1. INTRODUÇÃO

Própolis é um material resinoso produzido por *Apis mellifera*, constituído de exsudatos coletados de plantas e substâncias produzidas pelas abelhas (ceras), além de quantidades pequenas de aminoácidos, açúcares, pólen e outros compostos em pequenas quantidades (Ghisalberti 1979; Gabrys et al. 1986; Greenaway et al. 1990; Marcucci 1995; Bankova 2000). Na colméia, esse material é utilizado para diversos fins, como vedar aberturas no ninho e prevenir a decomposição de invasores mortos (Negri et al. 1998).

As abelhas coletam com suas mandíbulas partículas resinosas de gemas, brotos e pecíolos das folhas de diferentes espécies vegetais, que na colméia são misturados a compostos salivares das abelhas para a elaboração da própolis. Sua produção anual (100-300 g/colméia) varia em função da linhagem de abelhas, clima, flora e mecanismos de coleta (Krell 1996; Lin et al. 1999).

Graças ao seu conteúdo de óleos voláteis, a própolis é aromática e, dependendo de sua origem botânica e época de coleta, difere na coloração (de amarelo claro a castanho escuro e até vermelho), sabor (amargo, ligeiramente picante ou mesmo insípido) e consistência (Krell 1996; Cañas 2002; Bracho 2003).

Reportada como componente da medicina tradicional desde 300 a.C., a própolis tem sido amplamente utilizada por diferentes culturas e

com diversas finalidades, entre elas as medicinais (Krell 1996; Burdock 1998; Cañas 2002). Atualmente, é constituinte de cosméticos, alimentos e outros produtos (Matsuda 1994; Wollenweber e Buchmann 1997; Banskota et al. 2001a; Bracho 2003) apresentando muitas propriedades biológicas, como atividade antibacteriana (Moreno et al. 1999), antioxidante (Scheller et al. 1990; Yamauchi et al. 1992; Pascual et al. 1994; Basnet et al. 1997; Moreno et al. 2000), antitumoral (Matsuno 1995), antiinflamatória (Wang et. al. 1993) antifúngica (Kujumgiev et al. 1999), antiviral (Ghisalberti, 1979; Manolova et al. 1985; Amoros et al. 1992; Marcucci 1995; Kujumgiev et al. 1999) e hepatoprotetora (Banskota et al. 2001b). Comenta-se que criadores de abelhas mastigam própolis para tratar de infecções bucais e do trato digestório superior (Moreno et al. 1999).

Com o desenvolvimento da química farmacêutica, assim como ocorreu com os tratamentos fitoterápicos, a própolis deixou de ser tão utilizada. Entretanto, desde a década de 50 estudos têm sido realizados para identificar seus componentes e propriedades biológicas. Os primeiros trabalhos foram conduzidos com própolis de regiões temperadas, nas quais existem pronunciadas quantidades de flavonóides (Lavie 1968).

Recentemente, observa-se um ressurgimento de seu uso e atualmente são investigadas as suas ações, efeitos, e possíveis utilizações na biologia e medicina, entre os quais se destaca a aplicação como suplemento dietético e na indústria farmacêutica (Krell 1996; Burdock 1998; Banskota et al. 2001b; Bracho 2003).

Apesar da composição variada e ainda incompletamente conhecida, pode-se dizer que a própolis é composta de uma fração representada por cera (produzida pelas abelhas), uma fração resinosa e outra volátil (provenientes de material vegetal coletado pelas operárias) (Park et al. 2000). A cera pode ser obtida da própolis por extração a quente com etanol, seguida de resfriamento do extrato (Negri et al. 1998; Woisky e Salatino 1998) ou por extração com clorofórmio (Negri et al. 2000b). As composições da cera da própolis e do ninho são muito semelhantes, indicando uma origem comum (secreção pelas abelhas) para os dois tipos de cera (Negri et al. 2000a).

A fração volátil pode ser obtida por arraste de vapor d'água em extrator de Clevenger. Ela contém monoterpenos e sesquiterpenos freqüentemente encontrados em óleos voláteis de plantas (Marcucci 1995).

De fato, a composição da própolis é muito complexa e variada em função da diversidade fitogeográfica das áreas de coleta, que fornecem informações úteis sobre suas propriedades, origem botânica e localização geográfica (Marcucci et al. 2000; Wu e Ye *e*et al. 2000).

1.1. Composição química

Nas zonas temperadas a maior parte da própolis procede de exsudatos de gemas de espécies pertecentes ao gênero *Populus*. Na zona

setentrional da Rússia, as abelhas coletam resina dos brotos de *Betula verrucosa* e *P. tremula* (Wollenweber e Buchmann 1997; Bankova 2000), nas regiões mediterrâneas de *Populus nigra* e folhas de *Cistus* spp. (Martos et al. 1997), no Brasil de ápices caulinares de *Baccharis dracunculifolia* (Bankova 2000; Kumazawa et al. 2003), na Venezuela e em Cuba da resina floral de plantas do gênero *Clusia* (Cuesta-Rubio et al. 2002) e em outras áreas tropicais são obtidas de outros vegetais (Wollenweber e Buchmann 1997).

Própolis turcas (Sorkun et al. 2001), egípcias (Hegazi et al. 2001e 2002), brasileiras (Murat et al. 2002; Park et al. 2002; Cuesta-Rubio et al. 2002), chilenas (Muñoz et al. 2001 a, b) e cubanas (Cuesta-Rubio et al. 2002) têm procedências botânicas distintas e possuem constituintes característicos que poderiam ser utilizados para a identificação de sua fonte botânica.

Nas própolis européias, o conteúdo de fenóis totais, principais responsáveis pela maioria de suas propriedades farmacológicas, representa mais da metade dos 160 compostos identificados (Menghinello et al. 1999; Bankova 2000), com destaque para os flavonóides aglicônicos que são os polifenóis mais freqüentes nessas amostras de própolis (Bankova 2000). Entretanto, algumas amostras suíças e italianas possuem composições incomuns, com conteúdos de benzil *p*-cumarato e benzil ferulato bastante altos (>5%), relativa escassez de compostos fenólicos e ausência de alguns compostos típicos (pinobanksina e prenil-cafeatos) da

própolis procedente de *P. nigra* (Bankova et al. 2002).

As amostras de própolis brasileiras mais procuradas e estudadas têm coloração verde-escura, são duras e friáveis, e possuem odor resinoso. São conhecidas como "própolis verde" ou "própolis de alecrim", porque são produzidas principalmente de material que as abelhas coletam de espécies de *Baccharis* (Asteraceae), conhecidas popularmente como alecrim. A origem da própolis verde a partir de gemas vegetativas de *Baccharis* explica a pequena quantidade de flavonóides e a predominância de fenilpropanóides prenilados (Banskota et al. 1998, 2001a; Negri et al. 2003), que foram também obtidos de espécies de *Baccharis* (Marcucci et al. 2001; Kumazawa et al. 2003). Segundo Bankova et al. (2000), estudos sobre a própolis são necessários para determinar a composição química, bem como os compostos biologicamente ativos, além de fontes vegetais de própolis de diferentes regiões geográficas.

A própolis vermelha brasileira é produzida no nordeste do país, na região de Maceió (AL). Trusheva et al. (2006) relataram para uma amostra dessa própolis atividades antioxidante contra o radical estável DPPH e antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. Os autores também identificaram 14 compostos (seis deles inéditos em própolis), entre eles fenóis simples, triterpenóides, isoflavonóides, benzofenonas preniladas e a epóxido-naftoquinona, que pela primeira vez foi isolada de uma fonte natural.

Até agora, existem poucos dados sobre a própolis vermelha. Boa parte deles se refere às amostras produzidas em Cuba e na Venezuela. Os estudos realizados até o presente momento enfatizam a presença de benzofenonas preniladas (Cuesta-Rubio et al. 1999; Trusheva et al. 2004; Hernandez et al. 2005). O extrato etanólico de própolis vermelha cubana foi reportado como hepatoprotetor antes mesmo das análises químicas supracitadas terem sido realizadas (González et al. 1995).

Muitos dos extratos e compostos isolados de própolis têm apresentado atividades biológicas, principalmente contra bactérias, fungos e vírus (Marcucci 1995).

1.2. Atividade antimicrobiana

Até a década de setenta, as propriedades antimicrobianas de própolis foram amplamente documentadas em publicações sobre amostras européias. Tais trabalhos reportavam maior atividade de própolis contra bactérias Gram-positivas do que Gram-negativas (Lepekhin et al. 1970). Os extratos de própolis mostraram-se mais eficazes contra cocos Gram (+) (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* β-hemolíticos) e apresentaram atividade contra algumas cepas Gram (-), como *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (Keskin et al. 2001).

Nessa mesma época, ficou comprovado que extratos alcoólicos de própolis foram ativos contra muitos dermatófitos em diversas concentrações, além de serem antivirais e antiprotozoários eficazes contra

Toxoplasma gondii e *Trichomonas vaginalis* (Starzyk et al. 1970).

Devido às suas propriedades antisépticas, muitos preparados de própolis já eram recomendados nessa época. Dentre eles pode-se destacar a solução etanólica de própolis a 10%, utilizada em procedimentos cirúrgicos dentários para desinfecção das mãos do cirurgião (Rode et al. 1977).

Atualmente, sabe-se que a própolis é ativa contra numerosos microrganismos, como *Bacillus larvae*, *B. subtilis*, Bacilo de Koch, *Staphylococcus aureus*, *Streptomyces sobrinus*, *S. mutans*, *S. cricetus*, *Saccharomyces cereviseae*, *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Shigella*, *Giardia lamblia*, *Bacteroides nodosos* e *Klebsiella pneumoniae* (Krell 1996; Moreno, Mirzoeva et al. 1997; Min et al. 1999), incluindo alguns (*Streptococcus pyogenes*) resistentes a antibióticos (Mirzoeva et al. 1997; Moreno, Min et al. 1999). Por outro lado, alguns estudos (Mirzoeva et al. 1997; Heinze et al. 1998) indicam que os efeitos bacteriostáticos ou bactericidas da própolis dependem da dose, já que bactérias aeróbias Gram (-) também são inibidas por concentrações superiores a 28 mg/mL. Resumindo, os extratos de própolis inibem significativamente a maioria dos microrganismos, em especial as espécies de *Actinomyces* (Koo et al. 2000).

Os solventes e o método de extração utilizado podem modificar a atividade antimicrobiana da própolis (Krell 1996; Tosi et al. 1996). Os extratos etanólicos a 60-80% inibem o crescimento microbiano, a 70-80% possuem maior atividade e a 80% inativam majoritariamente a

hialuronidase (Park et al. 1998). Os extratos aquosos induzem uma proteção específica contra bactérias Gram (-) como *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (Krell 1996) e tanto os extratos etanólicos quanto os aquosos são ativos contra periodontite bacteriana, provavelmente graças ao efeito sinérgico de vários compostos (Santos et al. 2002).

A própolis tem sido analisada em muitos bioensaios e as amostras contendo altas concentrações de flavonóides são freqüentemente reportadas devido à sua atividade antibacteriana (Pepeljnjak et al. 1982; Grange et al. 1990; Cheng et al. 1996; Park et al. 1998; Bosio et al. 2000). Alguns compostos da própolis como os flavonóides (quercetina, galangina e pinocembrina) e os ácidos caféico, benzóico e cinâmico, provavelmente atuam na membrana bacteriana ou em sítios da parede celular, causando danos estruturais ou funcionais (Marcucci 1995; Cook e Samman 1996; Mirzoeva et al. 1997; Gatto et al. 2002).

Alguns pesquisadores têm reportado sinergismo entre flavonóides de ocorrência natural e outros agentes antimicrobianos contra cepas de bactérias resistentes. Dentre eles pode-se destacar o galato de epicatequina (Hamilton-Miller et al. 2000; Stapleton et al. 2004).

Flavonóides, ácido cinâmico e seus derivados e triterpenóides foram testados contra cepas mutantes de *Streptococcus*. Os resultados mostraram que flavonas e flavonóis foram potentes inibidores do crescimento bacteriano (Koo et al. 2002).

Muitos outros compostos apresentaram atividade antibacteriana contra gêneros de bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus* e *Streptococcus* e Gram-negativas como *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa.* Dentre eles destacam-se os ácidos graxos, sesquiterpenos, compostos aromáticos (Keskin et al. 2001) e derivados prenilados de ácidos cinâmicos, como o ácido 2,2-dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano, ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico e 2,2-dimetil-6-carboxietenil-8-prenil-2H-1-benzopirano, obtidos de amostras de própolis brasileira (Aga et al. 1994; Marcucci 2000).

Outros grupos de compostos também apresentaram atividade antibacteriana, como diterpenos glicosídicos *ent*-8(17)-labden-15-O-alpha-L-ramnosideo e *ent*-8(17)-15-O-(3-O-acetil)-alpha-L-ramnosideo (primeiros glicosídeos relatados em própolis) isolados da própolis de El Salvador (Popova et al. 2001) e os ésteres de ácidos fenólicos, especialmente cafeatos e ferulatos (Metzner et al. 1979; Serkedjieva et al. 1992; Kujumgiev et al. 1993).

Extratos brutos de própolis também foram responsáveis por pronunciada atividade antimicrobiana contra cepas de *Candida in vitro* (Hegazi et al. 2002) e em infecções causadas por esse patógeno em portadores de HIV, utilizando extratos hidroalcoólicos (Ota et al. 2001)

Extratos de própolis turca apresentaram significativa atividade antimicrobiana. Nesse trabalho foram utilizados porcos-da-Índia com tuberculose induzida como modelo experimental. Observou-se que os

animais tratados com extratos aquosos de própolis apresentaram menor área necrosada (Yildirim et al. 2004).

Além dos extratos brutos, compostos isolados como meliferona e três triterpenoides já conhecidos (ácido morônico, ácido avuvezônico e ácido betulônico) isolados de própolis brasileira, foram testados para atividade anti-HIV em linfócitos H9. O ácido morônico mostrou significativa atividade anti-HIV e foi modificado para desenvolvimento de agentes anti-AIDS mais potentes (Ito et al. 2001).

Ao estudar a atividade antibacteriana (*Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*), antifúngica (*Candida albicans*) e antiviral (*Avia infuenza*) de amostras de própolis de diferentes origens geográficas, comprova-se que todas são ativas frente a cepas Gram (+) e muitas delas também o são frente ao vírus *influenza*. Nas amostras de regiões temperadas, essa atividade é atribuída aos ésteres e ácidos fenólicos, componentes que são menos encontrados em própolis de origem tropical, mas que apesar disso mostram uma atividade similar devido à presença de derivados prenilados do ácido *p*-cumárico (Kujumgiev et al.1999; Bankova 2000). Outros compostos atribuídos à riqueza da flora tropical podem ser reportados como antimicrobianos (Salatino et al. 2005), devido à sua contribuição para desorganização estrutural do microrganismo, através do processo de oxidação (Trabulsi e Altherthun 2005), que também está envolvido em casos de danos celulares em humanos (Russo et al. 2002).

1.3. Atividade antioxidante

Espécies reativas de oxigênio (ERO) potencialmente danosas são produzidas continuamente nas células como conseqüência do metabolismo aeróbio normal (reações bioquímicas oxidativas) e dos fatores ambientais (Russo et al. 2002). Esses radicais livres (ex: OH. - radical hidroxila) são usualmente removidos ou inativados *in vivo* por enzimas antioxidantes endógenas, como a superóxido dismutase (SOD), peroxidase e compostos de baixo peso molecular como tocoferol, ácido ascórbico e polifenóis (Nagai et al. 2001). Os antioxidantes de defesa têm função de prevenir contra a geração de ERO, destruição de potenciais antioxidantes e degradação das ERO formadas. Dessa forma, os danos teciduais induzidos pelo stress oxidativo são mínimos (Benzie 1996). De qualquer forma, as ERO se tornam danosas quando produzidas em excesso sob certas condições anormais, como inflamação, isquemia e na presença de íons catalíticos (ex: Fe^{2+}). Sob essas condições, os antioxidantes endógenos (ex: glutation reduzido) podem ser insuficientes para conter a formação de ERO. Elas podem causar dano celular pela peroxidação de lipídios da membrana, inativação de enzimas sulfidrilas, ligações entrecruzadas de proteínas ou quebra de DNA (Russo et al. 2002). Esses danos podem estar envolvidos na etiologia de várias doenças, como doença cardíaca coronária, inflamação, doenças neurodegenerativas (Parkinson e Alzheimer), câncer e intoxicação por etanol (Benzie 1996; Russo et al. 2002).

Por isso, a ingestão de antioxidantes através da dieta tem uma importante função na prevenção de doenças (Van den Berg 1999).

Um antioxidante biológico é definido como "qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparado ao substrato oxidável, reduz ou previne significativamente a oxidação desse substrato" (Benzie 1996).

Vários autores relatam que algumas propriedades biológicas, particularmente a atividade antioxidante, em extratos etanólicos de própolis, se devem em parte ao alto teor de flavonóides (Moreno et al. 2000; Nagai et al. 2003). Os flavonóides afetam a atividade de uma série de sistemas. Eles inibem a atividade de enzimas envolvidas na conversão de ácidos graxos poliinsaturados de membrana, para ativar mediadores de fosfolipase A_2, ciclooxigenase e lipooxigenas e possuem também a propriedade de bloquear os radicais livres (Nagai et al. 2003). O seqüestro de radicais livres gerados pelos neutrófilos em processos inflamatórios pode ser um mecanismo importante para a atividade antiinflamatória (Moreno et al. 2000).

Pascual et al. (1994) relataram que a propriedade antioxidante da própolis (0,6 – 9,5 μg/mL) pode ser atribuída a sua atividade antiradicalar contra radicais alquila e em um grau menor contra o ânion superóxido. Nagai et al. (2001) observaram a atividade antioxidante de amostras de mel, geléia real e própolis baseando-se no sistema de peroxidação lipídica. Seqüencialmente, Nagai et al. (2003) verificaram atividade antioxidante

alta, utilizando-se do mesmo modelo de peroxidação lipídica para os extratos aquosos de própolis, sendo que nas concentrações de 1 e 5 mg/mL essa atividade foi maior do que a do ácido ascórbico a 5 mM. A atividade de seqüestro dos radicais livres desses extratos também foi alta, e em concentrações de 50 a 100 mg/mL houve a inibição da produção de superóxidos e dos radicais hidroxila. Os radicais hidroxila são conhecidos por abstrair átomos de hidrogênio de membranas e ocasionar reações de peroxidação lipídica. Por isso, extratos aquosos de própolis seriam efetivos contra a peroxidação lipídica em biomembranas, interceptando radicais hidroxila e ânions superóxido, em estágios de iniciação e término das reações radicalares (Nagai et al. 2003).

Moreno et al. (2000), evidenciaram que vários extratos etanólicos de própolis Argentina (20 μg/mL) demonstraram atividade antiradicalar analisada através da descoloração do DPPH (2,2-difenil-2-picrildrazila). A atividade antioxidante de extratos etanólicos de própolis de diversas regiões também foi comprovada por Kumazawa et al. (2004), através das metodologias de descoloração do β-caroteno e do radical livre DPPH. Banskota et al. (2000a), relataram a atividade antiradicalar de extratos etanólicos e aquosos de própolis do Brasil, Holanda, Peru e China, sendo os extratos aquosos das própolis do Brasil e da China mais ativos do que os metanólicos, e os extratos metanólicos das própolis da Holanda e Peru mais ativos do que os aquosos.

A atividade antioxidante das amostras de própolis da China, Austrália, Nova Zelândia e Japão foi relacionada à presença de α-tocoferol (Kumazawa et al. 2004). Observou-se que extratos aquosos de própolis do Brasil e da China possuem maior atividade de seqüestrar o radical livre DPPH do que extratos metanólicos correspondentes.

Russo et al. (2002) verificaram que os extratos de própolis com e sem CAPE (éster feniletílico do ácido caféico) são capazes de inibir a formação de ânions superóxidos, produzidos durante a autoxidação do β-mercaptoetanol, mas os extratos de própolis com CAPE mostraram potencial de inibição maior, sugerinfo uma significante contribuição desse composto fenólico na atividade antioxidante da própolis e ficando evidente que CAPE tem uma capacidade de interceptar (degradar) radicais livres maior do que a galangina. A atividade antiradicalar desse tipo de composto também foi avaliada pela metodologia de descoloração do radical DPPH, demonstrando o potencial das amostras frente a um radical livre independente de qualquer ação enzimática (Russo et al. 2002).

As amostras de própolis brasileiras mais comercializadas no mercado internacional são denominadas "própolis verde" e apresentam grande potencial antioxidante. Isso se deve à presença de ácidos fenólicos prenilados, como a artepilina C, um derivado do ácido cinâmico (Hayashi et al. 1999). Apesar de ser menos polar do que o α-tocoferol, a artepilina C apresenta atividade três vezes maior que esse composto em testes de

lipoperoxidação (Uto et al. 2006). Assim, torna-se necessário analisar amostras de própolis para que seja possível assegurar seu emprego alimentício com finalidades terpêuticas agregadas, conforme sugerido por Krell (1996), uma vez que a composição química e o potencial farmacológico da própolis ainda não são completamente conhecidos (Salatino et al. 2005).

Um aspecto muito importante também é determinar as fontes vegetais utilizadas pelas abelhas, para que seja possível otimizar a produção da própolis, inclusive a vermelha do Brasil. Esse processo é facilitado pelo trabalho das abelhas, que para elaborar a própolis, acumulam certas substâncias, tornando-as acessíveis à pesquisa química. Sem a produção de própolis pelas abelhas, certas substâncias que estão sendo isoladas e provavelmente muitas que serão reportadas jamais seriam descobertas, porque somente ocorrem em partes de plantas normalmente não estudadas por fitoquímicos (gemas vegetativas, por exemplo). Tendo em vista a enorme complexidade da composição da própolis, as boas possibilidades de obtenção de substâncias inéditas e o indiscutível potencial farmacológico desse produto apícola, o laboratório de fitoquímica vem há algum tempo dedicando-se a estudos sobre a composição química de própolis produzida no Brasil.

2. OBJETIVOS

Analisar os teores de ceras, fenóis e flavonóides bem como as atividades antioxidante e antimicrobiana do extrato metanólico de uma amostra de própolis vermelha da região de Maceió (AL).

3. MATERIAL E MÉTODOS

A amostra utilizada é oriunda da região de Maceió-AL e foi gentilmente cedida pelo Sr. Henrique da Breyer LTDA. e é dura, friável, possui coloração vermelha, apresenta odor discreto e sabor acre.

Para obter um perfil químico da amostra, foram determinados os teores de fenóis totáis, flavonóides e ceras, baseando-se nos métodos descritos por Woisky & Salatino (1998).

3.1 Extração

2,5 g de própolis foram pulverizados com nitrogênio líquido em grau e pistilo até a obtenção de um fino pó. Fez-se a extração com metanol em extrator Soxhlet até reação negativa ao cloreto férrico a 5%. Os extratos foram então diluídos com metanol a 250 mL em balão volumétrico, e posteriormente utilizados nos ensaios químicos para a determinação dos fenóis totais e flavonóides. As determinações foram feitas em triplicata.

3.1.1 Fenóis totais

Preparou-se uma curva de calibração com soluções de ácido gálico a 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0 e 4,5 μg/mL. De cada solução de referência, uma alíquota de 0,1 mL foi transferida a um balão volumétrico de 50 mL, ao qual foram adicionados 4 mL do reagente de Folin Ciocalteau e 6 mL de solução saturada de carbonato de sódio, sendo o volume final

completado com água destilada. Após duas horas foi feita leitura em 760 nm (Waterman & Mole 1994).

Os procedimentos descritos acima, relativos às soluções de referência, foram usados para as soluções da amostra.

3.1.2 Flavonóides

Empregou-se um método baseado na Farmacopéia Alemã. Soluções metanólicas de quercetina em concentrações de 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0, 10,0, 11,0 e 12,0 μg/mL foram utilizadas como referência. Para 2 mL de solução de referência, 20 mL de metanol e 1 mL de cloreto de alumínio a 5% foram adicionados e o volume completado até 50 mL com metanol. Após 30 minutos as absorbâncias foram medidas em 425 nm. O procedimento foi usado com 3 mL de solução metanólica da amostra.

3.1.3 Ceras

Uma porção de 3 g da amostra previamente pulverizada foi tratada com clorofórmio em extrator Soxhlet durante 6 horas. O extrato foi concentrado à secura sob pressão reduzida, e 250 mL de metanol quente foram adicionados ao resíduo. A mistura foi mantida em ebulição até que houvesse uma solução clara na porção superior e pequena quantidade de resíduo oleoso na porção inferior. A fase metanólica foi filtrada através de papel Whatman nº 1 para um frasco de 150 mL, previamente pesado, evitando a passagem do resíduo oleoso. O filtrado foi então resfriado a

0°C, e o conteúdo novamente filtrado através de papel de filtro Whatman nº1 previamente pesado. Após a secagem em capela, o frasco e o resíduo no papel de filtro foram transferidos ao dessecador até atingirem peso constante (Woisky & Salatino 1998).

3.2 Preparo dos extratos

Foram pesados 50 g de própolis e pulverizou-se após a adição de nitrogênio líquido, com grau e pistilo até a obtenção de um fino pó. Foram realizadas quatro extrações sucessivas de 6 horas em Soxhlet, com *n*-hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol. Todos os extratos obtidos foram concentrados sob pressão reduzida em rotaevaporador.

3.3 Teste de Ação Antimicrobiana

Foram utilizadas cepas-padrões de alta concentração de UFC (Unidades Formadoras de Colônias), originárias de culturas do ATCC ("American type culture collection") adquiridas através do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP) (Tab. 1).

Os microorganismos foram estocados em cultura com glicerol e mantidos a -20°C para preservação até o momento de uso, quando foram ativados em caldo TSB (com exceção de *Candida albicans*, que foi ativada com caldo BHI) para crescimento e mantidos em estufa por 24 horas à temperatura de 37°C.

3.3.1. Método de Macrodiluição em Caldo

Foi utilizada uma modificação do método de Sutter et al. (1979). Em tubos de ensaio contendo 5 mL de Caldo TSB para as cepas de bactérias e caldo BHI para *C. albicans*. Os tubos foram autoclavados por 15 minutos a 121°C e em seguida mantidos em estufa a 37°C por 24 horas, para assegurar sua esterilidade. Em oito tubos, foram depositadas soluções com concentrações em escala exponencial do extrato produzido (8 µg/mL a 2048 µg/mL) e 100 µL do inóculo (previamente ativado) padronizado em 1,5 x 10^{-8} UFC/mL, quantificado segundo a escala 0,5 de McFarland (Konemam et al. 2001). Quatro tubos foram utilizados como controle, sendo 2 controles negativos (tubo com caldo e tubo com caldo e 100 µL do extrato) e 2 controles positivos (um tubo com caldo e 100 µL de microorganismo e o outro com caldo, 100 µL de microorganismo e 50 µL de álcool). Os testes foram realizados em duplicatas e mantidos em estufa por 24 horas a 37°C. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi assumida como a menor concentração com a qual se observou inibição do crescimento.

Os microrganismos dos tubos onde foram detectadas concentrações inibitórias foram semeados em Ágar Mueller Hinton e Ágar Sabourad (este último para *C. albicans*) e incubadas em estufa por 24 horas a 37°C. A Concentração Microbicida Mínima (CMM) foi dada pela menor concentração do extrato com a qual não houve crescimento em placa.

3.4 Teste de atividade antioxidante

A atividade antioxidante do extrato metanólico de própolis foi avaliada através dos métodos de redução de radicais livres e do sistema β-caroteno/ácido linoléico.

3.4.1 Redução do radical livre DPPH

Usou-se o método de Brand-Williams (1995) para redução do radical estável DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila). Uma solução metanólica de DPPH a aproximadamente 20mg/mL foi preparada de forma a apresentar absorbância entre 0,7 e 0,8 em 517 nm.

Foram preparadas soluções metanólicas a 1mg/mL, tanto do extrato metanólico de própolis vermelha, quanto da amostra de referência, representada pelo flavonóide glicosídico rutina. Tais soluções foram consideradas "estoque", e a partir delas foram realizadas diluições para obtenção das três concentrações utilizadas no teste: 25 μg/mL 12 μg/mL e 8 μg/mL. Em tubos de ensaio foram depositados 400 μL das soluções da amostra, e em outros tubos o mesmo volume de soluções para a referência. Em seguida, com intervalos de 2 minutos entre cada amostra, 800 μL da solução de DPPH foram adicionados a cada tubo. Todos os tubos contendo a mistura reativa foram mantidos no escuro durante vinte minutos. A leitura das absorbâncias foi então feita em 517 nm. A absorbância das amostras (Abs amostra), e a absorbância do controle (Abs branco da amostra), e a absorbância da solução de DPPH são

usadas para cálculo da porcentagem de redução de radicais livres da amostra (Ram):

% Ram= [1-(Abs amostra – Abs branco amostra) / Abs DPPH]*100

Analogamente, calcula-se a porcentagem de redução de radicais livres da referência:

% Ref= [1-(Abs referência – Abs branco referência) / Abs DPPH]*100

3.4.2 Sistema β-caroteno/ácido linoléico

A avaliação da ação antioxidante do extrato metanólico de própolis vermelha foi realizada segundo a metodologia proposta por Koloeva et al. (2002), com modificações.

Para o preparo da solução reativa, foram adicionados 12,5 μL de ácido linoléico, 100 mL de Tween 40 e 1 mL de uma solução clorofórmica de β-caroteno a 0,2 mg/mL em *erlenmeyer*. Após a evaporação completa do clorofórmio sob nitrogênio, foram adicionados 12,5 mL de água previamente saturada com oxigênio durante 30 minutos e agitou-se a solução em vórtex. A solução reativa assim preparada ficou límpida e apresentou absorbância entre 0,8 e 0,9 nm em 470 nm.

O extrato metanólico da amostra testada foi diluído em metanol em três concentrações: 1mg/mL, 1,5 mg/mL e 2 mg/mL. Para efeito de comparação dos resultados obtidos, foi utilizada uma solução metanólica de rutina como referência, nas mesmas concentrações da amostra testada.

A análise foi feita utilizando-se cubetas plásticas. Em cada cubeta foram colocados 1000 μL da solução reativa e em seguida adicionados 120 μL da amostra. As leituras das absorbâncias foram realizadas em 470 nm com intervalos de 30 minutos, até o final do experimento, que durou 120 minutos.

A manutenção da coloração da solução reativa indica que a amostra impediu a oxidação do β-caroteno pelo ácido linoléico. Ao final do experimento avalia-se a queda ou não da absorbância da solução contendo a amostra (Abs_a) em 120 minutos, e o mesmo é feito para a solução reativa sem amostra (Abs_b). Os resultados foram expressos em coeficiente de antioxidação (CAO), através da fórmula:

$$CAO = (Abs_a - Abs_b \ / \ Abs_{t0} - Abs_b) * 100$$

Em seguida os valores obtidos foram utilizados para expressar a atividade antioxidante em porcentagem (% AAO), através da relação entre CAO da amostra e CAO da referência, conforme a seguinte fórmula:

$$\%AAO = (CAO\ amostra \ / \ CAO\ padrão) * 100x$$

Tabela 1. Cepas utilizadas para o teste de ação antimicrobiana.

Microrganismos	Origem
Bacillus subtilis	Isolado clinico (ICB/USP)
Enterococcus faecalis	Isolado clínico (ICB/USP)
Escherichia coli	ATCC - 25922 / IAL - 339
Klebisiella pneumoniae	ATCC - 13883 / IAL - 1920
Proteus mirabilis	Isolado clínico (ICB/USP)
Pseudomonas aeruginosa	ATCC - 10145 / IAL - 1024
Salmonella Typhimurium	C.5 CIP / IAL - 1472
Staphylococcus aureus	ATCC - 25923 / IAL -1606
Candida albicans	Isolado Clínico (UNISA/HGG)

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os compostos fenólicos e flavonóides foram determinados como ácido gálico equivalente e quercetina equivalente, respectivamente, através de equações lineares baseadas na curva de calibração e com coeficiente de correlação (R^2):

$Y= 0,00215\ x + 0,03648$, $R^2 = 0,99529$ (Acido gálico)

$Y= 0,00665\ x + 0,00000$, $R^2 = 0,99981$ (Quercetina)

Onde y é a absorbâcia e x a concentração da amostra analisada.

A amostra analisada apresenta 21,9,% de compostos fenólicos e 8,4% de flavonóides (Tab. 2).

Woisky & Salatino (1998) determinaram, pelo mesmo método usado no presente trabalho, teores de fenóis totais de quatro amostras de própolis verde do estado de São Paulo, uma de Santa Catarina e uma do Rio Grande do Sul variando entre 8,8% a 13,7%. Portanto, a amostra de própolis vermelha de Maceió possui teor de fenóis equivalente aproximadamente ao dobro do teor de amostras de própolis verde. Woiscky & Salatino (1998) determinaram teores de flavonóides variando de 0,8% a 2,6%. Bonvehí & Coll (1994) determinaram teores de fenóis variando entre 10,1% e 28,6% em amostras de própolis do Brasil, Uruguai e China, os menores valores correspondendo ao Brasil. Os mesmos autores encontraram nas amostras teores de flavonóides entre 3,0% a 6,6%. Os dados sugerem que a amostra de própolis vermelha analisada possui teores de fenóis totais comparáveis aos mais altos que se podem encontrar em própolis.

O teor de fenóis na própolis é um parâmetro de grande significado para uma primeira avaliação de algumas de suas propriedades biológicas, principalmente atividade antioxidante. Sabe-se que há correlação entre os teores de substâncias fenólicas e atividade antioxidante de material vegetal (Stratil et al. 2006). De fato, o método ainda mais adequado para a determinação do teor de fenóis totais (método de Folin-Ciocalteau) baseia-se numa reação de óxido-redução. Não deixa de ser, portanto, um outro método de avaliação de atividade antioxidante.

Na própolis européia, o as substâncias fenólicas são os principais responsáveis pela maioria de suas propriedades farmacológicas, representando mais da metade dos 160 compostos identificados (Menghinello et al. 1999; Bankova 2000), com destaque para os flavonóides aglicônicos que são os polifenóis mais freqüentes em amostras européias de própolis (Bankova 2000). Entretanto, muitos autores descrevem quantidades reduzidas de compostos fenólicos em algumas amostras de regiões tropicais (Banskota et al. 1998, 200a; Negri et al. 2003).

Com relação à própolis vermelha, existem dados pouco conclusivos no que diz respeito aos compostos fenólicos. Apenas um trabalho refere-se à análise desse grupo de compostos de um modo mais amplo (Tomás-Barberan et al. 1993). Outros trabalhos de análise química relatam a identificação de benzofenonas preniladas em amostras de própolis vermelha da Venezuela (Trusheva et al. 2004) e de Cuba (Cuesta-Rubio et al. 1999; Hernández et al. 2005).

Trusheva et al. (2006) analisaram uma amostra de própolis vermelha da região de Maceió e identificaram compostos fenólicos, como o isosativana, medicarpina e benzofenonas como compostos majoritários do extrato. Entretanto, não fizeram nenhuma menção ao teor de fenóis totais e nem tampouco algum doseamento de seus compostos majoritários. No presente trabalho, o extrato metanólico de própolis vermelha foi analisado quanto ao teor de fenóis totais e flavonóides. Os flavonóides estão entre os constituintes de própolis mais ativos farmacologicamente (Cushnie e Lamb, 2005). Vários flavonóides têm sido reportados como antiinflamtórios, estrogênicos, inibidores enzimáticos, antimicrobianos (Havsteen 1983; Harborne 1999), antialérgicos, antioxidantes (Middleton & Chithan 1993) e citotóxicos (Harborne 2000). É, portanto, interessante o doseamento de fenóis totais e flavonóides em amostras de própolis em geral, inclusive na própolis vermelha, um material que já vem sendo amplamente aceito no mercado brasileiro e internacional (Breyer LTDA 2006 -comunicação pessoal).

As ceras também são componentes importantes para a caracterização química da própolis, pois reúnem a maior parte de constituintes farmacologicamente inertes do produto. São formadas predominantemente por compostos lineares de cadeia longa, representados por ácidos graxos, ésteres e álcoois (Moyna e Heinzen 2003). As ceras constituem um dos parâmetros interessantes para o controle de qualidade de amostras de própolis (Woisky & Salatino 1998).

No presente trabalho foi observado um teor de ceras de 6,8% (Tab. 2). Não existem dados do teor de ceras em amostras de própolis vermelha da Venezuela (Trusheva et al. 2004) e de Cuba (Cuesta-Rubio et al. 1999; Hernández et al. 2005). Woisky & Salatino (1998) determinaram teores de cera que variaram de 4,6% a 7,8% em seis amostras de própolis brasileiras. Algumas substâncias cíclicas, como triterpenóides pentacíclicos, podem acompanhar as ceras no procedimento de extração destas (Negri et al. 2000a). Portanto, substâncias pouco polares como os triterpenóides podem passar despercebidos em análises que priorizam substâncias presentes em extratos alcoólicos, com o que se podem negligencias nas análises substâncias com atividade farmacológica (Negri et al. 2003).

Cuesta-Rubio et al. (1999) isolaram uma nova benzofenona prenilada de própolis vermelha, composto até então inédito em pesquisas sobre química de própolis. A amostra utilizada no trabalho foi obtida de um apiário cujo entorno é rico em espécimes de *Clusia major* e *C. minor*. A resina floral de tais espécies já tinha sido reportada como provável fonte de benzofenonas preniladas em amostras de própolis vermelha (Tomás-Barberán et al. 1993).

Em trabalhos posteriores, foi constatada a presença de outras três benzofenonas preniladas na própolis vermelha cubana. Tais compostos foram identificados como propolonas A, B e C. Dessa amostra também foram obtidos compostos inéditos em própolis, como a garcinielliptona e a hyperibona (Hernández et al. 2005). Entretanto, ambos já haviam sido

isolados de *Garcinia subelliptica* (Weng et al. 2003) e de *Hypericum scabrum* (Matsuhisa et al. 2002).

Na própolis vermelha venezuelana, o teor de flavonóides é reduzido. Enquanto as amostras européias são ricas em flavonóides e possuem origem em espécies de *Populus*, as amostras venezuelanas são ricas em benzofenonas preniladas e provavelmente são elaboradas a partir da resina floral de espécies de *Clusia* (Tomás-Barberán et al. 1993).

Recentemente foram reportadas duas novas escrobiculatonas numa amostra de própolis vermelha da Venezuela (Trusheva et al. 2004). Entretanto, tais compostos já haviam sido isolados no Brasil da resina floral de *Clusia scrobiculata* (Porto et al. 2000). Até então, *Clusia major* e *C. minor* tinham sido reportadas como fontes da própolis venezuelana (Tomás-Barberán et al. 1993) e *C. nemorosa* em Cuba (Cuesta-Rubio et al. 2000). Aparentemente espécies de *Clusia* são importantes fontes para própolis de regiões tropicais, de modo análogo a espécies de *Baccharis* no Brasil. É significativo notar que a resina floral de espécies de *Clusia* acaba sendo uma recompensa para as abelhas, pois apesar de não ser nutritiva, é certamente um bom material para reparos da colméia devido às suas propriedades antimicrobianas (Trusheva et al. 2004).

Os resultados obtidos no teste de atividade antimicrobiana são apresentados na tabela 3.

O extrato metanólico de própolis vermelha da região de Maceió inibiu o crescimento de todos os microrganismos testados. Os menores

valores de CIM (256 μg/mL) e CMM (512 μg/mL) foram observadas contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *Candida albicans*. O maior valor de CMM (1024 μg/mL) foi obtido contra *Klebisiella pneumoniae*. Há muito tempo se sabe que a própolis inibe o crescimento de bactérias Gram-positivas (Lindenfelser 1967) e Gram-negativas (Lepekhin 1970). No presente trabalho foram utilizados nove microrganismos, dentre os quais apenas *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus pyogenes* são Gram-positivos. Com exceção de *Candida albicans* que é um fungo, todos os outros microrganismos são bactérias Gram-negativas, e foram inibidas pelo extrato. Dentre elas pode-se destacar, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* Typhimurium e *Klebisiella pneumoniae*. Contra as duas primeiras, o extrato foi letal na concentração de 512 μg/mL e contra a última, na concentração de 1024 μg/mL (Tab. 3).

Em 1999, Kujumgiev reportou a atividade antimicrobiana das amostras de própolis de regiões temperadas e tropicais. As amostras de diferentes regiões geográficas apresentaram atividades semelhantes contra bactérias Gram-positivas e *Candida albicans*. No presente trabalho, foram utilizadas bactérias incomuns em testes para avaliar a atividade antimicrobiana de própolis, como *Bacillus subtilis* e *Klebsiela pneumoniae*. Ambas, são patógenos importantes em medicina humana, envolvidos em problemas dermatológicos e respiratórios, respectivamente (Trabulsi e Altherthun 2005). Em seu trabalho, Kujumgiev (1999) utilizou o método de zonas de inibição, que apesar de consagrado mundialmente, é pouco

elucidativo. Nesse método, o meio sólido pode perturbar a difusão do extrato, ao contrário do que acontece no método de macrodiluição, no qual o extrato está em contato direto com o microrganismo (Rios et al. 1988). No presente trabalho, foi utilizado o método de macrodiluição em caldo seguido de análise de crescimento microbiano em placa, que permite avaliar a atividade inibitória e microbicida do extrato testado. Com isso, foram obtidos resultados mais elucidativos, que permitem afirmar que essa amostra possui atividade microbicida tanto contra bactérias Gram-positivas (*Bacillus subtilis*), como contra Gram-negativas (*Klebisiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa e Salmonella* Typhimurium) e contra o fungo *Candida albicans*.

Koo et al. (2000) conseguiram resultados muito interessantes com própolis brasileira do Estado da Bahia. Utilizando o mesmo método de atividade antimicrobiana do presente trabalho, os autores obtiveram CIM de 25 μg/mL para *Streptococcus sobrinus* e *S.cricetus*, de 50 μg/mL para *S. mutans* e CMM de 100 μg/mL para *Streptococcus sobrinus e S.cricetus* e de 400 μg/mL *S. mutans*. A igualdade metodológica permite comparações mais seguras entre os trabalhos. A amostra de própolis baiana usada pelos autores era então pouco conhecida, assim como a própolis vermelha de Maceió atualmente (Trusheva et al. 2006). Os resultados do trabalho com própolis baiana estão baseados em bactérias Gram-positivas e analisando a tabela 3 do presente trabalho pode-se identificar valores de CMM de 512 μg/mL nesse mesmo grupo de bactérias.

Apesar da distância acentuada entre os estados da Bahia e Alagoas, eles fazem parte da região Nordeste do Brasil e é possível observar que amostras de ambos locais possuem níveis de atividade microbicida semelhantes contra bactérias Gram-positivas.

Em Botucatu (SP, sudeste do Brasil), amostras de própolis foram avaliadas também pelo método de macrodiluição em caldo e apresentaram atividade antimicrobiana. Nesse estudo, foram usadas quatro espécies de bactérias, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* Typhimurium e *Staphylococcus aureus*, esta última Gram-positiva e as demais Gram-negativas (Sforcin et al. 2000). Os resultados evidenciam maior atividade inibitória contra as bactérias Gram-positivas, corroborando os primeiros resultados obtidos com extrato metanólico de própolis vermelha de Maceió (Trusheva et al. 2006). No entanto, pode-se observar no presente trabalho que o extrato de própolis vermelha apresenta o mesmo nível de atividade inibitória (CIM 512 μg/mL) tanto para bactérias Gram-positivas (*Enterococcus faecalis* e *Streptococcus pyogenes*) como para Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Klebisiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Salmonella* Typhimurium). Um aspecto interessante do presente trabalho é que se obteve a confirmação de atividade inibitória de própolis brasileira contra *Pseudomonas aeruginosa* e a constatação de sua ação bactericida contra o patógeno.

Na região sudeste do Brasil, o estado de Minas Gerais é o principal fornecedor da própolis brasileira mais valorizada no mercado

internacional, a própolis verde (Marcucci et al. 2001; Kumazawa et al. 2003). Santos et al. (2002) trabalharam com amostras dessa região, analisando seu potencial contra *A. actinomycetemcomitans*, *Eubacterium lentum*, *Fusobacterium necrophorum*, *F.nucleatum*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Prevotella gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, todas espécies de bactérias causadoras de periodontite. Através do método de macrodiluição em caldo, os autores observaram que os extratos etanólicos de própolis inibiram o crescimento de todos os microrganismos testados. É importante salientar que todos eles são Gram-negativos. Os presentes resultados com a própolis vermelha de Maceió, que além de inibir o crescimento foi bactericida contra *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella* Typhi (Gram-negativas), asseguram perspectivas muito favoráveis para esse produto em futuros testes contra outras bactérias Gram-negativas e orais.

Resultados de análise antifúngica são importantes principalmente em países como o Brasil, com espécies causadoras de endemias (Barros et al. 2001). Ao avaliar extratos de própolis búlgara e brasileira, Salomão et al. (2004) observaram que a amostra brasileira apresentou atividade inibitória contra *Sporothrix schenkii*, que causa micoses profundas crônicas ou agudas principalmente em áreas urbanas (Barros et al. 2001), *Paracoccidioides brasiliensis*, *que* causa a paracocidiose, formadora de lesões polimórficas e que ocorre principlamente em países da América do Sul (Borges-Walmsley et al. 2002) e *Candida albicans*, que é um fungo

comensal ou oportunista que pode causar candidíase (Barros et al. 2001). A própolis vermelha cubana é ativa contra *Candida albicans* (Rojas & Lugo 1988). A própolis vermelha brasileira da região de Maceió apresentou resultados semelhantes através do método de difusão em disco (Trusheva et al. 2006). No presente trabalho foi realizada uma análise mais consistente através do método de macrodiluição em caldo. A amostra de própolis vermelha da região de Maceió tem ação fungistática e fungicida contra *Candida albicans* (Tab. 3). Provavelmente essa atividade é devida à presença de compostos fenólicos em abundância na própolis vermelha brasileira (21,9%). Essas substâncias vêm sendo citadas há pelo menos três décadas como possíveis princípios ativos com propriedades antimicrobianas de amostras de própolis de diferentes regiões geográficas (Ghisalberti 1979; Rojas & Lugo 1988, Kujumgiev et al. 1993; Marcucci et al. 2001; Cushnie e Lamb 2005; Choi et al. 2006).

Há mais de uma década que se conhece a atividade antioxidante da própolis, por meio de testes de atividade de redução de radicais livres (Pascual et al. 1994). Entre os constituintes de própolis que primeiro se revelaram como responsáveis pela atividade antioxidante estão os flavonóides (Midleton et al. 1993) E os fenilpropanóides prenilados (Hayashi et al. 1999).

No presente trabalho foram encontrados resultados expressivos de atividade antioxidante da amostra de própolis vermelha de Maceió. Na

tabela 4 apresentam-se os dados referentes à atividade antioxidante medida pelo método de redução de radicais livres DPPH.

O extrato testado apresentou atividade redutora em todas as concentrações. Nas concentrações de 8,0 e 12,5 μg/mL, o extrato apresentou praticamente 50% da atividade antioxidante da rutina (Tab. 4). Aparentemente, a concentração mínima da amostra que ainda possui atividade antioxidante é 8,0 μg/mL, uma vez que extratos mais diluídos não apresentaram redução significativa de DPPH nos experimentos prévios. É importante salientar que o material testado é uma mistura que conta com uma enorme diversidade de compostos, enquanto a referência é um composto isolado e purificado, com comprovada atividade antioxidante. Por isso, é adequado julgar os resultados fornecidos pelos extratos como promissores, pois eles indicam uma pronunciada atividade de um grupo de compostos ou de algum composto isoladamente.

Existem particularidades que podem justificar a ação do extrato testado. Na amostra em estudo, foi detectado um elevado teor de compostos fenólicos (21,9%), especialmente flavonóides (8,4%). Tais compostos são reconhecidamente antioxidantes. Em amostras argentinas, detectou-se atividade de redução de radical DPPH de até 67,5% em amostras com teor de flavonóides em torno de 42,6% (Moreno et al. 2000).

As considerações sobre o presente trabalho são corroboradas pelo único trabalho até então publicado sobre própolis vermelha. Trusheva et al. (2006) analisaram a própolis vermelha da região de Maceió e, dentre os

compostos isolados e testados, puderam constatar que a isosativana e a medicarpina apresentaram 4,5% e 0,7% de atividade antioxidante, respectivamente. Mas a mistura de benzofenonas preniladas sem identificação precisa, apresentou 49,0% de atividade antioxidante. No presente trabalho, também foi utilizado o método de redução do radical estável DPPH. O extrato testado talvez contenha compostos que, ao serem isolados e testados, venham a apresentar significativa atividade redutora de radicais livres.

Com relação à atividade antioxidante da amostra avaliada pelo método de descoloração do sistema β-caroteno/ácido linoléico, não existe até o presente momento nenhum estudo disponível. Este é o primeiro trabalho que faz a comparação entre as duas metodologias, sendo a do sistema β-caroteno/ácido linoléico baseada na metodologia proposta por Koloeva et al. (2002) com algumas modificações. Na tabela 5 estão os dados referentes ao coeficiente de atividade antioxidante, tanto da referência (rutina), como do extrato metanólico de própolis.

Em todas as concentrações testadas, a solução de referência apresentou atividade mais alta que as soluções do extrato. No entanto, a diferença entre referência e extrato não é expressiva. Em relação às soluções de rutina de concentrações 1,0%, 1,5% e 2,0%, as atividades das soluções do extrato de mesma concentração foram, respectivamente, de 84,5%, 85,3% e 85,7%.

O método de descoloração do sistema β-caroteno/ácido linoléico tem sido pouco utilizado para análise do potencial antioxidante de amostras de própolis. Esse é um fato preocupante, uma vez que o julgamento do potencial antioxidante de um extrato ou substância isolada através de um único método pode ser enganoso (Pratt et al. 1979; Von Gadow et al. 1997). Um bom exemplo é o ácido rosmarínico que, por ser uma substância polar, através do método de redução do DPPH apresenta elevada atividade antioxidante, mas quando analisado através do método de descoloração do sistema β-caroteno/ácido linoléico, revela fraco poder antioxidante (Koloeva et al. 2002). Por essa razão, é preciso mais cautela em determinadas afirmações acerca do potencial antioxidante de amostras de própolis. Em 1999, Hayashi et al. publicaram um trabalho segundo o qual a artepilina C, um dos composto mais comuns e abundantes na própolis verde, seria um recém-descoberto potente antioxidante. Nesse caso, foi utilizado o método de peroxidação do ácido linoléico, no qual tal composto apresentou ótimos resultados. Entretanto, não são encontradas referências sobre análises mais detalhadas do potencial antioxidante da artepilina C através de outras metodologias. No presente trabalho, o extrato foi testado segundo o sistema de redução do DPPH, e em seguida sob o sistema β-caroteno/ácido linoléico. Foi possível observar que o extrato apresentou considerável atividade redutora do DPPH e também na inibição da descoloração do sistema β-caroteno/ácido linoléico. O primeiro teste está baseado em um sistema

que usa um solvente polar (metanol), enquanto o segundo é um sistema apolar que envolve ácido linoléico e β-caroteno. Os resultados sugerem que possivelmente no extrato predominam compostos pouco polares, que não foram solubilizados em sua totalidade em metanol e conseqüentemente apresentaram comparativmente menor atividade antioxidante no sistema DPPH do que no sistema ácido linoléico/β-caroteno.

Tais constatações são importantes, já que permitem avaliar melhor o potencial antioxidante da amostra testada. Os resultados obtidos indicam que o extrato apresenta atividade antioxidante primária (redução ou interceptação de radicais livres) menor que a sua atividade antioxidante secundária que, entre outras atividades, inibe a cadeia de reações de oxidação lipídica (Gordon 1990). Esse resultado está ligado às propriedades químicas das substâncias predominantes na própolis vermelha.

Tabela 2. Teores de fenóis totais, flavonóides e ceras presentes no extrato metanólico de própolis vermelha de Maceió (AL).

Compostos	Teor (%)
Fenóis totais	21,9
Flavonóides	8,4
Ceras	6,8

Tabela 3. Microrganismos testados, concentração inibitória mínima (CIM) e concentração microbicida mínima (CIM) do extrato metanólico (μg/mL) de própolis vermelha de Maceió (AL).

Microrganismos	CIM	CMM
Bacillus subtilis	256	512
Candida albicans	256	512
Enterococcus faecalis	512	-
Escherichia coli	512	-
Klebisiella pneumonia	512	1024
Proteus mirabilis	512	-
Pseudomonas aeruginosa	256	512
Salmonella Typhimurium	512	512
Streptococcus pyogenes	512	-

Tabela 4. Atividade antioxidante de soluções metanólicas de rutina (substância de referência) e extratos metanólicos de própolis vermelha de Maceió, avaliada em testes de redução do radical livre DPPH.

Concentração (μg/mL)	Atividade antioxidante (%)
Rutina	
8,0	60,7
12,5	64,3
25,0	100,0
Extrato	
8,0	30,6
12,5	32,7
25,0	39,1

Tabela 5. Coeficiente de atividade antioxidante (CAO) da rutina e do extrato metanólico de própolis vermelha. Concentrações expressas em mg/mL.

Concentração (mg/mL)	CAO
Rutina	
1,0	787,95
1,5	814,45
2,0	874,69
Extrato	
1,0	672,28
1,5	698,79
2,0	739,35

5. CONCLUSÕES

- Os teores de ceras, fenóis e flavonóides da própolis vermelha de Maceió (AL) foram semelhantes aos encontrados em outras amostras de própolis do Brasil, reportados em outras publicações.

- O extrato metanólico da própolis vermelha de Maceió (AL) inibiu o crescimento de todos os microrganismos testados.

- O extrato metanólico da própolis vermelha de Maceió (AL) apresentou atividade microbicida contra *Bacillus subtillis*, *Klebsiella pnemoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* Typhimurium e *Candida albicans*.

- A atividade antioxidante do extrato metanólico da própolis vermelha da região de Maceió (AL) foi acentuada, tanto no teste de redução de radicais livres DPPH, como no de descoloração do sistema β-caroteno/ácido linoléico.

RESUMO

Própolis é um material resinoso produzido por *Apis mellifera* constituído de exsudatos coletados de plantas e substâncias produzidas pelas abelhas, além de pequenas quantidades de aminoácidos, açúcares, pólen, etc. Na colméia, esse material é utilizado para diversos fins, como vedar aberturas no ninho e prevenir a decomposição de invasores mortos. Sua composição variada e rica em compostos biologicamente ativos tem sido amplamente reportada em ensaios de atividades antibacteriana, antifúngica, antiinflamatória, antitumoral, antioxidante e antiviral. Por isso, existe um grande interesse no estudo da composição química da própolis e das atividades biológicas de seus constituintes. De uma amostra de própolis vermelha, oriunda da região de Maceió (AL), obteve-se uma série de extratos de polaridade crescente: *n*-hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol. Com extrato metanólico foram realizados ensaios para determinação dos teores de fenóis e flavonóides, ensaios de atividade antioxidante, além de ensaios antimicrobianos contra bactérias e o fungo *Candida albicans*. Foi determinado o teor de ceras a partir de 3 g de própolis bruta, por extração com clorofórmio, evaporação do solvente, tratamento com metanol quente e precipitação após resfriamento. O teor de ceras obtido foi de 6,8%. Os fenóis totais foram determinados pelo método de Folin-Ciocaulteau, usando-se soluções de ácido gálico como referência. Para a determinação dos flavonóides, realizou-se a reação com cloreto de alumínio e soluções de quercetina como referência, fazendo-se leituras em 420 nm. Foram determinados 21,9% de fenóis totais e 8,4% de flavonóides. A atividade antioxidante foi avaliada segundo dois métodos, o de redução do radical estável DPPH e o de descoloração do sistema β-caroteno/ácido linoléico, usando-se a rutina como referência em ambos os métodos. Extratos metanólicos da amostra em concentrações de 8, 12,5 e 25 μg/mL reduziram o DPPH em 30,6%, 32,7% e 39,1% respectivamente, enquanto a solução de rutina nas mesmas concentrações reduziu 60,7% 64,3%, 100% e respectivamente. Com o sistema β-caroteno/ácido linoléico foram utilizadas concentrações de 2, 1,5 e 1 mg/mL tanto de amostra como de rutina. Os coeficientes de atividade antioxidante (CAO) das soluções da amostra nas concentrações 1, 1,5 e 2 mg/mL foram 672,2, 698,7 e 739,7, enquanto os valores de CAO para as soluções de rutina nas mesmas concentrações foram 787,2, 814,4 e 739,7. A proximidade dos resultados entre amostra e referência indicam a presença de substâncias altamente antioxidantes na própolis vermelha, em proporções elevadas. A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de macrodiluição em caldo, seguida de crescimento em placa, usando cepas de *Bacillus subtillis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonela* Typhimurium e *Candida albicans*. Observou-se inibição do crescimento de todos os microrganismos e atividade microbicida contra *B. subtillis*, *P. aeruginosa*, *S.* Typhimurium e *C. albicans*.

ABSTRACT

Propolis is a resinous material produced by *Apis mellifera*, made up of exsudates from plants collected by the bees and beeswax, in addition to small quantities of aminoacids, sugars, pollen, etc. Propolis is used in the hive for several purposes, such as to seal openings and prevent decomposition of the bodies of invading animals. Its composition is varied and rich in biologically active compounds. Many reports have been published about activities such as antibacterial, antifungal, antiviral, anti-inflammatory, antitumoral and antioxidant. There is, therefore, an increasing interest for studies about chemical composition and biological activity of propolis and its constituents. Extracts of increasing polarity (*n*-hexane, chloroform, ethyl acetate and methanol) were obtained from a sample of red propolis from Maceió (state of Alagoas, northeast Brazil). Assays for determination of contents of phenolics and flavonoids and activities against bacteria and *Candida albicans* were carried out with the methanol extract. Waxes content was determined with 3 g of the sample by extraction with chloroform, evaporation of the solvent, treatment with hot methanol and precipitation upon cooling. The content obtained was 6.8%. The content of phenolic compounds was determined by the Folin-Ciocalteau method, using solutions of gallic acid as reference. The flavonoid content was determined by complexation with aluminum chloride and reading the absorbances at 420 nm, using quercetin as reference. The content of phenolic compounds was 21.9% and that of flavonoids 8.4%. The antioxidant activity was evaluated by the methods of reduction of the stable free radical DPPH and discoloration of the system β-carotene/linoleic acid, using rutin as reference in both methods. The percent of DPPH reduction of methanolic extracts at concentrations 8, 12.5 and 25 μg/mL were, respectively, 30.6%, 32.7% and 39.1%, and the values corresponding to rutin at the same concentrations were 60.7%, 64.3% and 100%. With regard to the system β-carotene/linoleic acid, solutions at concentrations 2, 1.5 and 1 mg/mL of the methanolic extract gave coefficients of antioxidant activity (CAO) of 672.2, 298.7 and 739.7, respectively, while solutions of rutin at the same concentrations gave CAO of 787.2, 814.4 and 739.7. The similarity of results comparing propolis extract and rutin indicate that the analyzed propolis sample contain high contents of substances with high antioxidant activity. The antimicrobial activity was evaluated by the method of macrodilution in broth, followed by plate growth, using lineages of *Bacillus subtillis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonela* Typhimurium and *Candida albicans*. The growth of all microorganisms was inhibited, while microbicidal activity was observed against *B. subtillis*, *P. aeruginosa*, *S.* Typhimurium and *C. albicans*.

Referências Bibliográficas

Aga, H.; Shibuya, T.; Sugimoto, T.; Kurimoto, M.; Nakajima, S. H. 1994. Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. Bioscience Biotechnology and Biochemistry 58: 945-946.

Amoros M.; Sauvager F.; Girre L.; Cormier M. 1992.In vitro antiviral activity of propolis. Apidologie, 23:231-240.

Bankova, V.; Castro, S. L.; Marcucci, M. C. 2000. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin" Apidologie, 31:3-15.

Bankova, V.; Popova, M.; Bogdanov, S.; Sabatini, A. 2002. Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results. J. Z. Natur. 57c:530-533.

Banskota, A. H.; Tezuka, Y.; Prasain, J. K.; Matsuhige, K.; Dsaiki, L.; Kadota, S. H. 1998. Chemical constituintes of brazilian propolis and their cytotoxic activies. J. Nat. Prod. 61:896-900.

Banskota, A. H.; Tezuka, Y.; Adnyana I. K.; Midorikawa, K.; Matsushige, K.; Message, D.; Huertas, A. A .G.; Kadota, S. 2000(a). Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China" J. Ethnopharmacol. 72:239-246.

Banskota, A. H.; Tezuka, Y.; Midorikawa, K.; Matsushige, K.; Kadota, S. 2000(b). Two novel cytotoxic benzofuran derivatives from Brazilian propolis", J.Nat.Prod. 63(9):1277-1279.

Banskota, A. H.; Tezuka, Y.; Adnyana I. K.; Ishii, E.; Midorikawa, K.; Matsushige, K.; Kadota, S. 2001. Hepatoprotevtive and anti-

Helicobacter pylori activities of constituents from Brazilian propolis. Phytomedicine, , 8(1):16-23.

Banskota, A. H.; Tezuka, Y.; Kadota, S. 2001. Recent progress in pharmacological research of propolis" Phytother. Res. 15:561-571.

Barros, M. B. L.; Schubach, T. M. P.; Galhardo, M. C. G.; Schubach, A. O.; Monteiro, P. C. F.; Reis, R. S.; Zancopé-Oliveira, R. M.; Lazera, M.S. 2001. Sporotrichosis: an emergent zoonosis in Rio de Janeiro. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 96: 777–779.

Basnet, P.; Matsuno, T.; Neidlein, R. 1997. Potent free radicalscavenging activity of propol isolated from Brazilianpropolis. Z. Naturforsch 52c, 828.

Benzie, I. F. 1996. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. Int. J. Food. Sci. Nutr. 47(3):233-261.

Borges-Walmsley, M.I.; Chen, D.; Shu, X.; Walmsley, A. R. 2002. The pathobiology of Paracoccidioides brasiliensis. Trends Microbiol. 10(2):80-7.

Bosio, K.; Avanzini, C.; D'Avolio, A.; Ozino O.; Savoia, D. 2000. In vitro activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. Lett. Appl. Microbiol. 31: 174-177.

Bracho J. C. 2003. Calidad de propóleos de origen argentino. I Propiedades organolépticas. Disponível em: http://www.culturaapicola.com.ar/apuntes/propoleos/calidad%20de%20propoleos.pdf>. Acessado em Nov. 2006.

Brand-Williams, W. 1995. Use a free radical method to evaluate antioxidative activity. Food Sci. Technol. 28: 25-30.

Burdock G. A. 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. Food Chem. Toxicol. 3:347 - 363.

Cañas S. 2002. Els Productes del Rusc. Mètode 33:51-55.

Cheng, P. C.; Wong, G. 1996. Honey bee propolis: prospects in medicine. Bee World 77: 8–15.

Choi, Y. M.; Noh, D. O.; Cho, S. Y.; Suh, H. J.; Kim, K. M.; Kim, J. M. 2006. Antioxidant and antimicrobial activities of própolis from several regions of Korea. LWT, 39: 756-761.

Cook, N. C.; Samman, S. 1996. Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. Nutr. Biochem. 7: 66-76.

Cuesta-Rubio, O.; Cuellar C. A.; Rojas N.; Velez C. H.; Rastrelli L.; Aquino R. 1999. A polyisoprenylated benzo-phenone from Cuban propolis. J. Nat. Prod. 62:1013-1015.

Cuesta-Rubio, O.; Frontana-Uribe, B. A.; Ramirez-Apan, T.; Cardenas, J. Z. 2000. A polyisoprenylated benzo- biological properties and therapeutic activity from Cuban propolis. J. Z. Natur. 57: 372-376.

Cuesta-Rubio, O.; Frontana-Uribe, B.; Ramírez-Apan, T.; Cárdenas J. 2002. Polyisoprenylated Benzophenones in Cuban Propolis; Biological Activity of Nemorosone J. Z. Natur. 57:372-378.

Cushnie, T. P.; Lamb. A. J . 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. Int J Int. J. Antimicrob. Agents. 26(5):343-56.

Gabrys J.; Konecki J.; Krol W.; Scheller S.; Shani J. 1986. Free amino acids identified and quantified by gas-liquid chromatography, Pharm. Res. Commun. 18:513–518.

Gatto, M. T.: Lcchio, S.; Grippa, E. G.; Mazzanti, L. 2002. Antimicrobial and anti-lipase activity of quercetin and its C2-C16 3-O-acyl-esters. Bioorg Med Chem.10(2):269-72.

Ghisalberti, E.L. 1979. Propolis: A review. Bee World. 60:.59-84.

González, R.; Corcho, I.; Ramirez, D. 1995. Hepatoprototective effects of própolis on carbono tetrachloride-induced liver injury in rats. Phitother Res 9:14-17.

Gordon, M. H. 1990. The mechanism of oxidant action *in vitro*. In Food Antioxidants , Hudson BJF. (eds.) Elsevier: London: 1-18.

Grange, J. M.; Davey, R. W. 1990. Antibacterial properties of propolis (bee glue). J. R. Soc. Med. 83:159-160.

Greenaway, W.; Scaysbrook, T.; Whatley, F. R. 1990. The composition and plant origins of propolis. Bee World. .71(3):107-118.

Hamilton-Miller, J. M. T. 2001. Anti-cariogenic properties of tea. J. Med. Microbiol. 50: 299–302.

Hayashi, K.; Komura, S.; Isaji, N.; Ohishi, N.; YSGI, K. 1999. Isolation of antioxidative compounds from Brazilian propolis: 3,4dihydroxy-5-prenylcinnamic acid, a novel potent antioxidant. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, v.47, p.1521-1524.

Harborne J. B. 1999. The comparative biochemistry of phytoalexin induction in plants. Bioch. System. Ecol. 27(4): 335-367.

Harborne, J. B. 2000. Arsenal for survival: secondary plant products. Taxon 49:435–449.

Havsteen, B. 1983. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. .Biochem. Pharmacol. 32(7):1141-1148.

Hayashi, K.; Komura, S.; Isaji, N.; Ohishi, N.; Yagi, O. 1999. Isolation of Antioxidative Compounds from Brazilian Propolis: 3,4-Dihydroxy-5-prenylcinnamic Acid, a Novel Potent Antioxidant. Chem. Pharm. Bull. 47(11): 1521-1524.

Hegazi, A. G.; Abd, E. I.; Hady, F. K.. 2001. Egyptian propolis: 1—Antimicrobial activityand chemical composition of Upper Egypt propolis. J. Z. Natur.56:82–88.

Hegazi, A. G.; Abd, E. I.; Hady, F. K. 2002. Egyptian propolis: 3 antioxidant, antimicrobial activities and chemical composition of propolis from reclaimed lands. J. Z. Natur. 57: 395:402.

Heinze, W.; Holz, J.; Nattermann, H.; Blankesntein, P. 1998. Effects of ethanol extracts of propolis against common bacteria, fungi and viruses of veterinary importance. Tierarztl Umsch 53(6):321-326.

Hernández, N. M. R.; Bernal, K. C. 1990. Efecto antibiótico del propóleo frente a cepas de Staphylococcus aureus de origen clínico humano, Rev Cubana Farm, 24(1):45-50.

Hernández, I. M.; Fernandez, M. C.; Cuesta-Rubio, O.; Piccinelli, A. L.; Rastrelli, L. 2005. Polyprenylated benzophenone derivatives from Cuban propolis. J. Nat. Prod. 68(6):931-934.

Ito, J.; Chang, F. R.; Wang, H. K.; Park, Y .K.; Ikegaki, M.; Kilgore, N.; Lee, K.H. 2001. Anti-Aids agents. 48.(1) anti-HIV activity of moronic acid derivatives and the new meliferone-related titerpnoid isolated from Brazilian propolis. J. Nat. Prod. 64: 1278-1281.

Keskin, N.; Hazir, S.; Baser, K.H.; Kurkcuoglu, M. 2001. Antibacterial activity and chemical composition of Turkish propolis. J. Z. Natur. 56(11-12):1112-1115.

Koloeva, I. I.; Van Beek, T. A.; Linssen, J. P. H.; Groot A.; Evstatieva, L. N. 2002. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. Phytochem. Anal., 13: 8-17.

Koo, H.; Gomes, B.; Rosalen, P.; Ambrosano, G.; Park, Y. 2000. *In vitro* antimicrobial activity of propolis and Arnica montana against oral pathogens. Arch. Oral Biol. 45(2):141-148.

Koo, H.; Rosalen, P. L.; Cury, J. A.; Park, Y. K.; Bowen, E. H. 2002. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and glusyltransferaseactivity. Antimicrob. Ag. Chem. 46:1302-1309.

Konishi, S. 2001. Análise da influência de agentes solubilizantes na extração da própolis visando uma preparação de spray hidroalcóolica" Dissertação de mestrado, Universidade São Francisco.

Krell, R. 1996. Value-Added Products from Beekeeping. FAO Agr. Serv. Bull. 124: M-24.

Kujumgiev, A.; Bankova, V.; Ignatova, A.; Popov, S. 1993. Antibacterial activity of propolis, some of its components and their analogs. Pharmazie. 48(10):785-786.

Kujumgiev, A.; Tsvetkova, I.; Serkedjieva, Y.; Bankova, V.; Chistov, R.; Popov, S. 1999. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. J. Ethnopharmacol. 64:235-240.

Kumazawa, S. H.; Yoned, M.; Shibata, I.; Kanaeda, J.; Hamasaka, T.; Nakayama, T. 2003. Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. Chem Pharm Bull: 51:740–742.

Kumazawa, S.; Hamasaka, T.; Nakayama, T. 2004. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. Food Chem. 84:329-339.

Kusumoto, T.; Miyamoto, T. R.; Doi, S.; Sugimoto, H.; Yamada, H. 2001. Isolation and structures of two new compounds from the essential oil of Brazilian propolis. Chem. Pharm. Bull. 49: 1207-1209.

Lavie, P. 1968. Propriete's antibacteriennes et action physiologique des produits de la ruche et des abeilles. Chauvin 1:1-115.

Lepekhin, V.N.; Leonova, T. A. 1970. Antimikrobnye svoĭstva propolisa. Stomatologiia (Mosk)49(4):16–19.

Lin, S.; Lin, Y.; Chen, C.; Chung, C.; Hsu, S. 1997. The hepatoprotective and therapeutic effects of propolis ethanol extract on chronic alcohol-induced liver injuries. Am. J. Chin. Med..25(3-4):325-332.

Lindenfelser L. A. 1967. Antimicrobial activity of propolis. Am. Bee. J. 107:90–92.

Manolova, N.; Maximova, V.; Gegova, G.; Serkedjieva, Y.; Uzunov, S.; Marekov, N.; Bankova, V. 1985. On the antiinfluenza action of fraction from propolis. Comp. rend. Academ. Bulg. Sci. 38: 735-738.

Marcucci, M. C. 1995. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. Apidologie 26: 83-99.

Marcucci, M. C.; Ferreres, F.; Custodio, Ângela, R.; Ferreira, M. M.C.; Bankova, V. S.; Garcia-Viguera, C. 2000. Evaluation of Phenolic Compounds in Brazilian Propolis from Different Geographical Regions. J. Z. Natur. 55:76-81.

Marcucci, M. C.; Ferreres, F.; García-Viguera, C.; Bankova, V. S.; De Castro, S. L.; Dantas, A. P.; Valente, P. H. M.; Paulino, M. 2001. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. J. Ethnopharmacol. 74: 105-112.

Martos, I.; Cossentini, M.; Ferreres, F.; TomasBarberan, F. A. 1997. Flavonoid composition of Tunisian honeys and propolis. J. Agric. Food Chem. 45(8):2824-2829.

Matsuda, S. Própolis Health Care Food. 1994. Disponível em: <http://www.ffcr.or.jp/zaidan/FFCRHOME.nsf>. Acesso em Nov. 2006.

Matsuhisa, M.; Shikishima, Y.; Takaishi, Y.; Honda, G.; Ito, M.; Takeda, Y.; Shibata, H.; Higuti, T.; Kodzhimatov, O. K.; Ashurmetov, O. 2002. Benzoylphloroglucinol derivatives from Hypericum scabrum. J. Nat. Prod., 65: 290–294.

Matsuno, T. 1995. A new clerodane diterpenoid isolated from propolis. J. Z. Natur. 50:93-97.

Menghinello, P.; Cucchiarini, L.; Palma, F.; Agostini, D.; Dacha M.; Stocchi V. 1999. Simultaneous analysis of flavonoid aglycones in natural products using an RP-HPLC method. J. Liq. Chormatogr. Relat. Technol. 22(19):3007-3018.

Metzner, J.; Bekemeier, M..; Paintz, M..; Schneidewind, E. 1979. On the antimicrobial activity of propolis and propolis constituents. Pharmazie, 34 (2): 97-102.

Middleton, E.; Chithan, K. 1993. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: Implications for immunity, inflammation and cancer. In: The Flavonoids: Advances in Research Since 1986. (J.B. Harborne, ed.), p. 619--652, Chapman and Hall, London, UK 2 Ratty, A.K. and Das.

Mirzoeva, O. K.; Grishanin, R. N.; Calder, P. C. 1997. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. Microbiol. Res. 152(3):239-46.

Moreno, M. I. N.; Isla, M. I.; Cudmani, N. G.; Vattuone, M. A.; Sampietro, A. R. 1999. Screening of antibacterial activity of Amaicha del Valle (Tucuman, Argentina) propolis. J. Ethnopharmacol. 68(1-3):97-102.

Moreno, M. I. N.; Isla, M. I.; Sampietro, A. R.; Vattuone, M. A. 2000. Comparison of the free radical scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *Journal ofEthnopharmacology,* v.71, p.109-114.

Muñoz, O.; Pena, R.; Ureta, E.; Montenegro, G.; Caldwell, C.; Timmermann, B.; 2001a. Phenolic compounds of propolis from central Chilean matorral. J. Z. Natur. 56:273-277.

Muñoz, O.; Pena, R.; Ureta, E.; Montenegro, G.; Timmermann, B. 2001b. Propolis from Chilean matorral hives. J. Z. Natur. 56(3-4):269-272.

Murat, K.; Serdar, K.; Semra, K. 2002. GC-MS Analysis of propolis samples from two different regions of Turkey. J. Z. Natur. 57: 905-909.

Nagai, T.; Sakai, M..; Inoue, R.; Inoue, H.; Suzuki, N. 2001. Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly, and propolis. Food Chem. 75: 237–240.

Nagai T.; Inoue R.; Inoue H.; Suzuki N. 2003. Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. Food Chem. 80 (1): 29-33.

Negri, G.; Marcucci, M. C.; Salatino, A.; Salatino, M. L. F. 1998. Hydrocarbons and Monoesters of Propolis Waxes from Brazil. Apidologie, 29, 305-314.

Negri, G.; Marcucci, M. C.; Salatino, A.; Salatino, M. L. F. 2000a. Comb and Propolis Waxes from Brazil. Triterpenoids in Propolis Waxes. J. Apicult. Res. 39:86-88.

Negri, G.; Marcucci, M. C.; Salatino, A.; Salatino, M. L. F. 2000b. Comb and Propolis Waxes from Brazil. J. Braz. Chem. Soc. 11: 453-457.

Negri, G.; Salatino, M. L.; Salatino, A. 2003. Unusual chemical composition of a sample of brazilian propolis, as assessed by analysis of a chloroform extract. J. Apicul. Res. 42 (4): 53-56.

Ota, C.; Unterkircher, C.; Fantinato, V.; Shimizu, M. T. 2001. Antifungal activity of propolis on different species of Candida. Mycoses 44:375–378.

Park, Y. K.; Koo, M.H.; Abreu, J. A. S.; Ikegagaki, M.; Cury, J. A. 1998. Antimicrobial Activity of Propolis on oral Microorganisms. Cur. Microbiol. 36:24-38.

Park, Y. K.; Alencar, S. M.; Scamparini, A. R. P. 2002. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. Cienc. Rural 32 (6): 997-1003.

Park, Y. K., Koo, M. H. 2000. Investigation of Flavonoid Aglycones in Propolis Collected by Two Different Varieties of Bees in the Same Regions. Bioci. Biotech. Biochem. 61(2):367-369.

Pascual, C.; Gonzalez, R.; Torricella, R.G.1994. Scavenging action of propolis extract against oxygen radicals. J. Ethnopharmacol. 41:9–13.

Pepeljnjak, S.; Jalsenjak, I.; Maysinger, D. 1982. Growth inhibition of Bacillus subtilis and composition of various propolis extracts. Pharmazie. 37(12):884-885.

Popova, M.; Bankova, V.; Tsvetkovab, I.; Naydenskib, C.; Silvac, M. V. 2001. The First Glycosides Isolated from Propolis: Diterpene Rhamnosides. J. Z. Natur. 56:1108-1111.

Porto, A. M.; Machado, S. M. F.; Oliveira, C. M. A.; Bittrich, V.; Amaral, M. C. E.; Marsaioli, A. J. 2000. Polyisoprenylated benzophenones from Clusia floral resins. Phytochemistry 55:755–768.

Pratt, D.E.; Birac, P.M. 1979. Source of antioxidant activity of soybean and soy products. J. Food Sci. 44: 1720-1722.

Rios, J.L.; Recio, M.C.; Villar, A. 1988. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: A review of the literature. Journal of Ethnopharmacology 23: 127-149.

Rode, M.; Filipic, B.; Herman, O. 1977. Disinfection of dentist hands with 10% alcoholic propolis solution. Zobozdrav. Vestn. 32:137-4.

Rojas, N. M.; Lugo, S. 1988. Efecto antifungico del propoleo sobre cepas del gênero Candida. In: ASIS, M. Investigaciones cubanas sobre el propoleo: Memorias del 1º Simposio sobre los efectos del propoleo en la salud humanay animal, Varadero. Matanzas: Consejo Científicodel Instituto de Medicina Veterinária, Cuba, 1989, p.42-54.

Russo, A.; Longo, R.; Vanella, A. 2002. The role of the phenethyl ester of caffeic acid (CAPE) in the inhibition of rat lung cyclooxygenase activity by propolis. Fitoterapia. 73:30-37.

Salatino, A.; Weinstein, A.; Teixeira, E.; Negri, G.; Message, D. 2005. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. Evid. Based. Comp. Alt. Med. *2: 33–8*

Salomão, K.; Borba, C. M.; Campos, L. C.; Machado, D. G.; Aquino-Neto, F. R.; De Castro, S. L. 2004. Chemical composition and microbicidal activity of extracts from Brazilian and Bulgarian propolis. Lett. Appl. Microbiol. 38: 87–92.

Santos, F. A.; Bastos, E. M.; Uzeda, M. Carvalho, M. A.; Farias, L. M.; Moreira, E. S. 2002. Antibacterial activity of Brazilian propolisand fractions against oral anaerobic bacteria. J. Ethnopharmacol. 80(1):1-7.

Scheller, S.; Szaflarski, J.; Tustanowski, J.; Nolewajka, E.; Stojko, A. 1977. Biological properties and clinical application of propolis. Arzneim – Forsch. Drug. Res. 27(4):889-890.

Serkedjieva, J.; Manolova, N.; Bankova, V. 1992. Anti-influenza virus effect of some propolis constituents and their analogues (esters of substituted cinnamic acids) J. Nat. Prod. 55(3):294-297.

Sforcin, J. M.; Fernandes, A.; Lopes, C. A. M.; Bankova, V.; Funari, S. R. C. 2000. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. J. Ethnopharmacol. 73(1-2):243 -249.

Sorkun, K.; Süer, B.; Salih B. 2001. Determination of chemical composition of Turkish propolis. J. Z. Natur. 56(7-8):666-668.

Stapleton, P. D.; Shah, S.; Anderson, J. C.; Hara, Y.; Hamilton-Miller, J. M. T. ; Taylor, P. W. 2004. Modulation of -lactam resistance in *Staphylococcus aureus* by catechins and gallates. Int. J. Antimic. Ag. 23:462-467

Starzyk, J.; Scheller, S.; Szaflarski, J.; Moskwa, M.; Stojko, A. 1970. Biological properties and clinical application of propolis. II.Studies on the antiprotozoan activity of ethanol extract of propolis. *Arzneimittelforschung*. 27:1198-9.

Sutter, V. L.; Barry, A. L.; Wilkins, T. D.; Zabransky, R. J. 1979. Collaborative evaluation of a proposid reference diluition method of suceptibility testing of anaerobic bacteria. Antimicrob. Agents Chemoth. 16: 495-502.

Tomás-Barberán, F. A.; Garcia-Viguera, C; Vit-Olivier, P.; Ferreres, F. 1993. Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. Phytochemistry., 34(1):191-196.

Tosi, B.; Donini, A.; Romagnoli, C.; Bruni, A. 1996. Antimicrobial activity of some commercial extracts of propolis prepared withdifferent solvents. Phytother. Res;10(4):335-336.

Trabulsi, L.R.; Altherthun, F. 2005. Microbiologia. Livraria Atheneu. 3ª Ed.

Trusheva, B.; Popova, M.; Naydenski, H.; Tsvetkova, I.; Rodriguez, J. G.; Bankova, V. 2004. New polyisoprenylated benzophenones from Venezuelan propolis. Fitoterapia. 75:683–689.

Trusheva, B.; Popova, M.; Bankova, V.; Simova, S.; Marcucci, M. C.; Miorin, P. L.; Pasin, F. R.; Tsvetkova, I. 2006. Bioactive Constituents of Brazilian Red Propolis. e CAM 3(2):249-254.

Uto, Y.; Ae, S.; Koyama, D.; Sakakibara, M.; Otomo, N.; Otsuki, M.; Nagasawa, H.; Kirk, K. L.; Hori, H. 2006. Artepillin C isoprenomics: design and synthesis of artepillin C isoprene analogues as lipid peroxidation inhibitor having low mitochondrial toxicity. Bioorg. Méd. Chem. 15;14(16):5721-5728.

Van den Berg R.; Haenen G.R.M.M.; Van den Berg H.; Bast A. 1999. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. Food Chem. 66(4): 511-517.

Von Gadow, A.; Joubert, E.; Hansmann, C. F. 1997. Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea *(Aspalathus linearis),* □-tocopherol, BHT and BHA. J. Agr. Food Chemi.45:632-638.

Wang, L.; Mineshita, S.; Ga, I.; Shigematsu, T., Matsuno, T. 1993. Anti-. inflammatory effect of propolis. Jpn. J. Pharmacol. Ther. 24:223–224.

Waterman, P.G.; Mole, S. 1994. Analysis of phenolic plant metabolites. London, Blackwell Scientific Publications.

Weng, J-R.; Lin, C-N.; Tsao, L-T.; Wang, J-P. 2003. Terpenoids with a New Skeleton and Novel Triterpenoids with Anti-inflammatory Effects from *Garcinia subelliptica*. Chemistry 9(22):5520-5527.

Woisky, R.G.; Salatino A. 1998. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. J. Apicult. Res. 37(2):99-105.

Wollenweber, E., Buchmann, S. L. 1997. Feral honeybees in the Sonoran Desert: Propolis sources other than poplars (*Populus* spp.). J. Z. Natur. 52(7-8):530-535.

Wu, P.; Ye, L. 2000. Determination of effective components in propolis. Wei Sheng Yan Jiu. 29(2):123-124.

Yamauchi, R. ; Kato, K.; Oida, S.; Kanaeda, J. ; Ueno, Y. 1992. Benzylcaffeate,an autioxidative compound isolated from propolis. Biosc. Biotechnol. Biochem. 56 (8) 1321-1322.

Yildirim, Z.; Sogut, S.; Odaci, E.; Iraz, M.; Ozyurt, H.; Kotuk, M.; Akyol, O. 2004. Oral erdosteine administration attenuates cisplatininduced renal tubular damage in rats. Pharmacol. Res. 47:49–156.