

Myrella Lessio Castro

Cirurgiã Dentista

Avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos isolados da própolis do tipo 6.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, no Programa de Pós-Graduação em Odontologia, para obtenção do título de MESTRE em Odontologia, Área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen

Co-orientador: Prof. Dr. Severino M. Alencar

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen

Prof^a. Dr^a. Cínthia Pereira Machado Tabchoury

Prof. Dr. Rogério Heládio Lopes Motta

Piracicaba, SP
2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

C279a Castro, Myrella Lessio.
Avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos isolados da própolis do tipo 6. / Myrella Lessio Castro. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2008.

Orientadores: Pedro Luiz Rosalen, Severino M. Alencar.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Antimicrobianos. 2. Ácidos graxos. I. Rosalen, Pedro Luiz. II. Alencar, Severino M. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

(mg/fop)

Título em Inglês: Evaluation of the antimicrobial activity of the isolated compounds from propolis type 6

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Antimicrobial. 2. Fatty acids

Área de Concentração: Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica

Titulação: Mestre em Odontologia

Banca Examinadora: Pedro Luiz Rosalen, Cíntia Pereira Machado Tabchoury, Rogério Heládio Lopes Motta

Data da Defesa: 21-02-2008

Programa de Pós-Graduação em Odontologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, em sessão pública realizada em 21 de Fevereiro de 2008, considerou a candidata MYRELLA LESSIO CASTRO aprovada.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Pedro Luiz Rosalen".

PROF. DR. PEDRO LUIZ ROSALEN

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Rogério Heládio Lopes Motta".

PROF. DR. ROGÉRIO HELÁDIO LOPES MOTTA

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Cinthia Pereira Machado Tabchoury".

PROFa. DRa. CINTHIA PEREIRA MACHADO TABCHOURY

Agradecimentos Especiais

A Deus e a Nossa Senhora, que sempre abençoaram de graças minha vida e amparam-me nas horas difíceis.

“Tudo posso naquele que fortalece”

*Agradeço a minha mãe **Irene**, pelo amor incondicional, a educação moldada em honestidade e humildade, pelo incentivo e pela batalha de transformar o meu sonho em realidade.*

*A **minha família**, obrigada por terem me ajudado a suportar os desafios, a distância, os momentos de ausência e as dificuldades.*

“Eu tenho tanto pra te falar, mas com palavras não sei dizer como é grande o meu amor por vocês.”

*Ao **Caio**, meu companheiro, cúmplice, amante, amigo e namorado; Agradeço pela torcida, incentivo, compreensão e principalmente pelo amor e a paciência.*

“Eu sei que vou te amar, por toda minha vida eu vou te amar... eu sei que vou chorar a cada ausência tua eu vou chorar... Eu sei que vou sofrer a eterna desventura de viver a espera de viver ao lado teu or toda a minha vida”.

*Ao prof. Dr. **Pedro Luiz Rosalen**, por ter aberto as portas da pós-graduação, possibilitando meu amadurecimento e crescimento profissional. Pelo exemplo, empenho, confiança e atenção.*

*Ao prof. Dr. **Severino Matias de Alencar** pelas inúmeras oportunidades, por aceitar co-orientar esta dissertação e pela forma que conduziu; pelos ensinamentos, estímulos, apoio durante todas as etapas deste trabalho e me permitir despertar a curiosidade sempre.*

“Sábio não é quem dá as verdadeiras respostas, mas quem formula as verdadeiras questões”.

Agradecimentos

A Universidade Estadual de Campinas, por meio do Reitor Prof. Dr. José Tadeu Jorge.

A Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP-UNICAMP), por meio do diretor Prof. Dr. Francisco Haiter Neto.

Ao Departamento de Ciências Fisiológicas da FOP, por meio da chefe de departamento Prof^a. Dr^a. Fernanda Klein Marcondes.

Ao Prof. Dr. Mário Alexandre Coelho Sinhoreti, coordenador dos cursos de Pós-Graduação da FOP/UNICAMP e a Prof^a. Dr^a. Cláudia Herrera Tambeli, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Ao CNPq pela concessão de bolsa de Mestrado e a FAPESP pela concessão de bolsa de treinamento técnico em 2005.

Aos professores da Área de Farmacologia, Anestesiologia, e Terapêutica, Prof^a. Dr^a. Maria Cristina Volpato, Prof. Dr. Francisco Groppo, Prof. Dr. Eduardo Dias Andrade, e a todos os docentes do Programa de Pós-Graduação em Odontologia de Piracicaba pelos ensinamentos, dicas e vivência passados durante as aulas e conversas de corredores.

Ao Prof. Dr. Masaharu Ikegaki e Prof. Dr. Hyun Koo pela participação na execução desse trabalho.

A Prof^a. Dr^a Andréa M do Nascimento, pela elucidação da estrutura química do composto.

A Prof^a Dr^a. Vera Redher e Prof^a Dr^a. Mary Ann Foglio pela ajuda no isolamento do composto e o uso dos laboratórios do CPQBA.

Aos Professores Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves, Prof. Dr. Gilson César Nobre Franco, Prof^a. Dr^a Rosângela Maria N. Bezerra, Prof^a. Dr^a. Thais Maria Ferreira S.

Vieira, membros da banca de qualificação, pelas sugestões para realização e finalização deste projeto.

A *Prof^a. Dr^a* Simone Duarte, amiga que me ensinou e incentivou na vida acadêmica.

Ao seu José Elpídio Cerqueira, apicultor que forneceu a enorme quantidade de própolis.

Ao professor Jorge Valério pela preciosa ajuda e paciência dadas nas aulas de inglês.

Aos meus amigos e amigas de laboratório da FOP Cristiane, Karina, Luciana, Luciana Berto, Michele, Ramiro e Regiane pelos momentos de felicidade, troca de experiências e incentivo.

Aos meus amigos e amigas de laboratório da ESALQ Ivani, Tatiane, Aline, Lucimara, Adna, Ingrid e Câimbra, pelas risadas, apoio, carinho e atenção.

As Amigas de graduação Mariana, Marcela, Simone e Valéria obrigada por me ensinarem o segredo da amizade, da convivência e da harmonia em grupo.

A Amiga Claudia e Elaine obrigada por serem amigas especiais nestes 15 anos, e que nestes últimos anos aceitarem minha amizade em pequenas doses homeopáticas, porem sempre verdadeiras.

A Amiga Gláucia e Stella, pelos bons momentos vividos, as horas de terapia e as baladas.

As novas amigas Cristina, Leatrice, Laura e Adriele pelas boas risadas e conselhos.

As amigas Regiane, Luciana e Eliane pelos momentos "páginas da vida" sempre regados com muita risada, ao carinho e por me fazer acreditar que qualquer dificuldade, por maior que pareça, torna-se insignificante quando se tem amigos.

A Elisa que com muita calma e paciência me agüentou todos estes anos

As minhas irmãs, que amo tanto, e aos meus sobrinhos que entenderam minha ausência, pelo apoio e torcida.

A minha mais nova família Pacheco-Lopes pelo acolhimento, atenção e carinho.

"Aprendi que se depende sempre de tanta gente diferente e toda pessoa sempre reflete as marcas de lições diárias de outras tantas pessoas. É tão bonito quando a gente entende que a gente é tanta gente, onde quer que a gente vá; É tão bonito quando a gente sente que nunca está sozinho por mais que a pessoa pense estar. . ."
(Gonzaquinha)

Resumo

Própolis é um produto natural mundialmente reconhecido por suas propriedades biológicas, com atividades antimicrobiana e anticariogênica. A própolis brasileira do tipo 6 da região de mata atlântica (BA), Nordeste, apresenta na composição química uma grande quantidade de compostos apolares, na maioria não identificada, e ausência de flavonóides, aos quais são atribuídos a atividade biológica. Entretanto, esta própolis apresenta alta atividades antimicrobiana e anticariogênica *in vitro* e *in vivo*. Assim, os objetivos deste estudo foram: (a) avaliar a atividade antimicrobiana e a composição química da própolis tipo 6, do seu extrato etanólico, frações e ácidos graxos encontrados em sua composição, identificando o(s) responsável(is) pela sua atividade biológica; e (b) isolar e identificar o(s) composto(s) bioativo(s) da própolis tipo 6, responsável pela atividade antimicrobiana. O extrato etanólico (EEP), as frações hexânica (H-Fr) e polar (P-Fr) obtidos pela técnica de fracionamento líquido-líquido foram analisados por Cromatografia Gasosa de Espectrofometria de Massa (CG-EM), Cromatografia Gasosa de Ionização de Chama (CG-FID), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e foram testados contra *Streptococcus mutans* Ingbritt 1600 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 determinando-se as Concentrações Inibitória (CIM) e Bactericida (CBM) Mínima. A H-Fr foi cromatografada em coluna LH-20, gerando 9 sub-frações, as quais foram avaliadas quanto à atividade antimicrobiana em difusão em ágar com *S. aureus*, para seleção da fração bioativa, e destinada ao isolamento dos compostos por CLAE preparativa. Somente um composto isolado demonstrou atividade antimicrobiana, o qual foi identificado por Ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H , ^{13}C e Infravermelho (IR) como sendo uma benzofenona prenilada denominada de *Plukenetiona H*. Este composto foi testado contra *Streptococcus mutans* UA159, *Streptococcus sobrinus* 6715, *Streptococcus gordonii* ATCC10558, *Streptococcus oralis* PB182, *Actinomyces naeslundii* ATCC 12104 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 para determinação da CIM, CBM e para a inibição da aderência celular ao biofilme de *S. mutans* UA159 e *S. sobrinus* 6715. Os ácidos graxos testados não apresentaram atividade antimicrobiana, entretanto a *Plukenetiona H* apresentou forte atividade antimicrobiana para os microrganismos testados, com CIM variando de 1,5 - 6.2 $\mu\text{g/mL}$ e CBM: 26 - 106 $\mu\text{g/mL}$. Pelo fato da molécula bioativa ser

uma nova substância nunca relatada na literatura e possuir alta atividade antimicrobiana contra vários microrganismos patogênicos, este composto apresenta-se como um promissor agente antimicrobiano.

Palavras-chave: Própolis tipo 6, Benzofenona prenilada, Atividade antimicrobiana.

Abstract

Propolis is a natural product globally known for its biological properties, with antimicrobial and anticariogenic activity. The chemical composition of the propolis type 6, from northeastern Brazil, Atlantic forest, Bahia state, consists of non-polar compounds, most of which are not identified, and absence of flavonoids, which are attributed to its biological activity; however, propolis presents good anticariogenic and antimicrobial activity *in vitro* and *in vivo*. Thus, the aim of this study was (a) to evaluate the antimicrobial activity and chemical composition of propolis type 6, its ethanolic extract, fractions and fatty acids found in its composition, and (b) to isolate and identify its bioactive compound. Its ethanolic extract (EEP) and hexane (H-Fr) and polar (P-Fr) fractions obtained with the liquid-liquid technique were analyzed through gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS), gas chromatography flame ionization (GC-FID), high-performance liquid chromatography (HPLC) and then tested against *Streptococcus mutans* Igbritt 1600 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Minimal inhibitory (MIC) and bactericidal (MBC) concentrations were determined. The H-Fr was rechromatographed in LH-20 column, generating 9 sub-fractions, which were tested for antimicrobial activity against *S. aureus* in agar diffusion to determine its bioactive fraction. Preparative HPLC was used to isolate its bioactive compounds. Only one compound isolated demonstrated antimicrobial activity and was identified by Nuclear Magnetic Resonance (NMR), ^1H , ^{13}C and Infrared (IR) as a prenylated benzodienone and denominated *Plukenetione H*. This compound was tested against *Streptococcus mutans* UA159, *Streptococcus sobrinus* 6715, *Streptococcus gordonii* ATCC10558, *Streptococcus oralis* PB182, *Actinomyces naeslundii* ATCC 12104 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 to determine the MIC and MBC and to determine cell adhesion inhibition in biofilm of *S. mutans* UA159 and *S. sobrinus* 6715. Propolis fatty acids tested showed no antimicrobial activity; however, its compound *Plukenetione H* showed good antimicrobial activity against the microorganisms tested, with MIC ranging from 1.5 to 6.2 $\mu\text{g/mL}$ and MBC from 26 to 106 $\mu\text{g/mL}$. Further studies are needed to investigate this new compound, a promising antimicrobial agent.

Key words: Brazilian propolis, prenylated benzophenone, antimicrobial activity

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	1
2 – CAPÍTULOS DOS ARTIGOS CIENTÍFICOS	
Capítulo I: “Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis type 6 and its fractions.”	7
Capítulo II: “New bioactive prenylated benzophenone isolated from Brazilian propolis type 6”.	22
3- CONCLUSÕES	38
4- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
5- ANEXOS	
5.1- Anexo 1 – Resolução do formato alternativo para defesa da dissertação de mestrado.	45
5.2- Anexo 2 – E-mail de confirmação de submissão do artigo 1 (Capítulo I).	46

1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais têm sido fontes valiosas para o desenvolvimento de novas drogas (Newman *et al.*, 2003), permitindo o avanço na descoberta de agentes terapêuticos para diversas doenças (Clardy and Walsh, 2004). Entre todas as novas drogas aprovadas pelo *Food and Drug Administration* (FDA) ou entidades equivalentes de outros países, 28% delas são totalmente de origem de produtos naturais, 39% são derivadas destes e 33% são drogas sintéticas (Newman *et al.*, 2003). O valor dos produtos naturais está claramente reconhecido e os desafios são identificar novos compostos bioativos, elucidar seus mecanismos de ação e propor o uso terapêutico.

Dentre os produtos naturais comercializados atualmente, os produtos de origem apícola recebem um destaque especial por suas diversas propriedades farmacológicas (Park *et al.*, 2000) e são conhecidos por praticamente todas as civilizações antigas (Alencar, 2002). As histórias das medicinas das civilizações Chinesa, Tibetana, Egípcia e Greco-Romana são muito ricas, todas contendo em seus escritos antigos, centenas de receitas, onde entram principalmente a própolis para curar ou prevenir enfermidades (Alencar, 2002).

As abelhas usam a própolis para proteger as colméias contra insetos invasores e microrganismos, empregando-a no reparo de frestas ou danos à colméia, no preparo de locais assépticos para a postura da abelha rainha e na mumificação de insetos invasores (Marcucci, *et al.* 1998). A própolis é uma resina de coloração e consistência variadas coletada por abelhas da espécie *Apis mellifera* de diversas partes das plantas como brotos, botões florais e exudatos resinosos (Ghisalberti, 1979; Bonhevi *et al.*, 1994).

A própolis destaca-se tanto por suas propriedades biológicas, tais como: atividades antimicrobianas, antiinflamatórias, cicatrizante, anestésica, antitripanossomal (Marcucci *et al.*, 2001; Montpied *et al.*, 2003, Cunha *et al.*, 2004), anticariogênica (Park *et al.*, 1998a; 1998b; Koo *et al.*, 2000a; 2000b; Rosalen *et al.*, 2002; Duarte *et al.*, 2003; 2006; Castro *et al.*, 2007 Alencar *et al.*, 2007), antiviral, anticarcinogênica, antioxidante (Alencar, 2002; Chen *et al.*, 2003; Ishikawa *et al.*, 2004; Kumazawa *et al.*, 2004), citotóxica (Banskota *et al.* 2000) e fitotóxica (Johnson *et al.*, 1994), bem como pela possibilidade de aplicação nas indústrias farmacêutica e alimentícia, como alimento funcional (Ackermann, 1991).

Devido à variedade de uso da própolis e/ou dos seus compostos isolados há um grande número de patentes registradas em todo o mundo. Desde a primeira patente, em 1965, até 1999 já foram depositadas cerca de 239 patentes no mundo. Hoje 43% de todas as patentes depositadas são japonesas. Em relação ao Brasil, a primeira patente com própolis surgiu somente em 1995, para o uso no tratamento odontológico de prevenção de cáries e gengivites (Itice, 1995). Até 1999, o Brasil possuía somente 3 patentes (menos de 2% de todas as patentes depositadas). Quinze patentes, ou seja, 6,2% das patentes depositadas até o começo de 1999, referem-se ao uso da própolis no tratamento odontológico. Essa é uma das aplicações da própolis mais estudada em todo mundo, com relatos científicos desde 1952 (Pereira *et al.*, 2002).

A composição química da própolis varia de acordo com a biodiversidade da região onde esta é coletada (Bankova *et al.*, 1999; Kujumugiev *et al.*, 1999; Koo *et al.*, 2000b) e com a variação sazonal (Sforcin *et al.*, 2000; Castro *et al.*, 2007). Entre os compostos químicos da própolis, os flavonóides agliconas têm sido considerados como as substâncias biologicamente ativas (Ghisalberti, 1979, Bankova *et al.*, 1982; 1996; Koo *et al.*, 1999), sendo inclusive o marcador químico da própolis segundo a Legislação Brasileira (Brasil, 1950), embora outros compostos também estejam envolvidos, como os derivados do ácido cinâmico e seus ésteres (Ikeno *et al.*, 1991; Koo *et al.*, 1999) e os diterpenos (Bankova *et al.*, 1996).

A própolis é constituída geralmente por 55% de resinas e bálsamos, 30% de ceras, 10% de pólen e 5% de metabólitos secundários incluindo, flavonóides, ácidos fenólicos, além de minerais (Miyataka *et al.*, 1997). Os principais compostos se encontram distribuídos nas seguintes classes: ácidos fenólicos e seus ésteres, flavonóides (flavonas, flavononas, flavonóis, dihidroflavonoís, chalconas), benzopirano, benzofenona, éster do ácido caféico, triterpenóides (cicloartano, alcanosatos de lupeol, ácido morônico e 3 β -acetato de bauerenol), derivados dos ácidos cinâmico, benzóico, peróxidos de naftoquinonas, β -esteróides, aldeídos aromáticos, álcoois, sesquiterpenos, naftaleno e derivados do estilbeno (Greenaway *et al.*, 1990; Aga *et al.*, 1994; Bankova *et al.*, 1995; Marcucci *et al.*, 1996a; Rubio *et al.*, 1999; Baskota, *et al.*, 2000; Chen, *et al.*, 2003; Albuquerque *et al.*, 2007). As vitaminas B1, B2, B6, C, E e minerais como manganês,

ferro, cálcio, alumínio também já foram identificados em amostras de própolis, assim como os açúcares arabinose, frutose, glicose, sacarose e maltose (Bonvehi, *et al.*, 1994; Marcucci *et al.*, 1995).

Dos diversos compostos químicos identificados e isolados das própolis, há uma atenção especial à classe das benzofenonas, que estão presentes nas própolis encontradas em regiões de clima tropical (Rubio *et al.*, 1999; Cuesta Rubio *et al.*, 2001; Albuquerque, *et al.*, 2007). Estes compostos isolados apresentam diversas atividades biológicas tais como ações anti-câncer (Ito *et al.*, 2003), anti-HIV (Gustafson *et al.*, 1992) e anti-ulcerativa (Yamaguchi *et al.*, 2000). Além disso, o potencial antimicrobiano dessas substâncias é confirmado por sua ação sobre cocos gram-positivos, gram-negativos e fungos (Bakana *et al.*, 1987; Rubio *et al.*, 1999); *Actinomyces sp.* (Rubio *et al.*, 1999); *Staphylococcus aureus* (Hussain *et al.*, 1982; Iinuma *et al.*, 1996; Santos *et al.*, 1996); *Trypanossoma cruzi* (Alves *et al.*, 1999); e *Helicobacter pylori* (Chatterjee *et al.*, 2003).

No Brasil, devido a grande biodiversidade e as diferentes zonas de temperaturas que nosso país apresenta, as própolis brasileiras apresentam uma variabilidade química bastante acentuada. Assim, as própolis brasileiras foram classificadas em 12 tipos de acordo com o perfil químico e geográfico (Park *et al.*, 2000), que identifica diferenças qualitativas e quantitativas na composição química. Entre esses, os tipos que apresentaram melhor atividade antimicrobiana contra os patógenos bucais foram os tipos: 3 (região sul), 6 (região nordeste) e 12 (região sudeste) (Koo *et al.*, 2000a; 2000b; 2000c; Duarte *et al.*, 2003; 2006).

A própolis do tipo 6 apresenta uma composição química distinta das demais, principalmente pela completa ausência de flavonóides e presença de outros compostos apolares de cadeia longa (Moura, 2000 e Alencar *et al.*, 2001). Porém, a própolis tipo 6 tem demonstrado resultados promissores, *in vitro* e *in vivo*, contra os patógenos bucais (Koo, *et al.*, 2000b; Duarte *et al.*, 2003; 2006).

Koo *et al.* (2000b) avaliaram o efeito de própolis tipo 6, proveniente da região de Mata Atlântica do nordeste brasileiro (Bahia), sobre o crescimento do microrganismo *Streptococcus mutans* e na aderência celular. O extrato etanólico da própolis (EEP) tipo 6 mostrou forte atividade em todos os parâmetros avaliados neste estudo. Os valores da

concentração inibitória mínima (MIC) e concentração bactericida mínima (MBC) foram próximos dos EEP da própolis tipo 12, que é amplamente estudada e comercializada como agente antimicrobiano (Pereira *et al.*, 2002). A aderência das células dos microrganismos *S. mutans* e *S. sobrinus* foi marcadamente inibida pelo EEP da própolis tipo 6, demonstrando significativa inibição em todas as concentrações quando comparadas com o controle (etanol 80%).

Duarte *et al.* (2006) relatam que as atividades anti-placa e anti-cárie da própolis tipo 6 e suas frações estão relacionadas com a inibição dos fatores de virulência do biofilme bacteriano, como a redução da produção de polissacarídeos insolúveis. Além disso, os tratamentos com a própolis tipo 6 reduziram a produção de ácidos em biofilmes de *S. mutans*, e inibiram a atividade das F-ATPase, enzimas relacionadas à manutenção do pH intracelular em meio ácido.

Os perfis químicos do extrato bruto da própolis do tipo 6 e da sua fração biologicamente ativa (fração hexano) apresentam grande quantidade de ácidos graxos, entre eles os ácidos oléico, linoléico, palmítico e esteárico, além de outros compostos ainda não identificados (Duarte *et al.*, 2006). As altas concentrações de ácidos graxos encontrados, bem como os efeitos apresentados pelos tratamentos com esta própolis, sugerem que estes ácidos estejam relacionados com a atividade biológica contra os patógenos bucais (Duarte *et al.*, 2006).

Alguns trabalhos na literatura relatam a atividade antimicrobiana de ácidos graxos e/ou a misturas deles, como por exemplo, o estudo de Wille & Kydonieus (2003) em que o ácido láurico e o ácido palmitoléico causaram redução significativa no crescimento das bactérias *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus salivarius* e *Fusobacterium nucleatum*. Em acréscimo, Ooshima *et al.* (2000), relataram que os ácidos graxos apresentam atividade anticárie, sendo atribuída à capacidade de modificar a permeabilidade da membrana da bactéria, a formação de mistelas ao redor das células o que dificultaria sua aderência a outras superfícies, bem como o metabolismo celular (Willins *et al.*, 1982). Zheng *et al.* (2005) observaram que os ácidos graxos insaturados palmitoléico, oléico, linoléico, linolênico e araquidônico possuem atividade antimicrobiana, entretanto, faltam elucidações sobre o mecanismo de ação nas células bacterianas.

Entretanto, não há na literatura nenhuma confirmação de que os ácidos graxos presentes na própolis do tipo 6 sejam os responsáveis pelas ações antimicrobianas já registradas, ou se outros compostos ainda não identificados seriam os responsáveis pela ação biológica desta própolis.

Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana do extrato, frações e ácidos graxos majoritários na própolis brasileira do tipo 6. Além disso, também foi o objetivo isolar e identificar compostos bioativos da própolis tipo 6 e verificar quais deles apresentam atividades biológicas sobre os patógenos bucais. Este estudo também pretende contribuir para a descoberta de novos compostos bioativos de origem natural, que possam ser avaliados e empregados futuramente em uso terapêutico.

2. CAPÍTULOS DOS ARTIGOS CIENTÍFICOS

Esta dissertação está de acordo com a Informação CCPG/002/06, UNICAMP (anexo 1), que regulamenta o formato alternativo para dissertação e tese, permitindo a inserção de artigos científicos de autoria ou co-autoria do candidato.

Assim sendo, este capítulo é composto de 2 estudos, que encontram-se em fase de submissão em revistas científicas conforme descrito abaixo:

Estudo 1: **“Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis type 6 and its fractions.”** Myrella Lessio Castro, Walquíria Ribeiro, Massaharu Ikegaki, Hyun Koo, Severino M. Alencar, Pedro L. Rosalen. Submetido à revista Journal of Ethnopharmacology; ISSN: 0378-8741; IF: 1,625.

Estudo 2: **“New bioactive prenylated benzophenone isolated from Brazilian propolis type 6”**. Myrella Lessio Castro, Andréa M. do Nascimento, Vera Lucia Garcia Rehder, Mary Ann Foglio, Severino M. Alencar, Pedro L. Rosalen. Submetido à revista Journal of Natural Products, ISSN: 0163-3864; IF: 2.418.

2.1-Capítulo I

Chemical Composition and antibacterial activity of Brazilian propolis type 6 and its fractions

M. L. Castro^{a*}, W. Ribeiro^b, M. Ikegaki^c, H. Koo^d, S. M. Alencar^b, P. L. Rosalen^a.

^aDepartment of Physiological Sciences, Faculty of Dentistry of Piracicaba, State University of Campinas (UNICAMP), SP, Brazil.

^bDepartment of Agri-Food industry, Food and Nutrition, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, University of São Paulo (USP), 11 Pádua Dias, Avenue, Piracicaba, SP, CEP: 13418900, Brazil.

^cFederal University of Alfenas, Alfenas, MG, Brazil

^dEastman Department of Dentistry and Center for Oral Biology, University of Rochester, 14620 NY, USA.

*Corresponding author:

Phone +55 19 2106-5208; fax +55 19 2106-5250;

rosalen@fop.unicamp.br

Abstract

Brazilian propolis type 6 (Atlantic forest, Bahia), has good antimicrobial activity. Fatty acids found in its propolis were reported to be responsible for its antimicrobial activity; however, this is not confirmed. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of Brazilian propolis type 6 testing its extract, fraction, and fatty acids. Its ethanolic extract (EEP), hexane fraction (H-Fr) and the major fatty acids were analyzed by HPLC, HRCG-FID and GC/MS and were used to test its antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Streptococcus mutans* Ingbritt 1600 for Minimum inhibitory (MIC) and bactericide (MBC) concentrations. The EEP and H-Fr inhibited the microorganisms tested; however, the major fatty acids showed no microbial growth inhibition. Three compounds were isolated from H-Fr by preparative HPLC and tested. Only one compound showed antimicrobial activity (MIC: 1.5 to 6.2 µg/mL; and MBC: 26 to 106 µg/mL). The major fatty acids tested were not responsible for the antimicrobial activity of propolis type 6; nevertheless, one compound isolated from H-Fr showed antibacterial activity in low concentration. Further studies are needed to identify this compound.

Keywords: Propolis; Fatty Acid; Isolated Compound; Antibacterial Activity.

1. Introduction

Propolis, a non-toxic resinous hive product collected by *Apis mellifera* bees from various plant sources, has been reported to have several properties that may confer health benefits to humans since old civilizations (Ghisalberti, 1979; Burdock 1998). The chemical composition and the pharmacological activity of propolis might vary significantly depending on its geographic origin and seasonal effect (Park et al., 2002; Bankova, 2005; Castro et al., 2007; Alencar et al., 2007). The chemical composition of propolis is extremely complex and the flavonoids and (hydroxyl) cinnamic acid derivatives have been widely cited as the main biologically active compounds (Koo e Park, 1999; Bankova et al., 2000; Marcucci et al., 2001). Although these compounds were not detected in propolis classified as type 6 (from Atlantic forest, Northeastern Brazil) (Park et al., 2000; Koo et al., 2000), its ethanolic extract and fractions showed remarkable antimicrobial activities against pathogens, including *Streptococsi mutans* (Koo et al., 2000; Duarte et al., 2003; Duarte et al., 2006).

Duarte *et al.* (2006) proposed that the antimicrobial activity of the type-6 propolis is due to a high proportion of fatty acids (oleic, palmitic, linoleic and stearic) identified in its chemical composition. However, these authors did not test such compounds, which they suggest are responsible for the biological activity of this propolis. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the antibacterial activity of the main pure fatty in the ethanolic extract and fractions, to elucidate the chemical nature of bioactive compounds from Brazilian propolis type 6.

2. Material and methods

2.1. Propolis samples and fractionation

Crude samples of *Apis mellifera* propolis were obtained from the Atlantic forest region, State of Bahia, SL 11° 56'31 and WL 38° 05'04, Northeastern Brazil, classified as propolis type 6 (Park et al.,2000). This propolis was acquired in May 2006 and botanically originated from *Hyptis divaricata* (Park et al., 2002). The ethanolic extract of propolis (EEP) at 20% (w/v) in aqueous ethanol (80% v/v) was prepared as detailed in the literature (Duarte et al., 2006). The EEP was further fractioned using a liquid-liquid extraction technique with hexane to generate a hexane fraction (H-Fr) and a polar fraction (P-Fr). The EEP and fractions obtained were monitored by thin layer chromatography (TLC) using the anisaldehyde reagent (4-methoxy-benzaldehyde, acetic acid, sulphuric acid / 1.0:48.5:0.5), followed by incubation at 100°C for 5 min. Substances were visualized under UV light at the wavelengths of 254 and 366 nm (Tanaka et al., 2005; Alencar et

al., 2007). The EEP, H-fr and P-Fr were concentrated in a rotaevaporator at 70 °C to obtain a yield of 58% (w/w), 14% (w/w) and 11% (w/w), respectively.

2.2. High Resolution Gas Chromatography with Flame Ionization Detector (HRGC-FID)

Fatty acid methyl esters (FAMES) were prepared from EEP, fractions and isolated compounds according to a modified method of Hartman and Lago (1973). FAMES were analyzed by high-resolution gas chromatography with flame ionization detection (FID). Samples (0.3 µL) were injected into the gas chromatography, a Hewlett-Packard (HP) 5890 series II equipped with a 60 m DB-23 (0.25 mm I.D., 0.25 µm film thickness) column. The oven temperature was programmed set as follows: 130°C (1.0 min) to 170°C (6.5°C / min), 170°C to 215°C (2.75°C / min), 215°C (12 min), 215°C to 230°C (40°C / min), and 230°C (3 min). The temperature of the injector and detector were 270° C and 280° C, respectively. FAMES peaks were identified using standard solutions (Sigma, St Louis, MO, USA). Helium was used as a carrier gas (1.0 mL/min.).

2.3. Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)

Fatty acid analyses were performed after methylation of the EEP and fractions as described by Markham *et al.* (1996). Aliquots of 400 µL (10 mg/mL) of extracts were placed into glass vials. The CH₂N₂ (400 µL) was added to each of the sample solutions. Samples were refrigerated for 4 h to allow complete methylation and then analyzed by GC-MS using a CBP5 column (30 m x 0.25 mm i.d.) installed in a GC 17A (Shimadzu Co.) instrument interfaced with a QP 5000 mass selective detector operated in scanning mode (m/z 40-400). For GC-MS analysis, temperature was set from 50°C (0.3 min hold) to 285°C (15 min hold) at a scale of 6 C/min. Samples were injected with an AOC-17 autoinjector using a splitless injection technique (0.6 µL injection volume). Carrier gas (He) flow was set at 1.0 mL/min. The GC-MS peaks were identified by comparing data from the literature and the profiles from Wiley 138 and Nist 98 libraries.

2.4. UV-VIS Spectra

UV-VIS spectra of the EEP and H-fr were recorded from mixture of 5 µL of each extract in 5 mL of 96% ethanol. The samples were scanned at 200-500 nm by UV-spectrophotometer (UVMini 1240, Shimadzu Co.) (Park et al., 2000).

2.5 Analytical and Preparative HPLC Analysis.

A Shimadzu Prep 6AD LC system equipped with a SPD-M10Avp photodiode array detector, auto injector 10AF, and a fraction collector FRC-10A was used for the HPLC analysis. For the analytical test, diluted solutions of EEP, fractions and isolated compounds (1 mg/100mL) were filtered (Millipore - 0.22 μ m), and 10 μ L aliquots were injected in a Shimadzu reverse-phase analytical column of 250 mm x 4.6 mm (i.d.) x 5 μ m (particle size). For the mobile phase, water (solvent A) and methanol (solvent B), with constant flow of 1mL/min, were used. The gradient started with 80–90% for solvent B at 15 minutes returning to 80% at 30 minutes. Compounds were detected according to characteristic UV-vis spectra (spectral range of 200–450 nm) and retention times. Preparative HPLC was carried out using a preparative column Shimadzu PREP - ODS (H) (250 mm x 20 mm - i.d). To isolate the compounds, a gradient using both solvents was used at room temperature with a flow rate of 8 mL/min (Alencar et al., 2007). Three bioactive compounds were isolated from the hexane fraction.

2.6. Microbial Susceptibility Testing

The microorganisms used in this study were *Streptococcus mutans* Ingbritt 1600, and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were evaluate to determine the antimicrobial activity, in accordance with Duarte et al. 2003; 2006. To determine MIC, the starting inoculum was 5×10^5 CFU/mL and the concentrations ranged from 6.25 to 1600 μ g/mL for the EEP, fractions and pure fatty acids and 0.2 to 210 μ g/mL for the isolated compounds. MIC was determined as the lowest concentration of the extracts that could inhibit bacterial growth. To determine MBC, an aliquot (20 μ L) of all incubated tubes with concentrations higher than the MIC was subcultured on BHI agar supplemented with 5% defibrinated sheep blood using a spiral plater (Whitley Automatic Spiral Plater). The MBC was determined as the lowest concentration that allowed no visible growth on the agar. (Duarte et al., 2003). Three replicates were made for each concentration of the EEP, fractions, fatty acids and compounds isolated.

3. Results and discussion

Table 1 shows values of MIC and MBC for EEP, H-Fr and P-Fr. The MIC values indicate that the H-Fr exhibited strong antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans*, with concentrations as low as 25 µg/mL and 50 µg/mL. Similar results were also found by Duarte et al. (2003, 2006) for *Streptococcus mutans* Ingbritt 1600; however, no data were found in the literature concerning antimicrobial activity of EEP and its fractions against *Staphylococcus aureus*.

Analyses of the spectrum of absorption were carried out in the UV-visible based on the antibacterial results of the EEP and H-Fr. EEP and H-Fr showed a similar spectral pattern at wavelengths ranging from 200 to 500 nm (Figure 1).

The EEP and H-Fr analysis using HPLC also demonstrated an identical chemical profile, with 3 chemical substances in common and in similar proportions (Figure 2) and neither flavonoids nor cinnamic acid derivatives were detected.

When the chemical composition of the EEP and H-Fr was analyzed by GC-FID and GC-MS, a high and similar concentration of fatty acids was found (Table 2).

The fatty acids identified were oleic acid (18:1), palmitic acid (16:0), linoleic acid (18:2) and stearic acid (18:0), showing a greater concentration on the ethanolic (EEP) and hexanic (H-Fr) fractions, as already shown in previous studies (Duarte et al., 2003; 2006). These authors suggested that the chemical composition of this propolis might be responsible for its antimicrobial activity, based on previous studies showing similar results (Dilika et al., 2000; Wille and Kydonieus, 2003; Yang et al., 2003).

However, the fatty acids (oleic, palmitic, linoleic and stearic acid) tested in the present study showed no bacterial activity against Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans*) in concentrations lower than 1600 µg/mL. Nevertheless, the MIC for H-fr was lower than 50 and 100 µg/ml for *Staph. aureus* and *Strep. mutans*, respectively (Table 1).

Since no satisfactory results of MIC and MBC for fatty acids were found, the bioactive compounds were isolated from the hexane fraction by preparative HPLC. Three compounds were isolated and tested for the antibacterial activity, and only one compound showed strong activity against *Staph. aureus* and *Strep. mutans*, with MIC ranging from 1.56 to 3.12 and 3.12 to 6.2 µg/mL, respectively (Table 3). Considering the strong antibacterial activity found, we can conclude that the isolated compound one is responsible for this activity. When this compound was analyzed by GC/MS and GC/FID, no fatty acid characteristic were found (figure 3).

5. Conclusion

The main fatty acids identified in the Brazilian propolis type 6 are not responsible for its antimicrobial activity as suggested in the literature. Meanwhile, the bioactive compound isolated, which is responsible for the antimicrobial activity of Brazilian propolis type 6 and should be investigated further.

Acknowledgements

The authors thank FAPESP (Proc. No. 04/10992-1), CNPq (131758/2006-3) and Mr. José Elpídio Cerqueira for providing the propolis samples.

References

- Alencar, S.M., Oldoni, T.L.C., Castro M.L., Cabral I.S.R., Costa-Neto, C.M., Cury, J.A., Rosalen, P.L., Ikegaki, M., 2007. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. *J Ethnopharmacol* 113, 278-83.
- Bankova, V., 2005. Recent trends and important developments in propolis research. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2, 29-32.
- Bankova, V.S., De Castro, S.L., Marcucci, M.C., 2000. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* 31, 3.
- Burdock, G.A., 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food and Chemical Toxicology* 36, 347–363.
- Castro, M. L., Duarte, S., Ikegaki, M., Cury, J. A., Koo, H., Alencar, S. M., Rosalen, P.L., 2007. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. *Quím. Nova* 30, 1512-1516.
- Dilika, F., Bremner, P. D., Meyer, J. J. M., 2000. Antibacterial activity of linoleic and oleic acids isolated from *Helichrysum pedunculatum*: a plant used during circumcision rites. *Fitoterapia* 71, 450-452.

- Duarte, S., Koo, H., Bowen, W.H., Hayacibara, M.F., Cury, J.A., Ikegaki, M., Rosalen, P.L. 2003. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of mutans streptococci. *Biol Pharm Bull* 26, 527-531.
- Duarte, S., Rosalen, P.L., Bowen, W.H., Hayacibara, M.F., Cury, J.A., Ikegaki, M., Koo, H., 2006. The influence of a novel propolis on mutans streptococci biofilmes and caries development in rats. *Arch Oral Biol* 51, 15-22.
- Ghisalberti, E.L., 1979. Propolis: a review. *Bee World* 60, 59-84.
- Hartman, L., Lago, R. C. A., 1973. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Prattice* 494, 475-476.
- Koo, H., Park, Y.K 1999. In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. *Arch Oral Biol* 33, 393-400.
- Koo, H., Hayacibara, M. F., Schobel, B. D., Cury, J. A., Rosalen, P. L., Park, Y. K., Vacca-Smith, A. M., Bowen, W. H., 2000. Effect of a new variety of *Apis mellifera* propolis on mutans streptococci. *Curr Microbiol* 41, 192-196.
- Marcucci, M. C., Ferreres, F., García-Viguera, C., Bankova, V. S., De Castro, S. L., Dantas, A. P., Valente. P. H., Paulino, N., 2001. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *J Ethnopharmacol* 74, 105-12.
- Markham, R. K., Mitchell, K. A., Wilkins, A. L., Daldy, J. A., Lu, Y., 1996. HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zealand propolis. *Phytochemistry* 42, 205-211.
- Park, Y. K., Alencar, S. M., Aguiar, C. L., 2002. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *J Agric Food Chem.* Apr 24; 50(9): 2502-6
- Park, Y. K., Ikegaki, M., Alencar, S. M., Moura, F. F., 2000. Evaluation of brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. *Honeybe Science* 21, 85-90.
- Tanaka, J.C.A., Silva, C.C., Dias Filho, B.P., Nakamura, C.V., Carvalho, J.E., Foglio, M.A. 2005. Chemical constituents of *Luehea divaricata* Mart (Tiliaceae). *Quim. Nova* 28, 834-837.
- Wille J. J., Kydonieus, A., 2003. Palmitoleic acid isomer (C16 : 1 Delta 6) in human skin sebum is effective against gram-positive bacteria. *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology* 16, 176-187.

Yang C, M., Luedecke, L. O., Swanson, B. G., Davidson, P. M., 2003. Inhibition of microorganisms in salad dressing by sucrose and methylglucose fatty acid monoesters. *Journal of Food Processing and Preservation* 27, 285-298.

Table 1: Minimum inhibitory concentration (MIC) and Minimum bacterial concentration (MBC) of different fractions against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans*.

Sample	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Streptococcus mutans</i>	
	ATCC 25923		Ingbritt 1600	
	MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)	MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)
EEP	25-50	400-800	50-100	>1600
H-Fr	25-50	200-400	50-100	800-1600
P-Fr	50-100	400-800	100-200	>1600

Three replicates experiments were conducted for each concentration

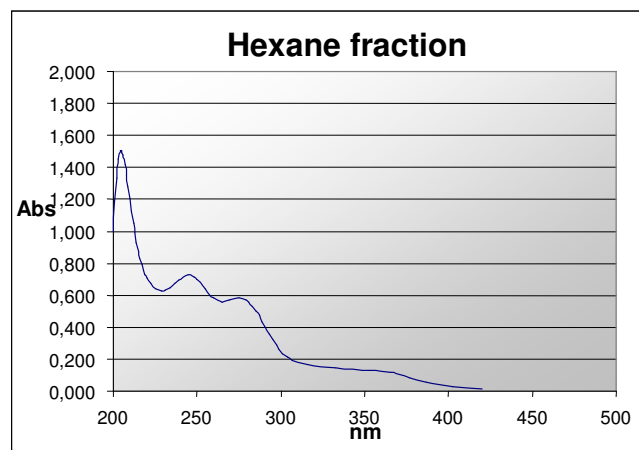
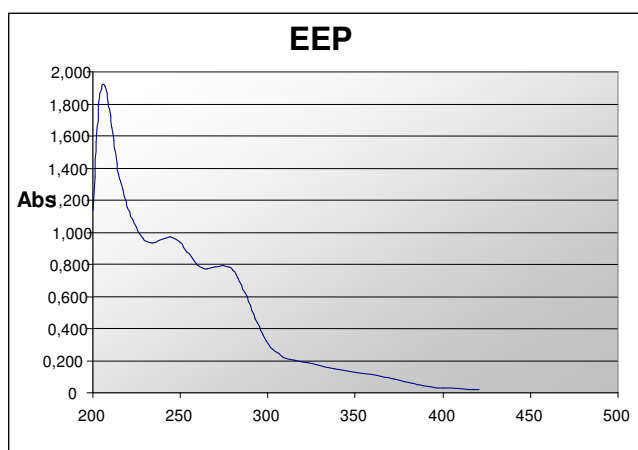


Figure 1: UV-Visible absorption spectra of the Ethanolic extract of propolis type 6 (EEP) and Hexane Fraction (H-Fr).

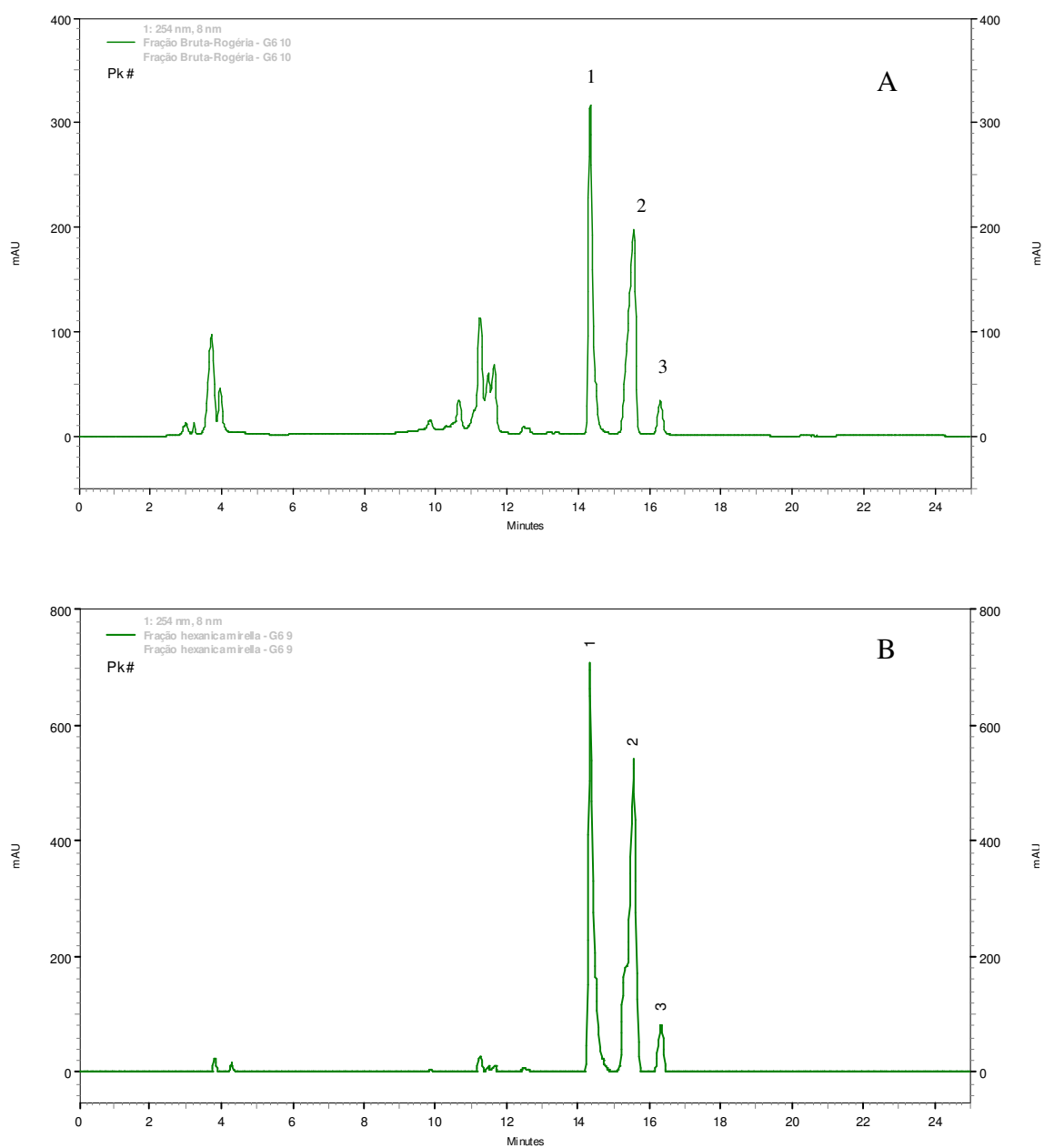


Figure 2: RP-HPLC Chromatograms of propolis type 6. Ethanolic Extract of propolis (A) and Hexane fractions (B). The 1, 2 and 3 picks isoleds have the same retention time in the A and B graphics.

Table 2: Chemical composition of fatty acids of EEP and H-Fr from Brazilian propolis type 6 obtained by CG/FID and GC/MS.

Retention Time	Carbon:Saturation	Fatty Acid	EEP (%)	H-Fr (%)
3.03	10:00	Capric Acid	4.61	traces
13.39	16:00	Palmitic Acid	29.05	35.44
16.97	18:00	Stearic Acid	3.12	4.41
17.59	18:01	Oleic Acid	55.72	50.33
18.54	18:02	Linoleic Acid	3.74	5.51
19.83	18:03	Alpha Linoleic Acid	1.47	1.98
20.88	22:00	Behenic Acid	2.29	2.33

*10:0 = decanoic acid; 16:0 = n-dodecanoic acid; 18:0 = n-octadecanoic acid; 18:1 = *cis*-9-octadecenoic acid; 18:2 = *cis*-9,12-octadecadienoic acid; 18:3 = *cis*-9,12,15-octadecatrienoic acid; 22:0 = docosanoic acid.

Table 4: Minimum inhibitory concentration (MIC) and Minimum bacterial concentration (MBC) of three isolated compounds against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Streptococcus mutans* Ingbritt 1600

Compound	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Streptococcus mutans</i>	
	MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)	MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)
Compound 1	1.5 to 3.1	26 to 53	3.1 to 6.25	53 to 106
Compound 2	> 210	NT	> 210	NT
Compound 3	> 210	NT	> 210	NT

NT: not tested

Three replicate experiments were conducted for each concentration

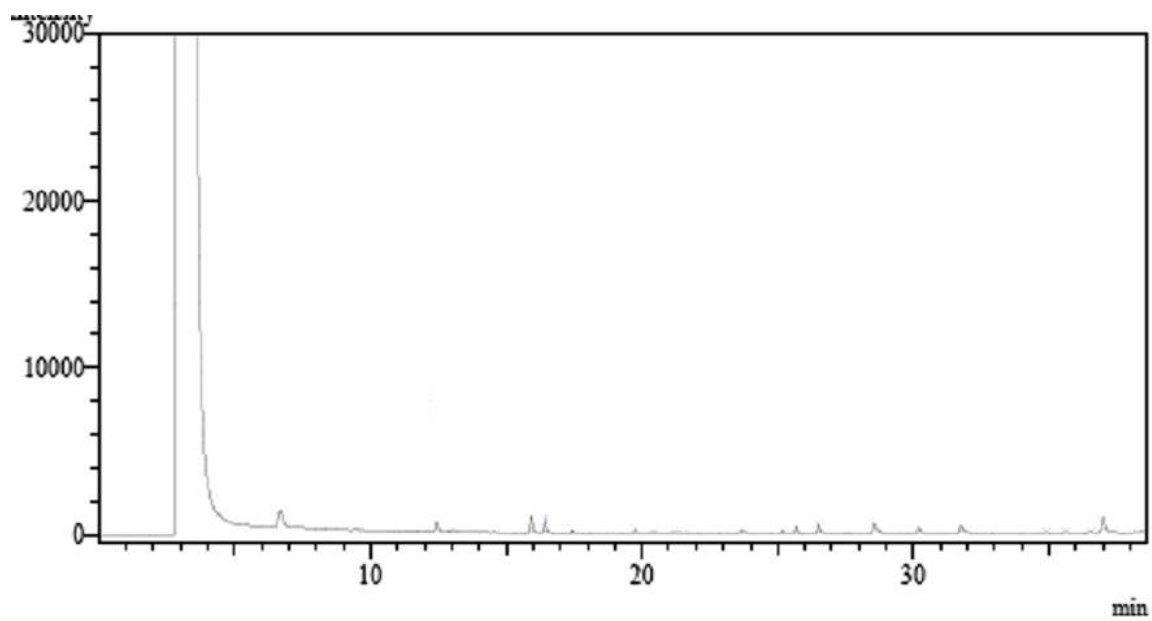


Figure 3. Profile of the isolated compound in HRGC-FID.

2.2. Capítulo II

Identification of bioactive isolated compound of propolis type 6

Myrella Lessio Castro¹, Andréa Nascimento², Vera Redher³, Mary Anny Foglio³, Severino M. Alencar², Pedro L. Rosalen^{1*}.

¹ Dentistry School Piracicaba (FOP - State University of Campinas - UNICAMP), Department of Physiologic Science, C.P. 52; ZIP-CODE: 13414-903 – Piracicaba – SP – Brazil

² College of Agriculture “Luiz de Queiroz” (ESALQ- University of São Paulo - USP), C.P. 9; ZIP-CODE: 13418-900 – Piracicaba – SP – Brazil

³ Chemical, Biological and Agricultural Pluridisciplinary Research Center (CPQBA) at Campinas State University (UNICAMP) C.P.6171 - ZIP-CODE 13081-970 - Campinas – SP – Brazil

*Corresponding author

Phone +55 19 2106-5313; fax +55 19 2106-5250;

rosalen@fop.unicamp.br)

ABSTRACT

A prenylated benzophenone was isolated and identified from the hexane fraction of Brazilian propolis type 6. This compound was elucidated by NMR as plukenetione H and showed strong antimicrobial activity (MIC: 0.73 to 6.6 $\mu\text{g/mL}$; and MBC: 2.92 to 106 $\mu\text{g/mL}$) against *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus oralis*, *Staphylococcus aureus* and *Actinomyces naeslundii*. Further studies are needed to investigate biological properties of this compound, a promising natural antimicrobial agent.

KEY WORDS: Prenylated benzophenone, antimicrobial activity, Brazilian propolis.

INTRODUCTION

Propolis is a non-toxic resin produced by honey bees and used for hundreds of years due to its biological properties, such as antimicrobial, anti-inflammatory, anesthetic, cytostatic, and cariostatic (Ghisalberti, 1979; Park *et al.*, 1998a; 1998b; Koo *et al.*, 2000a; 2000b; Marcucci *et al.*, 2001; Rosalen *et al.*, 2002; Montpied *et al.*, 2003, Duarte *et al.*, 2003; 2006; Castro *et al.*, 2007;). It is commonly used in food, pharmaceutical and cosmetic industries (Alencar *et al.*, 2007).

The chemical composition of propolis varies qualitatively and quantitatively depending on such factors as: geographic origin, temperature and seasonal effect (Bankova *et al.*, 1999, Kujumugiev *et al.*, 1999; Koo *et al.*, 2000; Castro *et al.*, 2007). The main compounds are distributed in the following chemical classes: phenolic acids and their esters, flavonoids (flavones, flavonones, flavonols, dihydroflavonois, chalcones), terpene, β -steroids, aromatic aldehydes, alcohols, sesquiterpenes, naphthalene, derivatives of stilbene benzopyran, benzophenone, caffeic acid, derivatives of cinnamic acid and benzoic acid (Greenaway *et al.*, 1990; Aga *et al.*, 1994; Bankova *et al.*, 1995; Marcucci *et al.*, 1996; Rubio *et al.*, 1999; Baskota, *et al.*, 2000; Chen, *et al.*, 2003; Albuquerque *et al.*, 2007).

The type 6 propolis, from northeastern Brazil, Atlantic forest, Bahia state (Park *et al.*, 2000), showed a distinct chemical composition in which flavonoids and cinnamic acid derivatives were not detected (Koo *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2002). Nevertheless, this propolis showed remarkable antimicrobial activity and cariostatic property *in vitro* and *in vivo* models (Koo, *et al.*, 2000b; Duarte *et al.*, 2003; 2006).

This information served as additional incentive to tackle the challenge of the investigative isolation and identification of the bioactive compounds of the propolis type 6.

Material and Methods

Propolis Samples and fractionation

Crude sample of *Apis mellifera* bee propolis was obtained in May 2006, from the Atlantic forest, Bahia state, Northeastern Brazil (SL 11°56'31" and WL38°05'04") and

classified as type 6 according to Park *et al.*, 2000. The propolis sample (100 g) was extracted with ethanol 80% (v/v) (450 mL) in water bath, at 70°C, for 30 min and then filtered to obtain its ethanolic extract of propolis (EEP). The EEP was further fractionated using a liquid–liquid extraction technique with hexane solvent (Hexane 450mL x 3) (Duarte *et al.*, 2006). The hexane (H-fr) was concentrated at 45°C and yielded 14% (w/w). This fraction (300 mg) was dissolved in methanol and sub-fractionated on a Sephadex LH-20 column (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) using methanol as eluent. The sub-fractions obtained were monitored by thin layer chromatography (TLC) using the anisaldehyde reagent (4-methoxy-benzaldehyde, acetic acid, sulphuric acid / 1.0:48.5:0.5), followed by incubation at 100°C for 5 min. Substances were visualized under UV light at the wavelengths of 254 and 366 nm (Tanaka *et al.*, 2005; Alencar *et al.*, 2007). In addition, each fraction also was monitored by antimicrobial activity using microdiffusion agar method. The sub-fractions with better antimicrobial results were concentrated and analyzed by HPLC.

Isolation of bioactive constituent

A Shimadzu Prep 6AD LC system equipped with a SPD-M10Avp photodiode array detector, auto injector 10AF, and a fraction collector FRC-10A was used for HPLC analysis. Isolation was carried out using a preparative column Shimadzu PREP - ODS (H), of 250 mm x 20 mm (i.d). A gradient profile, using two solvents was applied at room temperature with solvent A= water, solvent B= methanol, and flow rate of 8 mL/min. The gradient started with 80% of solvent B to 90% of B in 15 minutes and 80% of B in 30 minutes. One bioactive compound contained in hexane fraction was isolated (Alencar *et al.*, 2007).

Identification of compound

Infrared (IR) spectra were recorded on a Nicolet Protégé 460 spectrophotometer. The ¹H (500 MHz) and ¹³C Nuclear magnetic resonance (NMR) (125 MHz) spectra were recorded on a Bruker DPX 500 spectrometer in CDCl₃ using TMS as internal standard; chemical shift are in δ (ppm) and coupling constants (J values) in Hz. 2D NMR

experiments (^{13}C - ^1H HMQC and ^{13}C - ^1H HMBC) were performed using a Bruker DPX spectrometer.

Microorganisms

The microorganisms used in this study were *Streptococcus mutans* UA159, *Streptococcus sobrinus* 6715, *Streptococcus gordonii* ATCC10558, *Streptococcus oralis* PB182 and *Actinomyces naeslundii* ATCC 12104, which are proven oral pathogens (Bowen et al., 2002) and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. The cultures were stored at -80°C in brain heart infusion (BHI) broth containing 20% glycerol.

Agar diffusion

The inoculum with *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 were appropriate to provide a hemiconfluent growth of the microorganisms tested ($1\text{--}2 \times 10^5$ colony-forming units CFUs/ml) onto a brain heart infusion agar plate. Six sterilized steel cylinders of 8.0 mm-10.0 mm (inside diameter 6.0 mm) were placed on the inoculated agar plates. The test fractions (800 mg/ml) or control (80% ethanol, v/v) (40 μL) were applied inside the cylinders. The plates were incubated at 37°C for 24 h in a 10% CO_2 incubator. The zones of inhibition of microbial growth around the cylinder containing the extracts were measured. The inhibitory zone was considered the shortest distance (mm) from the outside margin of the initial point of microbial growth. Six replicates were made for each microorganism (Koo et al., 2000).

Determination of MIC and MBC of isolated compound

The Minimal Inhibitory (MIC) or bactericide (MBC) concentrations was modified by microtechnique based on Koo et al. (2000) and Duarte et al. (2003) using a microplaque (96-wells) with 195 μL of BHI broth with inoculum (1×10^5 CFU/mL) added 5 μL of isolated compound or control. For the determination of MIC, the test concentrations ranged from 0.42 to 425 $\mu\text{g/mL}$. The microplaque was incubated in 10% CO_2 , 37°C , for 24 h. After incubation, bacterial growth was assayed by measurement of absorbance at 660 nm. MIC was defined as the lowest concentration of compound that restricted growth to a level

lower than 0.05 at 660 nm (Multiskan MS, Labsystems - Versa Max Program). For the determination of MBC, an aliquot (10 μ L) of all incubated test wells was subcultured on BHI agar supplemented with 5% of defibrinated sheep blood. MBC was defined the lowest concentration that allows no growth on the agar (99.9% kill).

Inhibition of adherence of growing cells into biofilm

The inhibition of adherence of growing cells into biofilm was modified by microtechnique based on Koo et al., 2000b using microplaque non-treated background concave of 96 wells. To assess the adherence of growing bacteria cells to in biofilm, organisms were grown at 37°C for 18 h in test wells. The microorganisms *Streptococcus mutans* UA159 and *Streptococcus sobrinus* 6715 were grown in BHI broth plus 1% sucrose (w/v) containing sub-MIC concentrations of the test isolated compound or control (4% ethanol, v/v). After incubation, the adhering cells were washed with colorant crystal violet and re-suspended in an ultrasonic bath (Vibracell, Sonics & Material Inc.). The amount of adherent cells was measured spectrophotometer at 550 nm. The concentration for total bacterial adherence inhibition (TBAI) was defined as the lowest concentration that allowed no visible cell adherence on the biofilm. Six replicates were made for each concentration of the compound.

RESULTS AND DISCUSSION

The ethanolic extract of propolis (EEP) and hexane fraction (H-Fr) were concentrated and yielded were 58% and 14%, respectively. After the concentration 300 mg were placed in the LH-20 column with 9 sub-fractions, they were tested in the method of agar diffusion selection of the most active fraction. The sub-fraction 8 showed biological activity e yield of 17 mg.

Analysis of spectral data suggested that compound is a prenylated benzophenone because the ^{13}C NMR spectrum indicated three carbonyl groups at δ 204.9, 193.3 and 193.6. Prenylated benzophenones with a bicyclo 3.3.1-nonane-2,4,9-trione system have

been isolated from plants belonging to the Guttiferae family, specifically from the genera *Garcinia*, *Clusia*, and *Rheedia* (Rubio *et al* 1999; Cuesta Rubio *et al*, 2001).

Plukenetione E acetate (benzophenone type A), clusianone (benzophenone type B) and methyl-nemorosone (benzophenone type C) show this bicyclic structure, but the relative position of the benzoyl group is different for these compounds (Figure 1).

In this study discussed the type of prenylated benzophenone was isolated. The IR spectrum showed three bands for carbonyl groups ($\nu_{\max}$ 1724, 1619 and 1696 cm^{-1}). The ^1H NMR spectrum (Table 1) revealed five aromatic proton signals in the region δ 7.22-7.45 attributable to an unsubstituted phenyl group. Two olefinic hydrogens (δ 5.05, H-23 and 4.98, H-28), indicated the presence of two isopentenyl groups. A bicyclo 3.3.1 nonane-2,4,9-trione system could be recognized by the ^{13}C NMR chemical shifts of C-1 (δ 78.7), C-5 (δ 60.2), C-8 (δ 48.1), an unconjugated (δ 204.9, C-9) and two conjugated carbonyls (δ 193.3, C-2 and 193.6, C-10). The bicyclo and isopentenyl groups were also identified by the HMBC experiments. The ^{13}C NMR spectrum showed also a phenyl ketone (from C-10 to C-16), the *gem*-dimethyl group (δ 23.1, C-32 and 16.4, C-33) correlating by to the C-8, C-1 and C-7 (C $\rightarrow$ H-32, 33). The isopentenyl group (C-27-C-31) linked to the methyne at C-7 as evidenced also by a HMBC experiment. The quaternary carbon signal C-1 which, from its deshielded position, had to be inserted between three carbonyl groups (C-2, C-9, and C-10). The carbon signal at δ 115.9 was assigned to C-3 on the basis of biogenetic considerations and by analogy with known compounds such as clusianone and nemorosone (Rubio *et al* 1999; Cuesta Rubio *et al*, 2001).

Based upon all of the above evidence, the structure was elucidated as plukenetione H (Figure 2). The structure was deduced from detailed analysis of the ^1H and ^{13}C NMR data aided by 2D NMR experiments (HMQC and HMBC).

The results lead us to postulate that an isolated prenylated benzophenone plukenetione H is a derivative of type A.

From a biogenetic point of view, the structure suggested a cyclization mechanism of the putative precursors that is different from that which results in the previously reported prenylated benzophenone such as the clusianone (Rubio *et al.*, 1999). Various chemical

compounds identified and isolated from propolis, there is special attention to the class of benzophenone, present in propolis found in tropical regions (Rubio *et al.*, 1999; Cuesta Rubio *et al.*, 2001; Albuquerque, *et al.*, 2007). These isolated compounds were related with various biological activities, such as anti-cancer actions (Ito *et al.*, 2003), anti-HIV (Gustafson *et al.*, 1992) and anti-ulcerative (Yamaguchi *et al.*, 2000). In addition, the antimicrobial potential of these substances is confirmed by their action on gram-positive cocci, gram-negative and fungi (Bakana *et al.*, 1987; Rubio *et al.*, 1999); *Actinomyces sp.* (Rubio *et al.*, 1999), *Staphylococcus aureus* (Hussain *et al.*, 1982; Inuma *et al.*, 1996; Santos *et al.*, 1996); *Trypanosoma cruzi* (Alves *et al.*, 1999), and *Helicobacter pylori* (Chatterjee *et al.*, 2003).

Compound plukenetione H, was tested for its antimicrobial activities against several bacteria. The results are reported on the Table 2. The isolated compound showed strong antimicrobial activities, especially for *Staphylococcus aureus* with low MIC values 1.46 – 0.73 µg/mL and MBC values of 11.7 – 5.85 µg/mL. Also, the compound proved to have antimicrobial activity against oral pathogens exhibiting effect at lower concentration on *Streptococcus oralis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* with MIC values of 6.6 – 3.3 µg/mL and MBC values of 106 – 26 µg/mL. In addition, the compound was totally able to inhibit *in vitro* the adherence of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* at concentrations sub-MIC values (3.3 – 1.6 µg/mL). These results demonstrated that this a possible compound is a new natural antimicrobial agent and, never been reported in propolis.

Conclusion

Results of this study demonstrated that the antimicrobial compound of Brazilian propolis type 6 is a prenylated benzophenone denominated plukenetione H. Further studies are needed to investigate this compound, a promising antimicrobial and anticariogenic agent.

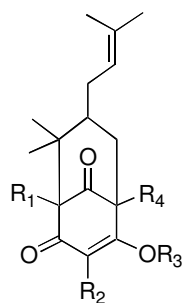
REFERENCE

1. Aga H, Shibuya T, Sugimoto, K, Nakajima S. Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 1994; 58(5): 945-946.
2. Albuquerque IL, Alves AL, Lemos TLG, Monte FJQM, Braz-filho R. Ácido canárico (3,4 seco derivado do lupano) em própolis do Ceará. *Quím. Nova*. 2007; 4(30): 828-831.
3. Alencar SM, Park YK, Aguiar CL, Mariuzzo DM. Evidências fitoquímicas da própolis da região da mata atlântica do Estado da Bahia. *TecBahia: Revista baiana de tecnologia*. 2001; 16 (1): 120-123.
4. Alencar SM, Oldoni TLC, Castro ML, Cabral ISR, Costa-Neto CM, Cury JA, Rosalen PL, Ikegaki M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. *J Ethnopharmacol*. 2007 Sep; 113(2): 278-83.
5. Alves, TM, Alves, R, Romanha, AJ, Zani, CL, dos Santos, MH, Nagem, TJ, Biological activities of 7-epiclusianone. *J. Nat. Prod*. 1999; 62, 369-371.
6. Bakana P, Claeys M, Totte J, Pieters LA, Van Hoof L, Tamba-Vemba, Van den Berghe DA, Vlietinck AJ. Structure and chemotherapeutical activity of a polyisoprenylated benzophenone from the stem bark of *Garcinia huillensis*. *J. Ethnopharmacol*. 1987; 21: 75-84.
7. Bankova V, Boudourova-Krasteva G, Sforcin JM, Frete X, Kujumgiev A, Maimoni-Rodella R, Popov S. Antibacterial activity of essential oils from Brazilian propolis. *Fitoterapia*. 1999; 70(2): 190-193.
8. Bankova V, Christov R, Kujumgiev A, Marcucci MC, Popov S. Chemical composition and antibacterial activity of brazilian propolis. *Zeitschrift fur Naturforschung C*. 1995; 50: 167:172.
9. Banskota AH, Tezuka Y, Adnyana IK, Midorikawa K, Matsushige K, Message D *et al*. Cytotoxic hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. *J Ethnopharmacol*. 2000; 72 (1-2): 239-246.
10. Bowen, WH. Do we need to be concerned about dental caries in the coming millennium? *Crit Rev Oral Biol Med* .2002; 13(2):126-31.

11. Castro ML, Duarte S, Ikegaki M, Cury JA, Koo M, Alencar SM et al. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. *Quím. Nova*. 2007; 30(7): 1512-1516.
12. Chatterjee, A, Yasmin, T, Bagchi, D, Stohs, SJ. The bactericidal effects of *Lactobacillus acidophilus*, garcinol and Protargin compared to clarithromycin, on *Helicobacter pylori*. *Mol. Cell. Biochem*. 2003. 243, 29-35.
13. Chen CN, Wu CL, Shy HS, Lin JK. Cytotoxic Prenylflavanones from Taiwanese Propolis. *Journal of Natural Products*. 2003; 66: 503-506.
14. Cuesta Rubio O, Velez-Castro H, Frontana-Urbe B, Cárdenas Nemorosone, the major constituent of floral resins of *Clusia rosea*. *J. Phytochemistry*. 2001; 57: 279.
15. Duarte S, Koo H, Bowen WH, Hayacibara MF, Cury JA, Ikegaki M, Rosalen PL. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of mutans streptococci. *Biol Pharm Bull*. 2003; 26(4): 527-531.
16. Duarte S, Rosalen PL, Bowen WH, Cury JA, Koo H *et al*. The influence of a novel propolis on mutans streptococci biofilmes and caries development in rats. *Arch Oral Biol*. 2006; 51: 15-22.
17. Ghisalberti E.L. Propolis: a review. *Bee World*. 1979; 60: 59-84.
18. Greenaway W, Scaysbrook T, Whatley F.R. The composition and plant origins of propolis. *Bee World*. 1990. 71(3): 107-118.
19. Gustafson KR, Blunt JW, Munro MHG, Fuller RW, Mckee TC, Cardellina II JH *et al*. The guttiferones, HIV-inhibitory benzophenones from *Symphonia globulifera*, *Garcinia livingstonei*, *Garcinia ovalifolia* and *Clusia rosea*. *Tetrahedron*. 1992; 48: 10093-102.
20. Hussain RA, Owegby AG, Parimoo P, Waterman PG. Kolanone, a novel polyisoprenylated benzophenone with antimicrobial properties from the fruit of *Garcinia kola*. *Planta Med*. 1982 Feb; 44(2): 78-81.
21. Ii-numa M Tosa H, Tanaka T, Kanamaru S, Asai F, Kobayashi Y *et al*. Antibacterial activity of some *Garcinia* benzophenone derivatives against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biol Pharm Bull*. 1996; 19(2): 311-314.

22. Ito C, Itoigawa M, Miyamoto Y, Onoda S, Rao KS, Mukainaka T *et al.* Polyprenylated benzophenones from *Garcinia assigu* and their potential cancer chemopreventive activities. *J Nat Prod.* 2003; 66(2): 206-209.
23. Koo H, Gomes BPFA, Rosalen PL, Ambrosano GMB, Park YK, Cury JA. *In vitro* antimicrobial activity of propolis and *Arnica Montana* against oral pathogens. *Archives of Oral Biology.* 2000a; 45(2): 141-148.
24. Koo H, Rosalen PL, Cury JA, Ambrosano GMB, Murata RM, Yatsuda R, Ikegaki M, Alencar SM, Park YK. Effect of a new variety of *Apis mellifera* propolis on mutants *Streptococci*. *Current Microbiology.* 2000b; 41: (3) 192-196.
25. Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Y, Bankova V, Christov R, Popov S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology.* 1999; 64(3): 235-240.
26. Marcucci MC. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. *Química Nova.* 1996; 19(5): 529-536.
27. Marcucci MC, Ferreres F, Garcia-Viguera C, Bankova VS, De Castro SL, Dantas AP, Valente PHM, Paulino N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacolog.* 2001; 74 (2): 105-112.
28. Montpied P, De Bock F, Rondouin G, Niel G, Briant L, Courseau AS, Lerner-Natoli M, Bockaert J. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) prevents inflammatory stress in organotypic hippocampal slice cultures. *Molecular Brain Research.* 2003; 115(2): 111-120.
29. Moura FF. Determinação das propriedades físico-químicas e biológicas da própolis produzida por *Apis mellifera* na região nordeste do Brasil [Dissertação]. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP; 2000.
30. Park YK, Koo H, Abreu JA, Ikegaki M, Alencar SM, Moura FF Antimicrobial activity of propolis on oral microorganism. *Current Microbiol.* 1998a; 36: 24-28.
31. Park YK, Ikegaki M, Alencar SM, Moura FF Effects of propolis on *Streptococcus mutans*, *Actinomyces naeslundii* and *Staphylococcus aureus*. *Rev Microbiol.* 1998b; 29: 143-148.
32. Park YK, Ikegaki M, Alencar SM, Moura FF. Evaluation of Brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. *Honeybe Science.* 2000; 21(2): 85-90.

33. Rosalen PL, Murata RM, Yatsuda R, Duarte S, Goncalves RB, Koo H *et al.* Effect of propolis from eight Brazilian regions on oral microorganisms. J Dent Res. 2002; 81: 349.
34. Rubio OC, Cuellar AC, Rojas N, Castro HV, Rastrelli L, Aquino R. A polyisoprenylated benzophenone from cuban propolis. J Nat Prod. 1999; 62: 1013-1015.
35. Santos MH. Estudo químico dos frutos de *Rheedia gardneriana* e efeito biológico de seus constituintes [dissertação]. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 1996.
36. Tanaka, J.C.A., Silva, C.C., Dias Filho, B.P., Nakamura, C.V., Carvalho, J.E., Foglio, M.A. Chemical constituents of *Luehea divaricata* Mart (Tiliaceae).Quim. Nova 2005. 28, 834-837.
37. Yamaguchi F, Saito M, Ariga T, Yoshimura Y, Nakazawa. Free radical scavenging activity and antiulcer activity of garcinol from *Garcinia indica* fruit rind. J Agric Food Chem. 2000; 48: 2320-2325.



Plukenetione E acetate: $R_1 = C_6H_5CO$, $R_2 = R_4 = C_5H_9$, $R_3 = COCH_3$ (Type A)

Clusianone: $R_1 = R_4 = C_5H_9$, $R_2 = C_6H_5CO$, $R_3 = H$ (Type B)

Methyl-nemorosone: $R_1 = R_2 = C_5H_9$, $R_3 = CH_3$, $R_4 = C_6H_5CO$ (Type C)

Figure 1: Related prenylated benzophenones with a [3.3.1]nonane-2,4,9-trione system.

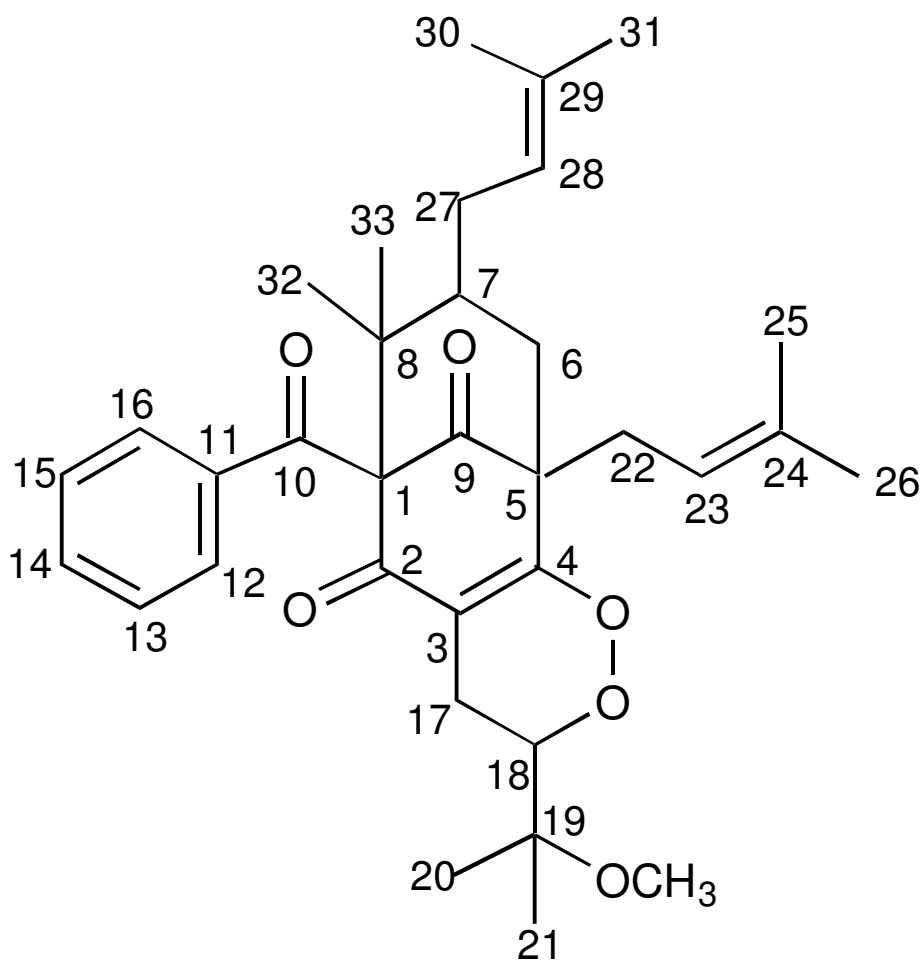


Figure 2. Structure of isolated compound Brazilian propolis type 6.

Table 1. NMR spectral data for isolated compound (500 MHz for ^1H NMR and 125 MHz for ^{13}C NMR, CDCl_3 , TMS).

<i>Position</i>	δ_{H} ($J = \text{Hz}$)	δ_{C}	HMBC (C $\rightarrow$ H)
1	-----	78.7 s	H-32, 33
2	-----	193.3 s	H-17
3	-----	115.9 s	H-17
4	-----	172.3 s	H-17
5	-----	60.2 s	H-22
6	2.17 s	39.3 t	H-22, 27
7	1.71 m	42.7 d	H-32, 33
8	-----	48.1 s	H-32, 33
9	-----	204.9 s	H-22
10	-----	193.6 s	H-12,16
11	-----	137.0 s	H-14
12 and 16	7.45 d (7,7)	128.1 d	H-13, 15
13 and 15	7.39 d (7,7)	127.9 d	H-12, 16
14	7.22 t (7,7)	131.9 d	H-12, 13, 15, 16
17	3.13 m; 3.07 m	22.1 t	
18	4.63 m	90.2 d	H-21
19	-----	71.1 s	H-21
20	1.66 s	25.7 q	
21	1.24 s	24.0 q	
22	2.71 m	30.4 t	
23	5.05 s	120.7 d	
24	1.39 s	133.6 s	
25	1.66 s	26.5 q	
26	1.60 m; 2.21 m	17.9 q	
27	4.98 s	26,8 t	
28	-----	122.3 d	H-7
29	-----	132.5 s	
30	1.58 s	17.8 q	H-28
31	1.66 s	25.9 q	
32	1.39 s	23.1 q	
33	1.21 s	16.4 q	
OCH ₃	3.29 s	56.5 q	

Table 2. Minimum inhibitory concentration (MIC), Minimum Bactericidal concentration (MBC) and total bacterial adherence inhibition (TBAI) of benzophenone plukenetione H, isolated from Brazilian propolis type 6.

Microorganisms	MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)	TBAI (µg/mL)
Streptococcus mutans UA 159	3.3 to 6.6	53 to 106	1.65 – 3.3
Streptococcus sobrinus 6715	3.3 to 6.6	53 to 106	1.65 – 3.3
Streptococcus oralis PB182	1.65 to 3.3	26 to 53	NT
Streptococcus gordonii 10558	1.65 to 3.3	26 to 53	NT
Staphylococcus aureus 25923	0.73 to 1.43	5.85 to 11.7	NT
Actinomyces naeslundii 12104	1.6 to 3.3	6.6 to 13	NT

*The concentration of compound isolated were 210-0.2 µg/mL

*Three replicate experiments were conducted for each concentration

*NT = Not Tested.

3. CONCLUSÕES

No presente estudo, podemos concluir que o composto com atividade antimicrobiana da própolis tipo 6 não está relacionado à presença de ácidos graxos. Sendo o composto que apresentou tal atividade uma benzofenona prenilada denominada de plukenetiona H, inédito na literatura. Esse composto poderá ser considerado um novo agente antimicrobiano, porém necessita de futuros estudos. A plukenetiona H merece uma atenção especial para a obtenção de uma patente de uso como um novo agente terapêutico.

4. REFERÊNCIAS¹.

1. Ackermann T. Fast chromatography study of propolis crudes. Food Chem. 1991; 42(2): 135-8.
2. Aga H, Shibuya T, Sugimoto K, Nakajima S. Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. Biosci Biotechnol Biochem. 1994; 58(5): 945-6.
3. Albuquerque IL, Alves AL, Lemos TLG, Monte FJQM, Braz-Filho R. Acido canário (3,4 seco derivado do lupano) em propolis do Ceará. Quim Nova. 2007; 4(30): 828-31.
4. Alencar SM. Estudo fitoquímico da origem botânica da própolis e avaliação da composição química de mel de *Apis mellifera* africanizada de diferentes regiões do Brasil [tese]. Campinas: UNICAMP/FEA; 2002. 120p.
5. Alencar SM, Oldoni TLC, Castro ML, Cabral ISR, Costa-Neto CM, Cury JA *et al.* Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. J Ethnopharmacol. 2007; 113(2): 278-83.
6. Alencar SM, Park YK, Aguiar CL, Mariuzzo DM. Evidências fitoquímicas da própolis da região da mata atlântica do Estado da Bahia. TecBahia: Rev Baiana Tecnol. 2001; 16(1): 120-3.
7. Alves, TM, Alves, R, Romanha, AJ, Zani, CL, dos Santos, MH, Nagem, TJ. Biological activities of 7-epiclusianone. J. Nat. Prod. 1999. 62, 369-371.
8. Bakana P, Claeys M, Totte J, Pieters LA, Van Hoof L, Tamba-Vemba *et al.* Structure and chemotherapeutical activity of a polyisoprenylated benzophenone from the stem bark of *Garcinia huillensis*. J Ethnopharmacol. 1987; 21(1): 75-84.
9. Bankova V, Christov R, Stoev G, Popov S. Determination of phenolics from propolis by capillary gas chromatography. J Chromatogr. 1992; 607: 150-3.
10. Bankova V, Christov R, Kujumgiev A, Marcucci MC, Popov S. Chemical composition and antibacterial activity of brazilian propolis. Z Naturforschung [C]. 1995. 50(3/4): 167-72.

¹ De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline

11. Bankova V, Boudourova-Krasteva G, Sforcin JM, Frete X, Kujumgiev A, Maimoni-Rodella R *et al.* Phytochemical evidence for the origin of Brazilian propolis from São Paulo state. *Z Naturforsch [C]*. 1999a; 54(5/6): 401-5.
12. Bankova V, Boudourova-Krasteva G, Sforcin JM, Frete X, Kujumgiev A, Maimoni-Rodella R *et al.* Antibacterial activity of essential oils from Brazilian propolis. *Fitoterapia*. 1999b; 70(2): 190-3.
13. Bankova, V., Recent trends and important developments in propolis research. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2005. 2, 29-32.
14. Banskota AH, Tezuka Y, Adnyana IK, Midorikawa K, Matsushige K, Message D *et al.* Cytotoxic hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. *J Ethnopharmacol*. 2000; 72(1/2): 239-46.
15. Bonhevi JS, Coll FV. Phenolic composition of propolis from China and from South-America. *Z Naturforsch [C]*. 1994; 49(11/12): 712-8.
16. Burdock, G.A., Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food and Chemical Toxicology* 1998. 36, 347–363.
17. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Lei n. 1283, de 18 de dezembro de 1950. Dispõe sobre a inspeção industrial e sanitária dos produtos de origem animal. *Diário Oficial da União* 1950; 1950 dez 19. Seção 1, p.18161 [acesso 2008 Jan 11]. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta>.
18. Castro ML, Duarte S, Ikegaki M, Cury JA, Koo M, Alencar SM *et al.* Propolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. *Quim Nova*. 2007; 30(7): 1512-16.
19. Chatterjee, A., Yasmin, T., Bagchi, D., Stohs, S.J., The bactericidal effects of *Lactobacillus acidophilus*, garcinol and Protargin compared to clarithromycin, on *Helicobacter pylori*. *Mol. Cell. Biochem*. 2003. 243, 29-35.
20. Chen CN, Wu CL, Shy HS, Lin JK. Cytotoxic Prenylflavanones from Taiwanese Propolis. *J Nat Prod*. 2003; 66(4): 503-6.
21. Clardy J, Walsh C. Lessons from natural molecules. *Nature*. 2004; 432(7019): 829-37.

22. Cunha IBDS, Salomao K, Shimizu M, Bankova VS, Custodio AR, De Castro SL et al. Antitrypanosomal activity of Brazilian Propolis from *Apis mellifera*. *Chem Pharm Bull* (Tokyo). 2004; 52(5): 602-4.
23. Cuesta Rubio O, Velez-Castro H, Frontana-Uribe B, Cárdenas Nemorosone, the major constituent of floral resins of *Clusia rósea*. *J. Phytochemistry*. 2001; 57: 279.
24. Dilika, F., Bremner, P. D., Meyer, J. J. M., Antibacterial activity of linoleic and oleic acids isolated from *Helichrysum pedunculatum*: a plant used during circumcision rites. *Fitoterapia* 2000. 71, 450-452.
25. Duarte S, Koo H, Bowen WH, Hayacibara MF, Cury JA, Ikegaki M *et al.* Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of mutans streptococci. *Biol Pharm Bull*. 2003;.26(4): 527-31.
26. Duarte S, Rosalen PL, Hayacibara MF, Cury JA, Bowen WH, Marquis RE *et al.* The influence of a novel propolis on mutans streptococci biofilmes and caries development in rats. *Arch Oral Biol*. 2006; 51(1): 15-22.
27. Food and Drug Administration (FDA). Center for Food Safety and Applied Nutrition. Economic Characterization of the Dietary Supplement Industry Final Report. March 1999. [acesso 2008 Jan 11]. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~comm/ds-econ2.html>.
28. Ghisalberti EL. Própolis: a review. *Bee World*. 1979; 60(2): 59-84.
29. Greenaway W, Scaysbrook T, Whatley FR. The composition and plant origins of propolis. *Bee World*. 1990; 71(3): 107-18.
30. Gustafson KR, Blunt JW, Munro MHG, Fuller RW, Mckee TC, Cardellina II JH *et al.* The guttiferones, HIV-inhibitory benzophenones from *Symphonia globulifera*, *Garcinia livingstonei*, *Garcinia ovalifolia* and *Clusia rosea*. *Tetrahedron*. 1992; 48: 10093-102.
31. Hartman, L., Lago, R. C. A., 1973. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Prattice* 494, 475-476.
32. Hussain RA, Owegby AG, Parimoo P, Waterman PG. Kolanone, a novel polyisoprenylated benzophenone with antimicrobial properties from the fruit of *Garcinia kola*. *Planta Med*. 1982; 44(2): 78-81.

33. Iinuma M, Tosa H, Tanaka T, Kanamaru S, Asai F, Kobayashi Y *et al.* Antibacterial activity of some Garcinia benzophenone derivatives against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biol Pharm Bull.* 1996; 19(2): 311-314.
34. Ikeno K, Ikeno T, Miyazawa C. Effects of propolis on dental caries in rats. *Caries Res.* 1991; 25(5): 347-51.
35. Ishikawa M, Kanno S, Asou K, Ogino M, Tadano T, Satou S. Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by Propolis. *J Pharmacol Sci.* 2004; 94: 129.
36. Itice NT. Dental gel. Brasil Patente BR 9503177, 1995.
37. Ito C, Itoigawa M, Miyamoto Y, Onoda S, Rao KS, Mukainaka T *et al.* Polypropenylated benzophenones from *Garcinia assigu* and their potential cancer chemopreventive activities. *J Nat Prod.* 2003; 66(2): 206-9.
38. Johnson KS, Eischen FA, Giannasi DE. Chemical-compositing of North-American bee propolis and biological-activity towards larvae of greater wax moth (Lepidoptera, Pyralidae). *J Chem Ecol.* 1994; 20(7): 1783-91.
39. Koo H, Park YK. In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. *Arch Oral Biol.* 1999; 33(5): 393-400.
40. Koo H, Gomes BPFA, Rosalen PL, Ambrosano GMB, Park YK, Cury JA. In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica Montana* against oral pathogens. *Arch Oral Biol.* 2000a; 45(2): 141-8.
41. Koo H, Rosalen PL, Cury JA, Ambrosano GMB, Murata RM, Yatsuda R *et al.* Effect of a new variety of *Apis mellifera* propolis on mutants *Streptococci*. *Curr Microbiol.* 2000b; 41(3): 192-6.
42. Koo H, Smith AMV, Bowen WH, Rosalen PL, Cury JA, Park YK. Effects of *Apis mellifera* propolis on the activities of Streptococcal glucosyltransferases in solution and adsorbed onto saliva-coated hydroxyapatite. *Caries Res.* 2000c; 34(5): 418-26.
43. Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Y, Bankova V, Christov R, Popov S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol.* 1999; 64(3): 235-40.

44. Kumazawa S, Hayashi K, Kajiya K, Ishii T, Hamasaka T, Nakayama T. Studies of the constituents of Uruguayan propolis. *J Agric Food Chem.* 2002; 50(17): 4777-82.
45. Marcucci MC, Ferreres F, Garcia-Viguera C, Bankova VS, De Castro SL, Dantas AP *et al.* Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *J Ethnopharmacol.* 2001; 74(2): 105-12.
46. Marcucci MC. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie.* 1995; 26(2): 83-99.
47. Marcucci MC. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. *Quim Nova.* 1996; 19(5): 529-36.
48. Markham, R. K., Mitchell, K. A., Wilkins, A. L., Daldy, J. A., Lu, Y., HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zealand propolis. *Phytochemistry* 1996. 42, 205-211.
49. Miyataka H, Nishiki M, Matsumoto H, Fujimoto T, Matsuka M, Satoh T. Evaluation of Brazilian and Chinese propolis by enzymatic and physico-chemical methods. *Biol Pharmacol Bull.* 1997; 20(5): 496-501.
50. Montpied P, De Bock F, Rondouin G, Niel G, Briant L, Courseau AS *et al.* Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) prevents inflammatory stress in organotypic hippocampal slice cultures. *Mol Brain Res.* 2003; 115(2): 111-20.
51. Moura FF. Determinação das propriedades físico-químicas e biológicas da própolis produzida por *Apis mellifera* na região nordeste do Brasil [dissertação]. Campinas: UNICAMP/FEA; 2000. 69p.
52. Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod.* 2003; 66(7): 1022-37.
53. Ooshima T, Osaka Y, Sasaki H, Osawa K, Yasuda H, Matsumura M *et al.* Caries Inibitory avtivity of cacao bean huso extract in vitro and animal experiments. *Arch Oral Biol.* 2000; 45(8): 639-45.
54. Park, Y.K., Paredes-Guzman, J.F., Aguiar, C.L., Alencar, S.M., Fujiwara, F.Y. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004, 52, 1100–1103.

55. Park YK, Ikegaki M, Alencar SM, Moura FF. Evaluation of brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. *Honeybe Sci.* 2000; 21(2): 85-90.
56. Park YK, Koo H, Abreu JA, Ikegaki M, Cury JA, Rosalen PL. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganism. *Curr Microbiol.* 1998a; 36; 24-8.
57. Park YK, Koo H, Ikegaki M. Effects of propolis on *Streptococcus mutans*, *Actinomyces naeslundii* and *Staphylococcus aureus*. *Rev Microbiol.* 1998b; 29: 143-8.
58. Pereira AS, Seixas FRMS, Aquino Neto FR. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Quim Nova.* 2002; 25(2): 321-6.
59. Rosalen PL, Murata RM, Yatsuda R, Duarte S, Goncalves RB, Koo H *et al.* Effect of propolis from eight Brazilian regions on oral microorganisms. *J Dent Res.* 2002; 81: 349.
60. Rubio OC, Cuellar AC, Rojas N, Castro HV, Rastrelli L, Aquino R. A polyisoprenylated benzophenone from cuban propolis. *J Nat Prod.* 1999; 62(7): 1013-1015.
61. Cuesta-Rubio OC, Padron A, Castro HV, Pizza C, Rastrelli L. Aristophenes A and B. A new tautomeric pair of polyisoprenylated benzophenones from *Garcinia aristata*. *J Nat Prod.* 2001; 64(7): 973-5.
62. Santos MH. Estudo químico dos frutos de *Rheedia gardneriana* e efeito biológico de seus constituintes [dissertação]. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 1996.
63. Sforcin JM, Fernandes A Jr, Lopes CA, Bankova V, Funari SR. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *J Ethnopharmacol.* 2000; 73(1/2): 243-9.
64. Tanaka, J.C.A., Silva, C.C., Dias Filho, B.P., Nakamura, C.V., Carvalho, J.E., Foglio, M.A. Chemical constituents of *Luehea divaricata* Mart (Tiliaceae). *Quim. Nova* 2005. 28, 834-837.
65. Wille JJ, Kydonieus A. Palmitoleic acid isomer (C16:1 Δ 6) in human skin sebum is effective against Gram-positive bacteria. *Kin Pharmacol Appl Skin Physiol.* 2003; 6(3): 176-87.
66. Williams KA, Schemehorn BR, McDonald JL Jr, Stookey GK, Katz S. Influence of selected fatty acids upon plaque formation and caries in the rat. *Arch Oral Biol.* 1982; 27(12): 1027-31.

67. Yamaguchi F, Saito M, Ariga T, Yoshimura Y, Nakazawa H. Free radical scavenging activity and antiulcer activity of garcinol from *Garcinia indica* fruit rind. *J Agric Food Chem.* 2000; 48(6): 2320-5.
68. Zheng CJ, Yoo JS, Lee TG, Cho HY, Kim YH, Kim WG. Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids. *FEBS Lett.* 2005; 579(23): 5157-62.

5. Anexos

5.1 Anexo 1 - Resolução do formato alternativo para defesa da dissertação de mestrado.

INFORMAÇÃO CCPG/002/06

Tendo em vista a necessidade de revisão da regulamentação das normas sobre o formato e a impressão das dissertações de mestrado e teses de doutorado e com base no entendimento exarado no Parecer PG nº 1985/96, que trata da possibilidade do formato alternativo ao já estabelecido, a CCPG resolve:

Artigo 1º - O formato padrão das dissertações e teses de mestrado e doutorado da UNICAMP deverão obrigatoriamente conter:

- I. Capa com formato único ou em formato alternativo que deverá conter informações relativas ao nível (mestrado ou doutorado) e à Unidade de defesa, fazendo referência à Universidade Estadual de Campinas, sendo o projeto gráfico das capas definido pela PRPG.
- II. Primeira folha interna dando visibilidade à Universidade, a Unidade de defesa, ao nome do autor, ao título do trabalho, ao número de volumes (quando houver mais de um), ao nível (mestrado ou doutorado), a área de concentração, ao nome do orientador e co-orientador, ao local (cidade) e ao ano de depósito. No seu verso deve constar a ficha catalográfica.
- III. Folha de aprovação, dando visibilidade à Comissão Julgadora com as respectivas assinaturas.
- IV. Resumo em português e em inglês (ambos com no máximo 500 palavras).
- V. Sumário.
- VI. Corpo da dissertação ou tese dividido em tópicos estruturados de modo característico à área de conhecimento.
- VII. Referências, formatadas segundo normas de referenciamento definidas pela CPG da Unidade ou por critério do orientador.
- VIII. Todas as páginas deverão, obrigatoriamente, ser numeradas, inclusive páginas iniciais, divisões de capítulos, encartes, anexos, etc... As páginas iniciais poderão ser numeradas utilizando-se algarismos romanos em sua forma minúscula.
- IX. Todas as páginas com numeração "ímpar" serão impressas como "frente" e todas as páginas com numeração "par" serão impressas como "verso".

§ 1º - A critério do autor e do orientador poderão ser incluídos: dedicatória; agradecimento; epígrafe; lista de: ilustrações, tabelas, abreviaturas e siglas, símbolos; glossário; apêndice; anexos.

§ 2º - A dissertação ou tese deverá ser apresentada na língua portuguesa, com exceção da possibilidade permitida no artigo 2º desta Informação.

§ 3º - As dissertações e teses cujo conteúdo versar sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou biossegurança, deverão apresentar anexos os respectivos documentos de aprovação.

Artigo 2º - A critério do orientador e com aprovação da CPG da Unidade, os capítulos e os apêndices poderão conter cópias de artigos de autoria ou de co-autoria do candidato, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, escritos no idioma exigido pelo veículo de divulgação.

§ único - O orientador e o candidato deverão verificar junto às editoras a possibilidade de inclusão dos artigos na dissertação ou tese, em atendimento à legislação que rege o direito autoral, obtendo, se necessária, a competente autorização, deverão assinar declaração de que não estão infringindo o direito autoral transferido à editora.

Artigo 3º - Dependendo da área do conhecimento, a critério do orientador e com aprovação da CPG da Unidade, a dissertação ou tese poderá ser apresentada em formato alternativo, desde que observados os incisos I, II, III, IV, V e VII do artigo 1º.

Artigo 4º - Para impressão, na gráfica da Unicamp, dos exemplares definitivos de dissertações e teses defendidas, deverão ser adotados os seguintes procedimentos:

§ 1º - A solicitação para impressão dos exemplares de dissertações e teses poderá ser encaminhada à gráfica da Unicamp pelas Unidades, que se responsabilizarão pelo pagamento correspondente.

§ 2º - Um original da dissertação ou tese, em versão definitiva, impresso em folha tamanho carta, em uma só face, deve ser encaminhado à gráfica da Unicamp acompanhado do formulário "Requisição de Serviços Gráficos", onde conste o número de exemplares solicitados.

§ 3º - A gráfica da Unicamp imprimirá os exemplares solicitados com capa padrão. Os exemplares solicitados serão encaminhados à Unidade em, no máximo, cinco dias úteis.

§ 4º - No formulário "Requisição de Serviços Gráficos" deverão estar indicadas as páginas cuja reprodução deva ser feita no padrão "cores" ou "foto", ficando entendido que as demais páginas devam ser reproduzidas no padrão preto/branco comum.

§ 5º - As dissertações e teses serão reproduzidas no padrão frente e verso, exceção feita às páginas iniciais e divisões de capítulos; dissertações e teses com até 100 páginas serão reproduzidas no padrão apenas frente, exceção feita à página que contém a ficha catalográfica.

§ 6º - As páginas fornecidas para inserção deverão ser impressas em sua forma definitiva, ou seja, apenas frente ou frente/verso.

§ 7º - O custo, em reais, de cada exemplar produzido pela gráfica será definido pela Administração Superior da Universidade.

Artigo 5º - É obrigatória a entrega de dois exemplares para homologação.

Artigo 6º - Esta Informação entrará em vigor na data de sua publicação, ficando revogadas as disposições em contrário, principalmente as Informações CCPG 001 e 002/98 e CCPG/001/00.

Campinas, 13 de setembro de 2006

Profa. Dra. Teresa Dib Zambon Atvars
Presidente
Comissão Central de Pós-Graduação