



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



ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FORMONONETINA DA
PRÓPOLIS DE JOÃO PESSOA-PB, ESTUDO DE SUA SAZONALIDADE
E AVALIAÇÃO DE SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Cleber Silveira Moraes

Mestre em Ciência de Alimentos

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 Doutor
em Ciência de Alimentos.

Campinas - SP

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

M791i Moraes, Cleber Silveira
Isolamento e identificação de formononetina da própolis vermelha de João Pessoa - PB, estudo de sua sazonalidade e avaliação de suas atividades biológicas / Cleber Silveira Moraes. -- Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: Yong Kun Park
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Própolis vermelha. 2. Formononetina. 3. *Dalbergia ecastophyllum*. 4. Flavonóides. 5. Isoflavonóides. I. Park, Yong Kun. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Titulo em inglês: Isolation and identification of formononetin of João Pessoa - PB red propolis, seasonal studies and evaluation of their biological activities

Palavras-chave em inglês (Keywords): Red propolis, Formononetin, *Dalbergia ecastophyllum*, Flavonoids, Isoflavonoids

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Yong Kun Park

Hélia Harumi Sato

Haroldo Yukio Kawaguti

Cláudio Lima de Aguiar

Masaharu Ikegaki

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Cleber Silveira Moraes aprovado pela Comissão Julgadora em 17 de dezembro de 2009.

Prof. Dr. Yong Kun Park
Orientador

Profa. Dra. Hélia Harumi Sato
Membro

Prof. Dr. Haroldo Yukio Kawaguti
Membro

Prof. Dr. Cláudio Lima de Aguiar
Membro

Prof. Dr. Masaharu Ikegaki
Membro

Ils ont dit: Tu es devenu fou à cause de Celui que tu aimes.

J'ai dit: La saveur de la vie n'est que pour les fous.

Yâfi'î, Raoudh al rayâhîn.

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, Dirceu Silveira Moraes Júnior e outros familiares pelo apoio emocional.

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

Aos meus amigos, pela amizade e incentivo sempre doados.

Aos meus cachorros, Tronador José e Cristal Maria, pelo apoio emocional sempre doado com a maior fidelidade.

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

Aos professores, Yong Kun Park, Luciana Francisco Fleuri, Haroldo Yukio Kawaguti, Cláudio Lima de Aguiar, Masaharu Ikegaki, Gláucia Maria Pastore, Hélia Harumi Sato, Fred Yukio Fujiwara pela correção e auxílio na realização desta tese.

Aos meus amigos de trabalho, Andreas Dausch. Viviane Toreti e Marcela Pavan pela amizade e auxílio na realização desse trabalho.

Aos colegas, José Alexandre Abreu, Edivaldo Pacheco, Fred Yukio Fujiwara e Marta Cristina Teixeira Duarte pela doação de amostras e auxílio nas pesquisas.

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.....	6
3.3	Influência da sazonalidade na qualidade da própolis.....	8
3.4	Efeitos regenerativos em tecidos biológicos e cura de feridas.....	9
3.5	Atividade anti-inflamatória.....	10
3.6	Efeitos analgésicos	13
3.7	Inibição enzimática.....	14
3.8	Atividades hepatoprotetoras	15
3.9	Ação hormonal.....	17
3.10	Atividades antioxidantes e antirradicais livres	18
3.11	Potencial de detoxificação	20
3.12	Atividade inseticida	21
3.13	Atividade antiparasitária.....	21
3.14	Atividade antibacteriana.....	23
3.14.1	Atividade contra úlcera péptica.....	26
3.14.2	Atividade contra cárie dental.....	27
3.14.3	Atividade antifúngica e antilevedura	30
3.15	Atividade antiviral.....	31
3.15.1	Atividade anti-adenovírus	32
3.15.2	Atividade anti-HIV	32
3.15.3	Atividade anti-herpes	33
3.15.4	Atividade anti-influenza.....	33
3.15.5	Atividade anti-hepatite	34
3.16	Antibiótico natural na alimentação de animais	35
3.17	Atividade antitumoral.....	35
3.18	Proteção do DNA	39
3.19	Sinergismo da própolis com quimioterapia	40
3.20	Atividade imunomoduladora.....	42
3.21	Potencial alergênico da própolis	45
3.22	Atividades biológicas dos principais compostos fenólicos encontrados na própolis vermelha do grupo 13	46
4	Materiais e métodos.....	53
4.1	Coleta das amostras de própolis.....	53
4.2	Extração dos compostos químicos da própolis coletados em diferentes épocas do ano	53
4.3	Espectrofotometria na região ultravioleta-visível.....	54
4.4	Cromatografia em camada delgada de alta eficiência em fase reversa (CCDAE-FR).....	54
4.5	Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR)	54
4.6	Determinação de compostos fenólicos totais.....	55
4.7	Determinação de flavonóides totais	56
4.8	Determinação da atividade antiradical (DPPH).....	56
4.9	Determinação da atividade antimicrobiana	57

4.10	Isolamento e identificação dos principais compostos da própolis do grupo 13	58
4.11	Análise estatística das amostras.....	59
5	Resultados e Discussão.....	60
5.1	Extração etanólica de compostos fenólicos de própolis em diferentes épocas do ano	60
5.2	Espectrofotometria na região ultravioleta-visível de extratos etanólicos de própolis do grupo 13, coletas em diferentes épocas do ano.....	65
5.3	Cromatografia em camada delgada de alta eficiência em fase reversa (CCDAE-FR) de extratos etanólicos de própolis em diferentes épocas do ano.	71
5.4	Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) de extratos etanólicos de própolis em diferentes épocas do ano	75
5.5	Determinação de compostos fenólicos totais de própolis do grupo 13 de diferentes épocas do ano.....	86
5.6	Determinação de flavonóides totais de própolis do grupo 13 de diferentes épocas do ano	93
5.7	Determinação da atividade antiradical (DPPH) de própolis do grupo 13 de diferentes épocas do ano.....	100
5.8	Determinação da atividade antimicrobiana de própolis do grupo 13 de diferentes épocas do ano.....	106
5.9	Comparação da quantidade de flavonóides e outros compostos fenólicos da própolis do grupo 13 em diferentes épocas do ano	112
5.10	Isolamento e identificação de formononetina presente em própolis do grupo 13.....	116
5.11	Determinação da atividade antiradical (DPPH) de formononetina isolada de própolis do grupo 13	118
5.12	Determinação da atividade antimicrobiana de formononetina isolada de própolis do grupo 13	120
6	Conclusões	122
7	Referências bibliográficas	124

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Extratos etanólicos de própolis do grupo 13 coletadas em fevereiro de 2008 em diferentes colméias, da cidade de João Pessoa - PB.	60
Figura 2 Extratos etanólicos de própolis do grupo 13 coletadas em abril de 2008 em diferentes colméias, da cidade de João Pessoa - PB.	61
Figura 3 Extratos etanólicos de própolis do grupo 13 coletadas em julho de 2008 em diferentes colméias, da cidade de João Pessoa - PB.	62
Figura 4 Extratos etanólicos de própolis do grupo 13 coletadas em outubro de 2008 em diferentes colméias, da cidade de João Pessoa - PB.	63
Figura 5 Extratos etanólicos de própolis do grupo 13 coletadas em dezembro de 2008 em diferentes colméias, da cidade de João Pessoa - PB.	64
Figura 6 Espectrofotometria UV-VIS dos extratos etanólicos de própolis do grupo 13 coletadas em fevereiro de 2008 em diferentes colméias, na cidade de João Pessoa - PB.	66
Figura 7 Espectrofotometria UV-VIS dos extratos etanólicos de própolis do grupo 13 coletadas em abril de 2008 em diferentes colméias, da cidade de João Pessoa - PB.	67
Figura 8 Espectrofotometria UV-VIS dos extratos etanólicos de própolis do grupo 13 coletadas em julho de 2008 em diferentes colméias, da cidade de João Pessoa - PB.	68
Figura 9 Espectrofotometria UV-VIS dos extratos etanólicos de própolis do grupo 13 coletadas em outubro de 2008 em diferentes colméias, da cidade de João Pessoa - PB.	69
Figura 10 Espectrofotometria UV-VIS dos extratos etanólicos de própolis do grupo 13 coletadas em dezembro de 2008 em diferentes colméias, da cidade de João Pessoa - PB.	70
Figura 11 CCDAE-FR dos extratos etanólicos de cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em fevereiro de 2008 em diferentes colméias, da cidade de João Pessoa - PB.	72
Figura 12 CCDAE-FR dos extratos etanólicos de cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em abril de 2008 em diferentes colméias, da cidade de João Pessoa - PB.	72
Figura 13 CCDAE-FR dos extratos etanólicos de cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em julho de 2008 em diferentes colméias, da cidade de João Pessoa - PB.	73
Figura 14 CCDAE-FR dos extratos etanólicos de cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em outubro de 2008 em diferentes colméias, da cidade de João Pessoa - PB.	74
Figura 15 CCDAE-FR dos extratos etanólicos de cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em dezembro de 2008 em diferentes colméias, da cidade de João Pessoa - PB.	74
Figura 16 CLAE-FR dos extratos etanólicos das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em fevereiro de 2008 em diferentes colméias, da cidade de João Pessoa - PB.	76

Figura 17 CLAE-FR dos extratos etanólicos das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em abril de 2008 em diferentes colméias, da cidade de João Pessoa - PB.	78
Figura 18 CLAE-FR dos extratos etanólicos das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em julho de 2008 em diferentes colméias, da cidade de João Pessoa - PB.	80
Figura 19 CLAE-FR dos extratos etanólicos das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em outubro de 2008 em diferentes colméias, da cidade de João Pessoa - PB.	82
Figura 20 CLAE-FR dos extratos etanólicos das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em dezembro de 2008 em diferentes colméias, da cidade de João Pessoa - PB.	84
Figura 21 Compostos fenólicos totais em mg ácido gálico equivalente/ g das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em fevereiro de 2008.	86
Figura 22 Compostos fenólicos totais em mg ácido gálico equivalente/ g das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em abril de 2008.	88
Figura 23 Compostos fenólicos totais em mg ácido gálico equivalente/ g das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em julho de 2008.	89
Figura 24 Compostos fenólicos totais em mg ácido gálico equivalente/ g das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em outubro de 2008.	90
Figura 25 Compostos fenólicos totais em mg ácido gálico equivalente/ g das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em dezembro de 2008.	91
Figura 26 Flavonóides totais em mg quercetina equivalente/ g das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em fevereiro de 2008.	93
Figura 27 Flavonóides totais em mg quercetina equivalente/ g das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em abril de 2008.	94
Figura 28 Flavonóides totais em mg quercetina equivalente/ g das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em julho de 2008.	96
Figura 29 Flavonóides totais em mg quercetina equivalente/ g das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em outubro de 2008.	97
Figura 30 Flavonóides totais em mg quercetina equivalente/ g das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em dezembro.	98
Figura 31 Atividade antirradical das própolis do grupo 13 coletadas em fevereiro de 2008.	100
Figura 32 Atividade antirradical das própolis do grupo 13 coletadas em abril de 2008.	101
Figura 33 Atividade antirradical das própolis do grupo 13 coletadas em julho de 2008.	102
Figura 34 Atividade antirradical das própolis do grupo 13 coletadas em outubro de 2008.	103
Figura 35 Atividade antirradical das própolis do grupo 13 coletadas em dezembro de 2008.	104
Figura 36 Antibiograma com <i>S. aureus</i> das própolis do grupo 13 coletadas em fevereiro de 2008.	106
Figura 37 Antibiograma com <i>S. aureus</i> das própolis do grupo 13 coletadas em abril de 2008.	107
Figura 38 Antibiograma com <i>S. aureus</i> das própolis do grupo 13 coletadas em julho de 2008.	108

Figura 39 Antibiograma com <i>S. aureus</i> das própolis do grupo 13 coletadas em outubro de 2008.....	109
Figura 40 Antibiograma com <i>S. aureus</i> das própolis do grupo 13 coletadas em dezembro de 2008.	110
Figura 41 Média de compostos fenólicos totais em mg ácido gálico equivalente/ g própolis das própolis do grupo 13 coletadas em fevereiro, abril, julho, outubro e dezembro de 2008.	113
Figura 42 Média de flavonóides totais em mg quercetina equivalente/ g própolis das própolis do grupo 13 coletadas em fevereiro, abril, julho, outubro e dezembro de 2008.	114
Figura 43 Média da quantidade de flavonóides e outros compostos fenólicos de própolis do grupo 13 coletados em fevereiro, abril, julho, outubro e dezembro de 2008.	115
Figura 44 Perfis cromatográficos e espectrofotométricos de formononetina de própolis do grupo 13 concentrada (a), do padrão obtido da empresa Extrasynthese Co.(b) e da fração obtida a partir da própolis do grupo 13 concentrada (c).	116
Figura 45 Ressonância magnética nuclear (RMN) da fração da própolis do grupo 13 e do padrão obtido da empresa Extrasynthese Co.	117
Figura 46 Atividade antirradical de formononetina isolada de própolis do grupo 13 em diferentes concentrações.	118
Figura 47 Antibiograma com <i>S. aureus</i> de formononetina isolada de própolis do grupo 13.....	120

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Flavonóides e outros compostos fenólicos dos extratos etanólicos de cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em fevereiro de 2008 em diferentes colméias determinados por comparação com padrões obtidos da empresa Extrasynthese Co.	77
Tabela 2 Flavonóides e outros compostos fenólicos dos extratos etanólicos de cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em abril de 2008 em diferentes colméias determinados por comparação com padrões obtidos da empresa Extrasynthese Co.	79
Tabela 3 Flavonóides e outros compostos fenólicos dos extratos etanólicos de cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em julho de 2008 em diferentes colméias determinados por comparação com padrões obtidos da empresa Extrasynthese Co.	81
Tabela 4 Flavonóides e outros compostos fenólicos dos extratos etanólicos de cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em outubro de 2008 em diferentes colméias determinados por comparação com padrões obtidos da empresa Extrasynthese Co.	83
Tabela 5 Flavonóides e outros compostos fenólicos dos extratos etanólicos de cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em dezembro de 2008 em diferentes colméias determinados por comparação com padrões obtidos da empresa Extrasynthese Co.	85
Tabela 6 Teor de compostos fenólicos totais em mg ácido gálico equivalente/ g das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em fevereiro de 2008.	87
Tabela 7 Teor de compostos fenólicos totais em mg ácido gálico equivalente/ g das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em abril de 2008.	88
Tabela 8 Teor de compostos fenólicos totais em mg ácido gálico equivalente/ g das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em julho de 2008.	89
Tabela 9 Teor de compostos fenólicos totais em mg ácido gálico equivalente/ g das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em outubro de 2008.	90
Tabela 10 Teor de compostos fenólicos totais em mg ácido gálico equivalente/ g das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em dezembro de 2008.	92
Tabela 11 Teor de flavonóides totais em mg quercetina equivalente/ g das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em fevereiro de 2008.	94
Tabela 12 Teor de flavonóides totais em mg quercetina equivalente/ g das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em abril de 2008.	95
Tabela 13 Teor de flavonóides totais em mg quercetina equivalente/ g das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em julho de 2008.	96
Tabela 14 Teor de flavonóides totais em mg quercetina equivalente/ g das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em outubro de 2008.	97
Tabela 15 Teor de flavonóides totais em mg quercetina equivalente/ g das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em dezembro de 2008.	98
Tabela 16 Atividade antirradical das própolis do grupo 13 coletadas em fevereiro de 2008.	100

Tabela 17 Atividade antiradical das própolis do grupo 13 coletadas em abril de 2008.....	101
Tabela 18 Atividade antiradical das própolis do grupo 13 coletadas em julho de 2008.....	102
Tabela 19 Atividade antiradical das própolis do grupo 13 coletadas em outubro de 2008.....	103
Tabela 20 Atividade antiradical das própolis do grupo 13 coletadas em dezembro de 2008.....	104
Tabela 21 Teor da média de compostos fenólicos totais em mg ácido gálico equivalente/ g das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em fevereiro, abril, julho, outubro e dezembro de 2008.....	113
Tabela 22 Teor da média de flavonóides totais em mg quercetina equivalente/ g das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em fevereiro, abril, julho, outubro e dezembro de 2008.	114
Tabela 23 Atividade antiradical de formononetina isolada de própolis do grupo 13 em diferentes concentrações.....	119

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 3000 anos a.C. principalmente por apresentar propriedades antimicrobiana, anti-inflamatória e cicatrizante (Marcucci, 1995; Khayyal *et al.*, 1993). Nos últimos anos foi demonstrado que alguns tipos de própolis apresentam atividade antioxidante, hipotensiva, anestésica, anticâncer, anti-HIV e anticariogênica.

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 escolhida a própolis do grupo 13 por possuir altas atividades biológicas.

Nessa tese foram avaliados a quantidade de compostos fenólicos totais e flavonóides totais presentes na própolis do grupo 13 de diferentes colméias e em diferentes épocas do ano, além de testar suas atividades biológicas.

Além disso, foram realizados o isolamento e a identificação da formononetina (7-hidroxi-4'-metoxi-isoflavona), principal isoflavona encontrada na própolis do grupo 13, e foram testadas suas atividades biológicas.

Demonstrou-se que a própolis vermelha de João Pessoa - PB apresenta grandes variações entre as colméias e em diferentes épocas do ano em relação à composição de compostos fenólicos totais e flavonóides totais. Mostrou-se também que as própolis com maiores quantidades de compostos fenólicos totais e

flavonóides totais apresentaram melhores atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e atividade antiradical livre.

Foi demonstrado um método de extração da formononetina de própolis do grupo 13, e mostrou-se que esse composto possui alta atividade antiradical e antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

Propolis is a resinous substance produced by the honeybee *Apis mellifera*. Bees use propolis to seal 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 3000 BC. Numerous biological properties have been found including antimicrobial, anti-inflammatory and cicatrizing (Marcucci, 1995, Khayyal *et al.*, 1993). Recently, studies revealed that propolis also has antioxidant, hypotensive, anesthetic, anticancer, anti-HIV and anticariogenic activities.

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 13 was chosen, as it shows high biological activity.

In this thesis were analyzed the quantity of whole phenolic compounds and flavonoids content was analyzed in each sample of propolis group 13, collected in different beehives and in different seasons. Furthermore, it was tested the biological activities of each sample.

In addition, formononetin (7-hydroxy-4'-methoxyisoflavone), the main isoflavonoid found in propolis group 13, was isolated and identified and its biological activity was analyzed.

It was demonstrated that João Pessoa – PB red propolis has great variations of phenolic compounds and flavonoids among honeybees and different seasons. It was showed that propolis with greater amount of phenolic compounds and flavonoids have better antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and antiradical activity.

It was demonstrated a method of formononetin extraction of red propolis group 13, and it was showed that this compound has high antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and antiradical activity.

1 Introdução

Há uma longa história do uso da própolis, que começou há 3000 a.C., 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.*, 1987a).

Na atualidade, a própolis é usada como medicamento caseiro e de uso estético, principalmente depois de constatado que a própolis possui várias atividades biológicas como ação antiséptica, antimicótica, bacteriostática, anti-inflamatória, antioxidante, sendo utilizada nos tratamentos de queimaduras, dermatites, úlceras, psoríase, herpes e pruridos devido a sua capacidade de promover a regeneração de tecidos. A própolis é também utilizada contra reumatismo, gengivite, 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.*, 1987b).

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 são adicionadas enzimas 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 (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 B₁, B₂, B₆, C e E (Ghisalberti, 1979).

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).

As própolis brasileiras são classificadas em 13 grupos conforme sua composição físico-química, que é diretamente relacionada com a planta utilizada pelas abelhas (Park *et al.*, 2002; Dausch *et al.*, 2008).

Foram avaliados nessa tese, a quantidade de compostos fenólicos totais e flavonóides totais presentes na própolis do grupo 13 de diferentes colméias e em diferentes épocas do ano, além de testar suas atividades biológicas, tais como atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e atividade antiradical. Além disso, foram realizados o isolamento e a identificação da formononetina (7-hidroxi-4'-metoxi-isoflavona), principal isoflavona encontrada na própolis do grupo 13, e foram testadas suas atividades biológicas.

2 Objetivos

Este trabalho teve o objetivo de avaliar a quantidade de compostos fenólicos totais e flavonóides totais presentes na própolis do grupo 13 de diferentes colméias e em diferentes épocas do ano, além de testar suas atividades biológicas, tais como atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e atividade antiradical.

Nesse trabalho foi estudado um método de isolamento de formononetina (principal isoflavona encontrada na própolis vermelha originária da resina de *Dalbergia ecastophyllum*), foi realizada sua identificação, e foram testadas suas atividades biológicas.

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, aminoácidos, cetonas, chalconas, diidrochalconas, terpenóides, vitaminas (B1, B2, B6, C e E) e minerais (alumínio, antimônio, cálcio, céσιο, cobre, ferro, lítio, manganês, mercúrio, níquel, prata, vanádio e zinco) (Almeida e Menezes, 2002; Ghisalberti, 1979).

Há um tipo de própolis que é produzida 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 3-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 que 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).

Foi demonstrado que as amostras de extrato de *D. ecastophyllum* (Leguminosae) da América do Sul, contém os flavonóides liquiritigenina, daidzeína, dalbergina, isoliquiritigenina, formononetina e biochanina A (Daugusch *et al.*, 2008). Foi descoberto que isoliquiritigenina inibe o crescimento de câncer prostático (Kanazawa *et al.*, 2003), onde liquiritigenina e isoliquiritigenina inibem a xantina oxidase. A inibição da xantina oxidase foi sugerida para uso no tratamento de hepatites e tumores cerebrais, porque aumenta o nível de xantina oxidase sérica (Kong *et al.*, 2000).

Cabral *et al.* (2009) demonstrou que a própolis vermelha brasileira possui alta atividade antioxidante e antibacteriana e que o fracionamento produziu sub frações biologicamente mais ativas que as frações e o extrato etanólico de própolis. A fração hexânica apresentou a maior atividade sequestradora de radicais livres (74,4%) em relação ao extrato etanólico de própolis e a fração clorofórmica, o que pode ser explicado pelo alto potencial das substâncias antioxidantes presentes. Foi demonstrada que as atividades antioxidante e antibacteriana da própolis vermelha não são função de um efeito sinérgico entre os vários compostos presentes no extrato bruto.

Alencar *et al.* (2007) identificaram quatro isoflavonas presentes na própolis vermelha, quais sejam: dihidroxiisoflavona, homopterocarpina, medicarpina e 4',7'-dimethoxy-2'- isoflavona. Estes compostos possuem propriedades antimicrobiana, anticâncer e antioxidante. Foi demonstrado que a própolis vermelha apresentou

alta e alta atividade antioxidante e atividade antimicrobiana contra *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*.

Trusheva *et al.* (2006) isolaram compostos da própolis vermelha e verificaram que as benzofenas isopreniladas, substâncias de menor polaridade em relação aos isoflavonóides, apresentaram maior potencial antioxidante.

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 à 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* (*Guttiferae*) (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 *Araucaria* sp (Bankova *et al.*, 1996) e *Baccharis dracunculifolia* (Park *et al.*, 2004).

As própolis brasileiras foram anteriormente classificadas em 12 grupos conforme sua composição físico-química, sendo 5 grupos encontrados na região Sul do país, 6 grupos encontrados na região Nordeste e 1 grupo encontrado na região Sudeste (Park *et al.*, 2002). Recentes estudos realizados mostraram a classificação de um tipo diferente de própolis, classificada como própolis do grupo 13, que foi diretamente relacionada com a planta (*Dalbergia ecastophyllum*) utilizada pelas abelhas para coleta de resinas e exsudatos (Daugusch *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2008; Alencar *et al.*, 2007).

Foi localizada no caule de arbustos ao longo das praias e costas dos rios na região nordeste do Brasil um exsudato resinoso vermelho que é utilizado na fabricação da própolis vermelha do grupo 13. Esse exsudato é secretado devido a buracos feitos por insetos no caule de *D. ecastophyllum* (Daugusch *et al.*, 2008).

A própolis vermelha do nordeste do Brasil (grupo 13) possui similaridade com a própolis de Cuba, em relação aos flavonóides presentes. Os compostos químicos encontrados na própolis de Cuba são: ácido gálico, isoliquiritigenina, (-)-liquiritigenina, formononetina, biochanina A, (3S)-vestitol, (3S)-7-O-metilvestitol, (3S)-7,4'-diidroxí-2'-metoxiisoflavana, (6aS,11aS)-medicarpina, (6aS,11aS)-homopterocarpina, (6aR,11aR)-vesticarpana, (6aR,11aR)-3,8-diidroxí-9-metoxipterocarpana, (6aR,11aR)-3-hidroxí-8,9-dimetoxipterocarpana, (6aR,11aR)-3,4-diidroxí-9-metoxipterocarpana (Piccinelli *et al.*, 2005; Daugusch, 2007).

Daugusch (2007) analisou as estruturas anatômicas de *D. ecastophyllum*, tais como os parênquimas lignificados e as células parênquimatosas retangulares com conteúdo avermelhado. As amostras de própolis vermelha do grupo 13 apresentaram na análise microscópica diversos elementos que caracterizam a

presença de *D. ecastophyllum*. Foi encontrada na própolis, a presença de tricomas que são os mesmos encontrados na planta *D. ecastophyllum*. A análise comparativa entre os elementos microscópicos encontrados na própolis vermelha do grupo 13 e observados no estudo realizado para *Dalbergia ecastophyllum*, como os ápices vegetativos, demonstrou que os elementos botânicos encontrados são idênticos.

3.3 Influência da sazonalidade na qualidade da própolis

Estudo da própolis verde do grupo 12 foi encontrado apresentou maior concentração de compostos fenólicos (81,70 e 94,98 mg/ g,) e flavonóides (43,00 e 47,31 mg/ g) nos meses de agosto e setembro, respectivamente, Foi verificado que nesse mesmo período ocorreu maior atividade antibacteriana. Da mesma forma, os menores resultados da atividade antibacteriana estiveram também associados com as menores concentrações de flavonóides e fenólicos totais, demonstrando, uma estreita relação da atividade antibacteriana com o teor de compostos fenólicos para essa própolis. A própolis do grupo 6 apresentou forte atividade antibacteriana durante o período estudado, porém não foram identificados altos teores de flavonóides e compostos fenólicos, sugerindo que a atividade antimicrobiana desta própolis não está relacionada com a presença de flavonóides e compostos fenólicos tradicionalmente presentes em outros tipos de própolis brasileira (Castro *et al.*, 2007).

Teixeira *et al.* (2008), realizou análise de própolis do grupo 12 e verificou que a sua origem botânica (*Baccharis dracunculifolia*) possui inversamente proporcional a quantidade de triterpenóides e compostos fenólicos. Foi verificado

que a *Baccharis dracunculifolia* possui grandes quantidades de compostos fenólicos e baixa quantidade de triterpenóides. Porém com o tempo esses triterpenóides aumentam e conseqüentemente, diminui a quantidade de compostos fenólicos. Foi descoberto que alguns compostos somente são detectados em determinadas épocas do ano, como o farnesol acetato, que somente é encontrado no mês de janeiro. Outros compostos foram detectados em março, porém não detectado nos outros meses. Os diterpenos aparecem no verão e alcançam sua maior concentração no outono, porém são ausentes nas outras estações do ano.

3.4 Efeitos regenerativos em tecidos biológicos e cura de feridas

Ozturk *et al.* (1999), demonstraram que a acetilcolina (Ach) e a própolis facilitaram a cura de ferida da córnea em ratos comparados com o grupo controle, que recebeu somente 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) e Magro-Filho e Carvalho (1994), usaram hidróxido de cálcio e própolis na avaliação do potencial de cura da própolis expondo pulpas dentais de ratos. Ambas substâncias testadas tiveram efeito em manter os agentes inflamatórios e células microbianas em baixas concentrações. Os efeitos do enxágue bucal contendo própolis no reparo tecidual depois do procedimento cirúrgico dental (sulcoplastia) em humanos foram testados. Magro-Filho e

Carvalho (1994) observaram que o uso de própolis acelerou a formação de tecido conectivo em situações pós-operatórias.

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

3.5 Atividade anti-inflamatória

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 os mediadores do processo inflamatório, foram identificados: 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). Os efeitos das própolis e seus subprodutos que apresentam propriedades anti-inflamatórias tem sido estudados em diferentes sistemas 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 a própolis apresentam efeitos similares às drogas anti-inflamatórias 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 anti-inflamatório 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 de inibir a enzima ciclooxigenase e assim a inflamação (Sigal e Ron, 1994). Há diferentes mecanismos para agentes anti-inflamatórios. Os esteróides inibem a liberação de ácido araquidônico para os fosfolipídios da membrana celular e assim bloqueiam a produção de eicosanóides (Mirzoeva e Calder, 1996). Drogas anti-inflamatórias 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 diversos 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 anti-inflamatória bloqueando essas enzimas (Goodwin, 1994). Na própolis do álamo europeu, flavononas, flavonas, ácidos fenólicos e seus ésteres foram identificados como principais compostos com atividade anti-inflamatória (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, tornam 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 a própolis é um potente produto anti-inflamatório natural, que é efetiva para aplicações em pacientes com asma em comparação com glicocorticóides, que tem uma atividade anti-inflamatória geral (Barnes, 1995). A própolis vermelha de Cuba, na concentração de 50 mg/ Kg mostrou efeito anti-inflamatório 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 fenilcaféico éster (CAPE) reduz as injúrias

da inflamação do tecido pulmonar de ratos (Koksel *et al.*, 2005; Koksel *et al.*, 2006).

A própolis apresentou efeito inibitório nas prostaglandinas, leucotrienos e histaminas liberadas, ajudando a melhorar os efeitos anti-inflamatórios em experimento *in vitro* (Khayyal *et al.*, 1993). Similarmente, Mirzoeva e Calder (1996) demonstraram que a 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 anti-inflamatórios 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 anti-inflamatórios similares aos produzidos pela indometacina (Menezes *et al.*, 1999) variando significativamente dependendo da procedência da amostra de própolis.

3.6 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, que atuam como receptores na inibição de dor no cérebro; e os não opióides, que inibem a síntese de prostaglandinas (De Campos *et al.*, 1998). O efeito anti-inflamatório 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 $ID_{(50)}$ foi 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 de própolis foram efetivas analgesicamente em testes em ratos colocados em pratos quentes (Ledón *et al.*, 1997). Extratos alcoólicos e aquosos de própolis da Coreia mostraram um forte efeito analgésico, que foi comparado com o ácido acetilsalisílico (Han *et al.*, 2002; Park e Kahng, 1999).

3.7 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 não pode catalisar a reação usual. O controle alostérico é usado pelas células para regular uma via metabólica importante. Essas pequenas moléculas 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 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 caféico (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).

3.8 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.*, 2001b). Apoptose hepatocítica e transmigração neutrofílica podem ser em parte responsáveis pela inflamação e também liderar a necrose do hepatócito (Banskota *et al.*, 2001a). A administração de paracetamol danificou o fígado de ratos examinados. Própolis vermelha cubana reduz os danos hepáticos significativamente. Danos no fígado são normalmente acompanhados 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 (CCl₄) 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 dicafeoiquínico com atividade hepatoprotetora significativa foi isolada da própolis verde brasileira e depois testada *in vitro*, quanto a indução de injúria em cultura de células hepáticas de ratos com CCl₄ (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 mediante o uso constante da própolis) (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). De acordo com o autor, o efeito hepatoprotetor de extrato etanólico de própolis pode ser, pelo menos parcialmente, devido à 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 caféico, 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).

3.9 Ação hormonal

Substâncias antagonistas de hormônios são usadas 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 etanólico ou etéreo 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, entre outros (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.

3.10 Atividades antioxidantes e antirradicais livres

Própolis contém substâncias com alta atividade antioxidante como flavonóides e outros compostos fenólicos (Burda e Oleszek, 2001). Processos oxidativos produzem radicais livres que causam muitos problemas para a 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 à 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 um 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, entre outros. Com isso para evitar o estresse fisiológico, uma alternativa 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 β -caroteno (vitamina A) são antioxidantes muito importantes (Bisby, 1990). A primeira linha de defesa em 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 caféico 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 caféico, 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 preveniu 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).

3.11 Potencial de detoxificação

Flavonóides, o principal componente da própolis, pode complexar 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, zumbido, distúrbios visuais, dificuldades respiratórias, dores torácicas, irregularidades no coração e muitas outras desordens neurológicas e psiquiátricas. Além disso órgãos como fígado, cérebro e 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 hipóxica 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. Kwon *et al.* (2004) sugeriram que os efeitos de neuroproteção poderiam ser através da via de modulação de receptores de adenosina A1 no hipocampo. 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).

3.12 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 (Lepidoptera: Pyralidae) (Johnson *et al.*, 1994).

3.13 Atividade antiparasitária

Protozoa ou protozoários, são organismos unicelulares, eucarióticos que têm típica estrutura interna, movem-se rapidamente com seus flagelos, embora muitos protozoas fitoflagelados realizam 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 NifurtimoxTM ou BenznidazoleTM. 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, sendo que ratos sobreviveram com os parasitas e outros morreram (De Castro e Higashi, 1995). A atividade antiprotozoária de extratos etanólicos da própolis foi estudada 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).

3.14 Atividade antibacteriana

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 antibacteriana 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 (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 antibacteriana foram demonstradas por Sforcin *et al.* (2001). A atividade antibacteriana 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 à atividade antibacteriana (Silici e Kutluca, 2005). Os flavonóides pinocembrina, pinostrobin, galangina e pinobanksina são conhecidos por ter uma alta atividade antibacteriana (Dastidar *et al.*, 2004). Também os ácidos prenil p-cumárico, ferúlico, caféico e ácido diterpênico e ligninas furofurano

isolados da própolis brasileira foram estudadas por terem uma boa atividade antibacteriana (Castaldo e Capasso, 2002). Três novas flavanonas derivadas: 7-prenilpinocembrina, totarol e 7-prenilstroboquina, isoladas de amostras de própolis grega, mostraram alta atividade antibacteriana (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 antibacteriana. Considerando que a atividade antibacteriana do álamo europeu é devido a flavonóis, flavonas, ácido fenólico e seus ésteres, na própolis vermelha cubana foi encontrado prenil benzofenonas, que tem maior atividade antibacteriana (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.*, 2000b; 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.*, 2001a; 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 testados 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, própolis extraída com glicerina, por exemplo, apresentou fraca inibição de bactérias Gram-positivas, enquanto própolis extraídas com etanol e propilenoglicol mostraram efetividade contra fungos (Castaldo e Capasso, 2002). Estudos com atividades antibióticas e antifúngicas foram testados usando soluções ou suspensões aquosas dos materiais a seguir: barras de própolis contendo 350 mg de própolis por grama, chamado pelos autores de PG; barras de própolis de cor vermelha contendo 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 diphthriae*) e quatro 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).

3.14.1 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 anti-inflamatórias 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 antibacterianas (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.*, 2001a; Hashimoto *et al.*, 1998).

3.14.2 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 (gingivites e doença periodontal); patologias orais estão entre as mais prevalentes e caras doenças que afetam a sociedade industrializada (Bowen, 2002a).

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, 2002b). Apesar da complexa comunidade microbiana, somente espécies específicas 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, 2002a). Essa patogenia oral em biofilme dental produz ácido muito rapidamente na presença de açúcares da dieta, 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, 2002a).

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.*, 2000a; Park *et al.*, 1998). O extrato etanólico de própolis do 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.*, 2002a). 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.*, 2000b). 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. A própolis brasileira foi dividida em 13 grupos conforme sua constituição físico-química (Park *et al.*, 2002; Dausch *et al.*, 2008). Entre as 13 própolis classificadas, 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 antibacteriana. 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^+ -ATPase) responsável pelo abaixamento do pH (Belli e Marquis, 1991). Essa enzima associada à membrana bombeia prótons (H^+) 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.*, 2002b). Apigenina e tt-farnesol tem sido identificadas como compostos ativos na atividade em glicosiltransferases e viabilidade dos biofilmes (Koo *et al.*, 2002b). 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).

3.14.3 Atividade antifúngica e antilevedura

A atividade antilevedura 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 antilevedura 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 *Paracoccidioides brasiliensis* (Murad *et al.*, 2002). Sacuranetina isolada de *Poecilanthe parviflora*, uma leguminosa comum no Brasil, e também constituinte da própolis brasileira mostrou alta atividade antifúngica (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 antifúngico (Metzner *et al.*, 1979). *Aspergillus sulphurous* 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 antifúngica. Outros compostos ativos são ésteres de ácido cumárico e ácido caféico (Dobrowolski *et al.*, 1991). A alta variabilidade de atividade antifúngica 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 antifúngica que própolis coletada na mesma região por *Apis mellifera carnica* e *Apis mellifera anatolica* (Silici *et al.*, 2005).

3.15 Atividade antiviral

Vírus é uma partícula protéica que pode infectar organismos vivos. Vírus são parasitas intracelulares obrigatórios e isso significa que eles somente se reproduzem pela invasão e posseção do controle da maquinaria de auto-reprodução celular. 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 antiviral *in vitro* de própolis foi demonstrada (Amoros *et al.*, 1992a) e a relação da atividade antiviral 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 antiviral de própolis é muito importante na prevenção de câncer e muitas prevenções ou tratamentos de outras doenças virais foram relatados.

3.15.1 Atividade anti-adenovírus

Os adenovírus pertencem à 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 caféico (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).

3.15.2 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 mostraram 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 antivirais da própolis podem ser, assim como pelo ZidovudineTM, por inibição da transcriptase reversa. Não há notícias do efeito da inibição das proteases do IndinavirTM (Gekker *et al.*, 2005).

3.15.3 Atividade anti-herpes

O vírus da herpes simples (HSV) é um vírus de DNA do grupo herpes viridae (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 antiviral contra HSV-1 em cultura de células (Amoros *et al.*, 1992b) 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, AcyclovirTM e placebo e suas efetividades foram confirmadas (Vynograd *et al.*, 2000).

3.15.4 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).

3.15.5 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, e 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.

3.16 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 sp* em rações avícolas, porém o efeito positivo foi devido à presença de grande quantidade de álcool e não devido à 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).

3.17 Atividade antitumoral

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 à 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 em estudos *in vitro*. Foi observado que a atividade antitumoral 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 antitumoral da própolis sugerem que essa atividade podem ser associada com a ativação na produção de linfócitos e a subsequente estimulação do sistema imune associado com a inibição da peroxidação lipídica (Kimoto *et al.*, 2001b).

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.*, 2001b). Artepillin C, pode também ser disponível como Artepillin C sintetizado (Uto *et al.*, 2002), mostrando propriedades protetoras na

carcinogênese pulmonar (Kimoto *et al.*, 2001b) e preferencialmente citotoxicidade de células tumorais (Kimoto *et al.*, 2001a).

O CAPE, ácido fenil caféico 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 (Orsollic *et al.*, 2005). CAPE e muitos análogos mostraram um efeito inibidor em células leucêmicas humanas HL-60 por indução de apoptose (Orsollic *et al.*, 2005). CAPE e muitos análogos da própolis de álamo holandês demonstraram responsabilidade pela atividade antiproliferativa em linhagens celulares cancerígenas (Banskota *et al.*, 2002). Ácido cafeoilquínico da própolis brasileira, está envolvida na introdução de granulócitos diferenciados de células HL-60 (Mishima *et al.*, 2005a; Mishima *et al.*, 2005b). 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 pela atividade antitumoral. Foi mostrado que CAPE, ácido caféico e a solução de própolis em água, reduziram o crescimento e potencial metastásico de carcinoma mamário transplantável em ratos (Orsollic *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 μ M). Foi verificado que a substância CAPE possui seletiva atividade antiproliferativa contra as células de carcinoma 26-L5. Nagaoka *et al.* (2003) verificaram 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 antimetastático 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 antimetastático, 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), avaliaram a apoptose induzida pelo éster do ácido fenil caféico (CAPE) em macrófagos de rato (NR 8383) e células humanas epiteliais (SW 620). As suspensões celulares 100.000/mL e 150.000/mL separadamente foram expostas a CAPE (3-30 μ 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).

Usia *et al.* (2002) verificaram que própolis do álamo chinês e dois novos flavonóides: 2-metil butiroil pinobanksina e 6-cinamil crisina apresentaram atividade antiproliferativa de células tumorais.

Na própolis de *Baccharis dracunculifolia* os compostos identificados como ácido prenil p-cumárico, clerodane, diterpenos e benzofuranos apresentaram atividade antitumoral. 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.*, 2005c).

As própolis de *Baccharis dracunculifolia* e de *Dalbergia ecastophyllum* apresentam antiproliferação de tumor maligno primário (RC-58T/h/SA#4) derivados de células de câncer prostático humano e células epiteliais prostáticas humanas. A inibição mais forte de células RC-58T/h/SA#4 foi observada no extrato de própolis de *Dalbergia ecastophyllum*, enquanto que foi observada inibição de crescimento moderado em células epiteliais prostáticas humanas utilizando-se a própolis de *Baccharis dracunculifolia* (Moraes *et al.*, 2009).

3.18 Proteção do DNA

Fitzpatrick *et al.*, 2001, avaliaram a apoptose induzida pelo CAPE em macrófagos de rato (NR 8383) e células humanas epiteliais (SW 620). No estudo de fragmentação de DNA, foi medido por meio do teste “Detector de morte celular ELISA mais” foi verificado que ocorre maior efeito indutor de apoptose em macrófagos quando submetidos à ação do CAPE (Fitzpatrick *et al.*, 2001). Chen *et al.* (2003) mostraram que CAPE é capaz de induzir a apoptose, dependendo do

tipo de célula usada – efeito seletivo de apoptose, sem nenhum efeito em células normais.

3.19 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 à 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 biodisponibilidade 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 interagem com radicais livres.

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 antimetastásica de compostos da própolis solúveis em água ou em combinação com quimioterápicos e/ ou radioterápicos podendo aumentar o potencial antimetastático por agentes quimioterápicos (Orsolich 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 antitumorais e minimizar os efeitos pós quimioterápicos ou radioterápicos, como também diminuir as células sanguíneas. Além disso, Padmavathi *et al.* (2005), estudaram 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 dismutase 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.

3.20 Atividade imunomoduladora

Terapia biológica é uma modalidade de terapia em que 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, em que 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. Orsollic *et al.* (2005) relataram a atividade antitumoral principalmente como propriedade imunomoduladora dos compostos, sua citotoxicidade de células tumorais, e sua habilidade em induzir a apoptose e ou necrose. 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 baseado nas características funcionais descritas em 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 à atividade antitumoral, proteção do DNA, eliminador de radicais livres e imunoestimulador (Banskota *et al.*, 2001b; 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 hesperidina 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- β 1) e linfócitos T. Os resultados sugeriram que substâncias são capazes de aumentar a capacidade produtora de fator de crescimento transformante β 1 (TGF- β 1) em células T humanas. TGF- β 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 imunomoduladora de células T. Isso é conhecido como um intermediário metabólico de oxigênio que são relatados em atividades macrofágicas bactericidas. Orsi *et al.* (2000) realizaram 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 a ativação macrofágica, foi determinada a concentração de metabólitos oxigenados intermediários: peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 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 µg/mL) induziu o aumento da produção de H₂O₂. Nesse estudo, a própolis não induziu alterações significativas na produção de NO, com discreta inibição na concentração de 50 e 100 µg/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 µg/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). De acordo com Matsushige *et al.* (1996) os extratos aquosos e alcoólicos de própolis mostraram ser potentes inibidores de NO.

3.21 Potencial alergênico da própolis

Alergia ou hipersensibilidade significam resposta imune inadequada em um indivíduo por uma substância. A própolis tem um potencial alergênico dependendo de sua origem botânica e composição química. As reações alérgicas causadas pelas própolis de exsudatos de álamo foram examinadas extensivamente e ácido 1,1-dimetil caféico 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). Posteriormente, 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 frequência 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 de exsudatos de álamo e vinte e cinco pacientes (4,2%) tiveram resultado positivo de alergia a própolis (Machackova, 1988). Dezenove substâncias existentes nas própolis de exsudatos de folhas de brotamento de

álamo foram testadas quanto ao 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).

3.22 Atividades biológicas dos principais compostos fenólicos encontrados na própolis vermelha do grupo 13

Foi comprovada que a própolis possui alta atividade biológica por apresentar compostos fenólicos, principalmente flavonóides (Bankova *et al.*, 1983; Ghisalberti, 1979; Park *et al.*, 1998). Segundo Dausch *et al.* (2008), a própolis

vermelha do nordeste brasileiro do grupo 13 contém rutina, liquiritigenina, daidzeína, pinobanksina, quercetina, luteolina, dalbergina, isoliquiritigenina, formononetina, pinocembrina, pinobanksina-3-acetato e biochanina A.

A administração de rutina (120 mg/ kg/ semana) em ratos, durante 15 dias, não induz a variação na glicemia de jejum e no teste de tolerância à glicose. A suplementação nutricional com rutina demonstrou importante papel na prevenção da aterosclerose, pois induziu elevação significativa da lipoproteína de alta densidade (colesterol-HDL de $35,82 \pm 2,31$ mg/ dL para $44,40 \pm 3,11$ mg/ dL), embora não tenham sido observadas mudanças significativas nas concentrações séricas de lipoperóxidos, triacilgliceróis, colesterol-LDL e proteínas totais (Gomes *et al.*, 2003).

A rutina em concentrações entre 10-160 $\mu\text{mol/ L}$ induziu ao vasorelaxamento através da indução da via óxido-guanil nítrico ciclase e mecanismo de mediação da prostaglandina. A rutina atuou como agente antioxidante, anti-inflamatório e antiviral, além de inibir a atividade da aldose redutase. Ela é também utilizada no tratamento de pacientes infartados, hipertensos e portadores de bronquite crônica. Apesar disso, o mecanismo de atuação da rutina ainda é desconhecido (Xia *et al.*, 2005).

A liquiritigenina e isoliquiritigenina possuem várias atividades farmacológicas. Conforme comprovado, estes compostos são inibidores de xantina oxidase e monoamina oxidase, além de mostrar alto efeito em células cancerígenas. Liquiritigenina e isoliquiritigenina possuem efeito antiangiogênico e atividades antioxidante e anti-inflamatória. Além disso, a isoliquiritigenina é inibidora da tirosinase, que é uma enzima encontrada na biossíntese de melanina,

sendo assim, a isoliquiritigenina pode estar envolvida com a pigmentação da pele e cabelo (Caoa *et al.*, 2004).

A pinocembrina e a quercetina inibem a peroxidação lipídica da membrana mitocondrial (Santos *et al.*, 1998). Segundo Metzner *et al.* (1979) a pinobanksina possui alta ação antimicrobiana e antimicótica. A pinobanksina -3-acetato possui ação antimicrobiana, antimicótica e antioxidante (Metzner *et al.*, 1979; Willför *et al.*, 2003).

Wong e Keung (1997) observaram efeito inibitório de um derivado de daidzeína sobre esterase sulfatase, enzima ligada à evolução do câncer de mama. Foi constatado que daidzeína não afetou a esterase sulfatase, no entanto, seus sulfo-conjugados, daidzeína-4'-O-sulfato e daidzeína-7,4'-di-O-sulfato, foram potentes inibidores dessa enzima. Evidências experimentais sugerem que a daidzeína possui propriedades estrogênicas, antioxidante, hipocolesterolêmica e inibidora da proliferação celular e síntese de DNA. A daidzeína possui características estrogênicas agonistas e antagonistas, em partes devido à alta afinidade pela isoforma do receptor de estrogênio (ER), com alta afinidade pelo ER β em comparação com o ER α (Gutierrez-Zepeda *et al.*, 2005).

Segundo Wong e Keung (1999), flavonóides como luteolina, quercetina inibem a atividade de β -caroteno-15,15'-dioxigenase. Entretanto, isoflavonas mostraram pouco efeito inibitório sobre essa enzima, responsável pelo fornecimento de vitamina A mediante catálise oxidativa do β -caroteno em duas moléculas de retinal. Outra enzima de grande importância, a F0F1-ATPase/ ATP sintase que sintetiza ATP durante a fosforilação oxidativa mitocondrial, pode ser inibida por diferentes isoflavonas como biochanina A e daidzeína. A daidzeína,

biochanina A e formononetina inibem a atividade de álcool desidrogenase, que é responsável pela oxidação de 3- β -hidroxiesteróides e a conversão de 5-pregnen-3,20-diona em progesterona.

Formica e Regelson (1995) mostraram que a quercetina modificam a biossíntese de eicosanóides (respostas antiprostanoídes e anti-inflamatórias), protegendo contra a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade, prevenindo assim, contra a aterosclerose e formação da placa aterosclerótica, além de prevenir contra a agregação plaquetária (efeito antitrombínico). A quercetina ainda apresenta atividade antihistamínica, antiviral e anticancerígena (Di Maggio e Ciaceri, 1961; König e Dustmann, 1985).

A luteolina tem mostrado atividade *in vivo* de inibição da produção de necrose tumoral sérica, inibição de ácido araquidônico, 12-*O*-tetradecanoilforbol-13-acetato e oxazolona, indutores de edema auricular alérgico. Além disso, König e Dustmann (1985) mostraram que a luteolina possui alta ação antiviral.

Biochanina A e formononetina são 4-*O*-metil derivados de genisteína e daidzeína, respectivamente. As plantas que contém isoflavonas são tipicamente detectadas in alimentos como substituto de conjugados glicosídicos. A biodisponibilidade e atividade biológica das isoflavonas encontradas em alimentos requerem hidrólise do grupo glicosídeo para liberar as isoflavonas agliconas. Algumas bactérias isoladas do intestino humano possuem a capacidade de hidrolisar o grupo glicosídeo das isoflavonas. O metabolismo de formononetina e biochanina A envolvem *O*-demetilação, o que leva a um aumento na extensão na ligação com as moléculas de estrogênio, presumivelmente através do grupo 4-hidroxil. No entanto, devido à baixa eficiência da demetilação anaeróbica

promovida por bactérias acetogênicas, existe grande a possibilidade de que as enzimas hepáticas possam ser capazes de demetilar as isoflavonas próestrogênicas formononetina e biochanina A (Tolleson *et al.*, 2002).

As formas ativas, genisteína e daidzeína, também podem ser derivadas de precursores como a biochanina A e formononetina, respectivamente, através de demetilação hepática. A excreção ocorre principalmente por via renal, sendo que uma pequena parte é eliminada através da vesícula biliar e intestino (Alves e Silva, 2002).

A pinocembrina possui atividade antioxidante, antibacteriana e anti-inflamatória. A avaliação do efeito protetor de neurônios pela pinocembrina foi demonstrada por Gaoa *et al.* (2008), através da inibição da liberação de lactato desidrogenase (LDH) e atenuação da apoptose. Foi demonstrado que a concentração de cálcio e a expressão do RNA mensageiro aumentam através da exposição de glutamato intracelularmente, porém esse aumento é atenuado na presença de pinocembrina, além de inibir a liberação do citocromo c da mitocôndria para o citoplasma (Gaoa *et al.*, 2008). Além disso, a pinocembrina tem efeitos bacteriostáticos, antimicrobianos e anestésico local (Villanueva *et al.*, 1970; Metzner *et al.*, 1979).

Foi demonstrado que isoliquiritigenina inibe o crescimento de câncer prostático (Kanazawa *et al.*, 2003), e a atividade da enzima xantina oxidase. A inibição da xantina oxidase foi sugerida para uso no tratamento de hepatites e tumores cerebrais, porque aumenta o nível de xantina oxidase sérica (Kong *et al.*, 2000).

Foi mostrado que a isoliquiritigenina tem atividade anti-alérgica dependendo da sua concentração. Foi estudado que a liquiritigenina inibe a atividade da enzima xantina oxidase causando os mesmos efeitos citados acima (Daugusch, 2007).

Formononetina é um isoflavonóide com atividade estrogênica e antifúngica. Foi demonstrado que quando mamíferos consomem essa isoflavona ela é metabolizada em daidzeína, que é um dos isoflavonóides agliconas presente na soja, que é utilizado na prevenção e tratamento dos sintomas da menopausa, e no tratamento de câncer de próstata e câncer de mama. O mesmo procedimento ocorre com a biochanina A, porém essa última é convertida em genisteína, que também é um dos isoflavonóides agliconas presente na soja, que é utilizado na prevenção e tratamento dos sintomas da menopausa, e no tratamento de câncer de próstata e câncer de mama. A própolis vermelha possui também o isoflavonóide daidzeína (Daugusch, 2007).

Dalbergina é um dos compostos que caracterizam o gênero *Dalbergia*, sendo encontradas em diversas espécies, tais como *Dalbergia odorífera* e *Dalbergia ecastophyllum* (Daugusch, 2007).

A própolis vermelha cubana foi testada como analgésica. *In vivo* uma concentração de 25 mg/kg a 40 mg/kg reduziu significativamente a sensibilidade de dor (Ledón *et al.*, 1997).

Foi mostrado que a própolis vermelha reduz os danos hepáticos significativamente devido à inibição da peroxidação da membrana lipídica e da formação de radicais livres. A atividade de AST, ALT e GSH foram reduzidas

quando a própolis foi aplicada (Gonzales *et al.*, 1995; Merino *et al.*, 1996; Rodriguez *et al.*, 1997).

4 Materiais e métodos

4.1 Coleta das amostras de própolis

Amostras de própolis do grupo 13 foram coletadas de cinco colméias da cidade de João Pessoa, no Estado da Paraíba nos meses de fevereiro, abril, julho, outubro e dezembro de 2008. 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 por possuir aberturas laterais na caixa, possibilitando maior facilidade para coleta, sendo colocadas nos lados da melgueira.

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

4.2 Extração dos compostos químicos da própolis coletados em diferentes épocas do ano

As amostras de própolis bruta, separadas por colméia de um apiário, foram trituradas em almofariz com pistilo. Amostras de dois gramas de própolis triturada foram pesadas em balança semi-analítica e transferidas para tubos de vidro Pyrex com tampa de rosca contendo 25 mL de etanol. As amostras foram mantidas a 70°C por 30 minutos, sob agitação constante. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 10000 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 4°C.

4.3 Espectrofotometria na região ultravioleta-visível

O espectro de máxima absorção dos extratos etanólicos de própolis (EEP), obtido como descrito no item 4.2 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.

4.4 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) RP18F₂₅₄S (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 à luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm, utilizando-se lâmpada UV Cole Parmer, modelo UVP-UVGL-58.

4.5 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). Alíquotas de vinte µL das amostras de extratos etanólicos de própolis 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) degaseificadas por hélio

(DGU-2A) e forno de colunas (CTO-10AS) com temperatura de 30°C. A fase móvel utilizada foi água/ ácido acético P.A. (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 autênticos (comprados da empresa Extrasynthese Co.) na região ultravioleta de 200 a 400 nm obtidos por meio do detector de arranjo de diodos (SPD-M10A).

4.6 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, v/ v 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, v/ v. Depois de 5 minutos de repouso foi adicionado 2 mL de solução 4% de carbonato de sódio e os tubos foram deixados em repouso por 2 horas no escuro total. Um tubo branco foi preparado substituindo-se 0,5 mL do extrato etanólico de própolis diluída por 0,5 mL de etanol e os resultados dos compostos fenólicos totais foram expressos como equivalente de ácido gálico (mg/ g de própolis).

4.7 Determinação de flavonóides totais

A determinação de flavonóides (flavonas, isoflavonas e flavonóis) dos extratos de própolis foi realizada pelo método colorimétrico pela complexação com cloreto de alumínio (Chang *et al.*, 2002). Amostras de 0,5 mL do extrato etanólico de própolis diluído 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 e água destilada. No tubo branco foi adicionado etanol 96% no lugar do extrato etanólico de própolis. Depois de 30 minutos, a absorvância das amostras foi medida em um espectrofotômetro Beckman Coulter modelo DU-640 a 434 nm e o conteúdo de flavonóides totais expresso em equivalentes de quercetina (mg/ g de própolis). 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 flavonóis pode ser determinada sem interferência de outras substâncias fenólicas, principalmente de ácidos fenólicos, mesmo que eles formem complexos com $AlCl_3$ devido a absorvância de luz desses compostos em comprimento de onda muito inferior a 434 nm (Marcucci *et al.*, 1998).

4.8 Determinação da atividade antiradical (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 em etanol (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.

4.9 Determinação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos extratos de própolis foi testada 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 incubadas por uma noite a 37°C. Para a preparação dos discos de papel, amostras de 30 µL de extratos etanólicos de própolis (2 g/ 25 mL de etanol) 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.

4.10 Isolamento e identificação dos principais compostos da própolis do grupo 13

Amostras de 300 g de própolis foram misturadas com 6 litros de metanol PA. e incubadas na temperatura de 70°C com agitação constante por 20 minutos e depois deixado à temperatura ambiente por 5 horas. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 10000 x g por 10 minutos, a 5°C em centrífuga Beckman Modelo J2-21 para obtenção dos sobrenadantes, que foram destiladas para evaporação do metanol e obtenção do extrato seco (Kumazawa *et al.*, 2007).

Foi pesado 10 g do extrato seco e foi misturado com 100 g de Sephadex LH-20. A mistura foi adicionada em coluna de 90 x 2,1 cm e eluída com velocidade de 0,6 mL por segundo (Ito *et al.*, 2001; Piccinelli *et al.*, 2005). Foi usado como eluente os compostos metanol (CH₃OH) e graduação com clorofórmio (CHCl₃) com velocidade de 0,6 mL por segundo para dar 153 frações com 10 mL cada. Essas 153 frações foram divididas em 9 frações através de sua similaridade espectrofotométrica e cromatográfica verificadas através de CLAE-FR e CCDAE-FR. Dessas 9 frações a fração de número 4 foi concentrada e misturada com Sephadex LH-20. Em seguida a mistura foi adicionada em coluna de 90 x 2,1 cm e eluída com velocidade de 0,6 mL por segundo resultando 77 frações com 10 mL cada. Dessas 77 frações as de número 46, 47 e 48 foram as que apresentaram a

formononetina (7-hidroxi-4'-metoxi-isoflavona), como principal composto, conforme análise por CLAE-FR e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (Chang *et al.*, 1994). A amostra de formononetina foi concentrada e testada quanto às atividades antirradical e antimicrobiana, conforme citado nos itens 4.8 e 4.9, respectivamente.

4.11 Análise estatística das amostras

As análises de variância foram determinadas pelo programa Minitab 15. A separação entre as médias dos dados foi realizada utilizando-se o teste de Tukey, com nível de confiança de 95%.

5 Resultados e Discussão

5.1 Extração etanólica de compostos fenólicos de própolis em diferentes épocas do ano

A extração etanólica de compostos fenólicos de própolis em diferentes épocas do ano foi obtida como descrito no item 4.2., onde cada colméia é representada por um número.

A Figura 1 ilustra as amostras dos extratos etanólicos de própolis do grupo 13 coletados no mês de fevereiro de 2008 em cinco colméias diferentes.

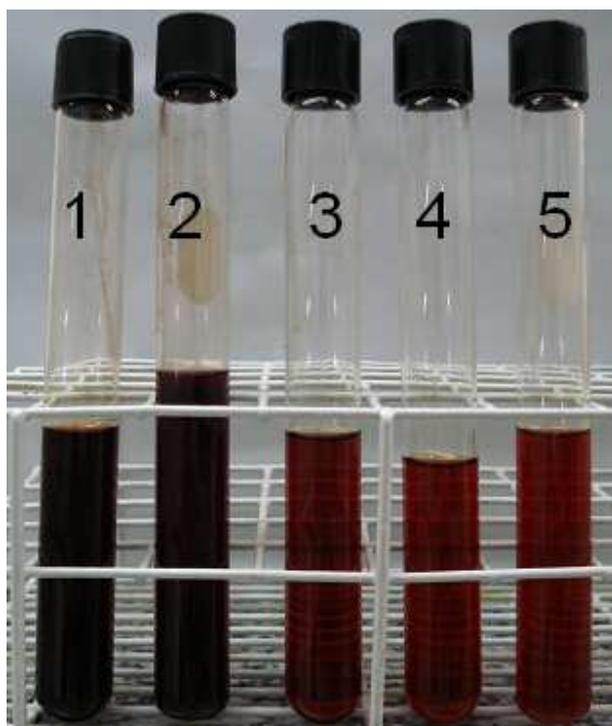


Figura 1 Extratos etanólicos de própolis do grupo 13 coletadas em fevereiro de 2008 em diferentes colméias, da cidade de João Pessoa - PB.

Foi observada pequena variação na coloração dos extratos etanólicos da própolis, onde as amostras de número 1 e 2 apresentaram cor vermelha mais intensa que as amostras de número 3, 4 e 5.

A Figura 2 ilustra as amostras dos extratos etanólicos de própolis do grupo 13 coletados no mês de abril de 2008 em cinco colméias diferentes.



Figura 2 Extratos etanólicos de própolis do grupo 13 coletadas em abril de 2008 em diferentes colméias, da cidade de João Pessoa - PB.

Foi observada grande variação na coloração dos extratos etanólicos da própolis, onde as amostras 1 e 4 apresentaram cor vermelha mais intensa que as amostras de número 3, 4 e 5.

A Figura 3 ilustra as amostras dos extratos etanólicos de própolis do grupo 13 coletados no mês de julho de 2008 em cinco colméias diferentes.



Figura 3 Extratos etanólicos de própolis do grupo 13 coletadas em julho de 2008 em diferentes colméias, da cidade de João Pessoa - PB.

Foi observada pequena variação na coloração dos extratos etanólicos da própolis, onde a amostra de número 1 apresentou coloração vermelha mais intensa.

A Figura 4 ilustra as amostras dos extratos etanólicos de própolis do grupo 13 coletados no mês de outubro de 2008 em cinco colméias diferentes.

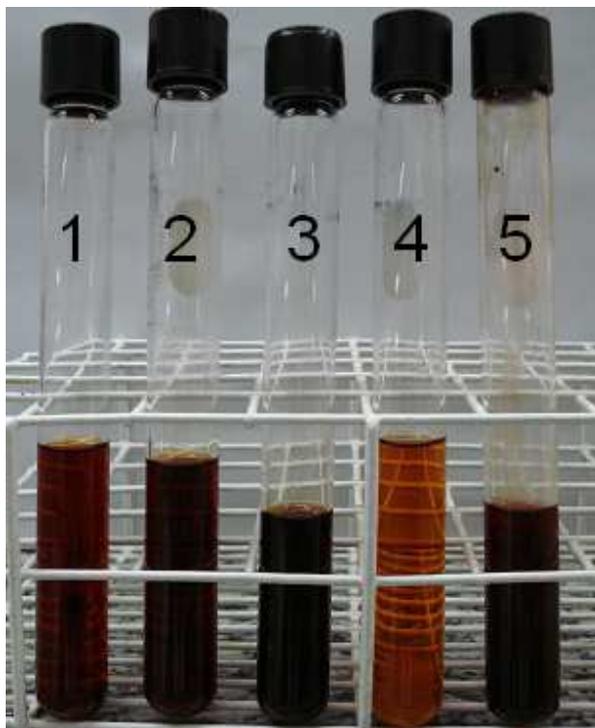


Figura 4 Extratos etanólicos de própolis do grupo 13 coletadas em outubro de 2008 em diferentes colméias, da cidade de João Pessoa - PB.

Foi observada grande variação na coloração dos extratos etanólicos da própolis, onde as amostras de número 2, 3 e 5 apresentaram cor vermelha mais intensa.

A Figura 5 ilustra as amostras dos extratos etanólicos de própolis do grupo 13 coletados no mês de dezembro de 2008 em cinco colméias diferentes.



Figura 5 Extratos etanólicos de própolis do grupo 13 coletadas em dezembro de 2008 em diferentes colméias, da cidade de João Pessoa - PB.

Foi observada pequena variação na coloração dos extratos etanólicos da própolis, onde a amostra de número 2 apresentou coloração vermelha mais intensa.

Os extratos etanólicos de própolis do grupo 13 coletados nos meses de abril e outubro de 2008 em João Pessoa – PB apresentaram grande variação de cor, enquanto que os extratos de própolis coletados nos meses de fevereiro, julho e dezembro de 2008 mostraram poucas variações quanto à coloração.

Segundo Dausch (2007), a própolis do Nordeste pode apresentar variação de cor devido à presença de outras origens botânicas além da *D. ecastophyllum*, ou redução da quantidade de resina encontrada pelas abelhas. Além disso, foi

demonstrada que a quantidade de resina de *D. ecastophyllum* é proporcional a atividade biológica da própolis vermelha.

Não foi observada nenhuma relação da coloração dos extratos etanólicos de própolis (Figuras 1-5) com a quantidade de compostos fenólicos presentes no mesmo (Figura 21-25). Além disso, foi possível observar que a própolis vermelha do grupo 13 pode apresentar cor amarelada e diversos tons de vermelho.

5.2 Espectrofotometria na região ultravioleta-visível de extratos etanólicos de própolis do grupo 13, coletas em diferentes épocas do ano

O espectro de absorção de UV é um dos parâmetros físico-químicos mais utilizados para se avaliar própolis, pois as suas atividades farmacológicas têm sido atribuídas a compostos fenólicos, tais como flavonóides, os quais absorvem luz nesta região do ultravioleta (Castro *et al.*, 2007).

A Figura 6 ilustra os espectros de absorção UV-VIS dos extratos etanólicos das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletados no mês de fevereiro de 2008. As amostras com maior absorção de luz ultravioleta foram as de número 1, 2 e 3, mostrando variações de absorção de luz ultravioleta conforme a colméia.

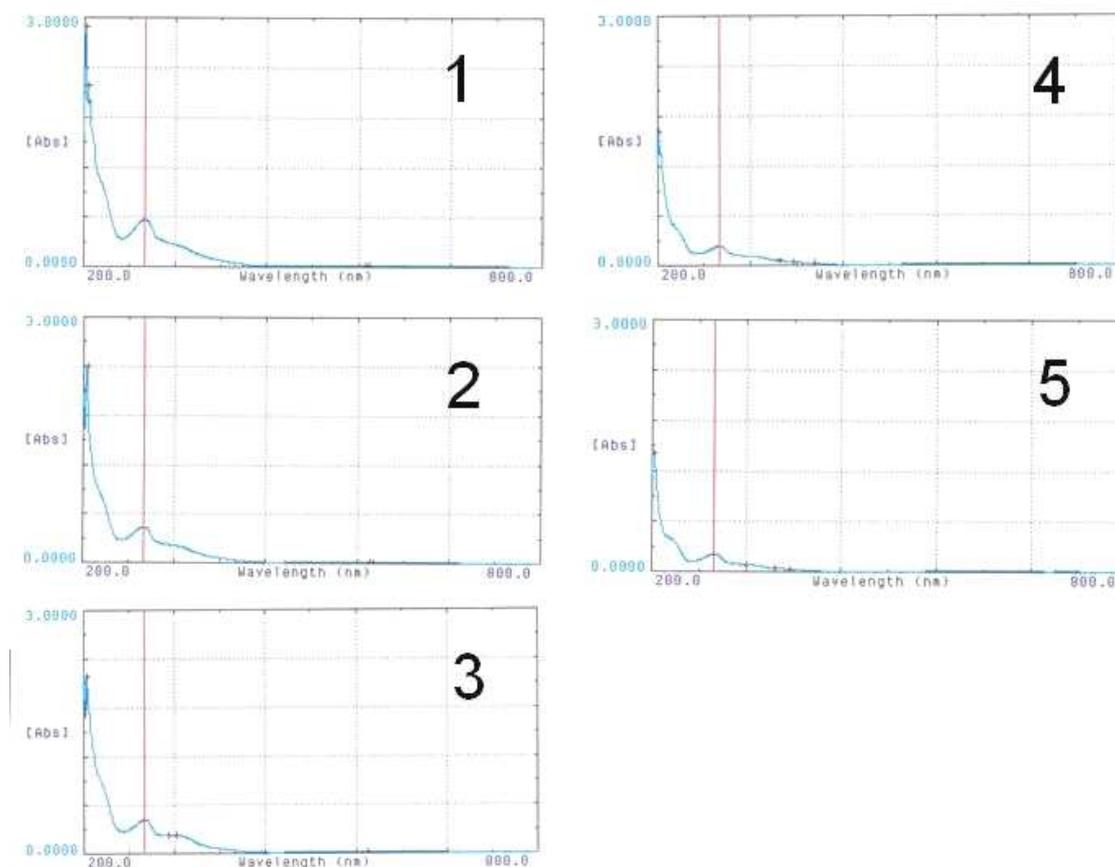


Figura 6 Espectrofotometria UV-VIS dos extratos etanólicos de própolis do grupo 13 coletadas em fevereiro de 2008 em diferentes colméias, na cidade de João Pessoa - PB.

A Figura 7 ilustra os espectros de absorção UV-VIS das cinco amostras dos extratos etanólicos das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletados no mês de abril. A amostra com maior absorção de luz ultravioleta foi a de número 4, mostrando variações de absorção de luz ultravioleta conforme a colméia.

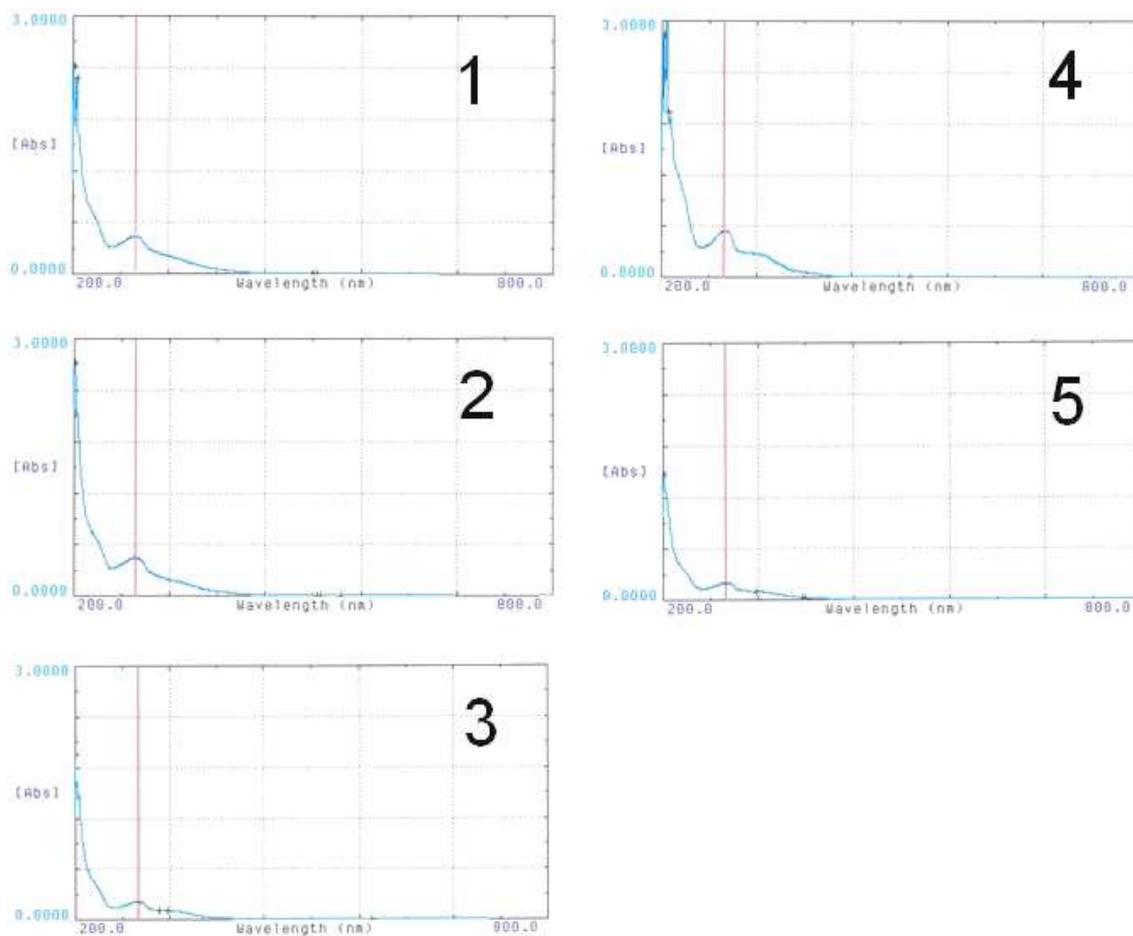


Figura 7 Espectrofotometria UV-VIS dos extratos etanólicos de própolis do grupo 13 coletadas em abril de 2008 em diferentes colméias, da cidade de João Pessoa - PB.

A Figura 8 ilustra os espectros de absorção UV-VIS dos extratos etanólicos das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletados no mês de julho. As amostras apresentaram absorção de luz ultravioleta semelhantes, em que somente a amostra de número 2 apresentou baixa absorção de luz ultravioleta. A amostra número 5 se destacou apresentando maior absorção de luz ultravioleta, comparada com as amostras de própolis coletadas nos meses de fevereiro, abril, julho, outubro e dezembro de 2008.

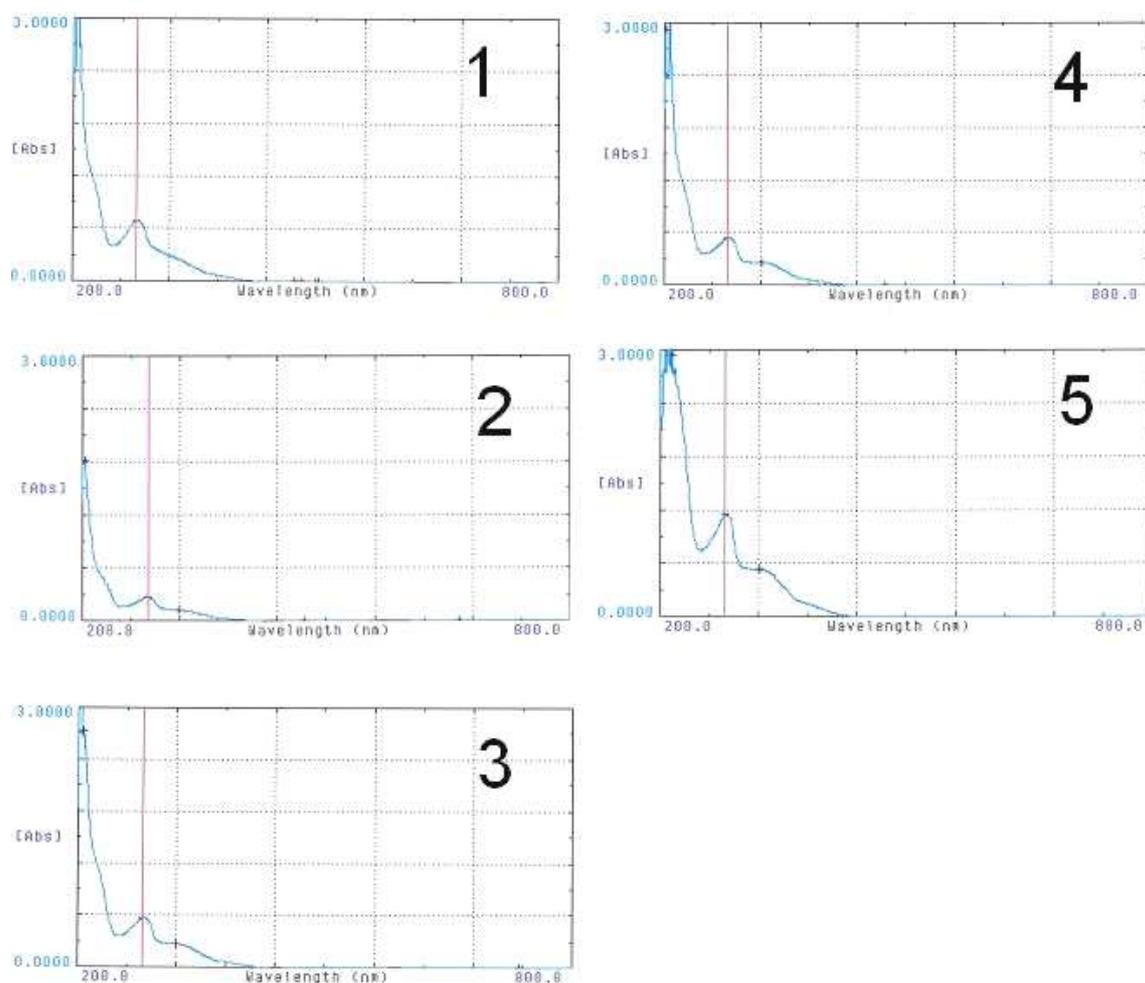


Figura 8 Espectrofotometria UV-VIS dos extratos etanólicos de própolis do grupo 13 coletadas em julho de 2008 em diferentes colméias, da cidade de João Pessoa - PB.

A Figura 9 ilustra os espectros de absorção UV-VIS dos extratos etanólicos das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletados no mês de outubro. As amostras com maior absorção de luz ultravioleta foram as de número 1 e 3, mostrando variações de absorção de luz ultravioleta conforme a colméia.

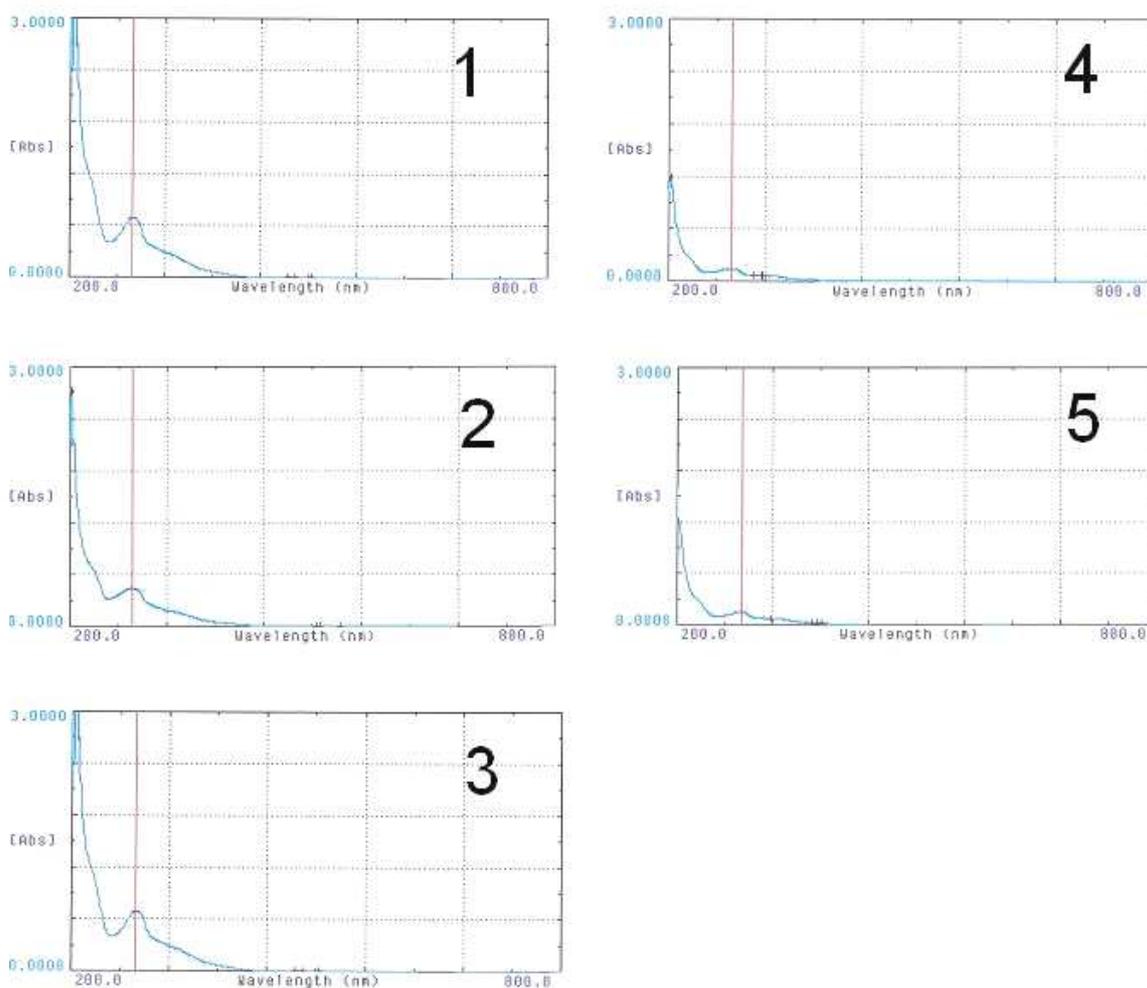


Figura 9 Espectrofotometria UV-VIS dos extratos etanólicos de própolis do grupo 13 coletadas em outubro de 2008 em diferentes colméias, da cidade de João Pessoa - PB.

A Figura 10 ilustra os espectros de absorção UV-VIS dos extratos etanólicos das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletados no mês de

dezembro. As amostras com maior absorção de luz ultravioleta foram as de número 3, 4 e 5, mostrando variações de absorção de luz ultravioleta conforme a colméia.

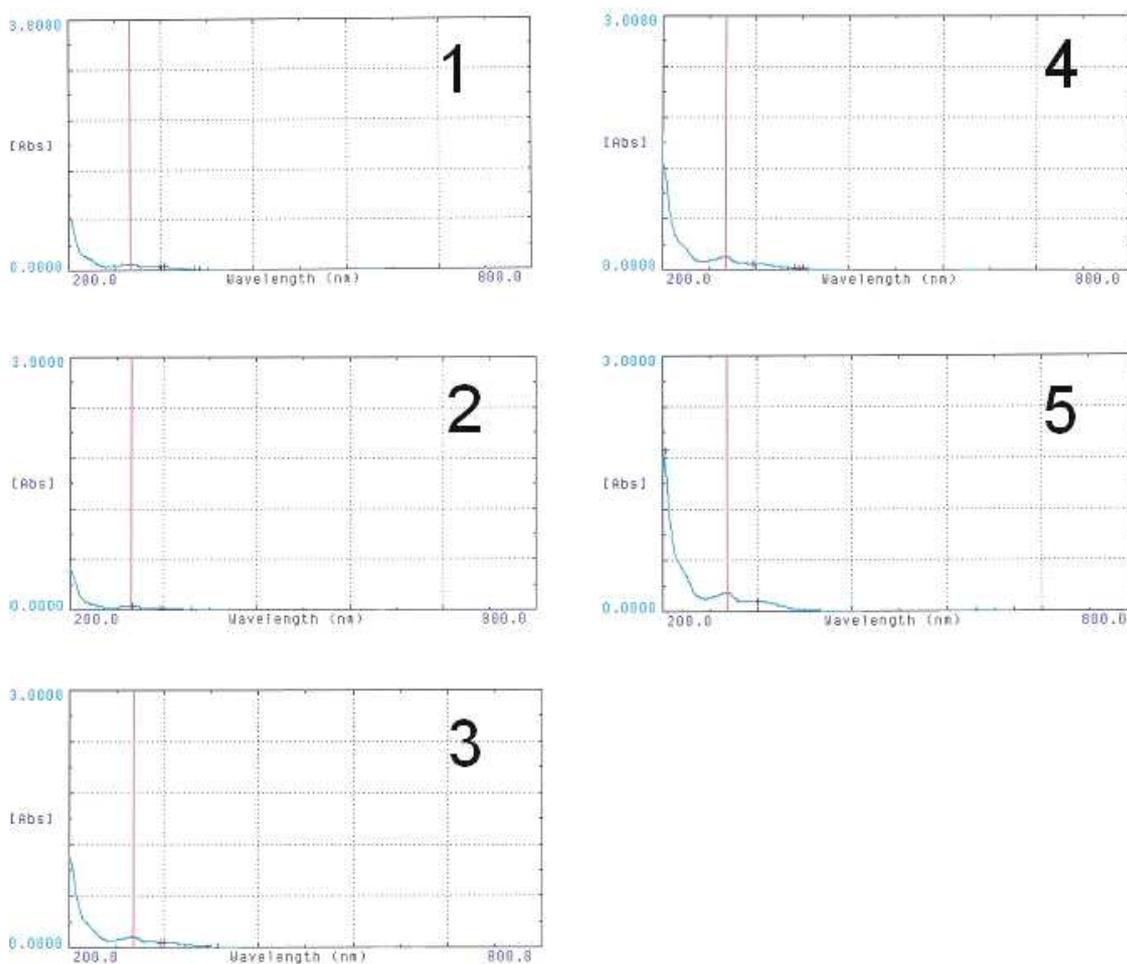


Figura 10 Espectrofotometria UV-VIS dos extratos etanólicos de própolis do grupo 13 coletadas em dezembro de 2008 em diferentes colméias, da cidade de João Pessoa - PB.

Castro *et al.* (2007) observou que dois tipos distintos de própolis apresentaram um perfil de absorção totalmente distinto e com absorbâncias máximas nos comprimentos de onda de 279 e 302 nm, respectivamente, faixas de absorção para compostos fenólicos. A absorbância máxima de uma amostra de

própolis, cerca de 3 vezes menor que a outra, indicou menor concentração de fenólicos.

Daugusch (2007) verificou através de análises espectrofotométricas por espectro de absorção UV-VIS, que amostras de própolis do estado de Alagoas apresentaram variações quanto à quantidade de flavonóides presentes. Foi mostrado que as amostras que continham maior quantidade flavonóides, continham também maior quantidade de resina de *D. ecastophyllum*.

Todas as amostras de extratos etanólicos de própolis do grupo 13 coletadas nos meses de fevereiro, abril, julho, outubro e dezembro de 2008 apresentaram grande variação quanto à absorção de luz ultravioleta conforme a colméia e época do ano. As amostras com maiores absorções de luz ultravioleta foram as do mês de julho por possuírem maiores quantidades de compostos fenólicos.

5.3 Cromatografia em camada delgada de alta eficiência em fase reversa (CCDAE-FR) de extratos etanólicos de própolis em diferentes épocas do ano

A Figura 11 ilustra os perfis cromatográficos dos extratos etanólicos das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas no mês de fevereiro de 2008, em placas de camada delgada RP18F₂₅₄S. As amostras com maior absorção de luz ultravioleta foram as de número 1, 2 e 3, mostrando variações de absorção de luz ultravioleta conforme a colméia.



Figura 11 CCDAE-FR dos extratos etanólicos de cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em fevereiro de 2008 em diferentes colméias, da cidade de João Pessoa - PB.

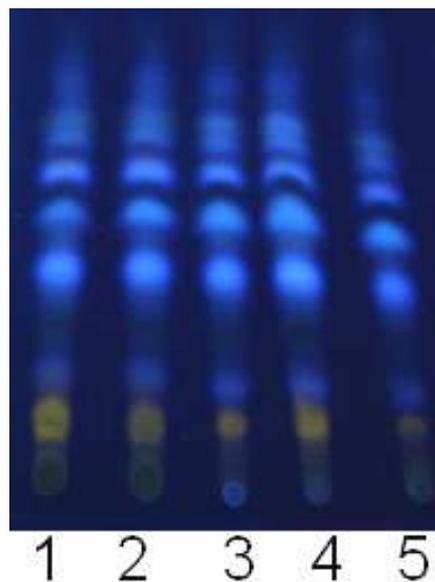


Figura 12 CCDAE-FR dos extratos etanólicos de cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em abril de 2008 em diferentes colméias, da cidade de João Pessoa - PB.

A Figura 12 ilustra os perfis cromatográficos dos extratos etanólicos das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas no mês de abril de 2008, em placas de camada delgada RP18F₂₅₄S. A amostra com maior absorção de luz

ultravioleta foi a de número 4, mostrando variações de absorção de luz ultravioleta conforme a colméia.



Figura 13 CCDAE-FR dos extratos etanólicos de cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em julho de 2008 em diferentes colméias, da cidade de João Pessoa - PB.

A Figura 13 ilustra os perfis cromatográficos dos extratos etanólicos das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas no mês de julho de 2008, em placas de camada delgada RP18F₂₅₄S. A amostra com maior absorção de luz ultravioleta foi a de número 5, mostrando variações de absorção de luz ultravioleta conforme a colméia.

A Figura 14 ilustra os perfis cromatográficos dos extratos etanólicos das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas no mês de outubro de 2008, em placas de camada delgada RP18F₂₅₄S. As amostras com maior absorção de luz ultravioleta foram as de número 1 e 3, mostrando variações de absorção de luz ultravioleta conforme a colméia.



Figura 14 CCDAE-FR dos extratos etanólicos de cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em outubro de 2008 em diferentes colméias, da cidade de João Pessoa - PB.

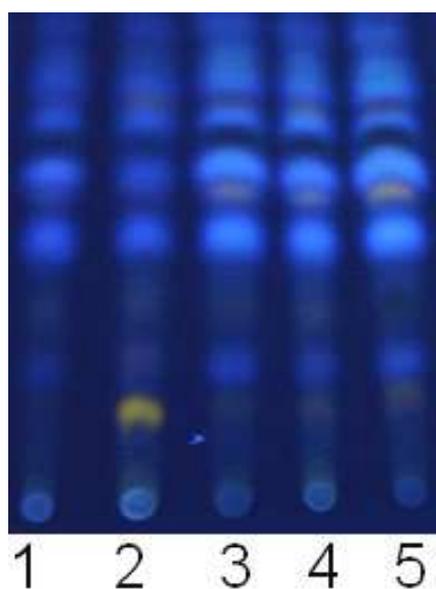


Figura 15 CCDAE-FR dos extratos etanólicos de cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em dezembro de 2008 em diferentes colméias, da cidade de João Pessoa - PB.

A Figura 15 ilustra os perfis cromatográficos dos extratos etanólicos das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas no mês de dezembro de 2008, em placas de camada delgada RP18F₂₅₄S. As amostras com maior absorção de

luz ultravioleta foram as de número 3, 4 e 5, mostrando variações de absorção de luz ultravioleta conforme a colméia.

Foram realizadas análises cromatográficas em camada delgada de alta eficiência em fase reversa de nove extratos etanólicos de amostras de própolis vermelha da Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia, resina avermelhada de *Rizophora mangle*, resina amarela de *Rizophora mangle*, casca com resina amarela de *Rizophora mangle* e resina de *D. ecastophyllum* e foi verificado que todas as amostras de própolis apresentaram grande similaridade com a resina de *D. ecastophyllum*, o mesmo não acontecendo com a resina e casca de *Rizophora mangle*. Foi verificado que as amostras que continham maior absorção de luz UV, apresentavam maior quantidade de flavonóides (Daugusch, 2007).

As amostras de extratos etanólicos de própolis do grupo 13 coletadas nos meses de fevereiro, abril, julho, outubro e dezembro de 2008 apresentaram grande variação quanto à absorção de luz ultravioleta conforme a colméia e mês. As amostras com maiores absorções de luz ultravioleta foram as do mês de julho de 2008. Conseqüentemente as amostras do mês de julho mostraram maiores quantidades de flavonóides.

5.4 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) de extratos etanólicos de própolis em diferentes épocas do ano

Foram identificados na própolis vermelha do grupo 13 através da comparação direta com padrões autênticos comprados da empresa Extrasynthese Co. Os compostos: rutina, liquiritigenina, daidzeína, pinobanksina, quercetina, luteolina, dalbergina, isoliquiritigenina, formononetina, pinocembrina, pinobanksin-

3-acetato e biochanina A. O composto que apresentou maior quantidade nas amostras analisadas foi a formononetina.

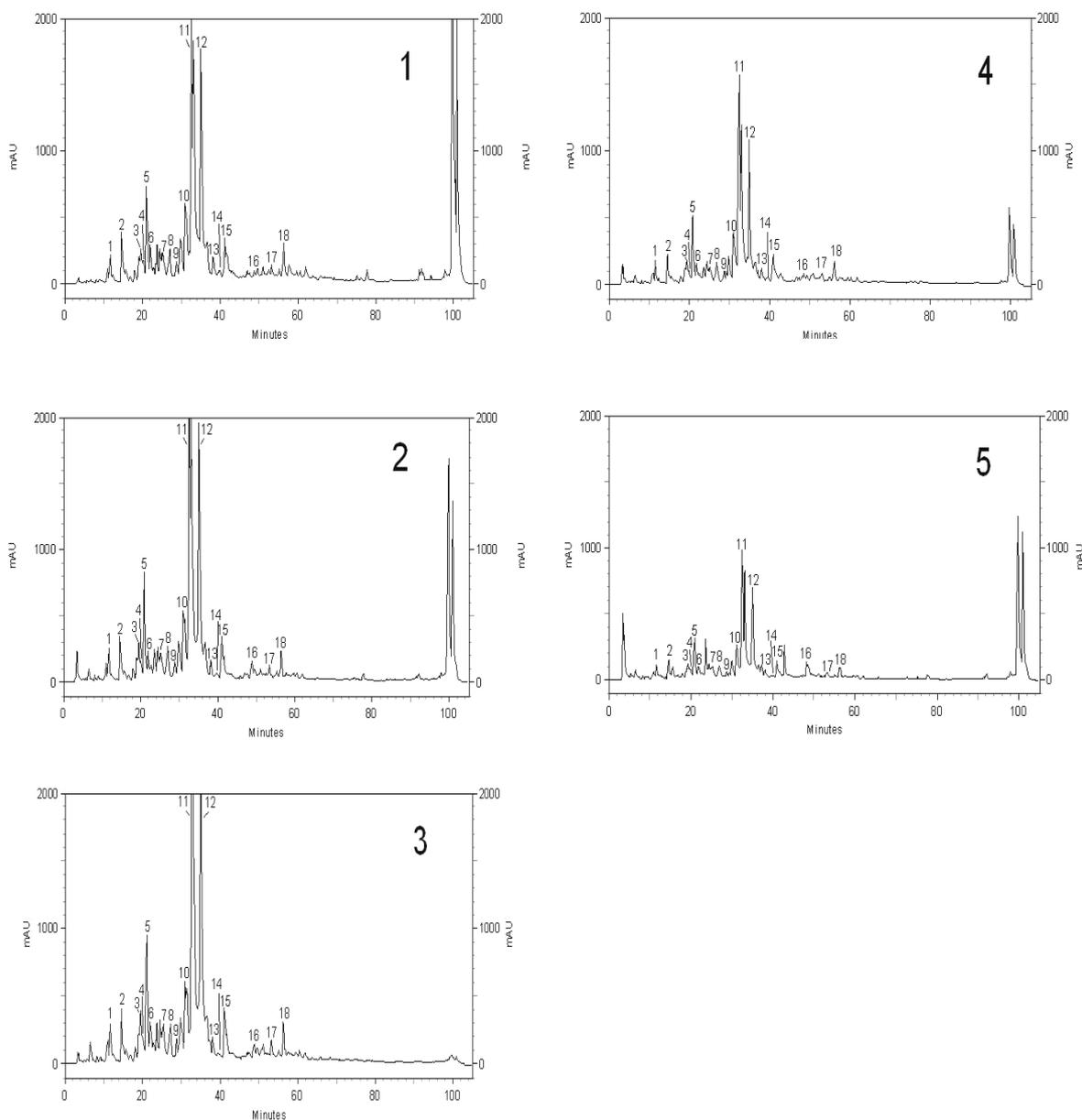


Figura 16 CLAE-FR dos extratos etanólicos das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em fevereiro de 2008 em diferentes colméias, da cidade de João Pessoa - PB.

A Figura 16 ilustra os perfis cromatográficos dos extratos etanólicos das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas no mês de fevereiro de 2008. A

Tabela 1 mostra as quantidades dos principais compostos fenólicos encontrados nas cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas no mês de fevereiro de 2008.

Foi verificado que existe variação na quantidade de flavonóides e outros compostos fenólicos nas amostras de própolis coletadas de diferentes colméias. As amostras de maior destaque foram as de número 1, 2 e 3, que apresentaram maiores quantidades de flavonóides e outros compostos fenólicos. O resultado apresentado foi similar aos resultados apresentados na espectrofotometria UV-VIS e CCDAE-FR.

Tabela 1 Flavonóides e outros compostos fenólicos dos extratos etanólicos de cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em fevereiro de 2008 em diferentes colméias determinados por comparação com padrões obtidos da empresa Extrasynthese Co.

Pico	Tempo de retenção (min)	Compostos	Amostra 1 ^a	Amostra 2 ^a	Amostra 3 ^a	Amostra 4 ^a	Amostra 5 ^a
			Quantidade (mg/g)				
1	13.42	Rutina	1,0	1,1	1,3	0,8	0,5
2	16.99	Liquiritigenina	3,1	2,7	4,3	2,5	1,4
3	20.63	Daiczeína	0,5	0,5	0,7	0,4	0,2
4	22.35	Pinobanksina	3,3	2,7	3,7	1,8	1,1
5	23.84	UV λ 251, 292 nm ^b	+	+	+	+	+
6	24.59	Quercetina	1,9	1,6	2,3	1,2	0,7
7	28.40	Luteolina	0,7	0,7	1,0	0,6	1,0
8	30.46	UV λ 241, 272, 282 nm ^b	+	+	+	+	+
9	32.15	Dalbergina	0,9	1,0	1,5	0,8	2,8
10	34.62	Isoliquiritigenina	9,7	5,1	6,2	3,3	3,6
11	36.97	Formononetina	5,8	6,2	7,1	4,6	3,1
12	39.28	UV λ 235, 263 nm ^b	+	+	+	+	+
13	40.08	Pinocembrina	6,7	5,2	7,8	4,9	2,0
14	42.30	Pinobanksin-3-acetato	2,0	1,4	2,0	1,5	0,4
15	46.45	Biochanina A	1,1	1,1	1,5	0,8	0,4
16	55.96	UV λ 238, 260, 269 nm ^b	+	+	+	+	+
17	60.53	UV λ 233, 249, 329 nm ^b	+	+	+	+	+
18	63.43	UV λ 233, 256 nm ^b	+	+	+	+	+

a Quantidade dos constituintes em mg/g de própolis.

Símbolos: "+" = presente, mas não quantificado.

b Constituintes não identificados representados somente pelo espectro de absorbância máxima UV.

A Figura 17 ilustra os perfis cromatográficos dos extratos etanólicos de cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas no mês de abril de 2008. A Tabela 2 mostra as quantidades dos principais compostos fenólicos encontrados nas cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas no mês de abril de 2008.

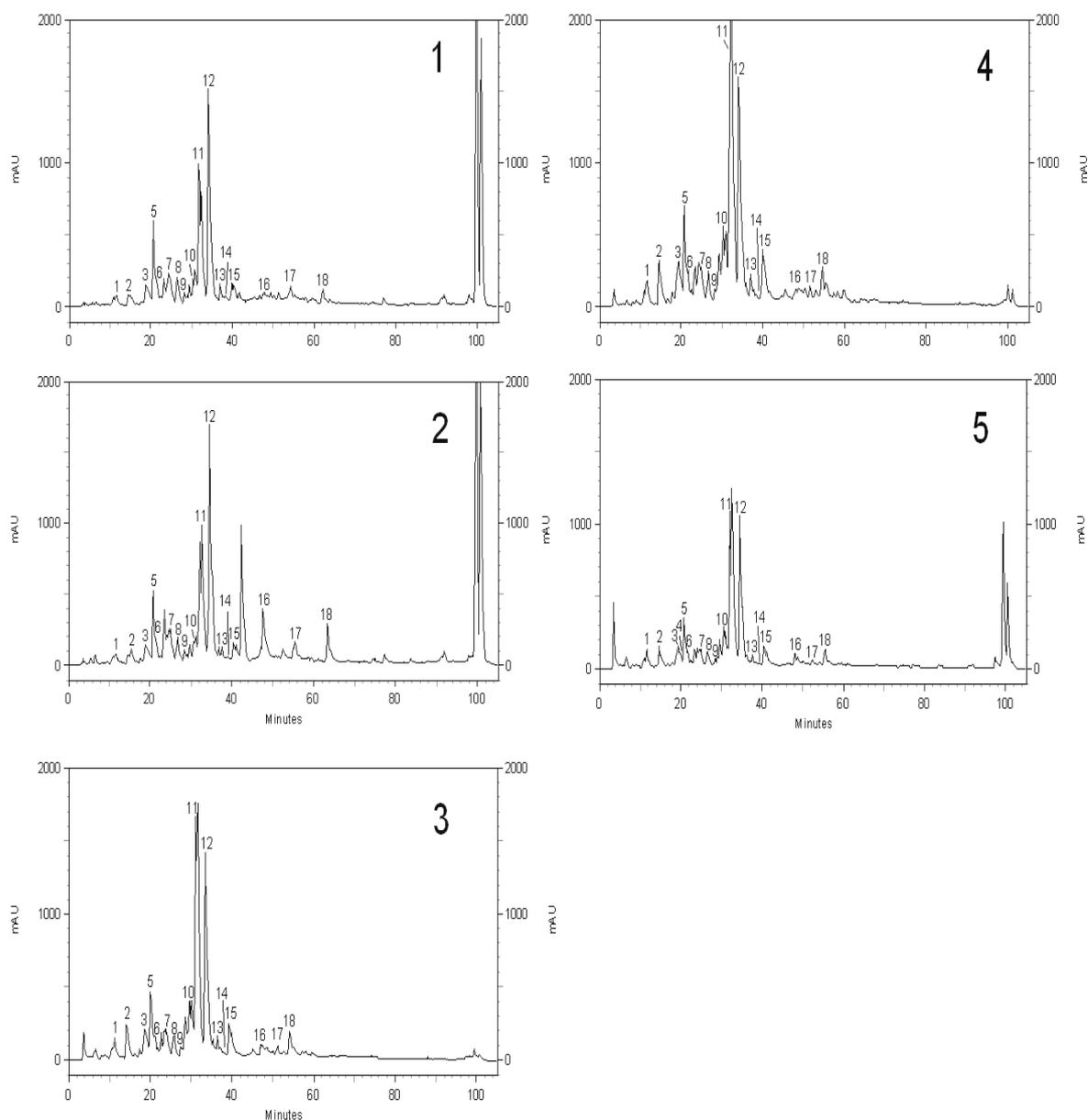


Figura 17 CLAE-FR dos extratos etanólicos das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em abril de 2008 em diferentes colméias, da cidade de João Pessoa - PB.

Foi verificado que existe variação na quantidade de flavonóides e outros compostos fenólicos nas amostras de própolis coletadas de diferentes colméias. A amostra de maior destaque foi a de número 4 que apresentou maior quantidade de flavonóides e outros compostos fenólicos similarmente aos resultados apresentados na espectrofotometria UV-VIS e CCDAE-FR.

Tabela 2 Flavonóides e outros compostos fenólicos dos extratos etanólicos de cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em abril de 2008 em diferentes colméias determinados por comparação com padrões obtidos da empresa Extrasynthese Co.

Pico	Tempo de retenção (min)	Compostos	Amostra 1ª	Amostra 2ª	Amostra 3ª	Amostra 4ª	Amostra 5ª
			Quantidade (mg/g)				
1	13.42	Rutina	0,8	0,9	1,4	1,8	1,0
2	16.99	Liquiritigenina	0,9	0,7	4,3	6,3	1,4
3	20.63	Daidzeina	0,6	0,5	0,8	1,2	0,4
4	22.35	Pinobanksina	-	-	-	-	2,2
5	23.84	UV λ 251, 292 nm ^b	+	+	+	+	+
6	24.59	Quercetina	2,0	0,4	0,9	1,5	0,6
7	28.40	Luteolina	2,2	1,2	1,0	1,5	0,6
8	30.46	UV λ 241, 272, 282 nm ^b	+	+	+	+	+
9	32.15	Dalbergina	0,7	0,6	0,3	0,5	0,3
10	34.62	Isoliquiritigenina	1,9	1,4	5,1	7,3	2,9
11	36.97	Formononetina	3,2	2,9	4,2	6,2	3,1
12	39.28	UV λ 235, 263 nm ^b	+	+	+	+	+
13	40.08	Pinocembrina	4,5	4,3	4,2	6,4	2,3
14	42.30	Pinobanksin-3-acetato	2,6	1,0	1,5	2,7	0,6
15	46.45	Biochanina A	0,7	0,5	0,8	1,4	0,6
16	55.96	UV λ 238, 260, 269 nm ^b	+	+	+	+	+
17	60.53	UV λ 233, 249, 329 nm ^b	+	+	+	+	+
18	63.43	UV λ 233, 256 nm ^b	+	+	+	+	+

a Quantidade dos constituintes em mg/g de própolis.

Símbolos: "+" = presente, mas não quantificado.

b Constituintes não identificados representados somente pelo espectro de absorbância máxima UV.

A Figura 18 ilustra os perfis cromatográficos dos extratos etanólicos de cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas no mês de julho de 2008. A Tabela 3 mostra as quantidades dos principais compostos fenólicos encontrados nas cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas no mês de julho de 2008.

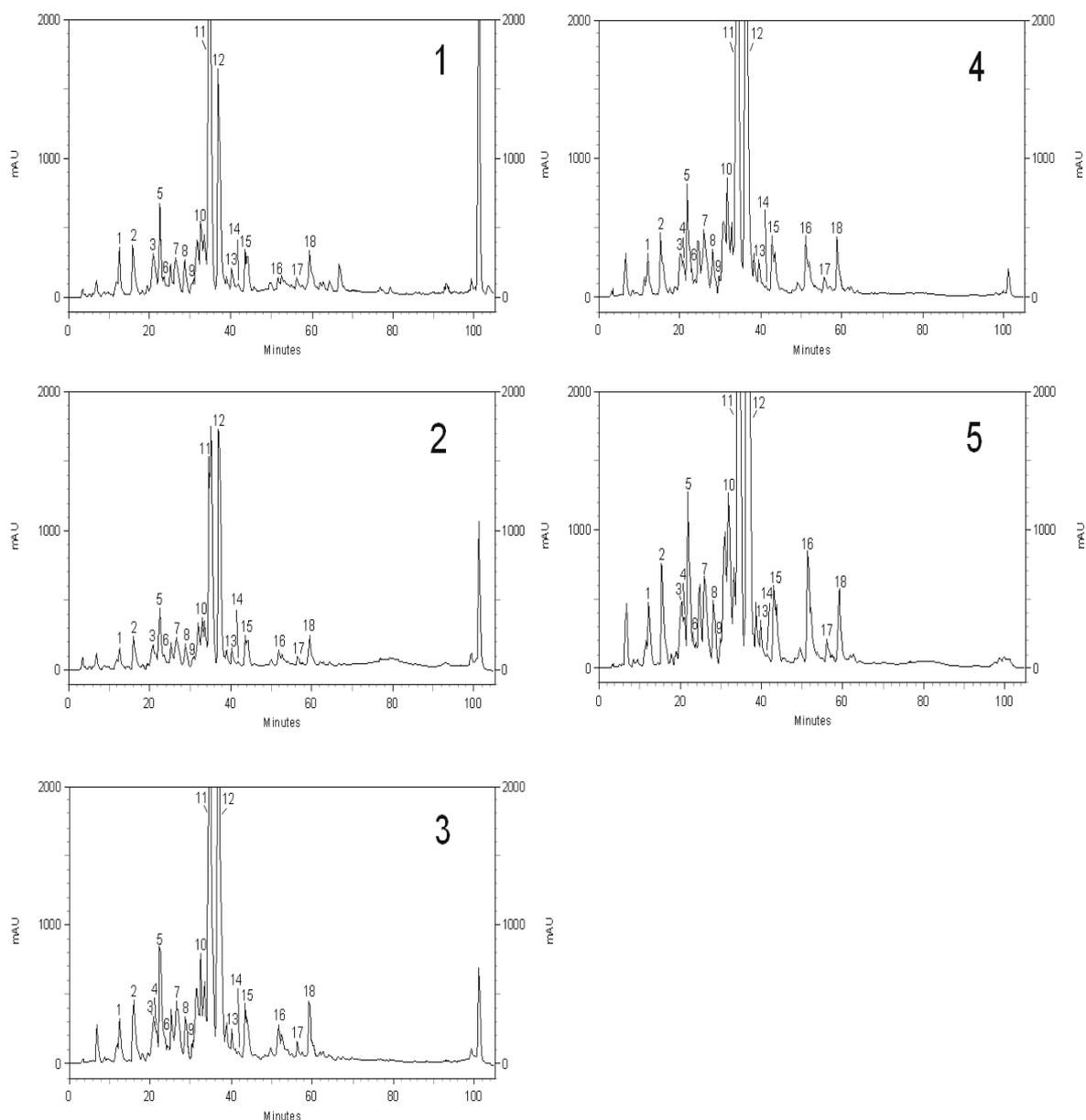


Figura 18 CLAE-FR dos extratos etanólicos das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em julho de 2008 em diferentes colméias, da cidade de João Pessoa - PB.

Foi verificado que existe variação na quantidade de flavonóides e outros compostos fenólicos nas amostras de própolis coletadas de diferentes colméias. As amostras que apresentaram maiores quantidades de flavonóides e outros compostos fenólicos foram as de número 3, 4 e 5. A amostra de própolis de número 5 se destacou entre as amostras de todas as épocas coletadas no ano de

2008, apresentando a maior quantidade de flavonóides e outros compostos fenólicos.

Tabela 3 Flavonóides e outros compostos fenólicos dos extratos etanólicos de cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em julho de 2008 em diferentes colméias determinados por comparação com padrões obtidos da empresa Extrasynthese Co.

Pico	Tempo de retenção (min)	Compostos	Amostra 1 ^a	Amostra 2 ^a	Amostra 3 ^a	Amostra 4 ^a	Amostra 5 ^a
			Quantidade (mg/g)				
1	13.42	Rutina	2,6	1,3	2,6	2,6	3,9
2	16.99	Liquiritigenina	6,5	4,5	8,6	8,9	13,8
3	20.63	Daiczeina	1,0	0,7	1,0	0,8	1,3
4	22.35	Pinobanksina	-	-	4,3	6,3	8,3
5	23.84	UV λ 251, 292 nm ^b	+	+	+	+	+
6	24.59	Quercetina	0,9	0,6	1,1	1,2	1,5
7	28.40	Luteolina	2,3	2,0	2,0	4,3	5,4
8	30.46	UV λ 241, 272, 282 nm ^b	+	+	+	+	+
9	32.15	Dalbergina	0,5	0,4	0,6	0,7	0,9
10	34.62	Isoliquiritigenina	7,1	4,4	10,7	12,1	21,8
11	36.97	Formononetina	6,0	8,1	21,5	23,7	16,0
12	39.28	UV λ 235, 263 nm ^b	+	+	+	+	+
13	40.08	Pinocembrina	5,6	3,5	7,0	3,5	12,7
14	42.30	Pinobanksin-3-acetato	1,6	0,6	2,6	0,4	2,9
15	46.45	Biochanina A	1,1	0,9	1,4	1,5	2,1
16	55.96	UV λ 238, 260, 269 nm ^b	+	+	+	+	+
17	60.53	UV λ 233, 249, 329 nm ^b	+	+	+	+	+
18	63.43	UV λ 233, 256 nm ^b	+	+	+	+	+

a Quantidade dos constituintes em mg/g de própolis.

Símbolos: "+" = presente, mas não quantificado.

b Constituintes não identificados representados somente pelo espectro de absorvância máxima UV.

A Figura 19 ilustra os perfis cromatográficos dos extratos etanólicos das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas no mês de outubro de 2008. A Tabela 4 mostra as quantidades dos principais compostos fenólicos encontrados nas cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas no mês de outubro de 2008.

Foi verificado que existe variação na quantidade de flavonóides e outros compostos fenólicos nas amostras de própolis coletadas de diferentes colméias. As amostras de maior destaque foram as de número 1 e 3, que apresentaram maiores quantidades de flavonóides e outros compostos fenólicos. O resultado

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

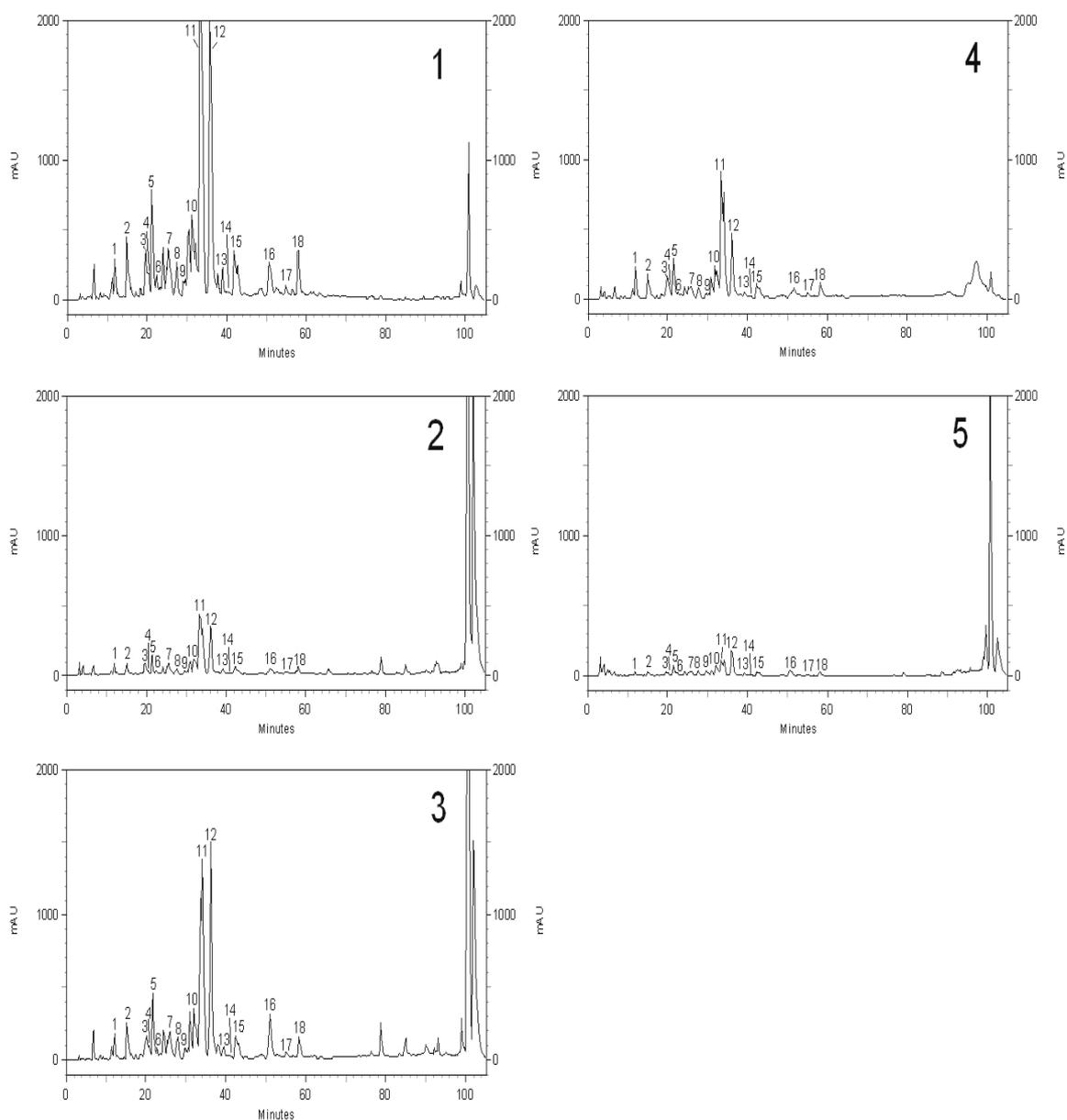


Figura 19 CLAE-FR dos extratos etanólicos das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em outubro de 2008 em diferentes colméias, da cidade de João Pessoa - PB.

Tabela 4 Flavonóides e outros compostos fenólicos dos extratos etanólicos de cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em outubro de 2008 em diferentes colméias determinados por comparação com padrões obtidos da empresa Extrasynthese Co.

Pico	Tempo de retenção (min)	Compostos	Amostra 1 ^a	Amostra 2 ^a	Amostra 3 ^a	Amostra 4 ^a	Amostra 5 ^a
			Quantidade (mg/g)				
1	13.42	Rutina	1,3	0,4	0,8	1,3	0,1
2	16.99	Liquiritigenina	5,6	0,8	3,0	2,3	0,3
3	20.63	Daiczeina	0,9	0,3	0,4	0,5	0,1
4	22.35	Pinobanksina	3,7	0,9	1,8	0,7	0,3
5	23.84	UV λ 251, 292 nm ^b	+	+	+	+	+
6	24.59	Quercetina	5,2	1,0	3,0	2,0	0,4
7	28.40	Luteolina	1,4	0,6	1,2	0,3	0,2
8	30.46	UV λ 241, 272, 282 nm ^b	+	+	+	+	+
9	32.15	Dalbergina	0,6	0,2	0,6	0,2	0,3
10	34.62	Isoliquiritigenina	8,2	2,5	4,0	2,1	1,4
11	36.97	Formononetina	11,1	1,9	6,2	3,1	0,5
12	39.28	UV λ 235, 263 nm ^b	+	+	+	+	+
13	40.08	Pinocembrina	2,5	0,1	1,9	0,1	0,1
14	42.30	Pinobanksin-3-acetato	5,4	1,3	1,3	1,1	0,2
15	46.45	Biochanina A	1,2	0,3	0,7	0,4	0,1
16	55.96	UV λ 238, 260, 269 nm ^b	+	+	+	+	+
17	60.53	UV λ 233, 249, 329 nm ^b	+	+	+	+	+
18	63.43	UV λ 233, 256 nm ^b	+	+	+	+	+

a Quantidade dos constituintes em mg/g de própolis.

Símbolos: "+" = presente, mas não quantificado.

b Constituintes não identificados representados somente pelo espectro de absorvância máxima UV.

A Figura 20 ilustra os perfis cromatográficos dos extratos etanólicos das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas no mês de dezembro de 2008. A Tabela 5 mostra as quantidades dos principais compostos fenólicos encontrados nas cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas no mês de dezembro de 2008.

Foi verificado que existe variação na quantidade de flavonóides e outros compostos fenólicos nas amostras de própolis coletadas de diferentes colméias. As amostras de maior destaque foram as de número 3 e 5 que apresentaram maiores quantidades de flavonóides e outros compostos fenólicos. O resultado

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

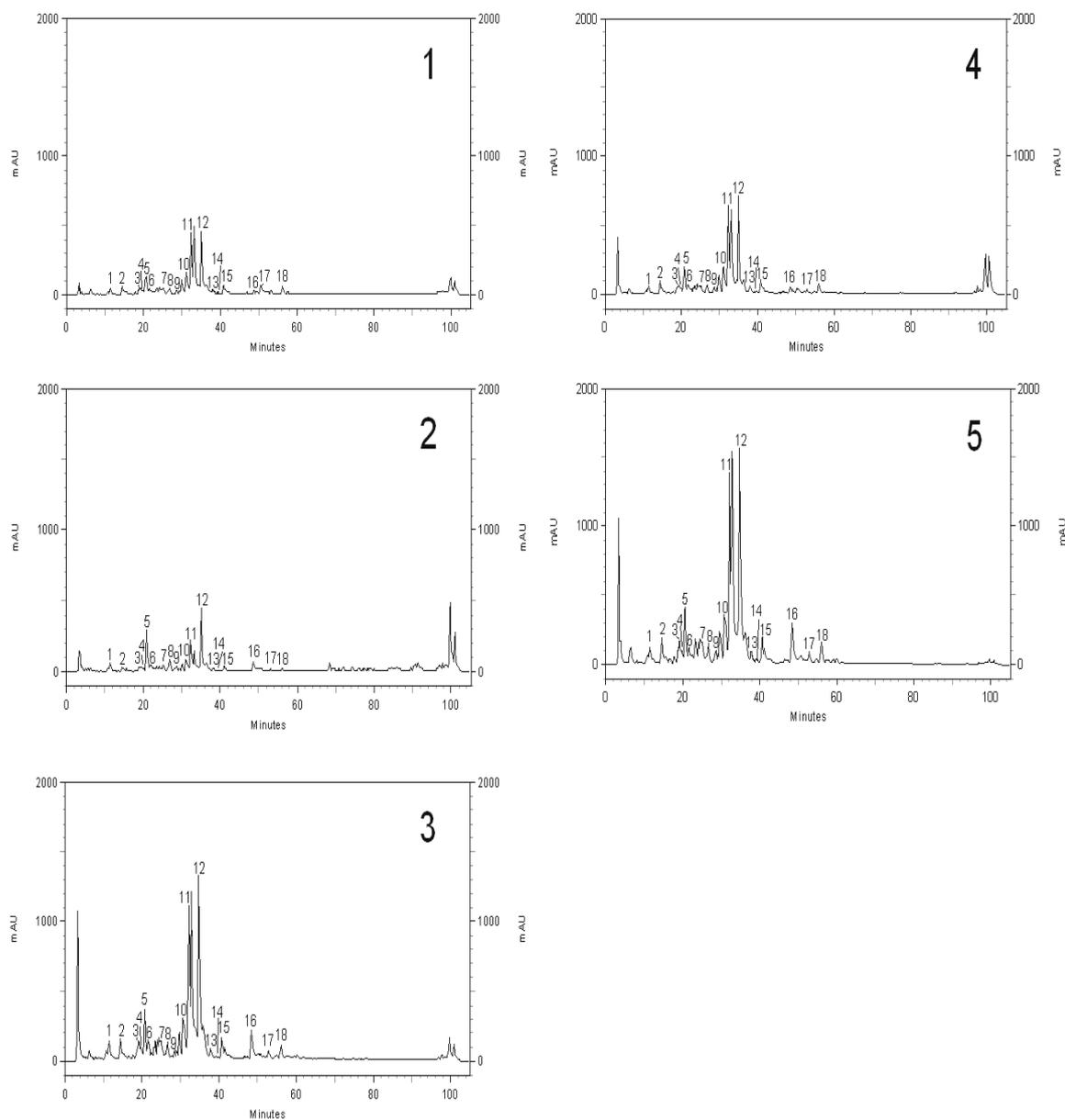


Figura 20 CLAE-FR dos extratos etanólicos das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em dezembro de 2008 em diferentes colméias, da cidade de João Pessoa - PB.

Tabela 5 Flavonóides e outros compostos fenólicos dos extratos etanólicos de cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em dezembro de 2008 em diferentes colméias determinados por comparação com padrões obtidos da empresa Extrasynthese Co.

Pico	Tempo de retenção (min)	Compostos	Amostra 1 ^a	Amostra 2 ^a	Amostra 3 ^a	Amostra 4 ^a	Amostra 5 ^a
			Quantidade (mg/g)				
1	13.42	Rutina	0,3	0,3	0,8	0,4	0,7
2	16.99	Liquiritigenina	0,8	0,3	1,6	1,3	2,4
3	20.63	Daiczeina	0,1	0,1	0,4	0,2	0,4
4	22.35	Pinobanksina	0,6	-	2,3	1,0	1,9
5	23.84	UV λ 251, 292 nm ^b	+	+	+	+	+
6	24.59	Quercetina	0,4	0,6	1,2	0,6	1,0
7	28.40	Luteolina	0,3	0,3	0,7	0,4	0,8
8	30.46	UV λ 241, 272, 282 nm ^b	+	+	+	+	+
9	32.15	Dalbergina	0,1	0,1	0,3	0,2	0,3
10	34.62	Isoliquiritigenina	2,3	1,1	4,5	3,3	3,2
11	36.97	Formononetina	1,4	0,8	3,5	2,1	4,0
12	39.28	UV λ 235, 263 nm ^b	+	+	+	+	+
13	40.08	Pinocembrina	1,5	1,1	3,6	2,7	3,3
14	42.30	Pinobanksin-3-acetato	0,3	0,6	1,4	0,4	1,2
15	46.45	Biochanina A	0,5	0,2	0,6	0,4	0,7
16	55.96	UV λ 238, 260, 269 nm ^b	+	+	+	+	+
17	60.53	UV λ 233, 249, 329 nm ^b	+	+	+	+	+
18	63.43	UV λ 233, 256 nm ^b	+	+	+	+	+

a Quantidade dos constituintes em mg/g de própolis.

Símbolos: "+" = presente, mas não quantificado.

b Constituintes não identificados representados somente pelo espectro de absorvância máxima UV.

Daugusch *et al.* (2008) analisou por CLAE-FR e CCDAE-FR, seis amostras de própolis vermelha da mesma região de Alagoas e exsudatos resinosos encontrados na região. As análises de CCDAE-FR e CLAE-FR demonstraram que quatro amostras de própolis vermelha mostraram perfis quase idênticos. As outras duas amostras também mostraram a presença dos compostos fenólicos encontrados nas quatro outras amostras, porém em menor quantidade. Foi observado que as amostras de própolis com menor quantidade de compostos fenólicos foram coletadas de colméias que estavam localizadas em áreas onde *D. ecastophyllum* era escassa, indicando que essas abelhas coletaram resinas de outras plantas também.

As amostras de extratos etanólicos de própolis do grupo 13 coletadas nos meses de fevereiro, abril, julho, outubro e dezembro de 2008 apresentaram grande variação entre as colméias e época do ano, quanto à quantidade de flavonóides e outros compostos fenólicos. No mês de julho foram verificados que todas as amostras apresentaram grandes quantidades de flavonóides e outros compostos fenólicos, indicando o aumento da quantidade de resina de *D. ecastophyllum*, enquanto que o mês de dezembro apresentou baixa quantidade desses compostos, provavelmente devido à escassez de resina de *D. ecastophyllum* nesse período do ano.

5.5 Determinação de compostos fenólicos totais de própolis do grupo 13 de diferentes épocas do ano

A Figura 21 e Tabela 6 ilustram o teor de compostos fenólicos totais dos extratos etanólicos das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas no mês de fevereiro de 2008.

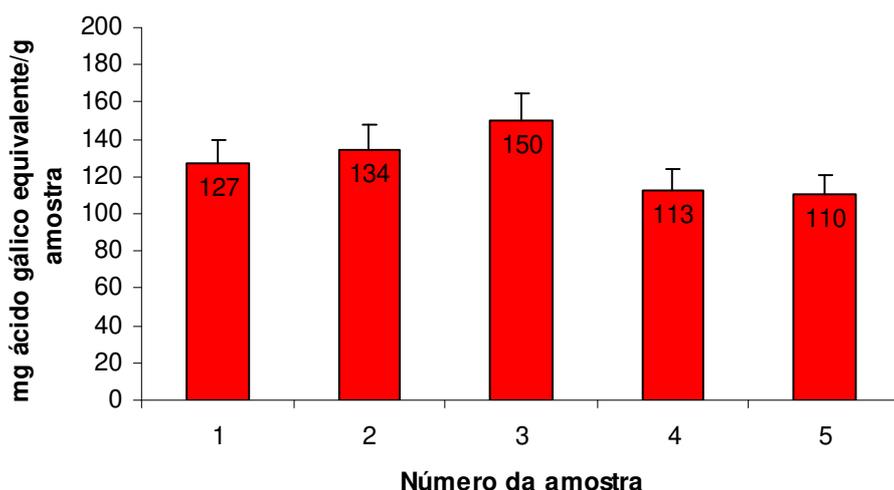


Figura 21 Compostos fenólicos totais em mg ácido gálico equivalente/ g das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em fevereiro de 2008.

Foi verificado que existe variação da quantidade de compostos fenólicos nas amostras de própolis coletadas de diferentes colméias. A amostra que apresentou maior quantidade de compostos fenólicos totais foi a de número 3 (150 mg de ácido gálico equivalente por grama de própolis), resultado similar ao obtido na análise CLAE-FR (Tabela 1).

Tabela 6 Teor de compostos fenólicos totais em mg ácido gálico equivalente/ g das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em fevereiro de 2008.

Amostras de própolis	Compostos fenólicos totais em equivalência de ácido gálico (mg/ g)*
Amostra 1	127 ^b
Amostra 2	134 ^b
Amostra 3	150 ^a
Amostra 4	113 ^c
Amostra 5	110 ^c

*Médias seguidas de letras diferentes são significativas a nível de 5% (Teste de Tukey $P < 0,05$).

A Figura 22 e Tabela 7 ilustram o teor de compostos fenólicos totais dos extratos etanólicos das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas no mês de abril de 2008. Foi verificado que existe variação da quantidade de compostos fenólicos nas amostras de própolis coletadas de diferentes colméias. A amostra que apresentou maior quantidade de compostos fenólicos totais foi a de número 4 (154 mg de ácido gálico equivalente por grama de própolis), resultado similar ao obtido na análise CLAE-FR (Tabela 2).

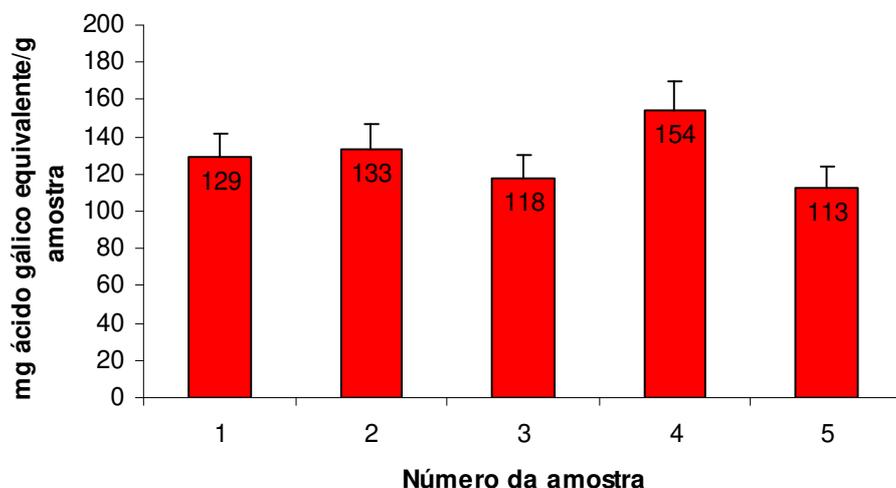


Figura 22 Compostos fenólicos totais em mg ácido gálico equivalente/ g das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em abril de 2008.

Tabela 7 Teor de compostos fenólicos totais em mg ácido gálico equivalente/ g das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em abril de 2008.

Amostras de própolis	Compostos fenólicos totais em equivalência de ácido gálico (mg/ g)*
Amostra 1	129 ^b
Amostra 2	133 ^b
Amostra 3	118 ^c
Amostra 4	154 ^a
Amostra 5	113 ^c

*Médias seguidas de letras diferentes são significativas a nível de 5% (Teste de Tukey $P < 0,05$).

A Figura 23 e Tabela 8 ilustram o teor de compostos fenólicos totais dos extratos etanólicos das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas no mês de julho de 2008. Foi verificado que existe variação da quantidade de compostos fenólicos nas amostras de própolis coletadas de diferentes colméias. A amostra que apresentou maior quantidade de compostos fenólicos totais foi a de número 5

(183 mg de ácido gálico equivalente por grama de própolis), resultado similar ao obtido na análise CLAE-FR (Tabela 3).

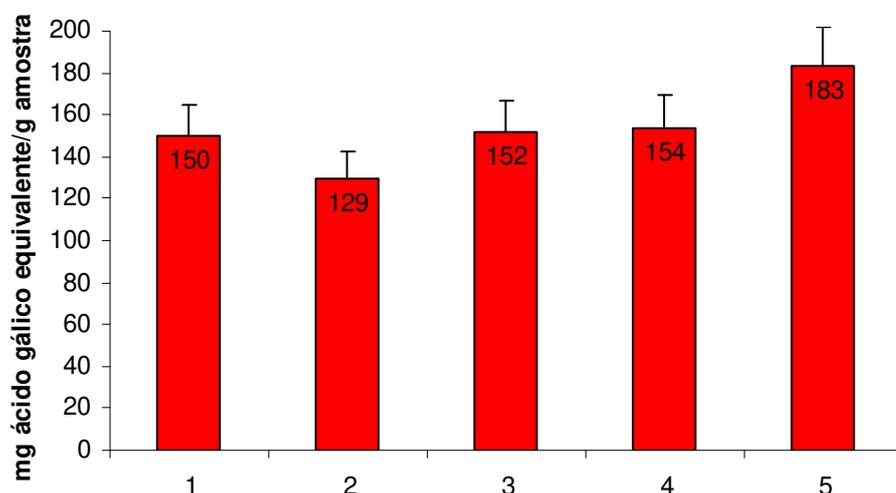


Figura 23 Compostos fenólicos totais em mg ácido gálico equivalente/ g das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em julho de 2008.

Tabela 8 Teor de compostos fenólicos totais em mg ácido gálico equivalente/ g das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em julho de 2008.

Amostras de própolis	Compostos fenólicos totais em equivalência de ácido gálico (mg/ g)*
Amostra 1	150 ^b
Amostra 2	129 ^c
Amostra 3	152 ^b
Amostra 4	154 ^b
Amostra 5	183 ^a

*Médias seguidas de letras diferentes são significativas a nível de 5% (Teste de Tukey P<0,05).

A Figura 24 e Tabela 9 ilustram o teor de compostos fenólicos totais dos extratos etanólicos das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas no mês de outubro de 2008. Foi verificado que existe variação da quantidade de

compostos fenólicos nas amostras de própolis coletadas de diferentes colméias. A amostra que apresentou maior quantidade de compostos fenólicos totais foram as de número 1 e 3 (140 e 137 mg de ácido gálico equivalente por grama de própolis), resultado similar ao obtido na análise CLAE-FR (Tabela 4).

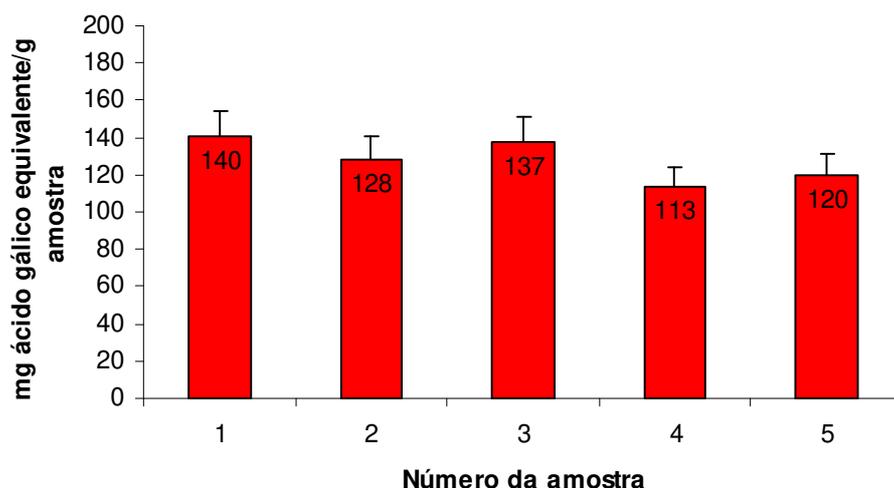


Figura 24 Compostos fenólicos totais em mg ácido gálico equivalente/ g das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em outubro de 2008.

Tabela 9 Teor de compostos fenólicos totais em mg ácido gálico equivalente/ g das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em outubro de 2008.

Amostras de própolis	Compostos fenólicos totais em equivalência de ácido gálico (mg/ g)*
Amostra 1	140 ^a
Amostra 2	128 ^b
Amostra 3	137 ^a
Amostra 4	113 ^c
Amostra 5	120 ^c

*Médias seguidas de letras diferentes são significativas a nível de 5% (Teste de Tukey $P < 0,05$).

A Figura 25 e Tabela 10 ilustram o teor de compostos fenólicos totais dos extratos etanólicos das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas no mês de dezembro de 2008. Foi verificado que existe variação da quantidade de compostos fenólicos nas amostras de própolis coletadas de diferentes colméias. A amostra que apresentou maior quantidade de compostos fenólicos totais foram as de número 3 e 5 (127 e 129 mg de ácido gálico equivalente por grama de própolis), resultado similar ao obtido na análise CLAE-FR (Tabela 5).

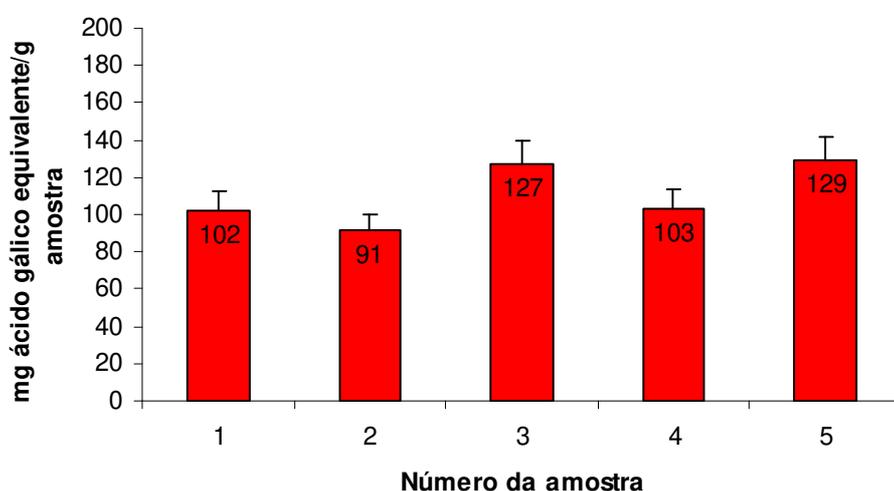


Figura 25 Compostos fenólicos totais em mg ácido gálico equivalente/ g das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em dezembro de 2008.

Tabela 10 Teor de compostos fenólicos totais em mg ácido gálico equivalente/ g das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em dezembro de 2008.

Amostras de própolis	Compostos fenólicos totais em equivalência de ácido gálico (mg/ g)*
Amostra 1	102 ^b
Amostra 2	91 ^c
Amostra 3	127 ^a
Amostra 4	103 ^b
Amostra 5	129 ^a

*Médias seguidas de letras diferentes são significativas a nível de 5% (Teste de Tukey P<0,05).

Alencar *et al.* (2007) quantificou os compostos fenólicos totais de própolis vermelha do estado de Alagoas e mostrou que essa própolis possui o maior valor de compostos fenólicos totais encontrados (232 mg de ácido gálico equivalente/ g de própolis), em comparação com os outros tipos de própolis brasileira e valor equivalente à própolis originária de *Populus sp.* Além disso, foi demonstrado que a fração clorofórmica da própolis vermelha apresentou duas vezes mais a quantidade de compostos fenólicos totais que fração hexânica, mostrando a existência de compostos fenólicos de diferentes polaridades.

Daugusch *et al.* (2008) verificou que quanto maior a quantidade de compostos fenólicos totais maior é a atividade antimicrobiana contra *S. aureus* ATCC 25923.

As amostras de extratos etanólicos de própolis do grupo 13 coletadas nos meses de fevereiro, abril, julho, outubro e dezembro de 2008 apresentaram grande variação entre as colméias e época do ano quanto à quantidade de compostos fenólicos totais. Apesar do mês de julho ter sido o mês onde as

quantidades de compostos fenólicos totais foram maiores, com a melhor própolis atingindo a quantia de 183 mg de ácido gálico equivalente por grama de própolis, segundo Alencar *et al.* (2007), a própolis de Alagoas mostrou-se possuir maiores quantidades de compostos fenólicos totais (232 mg de ácido gálico equivalente/ g de própolis).

5.6 Determinação de flavonóides totais de própolis do grupo 13 de diferentes épocas do ano

A Figura 26 e Tabela 11 ilustram o teor de flavonóides totais das amostras dos cinco extratos etanólicos de cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas no mês de fevereiro de 2008. Foi verificado que existe variação da quantidade de flavonóides nas amostras de própolis coletadas de diferentes colméias. A amostra que apresentou maior quantidade de flavonóides totais foram as de número 2 e 3 (47 e 46 mg de quercetina equivalente por grama de própolis).

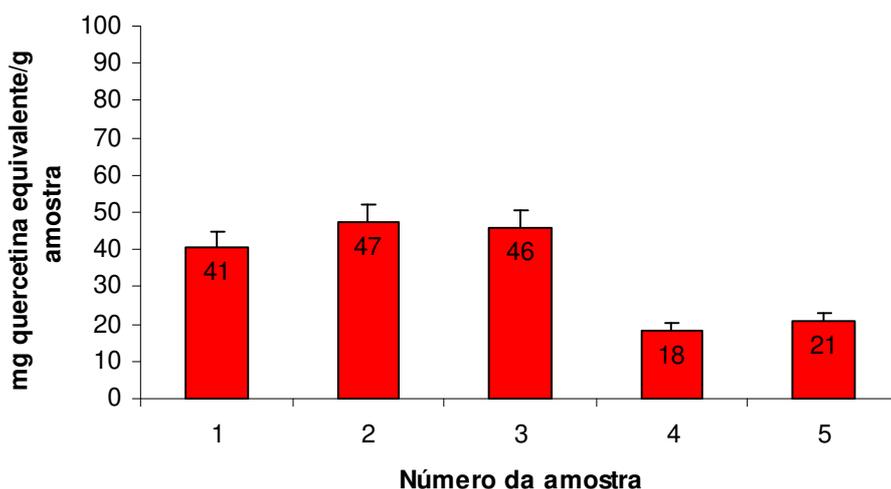


Figura 26 Flavonóides totais em mg quercetina equivalente/ g das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em fevereiro de 2008.

Tabela 11 Teor de flavonóides totais em mg quercetina equivalente/ g das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em fevereiro de 2008.

Amostras de própolis	Flavonóides totais em equivalência de quercetina (mg/ g)*
Amostra 1	41 ^b
Amostra 2	47 ^a
Amostra 3	46 ^{ab}
Amostra 4	18 ^c
Amostra 5	21 ^c

*Médias seguidas de letras diferentes são significativas a nível de 5% (Teste de Tukey P<0,05).

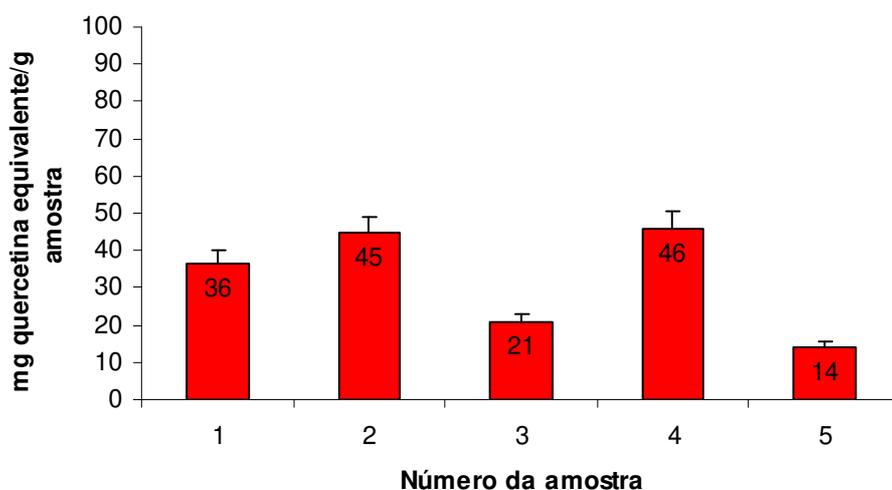


Figura 27 Flavonóides totais em mg quercetina equivalente/ g das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em abril de 2008.

Tabela 12 Teor de flavonóides totais em mg quercetina equivalente/ g das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em abril de 2008.

Amostras de própolis	Flavonóides totais em equivalência de quercetina (mg/ g)*
Amostra 1	36 ^b
Amostra 2	45 ^a
Amostra 3	21 ^c
Amostra 4	46 ^a
Amostra 5	14 ^c

*Médias seguidas de letras diferentes são significativas a nível de 5% (Teste de Tukey P<0,05).

A Figura 27 e Tabela 12 ilustram o teor de flavonóides totais das amostras dos cinco extratos etanólicos de cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas no mês de abril de 2008. Foi verificado que existe variação da quantidade de flavonóides nas amostras de própolis coletadas de diferentes colméias. A amostra que apresentou maior quantidade de flavonóides totais foram as de número 2 e 4 (45 e 46 mg de quercetina equivalente por grama de própolis).

A Figura 28 e Tabela 13 ilustram o teor de flavonóides totais das amostras dos cinco extratos etanólicos de cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas no mês de julho de 2008. Foi verificado que existe variação da quantidade de flavonóides nas amostras de própolis coletadas de diferentes colméias. A amostra que apresentou maior quantidade de flavonóides totais foi a de número 5 (62 mg de quercetina equivalente por grama de própolis).

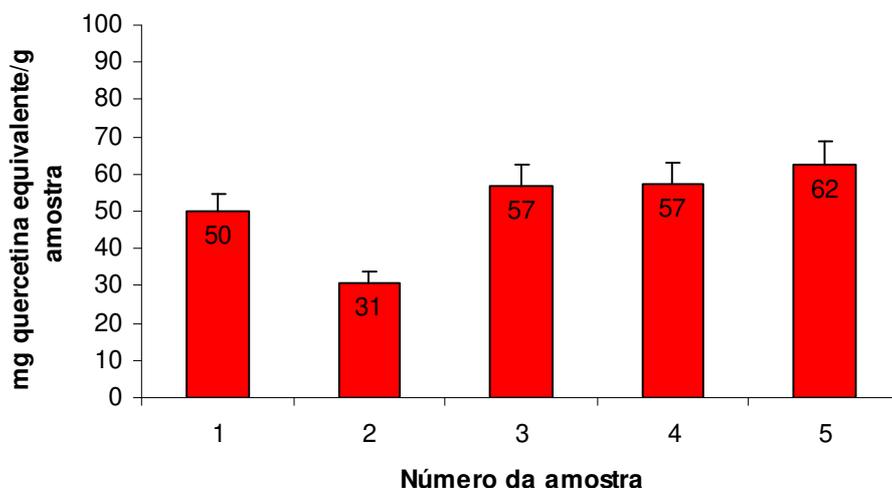


Figura 28 Flavonóides totais em mg quercetina equivalente/ g das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em julho de 2008.

Tabela 13 Teor de flavonóides totais em mg quercetina equivalente/ g das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em julho de 2008.

Amostras de própolis	Flavonóides totais em equivalência de quercetina (mg/ g)*
Amostra 1	50 ^b
Amostra 2	31 ^c
Amostra 3	57 ^{ab}
Amostra 4	57 ^{ab}
Amostra 5	62 ^a

*Médias seguidas de letras diferentes são significativas a nível de 5% (Teste de Tukey P < 0,05).

A Figura 29 e Tabela 14 ilustram o teor de flavonóides totais das amostras dos cinco extratos etanólicos de cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas no mês de outubro de 2008. Foi verificado que existe variação da quantidade de flavonóides nas amostras de própolis coletadas de diferentes colméias. A amostra

que apresentou maior quantidade de flavonóides totais foram as de número 1 e 3 (33 e 29 mg de quercetina equivalente por grama de própolis).

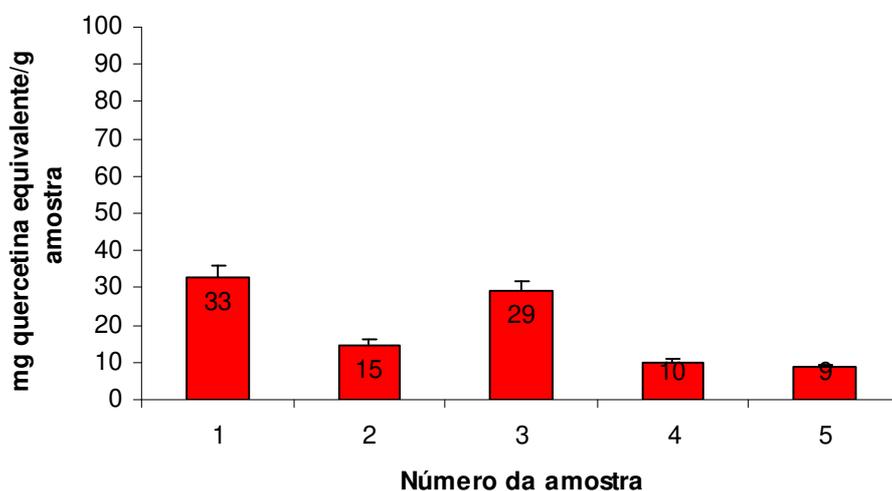


Figura 29 Flavonóides totais em mg quercetina equivalente/ g das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em outubro de 2008.

Tabela 14 Teor de flavonóides totais em mg quercetina equivalente/ g das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em outubro de 2008.

Amostras de própolis	Flavonóides totais em equivalência de quercetina (mg/ g)*
Amostra 1	33 ^a
Amostra 2	15 ^b
Amostra 3	29 ^a
Amostra 4	10 ^b
Amostra 5	9 ^b

*Médias seguidas de letras diferentes são significativas a nível de 5% (Teste de Tukey P<0,05).

A Figura 30 e Tabela 15 ilustram o teor de flavonóides totais das amostras dos cinco extratos etanólicos de cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas no mês de dezembro de 2008. Foi verificado que existe variação da quantidade de

flavonóides nas amostras de própolis coletadas de diferentes colméias. As 5 amostras apresentaram a quantidade de flavonóides totais similares.

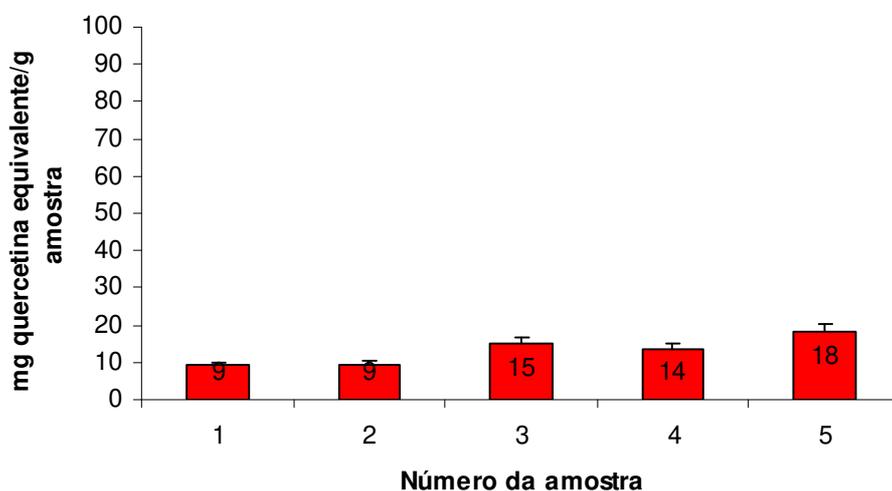


Figura 30 Flavonóides totais em mg quercetina equivalente/ g das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em dezembro.

Tabela 15 Teor de flavonóides totais em mg quercetina equivalente/ g das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em dezembro de 2008.

Amostras de própolis	Flavonóides totais em equivalência de quercetina (mg/ g)*
Amostra 1	9 ^{ab}
Amostra 2	9 ^{ab}
Amostra 3	15 ^{ab}
Amostra 4	14 ^{ab}
Amostra 5	18 ^{bc}

*Médias seguidas de letras diferentes são significativas a nível de 5% (Teste de Tukey P<0,05).

Foi comparado a quantidade de flavonóides totais de três tipos de amostras brasileiras (própolis da região Sul, Sudeste e Nordeste), e foi constatado pouca

variação na quantidade de flavonóides totais, sendo calculado 24, 29 e 25 mg quercetina equivalente/ g própolis, respectivamente (Daugusch, 2007).

Foi relatada baixa concentração de flavonóides em extratos etanólicos de própolis verde brasileira com resultado similar a fração clorofórmica da própolis vermelha do estado de Alagoas. Porém o resultado obtido através da fração hexânica mostrou que a maioria dos compostos fenólicos encontrados são flavonóides (Alencar *et al.*, 2007).

Daugusch *et al.* (2008) verificou que quanto maior a quantidade de flavonóides totais, maior é a atividade antimicrobiana contra *S. aureus* ATCC 25923.

As amostras de extratos etanólicos de própolis do grupo 13 coletadas nos meses de fevereiro, abril, julho, outubro e dezembro de 2008 apresentaram grande variação entre as colméias e época do ano quanto à quantidade de flavonóides totais. As própolis que apresentaram maiores quantidades de flavonóides foram as do mês de julho, com sua melhor amostra atingindo 62 mg de quercetina equivalente por grama de própolis. As amostras de João Pessoa - PB se destacaram pela quantidade relativamente maior de flavonóides, comparadas com as amostras da região Sul, Sudeste e outra região do Nordeste (Alagoas) (24, 29 e 25 mg quercetina equivalente/ g própolis, respectivamente), (Daugusch, 2007).

5.7 Determinação da atividade antiradical (DPPH) de própolis do grupo 13 de diferentes épocas do ano

A Figura 31 e a Tabela 16 ilustram a atividade antiradical dos extratos etanólicos das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletados no mês de fevereiro de 2008. Foi verificado que existe variação de atividade antiradical nas amostras de própolis coletadas de diferentes colméias. As amostras que apresentaram maior atividade antiradical livre foram as de número 1, 2 e 3.

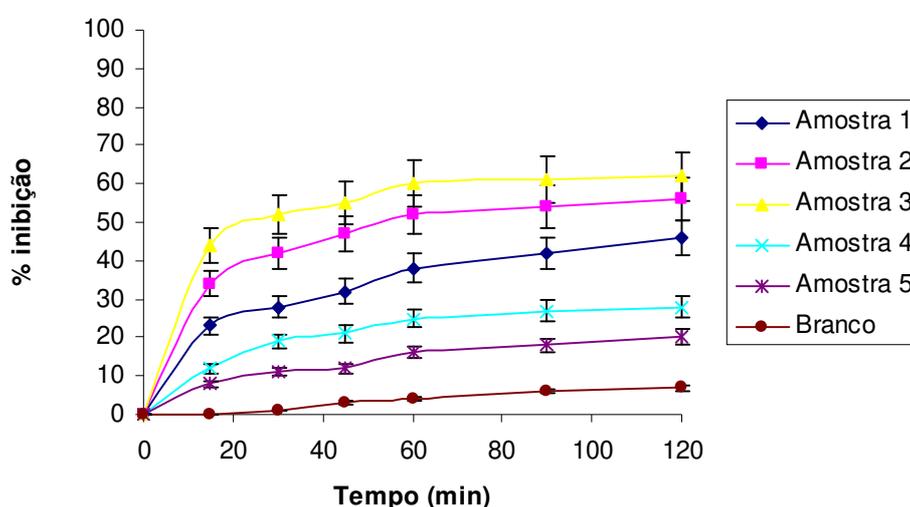


Figura 31 Atividade antiradical das própolis do grupo 13 coletadas em fevereiro de 2008.

Tabela 16 Atividade antiradical das própolis do grupo 13 coletadas em fevereiro de 2008.

	Branco	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5
Tempo (min)	Absorbância (517 nm)					
0	0,8354	0,8354	0,8354	0,8354	0,8354	0,8354
15	0,8388	0,6422	0,5521	0,4604	0,7319	0,7674
30	0,8248	0,6018	0,4810	0,3790	0,6760	0,7425
45	0,8142	0,5650	0,4393	0,3464	0,6566	0,7326
60	0,7986	0,5195	0,4024	0,3359	0,6278	0,7037
90	0,7846	0,4853	0,3811	0,3175	0,6091	0,6845
120	0,7730	0,4525	0,3655	0,3244	0,5977	0,6696

A Figura 32 e a Tabela 17 ilustram a atividade antirradical dos extratos etanólicos das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletados no mês de abril de 2008. Foi verificado que existe variação de atividade antirradical nas amostras de própolis coletadas de diferentes colméias. As amostras que apresentaram maior atividade antirradical livre foram as de número 1, 2 e 4.

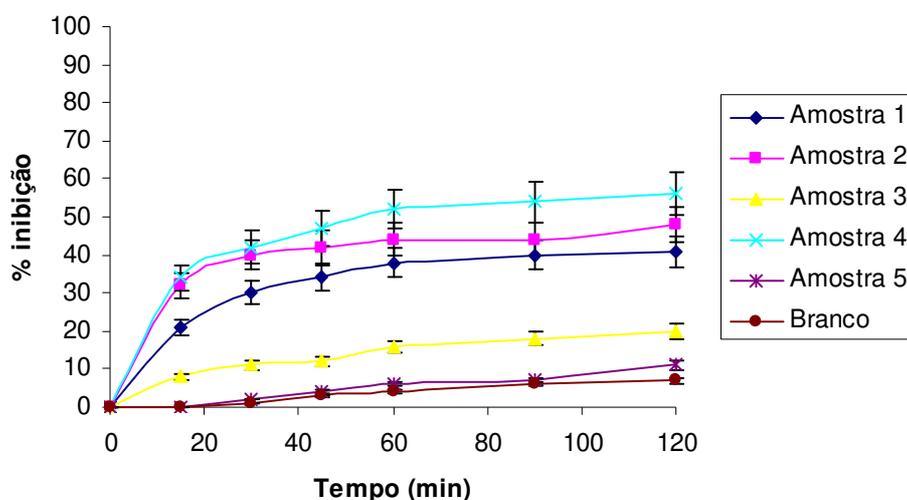


Figura 32 Atividade antirradical das própolis do grupo 13 coletadas em abril de 2008.

Tabela 17 Atividade antirradical das própolis do grupo 13 coletadas em abril de 2008.

	Branco	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5
Tempo (min)	Absorbância (517 nm)					
0	0,8354	0,8354	0,8354	0,8354	0,8354	0,8354
15	0,8388	0,6628	0,5665	0,7674	0,5521	0,8354
30	0,8248	0,5866	0,5052	0,7425	0,4810	0,8189
45	0,8142	0,5512	0,4884	0,7326	0,4393	0,8018
60	0,7986	0,5183	0,4700	0,7037	0,4024	0,7813
90	0,7846	0,5000	0,4654	0,6845	0,3811	0,7756
120	0,7730	0,4962	0,4370	0,6696	0,3655	0,7453

A Figura 33 e a Tabela 18 ilustram a atividade antirradical dos extratos etanólicos das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletados no mês de julho

de 2008. Foi verificado que existe variação de atividade antiradical nas amostras de própolis coletadas de diferentes colméias. As amostras que apresentaram maior atividade antiradical livre foram as de número 1, 3, 4 e 5.

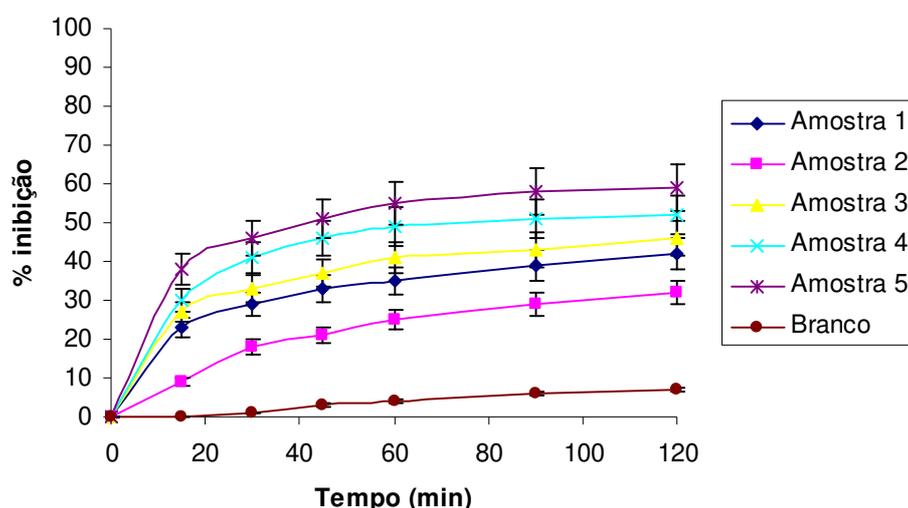


Figura 33 Atividade antiradical das própolis do grupo 13 coletadas em julho de 2008.

Tabela 18 Atividade antiradical das própolis do grupo 13 coletadas em julho de 2008.

	Branco	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5
Tempo (min)	Absorbância (517 nm)					
0	0,8354	0,8354	0,8354	0,8354	0,8354	0,8354
15	0,8388	0,6466	0,7562	0,6132	0,5848	0,5140
30	0,8248	0,5969	0,6851	0,5638	0,4907	0,4527
45	0,8142	0,5631	0,6603	0,5225	0,4496	0,4088
60	0,7986	0,5402	0,6236	0,4966	0,4302	0,3770
90	0,7846	0,5105	0,5957	0,4721	0,4126	0,3524
120	0,7730	0,4811	0,5677	0,4532	0,4032	0,3424

A Figura 34 e a Tabela 19 ilustram a atividade antiradical dos extratos etanólicos das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletados no mês de outubro de 2008. Foi verificado que existe variação de atividade antiradical nas amostras de própolis coletadas de diferentes colméias. Foi verificado que existe

variação de atividade antiradical entre as colméias. As amostras que apresentaram maior atividade antiradical livre foram as de número 1, 2 e 3.

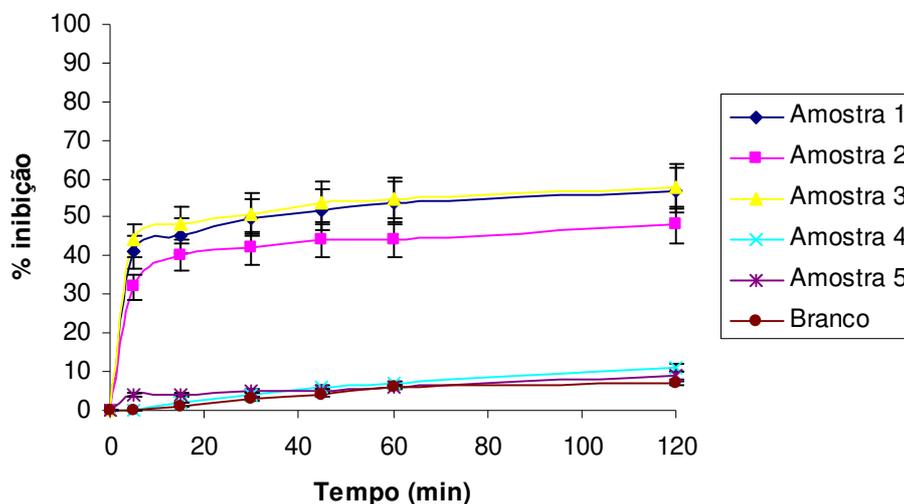


Figura 34 Atividade antiradical das própolis do grupo 13 coletadas em outubro de 2008.

Tabela 19 Atividade antiradical das própolis do grupo 13 coletadas em outubro de 2008.

	Branco	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5
Tempo (min)	Absorbância (517 nm)					
0	0,8354	0,8354	0,8354	0,8354	0,8354	0,8354
15	0,8388	0,4943	0,5665	0,4685	0,8354	0,8025
30	0,8248	0,4563	0,5052	0,4304	0,8189	0,8012
45	0,8142	0,4218	0,4884	0,4135	0,8018	0,7964
60	0,7986	0,3974	0,4700	0,3857	0,7813	0,7910
90	0,7846	0,3880	0,4654	0,3786	0,7756	0,7868
120	0,7730	0,3575	0,4370	0,3504	0,7453	0,7632

A Figura 35 e a Tabela 20 ilustram a atividade antiradical dos extratos etanólicos das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletados no mês de dezembro de 2008. Foi verificado que existe variação de atividade antiradical nas amostras de própolis coletadas de diferentes colméias. A amostra que apresentou maior atividade antiradical livre foi a de número 5.

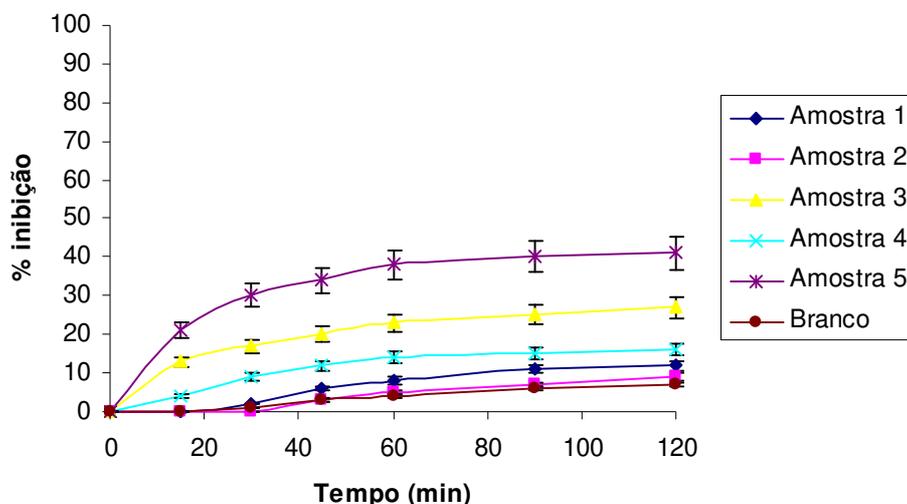


Figura 35 Atividade antirradical das própolis do grupo 13 coletadas em dezembro de 2008.

Tabela 20 Atividade antirradical das própolis do grupo 13 coletadas em dezembro de 2008.

	Branco	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5
Tempo (min)	Absorbância (517 nm)					
0	0,8354	0,8354	0,8354	0,8354	0,8354	0,8354
15	0,8388	0,8350	0,8352	0,7280	0,8045	0,6628
30	0,8248	0,8169	0,8316	0,6967	0,7630	0,5866
45	0,8142	0,7886	0,8120	0,6709	0,7370	0,5512
60	0,7986	0,7645	0,7950	0,6422	0,7211	0,5183
90	0,7846	0,7465	0,7745	0,6227	0,7135	0,5000
120	0,7730	0,7358	0,7580	0,6084	0,7001	0,4962

Cabral *et al.* (2009), submeteu 100 g de própolis bruta triturada à extração com 400 mL de etanol 80% (v/v). Esse extrato etanólico de própolis vermelha do estado de Alagoas foi fracionado pela técnica de extração líquido-líquido, em funil de separação, com hexano e clorofórmio, separadamente. Após a evaporação foram obtidas 11,36 g da fração hexânica (fr-Hex) e 30,08 g da fração clorofórmica (fr-Clo). A fr-Hex apresentou maior atividade de sequestro do radical livre DPPH (74,4%), seguida pelo extrato etanólico de própolis (50,5%) e fr-Clo (49,8%). O

método do DPPH se mostrou vantajoso, pois o resultado não é afetado pela polaridade do substrato, onde os fr-Hex são mais efetivos que os da fr-Clo.

Foi verificado que a atividade antiradical de seis amostras de própolis do estado de Alagoas apresentaram resultados similares à atividade antimicrobiana contra *S. aureus* ATCC 25923. Foram verificadas variações da atividade antiradical entre colméias, onde quatro apresentaram resultados expressivos e duas não (Daugusch, 2007).

As amostras de extratos etanólicos de própolis do grupo 13 de todos os meses apresentaram grande variação entre as colméias e época do ano quanto à atividade antiradical. O destaque foi para o mês de julho, onde uma amostra atingiu 59% de inibição do radical DPPH, superior ao extrato etanólico de própolis vermelha do estado de Alagoas, que apresentou inibição de 51%.

5.8 Determinação da atividade antimicrobiana de própolis do grupo 13 de diferentes épocas do ano

A Figura 36 ilustra a atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletados no mês de fevereiro de 2008, utilizando-se *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 como microrganismo sensível. Foi verificado que existe variação antimicrobiana entre as amostras de própolis coletadas de diferentes colméias. As amostras que apresentaram maior atividade antimicrobiana foram as de número 1, 2, 3 e 4.

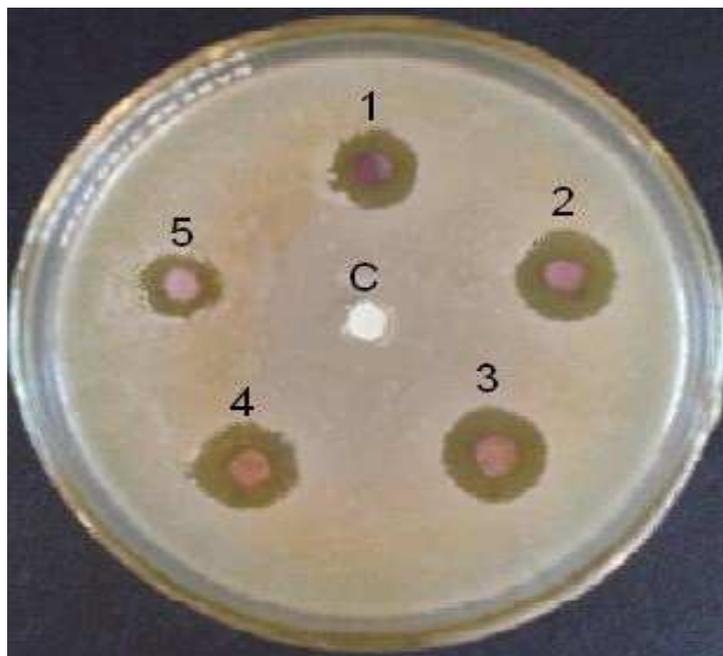


Figura 36 Antibiograma com *S. aureus* das própolis do grupo 13 coletadas em fevereiro de 2008.

C = controle (etanol 70%); 1 = amostra 1; 2 = amostra 2; 3 = amostra 3; 4 = amostra 4; 5 = amostra 5.

A Figura 37 ilustra a atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletados no mês de abril de 2008, utilizando-se *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 como microrganismo sensível.

Foi verificado que existe variação antimicrobiana entre as amostras de própolis coletadas de diferentes colméias. As amostras que apresentaram maiores atividades antimicrobianas foram as de número 1, 2, 3 e 4.

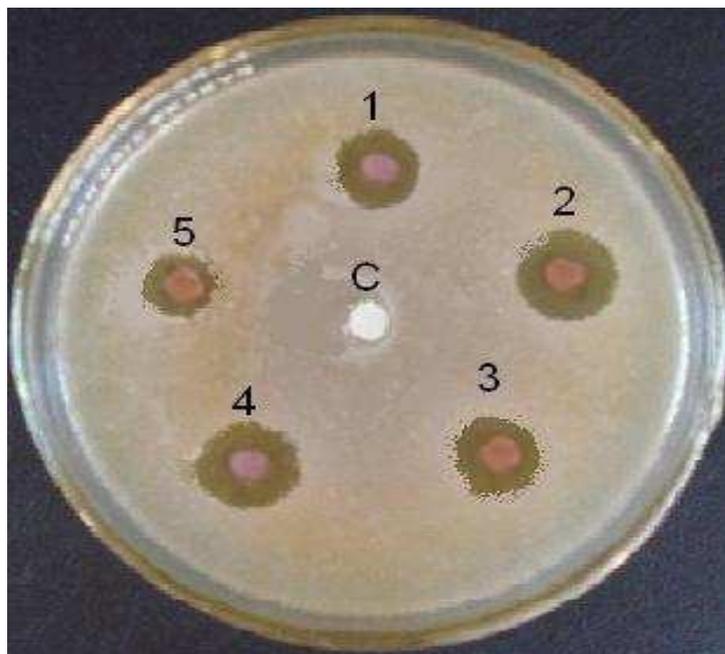


Figura 37 Antibiograma com *S. aureus* das própolis do grupo 13 coletadas em abril de 2008.

C = controle (etanol 70%); 1 = amostra 1; 2 = amostra 2; 3 = amostra 3; 4 = amostra 4; 5 = amostra 5.

A Figura 38 ilustra a atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletados no mês de julho de 2008, utilizando-se *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 como microrganismo sensível. Foi verificado que existe variação antimicrobiana entre as amostras de própolis coletadas de diferentes colméias. Todas as amostras apresentaram alta atividade antimicrobiana.

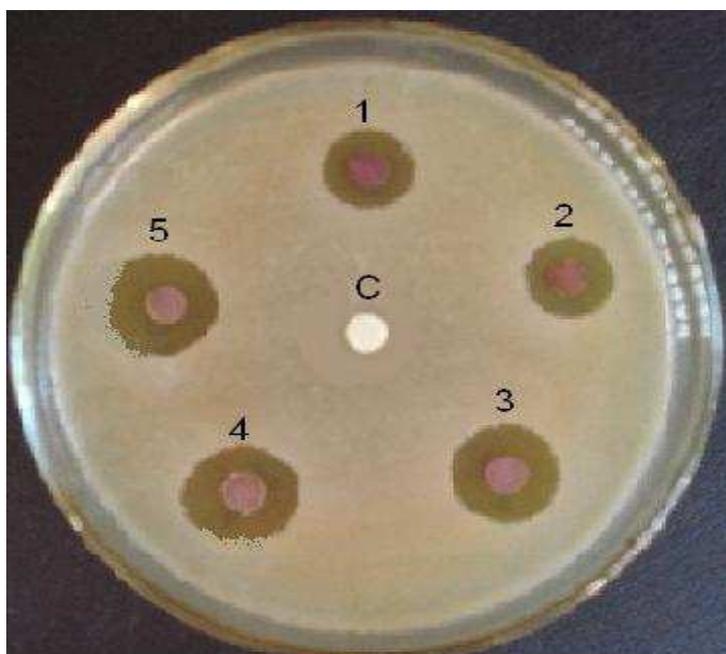


Figura 38 Antibiograma com *S. aureus* das própolis do grupo 13 coletadas em julho de 2008.

C = controle (etanol 70%); 1 = amostra 1; 2 = amostra 2; 3 = amostra 3; 4 = amostra 4; 5 = amostra 5.

A Figura 39 ilustra a atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletados no mês de outubro de 2008, utilizando-se *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 como microrganismo sensível. Foi verificado que existe variação antimicrobiana entre as amostras de própolis coletadas de diferentes colméias. A amostra que apresentou maior atividade antimicrobiana foi a de número 1.

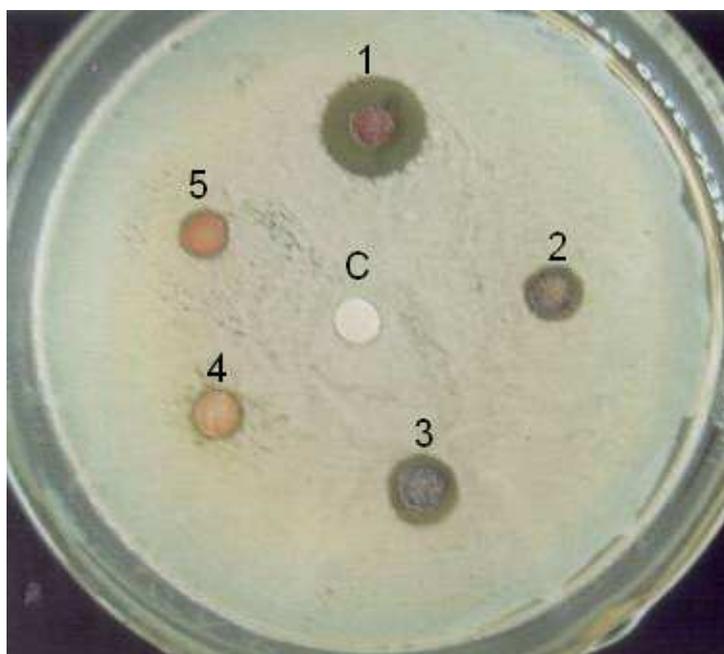


Figura 39 Antibiograma com *S. aureus* das própolis do grupo 13 coletadas em outubro de 2008.

C = controle (etanol 70%); 1 = amostra 1; 2 = amostra 2; 3 = amostra 3; 4 = amostra 4; 5 = amostra 5.

A Figura 40 ilustra a atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletados no mês de dezembro de 2008, utilizando-se *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 como microrganismo sensível. Foi verificado que existe variação antimicrobiana entre as amostras de própolis

coletadas de diferentes colméias. As amostras que apresentaram maior atividade antimicrobiana foram as de número 3 e 5.

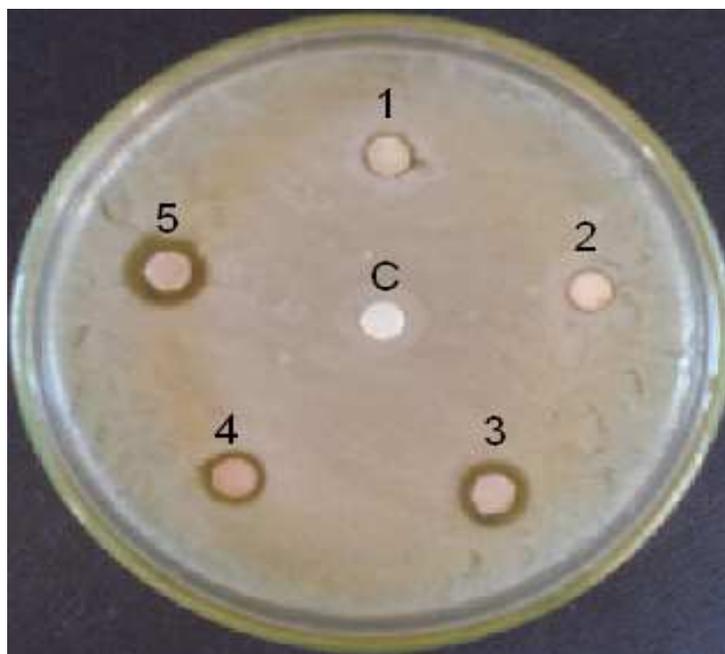


Figura 40 Antibiograma com *S. aureus* das própolis do grupo 13 coletadas em dezembro de 2008.

C = controle (etanol 70%); 1 = amostra 1; 2 = amostra 2; 3 = amostra 3; 4 = amostra 4; 5 = amostra 5.

Análises da concentração mínima inibitória (MIC) da própolis vermelha do grupo 13 foram realizadas contra *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*. Foi observado que a melhor inibição foi encontrada contra *C. perfringens*, com 7 µg/mL e a menor inibição foi encontrada em *E. coli* com 1000 µg/mL. Todas as amostras de própolis e antibióticos analisados inibiram os microrganismos na faixa de concentração estudada. As amostras de própolis em baixas concentrações foram capazes de inibir as bactérias, principalmente o *C. perfringens* e *S. aureus*. 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* (Daugusch, 2007).

Foram realizados testes de atividade antimicrobiana com os extratos etanólicos de própolis em diferentes concentrações etanólicas, e foi demonstrado maior atividade antimicrobiana, contra *S. aureus*, nos extratos obtidos com 40-100% de etanol. Os extratos de própolis vermelha extraídos com 50-70% de etanol apresentaram maiores atividades antimicrobianas (Daugusch, 2007). Os extratos de própolis vermelha do Nordeste do Brasil obtidos com metanol, etanol, acetato de etila, clorofórmio e acetona apresentaram maior atividade contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 do que os extratos de própolis verde do Sudeste do Brasil obtidos com os mesmos solventes. Os extratos de própolis obtidos com hexano apresentaram baixa atividade de inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Moraes, 2007).

Cabral *et al.* (2009) realizou a atividade antibacteriana de extrato de própolis vermelha do nordeste por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) contra o microrganismo *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Com uma CIM variando entre 62,5 e 125 µg/ mL e uma CBM entre 250 e 500 µg/ mL. Foi observado que a fração clorofórmica teve a atividade potencializada (CIM entre 31,7 e 62,5 µg/ mL e CBM entre 125 e 250 µg/mL), sendo estas concentrações reduzidas em 50% quando comparadas à atividade do extrato etanólico. Todas as sub-frações

testadas apresentaram alta atividade antibacteriana. A melhor atividade bactericida foi obtida por uma sub-fração que apresentou a CBM entre 31,7- 62,5 µg/ mL, valor este oito vezes menor que a concentração de extrato etanólico de própolis necessária para apresentar efeito bactericida contra o *S. aureus*. A alta atividade antibacteriana das sub-frações foi relacionada ao alto teor de compostos fenólicos das mesmas. Os resultados obtidos para a CIM e CBM revelaram que o potencial antibacteriano aumentou à medida que o extrato foi fracionado.

As amostras de extratos etanólicos de própolis do grupo 13 coletadas nos meses de fevereiro, abril, julho, outubro e dezembro de 2009 apresentaram grande variação entre as colméias e a época do ano quanto à atividade antimicrobiana. O mês de julho apresentou os maiores halos de inibição, porém sabe-se que a inibição de crescimento microbiano depende do microrganismo testado, do solvente em que a própolis está dissolvido e da concentração do solvente utilizado.

5.9 Comparação da quantidade de flavonóides e outros compostos fenólicos da própolis do grupo 13 em diferentes épocas do ano

A Figura 41, Tabela 21 e Figura 42, Tabela 22 ilustram respectivamente as quantidades médias de compostos fenólicos totais e flavonóides totais das própolis conforme a época do ano.

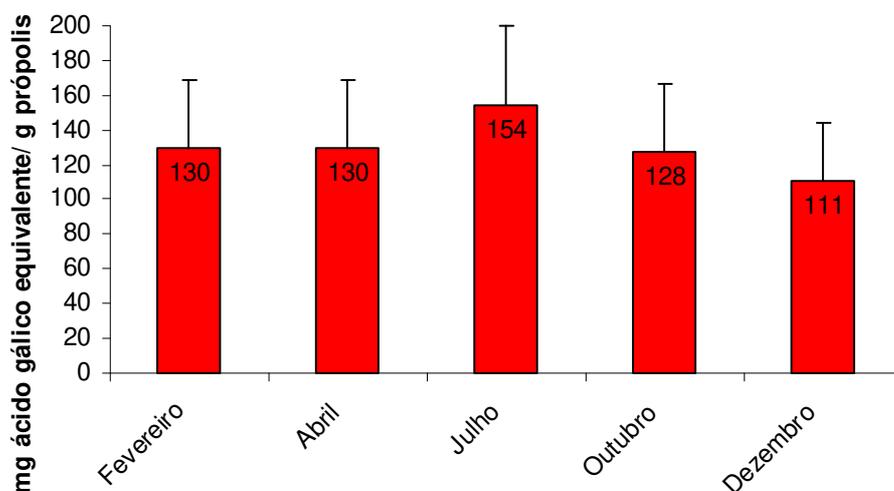


Figura 41 Média de compostos fenólicos totais em mg ácido gálico equivalente/ g própolis das própolis do grupo 13 coletadas em fevereiro, abril, julho, outubro e dezembro de 2008.

Tabela 21 Teor da média de compostos fenólicos totais em mg ácido gálico equivalente/ g das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em fevereiro, abril, julho, outubro e dezembro de 2008.

Amostras de própolis	Compostos fenólicos totais em equivalência de ácido gálico (mg/ g)*
Amostras de fevereiro	130 ^{ab}
Amostras de abril	130 ^{ab}
Amostras de julho	154 ^a
Amostras de outubro	128 ^{bc}
Amostras de dezembro	111 ^{bc}

*Médias seguidas de letras diferentes são significativas a nível de 5% (Teste de Tukey P<0,05).

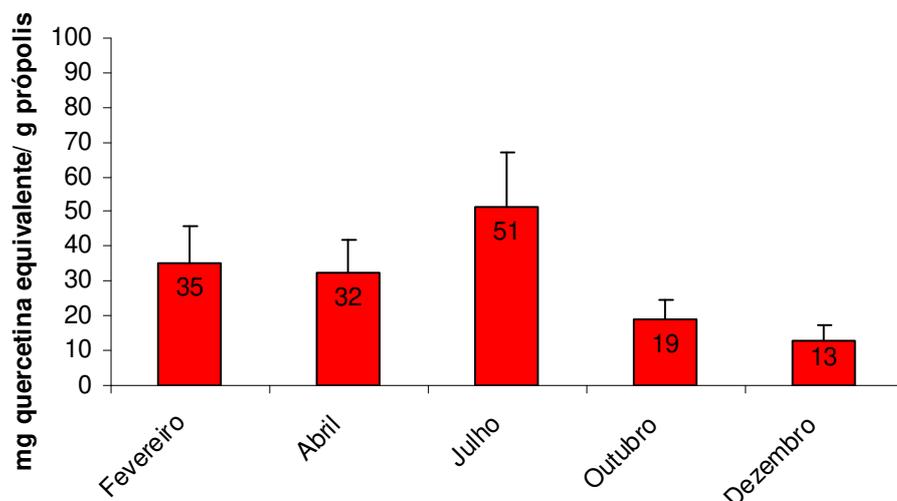


Figura 42 Média de flavonóides totais em mg quercetina equivalente/ g própolis das própolis do grupo 13 coletadas em fevereiro, abril, julho, outubro e dezembro de 2008.

Tabela 22 Teor da média de flavonóides totais em mg quercetina equivalente/ g das cinco amostras de própolis do grupo 13 coletadas em fevereiro, abril, julho, outubro e dezembro de 2008.

Amostras de própolis	Flavonóides totais em equivalência de quercetina (mg/ g)*
Amostras de fevereiro	35 ^{ab}
Amostras de abril	32 ^{ab}
Amostras de julho	51 ^a
Amostras de outubro	19 ^b
Amostras de dezembro	13 ^b

*Médias seguidas de letras diferentes são significativas a nível de 5% (Teste de Tukey $P < 0,05$).

Foi verificado que o mês de julho se destacou com a maior quantidade de compostos fenólicos totais e flavonóides totais, equivalentes a 154 mg de ácido gálico e 51 mg de quercetina por grama de própolis respectivamente. Foi

verificado que os demais resultados não puderam ser diferenciados devido a grande variação de compostos fenólicos e flavonóides entre as amostras de própolis coletadas de diferentes colméias.

A Figura 43 mostra a variação média dos principais flavonóides e outros compostos fenólicos da própolis do grupo 13 conforme a época do ano.

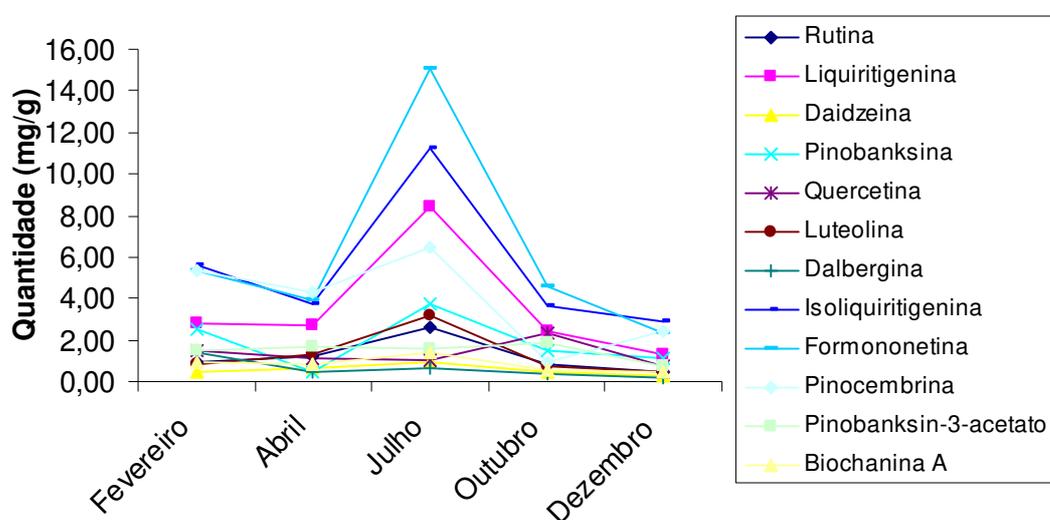


Figura 43 Média da quantidade de flavonóides e outros compostos fenólicos de própolis do grupo 13 coletados em fevereiro, abril, julho, outubro e dezembro de 2008.

Foi verificado que existe alta variação de flavonóides e outros compostos fenólicos nas própolis conforme a época do ano, sugerindo que ocorra variação da quantidade de resina de *Dalbergia ecastophyllum* disponível durante o ano. As amostras de maior destaque foram as do mês de julho que apresentaram maiores quantidades médias de flavonóides e outros compostos fenólicos. Em todos os meses, o composto encontrado em maior quantidade foi a formononetina, onde no mês de julho foi calculada média de 15,1 mg de formononetina por g de própolis.

5.10 Isolamento e identificação de formononetina presente em própolis do grupo 13

A Figura 44 ilustra os perfis cromatográficos e espectrofotométricos das amostras da própolis do grupo 13 concentrada conforme descrito no item 4.10 (Figura 44a), do seu respectivo padrão de formononetina obtido da empresa Extrasynthese Co. (Figura 44b), indicando a presença de formononetina (7-hidroxi-4'metoxi-isoflavona) na própolis do grupo 13.

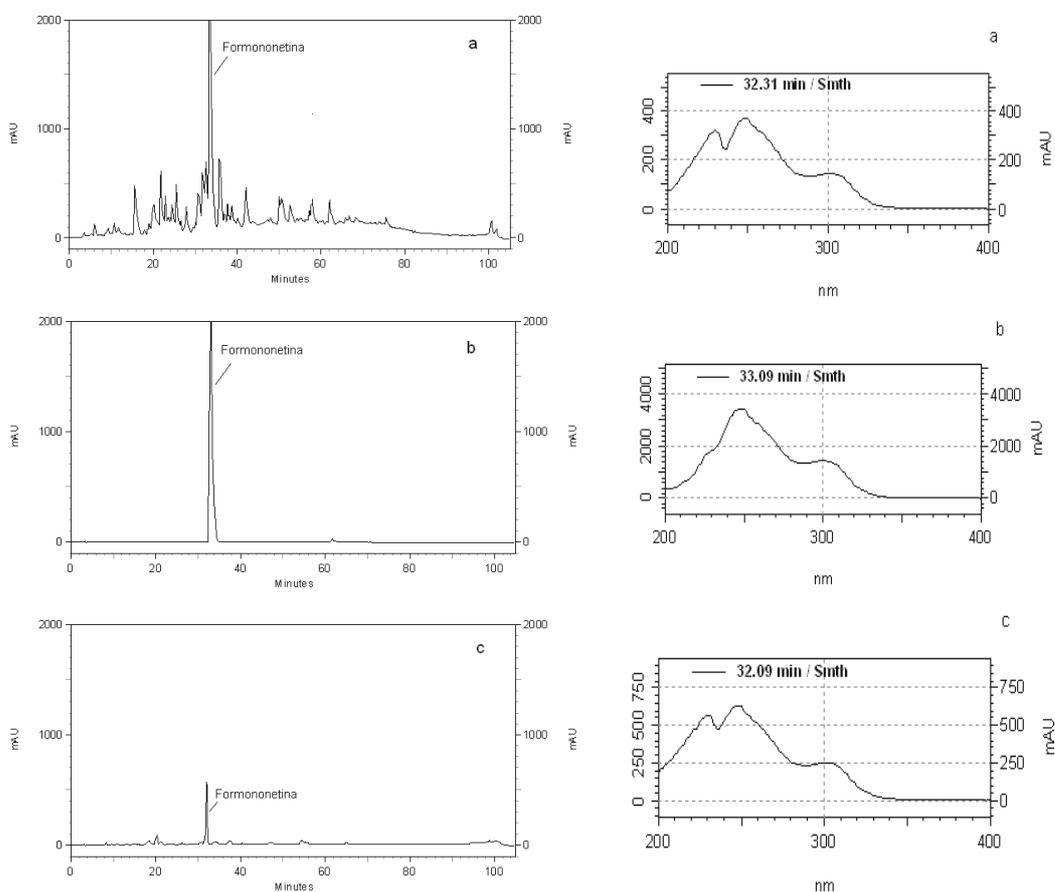


Figura 44 Perfis cromatográficos e espectrofotométricos de formononetina de própolis do grupo 13 concentrada (a), do padrão obtido da empresa Extrasynthese Co.(b) e da fração obtida a partir da própolis do grupo 13 concentrada (c).

A Figura 44c mostra a formononetina obtida por fracionamento da própolis do grupo 13 concentrada (Figura 44a), obtida conforme descrito no item 4.10.

A quantidade extraída de formononetina foi de 3,7 mg/ g de própolis. Foi demonstrada a presença de formononetina com alto grau de pureza como principal composto nesta fração, através da comparação dos perfis cromatográficos e espectrofotométricos (Figuras 44b e 44c) e através da ressonância magnética nuclear (Figura 45).

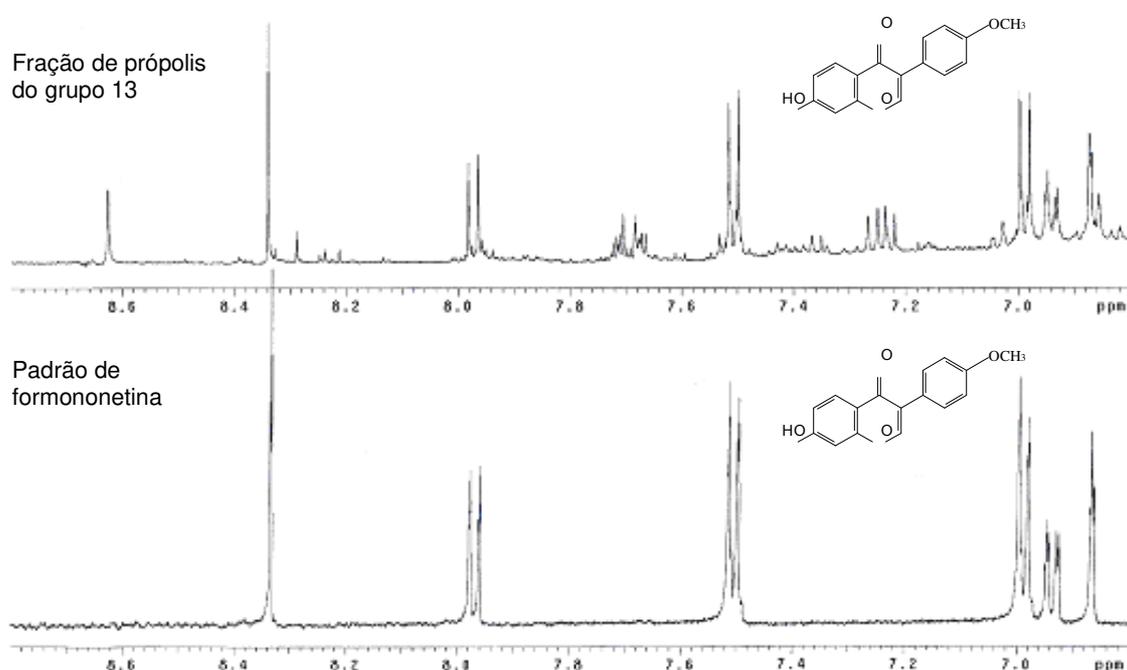


Figura 45 Ressonância magnética nuclear (RMN) da fração da própolis do grupo 13 e do padrão obtido da empresa Extrasynthese Co.

Onde, formononetina (7-hidroxi-4'-metoxi-isoflavona): ¹H NMR (DMSO-d₆) δ 3,78 (3H, s, -OCH₃), 6,86 (1H,d, *J* = 2,3, H-8), 6,93 (1H, dd, *J* = 8,8, 2,3, H-6), 6,99 (2H, m, H-3', H-5'), 7,50 (2H, m, H-2', H-6'), 7,97 (1H, d, *J* = 8,8, H-5), 8,33 (1H, s, H-2).

Foram isolados no trevo vermelho diversos isoflavonóides, como a genisteína, daidzeína, biochanina A e formononetina. Foi constatado que a formononetina e a biochanina A são mais fáceis de serem isoladas, comparadas com genisteína e daidzeína. Porém a isomerização pode ocorrer devido a uma

cascata de reações, onde a formononetina é convertida em daidzeína e a biochanina A é convertida em genisteína (Zgórcza, 2009).

Através do método descrito no item 4.10, é possível isolar a formononetina da própolis vermelha do grupo 13 com alto grau de pureza, assim como é possível isolar a formononetina do trevo vermelho pelo método de Zgórcza (2009), porém a própolis vermelha do grupo 13 é um produto tipicamente brasileiro e pode substituir o trevo vermelho na produção da formononetina isolada.

5.11 Determinação da atividade antiradical (DPPH) de formononetina isolada de própolis do grupo 13

A Figura 46 e a Tabela 11 ilustram a atividade antiradical de formononetina isolada da própolis do grupo 13. Foi verificado que a formononetina em concentração de 20 µg/ mL foi melhor do que algumas amostras de própolis quando comparada com as amostras das Figuras 32, 34 e 35.

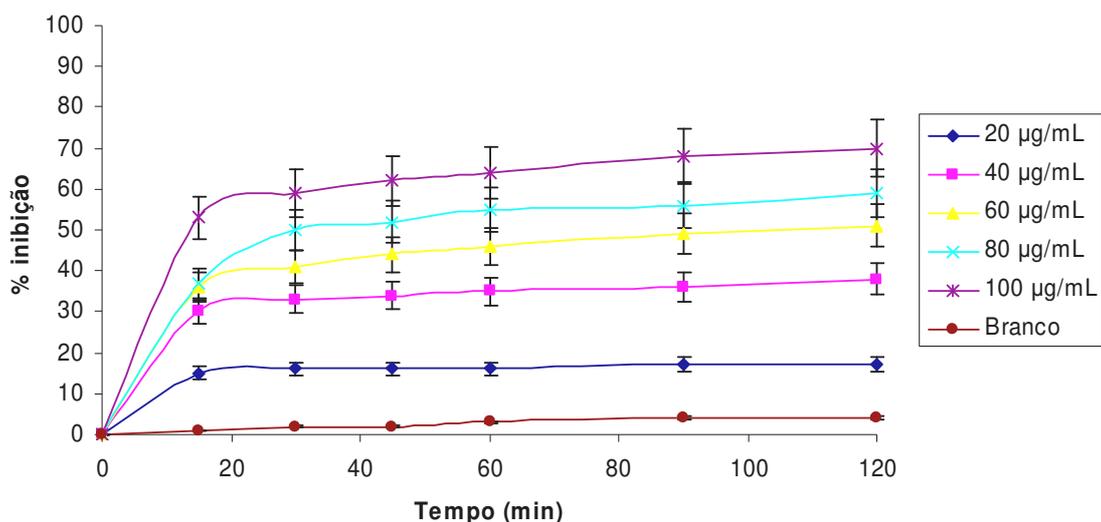


Figura 46 Atividade antiradical de formononetina isolada de própolis do grupo 13 em diferentes concentrações.

A formononetina em concentrações de 40 µg/ mL, 60 µg/ mL, 80 µg/ mL e 100 µg/ mL apresentaram melhores resultados que algumas amostras de própolis vermelha.

Tabela 23 Atividade antirradical de formononetina isolada de própolis do grupo 13 em diferentes concentrações.

	Branco	20 µg/mL	40 µg/mL	60 µg/mL	80 µg/mL	100 µg/mL
Tempo (min)	Absorbância (517 nm)					
0	0,8354	0,8354	0,8354	0,8354	0,8354	0,8354
15	0,8388	0,6422	0,5521	0,4604	0,7319	0,7674
30	0,8248	0,6018	0,4810	0,3790	0,6760	0,7425
45	0,8142	0,5650	0,4393	0,4640	0,6566	0,7326
60	0,7986	0,5195	0,4024	0,3359	0,6278	0,7037
90	0,7846	0,4853	0,3811	0,3175	0,6091	0,6845
120	0,7730	0,4525	0,3655	0,3244	0,5977	0,6696

Alencar *et al.* (2007) analisou a atividade sequestrante de radicais livres DPPH de extrato etanólico de própolis vermelha do estado de Alagoas e suas respectivas frações hexânica e clorofórmica. Foi verificado que a fração hexânica apresentou maior atividade (78%) sequestrante de DPPH que o extrato etanólico e a fração clorofórmica (57 e 55%, respectivamente). A concentração das amostras utilizadas foi de 90 µg/ mL.

A formononetina isolada na concentração de 80 µg/ mL, apresentou igual resultado a melhor própolis coletada nos meses de fevereiro, abril, julho, outubro e dezembro de 2008 (59%). Na concentração de 100 µg/ mL o resultado foi melhor que qualquer amostra coletada durante o ano de 2008. Além disso, a formononetina na concentração de 80 µg/ mL, apresentou resultado semelhante ao extrato etanólico de própolis de Alagoas na concentração de 90 µg/ mL.

5.12 Determinação da atividade antimicrobiana de formononetina isolada de própolis do grupo 13

A Figura 47 ilustra a atividade antimicrobiana de formononetina isolada de própolis do grupo 13 em diferentes concentrações (30, 40, 50, 60, 70, 80, 100 µg/mL), utilizando-se *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 como microrganismo sensível.

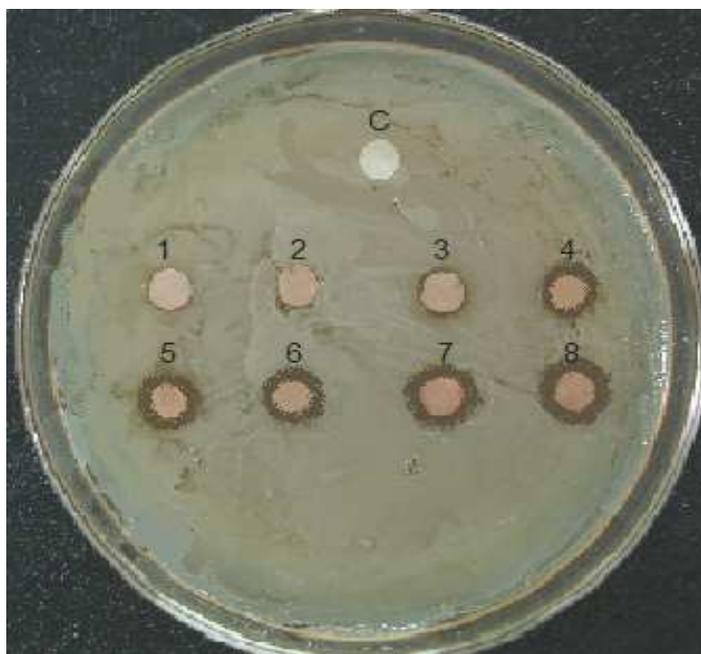


Figura 47 Antibiograma com *S. aureus* de formononetina isolada de própolis do grupo 13.

C = controle (etanol 70%); 1 = 30 µg/mL; 2 = 40 µg/mL; 3 = 50 µg/mL; 4 = 60 µg/mL; 5 = 70 µg/mL; 6 = 80 µg/mL; 7 = 90 µg/mL; 8 = 100 µg/mL de formononetina.

A própolis vermelha do estado de Alagoas apresentou notável atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Staphylococcus mutans* UA159. Foi verificado resultados expressivos nos extratos etanólicos da

própolis vermelha e sua fração clorofórmica. Os valores encontrados foram de 25 e 50 µg/ mL para os dois microrganismos testados. Foi verificado que a ação bactericida da própolis chega a ser quatro vezes maior que seu MIC. Foi demonstrado que a própolis vermelha brasileira tem um alto potencial antibacteriano contra *Staphylococcus mutans*, com o MIC entre 50 e 100 µg/ml (De Castro e Neto., 2003; Alencar *et al.*, 2007).

Foi verificado que ocorreu atividade antimicrobiana contra *S. aureus* a partir da concentração de 60 µg/ mL, indicando possível ação contra *S. mutans*, quando comparados com os resultados de Alencar *et al.* (2007).

6 Conclusões

Conclui-se que a própolis vermelha de João Pessoa - PB apresenta grandes variações entre as colméias em relação à composição de compostos fenólicos totais, flavonóides totais, e alguns compostos fenólicos identificados previamente como rutina, liquiritigenina, daidzeína, pinobanksina, quercetina, luteolina, dalbergina, isoliquiritigenina, formononetina, pinocembrina, pinobanksin-3-acetato e biochanina A. Mostrou-se que as própolis com maiores quantidades de compostos fenólicos totais e flavonóides totais apresentaram melhores atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e atividade antiradical livre.

Constatou-se grandes variações da própolis vermelha de João Pessoa - PB em diferentes épocas do ano em relação à composição de compostos fenólicos totais, flavonóides totais, e alguns compostos fenólicos identificados previamente como rutina, liquiritigenina, daidzeína, pinobanksina, quercetina, luteolina, dalbergina, isoliquiritigenina, formononetina, pinocembrina, pinobanksin-3-acetato e biochanina A. Verificou-se que no mês de julho são encontrados as própolis de melhor qualidade comprovado através da quantificação e classificação dos principais flavonóides e outros compostos fenólicos e conforme sua atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e atividade antiradical, sugerindo-se que ocorra variação da quantidade de resina de *Dalbergia ecastophyllum* disponível durante o ano.

Foi demonstrado no item 4.10 o método de isolamento da formononetina presente na própolis do grupo 13. Foi mostrado que a formononetina possui atividade antiradical em concentrações a partir de 20 µg/ mL, comprovando sua alta atividade contra os radicais livres. Foi verificado que a aplicação a partir de

60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de formononetina promoveu inibição de *Staphylococcus aureus*, demonstrando alta atividade antimicrobiana.

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. 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*, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas - SP, Brasil, 2002.

ALENCAR, S.M., OLDONI, T.L.C., CASTRO, M.L., CABRAL, I.S.R., COSTA-NETO, C.M., CURY, J.A., ROSALEN, P.L. e IKEGAKI, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, n. 2, p. 278-283, 2007.

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

ALVES, D.L. e SILVA, C.R. Fitohormônios: Abordagem Natural da Terapia Hormonal. **Editora Atheneu**, p. 1-54, 2002.

AMOROS, M., LURTON, E., BOUSTIE, J., GIRRE, L., SAUVAGER, F. e CORMIER, M. Comparison of the antiherpes 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, 1992a.

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, 1992b.

ANDERSON, P., PALMBAHA, S. e KIVALKINA, 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.

ANSORGE, S., REINHOLD, D. e LENDECKEL, U. Propolis and some of its constituents down-regulate DNA synthesis and inflammatory cytokine production but induce TGF-beta1 production of human immune cells. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 58, n.7-8, p. 580-589, 2003.

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, 2001a.

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, 2001b.

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 agrícola (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 millennium? **Critical reviews in oral biology and medicine: an official publication of the American Association of Oral Biologists**, v. 13, n. 2, p. 126-131, 2002a.

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

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 Institute**, 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.

CABRAL, I.S.R., OLDONIL, T.L.C., PRADO, A., BEZERRAL, R.M.N., ALENCAR, S.M., IKEGAKI, M., ROSALEN, P.L. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1523-1527, 2009.

CAOA, Y., WANGA, Y., JIA, C. e YE, J. Determination of liquiritigenin and isoliquiritigenin in *Glycyrrhiza uralensis* and its medicinal preparations by capillary electrophoresis with electrochemical detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1042, n. 1-2, p. 203-209, 2004.

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

CASTRO, M.L., CURY, J.A., ROSALEN, P.L., ALENCAR, S.M., IKEGAKI, M., DUARTE, S. e KOO, H. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1512-1516, 2007.

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.

CHANG, Y.C., NAIR, M.G., SANTEL, R.C. e HELFERICH, W.G. Microwave-mediated synthesis of anticarcinogenic isoflavones from soybeans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 1869-1871, 1994.

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 antiHIV 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. A própolis vermelha do nordeste do Brasil e suas características químicas e biológicas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas - SP, Brasil, 2007.

DAUGSCH, A., MORAES, C. S., FORT, P. e PARK, Y. K. Brazilian Red Propolis-Chemical Composition and Botanical Origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, p. 435-441, 2008.

DE CAMPOS, R.O., PAULINO, N., DA SILVA, C.H., SCREMIN, A. e CALIXTO, J.B. Antihyperalgesic 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. Cancer-Principles and Practice of Oncology. **Lippincott-Raven**, 6th edition, 1997.

DI MAGGIO, G. e CIACERI, G. The histaminopexic activity of quercetin. **Archivio italiano di scienze farmacologiche**, v. 11, p. 191-200, 1961.

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.

FORMICA, J.V. e REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, n. 12, p. 1061-1080, 1995.

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. Fundamental immunology. **Raven Press**. 2nd edition, p. 721-733, 1989.

GAOA, M., ZHANGB, W., LIUC, Q., HUA, J., LIUA, G. e DUA, G. Pinocembrin prevents glutamate-induced apoptosis in SH-SY5Y neuronal cells via decrease of bax/bcl-2 ratio. **European Journal of Pharmacology**, v. 591, p. 73-79, 2008.

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. AntiHIV-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.

GOMES, C.A., DA CRUZ, T.G., ANDRADE, J.L., MILHAZES, N., BORGES, F. e MARQUES, M.P. Anticancer Activity of Phenolic Acids of Natural or Synthetic Origin: A Structure-Activity Study. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 25, p. 5395-5401, 2003.

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. Antiinflammatory drugs. **Basic and clinical immunology**. 8th edition, p. 786-794, 1994.

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., Omay, 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.

GUTIERREZ-ZEPEDA, A., SANTELL, R., WU, Z., BROWN, M., WU, Y, KHAN, I., LINK, C.D., ZHAO, B. e LUO, Y. Soy isoflavone glycitein protects against beta amyloid-induced toxicity and oxidative stress in transgenic *Caenorhabditis elegans*. **BMC Neuroscience**, v. 6, n. 54, p. 1-9, 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 POST, B. Propolis allergy I. Origin properties usage and literature review. **Contact dermatitis**, v. 17, p. 163-170, 1987a.

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, 1987b.

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.

ISLA, M.I., PAREDES-GUZMAN, J.F., NIEVA-MORENO, M.I., KOO, H. e PARK, Y.K. Some Chemical Composition and Biological Activity of Northern Argentine Propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1166-1172, 2005.

ITO, J., CHANG, F.-R., WANG, H.-K., PARK, Y.K., IKEGAKI, M., KILGORE, N. e LEE, K.-H. AntiAIDS Agents. 48. AntiHIV 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.

KANAZAWA, M., SATOMI, Y., MIZUTANI, Y., UKIMURA, O., KAWAUCHI, A. SAKAI, T., BABA, M. e OKUYAMA, T. Isoliquiritigenin inhibits the growth of prostate cancer. **European urology**, v. 43, p. 580-586, 2003.

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 artepillin C, an active ingredient in Brazilian propolis. **Anticancer research**, v. 21, p. 221-228, 2001a.

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 artemisinin 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 artemisinin C. **Virchows Archiv : an international journal of pathology**, v. 438, n. 3, p. 259-270, 2001b.

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.

KONG, L.D., ZHANG, Y., PAN, X., TAN, R.X. e CHENG, C.H.K. Inhibition of xanthine oxidase by liquiritigenin and isoliquiritigenin isolated from *Sinofranchetia chinensis*. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 57, p. 500-505, 2000.

KONIG, B. e DUSTMANN, J.H. The caffeoylics as a new family of natural antiviral compounds. **Naturwissenschaften**, v. 72, n. 12, 659-661, 1985.

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, 2000a.

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, 2002a.

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, 2000b.

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, 2002b.

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.

KUMAZAWA, S., UEDA, R., HAMASAKA, T., FUKUMOTO, S., FUJIMOTO, T. e NAKAYAMA, T. Antioxidant prenylated flavonoids from propolis collected in Okinawa, Japan. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 7722-7725, 2007.

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. Antiherpes 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, antiinflammatory, 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. Techniques of flavonoid identification. **Academic Press**, 1982

MATSUSHIGE, K., BASNET, P., HASE, K., KADOTA, S., TANAKA, K. e NAMBA, T. Propolis protects pancreatic β -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 CHINOOU, 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 CCl₄ 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, 2005a.

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, 2005b.

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, 2005c.

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.

MORAES, C.S. Estudo comparativo de diferentes extrações de própolis dos grupos 12 e 13 e suas atividades biológicas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas - SP, Brasil, 2007.

MORAES, C.S., DAUGSCH, A., LI, H., RHIM, J.S. e PARK, Y.K. Comparative antiproliferation of human prostate cancer cells by ethanolic extracts of two groups of Brazilian propolis. **Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, em publicação.

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. Cancer Topics - Types of Treatment., <http://www.cancer.gov/cancertopics/biologcaltherapy> , 2004.

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.

OTA, C., UNTERKIRCHER, C., FANTINATO, V. e SHIMIZU, M.T. Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. **Mycoses**, v. 44, p.375-378, 2001.

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. The usage and composition of propolis added cosmetics in Korea, *International Conference on Bee Products: Properties, Applications and Apitherapy*, p. 75, 1996.

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., IKEGARI, 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.

PICCINELLI, A.L., FERNANDEZ, M.C., CUESTA-RUBIO, O., HERNANDEZ, I.M., SIMONE, F.D. e RASTRELLI, L. Isoflavonoids Isolated from Cuban Propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 23, p. 9010-9016, 2005.

POPRAVKO, S.A. e SOKOLOV, M.V. Plant sources of propolis. **Pchelovodstvo**, 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. American Cancer Society's guide to complementary and alternative cancer methods. **American Cancer Society**, 1st edition , 2000.

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, A.C., UYEMURA, S.A., LOPES, J.L.C., BAZON, J.N., MINGATTO, F.E. e CURTI, C. Effect of naturally occurring flavonoids on lipid peroxidation and membrane permeability transition in mitochondria. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 24, n. 9, p. 1455-1461, 1998.

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 antituberculosis 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 Grippe. Materialy Vsesoyuznogo Simpoziuma po Khimioprofilaktike I Khimioterapii Grippe. 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, R. e GRUNOW, W. 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. Antiinfluenza 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., BHADOURIA, 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. Immunology and inflammation: basic mechanisms and clinical consequences, **Mcgraw-Hill**, p. 760, 1994.

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.

SILVA, B.B., ROSALEN, P.L., CURY, J.A., IKEGAKI, M., SOUZA, V.C., ESTEVES, A. e ALENCAR, S.M. Chemical Composition and Botanical Origin of Red Propolis, a New Type of Brazilian Propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n. 3, p. 313-316, 2007.

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.

TEIXEIRA, E.W., MESSAGE, D., NEGRI, G., SALATINO, A., STRINGHETA, P.C. Seasonal Variation, Chemical Composition and Antioxidant activity of Brazilian Propolis Samples. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, em publicação.

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. Cancer Epidemiology and Prevention. **Comprehensive Textbook of Oncology**, p. 3-27, Baltimore, 1986.

TOLLESON, W.H, DOERGE, D.R., CHURCHWELL, M.I., MARQUES, M.M. e ROBERTS, D.W. Metabolism of Biochanin A and Formononetin by Human Liver Microsomes in Vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 17, p. 4783-4790, 2002.

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.

TRUSHEVA, B., POPOVA, B., BANKOVA, V., SIMOVA, S., MARCUCCI, M.C., MI-MIORIM, P.L. e PASIN, R. F. Brazilian propolis: Correlation between chemical composition and antimicrobial activity. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n.3, p.317-324, 2006.

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.

USIA, T., BANSKOTA, A.H., TEZUKA, Y., MIDORIKAWA, K., MATSUSHIGE, K. e KADOTA, S. Constituents of Chinese Propolis and Their Antiproliferative Activities. **Journal of Natural Products**, v. 65, n.5, p. 673-676, 2002.

UTO, Y., HIRATA, A., FUJITA, T., TAKUBO, S., NAGASAWA, H. e HORI, H. First total synthesis of artepillin 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 antiinflammatory drugs. **Scandinavian journal of rheumatology**, v. 25, p. 9-21, 1996.

VILLANUEVA, V. R., BARBIER, M., GONNET, M. e LAVIE, P. The flavonoids of propolis. Isolation of a new bacteriostatic substance: pinocembrin (dihydroxy-5, 7 flavanone). **Annales de l'Institut Pasteur**, v. 118, n. 1, p. 84-87, 1970.

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. Drugs used in the chemotherapy of protozoal infections. In The Pharmacological Basis of Therapeutics. **Perganom Press, New York**, 8th edition, p. 999-1007, 1990.

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.

WILLFÖR, S.M., NISULA, L., HEMMING, J.E., REUNANEN, M.H.T. e HOLMBOM, B.R. Bioactive phenolic substances in industrially important tree species. Part 1: Knots and stemwood of different spruce species. **Holzforschung**, v. 58, n. 4, p. 335-344, 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.

WONG, C.K. e KEUNG, W.M. Bovine adrenal 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/5-ene-4ene isomerase: characterization and its inhibition by isoflavones. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v. 71, n. 5-6, p. 191-202, 1999.

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.

XIA, M., ZHOU, X., YAO, H., JIANG, H., BRUCE, I.C., WEI, E. e XIA, Q. Rutin-induced Endothelium-dependent Vasorelaxation in Rat AorticRings and the Underlying Mechanism. **Engineering in Medicine and Biology 27th Annual Conference Shanghai**, 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.

ZGÓRKA, G. Pressurized liquid extraction versus other extraction techniques in micropreparative isolation of pharmacologically active isoflavones from *Trifolium* L. species. **Talanta**, v. 71, n. 1, 46-53, 2009.