

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Isolamento e identificação de compostos com atividade antibacteriana
da própolis vermelha brasileira**

Ingridy Simone Ribeiro Cabral

Dissertação apresentada para a obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência e
Tecnologia de Alimentos

**Piracicaba
2008**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Ingridy Simone Ribeiro Cabral
Bacharel e Licenciada em Ciências Biológicas

**Isolamento e identificação de compostos com atividade antibacteriana
da própolis vermelha brasileira**

Orientador:
Prof. Dr. **SEVERINO MATIAS DE ALENCAR**

Dissertação apresentada para a obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência e
Tecnologia de Alimentos

**Piracicaba
2008**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Cabral, Ingridy Simone Ribeiro

Isolamento e identificação de compostos com atividade antibacteriana da própolis vermelha brasileira / Ingridy Simone Ribeiro Cabral. - - Piracicaba, 2008.
94 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.
Bibliografia.

1. Abelhas 2. Agentes antimicrobianos-Isolamento e purificação 3. Cromatografia líquida de alta eficiência 4. Própolis I. Título

CDD 615.36
C117i

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

Ao Divino Espírito Santo,
por guiar meus caminhos e me proteger sempre.

Aos meus pais, Ítalo e Madalena, por me darem a vida e serem meu exemplo de amor,
luta e honestidade.

À minha irmã e madrinha Mileni, por ter sido minha segunda mãe
e até hoje se preocupar tanto comigo.

***E em especial ao meu esposo Richardson...
Por compreender minhas falhas
Por estar sempre por perto quando preciso de apoio
Enfim, por ter deixado sua família e os seus amigos, fazendo do meu sonho o seu
sonho.***

Dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao Divino Espírito Santo por iluminar minha vida e me mostrar sempre o caminho certo a seguir.

Aos meus pais, Ítalo e Madalena, e minha irmã Mileni, pelo carinho e apoio em todos os momentos que precisei.

Ao meu marido Richardson, o meu agradecimento especial por estar sempre ao meu lado e por tudo o que tem feito por nós.

Aos meus sogros, José Maria e Vera, e ao meu cunhado Rander, por acreditarem no meu sonho e entenderem que a distância era necessária para a realização dele.

Aos meus tios, tias e primos, por entenderem a minha ausência nas reuniões de família.

À amiga Leila Garcia pelo exemplo de educadora e à amiga Satiko Hanazono, pelo carinho que me proporcionou desde que nasci.

Aos meus amigos do laboratório de Bioquímica: Ivani, Rosângela, Solange, Lucimara, Adna, Aline, Ana Paula, Priscila, Rodrigo Moraes, Rodrigo Buissa, Letícia e em especial à Tatiane pela colaboração e carinho durante esses 3 anos de convivência.

Aos amigos da FOP-UNICAMP: Myrella, Bruno, Elisa e Eliane, pela colaboração nas análises microbiológicas.

Ao meu orientador, o professor Severino Matias de Alencar, obrigada pela oportunidade de ter desenvolvido este trabalho sob sua orientação, por me receber em

seu laboratório com tanto carinho e por acreditar na minha capacidade. Além disso, obrigada pelo exemplo de amor e dedicação à pesquisa.

Ao meu co-orientador, o professor Pedro Luiz Rosalen, obrigada pela parceria e por colaborar com a realização das análises microbiológicas na FOP.

Ao professor Masaharu Ikegaki, por me iniciar na carreira científica e por tudo o que me ensinou.

À professora Vera Lúcia Garcia Rheder, do CPQBA (UNICAMP), obrigada por me ensinar e disponibilizar o material para a realização da cromatografia em coluna seca.

À Dr^a Andréa Nascimento, pela identificação química dos compostos isolados da própolis vermelha.

Aos funcionários e professores do departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, em especial às professoras Marília e Marisa pelo apoio e palavras de ânimo nos momentos difíceis.

Aos amigos que fiz na pós-graduação da ESALQ-USP.

Aos funcionários da biblioteca, especialmente à Bia, e aos funcionários da seção de pós-graduação.

E por fim, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro concedido para a realização deste trabalho.

“Depois de algum tempo você aprende que amar não significa apoiar-se, e que companhia nem sempre significa segurança. Aprende que falar pode aliviar dores emocionais. Descobre que se leva anos para construir confiança e apenas segundos para destruí-la, e que você pode fazer coisas num instante, das quais se arrependerá pelo resto da vida.

Descobre que as pessoas com as quais você mais se importa são tomadas de ti muito depressa, por isso devemos deixar as pessoas que amamos com palavras amorosas, pois pode ser a última vez que a vemos. Aprende que as circunstâncias e os ambientes têm influência sobre nós. Começa a aprender que não se deve comparar com os outros, mas sim com o melhor que pode ser. Descobre que leva muito tempo para se tornar a pessoa que quer ser e que o tempo é curto.

Aprende que paciência requer muita prática. Aprende que maturidade tem mais a ver com os tipos de experiências que viveu do que com quantos aniversários celebrou. Aprende que quando está com raiva tem o direito de estar, mas isso não lhe dá o direito de ser cruel... Aprende que, com a mesma severidade com que julga, será em algum momento condenado. Aprende que não importa em quantos pedaços o seu coração foi partido, o mundo não pára para que você o concerte. Aprende que o tempo não é algo que possa voltar para trás. E aprende que realmente pode suportar... que realmente é forte! E que pode ir muito mais longe depois de pensar que não pode ir mais... e que realmente a nossa vida tem valor e que você tem valor diante da vida! As nossas dúvidas são traidoras e nos fazem perder o bem que poderíamos conquistar, se não fosse o medo de tentar.”

William Shakespeare

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	13
1 INTRODUÇÃO	14
2 DESENVOLVIMENTO	17
2.1 Revisão Bibliográfica	17
2.1.1 Própolis	17
2.1.2 Produção e Mercado	19
2.1.3 Patentes	21
2.1.4 Publicações	22
2.1.5 Composição química da própolis	22
2.1.6 Compostos isolados e identificados da própolis	28
2.1.7 Estratégias para a obtenção de compostos puros e biologicamente ativos	31
2.1.8 Propriedades biológicas da própolis	33
2.1.9 Atividade antibacteriana da própolis	34
2.2 Material e Métodos	37
2.2.1 Coleta do Material	37
2.2.2 Tratamento da amostra de própolis <i>in natura</i>	37
2.2.3 Preparo do Extrato Etanólico de Própolis (EEP)	37
2.2.4 Fracionamento líquido-líquido do extrato etanólico de própolis	39
2.2.5 Fracionamento e purificação da fração clorofórmica	39
2.2.5.1 Cromatografia em coluna seca	39
2.2.5.2 Purificação da sub-fração bioativa da fração clorofórmica	40
2.2.6 Isolamento dos compostos com atividade antibacteriana	40
2.2.7 Análises físico-químicas do EEP, frações, sub-frações e compostos isolados	41
2.2.7.1 Espectrofotometria na região ultravioleta-visível	41
2.2.7.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)	41

2.2.7.3 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa	41
2.2.8 Identificação química dos compostos isolados	42
2.2.9 Atividade antibacteriana <i>in vitro</i> do EEP, frações, sub-frações e compostos isolados	42
2.2.9.1 Teste de difusão em ágar	42
2.2.9.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM)	43
2.2.9.3 Concentração Bactericida Mínima (CBM)	44
2.2.9.4 Atividade antibacteriana pelo método da bioautografia	45
2.2.9.5 Microtécnica para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos compostos isolados	46
2.3 Resultados e Discussão	47
2.3.1 Coleta das amostras de própolis	47
2.3.2 Fracionamento do EEP pela técnica de partição líquido-líquido	49
2.3.3 Análises físico-químicas do EEP e suas frações	50
2.3.4 Atividade antibacteriana <i>in vitro</i> do EEP e suas frações	52
2.3.5 Fracionamento da fração clorofórmica por cromatografia em coluna seca	55
2.3.6 Atividade antibacteriana das sub-frações da fração clorofórmica obtidas pela cromatografia em coluna seca	59
2.3.7 Fracionamento da sub-fração 3 em coluna de Sephadex LH-20	60
2.3.8 Bioautografia das sub-frações obtidas pela coluna de Sephadex LH-20	61
2.3.9 Isolamento dos compostos com atividade antibacteriana	62
2.3.10 Atividade antibacteriana dos compostos isolados da própolis vermelha	65
2.3.11 Análise espectrofotométrica dos compostos isolados.....	67
2.3.12 Identificação química dos compostos isolados	68
3 CONCLUSÕES	74
REFERÊNCIAS	75

RESUMO

Isolamento e identificação de compostos com atividade antibacteriana da própolis vermelha brasileira

A própolis é uma substância resinosa coletada pelas abelhas de diversas partes das plantas, à qual têm sido atribuídas propriedades antimicrobiana, antioxidante, antiinflamatória, antiviral, entre outras. Sua composição química depende de vários fatores, como a localização geográfica. Um novo tipo de própolis brasileira, denominada de “própolis vermelha”, por sua coloração intensa característica, foi identificada e coletada em região de mangue do Estado de Alagoas. O objetivo deste trabalho foi fracionar e isolar compostos com atividade antibacteriana dessa nova variedade de própolis. O extrato etanólico da própolis vermelha foi fracionado pela técnica de extração líquido-líquido, originando as frações hexânica (fr-Hex) e clorofórmica (fr-Clo). A fr-Clo apresentou alta atividade antibacteriana pelos testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM), contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Actinomyces naeslundii*. Dessa forma, a fr-Clo foi refracionada por coluna seca gerando sete sub-frações. Após a avaliação da atividade antibacteriana das sub-frações pelas técnicas de CIM e CBM, a sub-fração 3, a mais bioativa, foi purificada em coluna de Sephadex LH-20. Dessa purificação foram obtidas três sub-frações bioativas, as quais foram submetidas ao isolamento dos compostos pela técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) preparativa. Dois compostos foram isolados e denominados de composto 1 e composto 2. O composto 2 foi o mais potente para as atividades inibitória e bactericida e sua CIM para os três tipos de bactéria testados variou entre 15,6 e 31,2 µg/mL, enquanto para o composto 1, este parâmetro variou de 31,2 a 62,5 µg/mL. As CBM do composto 1 e do composto 2 variaram entre 125 e 250 µg/mL e entre 31,2 e 62,5 µg/mL, respectivamente. Por meio da técnica Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foi possível identificar o composto 1 como pertencente à classe das isoflavanas e o composto 2 como uma chalcona (isoliquiritigenina). A forte atividade antibacteriana apresentada pelos compostos isolados da própolis vermelha torna este produto uma importante fonte de compostos antibacterianos naturais.

Palavras-chave: Própolis; Atividade antibacteriana, *Apis mellifera*, CLAE

ABSTRACT

Isolation and identification of compounds presenting antibacterial activity in Brazilian red propolis

Propolis is a resinous material, collected by honeybees from several parts of plants, known for its antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, antiviral properties, among others. Its composition varies according to several factors, such as the geographical location. A novel type of Brazilian propolis, named red propolis due to its intense characteristic color, was collected in a mangrove area in the State of Alagoas. This research aimed to fractionate and isolate the compounds in this new type of propolis that present antibacterial activity. The ethanolic extract of red propolis (EEP) was fractionated using the liquid-liquid extraction technique, yielding the hexanic (Hex-fr) and the chloroformic fractions (Chlo-fr). Chlo-fr showed high antibacterial activity determined by the minimal inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) tests against *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, and *Actinomyces naeslundii*. Thus, Chlo-fr was refractionated by Dry-Column Chromatography, yielding seven subfractions. After submitted to MIC and MBC techniques to assess their antibacterial activity, and subfraction 3, the most bioactive of them, was purified in Sephadex LH-20 column. After this purification, three bioactive subfractions were obtained, submitted to isolation of compounds using preparative High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Two compounds were isolated and named compound 1 and compound 2. Compound 2 presented the highest inhibitory and bactericidal activities and its MIC for the three types of bacteria tested ranged from 15.6 to 31.2 $\mu\text{g/mL}$, whereas for compound 1, this parameter ranged from 31.2 to 62.5 $\mu\text{g/mL}$. MBC of compound 1 and compound 2 ranged from 125 to 250 $\mu\text{g/mL}$ and from 31.2 to 62.5 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Through Nuclear Magnetic Resonance technique (NMR), it was possible to identify the compound 1 as belonging to class of isoflavans and the compound 2 as a chalcone (isoliquiritigenin). Due to the strong antibacterial activity presented by the compounds isolated from red propolis, it can be concluded that this product is an important source of natural antibacterial compounds.

Key words: Propolis; Antibacterial activity; *Apis mellifera*; HPLC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química de um fenol, o mais simples dos compostos fenólicos.....	25
Figura 2 - Núcleo básico hidroxifenilpropenóico dos ácidos fenólicos.....	25
Figura 3 - Estrutura química de alguns compostos fenólicos encontrados em própolis	26
Figura 4 - Núcleo básico de um flavonóide, sendo composto por dois anéis aromáticos (A e B) e um anel intermediário (C).....	27
Figura 5 - Estrutura de alguns flavonóides encontrados em própolis.....	28
Figura 6 - Fluxograma do fracionamento e isolamento bioguiado de compostos com atividade antibacteriana da própolis vermelha.....	38
Figura 7 - Aspecto do apiário selecionado como fornecedor de própolis, localizado em Marechal Deodoro – Alagoas.....	48
Figura 8 - Aspecto da própolis vermelha <i>in natura</i> nos coletores instalados em colméias de abelhas <i>Apis mellifera</i>	48
Figura 9 - Amostra de própolis vermelha <i>in natura</i> (A) e triturada (B).....	48
Figura 10 - Aspecto da partição líquido-líquido do EEP com hexano (A) e clorofórmio (B).....	49
Figura 11 - Cromatogramas obtidos por CLAE do extrato etanólico bruto da própolis vermelha (EEP), da fração hexânica (fr-Hex.) e fração clorofórmica (fr-Clo.).....	50
Figura 12 - Cromatograma do EEP, fração hexânica e fração clorofórmica.....	52
Figura 13 - Teste de difusão em ágar do EEP, fração hexânica e fração clorofórmica.....	53
Figura 14 - Cromatografia em coluna seca da fração clorofórmica.....	55
Figura 15 - Sub-frações da fração clorofórmica obtidas a partir da técnica da coluna seca.....	56
Figura 16 - Aparência das sete sub-frações obtidas após o fracionamento.....	56
Figura 17 - Cromatografia em camada delgada das 7 sub-frações obtidas através da coluna seca.....	57

Figura 18 - Cromatografia por coluna de Sephadex LH-20.....	60
Figura 19 - Cromatografia em camada delgada das frações obtidas através da coluna de Sephadex LH-20.....	61
Figura 20 - Bioautografia das 3 frações obtidas através da coluna Sephadex LH-20.....	62
Figura 21 - Cromatogramas obtidos por CLAE-FR das 3 frações obtidas através da coluna Sephadex LH-20.....	63
Figura 22 - Cromatogramas da coleta dos compostos por CLAE- preparativa.....	64
Figura 23 - Cromatogramas obtidos por CLAE dos compostos com atividade antibacteriana, isolados da própolis vermelha.....	64
Figura 24 - Evolução do fracionamento e purificação dos compostos com atividade antimicrobiana da própolis vermelha.....	65
Figura 25 - Perfis dos compostos isolados em espectrofotometria na região UV-visível.....	68
Figura 26 - Possível estrutura do composto 1.....	70
Figura 27 - Estrutura do composto 2.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Localidades no estado de Alagoas onde as amostras de própolis vermelha foram coletadas.....	47
Tabela 2 - Valores das médias das zonas inibição do crescimento das bactérias frente ao EEP, fr-Hex e fr-Clo.....	53
Tabela 3 - Valores da Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima do EEP, fr-Hex e fr-Clo.....	54
Tabela 4 - Rendimento das 7 sub-frações da fração clorofórmica, coletadas a partir do fracionamento em coluna seca.....	58
Tabela 5 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) das 7 sub-frações da fração clorofórmica.....	59
Tabela 6 - Valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos compostos isolados.....	66
Tabela 7 - Dados de RMN de ^1H do composto 1.....	69
Tabela 8 - Dados de RMN de ^1H do composto 2 e de RMN de ^1H do padrão obtido da literatura.....	71

1 INTRODUÇÃO

A resistência a agentes antibacterianos tem se tornado um importante problema global. Dos dois milhões de pessoas que contraíram alguma doença de origem bacteriana nos hospitais dos Estados Unidos a cada ano, cerca de 70% dos casos envolvem cepas bacterianas que são resistentes a pelo menos uma droga (CUSHINE; LAMB, 2005).

Em resposta a resistência bacteriana, as principais indústrias farmacêuticas, juntamente às universidades, têm concentrado esforços em isolar e identificar novos compostos com propriedades antibacterianas (TAYLOR; STAPLETON; PAUL, 2002).

Os produtos naturais têm sido fontes valiosas para o desenvolvimento desses novos compostos (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2000), permitindo a descoberta de agentes terapêuticos não somente para tratar doenças infecciosas, mas também para tratar o câncer, imunodeficiências e outras (CLARDY; WALSH, 2004). De acordo com Cushine e Lamb (2005), os flavonóides provenientes de produtos naturais, na forma original ou com suas estruturas alteradas, são uma das principais classes de compostos que podem ser utilizados como agentes terapêuticos.

Entre todas as novas drogas aprovadas pelo Food and Drug Administration (FDA) ou outras entidades equivalentes de outros países, 28% delas são totalmente de origem direta de produtos naturais e 39% são de derivados destes (NEWMAN et al., 2002). Assim, 67% de todas as novas drogas aprovadas atualmente são de fontes naturais ou derivadas de fontes naturais.

Entre os produtos naturais, a própolis tem se destacado, tanto pelas suas diversas propriedades biológicas (CHEN et al., 2003; NAGAOKA et al., 2003; DUARTE et al.,

2003; NAGAI et al., 2003; ASO et al., 2004; KUMAZAWA; HAMASAKA; NAKAYAMA, 2004; HAYACIBARA et al., 2005; CASTRO et al., 2007; ALENCAR et al., 2007; OLDONI, 2007), quanto pela sua aplicabilidade nas indústrias de cosméticos e alimentos, utilizada como ingrediente na formulação de vários produtos (MATSUDA, 1994).

Como definição, a própolis é uma substância resinosa coletada pelas abelhas de diferentes partes da planta, como brotos, botões florais e exsudados resinosos. Possui coloração e consistência variada e é utilizada para fechar pequenas frestas, embalsamar insetos mortos bem como proteger a colméia contra a invasão de microrganismos (GHISALBERTI, 1979).

Devido a grande complexidade química, a própolis é considerada uma das misturas mais heterogêneas já encontradas em fontes naturais. Os principais constituintes são os compostos fenólicos, representados pelos flavonóides, ácidos fenólicos e seus ésteres, e que possuem papel importante no organismo, pois podem agir como antioxidantes, antiinflamatórios, antimicrobianos entre outras atividades biológicas (CHEN et al., 2003; NAGAOKA et al., 2003; DUARTE et al., 2003; NAGAI et al., 2003; ASO et al., 2004; KUMAZAWA; HAMASAKA; NAKAYAMA, 2004; HAYACIBARA et al., 2005; CASTRO et al., 2007; ALENCAR et al., 2007; OLDONI, 2007).

A própolis brasileira foi classificada em 12 grupos de acordo com a composição química e propriedades biológicas, sendo que os grupos que apresentaram melhor atividade antimicrobiana foram os grupos 3 (Rio Grande do Sul); 6 (Bahia) e 12 (Minas Gerais) (PARK et al., 2000; ALENCAR, 2002). Um novo tipo de própolis, classificada como o 13^o tipo de própolis brasileira (SILVA et al., 2007), denominada de própolis vermelha, demonstrou alta atividade biológica, principalmente atividade antimicrobiana

contra microrganismos patogênicos em ensaios *in vitro* (ALENCAR et al., 2007), além de ter despertado recentemente um grande interesse pelo mercado internacional. Portanto, o objetivo deste trabalho foi fracionar e isolar compostos com atividade antibacteriana da própolis vermelha brasileira.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 Própolis

A origem do conhecimento do homem sobre as virtudes alimentícias, curativas e profiláticas dos produtos das abelhas é bastante curiosa e interessante. Praticamente todas as civilizações antigas conheceram e utilizaram os produtos das abelhas como valiosos recursos terapêuticos. A história da medicina das civilizações Chinesa, Tibetana e Egípcia é muito rica, todas contendo em seus escritos antigos centenas de receitas em que foram utilizados mel, própolis, larvas de abelhas e às vezes as próprias abelhas para curar ou prevenir enfermidades. Os Egípcios conheciam muito bem as propriedades conservantes da própolis e a usavam para embalsamar os mortos. Os Incas utilizaram a própolis como um agente antipirético e a farmacopéia inglesa do século XVII registrou a própolis como um remédio oficial. Entre os séculos XVII e XX a própolis tornou-se popular na Europa, principalmente por sua atividade antibacteriana (CASTALDO; CAPASSO, 2002).

Os gregos, entre os quais Hipócrates, adotaram a própolis como cicatrizante de feridas internas e externas. Plínio, historiador romano, refere-se à própolis como medicamento capaz de reduzir inchaços e aliviar dores, enquanto a elite feminina da época utilizava este produto no alívio da síndrome pré-menstrual e de cólicas. Os médicos europeus dos séculos XVI, particularmente russos e poloneses, utilizaram a própolis como antibacteriano, tuberculostático e agente dermatológico antiacne. Na odontologia foi empregada no tratamento de abscessos e gengivas hemorrágicas, bem como nos casos de candidíases bucais e halitoses. A própolis também é encontrada nos receituários chineses antigos como medicamento ativo contra doenças coronárias, hipertensão e disfunções hematológicas (NOTHENBERG, 1997).

O termo “própolis” já era descrito no século XVI na França. Na África do Sul, na guerra ao final do século XIX, foi amplamente utilizada devido às suas propriedades cicatrizantes e na segunda guerra mundial foi empregada em várias clínicas soviéticas

(MARCUCCI, 1996). Na antiga URSS, a própolis mereceu especial atenção na medicina humana e veterinária, com aplicações inclusive no tratamento da tuberculose, observando-se a regressão dos problemas pulmonares e recuperação do apetite (PEREIRA; SEIXAS; NETO, 2002).

A própolis pode ser definida como uma resina coletada por abelhas de diversas partes das plantas como brotos, botões florais e exudados resinosos (GHISALBERTI, 1979 apud BURDOCK, 1998). O nome “própolis” é derivado do grego *pro*, em defesa de, e *polis*, a cidade, e quer dizer: “em defesa da cidade ou da colméia”. De fato as abelhas usam esta substância na entrada das colméias com a finalidade de fechar as frestas, reduzindo assim a entrada do vento frio, dos insetos e microrganismos, além de ser utilizada para embalsamar pequenos animais mortos que não puderam ser retirados (BURDOCK, 1998; INOUE, et al., 2007). Costuma-se encontrar na colméia pequenos animais ou parte deles envoltos em própolis, e em perfeito estado de conservação (MARCUCCI, 1996), já que é atribuída também à própolis ação antimicrobiana, o que impede a decomposição do cadáver. É também utilizada como material de construção no interior da colméia para soldar favos, quadros e envernizar o interior dos alvéolos para que a abelha rainha faça a postura (MARCUCCI, 1996).

É um material quebradiço quando frio e se torna dúctil e maleável quando aquecido. Seu ponto de fusão é variável entre 60 - 70 °C, sendo que pode atingir em alguns casos até 100 °C. Possui propriedades elásticas e pode se distender em até 200% antes de se romper (INOUE et al., 2007). Das propriedades adesivas derivou a designação em língua inglesa de *bee glue* (cola-de-abelha). A coloração da própolis é dependente de sua procedência, sendo encontrada em tons que variam do amarelo-esverdeado, passando pelo marrom-avermelhado ao negro, dependendo da flora de origem e idade. Possui também um aroma forte e característico em consequência de uma fração volátil de ácidos fenólicos, podendo variar de uma amostra para outra (MARCUCCI, 1996; BURDOCK, 1998; INOUE et al., 2007).

Na Europa, América do Norte e oeste da Ásia, a fonte dominante da própolis é o exsudado do botão de álamo (*Populus* sp.) e, portanto somente um tipo de própolis é encontrado nestas regiões (MARKHAM et al., 1996; WOLLENWEBER; BUCHMANN, 1997). Entretanto, na América do Sul, a espécie vegetal do gênero *Populus* sp. não é

nativa, existindo uma grande diversidade vegetal para a retirada da resina, dificultando inclusive a correlação da própolis com a fonte produtora. A dependência geográfica e vegetal da própolis é exemplificada nos trabalhos, por exemplo, de própolis da América do Sul, Europa, China, Canadá e Espanha (GARCIA-VIGUERA; GREENAWAY, WHATLEY, 1992; TOMÁS-BARBERÁN et al., 1993; BONVEHI; COLL, 1994; PARK; ALENCAR; AGUIAR, 2002; ALENCAR, 2002; PARK et al., 2004; ALENCAR et al., 2005; SFORCIN et al., 2005; SILVA et al., 2007).

No Brasil, um novo tipo de própolis proveniente do Estado de Alagoas e denominada de própolis vermelha teve a sua composição química e origem botânica estudada por Silva et al. (2007) e Alencar et al. (2007). O extrato etanólico da própolis e de 20 resinas diferentes, secretadas por espécies de plantas mencionadas como a provável origem botânica, foram avaliados por espectrofotometria na região UV-visível, cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia gasosa acoplada por espectrometria de massas. Todas as evidências fitoquímicas demonstraram ser *Dalbergia ecastophyllum* a principal fonte da própolis vermelha de Alagoas. Esse foi o primeiro relato de uma própolis brasileira ter como fonte botânica uma espécie de leguminosa, o que corrobora com o fato da presença de várias isoflavonas em sua composição química. Pelo fato da própolis vermelha apresentar um perfil químico distinto dos outros 12 grupos de própolis, foi classificada como sendo o 13^o tipo de própolis brasileira.

2.1.2 Produção e Mercado

Dependendo da região de coleta de resina pelas abelhas, a produção pode ser concentrada em alguns meses do ano. No hemisfério Norte, as abelhas coletam própolis apenas nos períodos mais quentes. Por outro lado, na Argentina, observam-se dois períodos característicos de coleta: na primavera e no verão. No Brasil, graças ao clima propício, a coleta pode ser realizada durante praticamente todo o ano (GHISALBERTI, 1979 *apud* INOUE et al., 2007).

As pesquisas referentes à utilização da própolis aumentaram substancialmente e, devido aos seus resultados altamente positivos, ocorreu

uma procura maior pelo produto *in natura*, tornando-a um atrativo no incremento da exploração econômica do setor apícola (INOUE et al., 2007).

Nos últimos anos constatou-se um grande aumento do número de apicultores no Brasil aproveitando a extensa área territorial e a diversidade de plantas nectaríferas, poliníferas e propoliníferas (KISS, 2002). Isso ocasionou um aumento na produção da própolis nos últimos dez anos, sendo o terceiro maior produtor mundial, chegando a 100 toneladas anuais (INOUE et al., 2007). Desse volume, dois terços são destinados à exportação, principalmente ao Japão, Estados Unidos, Alemanha e China. O Japão é o principal importador deste produto apícola brasileiro. Este fato pode ser justificado pelo alto valor agregado da própolis em Tóquio, onde um frasco do extrato etanólico, que é vendido no Brasil por cerca de 5 a 10 reais, pode chegar a custar 150 dólares (NOTHENBERG, 1997; PEREIRA; SEIXAS; NETO, 2002). Embora o Brasil produza de 10 a 15% do total da produção mundial, o país atende cerca de 90% da demanda japonesa (PEREIRA; SEIXAS; NETO, 2002).

O mercado brasileiro de produtos apícolas está avaliado atualmente em US\$ 360 milhões anuais. As pesquisas demonstram um potencial de curto prazo para mais de US\$ 1 bilhão anual (O MERCADO, 2008). Estudos sobre a produção apícola no Brasil mostram dados contraditórios quanto ao número de apicultores e colméias, produção e produtividade. Quanto aos apicultores, as pesquisas apontam os extremos entre 26.315 e 300.000. Esses produtores, juntos, possuem entre 1.315.790 e 2.500.000 colméias e um faturamento anual entre R\$ 84.740.000,00 e R\$ 506.250.000,00 (PEREIRA et al., 2003).

Dados da Federação de Apicultores de Minas Gerais revelaram que a própolis produzida no estado é considerada a melhor do mundo pelo mercado japonês, onde o quilograma do produto saltou de US\$ 5 para US\$ 200 nos últimos anos (PEREIRA; SEIXAS; NETO, 2002).

O Nordeste brasileiro possui um dos maiores potenciais apícolas do Brasil, sendo que alguns de seus estados estão também vocacionados para a produção de própolis, geléia real, pólen, cera e apitoxina, produtos que podem atingir preços superiores ao do próprio mel (APICULTURA, 2008).

2.1.3 Patentes

Desde a primeira patente romena em 1965 até 1999 foram depositadas 239 patentes sobre própolis. Até o final da década de 80 as patentes eram dominadas pela antiga URSS e seus países satélites, principalmente a Romênia (PEREIRA; SEIXAS; NETO, 2002).

De acordo com dados obtidos na base de dados LATIPAT, no site do Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), até o mês de maio de 2008 já tinham sido depositadas 530 patentes referentes a própolis. Desse total, 142 patentes são japonesas, sendo que a primeira patente deste país surgiu em 1987 (CHO; TORII, KANAMORI, 1987). Como exemplos de patentes japonesas, podem ser citadas as patentes sobre o isolamento e aplicação do composto antitumoral da própolis brasileira produzida nos estados de São Paulo e Minas Gerais, Artepillin C (3,5-diprenil-4- ácido hidroxicinâmico) (ARAI et al., 1998); aplicação do composto 3,5-diprenil-4- ácido hidroxicinâmico isolado e/ou seu sal como agente controlador do processo de apoptose (KIMOTO et al., 1998) e o processo de obtenção de extrato de própolis desodorizado (SHIBUYA et al., 2000).

Em relação ao Brasil, a primeira patente surgiu somente em 1995 para o uso em tratamento odontológico, na prevenção de cáries e gengivites. Até 1999 o Brasil possuía apenas três patentes, menos de 2% de todas as patentes depositadas (PEREIRA; SEIXAS; NETO, 2002). Esse número aumentou para 27, em maio de 2008, de acordo com a base de dados LATIPAT, no site do INPI (INPI, 2008). Como exemplos, podem ser citadas patentes sobre a implementação de caixas coletoras de própolis (CARVALHO, 1997), a utilização de dispositivo coletor de própolis acoplado à colméia de abelhas (TZIORTZIS, 2002), o processo de obtenção de própolis em solução aquosa (ITICE, 2001), obtenção de extratos e avaliação da atividade antifúngica (PEREIRA; CARVALHO, 2006; ESTIVALET et al., 2007), formulações de própolis para uso odontológico (MARCUCCI, 2003) e o processo de identificação de tipagens da própolis brasileira (MARCUCCI, 2005).

2.1.4 Publicações

O primeiro trabalho científico sobre as propriedades químicas da própolis, indexado no *Chemical Abstracts* (referência nº 192) surgiu em 1908. No Brasil a primeira publicação sobre o assunto ocorreu somente em 1981. Em pouco mais de 90 anos, o número de trabalhos publicados citados no *Chemical Abstracts* totalizou 450, oriundos de 39 países dos cinco continentes. Houve um crescimento quase exponencial do número total de publicações sobre a própolis nos últimos anos. Apesar da posição de destaque na produção e comércio da própolis, e de possuir a quinta maior produtividade científica no assunto, a atividade de pesquisa no Brasil não reflete em número, nem em conteúdo, o interesse internacional que a própolis brasileira possui, principalmente para os japoneses (PEREIRA; SEIXAS; NETO, 2002).

2.1.5 Composição química da própolis

A composição química da própolis é determinada principalmente pelas características fitogeográficas existentes ao redor da colméia (KUMAZAWA; HAMASAKA; NAKAYAMA, 2004). Entretanto, a sua composição também varia sazonalmente em uma mesma localidade (SFORCIN et al., 2000) e entre amostras de própolis coletadas em uma mesma região, por diferentes raças de *Apis mellifera* (SILICI; KUTLUCA, 2005).

A composição química da própolis pode conter de 50 a 60% de resina, 30 a 40% de cera, 5 a 10% de óleos essenciais, 5% de pólen, além de microelementos como alumínio, cálcio, estrôncio, ferro, cobre, manganês e quantidades traços de vitaminas B1, B2, B6, C e E (GHISALBERTI, 1979; MARCUCCI, 1995). Estudos específicos sobre a composição química da própolis eram raros até 1969, provavelmente devido à falta de técnicas apropriadas de separação e análise (GHISALBERTI, 1979). Porém, atualmente mais de 300 compostos já foram identificados. O maior grupo de compostos isolados da própolis são os flavonóides, os quais junto com os ácidos carboxílicos modificados são

denominados de componentes estratégicos, pois são responsáveis pela bioatividade contra vários microrganismos patogênicos (BURDOCK, 1998).

Análises de própolis oriundas do Brasil e da Venezuela confirmaram a presença de compostos incomuns, além dos flavonóides, como por exemplo, os derivados do ácido cinâmico e seus ésteres e os diterpenos (TOMÁS-BARBERÁN et al., 1993; MARCUCCI, 1995; BANKOVA et al. 1995; MARCUCCI, 1996; BANSKOTA; TEZUKA; PRASAIN, 1998; PEREIRA; SEIXAS; NETO, 2002; SALATINO et al., 2005). Embora a composição química da própolis seja um dado extremamente importante, suas atividades farmacológicas distintas podem também decorrer do sinergismo entre seus diversos compostos químicos (KROL et al., 1993).

De acordo com Adelman (2005), a própolis possui uma composição química bem heterogênea e complexa, sendo possível encontrar os diversos grupos químicos descritos abaixo:

- hidrocarbonetos superiores (penta-, hexa-, nonacosanoshexanos);
- álcoois (cinâmicos, fenetílico, prenílico, isobutenol, benzílico);
- ácidos alifáticos (acético, angélico, butírico, fumárico, isobutírico, metilbutírico) e derivados de ésteres (acetatos de isobutila, isopentila e isopentelina);
- ácidos aromáticos (benzóico, caféico, cinâmico, cumáricos (orto, para e meta), ferúlico, gálico, salicílico, 3-4-dimetoxicinâmico, gentísico, hidroxicinâmico, isoferúlico, vanílico) e derivados de ésteres aromáticos (acetato de benzila, benzoato de benzila, cafeato de benzila, cumarato de benzila, cafeato de fenil etila, ferulato de prenila, salicilato de benzila, cafeato de butenila, cafeato de butila, cafeato de cinamila, cafeato de butila, benzoato de etila, benzoato de metila, salicilato de metila; ésteres do ácido cafeico com álcoois graxos de cadeia longa - dodecanol, tetradecanol, tetradecenol, hexadecanol);
- ácidos graxos superiores típicos de ceras (araquídico, behênico, cerótico, lignocérico) e usuais (palmítico, oleico, láurico, mirístico) e seus ésteres (hexacosilhexadecanoato);
- aldeídos (benzaldeído, aldeído capróico, vanilina, isovanilina, p-hidroxibenzaldeído);
- cetonas (acetofenona e seus derivados);

- flavonas e flavonóis (acacetina, apigenina, apigenina-7-metil éster, crisina, galangina, galangina-3-metil éster, quercetina, canferol, tectocrisina, canferide; 3,7,4',5'tetrametil éter da quercetina);

- flavanonas (naringenina, pinobanksina, pinobanksina-3-acetato, pinobanksina-3-butirato, pinobanksina-3-metil éter, pinocembrina, pinostrobina);

- chalconas e diidrochalconas (naringenina, pinobanksina, pinobanksina-3-acetato, pinocembrina, pinostrobina);

- terpenóides (farnesol, geraniol, cimeno, limoneno, estireno, naftaleno, β -bisabolol, 1,8-cineol, derivados de clerodane, derivados do labdane, β -amirin, sesquiterpenóides, ledol, spatulenol, germacren);

- esteróides (acetatos de estigmasterol e calinasterol);

- aminoácidos (alanina, β -alanina, ácido α -aminobutírico, ácido- δ -aminobutírico, arginina, asparagina, ácido aspártico, cistina, cisteína, ácido glutâmico, glicina, histidina, hidroxiprolina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, ornitina, fenilalanina, prolina, ácido piroglutâmico, sarcosina, triptofano, valina, serina, treonina, tirosina);

- açúcares (D-ribofuranose, D-frutose, D-glucitol, D-glucose, talose, sacarose, xilitol, xilose, galactose, manose, ácido galacturônico, lactose, maltose, melibiose, eritritol e inositol);

- lignanas (sesamina, aschantina, sesartenina, dihidrobenzofuran);

- vitaminas (A, B1, B2, B6, C e E);

- minerais (sódio, potássio, magnésio, bário, estrôncio, cádmio, chumbo, cobre, manganês, ferro, cálcio, vanádio, silício, alumínio, níquel, zinco, cromo, titânio, prata, molibdênio, cobalto).

Em termos de ação farmacológica, a principal classe de constituintes da própolis é a dos compostos fenólicos. Essas substâncias caracterizam-se pela presença de pelo menos um grupo hidroxila ligada diretamente a um anel aromático (figura 1).

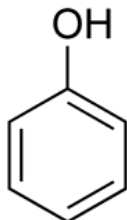
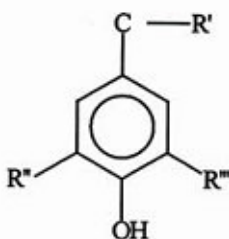


Figura 1 - Estrutura química de um fenol, o mais simples dos compostos fenólicos
Fonte: BRAVO (1998)

Existem diversas classes de compostos fenólicos que ocorrem de maneira universal nas plantas vasculares e que podem desempenhar importantes papéis na biologia dos animais, principalmente nos fitófagos. Como exemplos, podem-se citar os ácidos fenólicos e os flavonóides.

Os ácidos fenólicos podem ser divididos em três classes: os derivados substituídos do ácido benzóico, constituídos por um núcleo básico hidroxifenilpropenóico tipicamente C6-C1 (figura 2); os derivados do ácido cinâmico, com estruturas C6-C3, geralmente esterificados com álcool etílico ou benzílico, e a terceira classe engloba as cumarinas, que são derivadas do ácido cinâmico por ciclização da cadeia lateral do ácido *o*-cumárico (NOTHENBERG, 1997).

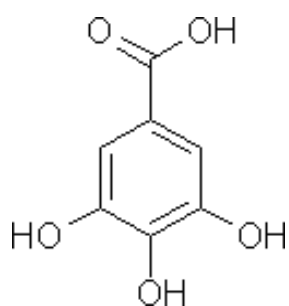


$R' = -OOH$ (ácidos benzóicos); $=CH-COOH$ (ácidos cinâmicos)

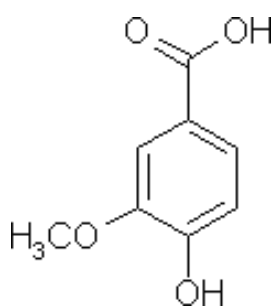
$R'', R''' = -H; -OH; -OCH_3$

Figura 2 - Núcleo básico hidroxifenilpropenóico dos ácidos fenólicos
Fonte: Adelman (2007)

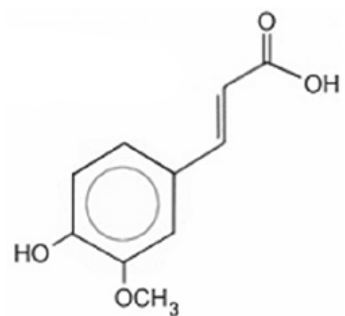
A figura 3 mostra a estrutura química de alguns exemplos de compostos fenólicos, vários deles comuns em produtos apícolas, como os ácidos gálico, vanílico, ferúlico, *p*-cumárico, CAPE, caféico e siríngico (SOARES, 2002).



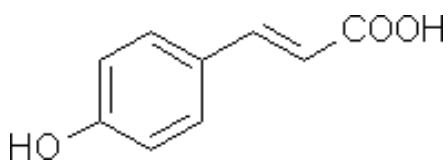
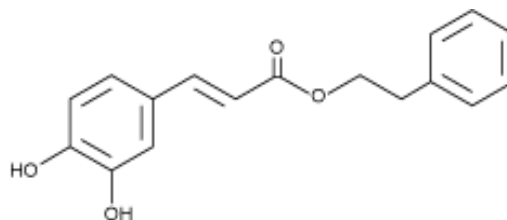
Ácido Gálico



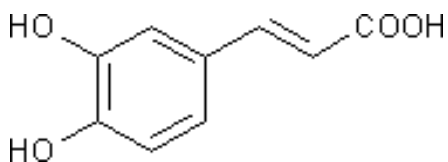
Ácido Vanílico



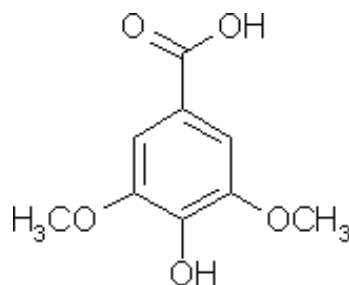
Ácido Ferúlico

Ácido *p*-cumárico

Ácido cafeico fenetil éster - CAPE



Ácido Caféico



Ácido Siríngico

Figura 3 - Estrutura química de alguns compostos fenólicos encontrados em própolis
Fonte: SERRA BONVEHÍ et al. (2001)

Os flavonóides compõem uma ampla classe de substâncias de origem natural, cuja síntese não ocorre na espécie humana. São substâncias aromáticas com 15 átomos de carbono no seu esqueleto básico, sendo compostos fenólicos C6-C3-C6, onde os dois anéis C6 são necessariamente aromáticos (anéis A e B) e conectados por uma ponte de três carbonos que geralmente contém um átomo de oxigênio (anel C) (Figura 4) (LOPES et al., 2000).

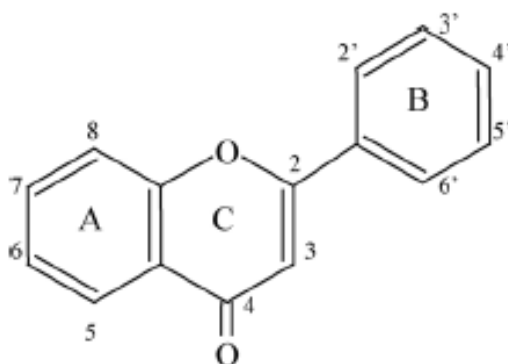


Figura 4 - Núcleo básico de um flavonóide, sendo composto por dois anéis aromáticos (A e B) e um anel intermediário (C)

Fonte: ADELMANN (2007)

Os flavonóides, de acordo com as suas características químicas, são separados em diversas classes tais como: flavonas, flavonóis, dihidroflavonóides (flavanonas e flavanonóis), antocianidinas, isoflavonóides, auronas, neoflavonóides, biflavonóides, catequinas e seus precursores metabólicos conhecidos como chalconas e podem ocorrer como agliconas, glicosilados e como derivados metilados (HAVSTEEN, 2002). Atualmente, já foram identificadas mais de quatro mil substâncias pertencentes ao grupo dos flavonóides (PETERSON; DWYER, 1998).

A figura 5 mostra estruturas de flavonóides comumente encontrados em própolis: a quercetina, miricetina e a galangina são flavonóis; a apigenina, a crisina e o canferol são exemplos de flavonas e a pinocembrina e a naringenina são flavanonas (CUSHINE; LAMB, 2005).

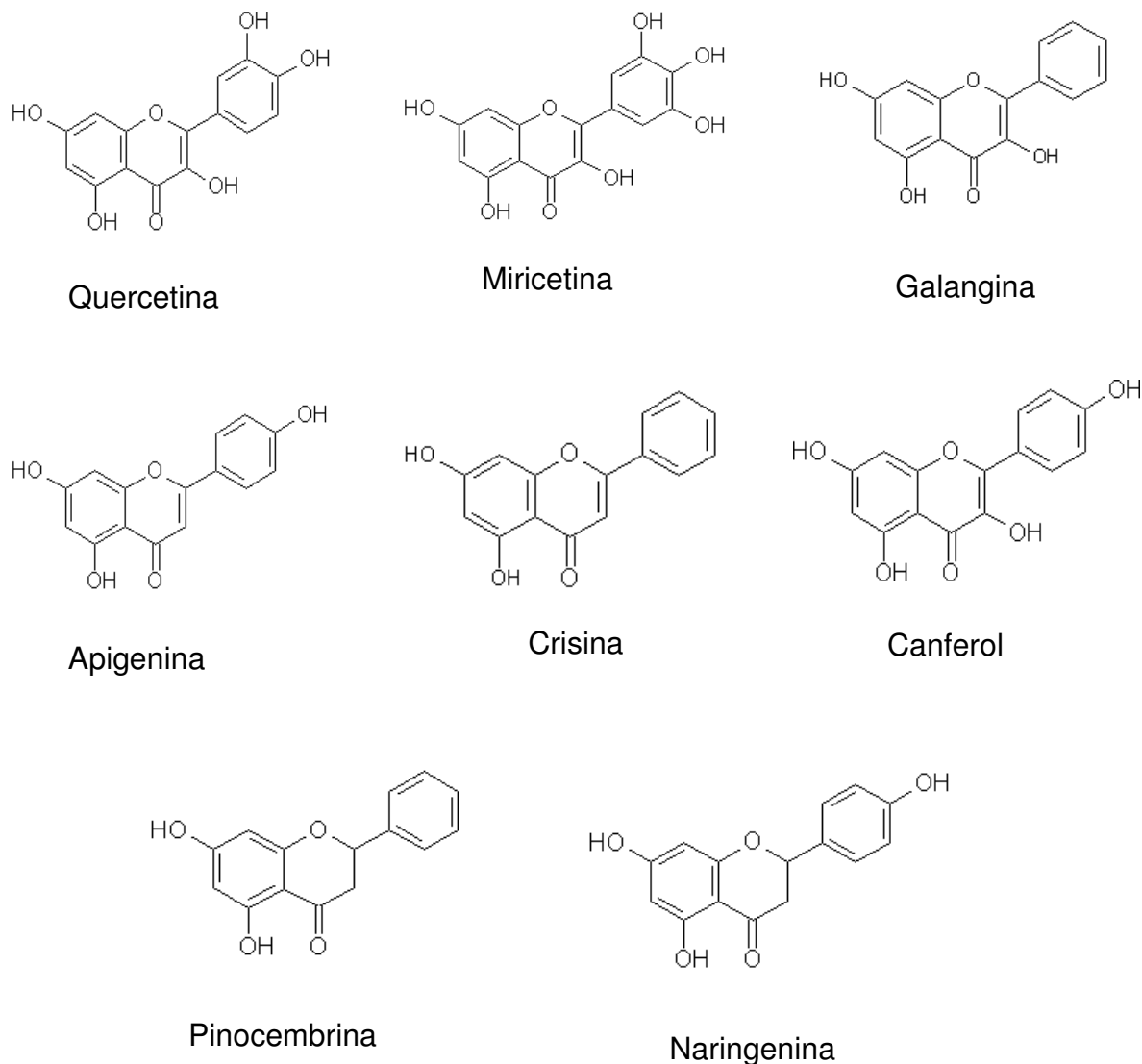


Figura 5 - Estrutura de alguns flavonóides comumente encontrados em própolis
 Fonte: PUBMED (2008)

2.1.6 Compostos isolados e identificados de própolis

Vários trabalhos sobre o isolamento e identificação de compostos têm demonstrado a diversidade de compostos biologicamente ativos da própolis. Como por exemplo, Aga et al. (1994) isolaram três ácidos com atividade antimicrobiana: ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico, ácido 3-prenil-4-dihidroxicinamoxicinâmico e ácido 2,2-dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano. Ácidos diterpênicos, típicos de algumas

espécies de Araucária, também foram isolados de própolis e apresentaram atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* (BANKOVA; NIKOLOVA; MARCUCCI, 1996). Os terpenóides, tais como o tri, o sesqui, o di e os pentacíclicos também são frequentemente encontrados e isolados de própolis brasileiras (SALATINO et al., 2005). Em amostras provenientes de Teresina – PI foram encontrados seis triterpenóides derivados do cicloartano inéditos em própolis (ácido mangiferólico, ácido isomangiferólico, ácido mangiferônico, 24-metileno-cicloartano-3 β ,26-diol, ácido ambólico e ácido ambônico) (SILVA et al., 2005). Triterpenóides pentacíclicos foram obtidos de extratos clorofórmicos de própolis provenientes da região sudeste do Brasil (NEGRI; SALATINO; SALATINO, 2003; TEIXEIRA et al. 2006).

A própolis proveniente do Estado de Minas Gerais teve seu extrato etanólico analisado por cromatografia líquida de alta eficiência, sendo identificados 24 compostos, sendo 5 flavonóides (isosacuranetina, pinocembrina, dihidrokamferide, camferide e betuletol); 3 compostos fenólicos ((+)-treo-1-C-guaiacilglicerol, ácido 3,4-dihidroxibenzóico e 3-metoxi-4-hidroxibenzaldeído (vanilina)); 6 ácidos cafeoilquínicos (ácido 3-cafeoilquínico (ácido clorogênico), ácido 4-cafeoilquínico, ácido 5-cafeoilquínico, ácido 3,4-dicafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico, ácido 4,5-dicafeoilquínico); 10 derivados do ácido cinâmico (ácido 4-hidroxicinâmico (ácido p-cumárico), ácido 3-(4-hidroxifenil) propanóico (ácido 2,3-dihidro-p-cumárico), ácido 3,4-dihidroxicinâmico (ácido cafeico), ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico (drupanina), ácido 3-prenil-4-(2,3-dihidrocinaoiloxi) cinâmico, ácido 3-prenil-4-(2-metilpropioniloxi) cinâmico, ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (artepilina C), ácido 3-(2,2-dimetil-8-prenil-2H-1-benzopiran-6-il)-2-propenóico, sendo dois novos compostos: ácido (E)-3-(2,2-dimetil-3,4-dihidro-3-hidroxi-8-prenil-2H-1-benzopiran-6-il)-2-propenóico e ácido (E)-3-[2,3-dihidro-2-(1-hidroxi-1-metiletil)-7-prenil-benzofuran-5-il]-2 propenóico) (TAZAWA et al., 1998).

As benzofenonas polipreniladas também já foram encontradas em amostras de própolis da Venezuela (TOMÁS-BARBERÁN et al. 1993). Estes compostos também foram identificados na própolis vermelha cubana (CUESTA RUBIO et al., 1999; HERNANDÉZ et al., 2005) e em amostras de própolis provenientes da Venezuela (TRUSHEVA et al., 2004).

Uzel et al. (2005) analisaram quatro amostras de própolis da Anatólia e verificaram por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas a presença dos flavonóides pinocembrina, pinostropina, isalpina, pinobanksina, quercetina, narigenina, galangina e crisina. Vários flavonóides já foram encontrados na própolis vermelha brasileira. Alencar et al. (2007) identificaram outros 20 compostos na própolis vermelha de Alagoas, sendo que sete deles (metil-o-arselinato; metil abietato; 2,4,6-trimetilfenol; homopterocarpina; medicarpina; 4',7-dimetoxi-2'-isoflavonol e 7,4'-diidroxiflavona) foram identificados pela primeira vez em amostras de própolis brasileiras. Pelo menos 3 isoflavonóides, tais como a homopterocarpina, medicarpina e 4',7-dimetoxi-2'-isoflavonol apresentaram-se como os compostos majoritários. A própolis vermelha produzida no Brasil tem uma composição química similar a um tipo específico de própolis vermelha cubana, produzida na província de Pinar Del Rio. Ambas não contêm benzofenonas, mas possuem em comum dois isoflavonóides, a medicarpina e a homopterocarpina (PICCINELLI, et al., 2005; ALENCAR et al., 2007) e duas isoflavonas, a formononetina e a biochanina (PICCINELLI et al., 2005). Além destes compostos, outros 7 isoflavonóides foram encontrados nesta amostra de própolis cubana sendo três isoflavanas e outras quatro pterocarpanas. Trusheva et al. (2006) também observaram a presença de isoflavonóides na própolis vermelha. Além destes autores, Oldoni (2007) identificou dois isoflavonóides metilados de alta atividade antioxidante da própolis vermelha brasileira. Um deles, identificado como vestitol, também já foi isolado da própolis vermelha cubana (PICCINELLI et al., 2005).

No trabalho de Silva et al. (2005) foram isolados seis triterpenóides da própolis proveniente de Teresina – PI. Utilizando-se da combinação das técnicas de cromatografia em coluna de sílica gel e cromatografia em coluna de Sephadex LH-20, os autores obtiveram seis triterpenóides derivados do cicloartano, inéditos em própolis. Por meio da análise dos espectros de ressonância magnética nuclear (RMN), os compostos foram identificados como ácido isomangiferólico, ácido mangiferólico, ácido mangiferônico, 24-metileno-cicloartano-3 β ,26-diol; ácido ambólico e ácido ambônico. Os autores concluíram que, por estes compostos terem sido isolados e identificados anteriormente em cascas de caule de *Mangifera indica*, esta espécie pode ter sido utilizada para a coleta do material usado na elaboração da própolis em estudo.

Recentemente Li et al. (2008) isolaram 42 compostos da própolis vermelha brasileira com o objetivo de avaliar a atividade citotóxica, sendo identificados 38 flavonóides e 3 lignanas. Dos 38 flavonóides, foram encontrados 10 flavanóides, 1 flavonol, 7 isoflavonas, 4 isoflavanonas, 4 isoflavanas, 4 chalconas, 1 auronol, 5 pterocarpanas, 1 arilbenzofurano, e 1 neoflavonóide.

2.1.7 Estratégias para a obtenção de compostos puros e biologicamente ativos da própolis

Um dos fatores de extrema importância para a descoberta de princípios ativos naturais consiste, principalmente, na interação entre a química e a farmacologia. Quanto mais estreita for esta colaboração, mais consistentemente serão alcançados os objetivos almejados (CECHINEL; YUNES, 1998).

A análise de substâncias ativas é complexa e longa, já que geralmente os compostos presentes em menor proporção em produtos naturais são os que apresentam melhores efeitos biológicos (CECHINEL e YUNES, 1998). Neste sentido, torna-se indispensável analisar a potência das frações, sub-frações e das substâncias puras dos extratos. Este procedimento, chamado de monitoramento bioguiado, permite prever se o principal componente químico responsável pela atividade biológica foi realmente determinado.

Quando se procura obter substâncias ativas de produtos naturais, o primeiro aspecto que deve ser observado consiste na preparação do extrato (CECHINEL e YUNES, 1998). Existem várias metodologias descritas para a preparação de extratos de produtos naturais, visando o isolamento de seus constituintes químicos. Um dos métodos considerado o mais adequado para a análise químico-farmacológica de própolis é a preparação de extratos hidroalcoólicos (KUMAZAWA et al., 2002; DUARTE et al., 2003; SAWAYA et al., 2004; TRUSHEVA et al., 2004; UZEL et al., 2005; CASTRO et al., 2007; ALENCAR et al., 2007; SILVA et al., 2007). Park et al. (1998) avaliaram várias concentrações de etanol como solvente e concluíram que o extrato etanólico a 80% (v/v) foi o que apresentou maior eficiência de extração de compostos fenólicos.

Posteriormente, o extrato pode ser submetido a um processo de partição líquido-líquido, com solventes de polaridades crescentes, como hexano, clorofórmio, diclorometano, acetato de etila e butanol, visando a separação das substâncias através de suas polaridades (CUSTÓDIO et al., 2000; MACIEJEWICZ, 2001; DUARTE et al., 2003; HAYACIBARA et al., 2005; ALENCAR et al., 2007). No sentido de se identificar os princípios ativos, todos os extratos semi-puros devem ser testados e aquele que apresentar efeito biológico de interesse, deve ser submetido aos procedimentos cromatográficos para o isolamento e purificação.

Diferentes técnicas cromatográficas podem ser empregadas. A princípio, é geralmente empregada a cromatografia em coluna aberta, com sílica-gel como fase estacionária (KUMAZAWA et al., 2002; TRUSHEVA et al., 2004; PICCINELLI et al., 2005; SILVA et al., 2005; TRUSHEVA et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2006; OLDONI, 2007; AWALE et al., 2008), podendo ser adaptada para a técnica da coluna seca, na qual se gasta menos solvente e sílica (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1997).

Dependendo do extrato, a coluna pode ser eluída com solventes de polaridade crescente ou por apenas uma única fase móvel, composta por mistura de solventes que deve ser previamente determinada por cromatografia em camada delgada (MACIEJEWICZ, 2001; SAWAYA et al., 2004; TEIXEIRA et al. 2006; OLDONI, 2007). A cromatografia em camada delgada, além de ser utilizada no acompanhamento da purificação também pode ser usada no isolamento de compostos (CCD-preparativa) (PICCINELLI et al., 2005; TRUSHEVA et al., 2006; AWALE et al., 2008). Outros suportes cromatográficos podem ser usados, como, poliamida (MACIEJEWICZ, 2001), Sephadex LH-20 (HERNANDÉZ et al., 2005; SILVA et al., 2005; PICCINELLI et al., 2005) e Amberlite XAD-2 (ALENCAR, 2002; MATSUI et al., 2004; GOMEZ-CARAVACA et al., 2006).

As frações obtidas devem ser reunidas segundo seu perfil cromatográfico, verificado por CCD. As frações reunidas, após terem sua atividade biológica avaliada e se apresentarem bioativas, devem ser novamente submetidas à cromatografia em coluna ou, dependendo da complexidade da mistura, às técnicas cromatográficas especiais, como cromatografia líquida de alta eficiência (KUMAZAWA et al., 2002; PICCINELLI et al., 2005; JIN et al., 2005; OLDONI, 2007).

Uma vez isolados os compostos ativos, deve-se proceder a elucidação estrutural dos mesmos. Uma ferramenta que seria importante para a identificação rápida e eficiente de misturas, consiste no uso de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa, onde grande parte dos componentes de uma mistura pode ser identificada e quantificada (UZEL et al., 2005; TEIXEIRA et al. 2006). O uso em conjunto de técnicas espectrais, como infra-vermelho (IV) e ressonância magnética nuclear (RMN) têm permitido também propor com segurança a estrutura molecular de substâncias naturais (SILVA et al., 2005; TRUSHEVA et al., 2006).

2.1.8 Propriedades biológicas da própolis

Existem vários relatos atribuindo à própolis as mais variadas aplicações na medicina popular e, de fato, os estudos vêm corroborando que a própolis possui um grande potencial terapêutico, principalmente em relação às atividades antimicrobiana, antiinflamatória, cicatrizante, anestésica, antitripanossomal (GHISALBERTI, 1979; BANKOVA; POPOV; MAREKOV, 1989; KHAYYAL; ELGHAZALY; ELKHATIB, 1993; KUJUMGIEV et al., 1999; MARCUCCI et al., 2001; ALENCAR, 2002; MONTPIED et al., 2003, CUNHA et al., 2004, ALENCAR et al., 2007), anticariogênica (PARK et al. 1998a; PARK et al., 1998b; KOO et al., 1999; KOO et al., 2000a; KOO et al., 2000b; ROSALEN et al., 2002; MURATA et al., 2003; DUARTE et al., 2003; HAYACIBARA et al., 2005; CASTRO et al., 2007), antiviral, anticarcinogênica, antioxidante (BURDOCK, 1998; MARCUCCI, 1996; CHEN et al., 1996; BANKSOTA et al., 2000; ALENCAR, 2002; CHEN et al., 2003; NAGAI et al., 2003; ASO et al., 2004; ISHIKAWA et al., 2004; KUMAZAWA; HAMASAKA; NAKAYAMA, 2004; OLDONI, 2007) e fitotóxica (GHISALBERTI, 1979; JOHNSON; EISCHEN; GIANASSI, 1994).

Diversas outras atividades da própolis têm sido descritas, tais como propriedades hepatoprotetoras (LIN et al., 1997; BANKSOTA et al., 2000), analgésica (PAULINO et al., 2003), atividade estrogênica (SONG et al., 2002a), atividade antiangiogênica (SONG et al., 2002b) e regenerativa de cartilagem e ossos, por meio do estímulo na proliferação de condrócitos (CARDILE et al., 2003). Avaliações da atividade

imunomodulatória da própolis foram realizadas e indicaram um incremento no número de linfócitos CD4 e CD8 em camundongos tratados com CAPE (PARK et al., 2004), bem como o estímulo na produção de anticorpos específicos (SFORCIN et al., 2005).

2.1.9 Atividade antibacteriana da própolis

Desde a introdução da penicilina houve aumento significativo no número de classes de antibióticos disponíveis. Infelizmente ocorreu o desenvolvimento da resistência bacteriana contra as diversas classes de antibióticos (GINZBURG et al., 2000), o que tem levado a intensa procura por novos medicamentos. Atenção especial tem sido voltada para os produtos de origem natural, entre eles a própolis.

Durante os últimos anos tem sido relatada a atividade antimicrobiana *in vitro* da própolis e vários autores atribuem essa atividade aos flavonóides, ácidos aromáticos e ésteres. O mecanismo de atividade antimicrobiana é complexo e provavelmente se baseia na inibição da RNA-polimerase bacteriana (BOSIO, 2000), podendo decorrer de um efeito sinérgico entre flavonóides, hidroxiácidos e sesquiterpenos (MARCUCCI, 1995).

A atividade antibacteriana da própolis está diretamente relacionada à sua composição química. Porém, os compostos presentes na própolis variam de acordo com vários fatores, tais como a flora da região estudada, a variedade da abelha rainha e ainda, com a variação sazonal, afetando, por conseqüência, a atividade antibacteriana da própolis. Um desses fatores que contribuem para a variação da atividade antibacteriana da própolis foi observado por Silici e Kutluca (2005). Os autores analisaram a composição química e atividade antibacteriana de três tipos de própolis coletadas por três diferentes raças de abelha *Apis mellifera*, de um único apiário. Como resultado, as amostras de própolis coletadas por *Apis mellifera caucasiana* mostraram maior atividade antibacteriana do que as coletadas por *Apis mellifera anatolica* e *Apis mellifera carnica*.

Com relação ao efeito da variação sazonal, Castro et al. (2007) coletaram amostras de própolis brasileiras tipo 6 e tipo 12, durante 6 meses, e avaliaram a

atividade antibacteriana contra *Streptococcus mutans* Ingbritt 1600. Os resultados encontrados demonstraram que a estação na qual a própolis é coletada influencia sua composição química, resultando em modificações na sua atividade antibacteriana.

A diferença na atividade antibacteriana da própolis em função do local de produção já foi bastante estudada. Foram encontradas variações de atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus sp*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* entre amostras de própolis de Botucatu (SP), Mossoró (RN) e Urubici (SC). A própolis de Botucatu, em São Paulo, foi a mais eficaz contra *S. aureus*, *Enterococcus sp* e *C. albicans*. (FERNANDES et al., 2006). No trabalho de Gonsales et al. (2006) também foi encontrada a maior atividade antibacteriana para as amostras de própolis do estado de São Paulo, quando comparadas à atividade das própolis provenientes de Goiás e Paraná.

Devido a excelente qualidade da própolis brasileira, o que faz do Brasil um dos maiores exportadores deste produto (PEREIRA; SEIXAS; NETO, 2002), várias própolis de outros países têm sua atividade antibacteriana comparada à atividade de amostras produzidas no Brasil. Como exemplos têm-se a própolis da Coréia (CHOI et al., 2006), da Anatólia (UZEL et al., 2005), da Turquia (BASIM; BAIM; ZCAN, 2006), da Bulgária (SALOMÃO et al., 2004) e da Argentina (ISLA et al., 2005), sendo que, na maioria dos casos, a própolis brasileira apresentou maior potencial antibacteriano.

Não somente o extrato bruto da própolis brasileira possui atividade antibacteriana, mas também as frações obtidas destes extratos. Isto foi verificado por Duarte et al. (2003), trabalhando com a própolis brasileira tipo 6 e Hayacibara et al. (2005) com as própolis tipo 3 e tipo 12, avaliando o efeito inibitório das frações destas própolis na atividade das glucosiltransferases (GTFs) e no crescimento e aderência de *Streptococcus mutans*. Como resultado destes dois trabalhos foi demonstrado o grande potencial anti-cárie dos três tipos de própolis brasileiras, principalmente a fração hexânica de cada uma delas. O efeito do fracionamento da própolis vermelha também foi avaliado por Alencar et al. (2007). Os autores testaram a atividade antibacteriana das frações hexânica e clorofórmica contra *Staphylococcus aureus* ATTC 25923 e *Streptococcus mutans* UA 159 e observaram que a atividade antibacteriana da própolis vermelha se concentrou na fração clorofórmica.

Vários autores têm estudado a atividade antibacteriana de compostos isolados encontrados em própolis. Como exemplos, Koo et al. (2002) avaliou a habilidade de 30 compostos puros inibirem a atividade de glucosiltransferases produzidas por *Streptococcus mutans*. Entre os flavonóides, derivados do ácido cinâmico e terpenóides avaliados, compostos comumente encontrados em própolis, o *tt*-farnesol e a apigenina foram os que apresentaram os melhores resultados. O CAPE (éster fenetílico do ácido caféico) também teve sua atividade avaliada contra *Helicobacter pylori*, sendo capaz de inibir seu crescimento numa concentração de 25 µg/mL (LATIF et al., 2005).

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Coleta do material

As amostras de própolis foram obtidas de coletores colocados nas caixas de abelhas *Apis mellifera*, em março de 2005, em um apiário localizado na cidade de Marechal Deodoro, Estado de Alagoas.

2.2.2 Tratamento da amostra de própolis *in natura*

A amostra de própolis bruta foi limpa retirando-se a poeira, pedaços de madeira, abelhas mortas, traças e qualquer outro tipo de material estranho. Em seguida, foi triturada mediante a adição de nitrogênio líquido, homogeneizada, pesada e armazenada a -18°C.

2.2.3 Preparo do extrato etanólico da própolis (EEP)

Para o preparo do extrato etanólico de própolis (EEP) foram pesados 100 gramas de própolis triturada, obtidos conforme o item 2.2.2, e transferidos para um frasco de vidro contendo 400 mL de etanol 80% (v/v). A extração foi feita a 70°C, em banho de água termostaticado, por 30 minutos, sob agitação constante. Em seguida realizou-se a filtração em papel de filtro e o Extrato Etanólico de Própolis (EEP) foi transferido para um frasco de vidro com tampa de rosca. O EEP obtido foi utilizado no fracionamento, conforme ilustrado na figura 6.

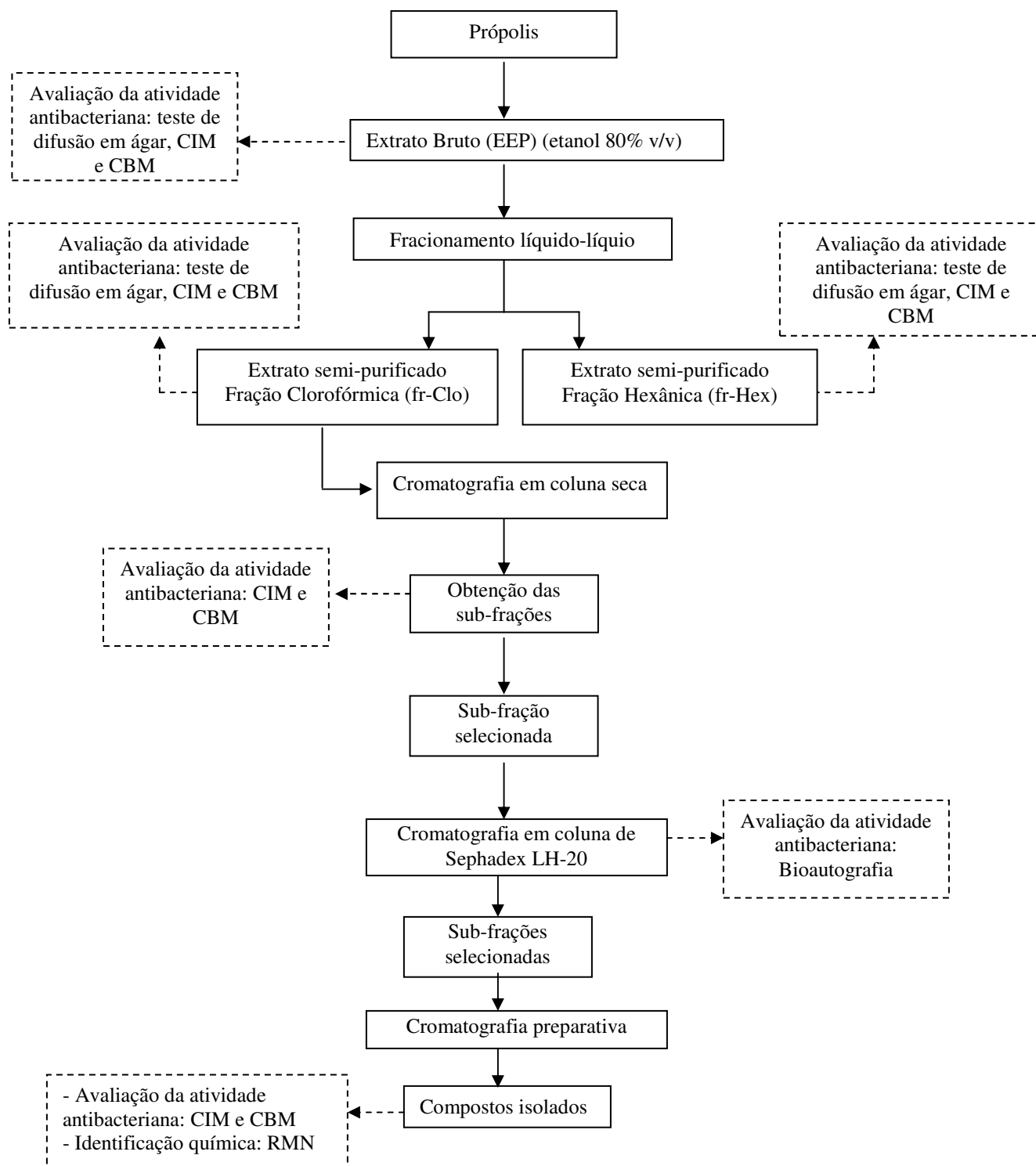


Figura 6 - Fluxograma do fracionamento e isolamento bioguiado de compostos com atividade antibacteriana da própolis vermelha

2.2.4 Fracionamento líquido-líquido do extrato etanólico da própolis

O fracionamento do EEP pela técnica de extração líquido-líquido foi feito pela partição em série, em funil de separação, com os solventes hexano e clorofórmio. As frações hexânica (fr-Hex) e clorofórmica (fr-Clo) obtidas foram concentradas a 60°C, em rotaevaporador, e submetidas às análises físico-químicas e microbiológicas.

2.2.5 Fracionamento e purificação da fração clorofórmica

2.2.5.1 Cromatografia em coluna seca

A pré-purificação da fração clorofórmica foi realizada utilizando-se a cromatografia em coluna seca, por meio de uma coluna de celulose de 20 cm de comprimento e 3 cm de diâmetro interno. A celulose foi escolhida por ser flexível, resistente, inerte aos solventes utilizados e transparente a luz natural e ultravioleta. Primeiramente a coluna foi tratada com hexano, para remoção da camada oleosa de proteção. Em seguida, a extremidade inferior foi fechada e empacotada deixando-se o adsorvente cair de uma altura de 20 cm. Logo após foi realizada uma pressão com os dedos para aumentar o empacotamento.

A amostra foi preparada pesando-se 1,0 g da fração clorofórmica concentrada, e após ser redissolvida em 5 mL de clorofórmio, foi misturada imediatamente a 2,5 gramas de sílica-gel 60 (MERCK). Na sequência foi feita a evaporação do solvente em rotaevaporador a 45°C, para obtenção de uma mistura da fração clorofórmica e sílica em forma de pó fino. A amostra adsorvida à sílica foi colocada no topo da coluna e, em seguida acrescentada a fase móvel, composta de 70% de clorofórmio e 30% de acetato de etila, até que a linha de frente atingisse a base da coluna. Após o desenvolvimento, a coluna foi avaliada sob luz natural e luz ultravioleta a 366 nm. Nas faixas onde apareceram os adsorvatos separados, foram feitas delimitações que em seguida foram cortadas com uma lâmina afiada. As fatias cortadas foram solubilizadas com metanol. As sub-frações foram então filtradas em papel de filtro e logo após foi realizada a cromatografia em camada delgada. As placas foram reveladas com anisaldeído sulfúrico a quente.

2.2.5.2 Purificação da sub-fração bioativa da fração clorofórmica

Para a purificação da sub-fração bioativa da fração clorofórmica foi utilizado o gel lipofílico Sephadex LH-20. Para a montagem da coluna, com base na metodologia descrita por Alencar (2002), foram pesados 7,0 g do gel, o qual foi misturado com metanol. A mistura foi então colocada numa coluna e o seu empacotamento foi feito de forma simples, com apenas a força da gravidade. A coluna preenchida com o gel apresentava 30 cm de altura por 1,5 cm de diâmetro.

As sub-frações bioativas obtidas pelo fracionamento em coluna seca foram concentradas em rotaevaporador a 45°C e, então preparadas soluções pela dissolução de 150 mg em 2 mL de metanol. Em seguida foram aplicadas no topo da coluna de gel Sephadex LH-20 e após a total penetração da amostra no gel, foram eluídas com metanol. A vazão da coluna foi de 53 gotas por minuto e as frações foram retiradas a cada 1 minuto e 30 segundos. As sub-frações obtidas foram avaliadas por cromatografia em camada delgada, tendo anisaldeído sulfúrico a quente como revelador, e teste de bioautografia para a determinação das sub-frações bioativas destinadas ao isolamento dos compostos por CLAE-preparativa.

2.2.6 Isolamento dos compostos com atividade antibacteriana

As sub-frações bioativas selecionadas previamente pela coluna de Sephadex LH-20 foram recromatografadas em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) preparativa, utilizando uma coluna preparativa Shimadzu PREP-ODS (H) (250 x 20 mm), para o isolamento dos compostos bioativos. A fase móvel utilizada foi 35% do solvente A (água) e 65% do solvente B (metanol). O gradiente iniciou com 65% do solvente B até 24 minutos, 95% de B de 27 a 30 minutos e 65% de B em 35 minutos, com uma vazão constante de 8 mL/min e temperatura do forno de 30°C. A coleta do compostos foi monitorada por um detector arranjo de fotodiodos (SPD-M10Avp, Shimadzu Co.) operando na faixa de 200 a 400 nm. O comprimento de onda escolhido para a coleta do composto 1 foi 280 nm e para o composto 2 de 383 nm. Os picos dos

compostos eluídos foram recolhidos em um coletor automático de frações (FRC-10A, Shimadzu Co.), acoplado ao sistema de cromatografia.

2.2.7 Análises físico-químicas do EEP, frações, sub-frações e compostos isolados

2.2.7.1 Espectrofotometria na região ultravioleta-visível dos compostos isolados

A determinação do espectro de absorção dos compostos isolados foi realizada segundo o método descrito por Park *et al.* (2000), Ikegaki (2001) e Alencar (2002), com algumas modificações. Alíquotas de 25 µL dos compostos isolados foram diluídos em 30 mL de metanol P.A. e os espectros de absorção na região UV-visível foram determinados na faixa de comprimento de onda de 200 a 500 nm em espectrofotômetro UV-Mini 1240 (Shimadzu-Co).

2.2.7.2 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

As análises por cromatografia em camada delgada foram realizadas em cromatofolhas de sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck Co.). Uma alíquota de 10 µL do EEP, fr-Hex, fr-Clo e sub-frações na concentração de 2 mg/mL foram aplicadas na placa. O tempo de desenvolvimento dos cromatogramas foi de aproximadamente 20 minutos, utilizando-se como fase móvel o sistema de solvente composto por acetato de etila: clorofórmio (3:7, v/v). As cromatoplasmas foram visualizadas sob luz ultravioleta, no comprimento de onda de 366 nm, antes e após a revelação com anisaldeído sulfúrico aquecido a 100°C em estufa, por 5 minutos (OLDONI, 2007).

2.2.7.3 Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR)

As análises por CLAE em fase reversa do EEP, frações, sub-frações e compostos isolados foram feitas de acordo com o método descrito por Park *et al.* (2004) e Alencar *et al.* (2007). Alíquotas de vinte microlitros na concentração 1% foram injetados em um cromatógrafo líquido acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos

a 254 nm e uma coluna de fase reversa C₁₈ (250 x 4,6 mm), com tamanho de partícula de 5 µm. A fase móvel utilizada foi água/ácido acético (19:1, v/v) (solvente A) e metanol (solvente B), com vazão constante de 1 mL/min. O gradiente iniciou com 40% do solvente B até 60% de B em 45 minutos, 90% de B em 60 minutos até 75 minutos e 40% de B em 85 minutos. A coluna foi mantida a uma temperatura constante de 30°C e os cromatogramas foram processados utilizando “software” específico. Neste trabalho foram investigados os seguintes padrões autênticos de flavonóides e ácidos fenólicos (Extrasynthese Co.): quercetina, canferol, apigenina, pinocembrina, crisina, acacetina, galangina, canferide, isosacuranetina, sacuranetina, ramnetina, isorramnetina, rutina, ácido gálico, ácido *p*-cumárico, ácido cinâmico e ácido ferúlico.

2.2.8 Identificação química dos compostos isolados

A identificação química dos compostos isolados foi realizada por meio da técnica de Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Os espectros de RMN foram registrados em espectrômetro Bruker DPX 500 MHz, operando em 500 MHz para o ¹H. Os espectros foram obtidos em CD₃OD (álcool metílico deuterado) utilizando TMS (tetrametilsilano) como padrão interno. Os deslocamentos químicos foram obtidos em δ (ppm) e as constantes de acoplamento (*J*) foram dadas em Hz.

2.2.9 Atividade Antibacteriana *in vitro* do EEP, frações, sub-frações e compostos isolados.

2.2.9.1 Teste de difusão em ágar do EEP e frações

Este teste trata-se de uma prova rápida de susceptibilidade a antimicrobianos, essencialmente qualitativa. O método utilizado foi o descrito por Koo et al. (2000b) e Duarte et al. (2003). Os microrganismos *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus mutans* Ingbritt 1600 e *Actinomyces naeslundii* ATCC 12104 foram reativados a partir das culturas estoque em meio BHI líquido por 18-24 h a 37°C, 10% CO₂ e posteriormente cultivados em placas BHI ágar. Após o crescimento bacteriano, as colônias individuais foram removidas com auxílio de uma alça de platina e

suspendidas em uma solução de NaCl 0,89% estéril. Após a homogeneização, as suspensões bacterianas foram ajustadas para o valor de absorvância de 0,135 a 660 nm em espectrofotômetro que equivale a $1-2 \times 10^8$ UFC/mL. Uma alíquota de 50 μ L de cada suspensão bacteriana foi inoculada em 50 mL de ágar BHI à 45°C, sendo a mistura homogeneizada por meio de um agitador magnético. Após a homogeneização, o meio inoculado foi imediatamente distribuído em placas de Petri.

Foram colocados cinco cilindros de aço-inoxidável esterilizados com 6 mm de diâmetro interno (8 mm de diâmetro externo x 10 mm de espessura x 10 mm de altura) sobre a superfície do ágar semeado, após a total solidificação do meio. Com o auxílio de uma pipeta, um volume de 40 μ L do EEP e suas frações (na concentração de 10% m/v), controle positivo (clorexidina 0,12% m/v) e controle negativo (etanol 80% v/v) foram colocados no interior de cada cilindro. As placas foram mantidas em repouso por 2 horas na temperatura ambiente para permitir a difusão dos extratos e, após esse procedimento, foram incubadas por 24 horas, a 37°C. As zonas de inibição de crescimento bacteriano foram medidas com auxílio de um paquímetro digital, sendo comparadas aos seus respectivos controles. Foram realizadas triplicatas de três experimentos distintos para o EEP e suas frações.

2.2.9.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da CIM foi realizada de acordo com a técnica descrita por Koo et al. (2000b) e Duarte et al. (2003), sendo utilizados tubos com tampa de rosca contendo meio de cultura líquido BHI. Os microrganismos *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus mutans* Ingbritt 1600 e *Actinomyces naeslundii* ATCC 12104 foram inicialmente reativados a partir das culturas estoque em meio BHI líquido por 18-24 h a 37°C, 10% CO₂ e posteriormente cultivados em placas BHI ágar. Após o crescimento bacteriano, as colônias individuais foram removidas com auxílio de uma alça de platina e suspendidas em uma solução de NaCl 0,89% estéril. Após a homogeneização, as suspensões bacterianas foram ajustadas para o valor de absorvância de 0,135 a 660 nm em espectrofotômetro, o que equivale a $1-2 \times 10^8$ UFC/mL.

Um volume de 100 μ L das suspensões bacterianas foram inoculados em 100 mL do meio BHI, de modo a obter uma concentração bacteriana em torno de

$1-2 \times 10^5$ UFC/mL, sendo a mistura homogeneizada através de um agitador magnético. Imediatamente após a homogeneização, um volume de 4960 μ L do inóculo e 40 μ L do EEP, frações e sub-frações (concentrações finais variando entre 800 μ g/mL a 6,25 μ g/mL (com diluição seriada de razão 2), foram acrescentados em cada tubo, resultando em um volume final de 5 mL de solução. Em seguida, os tubos foram agitados e incubados em estufa à 37°C, atmosfera parcial de 10% de CO₂, por 24 horas.

Após a incubação, os tubos foram agitados e a leitura foi feita através de um espectrofotômetro a 660 nm. Foram feitos quatro controles para todos os microrganismos: 1) meio de cultura inoculado de bactéria, com o objetivo de avaliar o crescimento bacteriano; 2) meio de cultura inoculado de bactéria acrescido de 40 μ L de etanol 80% (v/v), como controle negativo; 3) meio de cultura sem inocular, com a finalidade de testar a eficiência da esterilização do meio e 4) meio de cultura inoculado de bactéria acrescido de 40 μ L de clorexidina 0,12% (m/v), como controle positivo. A CIM foi considerada a menor faixa de concentração do EEP, frações e sub-frações em que não houve crescimento bacteriano visível, ou seja, uma leitura de absorvância a 660 nm menor que 0,05.

2.2.9.3 Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Para a determinação da Concentração Bactericida Mínima, segundo a técnica descrita por Koo et al. (2000b) e Duarte et al. (2003), foram utilizadas placas de Petri contendo meio de cultura ágar BHI.

Baseando-se nos resultados obtidos no teste da CIM, foram utilizados como inóculo as suspensões provenientes dos tubos que apresentaram resultado de leitura de absorvância, a 660 nm, inferior a 0,05. Uma alíquota de 50 μ L das suspensões utilizadas no teste da CIM foi inoculada em placas BHI ágar esterilizado. A CBM foi considerada a menor concentração que causa 99,9% de morte celular, ou seja, sem crescimento bacteriano visível sobre o ágar.

2.2.9.4 Atividade antibacteriana pelo método da bioautografia

Para o monitoramento bioguiado das sub-frações, foi realizada a bioautografia de acordo com o método descrito por Ahmad et al. 2007, com algumas modificações. O objetivo da bioautografia foi visualizar quais compostos das sub-frações bioativas apresentavam atividade antimicrobiana contra os microrganismos testados. Então, uma alíquota de 25 µL de cada sub-fração a 1 mg/mL foi aplicada em cromatofolha de sílica gel F₂₅₄ e eluída com a fase móvel composta por 70% de clorofórmio e 30% de acetato de etila. Após a eluição, a placa foi seca para a completa evaporação do solvente, revelada em lâmpada ultravioleta a 254 e 360 nm e armazenada em dessecador até a realização do teste antibacteriano. Uma outra placa foi desenvolvida nas mesmas condições e, além da revelação com a lâmpada de UV foi revelada com anisaldeído sulfúrico a quente, sendo então, referência das substâncias que reagiram ao revelador e não à luz ultravioleta.

Os microrganismos *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus mutans* Ingbritt 1600 e *Actinomyces naeslundii* ATCC 12104 foram reativados a partir das culturas estoque em meio BHI líquido por 18-24 h a 37°C, 10% CO₂ e posteriormente cultivados em placas BHI ágar. Depois do crescimento bacteriano, as colônias individuais foram removidas com auxílio de uma alça de platina e suspensas em uma solução de NaCl 0,89% estéril. Após a homogeneização, as suspensões bacterianas foram ajustadas para o valor de absorbância de 0,135 a 660 nm em espectrofotômetro que equivale a 1-2 x 10⁸ UFC/mL. Uma alíquota de 60 µL de cada suspensão bacteriana foi inoculada em 60 mL de ágar BHI à 45°C, sendo a mistura homogeneizada por meio de um agitador magnético.

Os cromatogramas desenvolvidos foram colocados no fundo das placas de Petri previamente esterilizadas e uma fina camada de meio inoculado (aproximadamente 20 mL), com as respectivas bactérias, foi adicionada sobre os cromatogramas. As placas então foram incubadas a 37°C por 24 horas. As zonas de ausência de crescimento sobre os cromatogramas serviram como norteadores para o isolamento bioguiado dos compostos ativos.

2.2.9.5 Microtécnica para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos compostos isolados

O método da CIM descrito anteriormente no item 2.2.9.2 foi modificado para microtécnica devido a pequena disponibilidade dos compostos isolados. A técnica foi desenvolvida em microplacas de 96 poços, nos quais foram adicionados 190 μL de caldo BHI previamente inoculado com as bactérias conforme descrito no item 2.2.9.2. Em seguida foram adicionados 10 μL dos compostos isolados em concentrações que variaram de 500 a 3,9 $\mu\text{g/mL}$ (diluição seriada de razão 2), como controle positivo foi utilizada a clorexidina 0,12 % (m/v) e como controle negativo foi utilizado o etanol 80% (v/v), solvente utilizado para solubilizar os compostos. As microplacas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Após a incubação foram adicionados 30 μL do corante Resazurina (0,01% m/v) com o objetivo de verificar, por meio de leitura visual, em quais poços houve crescimento bacteriano. Nos poços em que o corante não mudou de cor, ou seja, permaneceu roxo, foi considerada a ausência de bactérias viáveis. Qualquer evidência na mudança da coloração considerou-se crescimento bacteriano.

Para a determinação da CBM, uma alíquota de 10 μL do meio de cultura dos poços considerados inibitórios foram semeados em placas de Petri contendo BHI ágar e incubados a 37°C por 24 horas. A CBM foi considerada como a menor concentração na qual não houve crescimento de colônias na superfície do meio de cultura.

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Coleta das amostras de própolis

As amostras de própolis vermelha foram coletadas em oito cidades localizadas em regiões litorâneas do Estado de Alagoas, conforme descrito na Tabela 1. A coleta foi realizada diretamente nos apiários, onde foi feita a identificação de modo que fosse possível o retorno a cada colméia, caso necessário. O perfil químico dos extratos etanólicos provenientes das 25 amostras foi analisado por cromatografia em camada delgada (CCD), onde foi observado o mesmo padrão de bandas. Desta forma, e com o intuito de se obter um material o mais homogêneo possível, foi escolhido um único apiário fornecedor de própolis vermelha *in natura* localizado no município de Marechal Deodoro-AL (Figura 7). Na figura 8 pode-se observar as características da própolis vermelha nos coletores, enquanto que na figura 9 está ilustrado o aspecto da própolis vermelha *in natura* (A) e após ser triturada com o emprego de nitrogênio líquido (B). A amostra triturada foi utilizada no preparo dos extratos usados nos ensaios.

Tabela 1 - Localidades no estado de Alagoas onde as amostras de própolis vermelha foram coletadas

	Município	Nº de amostras coletadas
Litoral Norte	Maragogi, Matriz de Camarujipe, Ipicoça e Paripueira.	10
Litoral Sul	Barra de São Miguel, Jequiá da Praia, Coruripe e Marechal Deodoro	15



Figura 7 - Aspecto do apiário selecionado como fornecedor de própolis, localizado em Marechal Deodoro – Alagoas



Figura 8 - Aspecto da própolis vermelha *in natura* nos coletores instalados em colméias de abelhas *Apis mellifera*

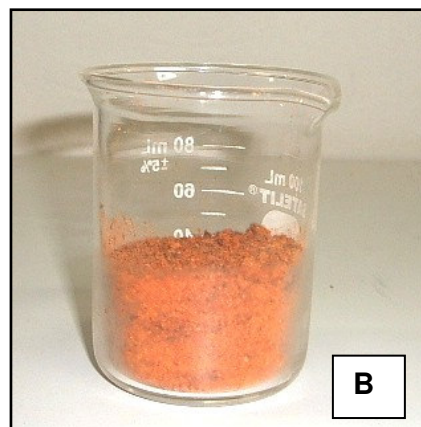


Figura 9 - Amostra de própolis vermelha *in natura* (A) e triturada (B)

2.3.2 Fracionamento do Extrato Etanólico de Própolis (EEP) pela Técnica de Partição Líquido-líquido

O processo de fracionamento do EEP iniciou-se com uma partição líquido-líquido, conforme ilustrado na figura 10, onde foram usados em seqüência os solventes hexano e clorofórmio. A partição líquido-líquido é uma técnica cromatográfica que se baseia nas diferentes solubilidades dos componentes da amostra entre os solventes imiscíveis (COLLINS; BRAGA; BONATO; 1997).

As frações obtidas foram concentradas em rotaevaporador a 60°C, obtendo-se um rendimento de 11,36 gramas para a fração hexânica (fr-Hex) (A) e 30,08 gramas para a fração clorofórmica (fr-Clo) (B). Em seguida, o EEP, a fr-Hex e a fr-Clo foram avaliados quanto a composição química e a atividade antimicrobiana.

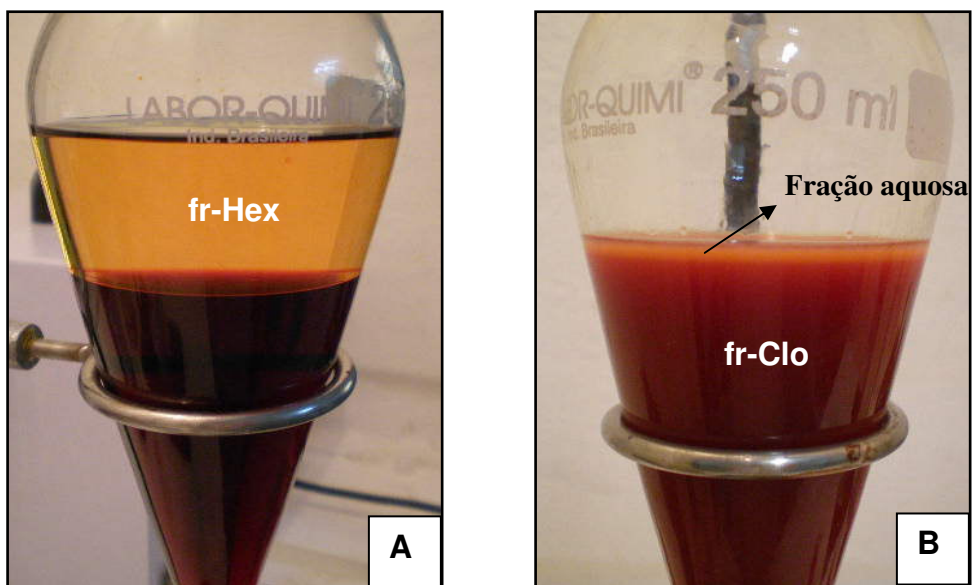


Figura 10 - Aspecto da partição líquido-líquido do EEP com hexano (A) e clorofórmio (B)

2.3.3 Análises físico-químicas do EEP e de suas frações

Os cromatogramas obtidos pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência do EEP e de suas frações demonstraram uma composição química complexa, com vários picos em diferentes tempos de retenção (figura 11).

O processo de fracionamento líquido-líquido originou duas frações quimicamente diferentes. A maioria dos compostos do extrato etanólico bruto se concentraram na fração clorofórmica. Já a fração hexânica apresentou apenas um pico majoritário, cujo tempo de retenção foi de aproximadamente 70 minutos.

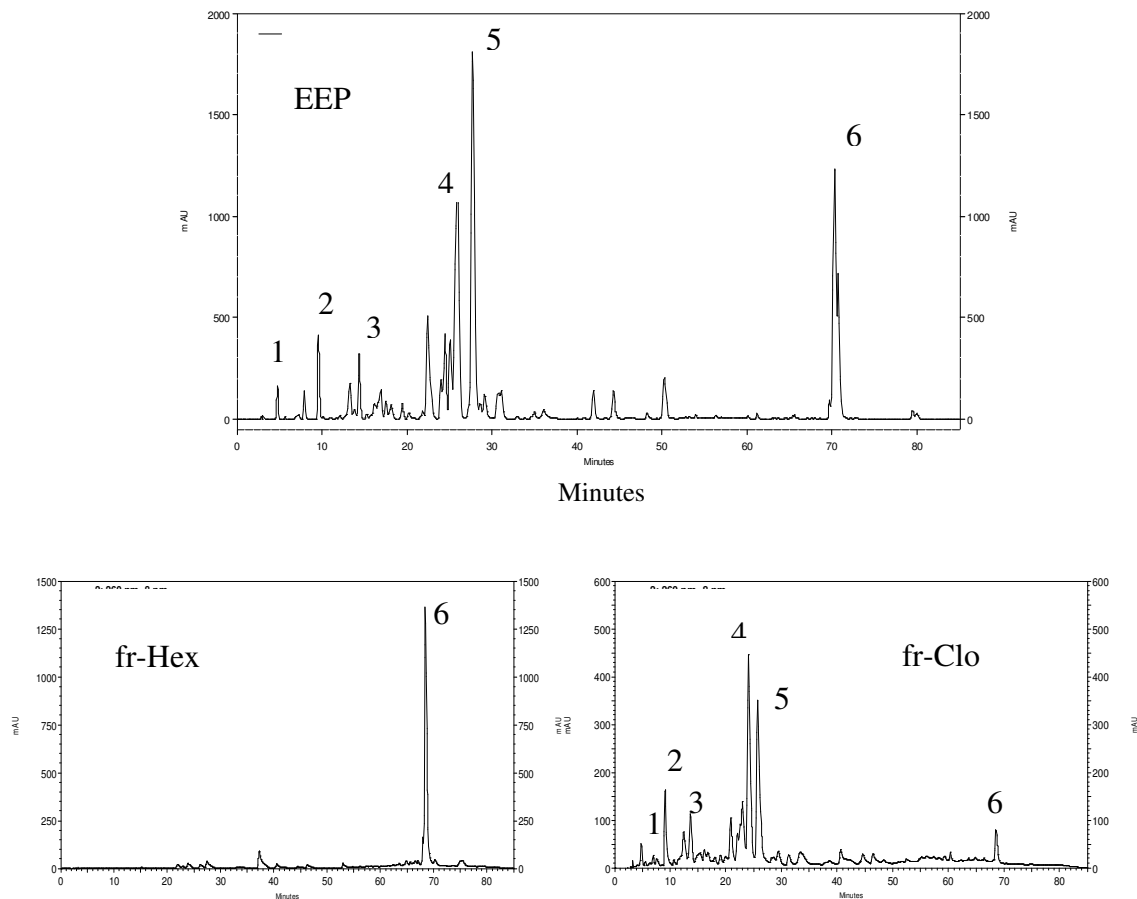


Figura 11 - Cromatogramas obtidos por CLAE do extrato etanólico bruto da própolis vermelha (EEP), da fração hexânica (fr-Hex.) e fração clorofórmica (fr-Clo.). 1, ácido ferúlico; 2, Daidzeína; 3, Quercetina; 4, UV λ 230, 242, 372 nm; 5, formononetina; 6, UV λ 227, 247, 359 nm

Apenas um flavonóide (quercetina), duas isoflavonas (daidzeína e formononetina) e um ácido fenólico (ácido ferúlico) puderam ser identificados no EEP e na fr-Clo, sendo que a maioria dos compostos usados como padrão e comumente encontrados em outros tipos de própolis brasileiras não foi identificada. Estes resultados estão de acordo com os trabalhos de Silva et al. (2007) e Alencar et al. (2007), demonstrando assim que a própolis vermelha se trata de um novo tipo de própolis brasileira.

Analisando o extrato etanólico bruto da própolis vermelha por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM), Alencar et al. (2007) identificaram 20 compostos, sendo que sete deles (metil-o-arselinato; metil abietato; 2,4,6-trimetilfenol; homopterocarpina; medicarpina; 4',7-dimetoxi-2'-isoflavonol e 7,4'-diidroxiflavona) foram identificados pela primeira vez em amostras de própolis brasileiras. Pelo menos 3 isoflavonóides, nunca antes relatadas em própolis, tais como a homopterocarpina, medicarpina e 4',7-dimetoxi-2'-isoflavonol se apresentaram como os compostos majoritários pela técnica de CG-EM.

O EEP, a fração hexânica e a fração clorofórmica foram também avaliados pela técnica de cromatografia em camada delgada (CCD), cujos cromatogramas podem ser observados na figura 12, que ocorreu o fracionamento dos compostos do EEP em duas frações. Na figura 12A, que ilustra a cromatofolha revelada sob luz UV a 366 nm, pode-se verificar que o EEP apresentou um perfil semelhante a fr-Clo e distinto da fr-Hex. Os vários tons de azul nas bandas são características de compostos fenólicos, principalmente da classe dos flavonóides (WAGNER; BLADT; ZGAINSKI, 1984). Quando a cromatofolha foi revelada com anisaldeído sulfúrico a quente (figura 12B), foi possível a visualização no EEP de bandas com tonalidades vermelha, roxo, verde e azul. As bandas roxo, verde e azul foram encontradas no EEP e em maior intensidade na fr- Hex, sendo ausentes na fr-Clo, a qual apresentou apenas as bandas em tons de vermelho características de terpenos, óleos essenciais e antocianinas (WAGNER; BLADT; ZGAINSKI, 1984).

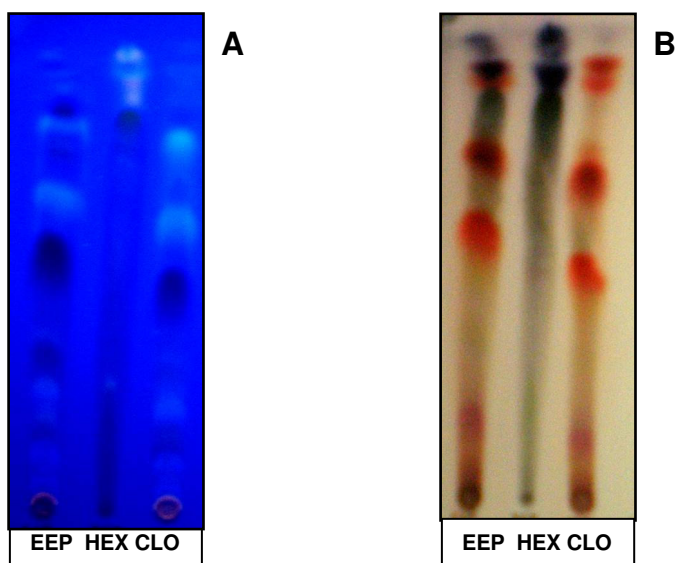


Figura 12 - Cromatograma do EEP, fração hexânica e fração clorofórmica. Na placa A, revelado com lâmpada de ultra-violeta a 360 nm; e na placa B, revelado com anisaldeído sulfúrico a quente

2.3.4 Atividade Antibacteriana *in vitro* do EEP e de suas frações

Por meio do teste de difusão em ágar foi possível verificar, de forma rápida e qualitativa, a atividade antibacteriana da própolis vermelha. O controle negativo utilizado foi o etanol 80% (v/v) enquanto que o controle positivo foi a clorexidina 0,12% (m/v), um antibacteriano de alto poder de ação. Na figura 13 estão ilustradas as placas de Petri com as zonas de inibição em relação ao controle positivo, enquanto que na tabela 2 encontram-se os valores da média dessas zonas em milímetros. De acordo com os resultados foi possível verificar que a atividade antibacteriana ficou concentrada na fração clorofórmica, sendo que as zonas de inibição foram bem maiores que até mesmo as apresentadas pelo EEP (Tabela 2). O solvente utilizado para solubilizar as amostras, etanol 80% (v/v), não inibiu o crescimento das bactérias testadas (Figura 13 e Tabela 2).

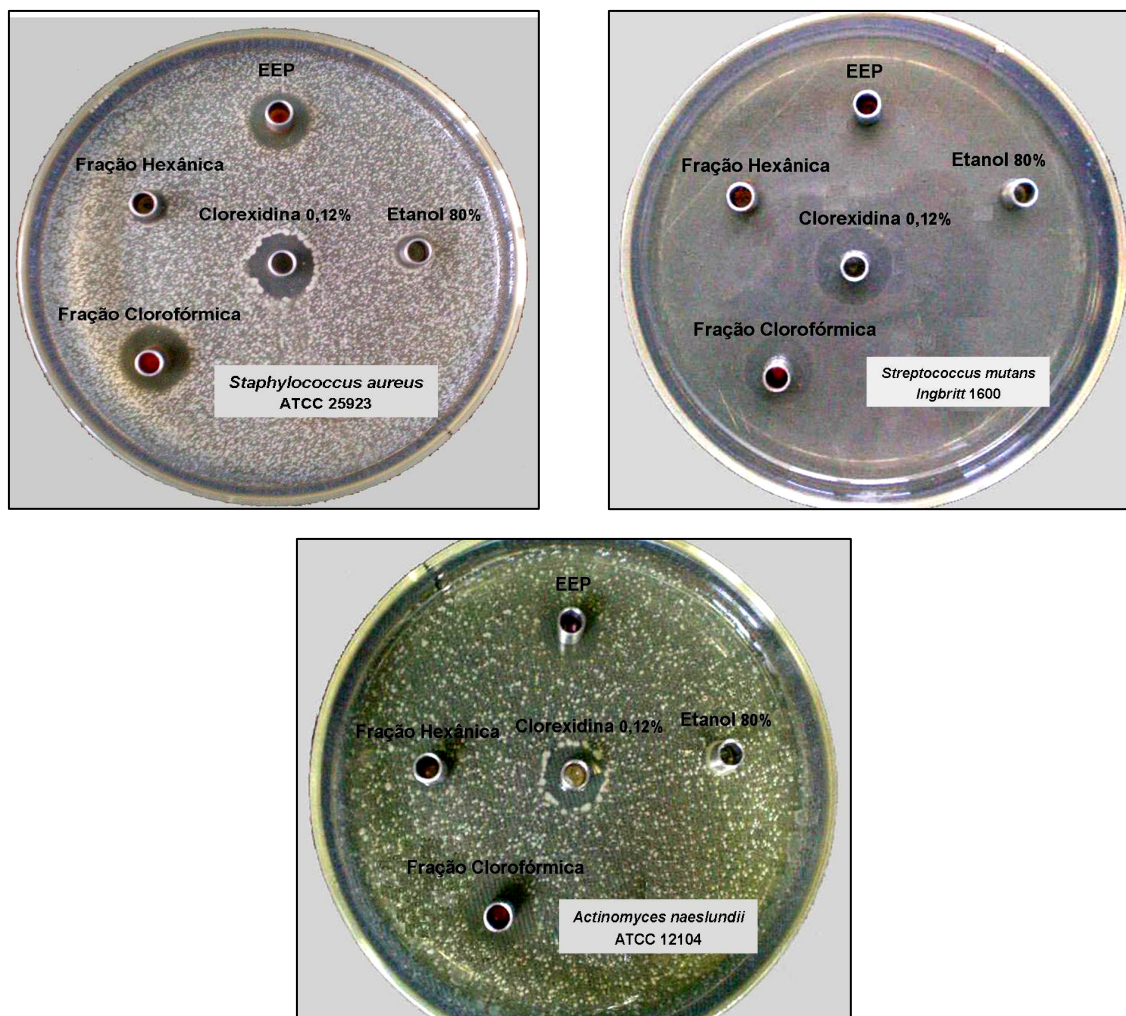


Figura 13 - Teste de difusão em ágar do EEP, fração hexânica e fração clorofórmica

Tabela 2 - Médias das zonas de inibição do crescimento (mm) de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus mutans* Ingbritt 1600 e *Actinomyces naeslundii* ATCC 12104 frente ao EEP, fr- Hex e fr-Clo

Tratamento	<i>S. aureus</i>	<i>S. mutans</i>	<i>A. naeslundii</i>
EEP	4,9 ± 0,5	2,4 ± 0,1	4,6 ± 0,1
Fração Hexânica	2,2 ± 0,7	nd	1,9 ± 0,1
Fração Clorofórmica	5,7 ± 0,4	3,7 ± 0,2	5,5 ± 0,5
Clorexidina 0,12% (controle positivo)	3,4 ± 0,4	4,8 ± 0,2	6,1 ± 0,3
Etanol 80% (controle negativo)	nd	nd	nd

* nd: valor não detectado.

Apesar dos resultados apresentados na tabela 2, é interessante salientar que o teste por difusão em ágar deve ser considerado como um teste qualitativo. Isto se deve à probabilidade de compostos com caráter apolar, como é o caso da fração hexânica, não se difundirem bem no meio de cultura utilizado. Dessa forma, também foram feitos ensaios qualitativos por meio dos testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM). Os resultados da CIM e da CBM estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do EEP, fr-Hex e fr-Clo contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus mutans* Ingbritt 1600 e *Actinomyces naeslundii* ATCC 12104.

Tratamento	<i>S.aureus</i>		<i>S. mutans</i>		<i>A. naeslundii</i>	
	CIM*	CBM*	CIM*	CBM*	CIM*	CBM*
EEP	50-100	200-400	50-100	200-400	100-200	100-200
fr- Hex.	50-100	200-400	100-200	400-800	200-400	400-800
fr- Clo.	25-50	200-400	50-100	200-400	50-100	50-100

* valores expressos em µg/mL.

A fração clorofórmica apresentou valores de inibição entre 25 e 50 µg/mL para o *S. aureus* e entre 50 e 100 µg/mL para *S. mutans* e *A. naeslundii*, sendo estas concentrações menores que as concentrações necessárias para inibir o crescimento das bactérias pela fração hexânica e até mesmo pelo extrato bruto. Estes resultados confirmam os resultados qualitativos obtidos pelo teste de difusão em ágar, demonstrando realmente que a atividade antibacteriana se concentrou na fração clorofórmica.

Com relação à atividade bactericida, a fr-Clo foi tão eficaz quanto o EEP para *S. aureus* e *S. mutans*; já para o *A. naeslundii* a fr-Clo se mostrou mais bioativa que o extrato, requerendo concentrações entre 50 e 100 µg/mL para inviabilizar o crescimento bacteriano. Os controles utilizados (negativo e positivo) responderam conforme o esperado, não havendo nenhum tipo de interferência. Esses resultados são similares aos resultados descritos por Alencar et al. (2007), que avaliaram a CIM e CBM da própolis vermelha proveniente de Alagoas, bem como das suas frações hexânica e

clorofórmica, contra *S. aureus* ATCC 25923 e *Streptococcus mutans* UA159. Os autores atribuíram a alta atividade antimicrobiana da própolis vermelha e da fração clorofórmica ao alto teor de compostos fenólicos, que foi de 232 mg/g e 324 mg/g, respectivamente, sendo este o mais alto teor já encontrado em amostras de própolis brasileiras (WOISKY; SALATINO, 1998; KUMAZAWA et al., 2004; ALENCAR et al., 2007).

Por ter apresentado a melhor atividade antibacteriana nos ensaios realizados, a fração clorofórmica foi escolhida para ser refractionada e utilizada como fonte de compostos com atividade antibacteriana no processo de isolamento.

2.3.5 Fracionamento da fração Clorofórmica por cromatografia em coluna seca

A montagem da coluna seca foi feita conforme o descrito no item 2.2.5.1. A coluna seca é uma variação da técnica tradicional de cromatografia em coluna úmida (coluna aberta clássica) apresentando redução de tempo e de volume de solvente durante a eluição da amostra (COLLINS; BRAGA; BONATO; 1997). Na figura 14A está ilustrada a coluna seca utilizada na eluição da fração clorofórmica. Após a eluição (figura 14B) com a mesma fase móvel utilizada na cromatografia em camada delgada, ou seja, clorofórmio e acetato de etila (7:3), pode-se observar sob luz natural e luz ultravioleta, várias faixas onde os adsorvatos apareceram separados.



Figura 14 - Cromatografia em coluna seca da fração clorofórmica. Na figura A, a coluna pronta para ser eluída e na figura B, a mesma após a eluição

Após a eluição, as faixas foram delimitadas de acordo com a visualização sob a luz natural e ultravioleta e em seguida, os cortes foram feitos utilizando-se uma lâmina afiada (figura 15).

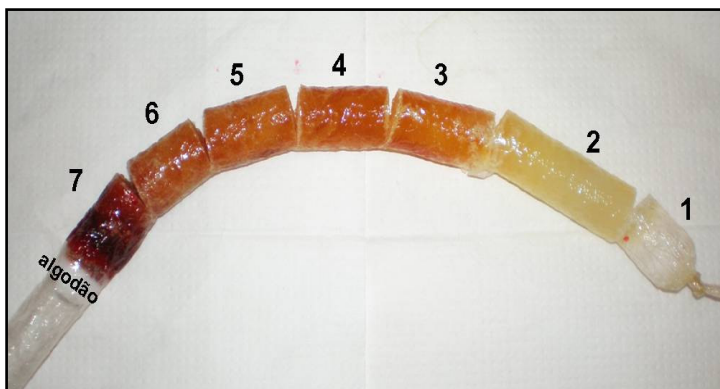


Figura 15 - Sub-frações da fração clorofórmica obtidas a partir da técnica da coluna seca

As sete sub-frações obtidas foram separadas e colocadas em béquer. Para a lavagem da sílica foi utilizado metanol (P.A.) e após a decantação da sílica no béquer, cada sub-fração foi filtrada em papel de filtro. A aparência das sub-frações sob luz natural está apresentada na figura 16.

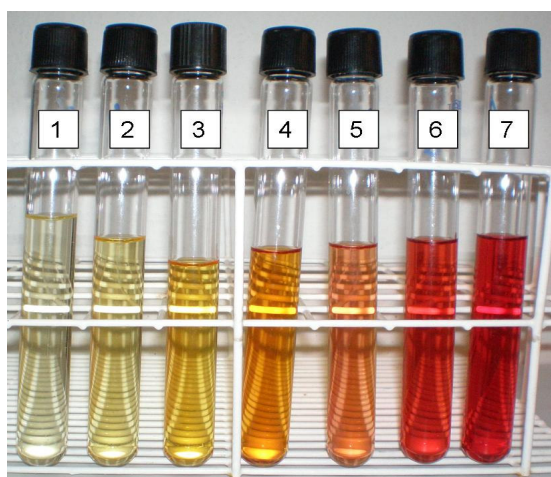


Figura 16 - Aparência das sete sub-frações obtidas após o fracionamento em coluna seca

O acompanhamento do fracionamento das 7 sub-frações pela técnica da coluna seca foi feita pela cromatografia em camada delgada (figura 17).

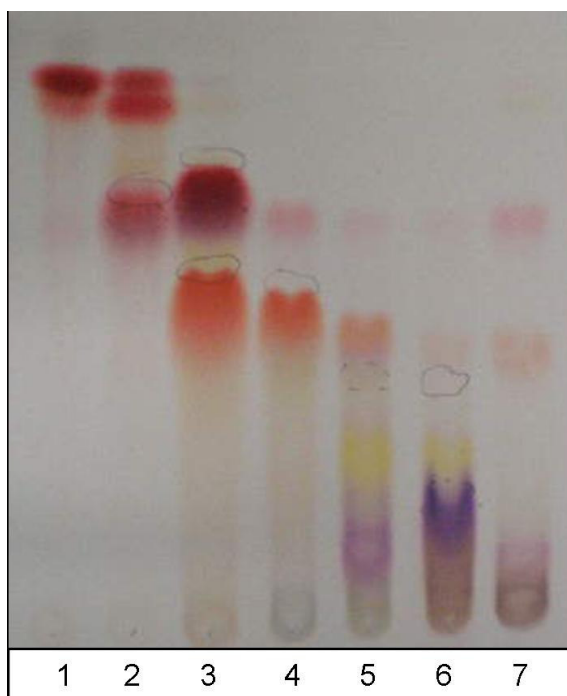


Figura 17 - Cromatografia em camada delgada das 7 sub-frações obtidas através da coluna seca, revelada com anisaldeído sulfúrico

Foi possível observar por meio da CCD que o fracionamento pela técnica da coluna seca resultou em 7 sub-frações diferentes. De acordo com Wang, Lien, Yu (2004) apud Yang e Wang (1999), o processo de fracionamento separa compostos com polaridades diferentes e rende frações de diferentes composições e propriedades com atividades farmacológicas individualizadas, diferentes daquelas apresentadas pelo sistema sinérgico inicial. O rendimento obtido foi de 91,53% em relação à massa de fr-Clo aplicada à coluna, sendo que a sub-fração que apresentou o maior rendimento foi a sub-fração 3 (302,7mg) (Tabela 4).

Tabela 4 - Rendimento das 7 sub-frações da fração clorofórmica, coletadas a partir do fracionamento em coluna seca. A porcentagem foi calculada referente ao 1,0 g de fração clorofórmica aplicada à coluna

Sub-fração	Rendimento (mg)	Rendimento (%)
01	67,8	6,78
02	158,4	15,84
03	302,7	30,27
04	75,3	7,53
05	103,9	10,39
06	157,8	15,78
07	49,4	4,94
Total	915,3	91,53%

Oldoni (2007) utilizando a técnica de cromatografia em coluna aberta para refracionar a fração clorofórmica da própolis vermelha obteve 15 sub-frações, após aplicar na coluna 8,0 g da fração clorofórmica e eluir com um sistema de solvente com polaridade crescente, de hexano até etanol 80% (v/v). O rendimento total do fracionamento foi de 89,62% e a sub-fração de maior rendimento foi a de número 4 (m= 1,52 g) perfazendo 19% do total da fração clorofórmica aplicada à coluna. É interessante ressaltar que o fracionamento por cromatografia em coluna seca é de baixo custo, requerendo pequenas quantidades de sílica e pequenos volumes de solvente, além de ser de rápida execução.

2.3.6 Atividade Antibacteriana das sub-frações da fração clorofórmica obtidas pela cromatografia em coluna seca.

Após a evaporação do solvente, as 7 sub-frações foram rediluídas em concentrações que variaram de 800 a 6,25 µg/mL. Os resultados dessas atividades estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) das 7 sub-frações da fração clorofórmica obtidas pela técnica de coluna seca contra os microrganismos *S. aureus* ATCC 25923, *S. mutans* Ingbritt 1600 e *A. naeslundii* ATCC 12104

Sub-fração	<i>S. aureus</i>		<i>S. mutans</i>		<i>A. naeslundii</i>	
	CIM*	CBM*	CIM*	CBM*	CIM*	CBM*
01	400-800	nd	>800	nd	>800	nd
02	200-400	400-800	400-800	nd	400-800	nd
03	25-50	200-400	50-100	400-800	50-100	200-400
04	100-200	200-400	200-400	400-800	400-800	400-800
05	100-200	200-400	400-800	nd	400-800	nd
06	400-800	nd	>800	nd	>800	nd
07	>800	nd	>800	nd	>800	nd

nd: atividade não detectada na concentração testada.

* valores expressos em µg/mL.

Foi possível observar que somente a sub-fração 7 não apresentou atividade antibacteriana nas concentrações testadas. Já a sub-fração 03 foi a mais ativa, inibindo o crescimento das bactérias numa concentração que variou entre 25 e 50 µg/mL para *S. aureus* e entre 50 e 100 µg/mL para *S. mutans* e *A. naeslundii*. Com relação à atividade bactericida, a sub-fração 3 também foi a que apresentou os melhores resultados contra os microrganismos testados.

Desta forma, a sub-fração 3 foi selecionada para o refractionamento pela técnica de cromatografia em coluna aberta em gel de Sephadex LH-20.

2.3.7 Fracionamento da sub-fração 3 em coluna de Sephadex LH-20

A figura 18A ilustra o momento da aplicação da sub-fração 3 e a figura 18B o seu desenvolvimento, o que possibilitou a coleta de 30 sub-frações.

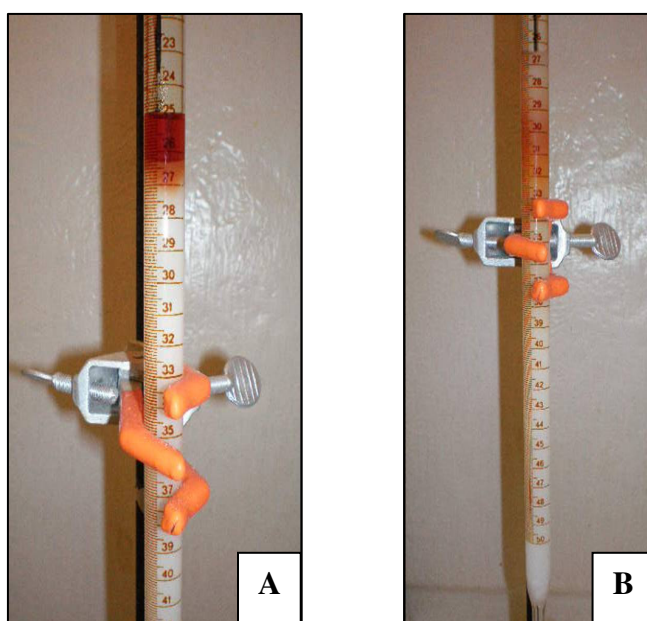


Figura 18 - Cromatografia por coluna de Sephadex LH-20. Figura A: momento da aplicação da sub-fração 3 e figura B: desenvolvimento da eluição com metanol

Na figura 19 está ilustrado o cromatograma obtido por CCD das sub-frações, após a revelação com anisaldeído sulfúrico. Pode-se observar no cromatograma que ao longo do fracionamento houve a separação de 3 substâncias que reagiram de forma diferente ao revelador, ou seja, bandas das cores roxa, rosa e laranja, as quais estão indicadas pelas setas na porção superior do CCD (Figura 19).

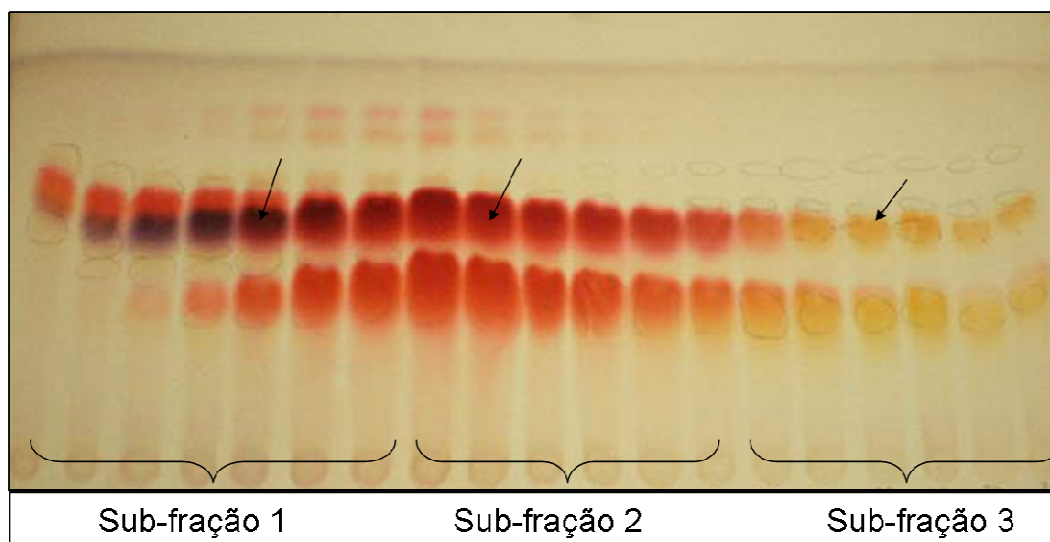


Figura 19 - Cromatografia em camada delgada das frações obtidas através da coluna de Sephadex LH-20

As sub-frações semelhantes em função da coloração apresentada no cromatograma de CCD foram reagrupadas para dar origem a seguintes sub-frações: sub-fração 1 (roxa), sub-fração 2 (rosa) e sub-fração 3 (laranja) (Figura 19). Essas sub-frações foram utilizadas para os testes bioautografia e isolamento dos compostos pela técnica de cromatografia líquida preparativa de alta eficiência.

2.3.8 Bioautografia das sub-frações obtidas pela coluna de Sephadex LH-20

As 3 sub-frações foram então avaliadas pelo teste de bioautografia. Na figura 20 está ilustrada a bioautografia das 3 sub-frações, utilizando-se como microrganismo a bactéria *S. aureus* ATCC 25923. De acordo com as zonas de inibição formadas, e indicadas pelas setas na figura 20, foi possível verificar que as três sub-frações foram bioativas.

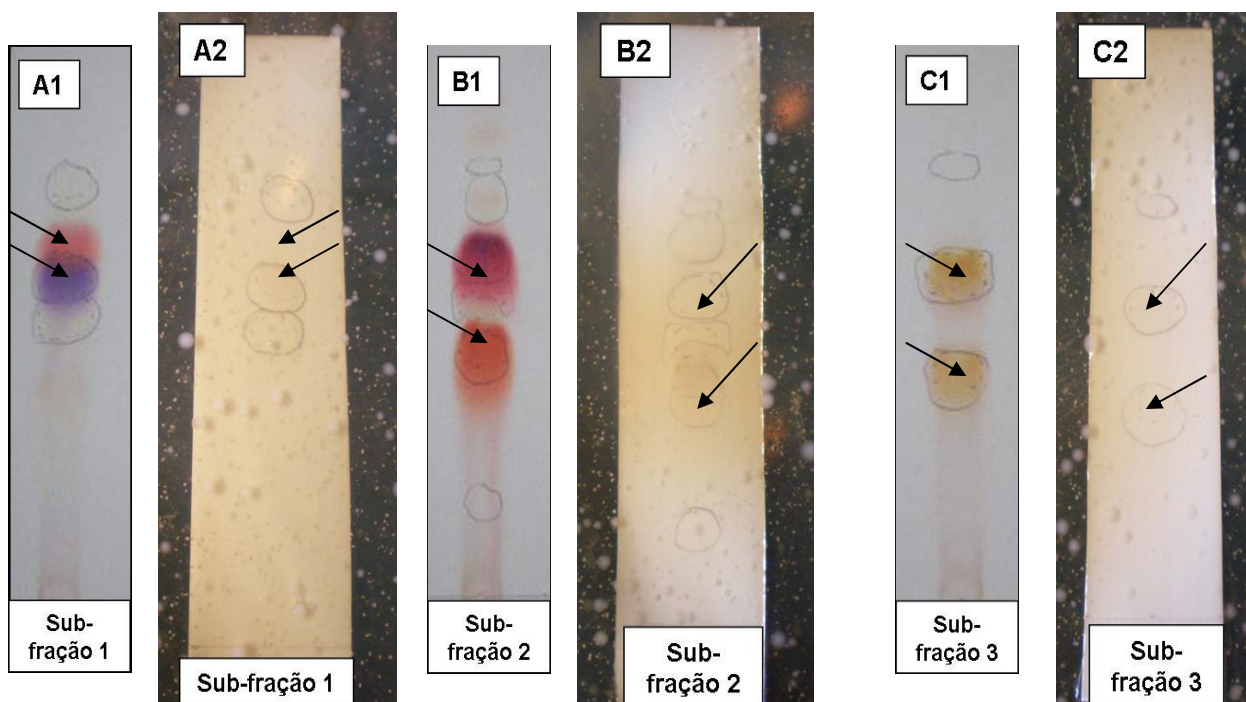


Figura 20 - Bioautografia das 3 frações obtidas através da coluna Sephadex LH-20, contra a bactéria *S. aureus* ATCC 25923. As figuras A1, B1 e C1 representam o CCD utilizado como padrão, revelado com anisaldeído sulfúrico, e as figuras A2, B2 e C2 se referem ao teste de bioautografia

Para as outras bactérias testadas o padrão de inibição do crescimento seguiu o mesmo perfil. Após este teste, as 3 sub-frações foram então analisadas pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência.

2.3.9 Isolamento dos compostos com atividade antibacteriana

As 3 sub-frações foram injetadas no cromatógrafo líquido, em modo analítico, para a avaliação dos perfis e pureza dos compostos.

Foi possível verificar que, em relação à fração clorofórmica, as sub-frações obtidas após o fracionamento em coluna seca e em coluna de Sephadex LH-20 apresentaram um menor número de picos, demonstrando assim a eficiência dos métodos de purificação. Os picos majoritários das frações se concentraram entre os tempos de retenção de 20 e 30 minutos, conforme ilustrado na figura 21.

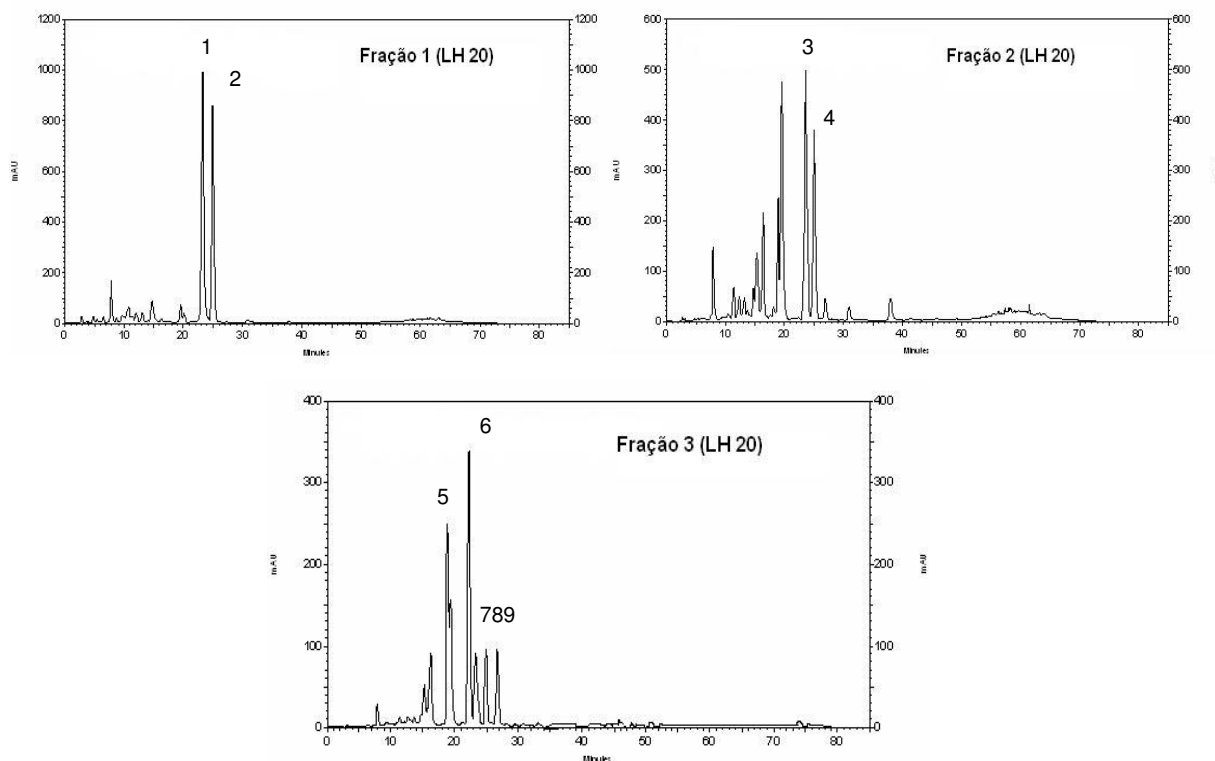


Figura 21 - Cromatogramas obtidos por CLAE-FR das 3 frações obtidas após o fracionamento em coluna de Sephadex LH-20. Os picos numerados foram submetidos ao isolamento em coluna preparativa

Pode-se verificar que apesar das semelhanças nos perfis das três sub-frações, os vários picos em comum pelos tempos de retenção, como por exemplo, os picos 1 e 3 e os picos 2 e 4 quando analisados pelos recursos do detector de arranjo de fotodiodos, foram espectralmente distintos.

Os picos 3 da sub-fração 2 (denominado de composto 1) e o pico 6 da sub-fração 3 (denominado de composto 2) foram selecionados para o processo de isolamento pela técnica de CLAE preparativa. Esses compostos além de serem majoritários, quando analisados pelos recursos do detector de arranjo de fotodiodos apresentaram altos índices de pureza, o que não ocorreu com os picos 1 e 2 da sub-fração 1.

A figura 22 ilustra os cromatogramas de coleta dos compostos das sub-frações, pela técnica de CLAE preparativa.

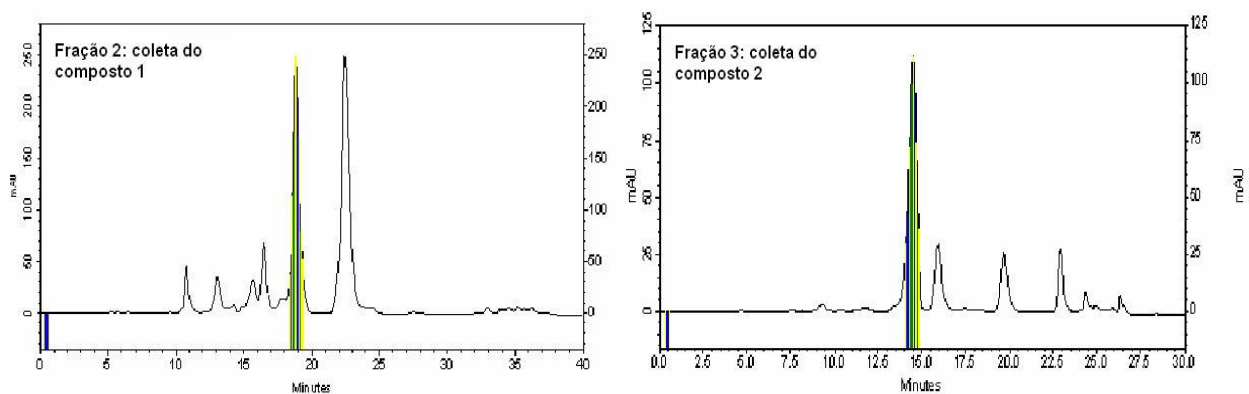


Figura 22 - Cromatogramas da coleta dos compostos por CLAE-preparativa: composto 1, proveniente da sub-fração 2 (LH-20) e composto 2, proveniente da sub-fração 3 (LH-20)

Após o isolamento, os compostos foram reavaliados pela técnica de CLAE, podendo ser observada a existência de somente um pico, indicando assim que estavam puros (Figura 23).

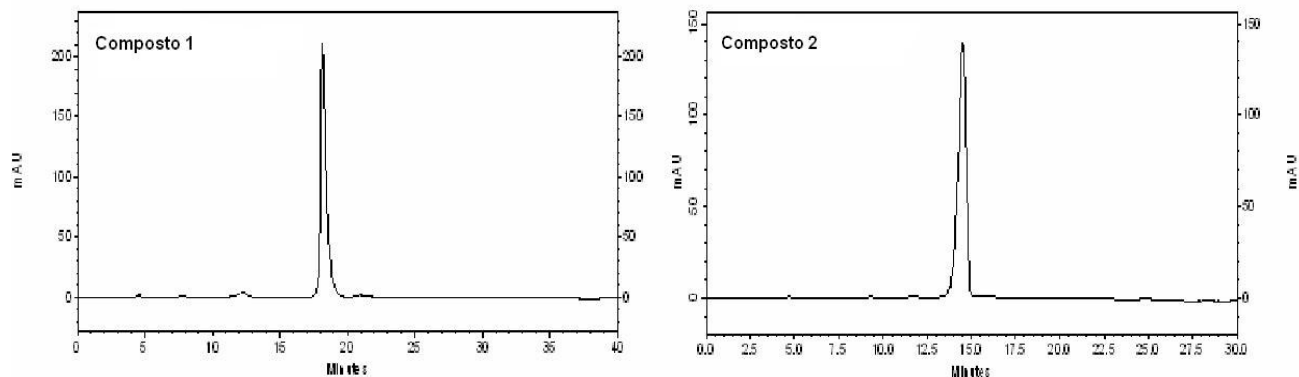


Figura 23 - Cromatogramas obtidos por CLAE dos compostos com atividade antibacteriana, isolados da própolis vermelha

Na Figura 24 está ilustrado o cromatograma por CCD da evolução do fracionamento e purificação, partindo do EEP, o que possibilitou o isolamento de 2 compostos bioativos pela técnica de CLAE-preparativa.

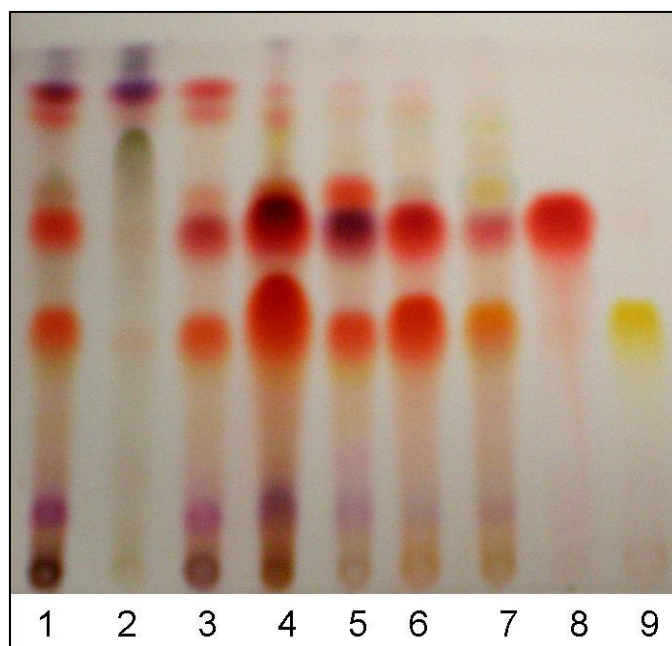


Figura 24 - Evolução do fracionamento e purificação dos compostos com atividade antibacteriana da própolis vermelha. Sendo, 1: Extrato etanólico da própolis vermelha; 2: Fração Hexânica; 3: Fração Clorofórmica; 4: Sub-fração 3 da coluna seca; 5: Sub-fração 1 (Sephadex LH-20); 6: Sub-fração 2 (Sephadex LH-20); 7: Sub-fração 3 (Sephadex LH-20); 8: Composto 1, isolado da sub-fração 2; 9: Composto 2, isolado da sub-fração 3

2.3.10 Atividade Antibacteriana dos compostos isolados

Os compostos isolados foram submetidos à avaliação da atividade antibacteriana pelos métodos da CIM e CBM, em microdiluição em caldo, sendo obtidos os resultados apresentados na Tabela 6.

Foi possível verificar que os compostos isolados apresentaram forte atividade frente às bactérias testadas. O composto 1 apresentou a CIM entre 31,2 e 62,5 $\mu\text{g/mL}$, não havendo distinção em seu efeito inibitório com relação à espécie bacteriana testada. Já o composto 2 foi mais eficiente que o composto 1, apresentando a CIM

entre 15,6 e 31,2 µg/mL para as três bactérias. Com relação a atividade bactericida dos compostos isolados foi possível observar que o composto 2 foi mais eficiente que o composto 1. A CBM do composto 2 ficou entre 31,2 e 62,5 µg/mL, tanto para *S. aureus* quanto para *S. mutans*. Pode-se observar que os compostos isolados não apresentaram efeito bactericida para *Actinomyces naeslundii*.

Marcucci et al (1995) verificaram que a excelente atividade antibacteriana da própolis pode decorrer de um efeito sinérgico entre flavonóides, hidroxiácidos e sesquiterpenos. Por isso, neste trabalho também foi analisado o efeito sinérgico entre os compostos isolados. A solução foi preparada misturando-se os compostos 1 e 2 na concentração de 1:1. A concentração final nos testes variou entre 125 e 1,8 µg/mL.

Tabela 6 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos compostos isolados da própolis vermelha contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus mutans* Ingbritt 1600 e *Actinomyces naeslundii* ATCC 12104.

Tratamento	<i>S.aureus</i>		<i>S. mutans</i>		<i>A. naeslundii</i>	
	CIM*	CBM*	CIM*	CBM*	CIM*	CBM*
Composto 1	31,2 – 62,5	62,5 -125	31,2 – 62,5	125 - 250	31,2 – 62,5	nd
Composto 2	15,6 – 31,2	31,2 – 62,5	15,6 – 31,2	31,2 – 62,5	15,6 – 31,2	nd
1+ 2 [1:1]	31,2 – 62,5	nd	62,5 - 125	nd	31,2 – 62,5	nd

nd: atividade não detectada na concentração testada.

* valores expressos em µg/mL.

Como se pode observar na tabela 6, apesar de apresentarem uma boa atividade antibacteriana, com a CIM variando entre 31,2 e 62,5 µg/mL para *S. aureus* e *A. naeslundii* e entre 62,5 e 125 µg/mL para *S. mutans*, a mistura dos compostos não apresentou efeito tão eficaz quanto os compostos puros. Além disso, a ação conjunta dos compostos anulou o efeito bactericida apresentado pelos compostos isoladamente. Isto demonstra que os compostos não apresentam efeito sinérgico capaz de potencializar a ação, já que quando misturados sua atividade foi menor que quando testados de forma isolada.

Koo et al. (2001) analisaram a CIM e CBM de 30 compostos puros encontrados em própolis contra *S. mutans* GS-5 e UA159 e *S. sobrinus* 6715. Algumas flavanonas e diidroflavonóis, bem como o *tt*-farnesol (um terpenóide) demonstraram atividade antibacteriana. Todas as flavanonas testadas inibiram o crescimento bacteriano. Dentre elas, a pinocembrina foi a mais eficaz, com uma CIM de 64 µg/mL. A pinobanksina-3-acetato também inibiu o crescimento das bactérias na concentração de 157 µg/mL. É interessante ressaltar que estas concentrações são maiores que a necessária para inibir o crescimento de *S. mutans* pelos 2 compostos isolados da própolis vermelha (Tabela 6). De todos os compostos analisados por Koo et al. (2001), o *tt*-farnesol foi o mais eficaz, com uma CIM de 28 µg/mL. A atividade do *tt*-farnesol é semelhante à atividade do composto 2 isolado da própolis vermelha, cuja CIM variou entre 15,6 – 31,2 µg/mL. Já Pepeljnjak et al. (2004) avaliaram a atividade da galangina, isolada de três amostras de própolis da Croácia, sobre cepas resistentes de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus spp.* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os autores encontraram valores de CIM entre 1600 e 2400 µg/mL. A alta concentração de galangina utilizada para inibir os microrganismos era esperada pelos autores, já que eles utilizaram nos testes bactérias resistentes a vários tipos de antibióticos conhecidos.

O composto α -Pineno foi isolado da própolis provenientes da Grécia e teve sua atividade antibacteriana avaliada contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Apesar de este composto ser conhecido pela sua forte atividade antibacteriana (MAGIATIS et al., 1999), ele apresentou uma CIM de 6500 µg/mL, sendo esta concentração significativamente maior que a concentração necessária para inibir o crescimento de *S. aureus* pelos compostos isolados da própolis vermelha.

2.3.11 Análise espectrofotométrica na região ultravioleta-visível dos compostos isolados

Os compostos isolados foram avaliados espectralmente na faixa de comprimento de onda de 200 e 500 nm. De acordo com a figura 25, pode-se observar que os perfis de absorção são distintos e que o composto 1 e o composto 2 possuem absorção máxima de 282 nm e 370 nm, respectivamente.

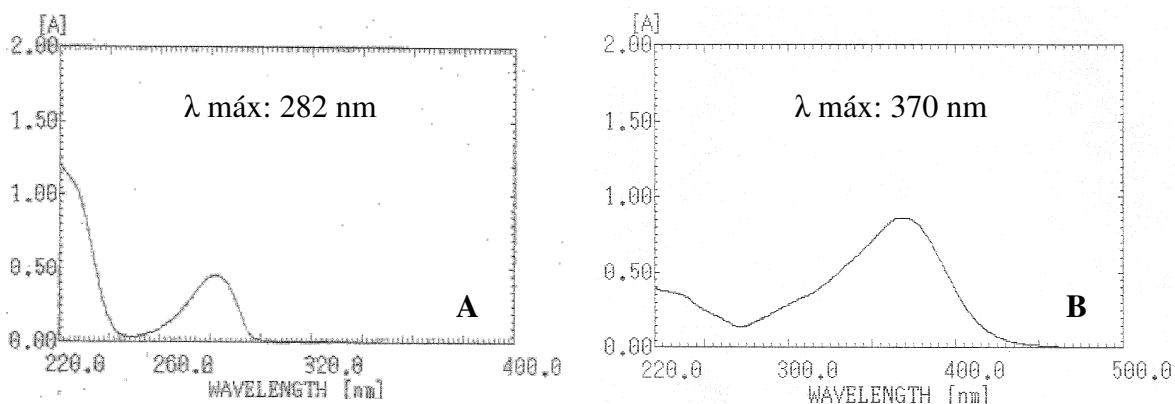


Figura 25 - Perfis dos compostos isolados em espectrofotometria na região UV-visível. A: Composto 1 e B: Composto 2

Os flavonóides possuem espectros de absorção característicos no ultravioleta, determinados pelo núcleo comum benzopirona, com dois máximos de absorção: um ocorrendo entre 240-285 nm (banda II) e outro entre 300-400 nm (banda I). Em geral, a banda II pode ser considerada como devido à existência do anel A e a banda I devido ao anel B, portanto, as diferentes classes dos flavonóides possuem bandas de absorção características (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970). De acordo com Mabry et al (1970), o espectro em metanol das chalconas geralmente exibe picos de absorção na região entre 340 - 370 nm. Portanto, de acordo com os resultados obtidos na análise espectrofotométrica, os compostos isolados da própolis vermelha podem pertencer a classe dos flavonóides, sendo a absorção do composto 2 compatível com a absorção característica de compostos da classe das chalconas.

2.3.12 Identificação química dos compostos isolados por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Após o isolamento e análise da atividade antibacteriana, os compostos isolados foram analisados pela técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), para identificação e confirmação da estrutura química.

De acordo com os resultados obtidos, o espectro de RMN de ^1H do composto 1 exibiu, para a região de hidrogênios aromáticos, dois conjuntos de sinais referentes a

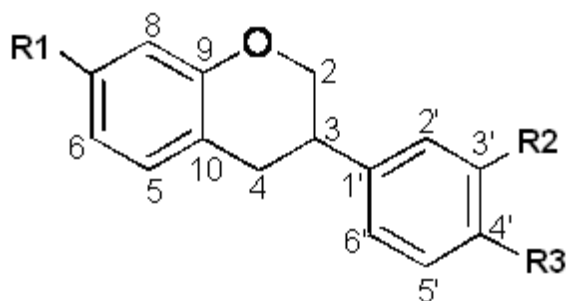
dois sistemas ABX a δ 6,95 (1H, d, $J = 8,3$ Hz), 6,37 (1H, dd , $J = 8,3$ e 2,4 Hz) e 6,41 (1H, d, $J = 2,4$ Hz) e a δ 6,24 (1H, d, $J = 2,4$ Hz), 6,87 (1H, d, $J = 8,3$ Hz) e 6,32 (1H, dd , $J = 8,3$ e 2,4 Hz). O espectro também mostrou um sinal a δ 3,71, que foi atribuído aos hidrogênios do grupo metoxila (-OCH₃). Os demais sinais foram relacionados com os hidrogênios nas posições 2, 3 e 4, conforme descrito na Tabela 7.

Tabela 7 - Dados de RMN de ¹H do composto 1 (500 MHz, CD₃OD, TMS, δ , mult., $J =$ Hz)

Posição	Composto 1 δ_H
2	equatorial 4,21 ddd (9,9; 3,2; 1,9) axial 3,93 t (10,0)
3	axial 3,42 m
4	equatorial 2,77 dd (15,4; 3,2) axial 2,92 dd (15,4; 10,0)
5 ou 5'	6,95 d (8,3)
6 ou 6'	6,37 dd (8,3; 2,4)
7	-----
8 ou 2'	6,41 d (2,4)
9	-----
10	-----
1'	-----
2' ou 8	6,24 d (2,4)
3'	-----
4'	-----
5' ou 5	6,87 d (8,3)
6' ou 6	6,32 dd (8,3; 2,4)
-OCH ₃	3,71 s

Onde: d = dubleto; dd = duplo dubleto; ddd = duplo duplo dubleto; m = multipleto; t = tripleto; s = singleto

Somente com os dados obtidos por RMN de ^1H não foi possível identificar o composto 1. No entanto, foi possível saber a partir dos sinais descritos anteriormente na tabela 7 que se trata de um isoflavonóide, pertencente à classe das isoflavanas, com estrutura semelhante à apresentada na figura 26.



Se: R1 = R2 = OH e R3 = CH₃ — 7,3'-diidroxi-4'-metoxiisoflavana;

R1 = R3 = OH e R2 = CH₃ — 7,4'-diidroxi-3'-metoxiisoflavana;

R2 = R3 = OH e R1 = CH₃ — 3,4'-diidroxi-7-metoxiisoflavana.

Figura 26 - Possível estrutura do composto 1, isolado da fração clorofórmica da própolis vermelha

De acordo com Oliveira (2005), as isoflavanas são compostos bastante raros na natureza, apresentando normalmente substituintes como grupos hidroxí/metoxi nas posições 7, 2' e 4', menos frequentemente nas posições 8 e 3'.

Os isoflavonóides, dentre eles as isoflavanas, apresentam diversas atividades biológicas, dentre elas atividade antimicrobiana (CUSHINE; LAMB, 2005; TRUSHEVA et al., 2006), anticâncer (LI et al., 2008; AWALE et al., 2008) e antioxidante (TRUSHEVA et al., 2006), além de serem associados a diversos benefícios para a saúde, como prevenção de doenças cardiovasculares (PICCINELLI et al., 2005), combate ao colesterol, prevenção da osteoporose e alívio dos sintomas da menopausa (LEE et al., 2006 *apud* OLDONI, 2007).

Com relação ao composto 2, o espectro de RMN de ^1H mostrou dois dubletos integrados para um hidrogênio cada a δ 7,61 e 7,78 ($J = 15,4$ Hz), característicos de hidrogênios trans-olefínicos do esqueleto de uma chalcona. O espectro exibiu também três sinais a δ 6,27 (1H, d , $J = 2,4$ Hz), 6,40 (1H, dd , $J = 8,8$ e $2,4$ Hz) e 7,96 (1H, d , $J = 8,8$ Hz), o que sugere a presença de um anel A 2',4'-dissubstituído, e dois sinais a δ 6,84 (2H, d , $J = 8,6$ Hz) e 7,62 (2H, d , $J = 8,6$ Hz), consistentes com um anel B monossubstituído, conforme descrito na Tabela 8.

Tabela 8 - Dados de RMN de ^1H do composto 2 (500 MHz, CD_3OD , TMS, δ , mult., $J = \text{Hz}$) e de RMN de ^1H do padrão obtido da literatura

Posição	Composto 2 δ_{H}	Padrão δ_{H}
		(Zheng <i>et al.</i> , 2008) 500 MHz, CD_3OD
α	7,61 d (15,4)	7,60 d (15,3)
β	7,78 d (15,4)	7,78 d (15,3)
1	-----	-----
2	7,62 d (8,6)	7,61 d (8,6)
3	6,84 d (8,6)	6,83 d (8,6)
4	-----	-----
5	6,84 d (8,6)	6,83 d (8,6)
6	7,62 d (8,6)	7,61 d (8,6)
1'	-----	-----
2'	-----	-----
3'	6,27 d (2,4)	6,28 d (2,4)
4'	-----	-----
5'	6,40 dd (8,8; 2,4)	6,40 dd (8,9; 2,4)
6'	7,96 d (8,8)	7,96 d (8,9)

Onde: d = dubleto; dd = duplo dubleto; ddd = duplo duplo dubleto; m = multipletto; t = triplete; s = singleto.

Com base nos dados do espectro de RMN de ^1H e comparação com dados da literatura (ZHENG et al., 2008), o composto 2 foi identificado como sendo a 2',4',4'-triidroxichalcona, também conhecida como isoliquiritigenina, cuja estrutura está demonstrada na figura 27.

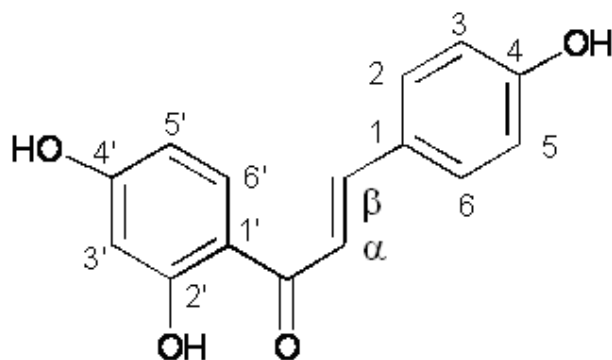


Figura 27 - Estrutura do composto 2 (2',4',4'-triidroxichalcona ou isoliquiritigenina), isolado da fração clorofórmica da própolis vermelha

A isoliquiritigenina foi encontrada pela primeira vez em 1953, proveniente de *Dahlia variabilis* (Bate-Smith; Swain, 1953). Pertence à classe das chalconas, cujos compostos são produzidos pelo metabolismo secundário das plantas atuando, em muitos casos, como mecanismos de defesa para neutralizar a ação de espécies reativas de oxigênio, para a sobrevivência e para prevenção de danos moleculares e danos provocados por microrganismos, mostrando assim sua atividade antioxidante e antimicrobiana, além de proteger a planta contra a ação de insetos e de herbívoros (YAYLI et al., 2005).

A isoliquiritigenina, bem como outros flavonóides, já foi identificada em amostras de própolis vermelha brasileira, provenientes do Estado da Paraíba (LI et al., 2008).

Ávila (2008) verificou que a atividade antimicrobiana de algumas chalconas pode estar relacionada com a presença das hidroxilas nas posições C-2' e C-4 e que têm substituintes na posição C-4'. Nessas chalconas há uma interação intramolecular entre a hidroxila na posição C-2' e o oxigênio da carbonila, produzindo efeito em várias

propriedades das chalconas. A boa atividade antimicrobiana também foi relatada por Sato et al. (2003) para chalconas que apresentam o mesmo tipo de estrutura química.

Outras atividades biológicas da isoliquiritigenina já foram descritas. Por exemplo, este composto exibiu atividade no músculo cardíaco (WEGENER et al., 1997), atividade antioxidante (PRACHAYASITTIKUL et al., 2008), efeito inibitório da xantina oxidase (KONG et al., 2000) e tirosinase (ZHENG et al., 2008), além de inibir a proliferação e induzir a apoptose em hepatoma humano (HSU et al., 2005). Também diminuiu a produção de prostaglandinas e óxido nítrico em macrófagos de rato (TAKAHASHI et al., 2004) e apresentou uma potente atividade inibitória de células cancerígenas de próstata (JUNG et al., 2006).

Tanto os isoflavonóides em geral quanto a isoliquiritigenina, uma chalcona, são considerados constituintes característicos de plantas da família *Leguminosae* (PICCINELLI et al., 2005). A presença desses compostos na própolis vermelha brasileira corrobora com a evidência de que sua origem botânica seja uma espécie de leguminosa, conforme verificado por Silva et al. (2007) e demonstra a importância dessa família como fonte de resinas com compostos bioativos para a produção da própolis.

3 CONCLUSÕES

O processo de fracionamento e purificação possibilitou a obtenção de frações e sub-frações mais bioativas que o extrato etanólico bruto da própolis.

Foi possível identificar pela técnica de CLAE, tanto no EEP quanto na fração clorofórmica, um flavonóide (quercetina), duas isoflavonas (daidzeína e formononetina) e um ácido fenólico (ácido ferúlico).

A atividade antibacteriana da própolis vermelha se concentrou na fração clorofórmica, sendo esta a fração rica em compostos antimicrobianos.

O fracionamento pela técnica de extração líquido-líquido, cromatografia em coluna seca de sílica-gel e cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 possibilitaram a obtenção de frações e sub-frações quimicamente distintas.

Foi possível isolar pela técnica de CLAE-preparativa 2 compostos de elevada pureza e alta atividade antibacteriana, sendo eles uma isoflavana e uma chalcona identificada como isoliquiritigenina.

Os compostos isolados não apresentaram efeito sinérgico, pois o efeito bactericida demonstrado por eles na forma isolada foi anulado quando misturados na proporção de 1:1.

A excelente atividade antibacteriana torna a própolis vermelha uma importante fonte de agentes antibacterianos naturais.

REFERÊNCIAS

ADELMANN, J. **Própolis**: variabilidade composicional, correlação com a flor e bioatividade antimicrobiana / antioxidante. 2007. 186p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

AGA, H.; SHIBUYA, T.; SUGIMOTO, K.; NAKAJIMA, S. Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 58, n. 5, p. 945-946, 1994.

AHMAD, I.; AQIL, F. In vitro efficacy of bioactive extracts of 15 medicinal plants against ESbL-producing multidrug-resistant enteric bacteria. **Microbiological Research**, Amsterdam, v.162, n.1, p.264-275, 2007.

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**. 2002. 120p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

ALENCAR, S.M.; AGUIAR, C.L.; GUZMÁN, J.P.; PARK, Y.K. Composição Química de *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais, **Ciencia Rural**, Santa Maria, v.3, n.4, 2005.

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. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.113, n.2, p.278-283, 2007.

APICULTURA. Disponível em: www.ceplac.gov.br/radar/Artigos/artigo11.html. Acesso em: 09 maio 2008.

ARAI, S.; NISHIZAKI, Y.; KIMOTO, T.; KURIMOTO, M. Antitumor agent. **United States Patent, 5.710.179**, 1998.

ASO, K.; KANNO, S. I.; TADANO, T.; SATOH, S.; ISHIKAWA, M. Inhibitory effect of propolis on the growth of human leukemia U937. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 27, n. 5, p. 727-730, 2004.

ÁVILA, H.P. **Atividade antibacteriana de chalconas**. 2008, 78p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

AWALE, S.; LI, F.; ONOZUKA, H.; ESUMI, H.; TEKUZA, Y, KADOTA, S. Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Berlin, v. 16, p. 181–189, 2008.

BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; KUJUMGIEV, A.; MARCUCCI, M. C.; POPOV, S. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. **Zeitschrift fur Naturforschung**, Tubingen, v. 50c, n. 2, p. 167-172, 1995.

BANKOVA, V.; NIKOLOVA, N.; MARCUCCI, M. New lignan from Brazilian propolis. **Zeitschrift fur naturforschung C**, Tubingen, v. 51, n. 9-10, p. 735-737, 1996.

BANKOVA, V.; POPOV, S.; MAREKOV, N. L. Isopentenyl cinnamates from poplar buds and propolis. **Phytochemistry**, Oxford, v. 28, n. 3, p. 871-873, 1989.

BANKSOTA, A.H.; TEKUZA, Y.; ADNYANA, I.K.; MIDORIKAWA, K.; MATSUSHIGE, K.; MESSAGE, D.; HUERTAS, A.G.; KADOTA, S. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of própolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.72, p.239-246, 2000.

BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; PRASAIN, J. K. Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities. **Journal of Natural Products**, Pittsburgh, v. 61, n. 7, p. 896-900, 1998.

BASIM, E.; BAIM, H.; ZCAN, M. Antibacterial activities of Turkish pollen and propolis extracts against plant bacterial pathogens. **Journal of Food Engineering**, Davis, v. 77, n.1, p. 992–996, 2006.

BATE-SMITH, E. C.; SWAIN, T. The isolation of 2,4,4'-trihydroxychalcone from yellow varieties of *Dahlia variabilis*. **Journal of Chemistry Society**, [S.N.], v.12, n.1, p. 2185-2187, 1953.

BONVEHI, J. S.; COLL, F. V. Phenolic composition of propolis from China and from South-America. **Zeitschrift fur Naturforschung c**, Tubingen, v. 49, n.11-12, p. 712-718, 1994.

BOSIO, K.; AVANZINI, C.; D'AVOLIO, A.; OZINO, O; SAVOIA, D. In vitro activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 31, n.1, p. 174-177, 2000.

BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n.11, p. 317-333, 1998.

BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. **Food and Chemical Toxicology**, London, v. 36, n. 4, p. 347-363, Apr. 1998.

CARDILE, V.; PANICO, A.; GENTILE, B.; BORRELLI, F.; RUSSO, A. Effect of própolis on human cartilage and chondrocytes. **Life Sciences**, New York, v.73, n.8, p.1027-1035, 2003.

CARVALHO, A.J. **Caixa coletora de própolis. Patente BR7501840 U**, Brasil, 1997.

CASTALDO, S. CAPASSO, S. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, São Paulo, v. 73, Suppl. 1, 2002.

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

CECHINEL, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n.1, 1998.

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

CHEN, D. F.; ZHANG, S. X.; CHEN, K.; ZHOU, B. N.; WANG, P.; COSENTINO, L. M.; LEE, K. H. Two new lignans, interiotherins A and B, as anti-HIV principles from *Kadsura interior*. **Journal of Natural Products**, Pittsburgh, v. 59, n. 11, p. 1066-1068, 1996.

CHO, H.; TORII, M.; KANAMORI, T. **Patente JP 63264516**, 1987.

CHOI, Y.M.; NOHB, D.O.; CHOC, S.Y.; SUHD, H.J.; KIMD, K.M.; KIM, J.M. Antioxidant and antimicrobial activities of própolis from several regions of Korea, **LWT- Food Science and Technology**, Zurich, v. 39, n.1, p. 756–761, 2006.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature Publishing Groups**, Paris, v. 432, p. 829 – 837, 2004.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 7. ed. Campinas: UNICAMP, 1997. 279p.

CUESTA RUBIO, O., CUESTA CUELLAR, A., ROJAS, N., VELEZ CASTRO, H., RASTRELLI, L., AQUINO, R., A polyisoprenilated Benzophenone from Cuban propolis, **Journal of Natural Products**, Pittsburgh, v. 62, p. 1013-5, 1999.

CUNHA, I. B. D. S.; SALOMAO, K.; SHIMIZU, M.; BANKOVA, V. S.; CUSTODIO, A. R.; DE CASTRO, S. L.; MARCUCCI, M. C. Antitrypanosomal activity of Brazilian Propolis from *Apis mellifera*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 52, n. 5, p. 602-604, 2004.

CUSHINE, T.P.T.; LAMB, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v.26, n.1, p.343-356, 2005.

CUSTÓDIO, A.R.; CUNHA, I.; MARCUCCI, M.C.; MORAIS, L.A. Extração Líquido-líquido de compostos presentes na própolis. **LECTA: Revista de Farmácia e Biologia**, Bragança Paulista, v.18, n.2, p.55-64, 2000.

DUARTE, S.; KOO, H.; BOWEN, W. H.; HAYACIBARA, M. F.; CURY, J. A.; IKEGAKI, M.; PARK, Y. K.; 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**, Tokyo, v. 26, n. 4, p. 527-531, Apr. 2003.

ESTIVALET, T.I.; FRANCO, S.L.; POZZI, A.C.; MOURA, L.P.P.; LONGHINI, R. **Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. Patente BRPI0501875**, Brasil, 2007.

FERNANDES, A.; LOPES, M.M.R.; COLOMBARI, V.; MONTEIRO, A.C.M.; VIEIRA, E.P. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.1, p.294-297, 2006.

GARCIA-VIGUERA, C., GREENAWAY, W., WHATLEY, F. R. Composition of propolis from 2 different Spanish regions. **Zeitschrift fur Naturforschung C**, Wiesbaden, v. 47, n. 7/8 p. 634-637, 1992.

GHISALBERTI, E. L. Propolis: a review. **Bee World**, Benson, v.60, n. 2, p. 59-84, 1979.

GINZBURG, E.; NAMIAS, N.; BROWN, M.; BALL, S.; HAMEED, S. M.; COHN, S. M. Gram positive infection in trauma patients: new strategies to decrease emerging Gram-positive resistance and vancomycin toxicity. **International Journal of Antimicrobial Agents**, London, v. 16, p. 39-42, 2000.

GÓMEZ-CARAVACA, A.M.; GÓMEZ-ROMERO, M.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; SEGURA-CARRETERO, A. ; FERNANDEZ-GUTIÉRREZA. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v.41, n.1, p. 1220–1234, 2006.

GONSALES, G.Z.; ORSI, R. O.; FERNADES JÚNIOR, A.; RODRIGUES, P.; FUNARI, S. R. C.¹ Antibacterial activity of propolis collected in different regions of Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Botucatu, v.12, n.2, 2006.

HAVSTEEN, B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. **Biochemical Pharmacology**, London, v. 32, n.1, p. 1141-1148, 1983.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology and Therapeutics**, London, v. 96, p. 67– 202, 2002.

HAYACIBARA, M.; KOO, H.; ROSALEN, P. L.; DUARTE, S.; FRANCO, E. M.; BOWEN, W. H.; IKEGAKI, M.; CURY, J. A. *In vitro* and *in vivo* effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 101, n. 3, p.371-376, 2005.

HERNANDEZ, I.M.; FERNANDEZ, M.C.; CUESTA-RUBIO, O., PICCINELLI, A.N.; RASTRELLI, L. Polyprenylated Benzophenone Derivatives from Cuban Propolis. **Journal of Natural Products**, Pittsburgh, v.68, n.1, p.931-934, 2005.

HSU, Y.-L.; KUO, P.-L.; LIN, C.-C. Isoliquiritigenin induces apoptosis and cell cycle arrest through p53-dependent pathway in Hep G2 cells. **Life Science**, Oxford, v.77, n.1, p. 279-292, 2005.

IKEGAKI, M. **Determinação de qualidade de propolis de *Apis mellifera* africanizada da região sul do Brasil**: avaliação de algumas propriedades físico-químicas e biológicas da própolis. 2001, 74p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

INOUE, T.H.; SOUSA, E.A.; ORSI, R.O.; FUNARI, S.R.C.; BARRETO, L.M.R.C.; SILVA, A.P. Produção de própolis por diferentes métodos de coleta **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, Mayaguez, v.15, n. 2, p. 65-69, 2007.

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. **Journal of Pharmacological Sciences**, Tokyo, v. 94, n.1, p. 129-129, 2004.

ISLA, M.; PAREDES-GUZMAN, J.F.; NIEVA-MORENO, M.I.; KOO, H.; PARK, Y.K. Some Chemical Composition and Biological Activity of Northern Argentine Propolis **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.53, n.1, p.1166-1172, 2005.

ITICE, N.T. **Processo de obtenção de de própolis em solução acuosa, Patente BR9705316**, Brasil, 2001.

JIN, U.H.; CHUNG, T. W.; KANG, S.K.; SUH, S.J.; KIM, J. K., CHUNG, K.H.; GU, Y.H.; SUZUKI, I.; KIM, C. H. Caffeic acid phenyl ester in propolis is a strong inhibitor of matrix metalloproteinase-9 and invasion inhibitor: isolation and identification. **Clinica Chimica Acta**, London, v. 362, p. 57-64, 2005.

JOHNSON, K. S.; EISCHEN, F. A.; GIANNASI, D. E. Chemical-compositing of North-American bee propolis and biological-activity towards larvae of greater wax moth (*Lepidoptera, Pyralidae*). **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 20, n. 7, p. 1783-1791, 1994.

JUNG, J. I.; CHUNG, E.; SEON, M. R.; SHIN, H.-K.; KIM, E. J.; LIM, S. S.; CHUNG, W.-Y.; PARK, K.-K.; PARK J. H. Y. Isoliquiritigenin (ISL) inhibits ErbB3 signaling in prostate cancer cells. **BioFactors**, Amsterdam, v. 28, n.1, p. 159-168, 2006.

KHAYYAL, M. T.; ELGHAZALY, M. A.; ELKHATIB, A. S. Mechanisms involved in the antiinflammatory effect of propolis extract. **Drugs Under Experimental and Clinical Research**, New Jersey, v. 19, n. 5, p. 197-203, 1993.

KIMOTO, T.; CHAEN, H.; KURIMOTO, M. **Apoptosis-controlling agent. US Patent, 5.830.914** , 1998.

KISS, J. Mel para viagem. **Globo Rural**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 206, p. 30-37, dez. 2002.

KONG, L. D.; ZHANG, Y.; PAN, X.; TAN, R. X.; CHENG, C. H. Inhibition of xanthine oxidase by liquiritigenin and isoliquiritigenin isolated from *Sinofranchetia chinensis*. **Cellular and Molecular Life Science**, Basel, v.57, n.1, p. 500-505, 2000.

KOO, H.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; AMBROSANO, G. M. B.; MURATA, R. M.; YATSUDA, R.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M.; PARK, Y. K. Effect of a new variety of *Apis mellifera* propolis on mutants *Streptococci*. **Current Microbiology**, New York, v. 41, n. 3, p. 192-196, 2000b.

KOO, H.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; SATTLER, A. Effect of *Apis mellifera* propolis from two brazilian regions on caries development in desalivated rats. **Caries Research**, Basel, v. 33, n. 5, p. 393-400, 1999.

KOO, H.; SMITH, A. M. V.; BOWEN, W. H.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; PARK, Y. K. Effects of *Apis mellifera* propolis on the activities of Streptococcal glucosyltransferases in solution and adsorbed onto saliva-coated hydroxyapatite. **Caries Research**, Basel, v. 34 n. 5, p. 418-426, 2000a.

KOO, H.; ROSALEN, P.L.; CURY, J.A.; PARK, Y.K.; BOWEN, W.H. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Detroit, v.46, n.5, p.1302-1309, 2002.

KROL, W.; SCHLLER, S.; SHANI,J.; PIETSZ,G.; CZUBA,Z. Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on the growth of *Staphylococcus aureus*. **Arzneimittelforschung**, Basel, v. 43, n. 5, p.607-609, 1993.

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**, Lausanne, v. 64, n. 3, p. 235-240, Mar.1999.

KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, Barking, v. 84, n. 3, p. 329-339, Feb. 2004.

KUMAZAWA, S.; HAYASHI, K.; KAJILA, K.; ISHII, T.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Studies of the Constituents of Uruguayan propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.50, p. 4777-4782, 2002.

LATIF, M.M.M.A; WINDLE, H.J.; HOMASANY, B.S.; SABRA, K. Caffeic acid phenethyl ester modulates Helicobacter pylori-induced activator protein-1 expression in gastric epithelial cells. **British Journal of Pharmacology**, London, v.146, p.1139-1147, 2005.

LEE, K. W.; LEE, H. J. Biphasic effects of dietary antioxidants on oxidative stress-mediated carcinogenesis. **Mechanisms of Ageing and Development**, Baltimore, v. 127, n. 5, p. 424–431, May, 2006.

LI, F; AWALE, S.; TEKUZA, Y.; KADOTA, S. Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure–activity relationship. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Berlin, p. 181–189, 2008, doi:10.1016/j.bmc.2008.04.016.

LIN, S.C.; HUNG, C.Y.; HIANG, C.L.; HSU, S.H. The influence of propolis ethanol extract on liver microsomal enzymes and glutathione after chronic alcohol administration. **American Journal of Chinese Medicine**, New York, v.27, p.83-93, 1997.

LOPES, R. M., OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; PINTO, A. S. Flavonóides. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 17, n.1, p. 18-22, 2000.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The systematic identification of flavonoids**. Berlin:Springer-Verlag, 1970. 354p.

MACHADO, L.M.V. **Estudo fitoquímico das raízes de *Platycyamus regnelli***. 2000, 103p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

MACIEJEWICZ, W. Isolation of flavonoids aglycones from propolis by a column chromatography method and their identification by GC-MS and TLC methods. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, New York, v.24, n.8, p.1171-1179, 2001.

MAGIATIS, P., MELLIU, E., SKALTSOUNIS, A-L., CHINO, I., MITAKU, S. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Pistacia lentiscus* var. *chia*. **Planta Medica**, Basel, v. 65, p.749–752, 1999.

MARCUCCI, M.C. **Formulações à base de própolis para uso odontológico. Patente BR0105471**, Brasil, 2003.

MARCUCCI, M. C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, Paris, v. 26, n.1, p. 83–99, 1995.

MARCUCCI, M. C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**, São Paulo, v. 19, n. 5, p. 529-536, 1996.

MARCUCCI, M.C. **Typing natural products. Patente EP1575689**, Brasil, 2005.

MARCUCCI, M. C.; FERRERES, F.; GARCIA-VIGUERA, C.; BANKOVA, V. S.; DE CASTRO, S. L.; DANTAS, A. P.; VALENTE, P. H. M.; PAULINO, N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 74, n. 2, p. 105-112, 2001.

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**, Oxford, v. 42, n. 1, p. 205-211, 1996.

MATSUI, T.; EBUCHI, S.; FUJISE, T. ABESUNDARA, K.J.M.; DOI, S.; YAMADA, H.; MATSUMOTO, K. Effects of Water-Soluble Fraction of Brazilian Propolis and Its Bioactive Constituent, 3,4,5-Tri-O-caffeoylquinic Acid. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 27, n.11, p. 1797 – 1803, 2004.

MATSUDA, S.H. Propolis - health care food. **Foods and Foods Ingredients**, Tokyo, v.1, n.160, 64-73, 1994.

MELLIYOU, E.; STRATIS, E.; CHINOI, I. Volatile constituents of propolis from various regions of Greece – Antimicrobial activity. **Food Chemistry**, New York, v.103, p. 375–380, 2007.

O MERCADO. Disponível em:<http://www.uniflora.ind.br/conteudo/omercado.asp>
Acesso em: 09 maio 2008.

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

MURATA, R. M.; KOO, H.; GONCALVES, R. B.; CURY, J. A.; YATSUDA, R.; ROSALEN, P. L. Antimicrobial potential of propolis from brazilian regions against periodontopathogenic microorganisms. **Journal of Dental Research**, Chicago, v. 82, n.1, p. 234-234, 2003.

NAGAOKA, T., BANKSOTA, A.H.; TEKUZA, Y.; MIRIDORIKAWA, K.; KADOTA, S.; Caffeic acid phenethylester analogues: potent nitric oxide inhibitors from the Netherlands propolis. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v.26, n.4, p.487-491, 2003.

NAGAI, T.; INOUE, R.; INOUE, H.; SUZUKI, N. Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. **Food Chemistry**, New York, v. 80, n. 1, p. 29-33, 2003.

NEGRI, G.; SALATINO, M. L. F.; SALATINO, A. "Green propolis": unreported constituents and a novel compound from chloroform extracts. **Journal of Apicultural Research**, London, v. 42, n. 3, p. 39-41, 2003.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Products Report**, Cambridge, v. 17, n.1, p. 215-234, 2000.

NEWMAN D. J.; CRAGG, G. M.; HOLBECK, S.; SAUSVILLE, E. A. Natural products and derivatives as leads to cell cycle pathway targets in cancer chemotherapy. **Current Cancer Drug Targets**, New York, v. 2, p. 279-308, 2002.

NOTHENBERG, M. Própolis enfrenta bem o desafio das pesquisas. **Química e Derivados**, São Paulo, v. 348, n.1, p. 24-28, 1997.

OLDONI, T.L.C. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera***. 2007, 104p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

OLIVEIRA, A.C. **Estudo Fitoquímico de Leguminosas: *Harleyodendron unifoliolatum* e *Holocalyx balansae***. Isolamento, determinação estrutural e atividade biológica. 2005, 233p. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

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

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M.; MOURA, F. F. Evaluation of brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. **Honey Bee Science**, Tokyo, v. 21, n.2, p. 85-90, 2000.

PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ABREU, J.S.; ALCICI, N.M.F. Estudo da preparação dos extratos da própolis e suas aplicações. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.18, n.3, 1998.

PARK, Y. K.; KOO, M. H.; IKEGAKI, M.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L. Effects of propolis on *Streptococcus mutants*, *Actinomyces naeslundii* and *Staphylococcus aureus*. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 29, n.1, p. 143-148, 1998b.

PARK, Y. K.; KOO, M. H.; IKEGAKI, M.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; ABREU, J. A. S. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. **Current Microbiology**, New York, v. 36, n. 1, p. 24-28, 1998a.

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**, Easton, v. 52, n. 5, p. 1100-1103, 2004.

PARK, J.H.; LEE, J.K.; KIM, H.S.; CHUNG, S.T.; EOM, J.H.; KIM, K.A.; CHUNG, S.J.; PAIK, S.Y.; OH, H.Y. Immunomodulatory effect of caffeic acid phenethyl ester in Balb/c mice. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v.4, n.3, p.429-436, 2004.

PAULINO, N.; DANTAS, A.P.; BANKOVA, V.; LONGHI, D.T.; SCREMIN, A.; CASTRO, S.L.; CALIXTO, J.B. Bulgarian propolis induces analgesic and anti-inflammatory effects in mice and inhibits in vitro concentration of airway smooth muscle. **Journal of Pharmacological Sciences**, Tokyo, v.93, n.3, p.307-313, 2003.

PEPELJNJAK, S.; KOSALEC, I. Galangin expresses bactericidal activity against multiple-resistant bacteria: MRSA, *Enterococcus* spp. and *Pseudomonas aeruginosa*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 240, p. 111–116, 2004.

PEREIRA, C.S.; CARVALHO, S.J. **Produtos apícolas (extrato etanólico de própolis e mel) e seus usos como fungicida no controle de doenças de plantas e nutriente foliar para plantas e fonte de carboidratos. Patente BRPI0502448**, Brasil, 2006.

PEREIRA, A. S.; SEIXAS, F.R. M. S.; NETO, F.R.A. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 321 – 326, 2002.

PEREIRA, F. M., LOPES, M. T. R., CAMARGO, R. C. R.; OLIVEIRA, V, S. L. Produção de mel. **Embrapa Meio-Norte - Sistema de Produção**, Teresina, v. 3, n.1, 2003.

PETERSON, J.; DWYER, J. Flavonoids: dietary, occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**, New York, v. 18, n. 12, p. 1995-2018, 1998.

PICCINELLI, A.N.; FERNANDEZ, M.C.; CUESTA-RUBIO, O.; HERNÁNDEZ, I.M.; SIMONE, F.; RASTRELLI, L. Isoflavonoids isolated from Cuban Propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.53, n.1, p.9010-9016, 2005.

PRACHAYASITTIKUL, S.; BURAPARUANGSANG, A. P.; WORACHARTCHEEWAN, A.; ISARANKURA-NA-AYUDHYA, C.; RUCHIRAWAT, S.; PRACHAYASITTIKUL, V. Antimicrobial and antioxidative activities of bioactive constituents from *Hydnophytum formicarum* Jack. **Molecules**, Basel, v.13, n.1, p.904-921, 2008.

PUBMED. Disponível em: www.pubmed.gov. Acesso em: 20 jun. 2008.

ROSALEN, P. L.; MURATA, R. M.; YATSUDA, R. DUARTE, S.; GONCALVES, R. B.; KOO, H.; CURY, J. A. Effect of propolis from eight Brazilian regions on oral microorganisms. **Journal of Dental Research**, Chicago, v. 81, p. A 349-A 349, 2002.

SALATINO, A.; TEIXEIRA, E.W.; NEGRI, G.; MESSAGE, D. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2, n.1, p.33-38, 2005.

SALOMÃO, K.; DANTAS, A.P.; BORBA, C.M.; CAMPOS, L.C.; MACHADO, D.G.; AQUINO NETO, F.R.; CASTRO, S.L. Chemical composition and microbicidal activity of extracts from Brazilian and Bulgarian propolis. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.38, n.1, p. 87-92, 2004.

SATO, M., TANAKA, H., YAMAGUCHI, R., OH-UCHI, T., ETOH, H. Erythrina poeppigiana-derived phytochemical exhibiting antimicrobial activity against *Candida albicans* and methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford. v. 37, n.1, p. 81-85, 2003.

SAWAYA, A.C.H.F.; SOUZA, K.S.; MARCUCCI, M.C.; CUNHA, I.S.; SHIMIZY, M.T. Analysis of the composition of Brazilian própolis extracts by chromatography and evaluation of their in vitro activity against gram-positive bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.35, n.1-2, 2004.

SERRA BONVEHÍ, J.; SOLIVA TORRENTÓ, M.; CENTELLES LORENTE, E. Evaluation of polyphenolic and flavonoid compounds in honeybee-collected pollen produced in Spain. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.9, p.1848-1853, 2001.

SFORCIN, J. L.; FERNANDES JR, A.; LOPES, C. A. M.; BANKOVA, V.; FUNARI, S. R. C. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.73, p. 243-249, 2000.

SFORCIN, J.M.; ORSI, R.O.; BANKOVA, V. Effect of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.98, n.3, p.310-305, 2005.

SHIBUYA, T.; OKU, K.; AGA, H.; FUKUDA, S. **Propolis extract. US Patent, 6.153.228**, 2000.

SILICI, S.; KUTLUCA, S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 99, n.1, p. 69-73, 2005.

SILVA, B. B.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; IKEGAKI, M.; SOUZA, V. C.; ESTEVES, A.; ALENCAR, S.M. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Oxford, v.4, n.1, p.1- 4, 2007.

SILVA, M.S.S.; CITÓ, A.M.G.L.; CHAVE, M.H.; LOPES, J.A.D. Triterpenóides tipo cicloartano de própolis de Teresina-PI. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 5, 2005.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 15, n.1, p. 71-81, 2002.

SONG, Y.S.; JIN, C.; JUNG, K.J.; PARK, E.H. Estrogenic effects of ethanol and ether extracts of própolis. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.82, n.2-3, p.89-95, 2002a.

SONG, Y.S.; PARK, E.H.; JUNG, K.J.; JIN, C. Inhibition of angiogenesis by propolis. **Archives of Pharmacal Research**, London, v.25, n.4, p. 500-504, 2002b.

TAKAHASHI, T.; TAKASUKA, N.; IIGO, M.; BABA, M.; NISHINO, H.; TSUDA, H.; OKUYAMA, T. Isoliquiritigenin, a flavonoid from licorice, reduces prostaglandin E2 and nitric oxide, causes apoptosis, and suppresses aberrant crypt foci development. **Cancer Science**, San Francisco, v. 95, n.1, p. 448-453, 2004.

TAYLOR, P.W.; STAPLETON, P.D.; PAUL, L.J. New ways to treat bacterial infections. **Drug Discovery Today**, New York, v.7, n.1, p. 1086-1091, 2002.

TAZAWA, S.; WARASHINA, T.; NORO, T.; MIYASE, T. Studies on the constituents of Brazilian propolis. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Oxford, v. 46, n. 9, p. 1477-1479, 1998.

TEIXEIRA, E.W.; MESSAGE, D.; NEGRI, G.; SALATINO, A. Bauer-7-en-3 β -yl acetate: a major constituent of unusual samples of Brazilian propolis. **Química Nova**, São Paulo, v.29, n.2, p. 245-246, 2006.

TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; GARCÍA-VIGUERA, C.; VIT-OLIVIER, P.; FERRERES, F.; TOMÁS-LORENTE, F. Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. **Phytochemistry**, Oxford, v. 34, n. 1, p. 191-196, 1993.

TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; NAYDENSKI, H.; TSVETKOVA, I.; RODRIGUEZ, J.G.; BANKOVA, V. New polyisoprenylated benzophenones from Venezuelan propolis. **Fitoterapia**, Milano, v.75, n.1, p.683-689, 2004.

TRUSHEVA, B.; POPOVA, B.; BANKOVA, V.; SIMOVA, S.; MARCUCCI, M.C.; MIORIN, P.L.; PASIN, R.F.; Bioactive constituents of Brazilian red propolis, **Evidence based Complementary and Alternative Medicine**, Oxford, v.3, p.249-254, 2006.

TZIORTZIS, J.F. **Dispositivo coletor de própolis acoplado à colméia de abelhas, Patente BR7800804 U**, Brasil, 2002.

UZEL, A.; SORKUN, K.; ONÇAG, O.; ÇOGULU, D.; GENÇAY, O.; SALIH, B. Chemical composition and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. **Microbiological Research**, Jena, v.160, n.1, p.189-195, 2005.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. M. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. Berlin: Springer-Verlag, 1984. 394p.

WANG, B. J.; LIEN, Y. H.; YU, Z. R. Supercritical fluid extractive fractionation – study of the antioxidant activities of propolis. **Food Chemistry**, Barking, v. 86, p. 237-243, 2004.

WEGENER, J. W.; NAWRATH, H. Cardiac effects of isoliquiritigenin. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 396, n.1, p. 37-44, 1997.

WOLLENWEBER, E.; BUCHMANN, S.L. Feral honey bees in the Sonoran Desert: propolis sources other than poplars (*Populus* spp.) **Zeitschrift fur Naturforschung C**, Tübingen, v. 52, n. 7/8, p. 530-535, 1997.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal Apicultural Research**, London, v. 37, n. 2 p. 99-105, 1998.

YAYLI, N.; ÜÇÜNCÜ, O.; AYDIN, E.; GÖK, Y.; YASAR, A.; BALTACI, C.;
YILDIRIM, N.; KÜCÜK, M. Stereoselective photochemistry of heteroaryl chalcones in solution and the oxidant activities. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: chemistry**, Lausanne, v. 169, n.1, p. 229-234, 2005.

YANG, G.; WANG, R. A. The supercritical fluid extractive fractionation and the characterization of heavy oils and petroleum residua. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, Amsterdam, v. 22, n. 1/3, p. 47–52, 1999.

ZHENG, Z. P.; CHENG, K. W.; CHAO, J.; WU, J.; WANG, M. Tyrosinase inhibitors from paper mulberry (*Broussonetia papyrifera*). **Food Chemistry**, Barking, v.106, n.2, p.529-35, 2008.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)