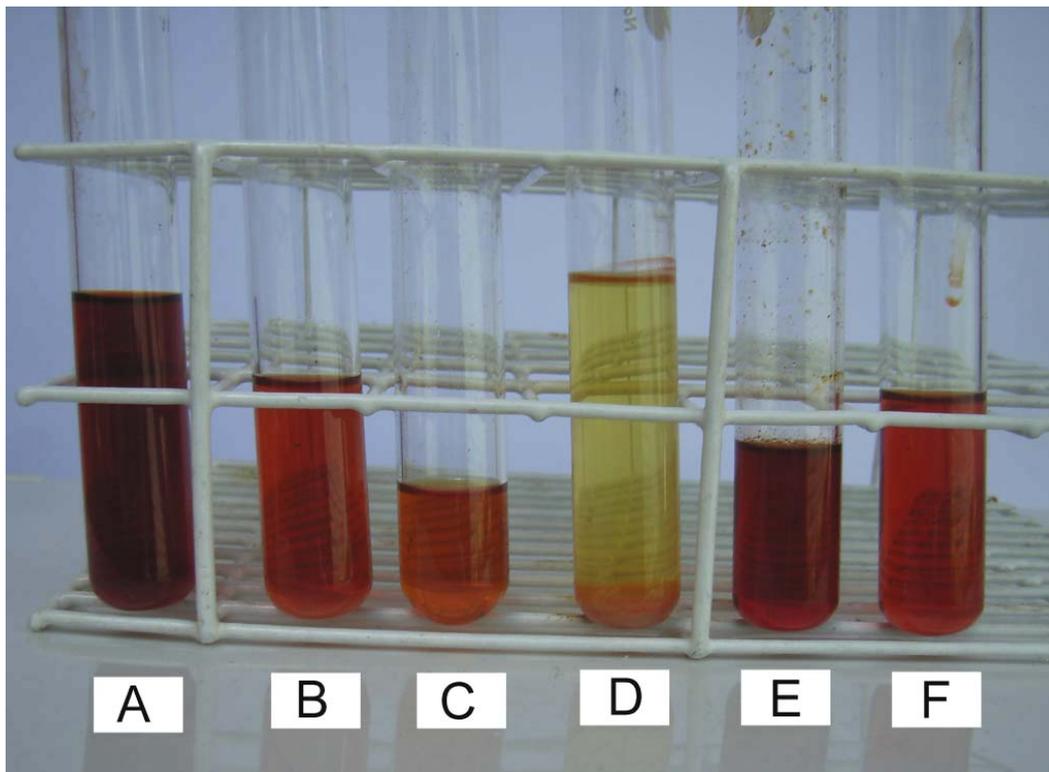
A extração de compostos fenólicos de própolis com diferentes solventes foi testada como descrito no item 4.2.

As figuras 1 e 2 ilustram respectivamente os extratos de própolis dos grupo 12 e 13 utilizando-se metanol, etanol, acetato de etila, hexano, clorofórmio e acetona.



**Figura 1** Extratos de própolis do grupo 12 com solventes diferentes.

A = Metanol, B = Etanol, C = Acetato de etila, D = Hexano, E = Clorofórmio, F = Acetona.

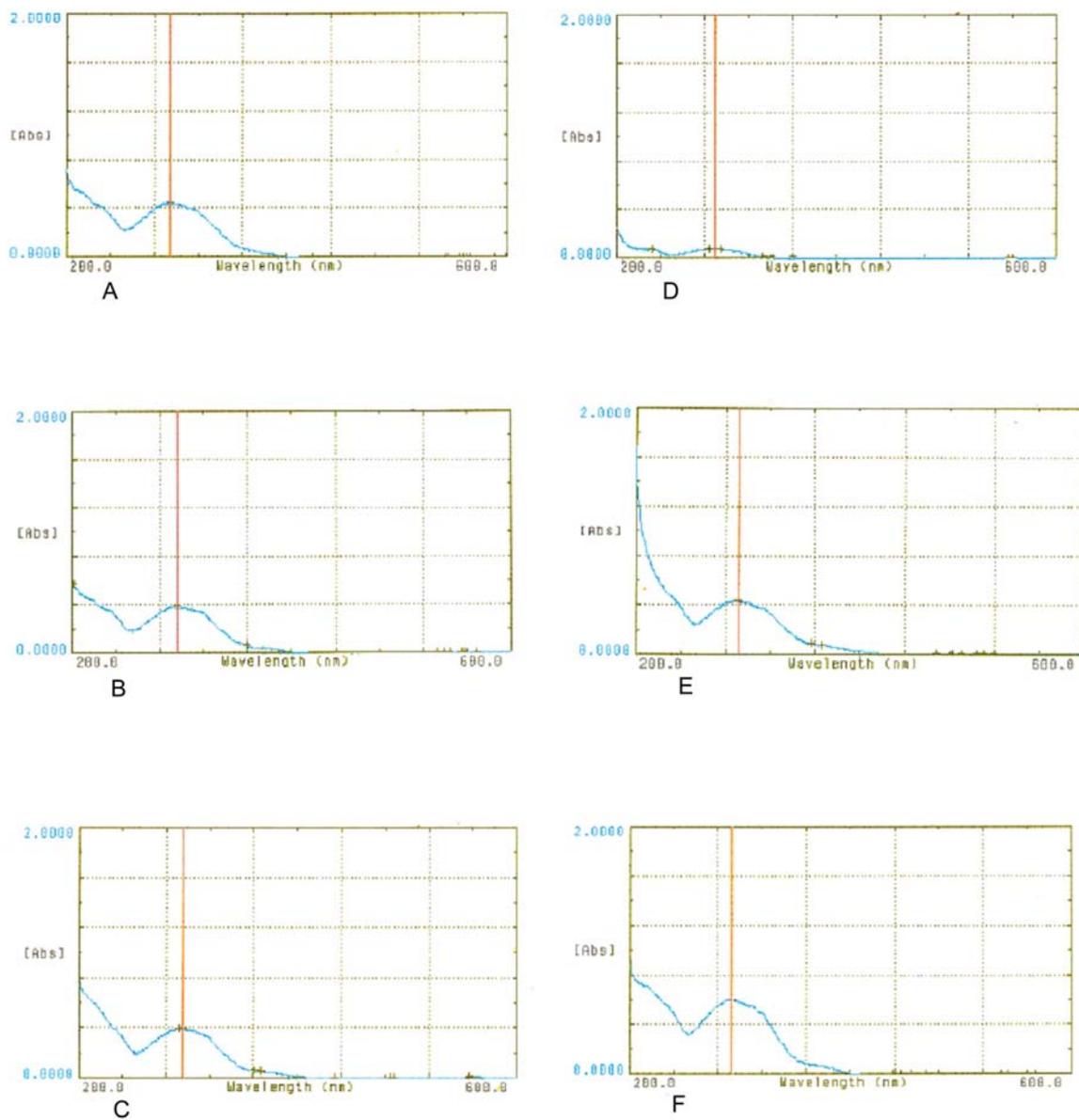


**Figura 2** Extratos de própolis do grupo 13 com solventes diferentes.

A = Metanol, B = Etanol, C = Acetato de etila, D = Hexano, E = Clorofórmio, F = Acetona.

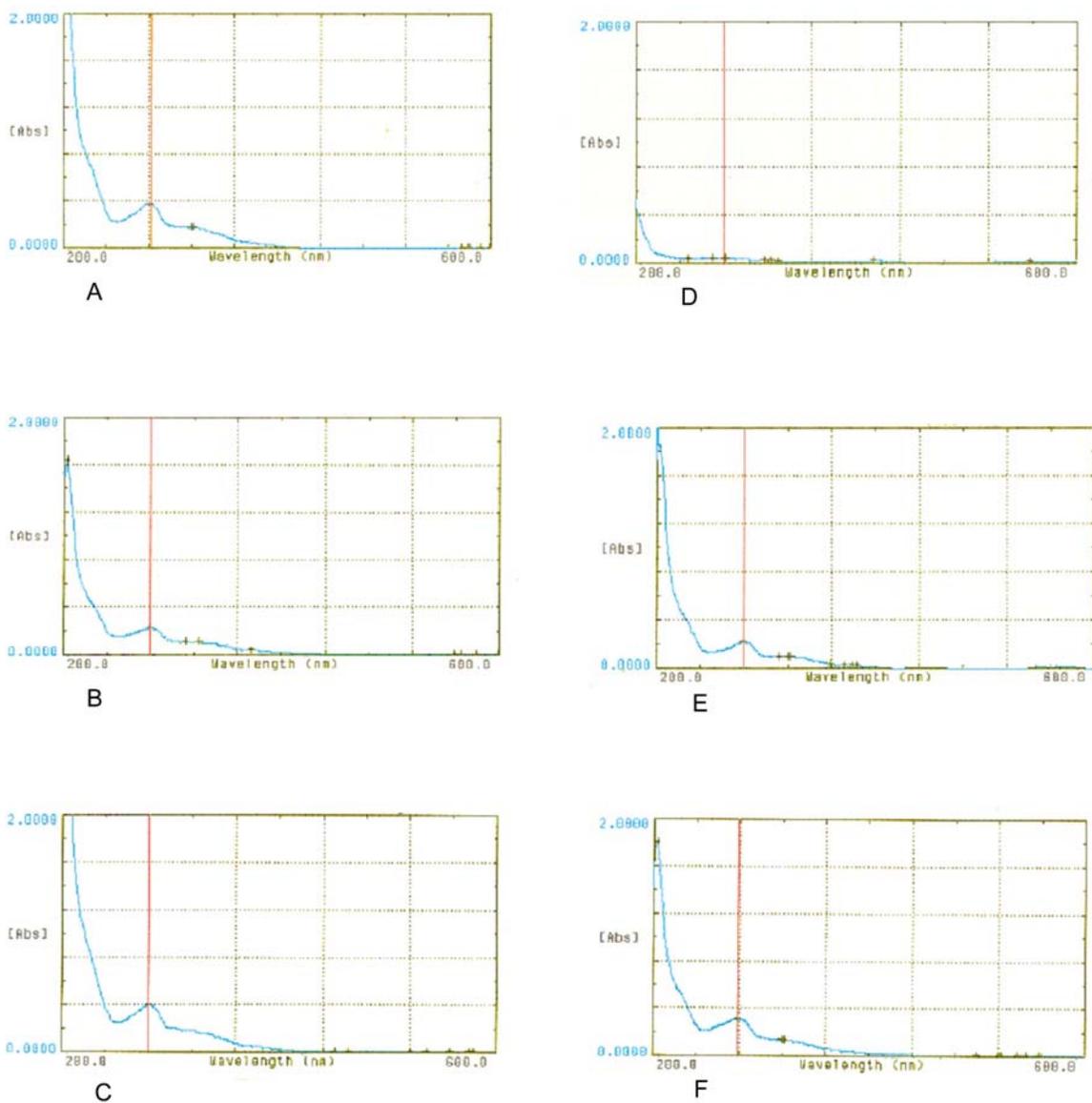
### ***5.2 Espectrofotometria na região ultravioleta-visível de diferentes extratos de própolis obtidos com diferentes solventes***

As Figuras 3 (A-F) e 4 (A-F) ilustram os espectros de absorção UV-VIS respectivamente dos extratos de própolis dos grupos 12 e 13 obtidos com metanol, etanol, acetato de etila, hexano, clorofórmio e acetona. As amostras com maior absorção de luz ultravioleta foram em ambas amostras de própolis o metanol, o acetato de etila, o clorofórmio e a acetona.



**Figura 3** Espectrofotometria UV-VIS de própolis do grupo 12 obtidos com diferentes solventes.

A = Metanol, B = Etanol, C = Acetato de etila, D = Hexano, E = Clorofórmio, F = Acetona.

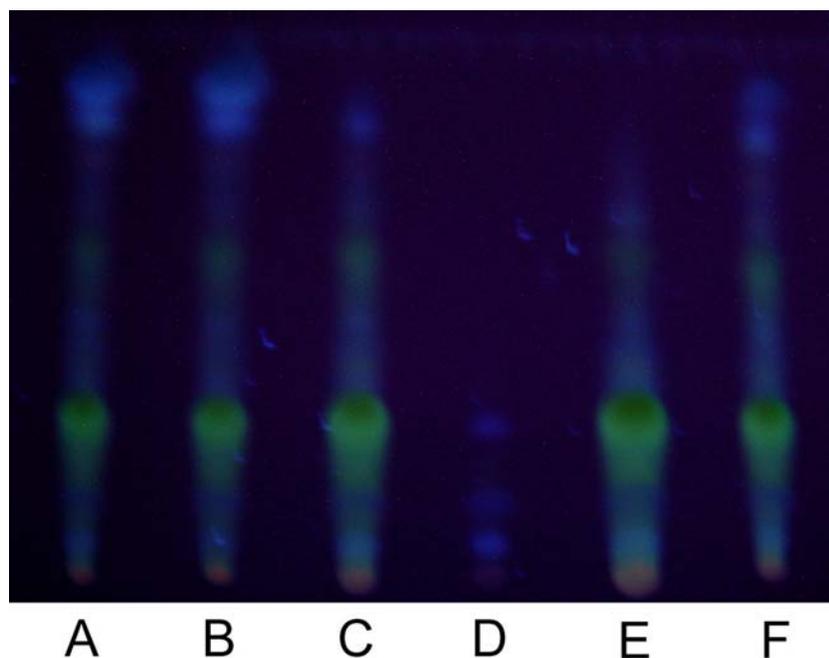


**Figura 4** Espectrofotometria UV-VIS de própolis do grupo 13 obtidos com diferentes solventes.

A = Metanol, B = Etanol, C = Acetato de etila, D = Hexano, E = Clorofórmio, F = Acetona.

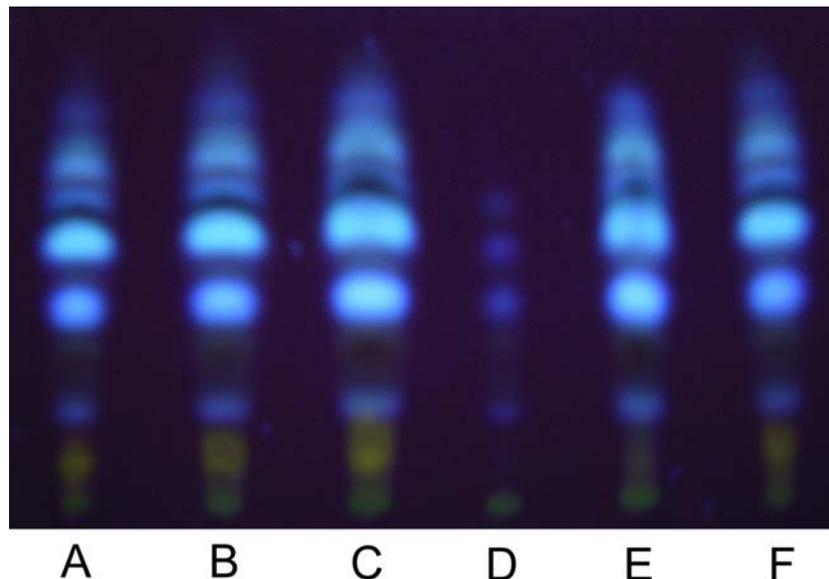
### **5.3 Cromatografia em camada delgada de alta eficiência em fase reversa (CCDAE-FR) dos extratos de própolis obtidos com diferentes solventes**

As Figuras 5 e 6 ilustram respectivamente os perfis cromatográficos das amostras de extratos de própolis dos grupos 12 e 13 obtidos com diferentes solventes, em placas de camada delgada RP18F<sub>254</sub>S. Os extratos de própolis dos grupos 12 e 13 obtidos com os solventes metanol, acetato de etila, clorofórmio e acetona apresentaram na cromatografia em camada delgada compostos com maior intensidade de absorção da luz UV do que os extratos obtidos com os solventes etanol e hexano.



**Figura 5** Cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE-FR) dos extratos de própolis do grupo 12 obtidas com diferentes solventes.

A = Metanol, B = Etanol, C = Acetato de etila, D = Hexano, E = Clorofórmio, F = Acetona.



**Figura 6** Cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE-FR) dos extratos de própolis do grupo 13 obtidas com diferentes solventes.

A = Metanol, B = Etanol, C = Acetato de etila, D = Hexano, E = Clorofórmio, F = Acetona.

#### ***5.4 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) dos extratos de própolis obtidos com diferentes solventes***

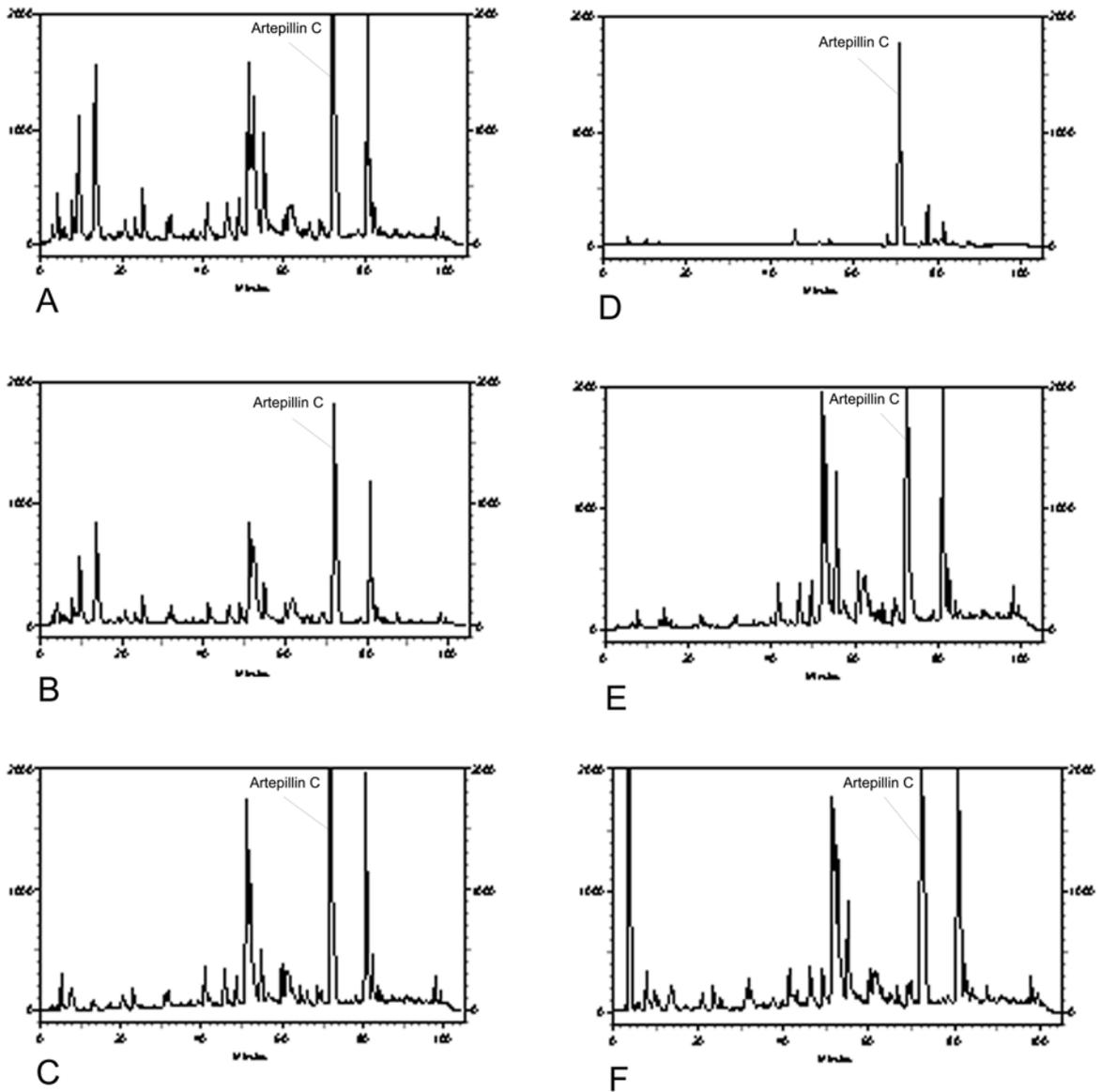
As Figuras 7 e 8 ilustram respectivamente os perfis cromatográficos dos extratos de própolis dos grupos 12 e 13 extraídos com metanol, etanol, acetato de etila, hexano, clorofórmio e acetona, em placas de camada delgada. Foi verificado que existe variação da quantidade de flavonóides e outros compostos fenólicos conforme o solvente utilizado.

Foi observado que para a própolis do grupo 12, a acetona mostrou-se ser o melhor solvente (Figura 7-A), porque extraiu maior quantidade de flavonóides e outros compostos fenólicos. O solvente hexano mostrou capacidade em extrair

praticamente apenas o composto Artepillin C (Figura 7-D), que é um dos compostos da própolis que apresenta atividade anti-tumoral.

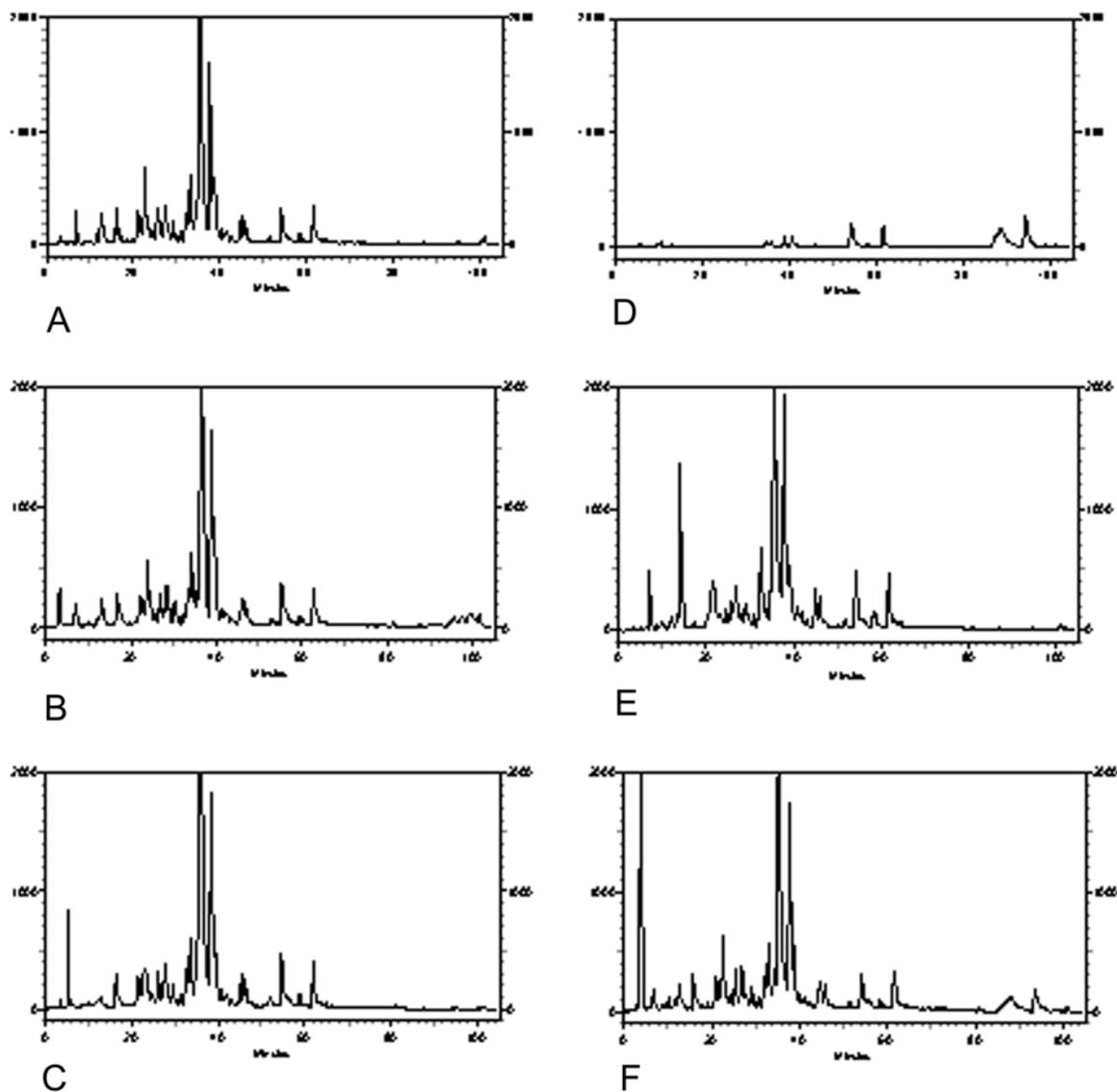
Foi observado que para a própolis do grupo 13, o acetato de etila e o clorofórmio mostraram-se ser o melhor solvente (Figura 8-C e 8-E), porque extraíram maior quantidade de flavonóides e outros compostos fenólicos.

O resultado apresentado foi similar aos resultados apresentados na espectrofotometria UV-VIS e CCDAE-FR.



**Figura 7** Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa dos extratos de própolis do grupo 12 obtidos com diferentes solventes.

A = Metanol, B = Etanol, C = Acetato de etila, D = Hexano, E = Clorofórmio, F = Acetona.



**Figura 8** CLAE-FR mostrando a diferença na extração de compostos fenólicos da própolis do grupo 13 através de diferentes diluentes.

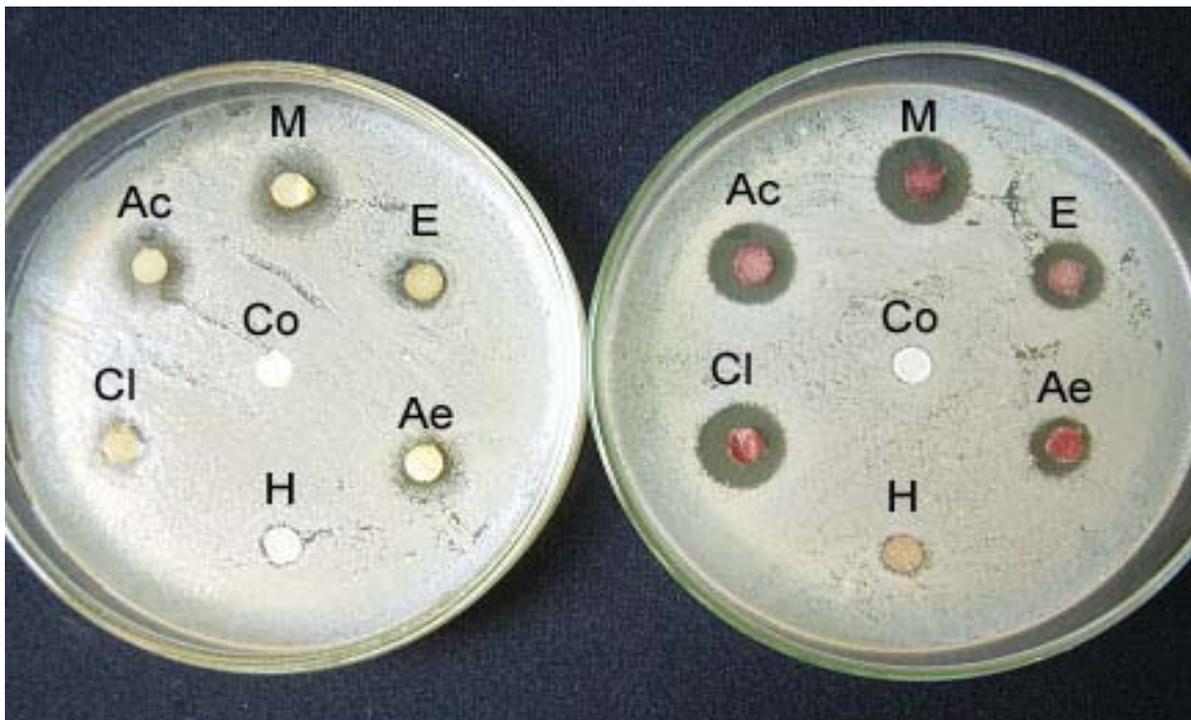
A = Metanol, B = Etanol, C = Acetato de etila, D = Hexano, E = Clorofórmio, F = Acetona.

### **5.5 Determinação da atividade antimicrobiana dos extratos de própolis obtidos com diferentes solventes**

A Figura 9 ilustra a atividade antimicrobiana dos extratos de própolis dos grupos 12 e 13 obtidos com os solventes metanol, etanol, acetato de etila, hexano, clorofórmio e acetona, utilizando-se *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 como microrganismo sensível.

Foi observado que os extratos de própolis do grupo 12 extraídos com metanol, acetato de etila e acetona apresentaram maior atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 do que os extratos obtidos com etanol, hexano e clorofórmio.

Os extratos de própolis do grupo 13 extraídos com metanol, clorofórmio e acetona apresentaram alta atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, sendo que os extratos de própolis obtidos com etanol, acetato de etila e hexano apresentou menor halo de inibição do crescimento de microrganismo.



**Figura 9** Antibiograma de própolis do grupo 12 (esquerda) e própolis do grupo 13 (direita) com *S. aureus*.

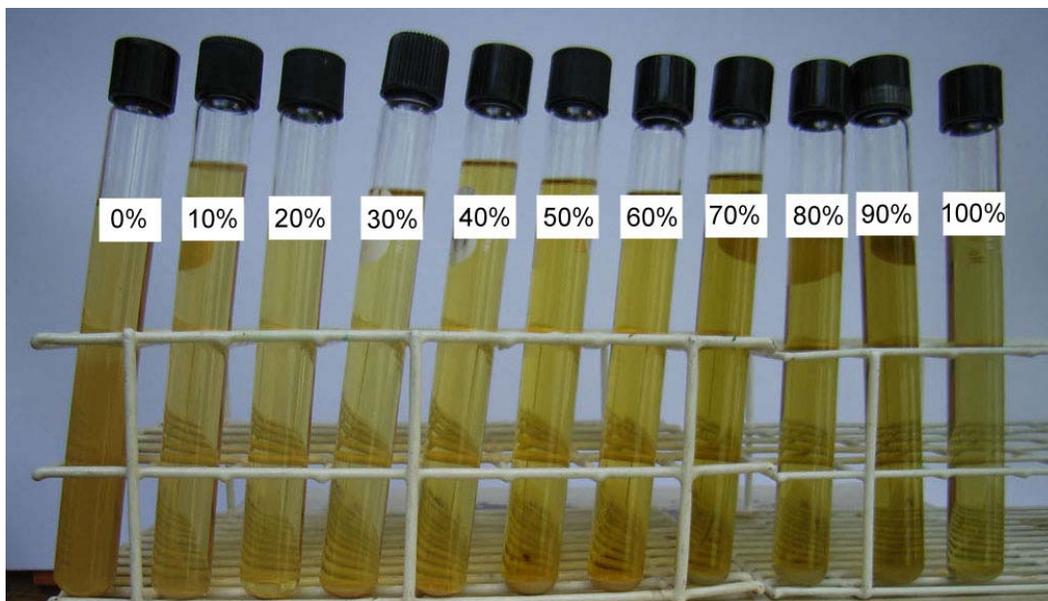
Co = controle, M = metanol, E = etanol, Ae = acetato de etila, H = hexano, Cl = clorofórmio e Ac = acetona.

Os extratos de própolis do grupo 13 obtidos com metanol, etanol, acetato de etila, clorofórmio e acetona apresentaram maior atividade contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 do que os extratos de própolis do grupo 12 obtidos com os mesmos solventes. Os extratos de própolis dos grupos 12 e 13 obtidos com hexano apresentaram baixa atividade de inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

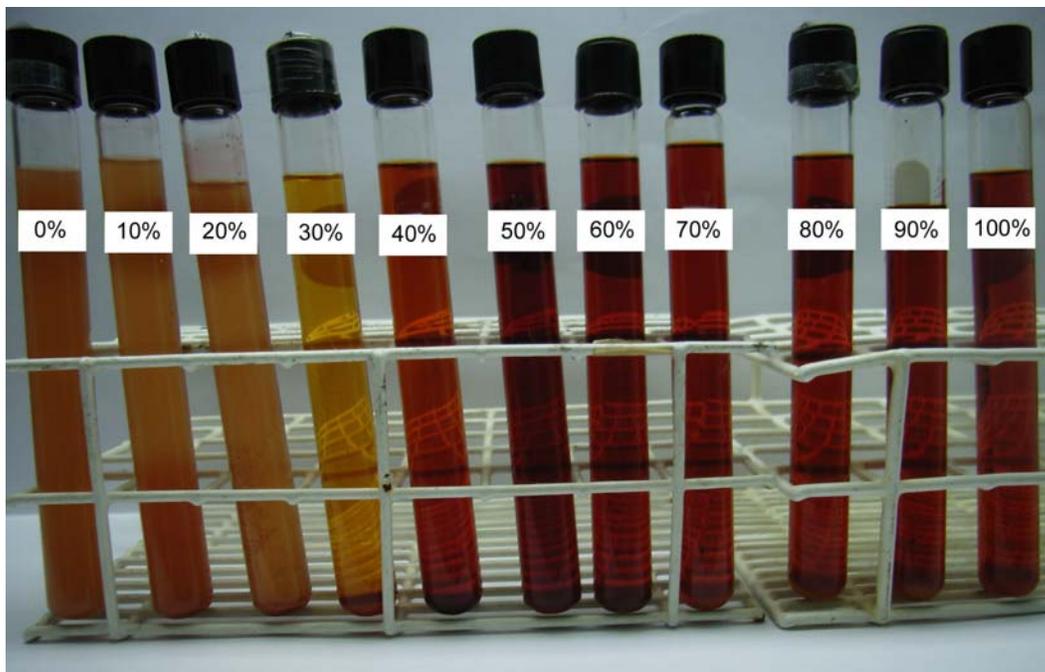
## **5.6 Extração de compostos fenólicos de própolis utilizando etanol em diferentes concentrações**

As Figuras 10 e 11 ilustram respectivamente a coloração dos extratos de própolis dos grupos 12 e 13 obtidos com água (0% de etanol) e diferentes concentrações de etanol (10% à 100% de etanol 96°GL).

Foi observado que tanto a própolis do grupo 12 quanto a do grupo 13 apresentaram coloração amarelada quando em concentrações de 0 à 40%, porém a própolis do grupo 12 adquiriu cores mais esverdeadas e a própolis do grupo 13 adquiriu cores mais avermelhadas nas concentrações de 50 à 100%.



**Figura 10** Coloração dos extratos etanólico da própolis do grupo 12 utilizando-se diferentes concentrações de etanol.

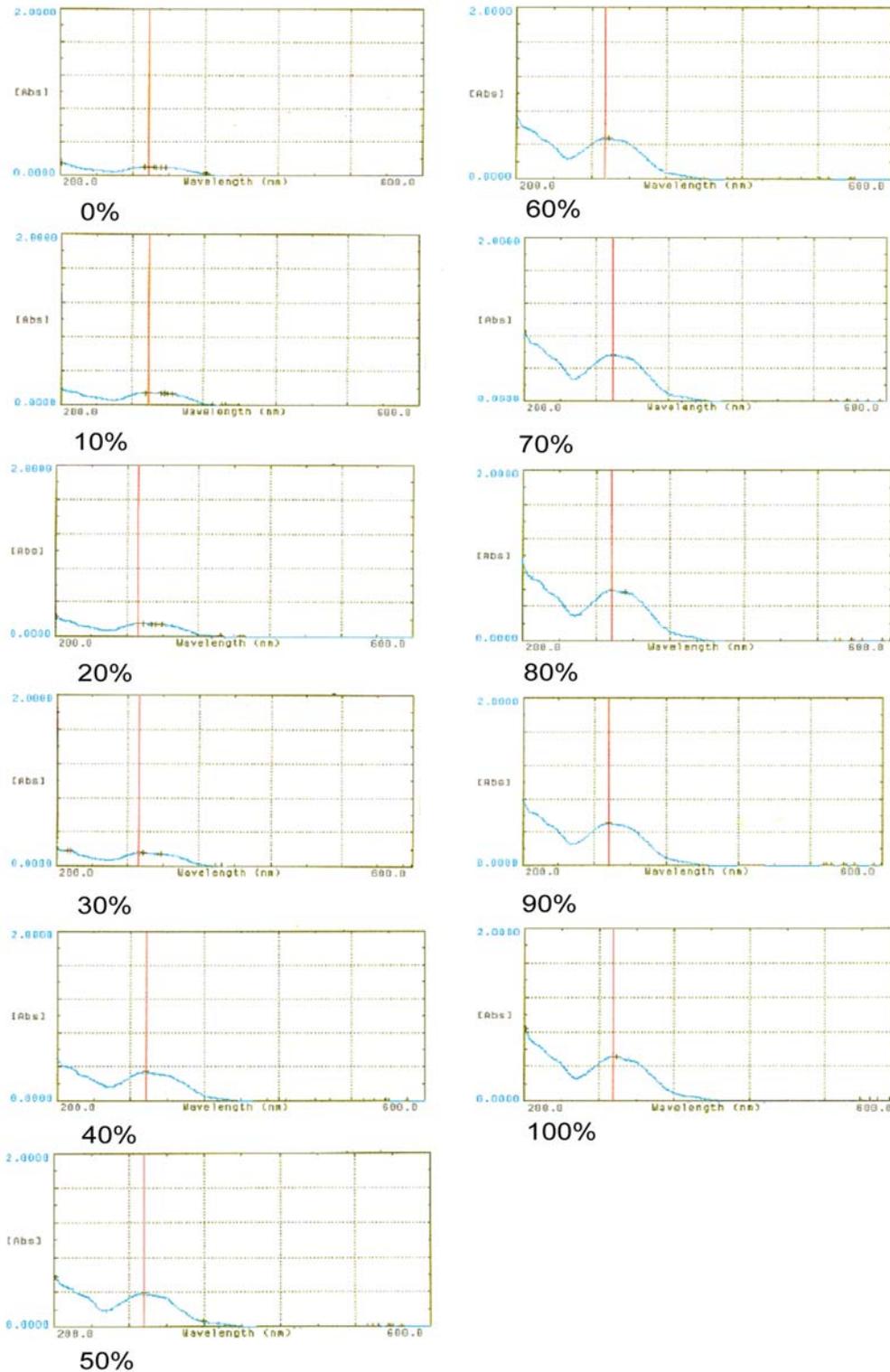


**Figura 11** Coloração dos extratos etanólico da própolis do grupo 13 utilizando-se diferentes concentrações de etanol.

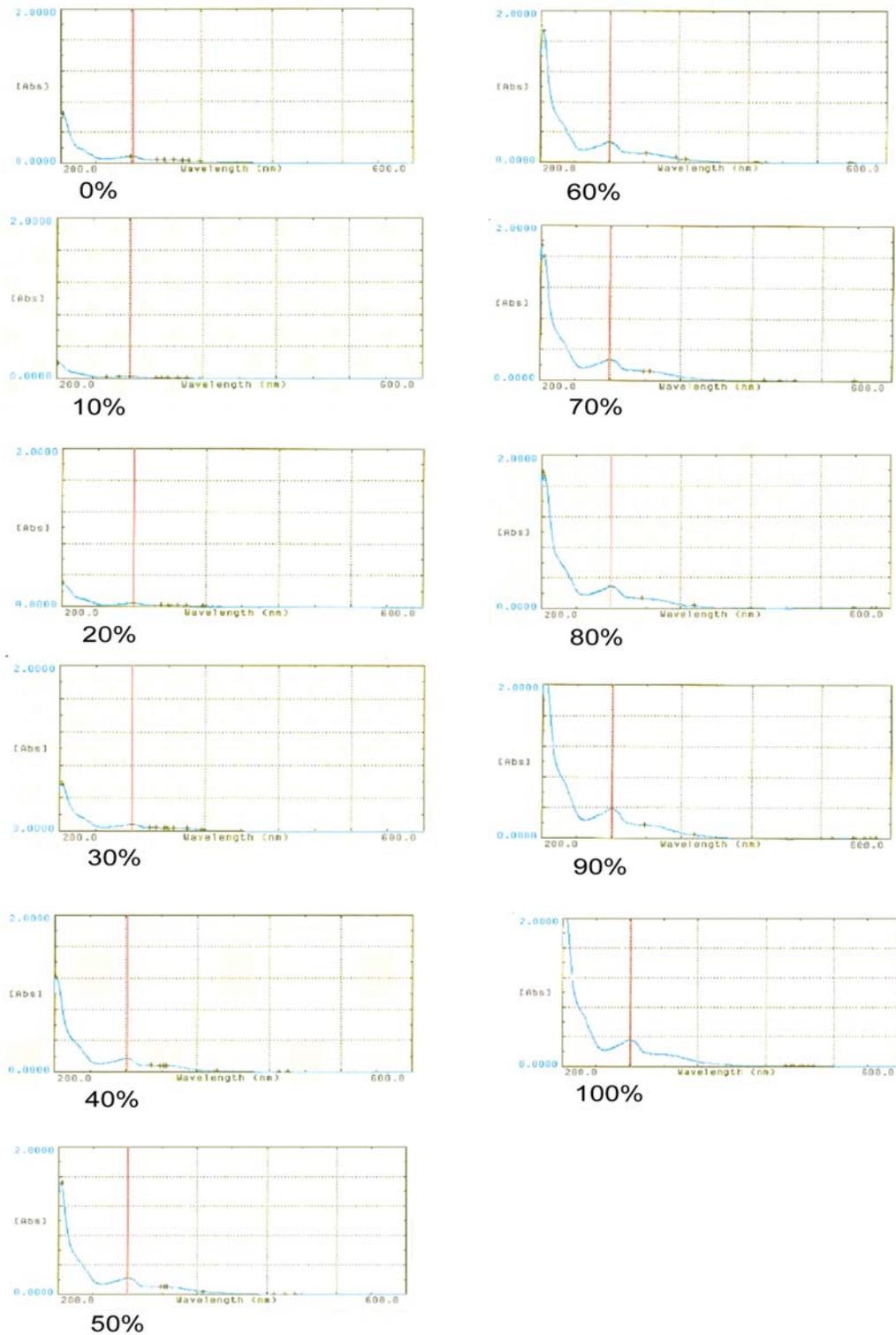
### ***5.7 Espectro de absorção na região ultravioleta visível dos extratos de própolis dos grupos 12 e 13 obtidos com água e diferentes concentrações de etanol***

Na Figura 12 e 13 foram verificados através de análises espectrofotométricas por espectro de absorção UV-VIS, que as amostras de extrato de própolis testadas apresentaram variações quanto a absorção de luz ultravioleta.

Verificou-se que tanto a própolis do grupo 12 quanto a do grupo 13 apresentaram maior absorção de luz ultravioleta quando em concentrações de 50 à 100% de etanol. A própolis do grupo 12 apresentou maior efetividade em concentrações entre 70 e 80% e a própolis do grupo 13 apresentou maior efetividade em concentrações entre 50 e 70%.



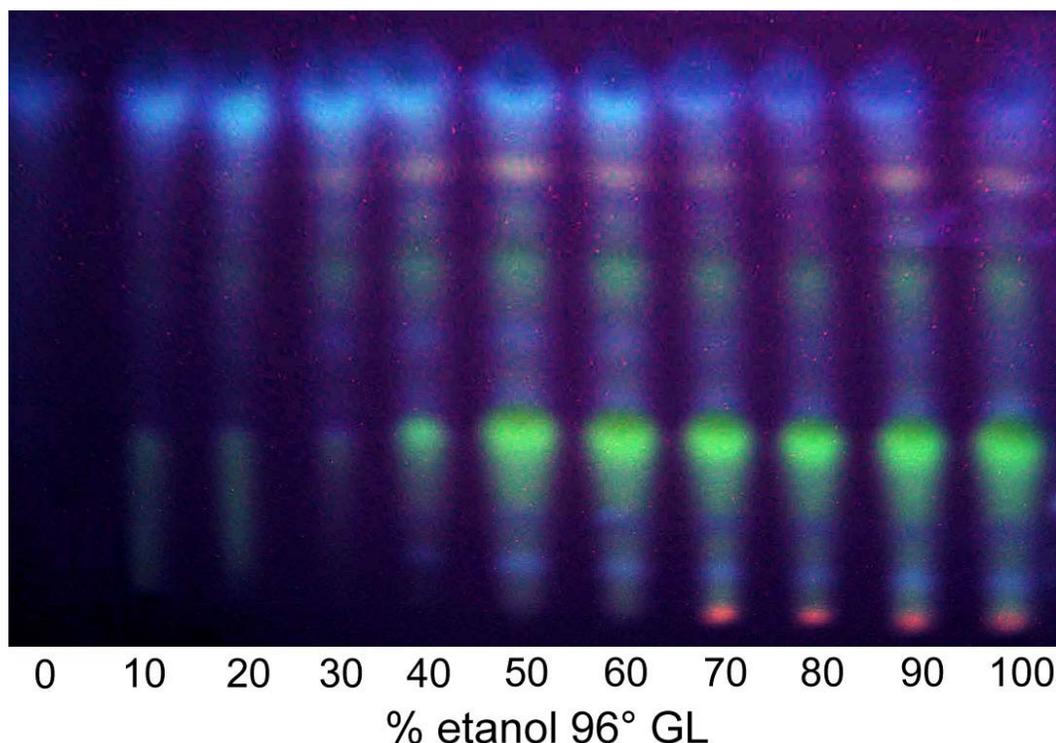
**Figura 12** Espectro de absorção na região UV-VIS, do extrato aquoso (0% de etanol) e extratos de própolis do grupo 12 obtidos com diferentes concentrações de etanol (10 à 100%).



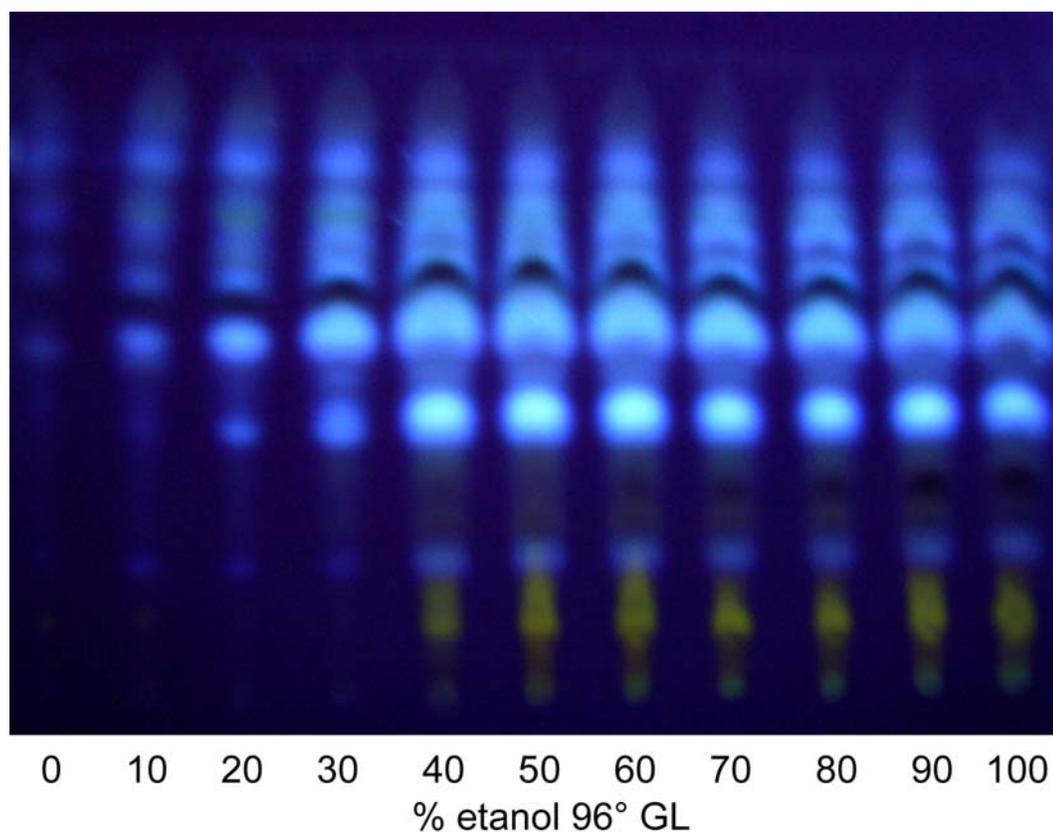
**Figura 13** Espectro de absorção na região UV-VIS, do extrato aquoso (0% de etanol) e extratos de própolis do grupo 13 obtidos com diferentes concentrações de etanol (10 à 100%).

### **5.8 Cromatografia em camada delgada de alta eficiência em fase reversa (CCDAE-FR) dos extratos aquosos e dos extratos de própolis obtidos com diferentes concentrações de etanol**

As Figuras 14 e 15 ilustram respectivamente o perfil de separação dos compostos dos extratos aquosos (0% de etanol) e extratos de própolis dos grupos 12 e 13, obtidos com diferentes concentrações de etanol (10% à 100% de etanol 96°GL), em placas de camada delgada RP18F<sub>254</sub>S. Foi observado que as amostras de própolis extraídas com etanol nas concentrações de 40 a 100% de etanol 96°GL apresentaram, nas placas de cromatografia, maior intensidade de absorção a luz UV indicando maior extração de compostos fenólicos.



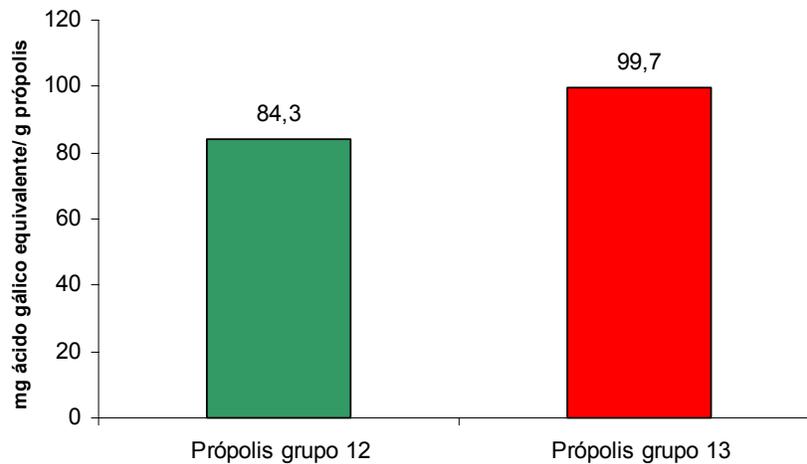
**Figura 14** Cromatografia de camada delgada dos extratos etanólicos da própolis do grupo 12 extraídos com água (0% de etanol) e diferentes concentrações de etanol (0 à 100%) .



**Figura 15** Cromatografia de camada delgada dos extratos etanólicos da própolis do grupo 13 extraídos com água (0% de etanol) e diferentes concentrações de etanol (0 à 100%) .

### **5.9 Determinação de fenólicos totais das própolis do grupo 12 e grupo 13**

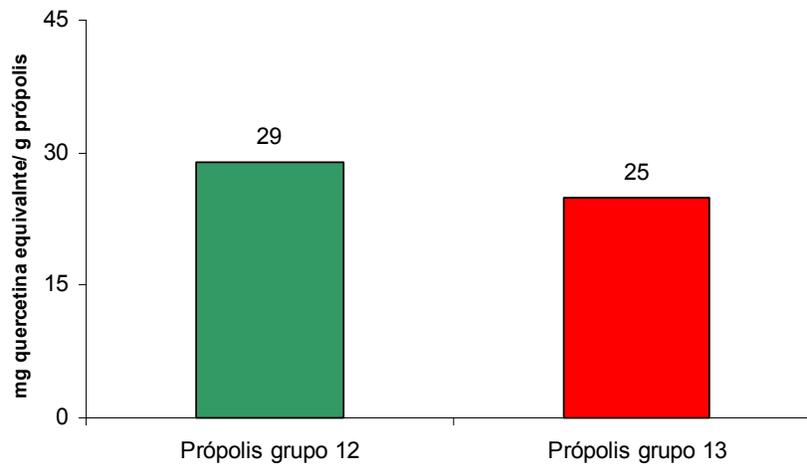
A Figura 16 ilustra o teor de compostos fenólicos totais de amostras de própolis do grupo 12 e grupo 13, onde foi mostrado que ambas contém grande quantidade de compostos fenólicos, porém a própolis do grupo 13 (99,7 mg de ácido gálico equivalente/g própolis) apresentou maior quantidade em relação a própolis do grupo 12 (84,3 mg de ácido gálico equivalente/g própolis).



**Figura 16** Fenólicos totais em mg ácido gálico equivalente / g própolis das própolis do grupo 12 e grupo 13.

### ***5.10 Determinação de flavonóides totais das própolis do grupo 12 e grupo 13***

A Figura 17 ilustra os teores de flavonóides totais estimados por reação com  $AlCl_3$ , usando padrão quercetina, das própolis dos grupos 12 e grupo 13. As amostras de própolis do grupo 12 (29 mg de quercetina equivalente/g própolis) e grupo 13 (25 mg de quercetina equivalente/g própolis) apresentaram quantidades muito similares de flavonóides.

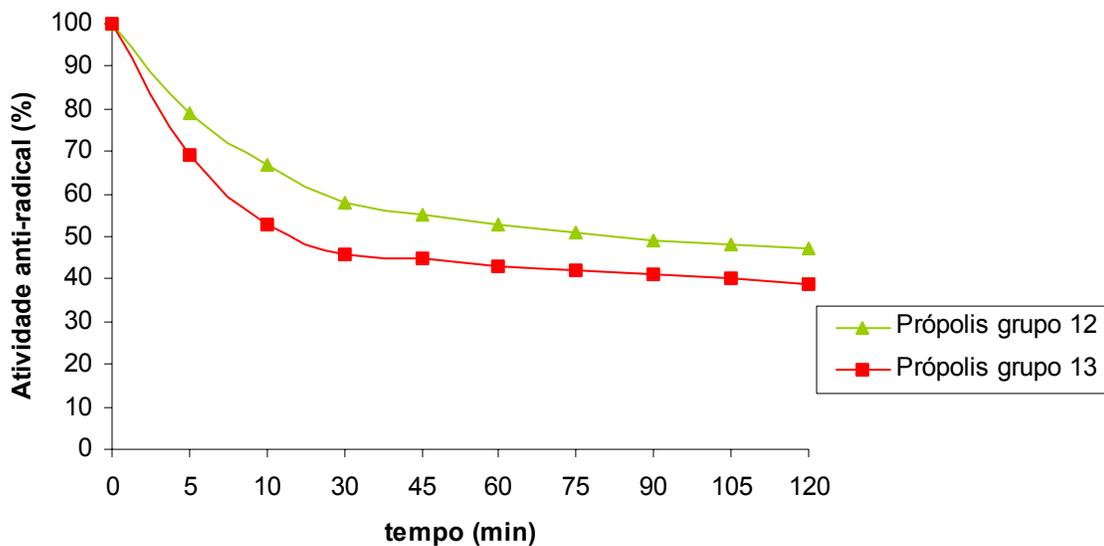


**Figura 17** Flavonóides totais ( $\text{AlCl}_3$ ) em mg quercetina equivalente / g das própolis do grupo 12 e grupo 13.

### **5.11 Determinação da atividade anti-radical (DPPH) das própolis do grupo 12 e grupo 13**

A Figura 18 e Tabela 1 ilustram a atividade anti-radical das amostras de própolis do grupo 12 e grupo 13.

Foi observado que a própolis do grupo 13 apresentou maior atividade anti-radical (39%) que a própolis do grupo 12 (47%) depois de 2 h de incubação.



**Figura 18** Atividade anti-radical das própolis dos grupos 12 e grupo 13.

**Tabela 1** Atividade anti-radical das própolis dos grupos 12 e grupo 13.

Tempo (min)	Própolis grupo 12	Própolis grupo 13
	Anti-radical %	Anti-radical %
0	100	100
5	79	69
10	67	53
30	58	46
45	55	45
60	53	43
75	51	42
90	49	41
105	48	40
120	47	39

### **5.12 Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) das própolis dos grupos 12 e 13 para diferentes microrganismos**

A Tabela 2 ilustra a concentração mínima inibitória (MIC) das própolis dos grupos 12 e 13 para diferentes microrganismos. Foi observado que a própolis do grupo 12 inibiu com maior intensidade os microrganismos *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Clostridium perfringens* ATCC 13124, sendo obtido os valores de

MIC de 15 µg/mL e 30 µg/mL de própolis respectivamente. Entre os microrganismos testados as linhagens *Streptococcus mutans* ATCC 25175 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 foram menos inibidos pela própolis do grupo 12 apresentando respectivamente MIC igual a 400 µg/mL e 300 µg/mL respectivamente.

A própolis do grupo 13 inibiu com maior intensidade as linhagens *Clostridium perfringens* ATCC 13124, *Streptococcus mutans* ATCC 25175 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 sendo obtido os valores de 7 µg/mL, 10 µg/mL e 31 µg/mL respectivamente. A *Escherichia coli* hemolítica isolada de suíno foi a linhagem menos inibida pela própolis do grupo 13, sendo obtido MIC 1000µg/mL.

A Tabela 3 ilustra a inibição dos microrganismos *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli* usando própolis dos grupos 12 e 13 em comparação com diversos antibióticos comerciais.

**Tabela 2** Concentração mínima inibitória (MIC) em µg/mL de própolis do grupo 12 e grupo 13 contra vários microrganismos patogênicos .

Microrganismos	Própolis do grupo 12 MIC (µg/mL)	Própolis do grupo 13 MIC (µg/mL)
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	400	10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	300	31
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	15	125
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124	30	7
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	250	200
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	125	1000

**Tabela 3** Concentração mínima inibitória (µg/mL) de própolis dos grupos 12 e 13 em comparação com antibióticos comerciais para diferentes bactérias.

Microrganismo	Própolis G12	Própolis G13	Avilamicina	Halquinol	Lincomicina	Tilosina	Virginamicina	Tiamulina	Sulfato de Colistina
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	300	31	62	31	500	250	125	62	1
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	15	125	2	8	1	1	16	1	31
<i>C. perfringens</i> ATCC 13124	30	7	4	16	1	16	31	31	31
<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	250	200	125	2	400	500	400	100	2
<i>E. coli</i> ATCC 25922	125	1000	62	8	600	16	62	31	2

Obs: Não houve inibição do crescimento bacteriano pela solução de etanol 80%.

Todas as amostras de própolis e antibióticos analisados inibiram os microrganismos na faixa de concentração estudada, sendo que a maior MIC observada em própolis do grupo 12 foi para *P. aeruginosa* (300 µg/mL), e a menor MIC com o mesmo material para *S. aureus* (15 µg/mL), a maior MIC observada em própolis do grupo 13 foi para *E. coli* isolada de suíno (1000 µg/mL), e a menor MIC com o mesmo material para *C. perfringens* (7 µg/mL).

As amostras de própolis em baixas concentrações foram capazes de inibir as bactérias, principalmente o *C. perfringens*.

Em alguns casos, a própolis apresentou melhor inibição do que alguns dos antibióticos analisados, como pode ser observado para Lincomicina, Tilosina e Virginamicina utilizando-se o microrganismo *S. typhimurium*.

Dentre os antibióticos investigados, o sulfato de colistina foi o que apresentou melhor atividade antimicrobiana, principalmente para *P. aeruginosa*, *S. typhimurium* e *E. coli*.

## 6 Conclusões

Constatou-se que a própolis do grupo 12 e 13 contém grande quantidade de compostos fenólicos (84,3 mg de ácido gálico equivalente/ g própolis e 99,7 mg de ácido gálico equivalente/ g própolis respectivamente), entre eles os flavonóides (29 mg de quercetina equivalente/ g própolis e 25 mg de quercetina equivalente/ g própolis respectivamente), que possuem atividades antimicrobianas e anti-radical.

Concluiu-se que apesar das própolis possuírem grande quantidade de compostos fenólicos, a extração depende intensamente do solvente utilizado. Destacou-se na própolis do grupo 12 a acetona, que apresentou extração de maior quantidade de compostos fenólicos em relação aos outros solventes utilizados e o hexano que quando utilizado como solvente extraiu quase exclusivamente artepillin C, que é um dos compostos da própolis mais utilizados como anti-tumoral. Na própolis do grupo 13 destacou-se o acetato de etila e o clorofórmio, que extraíram maiores quantidades de compostos fenólicos. Constatou-se que o solvente utilizado para a extração da própolis é determinante para a quantidade de compostos fenólicos extraídos.

Mostrou-se que extrações de própolis do grupo 12 e grupo 13 foram altas em concentrações etanólicas de 50 à 100%.

Concluiu-se que as própolis do grupo 12 e grupo 13 possuem similaridade na quantidade de flavonóides, porém observou-se que a própolis do grupo 13 possui maior quantidade de compostos fenólicos e atividade anti-radical. Verificou-se que as própolis dos grupos 12 e 13 têm atividade antimicrobiana diferente porque inibem alguns microrganismos em diferente intensidade.

## 7 Referências bibliográficas

ACCIAI, M.C., GINANNESCHI, M., BRACCI, S. e SERTOLI, A. Studies of the sensitizing properties of propolis. **Contact dermatitis**, v. 23, p. 274-275, 1990.

ALENCAR, S.M., 2002. Estudo fitoquímico da origem botânica da própolis e avaliação da composição química de mel de *Apis mellifera* africanizada de diferentes regiões do Brasil, *Faculdade de Engenharia de Alimentos*, pp. 120p., Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas - SP, Brasil.

ALMEIDA, E.C. e MENEZES, H. Anti-inflammatory activity of propolis extracts: a review. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 8, n. 2, p. 191-212, 2002.

AMOROS, M., LURTON, E., BOUSTIE, J., GIRRE, L., SAUVAGER, F. e CORMIER, M. Comparison of the anti-herpes simplex virus activities of propolis and 3-methylbut-2-enyl caffeate. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 235-240, 1994.

AMOROS, M., SAUVAGER, F., GIRRE, L. e CORMIER, M. *In vitro* antiviral activity of propolis. **Apidologie**, v. 23, p. 231-240, 1992.

AMOROS, M., SIMÕES, C.M.O., GIRRE, L., SAUVAGER, F. e CORMIER, M. Synergistic effect of flavonoids against herpes simplex virus type 1 in cell culture comparison with the antiviral activity of propolis. **Journal of Natural Products**, v. 55, p. 1732-1740, 1992.

ANDERSON, P., PALMBAHA, S. e KIVALINA, V.P. Effect of an aqueous-alcohol emulsion and oil extract of bee glue on the growth of chicks. **Latv. Lauksaimn. Akad. Raksti**, v. 25, p. 142-146, 1970.

ARIPOV, K.L.A., KAMILOV, I.K. e ALIEV, K.U. Effect of propolis on experimental stomach ulcers in rats. **Meditinskii zhurnal Uzbekistana**, v. 5, p. 50-52, 1968.

ARVOUET-GRAND, A., LEJEUNE, B., BASTIDE, P., POURRAT, A. e LEGRET, P. Propolis extract. Part 6. Subacute toxicity and cutaneous primary irritation index. **Journal de Pharmacie de Belgique**, v. 48, p. 165-170, 1993.

ASSUNÇÃO, R.M.V., KOOP, S.M. e GOTTLIEB, O.R. Chemistry of Brazilian Leguminosae. XIX Sakuranetin, antifungal constituent of *Poecilanthe parviflora*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 40, p. 297-298, 1968.

AYALA, F., LEMBO, G., NAPPA, P. e BALATO, N. Contact dermatitis from propolis. **Contact dermatitis**, v. 12, p. 181-182, 1985.

BANKOVA, V. Recent trends and important developments in propolis research. **Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM**, v. 2, n. 1, p. 29-32, 2005.

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

BANKOVA, V., CHRISTOV, R., MARCUCCI, M.C. e POPOV, S. Constituents of Brazilian geopropolis. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 53c, p. 402-406, 1998.

BANKOVA, V., CHRISTOV, R., POPOV, S., PUREB, O. e BOCARI, G. Volatile constituents of propolis. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 49c, p. 6-10, 1994.

BANKOVA, V., MARCUCCI, M.C., SIMOVA, S., NIKOLOVA, N., KUJUMGIEV, A. e POPOV, S. Antibacterial diterpenic acids from Brazilian propolis. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 51c, p. 277-280, 1996.

BANKOVA, V., POPOV, S. e MAREKOV, N.L. A study on flavonoids of propolis. **Journal of Natural Products**, v. 46, p. 471-474, 1983.

BANSKOTA, A.H., NAGAOKA, T., SUMIOKA, L.Y., TEZUKA, Y., AWALE, S., MIDORIKAWA, K., MATSUSHIGE, K. e KADOTA, S. Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. **Journal of ethnopharmacology**, v. 80, n. 1, p. 67-73, 2002.

BANSKOTA, A.H., TEZUKA, Y., ADNYANA, I.K. e AL., E. Hepatoprotective and anti-*Helicobacter pylori* activities of constituents from Brazilian propolis.

**Phytomedicine** : international journal of phytotherapy and phytopharmacology, v. 8, p. 16-23, 2001.

BANSKOTA, A.H., TEZUKA, Y. e KADOTA, S. Recent process in pharmacological research of propolis. **Phytotherapy research : PTR**, v. 15, n. 7, p. 561-571, 2001.

BARNES, P.J. Mechanisms of action of glucocorticoids in asthma. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 154, p. S21-27, 1996.

BARNES, P.J. Molecular mechanism of antiasthma therapy. **Annals of medicine**, v. 27, p. 531-535, 1995.

BASNET, P., MATSUNO, T. e NEIDLEIN, R. Potent free radical scavenging activity of propol isolated from Brazilian propolis. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 52c, p. 828-833, 1997.

BASNET, P., MATSUSHIGE, K., HASE, K., KADOTA, S. e NAMBA, T. Four di-O-caffeoyl quinic acid derivatives from propolis. Potent Hepatoprotective Activity in experimental liver injury models. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 19, n. 11, p. 1479-1484, 1996.

BAUMANN, J., BRUCHHAUSEN, F.V. e WURM, G. Flavonoids and related compounds as inhibitors of arachidonic acid peroxidation. **Prostaglandins**, v. 20, p. 627-639, 1980.

BELLI, W.A. e MARQUIS, R.E. Adaptation of *Streptococcus mutans* and *Enterococcus hirae* to acid stress in continuous culture. **Applied and environmental microbiology**, v. 57, n. 4, p. 1134-1138, 1991.

BERNGARD, K.E. Preparation of aqueous propolis solutions for treating fish and determination of its concentration in solutions. **Ryb. Khoz. (Moscow)**, v. 12, p. 66-67, 1976.

BIANCHINI, L. e BEDENDO, I.P. Efeito antibiótico do Própolis sobre bactérias fitopatogênicas. **Scientia agricola (Piracicaba, Braz.)**, v. 55, n. 1, p. 1-6, 1998.

BISBY, R.H. Interaction of vitamin E with free radicals and membranes. **Free radical research communications**, v. 8, p. 266-306, 1990.

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

BOWEN, W.H. Do we need to be concerned about dental caries in the coming millenium? **Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists**, v. 13, n. 2, p. 126-131, 2002.

BOWEN, W.H. Fluorosis: is it really a problem? **Journal of the American Dental Association (1939)**, v. 133, n. 10, p. 1405-1407, 2002.

BRETZ, W.A., CHIEGO, D.J.J., MARCUCCI, M.C., CUNHA, I.B.S., CUSTODIO, A.R. e SCHNEIDER, L.G. Preliminary report on the effects of propolis on wound healing in the dental pulp. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 53c, n. 11-12, p. 1045-1048, 1998.

BUDARKOVA, E.L. Cellular and humoral reactions to tetanus toxoid plus propolis. **Uchenye Zapiski Kazanskovo Veterinarnogo Instituta**, v. 117, p. 148-151, 1976.

BURDA, S. e OLESZEK, W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 2774-2779, 2001.

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

CASTALDO, S. e CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, v. 73, n. suppl. 1, p. S1-S6, 2002.

CELLI, N., MARIANI, B., DRAGANI, L.K., MURZILLI, S., ROSSI, C. e ROTILIO, D. Development and validation of a liquid chromatographic–tandem mass

spectrometric method for the determination of caffeic acid phenethyl ester in rat plasma and urine. **Journal of Chromatography B**, v. 810, n. 1, p. 129-136, 2004.

CHANG, C.-C., YANG, M.-H., WEN, H.-M. e CHERN, J.-C. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 10, n. 3, p. 178-182, 2002.

CHEE, H.Y. *In vitro* evaluation of the antifungal activity of propolis extract on *Cryptococcus Neoformans* and *Candida albicans*. **Mycobiology**, v. 30, p. 93-95, 2002.

CHEN, C.N., WU, C.-L. e LIN, J.-K. Propolin C from propolis induces apoptosis through activating caspases, Bid and cytochrome C release in human melanoma cells. **Biochemical pharmacology**, v. 67, p. 53-66, 2004.

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

CHEN, Y.-J., SHIAO, M.-S., HSU, M.-L., TSAI, T.-H. e WANG, S.-Y. Effect of caffeic acid phenethyl ester, an antioxidant from propolis, on inducing apoptosis in human Leukemic HL-60 Cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5615-5619, 2001.

CHI, J., XUE, B. e CHEN, H. The chemical constituents of flavonoids from Liaoxi propolis. **Zhongguo yao xue za zhi (Zhongguo yao xue hui : 1989)**, v. 31, p. 264-266, 1996.

CHOI, Y.M., NOH, D.O., CHO, S.Y., SUH, H.J., KIM, K.M. e KIM, J.M. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. **Food science and technology research**, v. 39, n. 7, p. 756-761, 2006.

CIACERI, G. e ATTAGUILE, G. Influenza della luteolina, dell'apigenina e dell'acacetina sull'ulcera gastrica sperimentale. **Minerva Medica (Italy)**, v. 63, n. 29, p. 1665-1668, 1972.

CIZMARIK, J. e TRUPL, J. Propolis-Wirkung auf Hefepilze. **Die Pharmazie**, v. 30, n. 6, p. 406-407, 1975.

COLEMAN, R.A., SMITH, W.L. e NARUMIYA, S. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. **Pharmacological reviews**, v. 46, p. 205-229, 1994.

COS, P., MAES, L., VANDEN BERGHE, D., HERMANS, N., PIETERS, L. e VLIETINCK, A. Plant substances as anti-HIV agents selected according to their putative mechanism of action. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 2, p. 284-293, 2004.

CZERMAK, B.J., FRIEDL, H.P. e WARD, P.A. Complement, cytokines, and adhesion molecule expression in inflammatory reactions. **Proceedings of the Association of American Physicians**, v. 110, p. 306-312, 1998.

DASTIDAR, S.G., MANNA, A., KUMAR, K.A., MAZUMDAR, K., DUTTA, N.K., CHAKRABARTY, A.N., MOTOHASHI, N. e SHIRATAKI, Y. Studies on the antibacterial potenciality of isoflavones. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 23, p. 99-102, 2004.

DAUGSCH, A., MORAES, C.S., FORT, P., PACHECO, E., LIMA, I.B., ABREU, J.A. e PARK, Y.K. Própolis vermelha e sua origem botânica. **Mensagem Doce**, v. 89, p. 2-15, 2006.

DE CAMPOS, R.O., PAULINO, N., DA SILVA, C.H., SCREMIN, A. e CALIXTO, J.B. Anti-hyperalgesic effect of an ethanolic extract of propolis in mice and rats. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 50, p. 1187-1193, 1998.

DE CASTRO, S.L. e HIGASHI, K.O. Effect of different formulations of propolis on mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 46, p. 55-58, 1995.

DEBIAGGI, M., TATEO, F., PAGANI, L., LUINI, M. e ROMERO, E. Effects of propolis flavonoids on virus infectivity and replication. **Microbiologica**, v. 13, p. 207-213, 1990.

DELMAESTRO, R.F. An approach to free radicals in medicine and biology. **Acta physiologica Scandinavica**, v. 492, p. 153-168, 1980.

DEVITA, V.T.J., HELLMAN, S. e ROSENBERG, S.A., 1997. *Cancer- Principles and Practice of Oncology. 6th ed.*, Lippincott-Raven.

DOBROWOLSKI, J.W., VOHORA, S.B., SHARMA, K., SHAH, S.A., NAQVI, S.A.H. e DANDIYA, P.C. Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. **Journal of ethnopharmacology**, v. 35, p. 77-82, 1991.

DORMANDY, T.L. Free radicals pathology and medicine: a review. **Journal of the Royal College of Physicians of London**, v. 23, p. 221-227, 1989.

DUARTE, S., KOO, H., BOWEN, W.H., HAYACIBARA, M.F., CURY, J.A., IKEGAKI, M. e ROSALEN, P.L. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of *mutans Streptococci*. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 26, n. 4, p. 527-531, 2003.

EL-GHAZALY, M.A. e KHAYYAL, M.T. The use of aqueous propolis extract against radiation-induced damage. **Drugs under experimental and clinical research**, v. 21, n. 6, p. 229-236, 1995.

EL-KHATIB, A.S., AGHA, A.M., MAHRAN, L.G. e KHAYYAL, M.T. Prophylactic effect of aqueous propolis extract against acute experimental hepatotoxicity *in vivo*. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 57c, n. 3-4, p. 379-385, 2002.

ESSER, B. Allergy due to propolis. **Aktuelle Dermatologie**, v. 12, p. 203-205, 1986.

FIALA, M., LIU, Q.N., SAYRE, J., POP, V., BRAHMANDAM, V., GRAVES, M.C. e VINTERS, H.V. Cyclooxygenase-2-positive macrophages infiltrate the Alzheimer's disease brain and damage the blood-brain barrier. **European journal of clinical investigation**, v. 32, n. 5, p. 360-371, 2002.

FITZPATRICK, L.R., WANG, J. e LE, T. Caffeic acid phenethyl ester, an inhibitor of nuclear factor-B, attenuates bacterial peptidoglycan polysaccharide-induced colitis in rats. **Journal of pharmacology and experimental therapy**, v. 299, n. 3, p. 915-920, 2001.

FREEMAN, B.A. e CRAPA, J.D. Biology of disease: free radicals and tissue injury. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 47, p. 412-426, 1982.

FUKUDA, I., NISHIUMI, S., YABUSHITA, Y., MUKAI, R., KODOI, R., HASHIZUME, K., HATANAKA, Y. e ASHIDA, H. A new southwestern chemistry-based ELISA for detection of aryl hydrocarbon receptor transformation: application to the screening of its receptor agonists and antagonists. **Journal Immunological Methods**, v. 287, p. 184-201, 2004.

FULIANG, H.U., HEPBURN, H.R., HONGZHUAN, X., MINLI, C., DAYA, S. e RADLOFF, S.E. Effects of propolis on blood glucose, blood lipid and free radicals in rats with diabetes mellitus. **Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society**, v. 51, p. 47-152, 2005.

GALLIN, J.I., 1989. Inflammation. *In*: W.E. PAUL (ed.), *Fundamental immunology* 2. ed., pp. 721-733, Raven Press, New York.

GARCIA-VIGUEIRA, C., FERRERES, F. e TOMAS-BARBERAN, F.A. Study of Canadian Propolis by GC-MS and HPLC. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 46c, p. 731-735, 1993.

GAREDEW, A., SCHMOLZ, E., SCHRICKER, B. e LAMPRECHT, I. Microcalorimetric toxicity investigation of propolis on *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae). **Thermochimica acta**, v. 394, n. 1-2, p. 239-245, 2002.

GARRIDO FERNANDEZ, S., ARROABARREN ALEMAN, E., GARCIA FIGUEROA, B.E., GOIENETXE FAGOAGA, E., OLAGUIBEL RIVERA, J.M. e TABAR PURROY, A.I. Direct and airborne contact dermatitis from propolis in beekeepers. **Contact dermatitis**, v. 50, n. 5, p. 320-321, 2004.

GEKKER, G., HU, S., SPIVAK, M., LOKENSGARD, J.R. e PETERSON, P.K. Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4(+) lymphocyte and microglial cell cultures. **Journal of pharmacological sciences**, v. 102, p. 158-163, 2005.

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

GHISALBERTI, E.L., JEFFERIES, P.R., LANTERI, R. e MATISONS, J. Constituents of propolis. **Experientia**, v. 34, p. 157-158, 1978.

GONZALES, R., CORCHO, I., REMIREZ, D., RODRIGUEZ, S., ANCHETA, O., MERINO, N., GONZALES, A. e PASCUAL, C. Hepatoprotective effects of propolis extract on carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. **Phytotherapy research : PTR**, v. 9, p. 114-117, 1995.

GONZALEZ, R., REMIREZ, D., RODRIGUEZ, S., GONZALES, A., ANCHETA, O., MERINO, N. e PASCUAL, C. Hepatoprotective effects of propolis extract on paracetamol-induced liver damage in mice. **Phytotherapy research : PTR**, v. 8, p. 229-232, 1994.

GOODWIN, J.S., 1994. Anti-inflammatory drugs. *In*: D.P. STITES, A.I. TERR eT.G. PARSLOW (eds.), *Basic and clinical immunology*. 8ed., pp. 786-794, Appleton & Lange, Stanford.

GORBATENKO, A.G. Treatment of ulcer patients with a 30% alcohol solution of propolis. **Vrachebnoe delo**, v. 3, p. 22-24, 1971.

GRANGE, J.M. e DAVEY, R.W. Antibacterial properties of propolis (bee glue). **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 83, p. 159-160, 1990.

GREENAWAY, W., MAY, J., SCAYSBROOK, T. e WHATLEY, F.R. Identification by gas chromatography-mass spectrometry of 150 compounds in propolis. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 46c, p. 111-121, 1991.

GREENAWAY, W., SCAYSBROOK, T. e WHATLEY, F.R. The analysis of bud exudate of *Populus x euramericana*, and of propolis, by gas chromatography-mass spectrometry. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing papers of a Biological character. Royal Society (Great Britain)**, v. 232, p. 249-272, 1987.

GULBAHAR, O., OZTURK, G., ERDEM, N., KAZANDI, A.C. e KOKULUDAG, A. Psoriasiform contact dermatitis due to propolis in a beekeeper. **Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology**, v. 94, n. 4, p. 509-511, 2005.

GUNDUZ, C., BIRAY, C., KOSOVA, B., YILMAZ, B., EROGLU, Z., SAHIN, F., OMAI, S.B. e COGULU, O. Evaluation of Manisa propolis effect on leukemia cell line by telomerase activity. **Leukemia research**, v. 29, n. 11, p. 1343-1346, 2005.

HAN, S., SUNG, K.H., YIM, D., LEE, S., CHO, K., LEE, C.K., HA, N.J. e KIM, K. Activation of murine macrophage cell line RAW 264.7 by Korean propolis. **Archives of pharmacal research**, v. 25, n. 6, p. 895-902, 2002.

HAN, S.K. e PARK, H.K. A study on the preservation of meat products by natural propolis: effect of EEP on protein change of meat products. **Korean Journal of Animal Science**, v. 37, p. 551-557, 1995.

HASAN, T., RANTANEN, T., ALANKO, K., HARVIMA, R.J., JOLANKI, R., KALIMO, K., LAHTI, A., LAMMINTAUSTA, K., LAUERMA, A.I., LAUKKANEN, A., LUUKKAALA, T., RIEKKI, R., TURJANMAA, K., VARJONEN, E. e VUORELA, A.M. Patch test reactions to cosmetic allergens in 1995-1997 and 2000-2002 in Finland--a multicentre study. **Contact dermatitis**, v. 53, n. 1, p. 40-45, 2005.

HASHIMOTO, T., AGA, H., TABUCHI, A. e AL., E. Anti-*Helicobacter pylori* compounds in Brazilian propolis. **Nature medicine**, v. 52, p. 518-520, 1998.

HATA, A.N. e BREYER, R.M. Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. **Pharmacology & therapeutics**, v. 103, p. 147-166, 2004.

HAUSEN, B.M., EVERS, P., STUWE, H.T., KÖNIG, W.A. e WOLLENWEBER, E. Propolis allergy (IV). Studies with further sensitizers from propolis and constituents common to propolis, poplar buds and balsam of Peru. **Contact dermatitis**, v. 26, n. 1, p. 34-44, 1992.

HAUSEN, B.M., WOLLENWEBER, E., H., S. e B., P. Propolis allergy I. Origin properties usage and literature review. **Contact dermatitis**, v. 17, p. 163-170, 1987.

HAUSEN, B.M., WOLLENWEBER, E., SENFF, H. e POST, B. Propolis allergy II. The sensitizing properties of 1,1-dimethylallyl caffeic acid ester. **Contact dermatitis**, v. 17, p. 163-170, 1987.

HAVSTEEN, B., H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & therapeutics**, v. 96, p. 67-202, 2002.

HAYACIBARA, M.F., KOO, H., ROSALEN, P.L., DUARTE, S., FRANCO, E.M., BOWEN, W.H., IKEGAKI, M. e CURY, J.A. *In vitro* and *in vivo* effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. **Journal of ethnopharmacology**, v. 101, n. 1-3, p. 110-115, 2005.

HAYASHI, K., KOMURA, S., ISAJI, N., OHISHI, N. e YAGI, K. Isolation of antioxidative compounds from Brazilian propolis: 3,4-dihydroxy-5-prenylcinnamic acid, a novel potent antioxidant. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 47, p. 1521-1524, 1999.

HOSNUTER, M., GÜREL, A., BABUCÇU, O., ARMUTCU, F., KARGI, E. e IIKDEMIR, A. The effect of CAPE on lipid peroxidation and nitric oxide levels in the plasma of rats following thermal injury. **Burns : journal of the International Society for Burn Injuries**, v. 30, n. 2, p. 121-125, 2004.

HUANG, S.-S., LIU, S.M., LIN, S.M., LIAO, P.H., LIN, R.H., CHEN, Y.C., CHIH, C.L. e TSAI, S.-K. Antiarrhythmic effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on myocardial ischemia/reperfusion injury in rats. **Clinical biochemistry**, v. 38, p. 943-947, 2005.

IKEGAKI, M., ALENCAR, S.M., MOURA, F.F., SATO, H.H. e PARK, Y.K. Determinação das características físico-químicas e algumas propriedades biológicas de própolis coletadas na região Sul do Brasil. **Revista da Universidade de Franca**, v. 7, n. 7, p. 44-45, 1999.

IMHOF, M., LIPOVAC, M., BARTA, J., VERHOEVEN, H.C. e HUBER, J.C. Propolis solution for the treatment of chronic vaginitis. **International journal of**

**gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics**, v. 89, p. 127-132, 2005.

ITO, J., CHANG, F.-R., WANG, H.-K., PARK, Y.K., IKEGAKI, M., KILGORE, N. e LEE, K.-H. Anti-AIDS Agents. 48. Anti-HIV activity of moronic acid derivatives and the new melliferone-related triterpenoid isolated from Brazilian propolis. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 10, p. 1278-1281, 2001.

IVANOVSKA, N.D., DIMOV, V.D., BANKOVA, V. e POPOV, S. Immunomodulatory action of propolis VI. Influence of a water soluble derivative on complement activity *in vivo*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 47, p. 145-147, 1995.

JOHNSON, K.S., EISCHEN, F.A. e GIANNASI, D.E. Chemical composition of North American bee propolis and biological activity towards larvae of greater wax moth (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Chemical Ecology**, v. 20, p. 1783-1792, 1994.

KARIMOVA, Z. e RODIONOVA, E.I. Lung tuberculosis and propolis. **Pchelovodstvo (Russia)**, v. 40, n. 1, p. 36-37, 1963.

KHAYYAL, M.T., EL-GHAZALY, M.A. e EL-KHATIB, A.S. Mechanisms involved in the antiinflammatory effect of propolis extract. **Drugs under experimental and clinical research**, v. 19, p. 197-203, 1993.

KIMOTO, T., AGA, M., HINO, K., KOYA-MIYATA, S., YAMAMOTO, Y., MICALLEF, M.J., HANAYA, T., ARAI, S., IKEDA, M. e KURIMOTO, M. Apoptosis of human leukemia cells induced by artemillin C, an active ingredient in Brazilian propolis. **Anticancer research**, v. 21, p. 221-228, 2001.

KIMOTO, T., ARAI, S., KOHGUCHI, M., AGA, M., NOMURA, Y., MICALLEF, M.J., KURIMOTO, M. e MITO, K. Apoptosis and suppression of tumor growth by artemillin C extracted from Brazilian propolis. **Cancer detection and prevention**, v. 22, n. 6, p. 506-515, 1998.

KIMOTO, T., KOYA-MIYATA, S., HINO, K., MICALLEF, M.J., HANAYA, T., ARAI, S., IKEDA, M. e KURIMOTO, M. Pulmonary carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in mice and protection from it by Brazilian propolis and artemillin C. **Virchows Archiv : an international journal of pathology**, v. 438, n. 3, p. 259-270, 2001.

KOKSEL, O., KAPLAN, M.B., OZDULGER, A., TAMER, L., DEGIRMENCI, U., CINEL, L., BASTÜRK, M. e KANIK, A. Oleic acid-induced injury in rats and effects of caffeic acid phenethyl ester. **Experimental Lung Research**, v. 31, p. 483-496, 2005.

KOKSEL, O., OZDULGER, A., TAMER, L., CINEL, L., ERCIL, M., DEGIRMENCI, U., UNLU, S. e KANIK, A. Effects of caffeic acid phenethyl ester on

lipopolysaccharide-induced lung injury in rats. **Pulmonary pharmacology & therapeutics**, v. 19, p. 90-95, 2006.

KOLANKAYA, D., SELMANOGLU, G., SORKUN, K. e SALIH, B. Protective effects of Turkish propolis on alcohol-induced serum lipid changes and liver injury in male rats. **Food Chemistry**, v. 78, n. 2, p. 213-217, 2002.

KOO, H., GOMES, B.P.F.A., ROSALEN, P.L., AMBROSANO, G.M.B., PARK, Y.K. e CURY, J.A. *In vitro* antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. **Archives of oral biology**, v. 45, p. 141-148, 2000.

KOO, H., HAYACIBARA, M.F., SCHOBEL, B.D., CURY, J.A., ROSALEN, P.L., PARK, Y.K., VACCA-SMITH, A.M. e BOWEN, W.H. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and tt-farnesol. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 52, p. 782-789, 2003.

KOO, H., PEARSON, S.K., SCOTT-ANNE, K., ABRANCHES, J., CURY, J.A., ROSALEN, P.L., PARK, Y.K., MARQUIS, R.E. e BOWEN, W.H. Effects of apigenin and tt-farnesol on glucosyltransferase activity, biofilm viability and caries development in rats. **Oral Microbiology and immunology**, v. 17, n. 6, p. 337-343, 2002.

KOO, H., ROSALEN, P.L., CURY, J.A., AMBROSANO, G.M.B., MURATA, R.M., YATSUDA, R., IKEGAKI, M., ALENCAR, S.M. e PARK, Y.K. Effect of a new variety

of *Apis mellifera* propolis on *mutans Streptococci*. **Current microbiology**, v. 41, p. 192-196, 2000.

KOO, H., ROSALEN, P.L., CURY, J.A., PARK, Y.K. e BOWEN, W.H. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, p. 1302-1309, 2002.

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

KROL, W., SCHELLER, S., SHANI, J., PIETZ, G. e CZUBA, Z. Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on the growth of *Staphylococcus aureus*. **Arzneimittel-Forschung**, v. 43, p. 607-609, 1993.

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

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

KUO, H.-C., KUO, W.-H., LEE, Y.-J., LIN, W.-L., CHOU, F.-P. e TSENG, T.-H. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on the growth of C6 glioma cells *in vitro* and *in vivo*. **Cancer letters**, v. 234, n. 2, p. 199-208, 2005.

KUROKAWA, M., BASNET, P., OHSUGI, M., HOZUMI, T., KADOTA, S., NAMBA, T., KAWANA, T. e SHIRATA, K. Anti-herpes simplex virus activity of moronic acid purified from *Rhus javanica* *in vitro* and *in vivo*. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 289, p. 72-78, 1999.

KWON, Y.-S., PARK, D.-H., SHIN, E.-J., KWON, M.S., KO, K.H., KIM, W.-K., JHOO, J.H., JHOO, W.-K., WIE, M.-B., JUNG, B.D. e KIM, H.-C. Antioxidant propolis attenuates kainate-induced neurotoxicity via adenosine A1 receptor modulation in the rat. **Neuroscience Letters**, v. 355, n. 3, p. 231-235, 2004.

LEDÓN, N., CASACÓ, A., GONZALES, A., BRACHO, J. e ROSADO, A. Assessment of potential dermal and ocular toxicity and allergic properties of an extract of red propolis. **Archives of dermatological research**, v. 293, n. 11, p. 594-596, 2002.

LEDÓN, N., CASACÓ, A., GONZÁLEZ, R., MERINO, N., GONZÁLEZ, A. e TOLÓN, Z. Antipsoriatic, anti-inflammatory, and analgesic effects of an extract of red propolis. **Acta pharmacologica Sinica**, v. 18, p. 274-276, 1997.

LIN, S.C., LIN, Y.H., CHEN, C.F., CHUNG, C.Y. e HSU, S.H. The hepatoprotective and therapeutic effects of propolis ethanol extract on chronic alcohol induced liver injuries. **The American journal of Chinese medicine**, v. 25, p. 325-332, 1997.

LIU, C.F., LIN, C.H., LIN, C.C., LIN, Y.H., CHEN, C.F., LIN, C.K. e LIN, S.C. Antioxidative natural product protect against econazole-induced liver injuries. **Toxicology**, v. 196, n. 1-2, p. 87-93, 2004.

LOMBARDI, C., BOTTELLO, M., CARUSO, A., GARGIONI, S. e PASSALACQUA, G. Allergy and skin diseases in musicians. **Allergie et immunologie**, v. 35, n. 2, p. 52-55, 2003.

LU, L.-C., CHEN, Y.-W. e CHOU, C.-C. Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 102, n. 2, p. 213-220, 2005.

MACHACKOVA, J. The incidence of allergy to propolis in 605 consecutive patients patch tested in Prague. **Contact dermatitis**, v. 18, n. 4, p. 210-212, 1988.

MAGRO-FILHO, O. e CARVALHO, A.C.D. Topical effect of propolis in the repair of sulcoplasties by the modified Kazanjian technique. Cytological and clinical evaluation. **The Journal of Nihon University School of Dentistry**, v. 36, n. 2, p. 102-111, 1994.

MARCUCCI, M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v. 20, p. 83-99, 1995.

MARCUCCI, M.C., WOISKY, R.G. e SALATINO, A. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis. **Mensagem Doce**, v. 46, p. 3-8, 1998.

MARKHAM, K.R., 1982. *Techniques of flavonoid identification*, Academic Press Inc., London, Great Britain.

MATSUSHIGE, K., BASNET, P., HASE, K., KADOTA, S., TANAKA, K. e NAMBA, T. Propolis protects pancreatic  $\beta$ -cells against toxicity of streptozotocin (STZ). **Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 3, n. 2, p. 203-209, 1996.

MAZZUCO, H., DE M. E SILVA, R.D., BERCHIERI JR., A. e DE OLIVEIRA, E. Utilização da própolis e álcool etílico no controle de *Salmonella* em rações avícolas. **Scientia agricola (Piracicaba, Braz.)**, v. 53, n. 1, p. 1-7, 1996.

MELLIYOU, E. e CHINOY, I. Chemical analysis and antimicrobial activity of Greek propolis. **Planta Medica**, v. 70, p. 515-519, 2004.

MENDOZA, O.H., PEREZ, J.A., RAMOS, C.L. e ARIOZA, M.C. Propoleo y ulceras fleboblásticas. **Rev. Cubana Circ.**, v. 30, p. 28-33, 1991.

MENEZES, H., ALVAREZ, J.M. e ALMEIDA, E.C. Mouse ear edema modulation by different propolis ethanol extracts. **Arzneimittel-Forschung**, v. 49, p. 705-707, 1999.

MERINO, N., GONZALEZ, R., GONZALEZ, A. e REMIREZ, D. Histopathological evaluation on the effect of red propolis on liver damage induced by CCl<sub>4</sub> in rats. **Archives of medical research**, v. 27, p. 285-289, 1996.

METZNER, J., BEKEMEIER, H., PAINTZ, M. e SCHNEIDEWIND, E.M. Zur antimikrobiellen Wirksamkeit mit Propolis und Propolisinhaltsstoffen. **Die Pharmazie**, v. 34, p. 97-102, 1979.

MIRZOEVA, O.K. e CALDER, P.C. The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response. **Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids**, v. 55, p. 441-449, 1996.

MISHIMA, S., INOH, Y., NARITA, Y., OHTA, S., SAKAMOTO, T., ARAKI, Y., SUZUKI, K.-M., AKAO, Y. e NOZAWA, Y. Identification of caffeoylquinic acid derivatives from Brazilian propolis as constituents involved in induction of granulocytic differentiation of HL-60 cells. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 13, n. 20, p. 5814-5818, 2005.

MISHIMA, S., NARITA, Y., CHIKAMATSU, S., INOH, Y., OHTA, S., YOSHIDA, C., ARAKI, Y., AKAO, Y., SUZUKI, K.-M. e NOZAWA, Y. Effects of propolis on cell growth and gene expression in HL-60 cells. **Journal of ethnopharmacology**, v. 99, p. 5-11, 2005.

MISHIMA, S., ONO, Y., ARAKI, Y., AKAO, Y. e NOZAWA, Y. Two related cinnamic Acid derivatives from Brazilian honey bee propolis, baccharin and drupanin, induce growth inhibition in allografted sarcoma s-180 in mice. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 28, n. 6, p. 1025-1030, 2005.

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

MURAD, J.M., CALVI, S.A., SOARES, A.M.V.C., BANKOVA, V. e SFORCIN, J.M. Effect of propolis from Brazil and Bulgaria in fungicidal activity of mactophages against *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 79, p. 331-334, 2002.

NAGAOKA, T., BANSKOTA, A.H., TEZUKA, Y., SAIKI, I. e KADOTA, S. Selective antiproliferative activity of caffeic acid phenethyl ester analogues on highly liver-

metastatic murine colon 26-L5 carcinoma cell line. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 10, p. 3351-3359, 2002.

NAGOAKA, T., BANSKOTA, A.H., TEZUKA, Y., MIDORIKAWA, K., MATSUSHIGE, K. e KADOTA, S. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) Analogues: Potent nitric oxide inhibitors from the Netherlands propolis. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 26, n. 4, p. 487-491, 2003.

NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2004. Cancer Topics - Types of Treatment., <http://www.cancer.gov/cancertopics/biologicaltherapy>.

NOSTRO, A., CELLINI, L., DI BARTOLOMEO, S., DI CAMPLI, E., GRANDE, R., CANNATELLI, M.A., MARZIO, L. e ALONZO, V. Antibacterial effect of plant extracts against *Helicobacter pylori*. **Phytotherapy research : PTR**, v. 19, n. 3, p. 198-202, 2005.

OGETURK, M., KUS, I., COLAKOGLU, N., ZARARSIZ, I., ILHAN, N. e SARSILMAZ, M. Caffeic acid phenethyl ester protects kidneys against carbon tetrachloride toxicity in rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 97, p. 273-280, 2005.

OHISHI, S. Evaluation of time course and inter-relationship of inflammatory mediators in experimental inflammatory reaction. **Yakugaku zasshi : Journal of the Pharmaceutical Society of Japan**, v. 120, p. 455-462, 2000.

OKSUZ, H., DURAN, N., TAMER, C., CETIN, M. e SILICI, S. Effect of propolis in the treatment of experimental *Staphylococcus aureus* keratitis in rabbits. **Ophthalmic research**, v. 37, n. 6, p. 328-334, 2005.

OKTEM, F., OZGUNER, F., SULAK, O., OLGAR, S., AKTURK, O., YILMAZ, H.R. e ALTUNTAS, I. Lithium-induced renal toxicity in rats: Protection by a novel antioxidant caffeic acid phenethyl ester. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 277, n. 1-2, p. 109-115, 2005.

OKUTAN, H., OZCELIK, N., YILMAZ, H.R. e UZ, E. Effects of caffeic acid phenethyl ester on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat heart. **Clinical biochemistry**, v. 38, p. 191-196, 2005.

ORKIN, V.F. Use of propolis in the treatment of pyoderma caused by antibiotics-resistant strains of *Staphylococcus*. **Vrachebnoe delo**, v. 110-112, 1971.

ORSI, R.O., FUNARI, S.R.C., SOARES, A.M.V.C., CALVI, S.A., OLIVEIRA, S.L., SFORCIN, J.M. e BANKOVA, V. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 6, n. 2, p. 205-219, 2000.

ORSI, R.O., SFORCIN, J.M., FUNARI, S.R.C. e BANKOVA, V. Effects of Brazilian and Bulgarian propolis on bactericidal activity of macrophages against *Salmonella typhimurium*. **International Immunopharmacology**, v. 5, p. 359-368, 2005.

ORSOLIC, N. e BASIC, I. Antitumor, hematostimulative and radioprotective action of water-soluble derivative of propolis (WSDP). **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomédecine & pharmacothérapie**, v. 59, n. 10, p. 561-570, 2005.

ORSOLIC, N., SVER, L., TERZIC, S. e BASIC, I. Peroral application of water-soluble derivative of propolis (WSDP) and its related polyphenolic compounds and their influence on immunological and antitumour activity. **Veterinary research communications**, v. 29, n. 7, p. 575-593, 2005.

OZEN, S., AKYOL, Ö., IRAZ, M., SOGUT, S., OZUGURLU, F., OZYURT, H., ODACI, E. e YILDIRIM, Z. Role of caffeic acid phenethyl ester, an active component of propolis, against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. **Journal of applied toxicology**, v. 24, p. 27-35, 2004.

OZGUNER, F., OKTEM, F., AYATA, A., KOYU, A. e YILMAZ, H.R. A novel antioxidant agent caffeic acid phenethyl ester prevents long-term mobile phone exposure-induced renal impairment in rat. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 277, n. 1-2, p. 73-80, 2005.

OZTURK, F., KURT, E., UBEYT INAN, U., EMIROGLU, L. e ILKER, S.S. The effects of acetylcholine and propolis extract on corneal epithelial wound healing in rats. **Cornea**, v. 18, n. 4, p. 466-471, 1999.

PADMAVATHI, R., SENTHILNATHAN, P., CHODON, D. e SAKTHISEKARAN, D. Therapeutic effect of paclitaxel and propolis on lipid peroxidation and antioxidant system in 7,12 dimethyl benz(a)anthracene-induced breast cancer in female Sprague Dawley rats. **Life sciences**, v. 78, n. 24, p. 2820-2825, 2005.

PAREDES-GUZMAN, J.F., AGUIAR, C.L., FUJIWARA, F.Y. e PARK, Y.K. Estudo das própolis que contém Artepillin C. **Mensagem Doce**, v. 74, p. 9-16, 2003.

PARK, E.H. e KAHNG, J.H. Suppressive effects of propolis in rat adjuvant arthritis. **Archives of pharmacal research**, v. 22, n. 6, p. 554-558, 1999.

PARK, J.S. e WOO, K.S., 1996. The usage and composition of propolis added cosmetics in Korea, *International Conference on Bee Products: Properties, Applications and Apitherapy*, pp. 75, Israel.

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

PARK, Y.K., FUKUDA, I., ASHIDA, H., NISHIUMI, S., GUZMAN, J.P., SATO, H.H. e PASTORE, G.M. Suppression of dioxin mediated aryl hydrocarbon receptor transformation by ethanolic extracts of propolis. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 68, p. 935-938, 2004.

PARK, Y.K. e IKEGAKI, M. Preparation of water and ethanolic extracts of propolis and evaluation of the preparations. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 62, p. 2230-2232, 1998.

PARK, Y.K., KOO, H., ABREU, J.A.S., IKEGAKI, M., CURY, J.A. e ROSALEN, P.L. Antimicrobial Activity of Propolis on Oral microorganisms. **Current microbiology**, v. 36, p. 24-28, 1998.

PARK, Y.K., KOO, H., IKEGAKI, M. e CONTADO, J.L. Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 40, p. 97-106, 1997.

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

PASCUAL, C., GONZALES, R.G. e TORRICELLA, R.G. Scavenging action of propolis extract against oxygen radicals. **Journal of ethnopharmacology**, v. 41, p. 9-13, 1994.

PEPELJNJAK, S., JALSENJAK, I. e MAYSINGER, D. Flavonoid content in propolis extracts and growth inhibition of *Bacillus subtilis*. **Die Pharmazie**, v. 40, p. 122-123, 1985.

PEPELJNJAK, S., JALSENJAK, I. e MAYSINGER, D. Inhibition of growth and biosynthesis of ochratoxin A in *Aspergillus sulphureus* NRRL 4077 by propolis extract. **Die Pharmazie**, v. 37, p. 439-440, 1982.

PEPELJNJAK, S. e KOSALEC, I. Galangin expresses bactericidal activity against multiple-resistant bacteria: MRSA, *Enterococcus* sp. and *Pseudomonas aeruginosa*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 240, n. 1, p. 111-116, 2004.

PERUCHI, C.M.S., SILVA, F.B., FRANCO, S.I. e RAMALHO, L.T.O. Efeito da ação da propolis na lamina própria da mucosa bucal de ratos. Estudo histológico. **Robrac - Revista de Odontologia do Brasil Central**, v. 9, n. 28, p. 4-8, 2000.

POPRAVKO, S.A. e SOKOLOV, M.V. Plant sources of propolis. **Pchelovodstvo (Russia)**, v. 2, p. 28-29, 1980.

PRYTZYK, E., DANTAS, A.P., SALOMÃO, K., PEREIRA, A.S., BANKOVA, V.S., DE CASTRO, S.L. e NETO, F.R.A. Flavonoids and trypanocidal activity of Bulgarian propolis. **Journal of ethnopharmacology**, v. 88, n. 2-3, p. 189-193, 2003.

RAMIREZ, D., GONZALEZ, R., RODRIGUEZ, S. e AL., E. Protective effects of propolis extract on allyl alcohol-induced liver injury in mice. **Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 4, p. 309-314, 1997.

RANKIN, J.A., PICARELLA, D.E., GEBA, G.P., TEMANN, U.A., PRASAD, B., DICOSMO, B., TARALLO, A., STRIPP, B., WHITSETT, J. e FLAVELL, R.A. Phenotypic and physiologic characterization of transgenic mice expressing interleukin 4 in the lung: lymphocytic and eosinophilic inflammation without airway hyperreactivity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 7821-7825, 1996.

REZZANI, R., GIUGNO, L., BUFFOLI, B., BONOMINI, F. e BIANCHI, R. The protective effect of caffeic acid phenethyl ester against cyclosporine A-induced cardiotoxicity in rats. **Toxicology**, v. 212, n. 2-3, p. 155-164, 2005.

RODRIGUEZ, S., ANCHETA, O., RAMOS, M.E., REMIREZ, D., ROJAS, E. e GANZOLEZ, R. Effects of cuban red propolis on galactosamine-induced hepatitis

in rats. **Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society**, v. 35, p. 1-4, 1997.

ROJAS, H.N.M., CANDELARIO, M. e OLIVARES, E. Antimicrobial activity of propolis against representatives of the genus *Mycobacterium*. **Revista Biologica (Habana)**, v. 7, p. 69-75, 1993.

ROSENTHAL, D.S., 2000. *American Cancer Society's Guide to Complementary and Alternative Cancer Methods. 1st ed., ISBN 0-944235-24-7.*

RUSSO, A., LONGO, R. e VANELLA, A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. **Fitoterapia**, v. 73, n. Suppl. 1, p. S21-S29, 2002.

SALOMÃO, K., DANTAS, A.P., BORBA, C.M., CAMPOS, L.C., MACHADO, D.G., AQUINO NETO, F.R. e DE CASTRO, S.L. Chemical composition and microbicidal activity of extracts from Brazilian and Bulgarian propolis. **Letters in applied microbiology**, v. 38, p. 87-92, 2004.

SANTOS, F.A., BASTOS, E.M.A., RODRIGUES, P.H., DE UZEDA, M., DE CARVALHO, M.A.R., DE MACEDO FARIAS, L. e ANDRADE MOREIRA, E.S. Susceptibility of *Prevotella intermedia/Prevotella nigrescens* (and *Porphyromonas gingivalis*) to propolis (bee glue) and other antimicrobial agents. **Anaerobe**, v. 8, n. 1, p. 9-15, 2002.

SANTOS, H.S.D. e CRUZ, W.M.S. A Terapia nutricional com vitaminas, antioxidantes e o tratamento quimioterápico e oncológico. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, n. 3, p. 303-308, 2001.

SAWAYA, A.C.H.F., PALMA, A.M., CAETANO, F.M., MARCUCCI, M.C., CUNHA, I.B.S., ARAUJO, C.E.P. e SHIMIZU, M.T. Comparative study of *in vitro* methods used to analyse the activity of propolis extracts with different compositions against species of *Candida*. **Letters in applied microbiology**, v. 35, p. 205-207, 2002.

SAWAYA, A.C.H.F., SOUZA, K.S., MARCUCCI, M.C., CUNHA, I.B.S. e SHIMIZU, M.T. Analysis of the composition of Brazilian propolis extracts by chromatography and evaluation of their *in vitro* activity against gram-positive bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 104-109, 2004.

SHELLER, S., DWORNICZAK, S., WALDEMAR, K.K., RAJCA, M., TOMCZYK, A. e SHANI, J. Synergism between ethanolic extract of propolis (EEP) and anti-tuberculosis drugs on growth of mycobacteria. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 54c, p. 549-553, 1999.

SHELLER, S., KROL, W., SEDLACZEK, R., ZYDOWICZ, G., WOJCIK, L. e SHANI, J. Ethanolic extract of propolis (EEP), a natural antioxidant, prolongs life span of male and female mice. **Pharmacology**, v. 3, p. 123-125, 1994.

SCHEVCHENKO, L.F., CHASOVODTSEVA, O.A. e PESCHANSKII, A.N. Inhibiting activity of propolis on the influenza virus. Conference title: Khimioprofilakika I Khimioterapiya Grippa. Materialy Vsesoyoznogo Simpoziuma po Khimioprofilaktike I Khimioterapil Grippa. 1st 1971. Edited by A. A. Smorodintsev and D. M. Vlydnikov. pp. 56-57. v., 1972.

SCHNUCH, A., UTER, W., GEIER, J., LESSMANN, H. e FROSCH, P.J. Contact allergy to farnesol in 2021 consecutively patch tested patients. Results of the IVDK. **Contact dermatitis**, v. 50, n. 3, p. 117-121, 2004.

SCHUHMANN e GRUNOW Pflanzliche Allergene in kosmetischen Mitteln - das Beispiel Propolis. **Bundesgesundheitsblatt**, v. 34, p. 11-12, 1991.

SEO, K.W., PARK, M., SONG, Y.J., KIM, S.J. e YOON, K.R. The protective effects of Propolis on hepatic injury and its mechanism. **Phytotherapy research : PTR**, v. 17, n. 3, p. 250-253, 2003.

SERHAN, C.N. e CHIANG, N. Novel endogenous small molecules as the checkpoint controllers in inflammation and resolution: entree for resoleomics. **Rheumatic diseases clinics of North America**, v. 30, p. 69-95, 2004.

SERKEDJIEVA, J., MANOLOVA, N. e BANKOVA, V. Anti-influenza virus effect of some propolis constituents and their analogues (esters of substituted cinnamic acids). **Journal of Natural Products**, v. 55, p. 294-297, 1992.

SFORCIN, J.M., FERNANDES, A., JR., LOPES, C.A.M., FUNARI, S.R.C. e BANKOVA, V. Seasonal effect of Brazilian propolis on *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 7, p. 139-144, 2001.

SHIMAZAWA, M., CHIKAMATSU, S., MORIMOTO, N., MISHIMA, S., NAGAI, H. e HARA, H. Neuroprotection by Brazilian green propolis against In vitro and In vivo ischemic neuronal damage. **Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM**, v. 2, n. 2, p. 201-207, 2005.

SHIMIZU, K., ASHIDA, H., MATSUURA, Y. e KANAZAWA, K. Antioxidative bioavailability of artemillin C in Brazilian propolis. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 424, p. 181-188, 2004.

SHUKLA, S., BHADAURIA, M. e JADON, A. Effect of propolis extract on acute carbon tetrachloride induced hepatotoxicity. **Indian journal of experimental biology**, v. 42, n. 10, p. 993-997, 2004.

SIGAL, L.H. e RON, Y., 1994. *Immunology and inflammation: basic mechanisms and clinical consequences*, p. 760, Mcgraw-Hill, New York.

SILICI, S., KOC, N.A., AYANGIL, D. e CANKAYA, S. Antifungal activities of propolis collected by different races of honeybees against yeasts isolated from

patients with superficial mycoses. **Journal of pharmacological sciences**, v. 102, n. 3, p. 371-376, 2005.

SILICI, S. e KUTLUCA, S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. **Journal of ethnopharmacology**, v. 99, p. 69-73, 2005.

SINGER, R. Neurobehavioral evaluation of residual effects of low-level bystander organophosphate pesticide exposure. **Fundamental and applied toxicology : official journal of the Society of Toxicology**, v. 55, n. 1, March, 2002.

SON, S. e LEWIS, B.A. Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: structure-activity relationship. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 3, p. 468-472, 2002.

SONG, Y.S., JIN, C.B., JUNG, K.J. e PARK, E.H. Estrogenic effects of ethanol and ether extracts of propolis. **Journal of ethnopharmacology**, v. 82, p. 89-95, 2002.

STARZYK, J., SCHELLER, S., SZAFLARSKI, J., MOSKWA, M. e STOJKO, A. Biological properties and clinical application of propolis II. Studies on the antiprotozoan activity of ethanol extract of propolis. **Arzneimittel-Forschung**, v. 27, p. 1198-1199, 1997.

STOJKO, A., SCHELLER, S., SZWARNOWIECKA, I., TUSTANOWSKI, J., OSTACH, H. e OBUSZKO, Z. Biological properties and clinical application of propolis. VII. Experimental observations on the influence of ethanol extract of propolis (EEP) on the regeneration of bone tissue. **Arzneimittel-Forschung**, v. 28, p. 35-37, 1978.

SU, Z.-Z., GRUNBERGER, D. e FISHER, P.B. Suppression of adenovirus type 5 E1A-mediated transformation and expression of the transformed phenotype by caffeic acid phenethyl ester (CAPE). **Molecular Carcinogenesis**, v. 4, p. 231-242, 1991.

SU, Z.-Z., LIN, J., GRUNBERGER, D. e FISHER, P.B. Growth suppression and toxicity induced by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in type 5 adenovirus-transformed rat embryo cells correlate directly with transformation progression. **Cancer research**, v. 54, p. 1865-1870, 1994.

SU, Z.-Z., LIN, J.-K., PREWETT, M., GOLDSTEIN, N. e FISHER, P.B. Apoptosis mediates the selective toxicity of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) toward oncogene-transformed rat embryo fibroblast cells. **Anticancer research**, v. 15, n. 5, p. 1841-1848, 1995.

SUZUKI, I., HAYASHI, I., TAKAKI, T., GROVEMAN, D.S. e FUJIMIYA, Y. Antitumor and anticytopenic effects of aqueous extracts of propolis in combination

with chemotherapeutic agents. **Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals**, v. 17, n. 5, p. 553-562, 2002.

TAKAGI, Y., CHOI, I.S., YAMASHITA, T., NAKAMURA, T., SUZUKI, I., HASEGAWA, T., OSHIMA, M. e GU, Y.H. Immune activation and radioprotection by propolis. **The American journal of Chinese medicine**, v. 33, n. 2, p. 231-240, 2005.

THAN, M.M., BANSKOTA, A.H., TEZUKA, Y., MIDORIKAWA, K., MATSUSHIGE, K. e KADOTA, S. Inhibitors of nitric oxide (NO) production in murine macrophage-like J774.1 cells from Brazilian propolis. **Journal of Traditional Medicine**, v. 20, n. 1, p. 1-8, 2003.

THOMAS, D.B., 1986. Cancer Epidemiology and Prevention. *In*: A.R. MOOSA, M.C. ROBSON eS.C. SCHIMPF (eds.), *Comprehensive Textbook of Oncology*, pp. 3-27, Baltimore.

TOMÁS-BARBERÁN, F.A., GARCIA-VIGUEIRA, C., VIT-OLIVIER, P., FERRERES, F. e TOMAS-LORENTE, F. Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from venezuela. **Phytochemistry**, v. 34, n. 1, p. 191-196, 1993.

TOSI, B., DONINI, A., ROMAGNOLI, C. e BRUNI, A. Antimicrobial activity of some commercial extracts of propolis prepared with different solvents. **Phytotherapy research : PTR**, v. 1014, p. 335-336, 1996.

URADZINSKI, J., SZTEYN, J. e KAFEL, S. Investigation on the inhibition of *Campylobacter jejuni* growth with the applications of some preservatives, medicines, herbs and herb preparations. **Polish journal of veterinary sciences**, v. 5, n. 4, p. 223-225, 2002.

UTO, Y., HIRATA, A., FUJITA, T., TAKUBO, S., NAGASAWA, H. e HORI, H. First total synthesis of artemisinin C. Established by *o,o'*-Diprenylation of *p*-Halophenols in Water. **The Journal of organic chemistry**, v. 67, p. 2355-2357, 2002.

UZEL, A., SORKUN, K., ÖNCAG, Ö., COGULU, D., GENÇAY, Ö. e SALIH, B. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. **Microbiological Research**, v. 160, p. 189-195, 2005.

VANE, J.P. e BOTTING, R.M. Mechanisms of anti-inflammatory drugs. **Scandinavian journal of rheumatology**, v. 25, p. 9-21, 1996.

VYNOGRAD, N., VYNOGRAD, I. e SOSNOWSKI, Z. A comparative multi-center study of the efficacy of propolis, acyclovir and placebo in the treatment of genital herpes (HSV). **Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 7, p. 1-6, 2000.

WEBSTER, L.T., 1990. *Drugs used in the chemotherapy of protozoal infections. In The Pharmacological Basis of Therapeutics. 8th Ed. Edited by A. G. Gilman, T. W. Rall, A. S. Nies and P. Taylor. pp. 999-1007. Pergamon Press, New York.*

WEI, X., ZHAO, L., MA, Z., HOLTZMAN, D.M., YAN, C., DODEL, R.C., HAMPEL, H., OERTEL, W., FARLOW, M.R. e DU, Y. Caffeic acid phenethyl ester prevents neonatal hypoxic-ischaemic brain injury. **Brain : a journal of neurology**, v. 127, n. 12, p. 2629-2635, 2004.

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

WOLLENWEBER, E., ASAKAWA, Y., SCHILLO, D., LEHMANN, U. e WEIGEL, H.A. Floral honey bees in the Sonoran Desert: Propolis sources other than poplars (*Populus* sp.). **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 52c, p. 530-535, 1997.

WOO, K.J., JEONG, Y.-J., INOUE, H., PARK, J.-W. e KWON, T.K. Chrysin suppresses lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression through the inhibition of nuclear factor for IL-6 (NF-IL6) DNA-binding activity. **FEBS Letters**, v. 579, p. 705-711, 2005.

YEN, G.C. e WU, J.Y. Antioxidant and radical scavenging properties of extracts from *Ganoderma tsugae*. **Food Chemistry**, v. 65, p. 375-379, 1999.

YILDIRIM, Z., HACIEVLIYAGIL, S., KUTLU, N.O., AYDIN, N.E., KURKCUOGLU, M., IRAZ, M. e DURMAZ, R. Effect of water extract of Turkish propolis on tuberculosis infection in guinea-pigs. **Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society**, v. 49, n. 3, p. 287-292, 2004.